

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abbès Laghrour Khenchela
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire



Thème

*Investigation phytochimique et étude in vitro du
potentiel antioxydant des flavonoïdes extraits d'une
espèce locale d'*Allium sativum**

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master
Option : Biochimie Appliquée

Par

HAMOUDAOUI Hanan
BOULEBIAR Fairouz
AYADI Ghania

Soutenu le 25/06/2014

Devant le jury

Président : M^{elle} Benredjem Lamia (M.A.A) Univ. Abbès Laghrour-Khenchela
Encadreur : M^{me} Douaouya Lilia (M.A.A) Univ. Abbès Laghrour-Khenchela
Examineur : M^{elle} Nadji Hamida (M.A.A) Univ. Abbès Laghrour-Khenchela

Année Universitaire : 2013/2014

Remerciements



En premier lieu, nous tenons à remercier notre DIEU, notre créateur pour nous avoir donné la force pour accomplir ce travail.

Nous désirons exprimer nos profonde remerciements et notre vive reconnaissance à notre encadreur

Mme .DOUAOUIA Lilia

Qui a mis toute sa compétence à notre disposition, pour ces directives et Conseils judicieux et pour son suivi régulier à l'élaboration de ce modeste travail ;

Merci également pour votre encadrement, votre disponibilité et votre gentillesse.

Nous tenons à remercier très vivement M^{lle} BENREDJEM Lamia qui nous a honoré en acceptant d'être présidente de ce jury.

Nos remerciements s'adressent aussi à M^{lle} NADJI Hamida de nous avoir accordé le privilège de participer à ce jury et d'examiner avec soin ce mémoire.

Nous tenons à exprimer nos remerciements aussi aux membres du laboratoire de biochimie pour leur aide précieuse.

Nos derniers remerciements et ce ne sont pas les moindres, vont à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour l'aboutissement de ce travail.

Dédicace

À **ALLAH** le Tout miséricordieux, le très miséricordieux, louange à Toi qui nous a inculqué la force nécessaire et le courage pour mener à bien ce travail.

À **MON CHER PÈRE ET MA CHÈRE MÈRE** ;

Votre affection sans limite m'a accompagné tout au long de mes études. Je ne pourrai jamais vous en remercier assez. Puisse ce travail vous combler de joie et d'espoir.

Qu'Allah vous garde longtemps parmi nous.

À **MON MARI** pour son écoute, ses encouragements, merci d'avoir toujours cru en moi

À **MES FRÈRES** et **MES SŒURS**

À mes sœurs, meilleures amies et source profonde d'inspiration ; **NASSIMA ET KHADIDJA** ;

Merci de l'irremplaçable et inconditionnel soutien.

Merci à tous...

je vous aime.

FAIROUZ

Dédicace

A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, J'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

- ❖ A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.
- ❖ A mon cher père qui ma appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements.
- ❖ A mon mari louardi qui n'a jamais cessé de croire en moi source d'amour et de tendresse
- ❖ A ma belle mère Cherifa
- ❖ A mon beau père Ahmed
- ❖ Ames frères : Rachid ; Farid ; Hassan .
- ❖ Ames sœurs : Sabah ; Dalila ; Warda ; Souad ; Malika ; Fatma ; Taffaha .
- ❖ Mes amis : Hakima ; Nawal ; Zohra ; Khadija ; Kaltoum ; Rachida ; Wahiba ; Nafissa ; Nourelhouda ; Samira ; Nassira ; Khawla
- ❖ A tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire.

GHANIA

Dédicace

Je Dédie ce modeste travail à :

Mes chers parents, pour leur endurance

et leurs sacrifices sans limites

Mon mari

Mes frères et sœurs,

en reconnaissance de leur affection toujours constante

Tous mes proches

Mes amis

Mes camarades de promotion

Tous mes enseignants

Tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire

HANANE

SOMMAIRE

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
INTRODUCTION GENERALE.....	01
<i>PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	
CHAPITRE I : LES PLANTES MEDICINALES	
I- Généralités.....	03
I-1-La phytothérapie.....	03
I-2-Les plantes médicinales.....	03
I-3-Principes actifs des plantes médicinales.....	03
I-4- Domaines d'application des plantes médicinales.....	05
CHAPITRE II : <i>Allium sativum</i>	
II-Généralités	08
II-1-Position systématique.....	08
II-2-Description botanique.....	08
II-3-Sous espèces et variétés.....	09
II-4-Origine.....	09
II-5- Composition chimique et principes actifs.....	09
II-6- Recherches et principaux effets.....	11
CHAPITRE III : LES AGENTS ANTIOXYDANTS	
III-Généralités.....	13
III-1-Stress oxydant.....	13
III-2- Les radicaux libres.....	14
III-3-Les antioxydants.....	16
III-3-1-Classification des antioxydants par rapport à leur mécanisme d'action.....	16
III-3-2-Classification des antioxydants suivant la nature chimique.....	17
III-3-2-1- Les antioxydants naturels.....	18
III-3-2-2-Les antioxydants synthétiques.....	23
III-3-3-Mécanismes d'actions des antioxydants.....	23
III-3-4-Les composés phénoliques.....	23
III-3-5-Les flavonoïdes.....	24
III-3-5-1-Définition.....	24

III-3-5-2-Structure et classification.....	25
III-3-5-3-Localisation, distribution et biodisponibilité des flavonoïdes.....	25
III-3-5-4-Activités biologiques des flavonoïdes.....	25
III-3-5-4-1-Activités anti-inflammatoires et immunologiques.....	25
III-3-5-4-2-Activité antivirale.....	26
III-3-5-4-3-Activité antioxydante.....	26

PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE IV : MATERIEL ET METHODES

IV-1- Matériel végétal	27
IV-2- Extraction	27
IV-2-1-Préparation de l'extrait aqueux total.....	27
IV.2.2 Préparation de l'extrait méthanolique brut	27
IV-2-3- Fractionnement de l'extrait brut.....	27
IV-3- Dosage des polyphénols.....	30
VI-4-Teneur en flavonoïdes.....	30
IV-4-1- Test préliminaire	30
IV-4-2- Dosage des flavonoïdes	31
IV-5- Analyse de la composition chimique des flavonoïdes par CCM	31
IV-6- Etude de l'activité anti-oxydante par test au DPPH	32
IV-7- Etude statistique	33

CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSION

V-1-Détermination de rendement d'extraction.....	34
V-2- Teneur en polyphénols	35
V-3- Teneur en flavonoïdes	36
V-3-1- Test préliminaire.....	36
V-3-2- Dosage des flavonoïdes.....	37
V-4- Résultat de la CCM des fractions issues d'extrait brut méthanolique	38
V-5-Test au DPPH.....	45
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	47

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AG :	Acide Gallique
AlCl₃:	Trichlorure d'aluminium
BHA :	Butylhydroxyanisole
BHT :	Butylhydroxytoluène
CAT:	Catalase
CCM :	Chromatographie sur couche mince
CLHP :	Chromatographie liquide de haute performance
CPG :	Chromatographie en phase gazeuse
Cu :	Cuivre
DO :	Densité optique
DPPH :	1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl
EMB :	Extrait méthanolique brut
ETA_{As} :	Extrait total aqueux
GR :	Glutathion réductase
GSH :	Glutathion réduit
GSSG :	Glutathion oxydé
GPx :	Glutathion peroxydase
H₂O₂ :	Peroxyde d'hydrogène
HOCl :	Acide hypochloreux
m/v :	Masse/Volume
NADP :	Nicotine amide adénine di nucléotide phosphate liquide
NADPH :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
Na₂CO₃ :	Carbonate de sodium à haute performance
NO :	Oxyde d'azote
NO₂ :	Dioxyde d'azote
O₂⁻ :	Le radical superoxyde
O₃ :	Ozone
ONOO⁻ :	Peroxynitrite
OMS :	Organisation mondiale de la Santé
PG :	Gallate propylée
R :	Radicaux

Rdt :	Rendement
Rf :	Rapport frontal
RNS :	Espèces réactives de l'azote
RO₂ :	Le radical peroxyde
ROS :	Espèces réactives de l'oxygène
RO· :	Radical alcoxyde
SOD:	Superoxyde dimutase
TBHQ :	Tétra butyl hydroquinone
XO :	Xanthine oxydase
Zn :	Zinc

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Photo d' <i>Allium sativum</i>	09
Figure 2 : Principaux composés soufrés du l' <i>Allium sativum</i>	11
Figure 3 : Les systèmes de défense contre les radicaux libres	17
Figure 4 : Principales étapes de la défense enzymatique contre les espèces réactives de l'oxygène.....	19
Figure 5 : Structure de base des flavonoïdes.....	25
Figure 6 : Piégeage des espèces réactives oxygénées par les flavonoïdes.....	26
Figure 7: Préparation de l'extrait aqueux total	28
Figure 8 : Protocole résumant les étapes de fractionnement de l'EMB	29
Figure 9 : Forme libre et réduite du DPPH	32
Figure 10 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	35
Figure 11 : Courbe d'étalonnage de la quercétine	37
Figure 12 : Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait éther de pétrole..	39
Figure 13: Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait acétate d'éthyle...	41
Figure 14 : Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait butanolique.....	42
Figure 15 : Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait méthanolique par le système solvant : butanol /a. acétique/ H ₂ O.....	43
Figure 16: Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait méthanolique par le système solvant : Acétate/ H ₂ O	44
Figure 17 : Activité anti-oxydante relative des extraits d' <i>Allium sativum</i>	45
Figure 18 : Changement d'absorbance des extraits d' <i>Allium sativum</i>	46

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques	13
Tableau 2 : Les grandes familles de polyphénols.....	22
Tableau 3 : Activités biologiques des composés polyphénoliques.....	24
Tableau 4 : Tableau récapitulatif regroupant les rendements des différents extraits.....	34
Tableau 5 : Teneur en polyphénols des extraits d' <i>Allium sativum</i>	36
Tableau 6 : Virement de la couleur des extraits d' <i>Allium sativum</i>	36
Tableau 7 : Teneur en flavonoïdes des extraits d' <i>Allium sativum</i>	38
Tableau 8 : résultat de la CCM de la fraction éther de pétrole.....	39
Tableau 9 : résultat de la CCM de la fraction acétate d'éthyle.....	40
Tableau 10 : résultat de la CCM de la fraction butanolique.....	41
Tableau 11: résultat de la CCM de la fraction méthanolique système solvant : butanol /a. acétique/ H ₂ O.....	43
Tableau 12: résultat de la CCM de la fraction méthanolique système solvant : Acétone / H ₂ O.....	44

INTRODUCTION GENERALE

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies. Actuellement, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 80% des habitants de la terre ont recours aux préparations traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire(1).

Depuis toujours les plantes ont constitué la source majeure des médicaments grâce à la richesse de ce qu'on appelle le métabolisme secondaire (2,3). Plus de 120 composés provenant de plantes sont aujourd'hui utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont utilisés selon leur usage traditionnel. Parmi, les 25 composés pharmaceutiques les plus vendus au monde, 12 d'entre eux sont issus de produits naturels. Cela signifie que le nombre de médicaments issus de produits naturels est supérieur à celui issus de la chimie combinatoire où plus de 10 000 molécules doivent être synthétisées puis testées afin de mener au développement d'un seul médicament. Par conséquent, les quelques 250 à 300 000 espèces inventoriées de plantes que l'on trouve sur terre, dont seulement 5 à 15% ont fait l'objet de recherches de molécules bioactives, représentent un réservoir immense de nouveaux composés médicinaux potentiels. Selon certains auteurs, les composés d'origine naturelle présentent l'avantage d'une très grande diversité de structures chimiques et ils possèdent aussi un très large éventail d'activités biologiques (4). L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives (5). Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie, en alimentation, en cosmétologie et en dermopharmacie, Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les lignanes, les terpènes et les flavonoïdes (6).

Les flavonoïdes constituent un groupe de produits naturels appartenant à la famille des polyphénols, largement représentés dans la quasi-totalité des plantes, faisant partie intégrante de notre nourriture quotidienne. Ils possèdent potentiellement des activités biologiques, anti-inflammatoires, anti-cancérogènes, antimicrobiennes et anti-oxydantes. Les épices et les herbes aromatiques sont considérés comme des sources importantes de flavonoïdes(7).

L'ail est une panacée utilisée dans l'alimentation et les préparations médicinales depuis l'antiquité. Ses molécules biologiquement actives lui confèrent plusieurs vertus thérapeutiques.

C'est pourquoi nous nous sommes intéressé à entreprendre ce travail qui est subdivisé en deux parties essentielles; initié par une synthèse bibliographique qui englobe et rassemble des données théoriques sur les plantes médicinales et leurs substances bioactives, les problèmes liés aux radicaux libres et l'importance des substances naturelles dans la lutte anti-radicalaire, en exposant la plante médicinale choisie «*Allium sativum*» et élucide sa composition en principes actifs et leurs activités biologiques.

La partie pratique consiste premièrement aux étapes d'extraction des flavonoïdes, leur identification par CCM, étude de leurs teneurs en polyphénols ainsi qu'en flavonoïdes et l'exploration du pouvoir anti-radicalaire *in vitro* par le test de DPPH.

I-Généralités :

I-1-La phytothérapie :

(du grec « phytos » = plante, et « therapiea » = thérapie) est l'art de soigner par les plantes (8, 9, 10) C'est l'utilisation thérapeutique des plantes médicinales et de leurs extraits. Dans la mesure où les plantes sont utilisées pour produire l'effet contraire aux symptômes, la phytothérapie relève de l'allopathie au sens strict. Si la phytothérapie peut n'être qu'une allopathie végétale lorsqu'on se contente de mettre en relation les propriétés pharmacologiques et les indications thérapeutiques, elle devient au contraire, une aide appréciable lorsqu'elle prend en compte la gestion du stress qui engendre des déséquilibres immunitaires, neurovégétatifs et hormonaux. La phytothérapie fait donc partie de l'arsenal thérapeutique à la disposition du vétérinaire. C'est une médecine dite « de terrain », de type allopathique, (8) qui repose sur l'utilisation des propriétés thérapeutiques des plantes médicinales (11, 17). La phytothérapie est le traitement des maladies par des plantes dites médicinales (12).

I-2- Les plantes médicinales :

La phytothérapie peut être vue comme un précurseur de la pharmacologie moderne (13).L'origine des plantes médicinales est importante à la compréhension de leurs propriétés biologiques (14). Les propriétés thérapeutiques d'une plante ne peuvent pas être transposées à celles de l'une de ses préparations sans connaissances précises des constituants responsables des propriétés de la plante, de la méthode d'extraction des principes actifs, de la galénique, de la voie d'administration et des conditions de conservation des produits issus des plantes médicinales (17). Une plante médicinale est définie par une « drogue végétale (10, 13, 15, 16, 18, 19) ».La plante médicinale couramment utilisée en phytothérapie pour ses propriétés sédative, vasculoprotectrice et anti-oxydante (20).

I-3-Principes actifs des plantes médicinales :

La phytochimie, c'est-à-dire l'étude de la structure et des propriétés chimiques des constituants des plantes médicinales (21, 22) est fondamentale à la compréhension de leurs mécanismes d'action. Les métabolites végétaux peuvent être classés en deux catégories :

Les métabolites primaires: métabolisme primaire, qui donne origine aux métabolites nécessaires à la survie de la plante (13), tels que les glucides, les acides aminés, les

protéines et les lipides (8), sont les acteurs des réactions nécessaires à la vie des végétaux : photosynthèse, respiration, et absorption des nutriments (8).

Les métabolites secondaires, ne semblent pas avoir d'importance à l'échelle de la cellule végétale, mais jouent un rôle prépondérant dans l'adaptation des végétaux (8, 13) à leur environnement, notamment grâce à leur pouvoir antioxydant qui les protège des radicaux libres produits au cours de la photosynthèse (caroténoïdes, flavonoïdes), à leur capacité d'attirer des agents de pollinisation ou de dissémination des graines (terpénoïdes), et à leur intervention dans l'éloignement des herbivores et insectes ravageurs(alcaloïdes) (8, 23).

Cependant, certains de ces composés ont aussi un intérêt thérapeutique qui n'est généralement pas abordé dans les programmes enseignés dans les écoles vétérinaires. Les métabolites secondaires sont des molécules complexes à l'origine de l'activité thérapeutique des plantes médicinales, et dont les précurseurs sont des métabolites primaires ou des produits intermédiaires Leur connaissance est donc indispensable pour la compréhension et l'utilisation efficace de la phytothérapie moderne (8). La diversité des métabolites secondaires s'oppose à l'ubiquité des métabolites primaires. Ils peuvent être classés selon plusieurs systèmes dont aucun n'est entièrement satisfaisant. Pour les chimistes et les pharmacologistes, il est plus pratique de les classer selon leur voie biosynthétique et leur structure ; alors que pour les cliniciens, un classement selon leur mode d'action serait plus approprié. Il serait illusoire de vouloir présenter individuellement chacune des molécules impliquées dans l'activité des plantes médicinales. Ainsi, nous préférons présenter les principes actifs leur conférant leurs propriétés biologiques selon une classification fondamentale biosynthétique en mettant en évidence la pertinence clinique de chaque groupe. Cependant, il est important de noter que des métabolites d'origine biosynthétique commune n'ont pas systématiquement des propriétés biologiques communes (8).

- Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des molécules hétérocycliques azotées basiques d'origine végétale (8, 21, 24). Les premiers alcaloïdes isolés chimiquement furent la morphine (2, 13).

-Polysaccharides

Les polysaccharides sont des complexes de carbonate d'origine végétale et fongique.

Leurs propriétés sont nombreuses, ils sont notamment capables de :

- ✓ Former un gel hydro colloïde, appelé mucilage ou gomme.

- ✓ Réduire la triglycémie en diminuant la synthèse hépatique d'acide gras.
- ✓ Stimuler le renouvellement et la synthèse des acides biliaires (8).

-Glucosinolates

Les glucosinolates sont des hétérosides soufrés présents dans les plantes de la famille des Brassicales. Leur hydrolyse permet la libération d'aglycones, dérivés d'acides aminés (10).

-Terpènoïdes

Les terpènoïdes sont des molécules de faible poids moléculaire, volatiles, dérivés de l'isoprène (C₅H₈) (8, 13, 21, 25) et entrant dans la composition des huiles essentielles. (8).

-Diterpènoïdes

Composés de 4 unités isoprènes, les diterpènoïdes sont des molécules de haut poids moléculaire formé de vingt atomes de carbone (26). Grâce à leur caractère lipophile, elles sont très bien absorbées par les muqueuses digestives, et sont utilisées pour leurs propriétés antioxydantes (8).

-Triterpènoïdes et saponines stéroïdiennes

Les triterpènes sont des molécules à 30 atomes de carbone (26) synthétisées à partir d'unités isoprènes, alors que les saponines stéroïdiennes, appelées aussi phytotrons, sont des molécules tétra cycliques synthétisées à partir de l'acétylcoenzyme A. Malgré leur structure distincte, la majorité de leurs propriétés sont communes (27).

- Phénols et dérivés

Les phénols sont des composés aromatiques possédant au moins une fonction hydroxyle, et sont réputés pour leur pouvoir antioxydant (13, 25, 28). Ce sont les constituants les plus répandus dans les plantes médicinales (13, 28).

I-4-Domains d'application des plantes médicinales :

Les substances naturelles issues des végétaux ont les intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolismes secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des nouvelles molécules actives, ou des matières premières pour la semi- synthèse (29). Il y a en donc un réveil vers un intérêt progressif dans l'utilisation des plantes médicinales dans les

pays développés comme dans les pays en voie de développement, parce que les herbes fines guérissent sans effet secondaire défavorable. Ainsi, une recherche des nouvelles drogues est un choix normal (30).

-Utilisation en médecine :

En tant que médicament pour l'homme :

-En urologie, dermatologie, gastrites aiguës, toux, ulcères d'estomac, laxatifs, sommeil et désordre nerveux (31).

- Système cardiovasculaire, exemple : Flavocoe est un médicament constitué par la lavone non substitué en combinaison avec la rutine et isoquercetine est utile dans le Traitement de l'athérosclérose (32).

-Drogues immunostimulantes, antispasmodiques et anti-inflammatoires (*Malaleuca alternifolia*, *Echinacea angustifolia*, *Chrysantenun parthenium*, *Achillea millefolium...*etc) (31, 33, 34).

-Contre le diabète (*Azadirachta indica*, *Annona squamosa*, *Musanga cecropioides...*etc) (34, 35, 36).

-Les maladies de stress, des activités antioxydantes, tels le thé noir, le thé vert et le cacao sont riches en composés phénoliques, parmi les quels théaflavine, le resveratrol, le gallate et épigallocatechine procyanidine très étudié en raison de leur rôle en tant qu'agent chémopreventifs basés sur leurs capacités antioxydantes (37).

D'excellentes capacités à inhiber les réactions oxydatives ont été mises en évidence pour les huiles essentielles de romarin et sauge gingembre (38).

-Activité antimicrobienne, antivirale, antiparasitaire: les produits naturels des plantes depuis des périodes très anciennes ont joué un rôle important dans la découverte de nouveaux agents thérapeutiques ex: la quinine obtenue à partir du quinquina "*Cinchona*". A été avec succès employée pour traiter le malaria (39), l'arbre de thé (*Malaleuca alternifolia*) est renommé pour ses propriétés: anti-bactériennes, antiinfectieux, antifongiques et antivirales (31), aussi comme antivirale (*Azadirachta indica*, *Aloe vera*, *Withania somnifera*, *Curcuma louga...*etc) (34, 40) mais aucune plante n'est aussi efficace que les médicaments anti rétroviraux pour arrêter la réplication du VIH (40), antifongiques (*Capsicum annum*, *Allium ramosum*, *Allium sativum*, *Tulbaghia violacea...*) (41).

-En alimentation :

Assaisonnements, des boissons, des colorants (31, 42) et des composés aromatiques (43). Les épices et les herbes aromatiques utilisées dans l'alimentation sont pour une bonne part responsable des plaisirs de la table (44), considérées comme condiments et aromates. La popularité des épices et des herbes aromatiques a été et reste liée à leurs propriétés organoleptiques. La notion de flaveur des épices et aromates recouvre l'ensemble des perceptions olfacto-gustatives. Ces perceptions résultent de stimuli générés par une multitude de composés organiques dont certains sont volatils et constituent ce qu'on appelle en général l'huile essentielle. Les autres non volatils, sont plus particulièrement responsables de la saveur et de la couleur (45, 46, 47).

-En cosmétique :

Des produits de beauté, parfums et articles de toilette, produits d'hygiène (42).

II- Généralités :

I-1- Position systématique (48) :

➤ **Classification classique :**

Règne : Plantae

Sous- Règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Liliopsida

Sous- Classe : Liliidae

Ordre : Liliales

Famille : Liliaceae

Genre : *Allium*

Espèce : *sativum L*

➤ **Classification phylogénétique :**

Ordre : Asparagales

Famille : Alliaceae

Non scientifique : *Allium sativum L*

Nom commun : Ail, ail cultivé, ail à tige tendre, thériaque des pauvres.

Nom vernaculaire arabe : ثوم

Parties utilisés : Bulbes.

Les liliaceae sont des monocotylédones cosmopolites, comprenant plusieurs milliers d'espèces. Vivaces le plus souvent caractérisées par un rhizome ou par un bulbe, surtout dans les pays tempérés (ex : tulipe, jacinthe, muguet, oignon, ail, scille), elles sont parfois un port d'arbre ou de liane dans les pays chauds (ex : aloès, yucca, dragonnier). Le genre *Allium* comprend plusieurs centaines d'espèces (ex : poireau, oignon, ciboule) originaire de l'hémisphère Nord (49).

II-2- Description botanique :

Plante pérenne herbacée, bulbeuse et vivace, rarement bisannuelle ; atteignant 25 à 70cm de hauteur, l'ail est une espèce à nombreuse feuilles engainant le bas de la tige. L'inflorescence est enveloppée d'une spathe en une seule pièce tombant assez rapidement. Les fleurs sont groupées en ombelles. Assez peu nombreuses, elles sont de couleur blanche ou rose et s'épanouissent en été. Le fruit est une capsule à trois loges, mais celle ci est rarement produite (50). La racine à bulbe est composée de trois à 20 bulbilles (gousses)

arqués (les caïeux) (figure 1). On la récolte en juillet- août. L'odeur faible, se développe forte et soufrée- dès que les tissus sont lésés (51).



Figure 1 : Photo d'*Allium sativum*

II-3- Sous-espèces et variétés :

On distingue deux sous-espèces, qui se plantent à des époques différentes de l'année : subsp, ophioscorodon, plantée en automne et subsp, sativum, plantée au printemps. Les deux sous- espèces sont respectivement appelée « ail d'automne » et « ail de printemps ». Indépendamment de la couleur réel du bulbe, l'ail dit blanc est généralement l'ail d'automne, l'ail rose est l'ail de printemps. Le premier est planté d'octobre à décembre selon le climat. L'autre est mis en terre entre novembre et janvier. Dans les deux cas, la récolte à lieu au juin- juillet (50).

II-4- Origine :

Plante cultivée mondialement comme épice, dans les zones chaudes et tempérées, originaire d'Asie Centrale. L'ail est surtout importé des pays méditerranés, mais aussi plus récemment de Chine. Sa culture est facile, puisque l'ail croit sur tous les sols, mais de préférence sur les terrains meubles ou même les sables, où les bulbes peuvent atteindre une grosseur considérable. L'ail était cultivé par les anciens Egyptiens. L'on rapporte que les bâtisseurs des pyramides en faisaient usage pour rester en bonne santé et éviter les maladies infectieuses. Le culte grec dédié à Rhéa, mère de Zeus, interdisait toute vénération à celui qui avait préalablement consommé de l'ail.... Ainsi, quiconque en avait consommé était privé d'entrée au temple de Cybèle encore dénommé « Grande Déesse de Phrygie ». Les Romains par contre en faisaient cas (52, 53).

II-5- Composition chimique et principes actifs :

La gousse d'ail renferme des polysaccharides de réservés (des fructanes) des acides amines, des sels minéraux (potassium, soufre, fer, cuivre, magnésium...) des oligoéléments assez rares dont du sélénium, du germanium et du tellurium, des enzymes (allinase,

peroxydase, myrosinase..etc) , des vitamines (A,B1, B2, C,E), des saponosides (hétérosides de furostanols : sativosides, proto- érubosides- B, etc) et est surtout connue pour ses composés soufrés responsables de la majorité des propriétés pharmacologiques . Le constituant principal de l'ail frais non contusé est l'alliine ou sulfoxyde de Sallyl L-(+)-cystéine. Lorsque les tissus sont coupés ou broyés, l'alliine est dégradé par l'alliinase (S-alkyl-L-cystéine sulfoxyde lyase), en acide pyruvique et acide 2- propènesulférique, ce dernier étant aussitôt transformé en allicine (0,3% de la masse fraîche et à forte odeur aillé). L'oxydation à l'air de l'allicine conduit au 1,7 dithioocta-4,5- diène, connu sous le nom de désulfure de diallyle : c'est le constituant majoritaire de l'« essence » d'ail (à l'odeur également marquée) (14). L'analyse fine des extraits alcooliques d'ail montre également la présence des produits de condensation de l'allicine, les 6Z – et 6E- ajoènes (4,5, 9- trithiadodéca- 1,6, 11- trièn -6-S-oxyde) et de produits de cyclo-addition du propénethial (vinyldithiines) (54). Il à été montré que beaucoup de composés identifiés en CPG dans les diverses « essences » d'ail ne sont que des artéfacts : l'analyse en CLHP des produits obtenus par simple distillation sous vide poussé et à température ambiante ne met en évidence que des thiosulfates R-S (O) S-R' ; l'allicine (R=R'= allyl), étant nettement prépondérante (80-90%) (50, 52) (figure2). Il convient de distinguer entre :

- ❖ **L'ail frais**
- ❖ **Poudre d'ail** : l'or de sa préparation, il est important de conserver le système «alliine- allinase » et d'inhiber une transformation ultérieure de l'allicine déjà formée. Généralement, la poudre d'ail est préparer en fragmentant rapidement l'ail (« flocons » d'environ 5mm d'épaisseur) et en le séchant immédiatement à environ 60°C (52).
- ❖ **Macéras huileux** : préparés en agitant pendant 48 heures de l'ail fraîchement fragmenté dans l'huile grasse (52).
- ❖ **Essence d'ail** : il ne s'agit pas à proprement parler d'une huile essentielle « vraie », puisqu'elle est obtenue par une macération aqueuse préalable, pendant plusieurs heures, d'ail fraîchement fragmenté suivie d'une distillation à la vapeur d'eau. Ainsi, 100g d'ail frais fournissent environ de 0,02 à 0,4 g d' « essence » d'ail (50).
- ❖ **Extrait sec d'ail** : en 1996, la fabrication d'un extrait sec à été brevetée (55 ,56): les « gousses » d'ail non pelées sont soumises tout d'abord à un traitement de courte durée par les micro- ondes, ce qui inactive l'allinase ainsi, lors de l'extraction hydro alcoolique ultérieure, les composés soufrés odorant ne peuvent se développer et seuls les constituants hydrophiles de l'ail sont extraits.

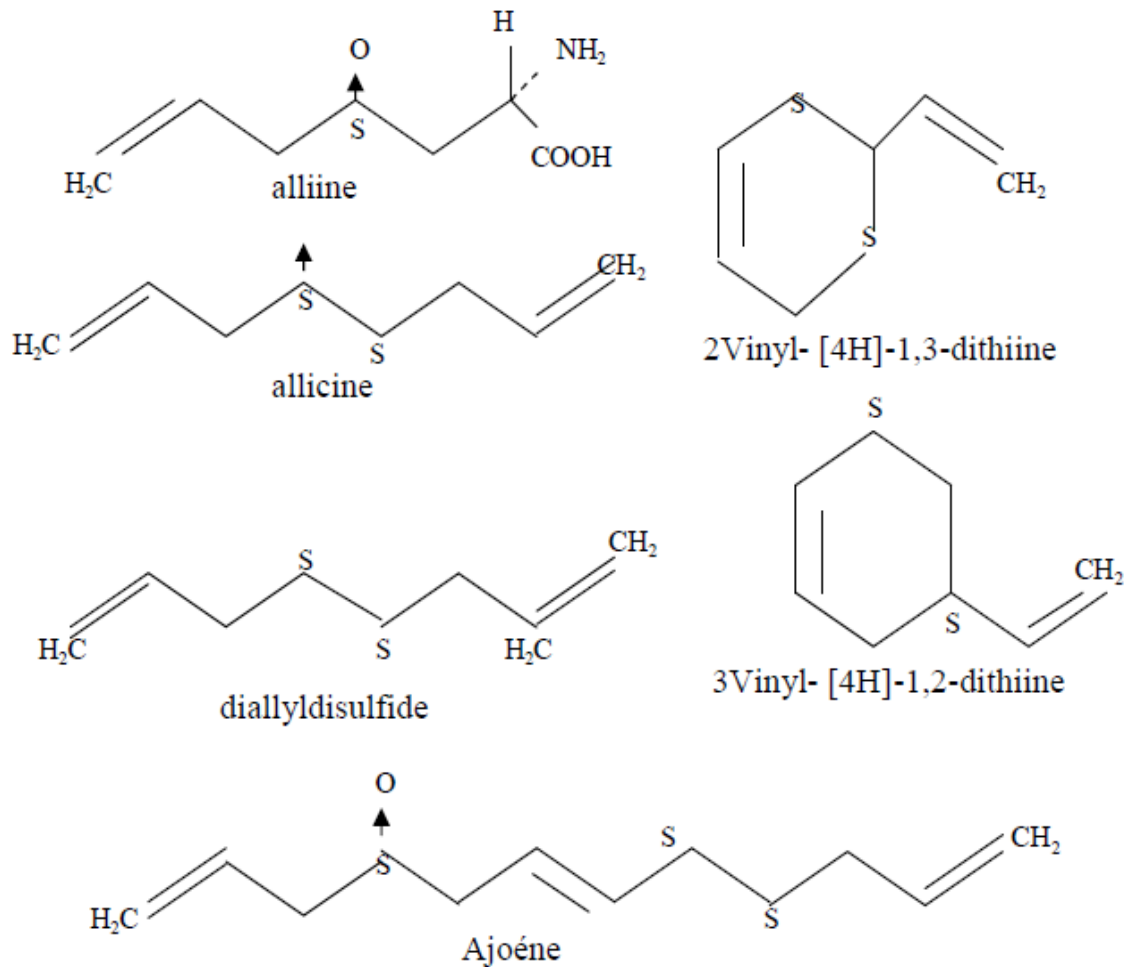


Figure 2: Principaux composés soufrés du l'*Allium sativum*

II-6- Recherches et principaux effets :

L'ail est une plante alimentaire très commune, un condiment commercialisé dans le monde entier mais qui possède aussi des propriétés pharmacologiques et thérapeutiques fort intéressantes. Au cours des dernières décennies, les chercheurs ont publié plus de 2000 recherches scientifiques et un grand nombre d'études ont été réalisées afin de mieux connaître les principes actifs de l'ail et leurs effets physiologiques. Différentes études sur des animaux ou in Vitro ont mis en évidence une activité anticancérogène des composés actifs de l'ail (diallyl sulfide, le diallyl disulfide et l'ajoène). Ce sont principalement ces composés qui pourraient empêcher certaines cellules cancéreuses de se multiplier et ainsi protéger l'organisme contre de potentiels agents cancérogènes (57, 58, 59). Dans certaines études, l'allicine a été proposée comme étant le principal composé actif associé à l'effet cardioprotecteurs de l'ail (60), entre autres par sa capacité de réduire les plaques d'athérosclérose chez l'animal (61). Par contre, lors qu'on tient compte du fait que l'allicine n'est pas absorbé dans le sang durant la consommation d'ail, il est peu probable

qu'elle contribue autant que tel à l'effet sur la santé cardiovasculaire **(62)**. L'allicine serait plutôt un composé transitoire rapidement transformé en d'autres composés sulfurés qui, eux, sont actifs dans l'organisme **(63)**.

L'ajoène serait un composé capable d'empêcher la synthèse (formation) du cholestérol in vitro **(64, 65)** et pourrait ainsi jouer un rôle dans l'effet hypocholestérolémiant attribué de l'ail.

Les antioxydants sont des composés qui protègent les cellules du corps des dommages causés par les radicaux libres. Ces derniers sont des molécules très réactives qui seraient impliquées dans le développement des maladies cardiovasculaires, de certains cancers et d'autres maladies liées au vieillissement **(66)**. L'ail contient différents composés antioxydants tels des flavonoïdes **(67)** et des tocophérols **(68)**, en plus des composés sulfurés qui contribueraient aussi à son activité antioxydants **(69)**. La consommation d'ail frais (cru ou cuit) augmenterait l'activité antioxydante dans le plasma chez des rats **(70)**. L'ail possède une capacité antioxydante plus élevée qu'une large sélection de légumes **(71,72)**. Concernant l'hypertension artérielle, l'OMS indique que l'ail peut être utile en cas d'hypertension modérée. Plusieurs essais cliniques démontrent que l'ail peut effectivement être utile à ce chapitre **(73, 74,75)**.

Les propriétés antibactérienne et antifongiques de l'ail sont bien connues **(76)**.

III-Généralités :

III-1-Stress oxydant :

Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène (78) et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (79). Les espèces oxygénées activées sont produites en permanence dans l'organisme, et sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie cellulaire (prolifération cellulaire normale, métabolisme, état redox physiologique pour l'expression de gènes) (80).

Le plus souvent, les espèces réactives de l'azote(RNS) et espèces réactives de l'oxygène(ROS) formées subissent une transformation en une autre forme Réactive. Ainsi, l'anion super oxyde $O_2^{\bullet-}$ et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 peuvent interagir avec les métaux de transition (fer, cuivre) pour générer des radicaux hydroxyles $\bullet OH$. De même, NO^{\bullet} se combine aisément avec $O_2^{\bullet-}$ pour former le peroxyde d'azote $ONOO^-$, agent non radicalaire à la fois oxydant et nitrosant. Grâce à la présence d'antioxydants, il existe un équilibre physiologique subtil entre la production et l'élimination des ROS et RNS (81)

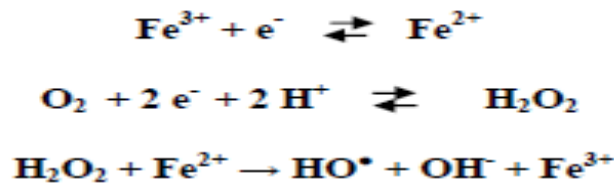
Tableau 1. Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques (82)

Nom	Symbole
Espèces radicalaires	
Anion superoxide	$O_2^{\bullet-}$
Radical hydroxyle	OH^{\bullet}
Monoxyde d'azote	NO^{\bullet}
Espèces non radicalaires	
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Acide hypochlorique	$HOCl$
Oxygène singulier1	O_2
Peroxyde d'azote	$ONOO^-$

III-2- Les radicaux libres :

III-2-1- Un radical libre :

Un radical libre est définies comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés (83), cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité, une réaction en chaine débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre (84, 95).



III-2-2-Principaux radicaux libres et leurs origines :

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires (47, 78). Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (47, 80, 78).

Du point de vue de la terminologie, il est souvent fait mention d'espèces réactives de l'oxygène. Ces espèces incluent non seulement des radicaux libres dérivés: anion superoxyde (O_2^-), radical hydroxyle (OH^\bullet), radical hydroperoxyde (HO_2^\bullet), radical peroxyde (RO_2^\bullet), radical alcoxyde (RO^\bullet), mais d'autres espèces non radicalaires dérivées de l'oxygène : peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), acide hypochloreux (HOCl), Ozone (O_3), Oxygène singulet (O_2), peroxyde d'azote (ONOO^-), qui ne sont pas réactives mais peuvent être des précurseurs de radicaux. Par ailleurs, tous les radicaux libres ne sont pas des dérivés de l'oxygène, par exemple le monoxyde d'azote (NO) est un radical libre dérivé de l'azote. Il ne faut pas penser que tous les radicaux d'oxygène sont extrêmement réactifs, cette réactivité étant très variable selon la nature du radical. Ainsi parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, l'anion radicalaire superoxyde comme le monoxyde d'azote ne sont pas très réactifs, mais constituent des précurseurs d'autres espèces plus réactives (16, 78, 80).

III-2-3- Les conséquences moléculaires du stress oxydatif :

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques : oxydation de l'ADN, des protéines, de lipides et des glucides, mais aussi des Lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (78).

Les principales cibles radicalaires sont:

III-2-3-1- L'oxydation de l'ADN :

Les radicaux libres peuvent induire des effets mutagènes ou l'arrêt des réplifications de l'ADN. Ils agissent en provoquant des altérations de bases, des pontages ADN protéines (16). L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, ce qui donne naissance à un grand nombre de bases modifiées. Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque des lipides dont la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine ou éthénodérivés. Les radicaux libres peuvent aussi attaquer les protéines qui sont très nombreuses à entrer en contact avec l'ADN pour le protéger (histones) ou pour le lire (enzymes et facteurs de la réplication ou de la transcription), entraîne des pontages des protéines. Comme ils peuvent attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre Lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin (19, 78).

III-2-3-2- L'oxydation des protéines :

L'action des radicaux libres a lieu sur les chaînes latérales de certains acides aminés comme le Thiol des cystéines. A proximité des sites de liaison d'ions métalliques peuvent se dérouler des réactions d'oxydation qui produisent des acides aminés anormaux. Les radicaux libres sont également responsables de la formation de ponts disulfures qui modifient la conformation des protéines et nuisent à leur activité biologique (activité enzymatique, transduction d'un signal ou système de transport) (75).

III-2-3-3-L'oxydation des lipides :

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical pyroxyde. Cette réaction appelée peroxydation lipidique.

III-2-4-Rôles des radicaux libres :

Le paradoxe des radicaux libres en biologie est qu'ils constituent des espèces extrêmement dangereuses, susceptibles d'engendrer un nombre considérable de maladies, tout en étant des espèces indispensables à la vie. Ils remplissent en effet de très nombreuses fonctions utiles qui à part la phagocytose, ont été découvertes récemment. Les radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes, à la production énergétique, au règlement de la croissance des cellules et à la signalisation intracellulaire (78).

III-3-Les antioxydants :

Les antioxydants sont l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la Production (42, 78), de limiter la propagation ou de détruire les espèces réactives de l'oxygène (37, 81). Sont des composés qui protègent les cellules du corps des dommages causés par les radicaux libres (39, 40). Ils peuvent agir en réduisant ou en dismutant ces espèces, en les piégeant pour former un composé stable, en séquestrant le fer libre ou en générant du glutathion. On distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule (37) Un antioxydant est toute substance, présente à une concentration inférieure à celle du substratoxydable (86).

III-3-1-Classification des antioxydants par rapport à leur mécanisme d'action :

Indépendamment de leur localisation, les antioxydants peuvent agir à deux niveaux : en prévenant la formation de radicaux libres oxygénés ou en épurant les radicaux libres oxygénés (87).

-Groupe I

Plusieurs noms ont été attribués à ce groupe par exemple, antioxydants primaires, chain breaking, piègeur des radicaux libres. Ce genre d'antioxydants peut inhiber la réaction d'initiation et la propagation de l'oxydation en participant au processus d'oxydation et en convertissant les radicaux libres vers leurs formes inactives. Les antioxydants primaires sont généralement des composés phénoliques capables de donner un atome d'hydrogène au radical libre et le convertir en un composé stable non

radicalaire. Les antioxydants de ce groupe réagissent de façon prédominante avec les radicaux peroxydés, pour deux raisons : la concentration élevée de ces radicaux et la faible énergie du groupement (ROO^\cdot), en comparaison avec les autres radicaux comme le (RO^\cdot) et la faible concentration du piègeur du Radical libre dans l'aliment (88).

-Groupe II

Les composés de ce groupe sont catalogués comme préventifs ou antioxydants secondaires. Ils englobent une large gamme de différentes substances chimiques qui inhibent l'oxydation des lipides par différents mécanismes et ne transfèrent pas le radical libre sous sa forme non-radicalaire. Avec quelques exceptions, les antioxydants secondaires sont généralement reliés à l'inhibition de facteurs initiant l'oxydation. Le groupe II inclut : des chélateurs de métaux pro-oxydatifs, des désactivateurs de l'oxygène singlet, des piègeurs de la molécule d'oxygène, inhibiteurs des enzymes pro-oxydative, enzymes antioxydantes et destructeurs des hydroperoxides. (Figure3) Parfois, quelques antioxydants peuvent exercer plusieurs fonctions anti-oxydatives, par exemple, l'acide ascorbique peut être un piègeur du radical libre, désactivateur des oxygènes singlets dans une solution aqueuse et effectivement régénérer du tocophérol. Plusieurs flavonoïdes sont des piègeurs de radicaux libres et chélateurs de métaux (89).

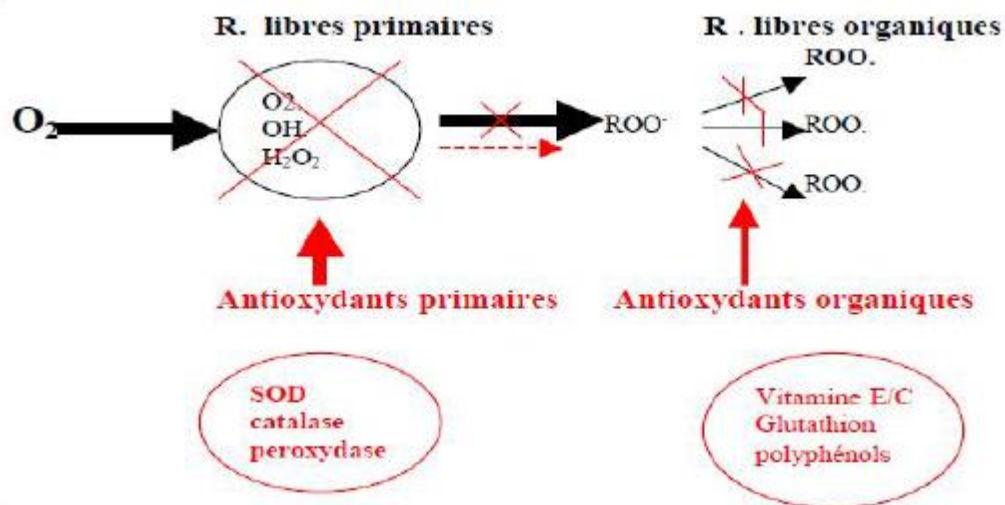


Figure 3 : Les systèmes de défense contre les radicaux libres (89).

III-3-2-Classification des antioxydants suivant la nature chimique :

Plusieurs antioxydants synthétiques et quelques composés naturels (tocophérol, acide ascorbique, Béta-carotène) sont officiellement autorisés pour l'utilisation dans l'alimentation. Leur présence s'avère également nécessaire au sein des produits pharmaceutiques et de cosmétiques afin d'éviter leur dégradation. Cependant, des études toxicologiques ont jugé certains antioxydants synthétiques comme sources de

danger. La recherche de nouveaux antioxydants naturels est l'objectif de nombreux industriels et scientifiques (90).

III-3-2-1-Les antioxydants naturels :

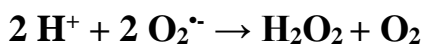
L'organisme possède des systèmes de défense très efficaces, de deux types : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques. Ces antioxydants sont d'autant plus importants que certains peuvent être utilisés en thérapeutique pour tenter de prévenir le stress oxydatif (91).

III-3-2-1-1-Les systèmes antioxydants enzymatiques :

L'organisme humain possède un système enzymatique, constitué principalement de trois enzymes: le superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase. Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (91, 92).

III-3-2-1-1-1-La superoxyde dismutase :

Cette métalloprotéine est classée en trois catégories, la SOD cytosolique (Cu- et Zn dépendante) (81), la SOD mitochondriale (Mn-dépendante), et la SOD extracellulaire. Le superoxyde dismutase (SOD), est une enzyme qui élimine l'anion superoxyde par une réaction de dismutation, elle produit de l'oxygène et du peroxyde d'hydrogène (42, 75). Cette enzyme existe sous deux formes : une cytoplasmique nécessite comme cofacteur les ions de cuivre et de zinc (Cu Zn SOD) et l'autre mitochondriale utilise le manganèse comme cofacteur (Mn SOD) (94, 95, 76).



III-3-2-1-1-2-La catalase :

La catalase est une enzyme intracellulaire, localisée principalement dans les peroxysomes (81).

Le peroxyde d'hydrogène produit par la réaction de dismutation (75,92) peut subir une réaction de Fenton. Il ne faut pas donc qu'il s'accumule, c'est le rôle de la catalase, elle transforme deux molécules de peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène qui sont des composés (76, 93).



III-3-2-1-1-3- La glutathion peroxydase :

La glutathion peroxydase est une enzyme qui constitue l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection car elle est capable non seulement de détoxifier le peroxyde d'hydrogène (92, 81, 37), mais aussi d'autres hydroperoxydes résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras (84). La glutathion peroxydase se trouve dans le cytoplasme et dans les mitochondries (37, 92), elle nécessite la présence de deux cofacteurs importants: le glutathion réduit et le sélénium. En présence de deux molécules de glutathion sous forme réduites, la glutathion peroxydase catalyse la transformation de peroxyde d'hydrogène en deux molécules d'eau. Au fur et à mesure de sa consommation par la glutathion peroxydase, le glutathion doit être régénéré, cela est rendu possible par une glutathion réductase qui consomme une molécule de NADPH fourni par la voie des pentoses phosphates (75) Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans la détoxification active peut être résumé dans le (figure4):

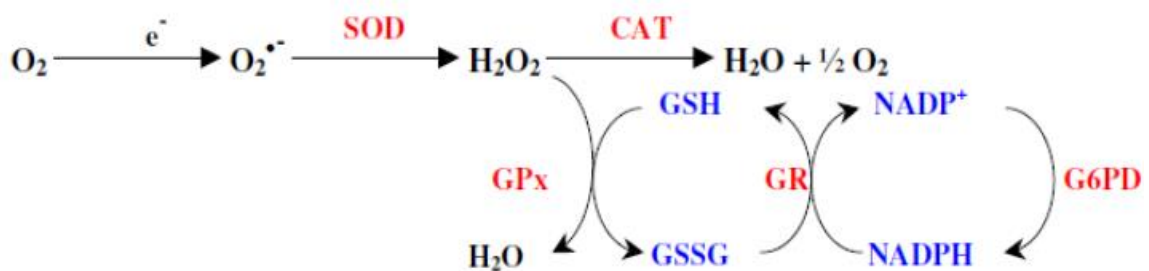


Figure 4 : Principales étapes de la défense enzymatique contre les espèces réactives de l'oxygène (81, 92, 94, 96).

III-3-2-1-2-Les systèmes antioxydants non enzymatiques :

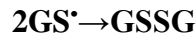
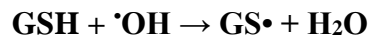
Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les oligoéléments, la glutathion réduit (GSH), les vitamines E et C et les polyphénols (62). Les antioxydants sont des agents redox qui réagissent avec les oxydants et soit stoppent, soit ralentissent les processus d'oxydation (81).

III-3-2-1-2-1-Les antioxydants endogènes :

Les systèmes antioxydants non-enzymatiques endogènes incluent de nombreux thiols dont le majoritaire est le glutathion, largement présent sous forme réduite, qui est capable de réagir, *in vitro*, avec les radicaux (98).

III-3-2-1-2-1-1- Glutathion :

Le glutathion est le thiol le plus abondant dans les organismes et les systèmes vivants. Il est antioxydant par son caractère nucléophile et radicalaire (99) :

**III-3-2-1-2-1-2-Acide Urique :**

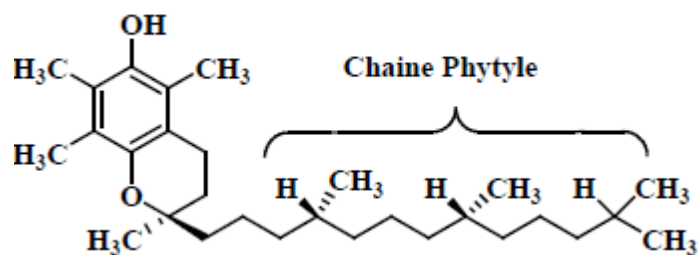
L'acide urique est un piègeur de O_2 , des radicaux peroxydes et hydroxydes ($\text{RO}_2\cdot$ et $\text{HO}\cdot$), de l'ozone et de HClO . La réaction de l'acide urique avec ces ROS génère des radicaux moins réactifs que $\text{HO}\cdot$ (100).

III-3-2-1-2-2- Les antioxydants exogènes :

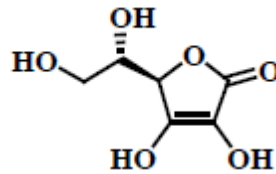
Les antioxydants chimiques exogènes, comprennent majoritairement les vitamines C et E, les caroténoïdes et des composés phénoliques (100)

III-3-2-1-2-2-1-Médicaments :

Ils constituent une source importante d'antioxydants. Actuellement, les classes thérapeutiques comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les antihyperlipoprotéïnémiques, les bêta-bloquants et autres antihypertenseurs ont été évalués pour leurs propriétés anti-oxydantes (92)

III-3-2-1-2-2-2- Les vitamines :**- La vitamine E**

La vitamine E ou α -tocophérol, est un antioxydant liposoluble, elle se localise entre les chaînes d'acides gras des phospholipides qui constituent les membranes et les lipoprotéines (92, 100). Le rôle essentiel de la vitamine E est de capter les radicaux peroxydes lipidiques $\text{RO}_2\cdot$ qui propagent les chaînes de peroxydation (16, 100).

- La vitamine C

La vitamine C ou acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble (**98, 101**) présente dans la plupart des fruits et légumes (non synthétisée par l'Homme (**98**)).

L'ascorbate est un très bon capteur de radicaux libres oxygénés puisqu'il réagit non seulement avec les radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$, mais aussi avec les radicaux superoxydes $\text{O}_2\cdot^-$. En outre, l'ascorbate capte les radicaux peroxydes $\text{RO}_2\cdot^-$. En réagissant avec ces diversoxyradicaux, l'ascorbate est oxydé en radical ascorbyle ($\text{Asc}\cdot^-$) qui est relativement inerte vis-à-vis des matériaux biologiques. L'ascorbate possède une propriété importante qui est la réparation possible de deux autres antioxydants, le glutathion et l' α -tocophérol à partir de leurs formes radicalaires. Il est recyclé, tout au moins en partie, par dismutation du radical ascorbyle (**101**). C'est un puissant réducteur. Il joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E (**92**).

III-3-2-1-2-Exemples des antioxydants exogènes phénoliques naturels :

Une grande partie de ces molécules est présente dans l'alimentation. Les plus connus sont les acides phénoliques (benzoïque ou cinnamique), les flavonoïdes, et les tanins. Les stilbènes et le lignant sont moins connus.

III-3-2-1-2-1-Les flavonoïdes :

Le terme flavonoïde rassemble de nombreux composés naturels répartis en plusieurs familles dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanols, les flavanones, les isoflavones et les anthocyanines (**102**). Les relations structure-activités anti-oxydantes des flavonoïdes et des composés phénoliques ont montré que l'activité anti-oxydante était déterminée par la position et le degré d'hydroxylation (**92**). Ce sont des pigments naturels qui donnent leurs couleurs aux plantes. Des études chez l'homme ont permis de montrer que les flavonoïdes, et notamment les isoflavones contenus dans le soja, permettent de réduire le taux de cholestérol (LDL).

Tableau 2. Les grandes familles de polyphénols (103).

Famille	Principaux composés	Origine
Acide hydroxy- benzoïques	Acide vanillique Acide gallique	Vanille Feuilles de thé
Acides hydro- cinnamiques	Acide caféique Acide férulique Acide chlorogénique	Café Riz, blé, pomme de terre
Stilbène	Resvératrol	Raisin, vin
Flavanoïdes - Flavonols - Flavones - Flavanones - Flavones-3-ols - Isoflavones - Anthocyanidines	Quercétine, kaempférol Luéoline, apigénine Naringénine Catéchine, épicatechine Génistéine, daidzéine Cyanidine	Oignon, brocoli Céleri Agrumes Raisin, chocolat, Soja Fruits rouges, raisin
Tannins hydrosolubles ou non	Polyphénols de haut poids moléculaire	Plantes supérieures
Lignines Lignane Bois	Lignane	Bois

III-3-2-1-2-2-Les tanins :

Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation (104).

III-3-2-1-2-3-Les coumarines:

Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (92).

III-3-2-1-2-4-phénoliques :

Les acides phénoliques sont divisés en deux catégories : les dérivés de l'acide benzoïque comme l'acide gallique ou vanillique et les dérivés de l'acide cinnamique comme l'acide caféique, coumarique, sinapique et férulique. Ces derniers ont une bonne activité antioxydante (40, 105).

III-3-2-2-Les antioxydants synthétiques :

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT) gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matière de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture. Cependant, il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques. En effet, le BHA convertirait certains produits ingérés en substances toxiques ou carcinogènes en augmentant la sécrétion des enzymes microsomales du foie et des organes extra-hépatiques (106).

III-3-3-Mécanismes d'actions des antioxydants :

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulet, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (92).

III-3-4-Les composés phénoliques

Comme définition, nous pouvons dire que les polyphénols sont des composés phénoliques hydrosolubles (25, 107), de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton, et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines (107). Les fonctions principales attribuées à ces composés chez les végétaux sont la protection contre les pathogènes et les herbivores ainsi que la limitation des dommages dus aux radiations UV. Dans ce cas, ils agissent par effet d'écran et par effet antioxydant. Les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes simples et proanthocyanidines) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes. Ces substances sont dotées de certaines activités résumées dans le (Tableau 3).

Tableau 3 : Activités biologiques des composés polyphénoliques (25)

POLYPHENOLS	ACTIVITES
Acides Phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes Antifongiques Antioxydantes
Coumarines	Protectrices vasculaires et antioedémateuses
Flavonoïdes	Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires Antioxydantes
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux
Proanthocyanidines	Antioxydantes Antitumorales Antifongiques Anti-inflammatoires
Tanins galliques et catéchiqes	Antioxydantes

III-3-5-Flavonoïdes :**III-3-5-1-Définition:**

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques (47, 92, 94, 105, 106, 104). Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont omniprésentes dans les fruits, les légumes (43, 47, 94, 105), les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge et d'autres parties de la plante (65). Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux (47, 91, 94) qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques, dans la régulation de gène et dans le métabolisme de croissance. Actuellement, environ de 4000 composés flavoniques sont connus et ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane ce qui est synonyme avec la structure 2-phényle chromane (47).

III-3-5-2-Structure et classification :

Les flavonoïdes sont des dérivés benzo-y-pyrane. Leur structure de base est celle d'un diphényl propane à 15 atomes de carbone ($C_6-C_3-C_6$) (**37, 89**), constitué de deux noyaux aromatiques qui désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle (**94, 105, 113**) oxygéné, qui désigne la lettre C. De façon générale les flavonoïdes se trouvent soit à l'état libre, dans ce cas ils sont dits aglycones, soit sous forme de C- ou O glycosides (**94, 113**), et dans ce cas ils sont liés à des sucres tels que le glucose, le rhamnose, l'arabinose, ils peuvent en outre être des monomères ou des oligomères (**113**). Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont: flavones, isoflavandiols, flavanols, flavondiols, aurones, chalcones, anthocyanins (**94,113**).

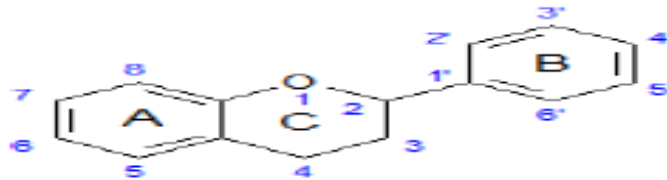


Figure 5 : Structure de base de flavonoïdes.

III-3-5-3-Localisation, distribution et biodisponibilité des flavonoïdes :

Les flavonoïdes possèdent une large répartition dans le monde végétal, ils sont distribués dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs des plantes (**43, 62, 91, 94**). Les formes hétérosidiques des flavonoïdes, s'accumulent dans les vacuoles et selon les espèces, elles se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophylle. Dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques (**76**).

III-3-5-4-Activités Biologiques des flavonoïdes :

III-3-5-4-1-activités anti-inflammatoires et immunologiques :

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (**107**).

III-3-5-4-2-Activité antivirale :

L'évaluation de l'activité antivirale de l'extrait commercial du romarin, a indiqué qu'il ya une inhibition de l'infection (87, 109) par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) aux concentrations très basses, qui ont été également cytotoxiques. Cependant, le carnosol a montré une activité anti-HIV à une concentration de 8µM qui n'était pas cytotoxique (87).

III-3-5-4-3-Activités antioxydantes des flavonoïdes :

Les flavonoïdes possèdent de nombreuses activités biologiques, ces activités sont attribuées en partie aux propriétés antioxydantes de ces composés naturels (110). L'action antioxydante de ces composés ne s'exerce pas seulement par l'inhibition des radicaux libres, mais elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation d'ions métalliques responsables de la production des espèces réactives l'oxygène (111) de là cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants (R*), comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle, par transfert d'hydrogène et le radical Flavonoxy (FL^o) qui en résulte peut réagir avec un autre radical pour former une structure stable (112)

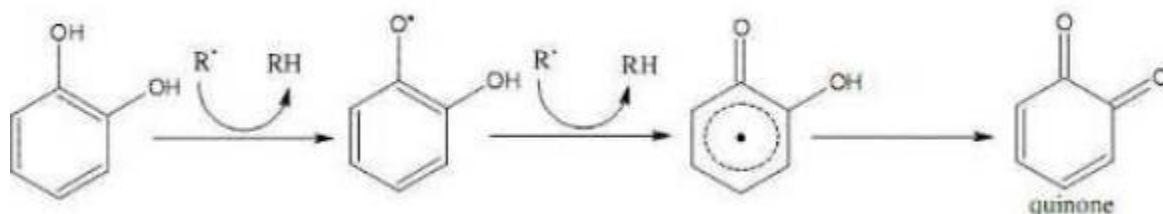


Figure 6: Piégeage des espèces réactives oxygénées par les flavonoïdes (96).

Les flavonoïdes sont aussi considérés comme de bons chélateurs d'ions métalliques, comme les ions du fer (Fe²⁺) et du cuivre (Cu⁺) qui sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques, mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante (114)

$$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} (\text{Cu}^+) \rightarrow \cdot\text{OH} + \cdot\text{OH} + \text{Fe}^{3+} (\text{Cu}^{2+})$$

IV-Matériels :

IV-1- Matériel végétal :

Le matériel végétal est une espèce locale constitué d'une racine à bulbe (*Allium sativum*) dont la poudre est préparée en fragmentant rapidement l'ail (flocons d'environ 5 mm d'épaisseur) et en le séchant immédiatement à l'ombre dans un endroit sec et aéré puis pulvérisée et conservée.

IV-2 -Extraction:

L'extraction a été réalisée au niveau du laboratoire de biochimie, université Abbes Laghrour «Khenchela».

IV-2-1-Préparation de l'extrait aqueux total :

La préparation de cet extrait consiste à macérer 80g de la poudre d'ail obtenue dans un volume de 2L d'eau distillée. Le macérât est homogénéisé pendant 24 heures à l'aide d'un agitateur magnétique puis filtré successivement 2 fois sur du coton hydrophile puis 1 fois sur du papier Wattman N°1. Le filtrât obtenu est évaporé dans une étuve de type (MEMMERT) à 50°C pour donner une poudre qui constitue **ETA_{AS}** (figure7)

IV-2-2- Préparation de l'extrait méthanolique brut :

600g de la poudre d'ail sont mises à macérer pendant une nuit à température ambiante, dans un mélange méthanol-eau (7:3 V/V), le tout par la suite est filtré sur papier Wattman N°1, l'extraction est refaite 2 fois avec renouvellement du solvant. Le solvant est évaporé sous vide à sec en utilisant un rotavapeur (HAHNVAPOR) à la température 50°C. Une fraction d'extrait est préparée à part à partir de 200g de la poudre est considérée Comme étant l'extrait méthanolique brut **EMB_{AS}** qui est conservé à +5°C jusqu'à utilisation.

IV-2-3- Fractionnement de l'extrait brut:

L'extrait méthanolique brut est mélangé avec de l'eau distillée bouillante et laissé à température ambiante pendant 24 heures. Après filtration, l'extrait brut est épuisé successivement par 3 solvants (l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle et le n- butanol). L'extrait brut est initialement mélangé avec l'éther de pétrole, le mélange est laissé décanter et la phase organique supérieure est récupérée. L'extraction est refaite plusieurs fois jusqu'à ce que le solvant devienne transparent. L'éther de pétrole est par la suite évaporé à 40°C et l'extrait résultant est considéré comme étant la fraction d'éther de pétrole **EEP_{AS}**.

La phase aqueuse résiduelle est soumise à deux autres extractions liquide-liquide par l'acétate d'éthyle et le n- butanol, en suivant les mêmes étapes que la première extraction afin d'obtenir les fractions acétate d'éthyle **EAE_{AS}** et n-butanolique **En-B_{AS}**. Tous les extraits obtenus sont conservés à +5°C jusqu'à utilisation après le calcul de leur rendement. La (Figure 8), résume les étapes de cette extraction.

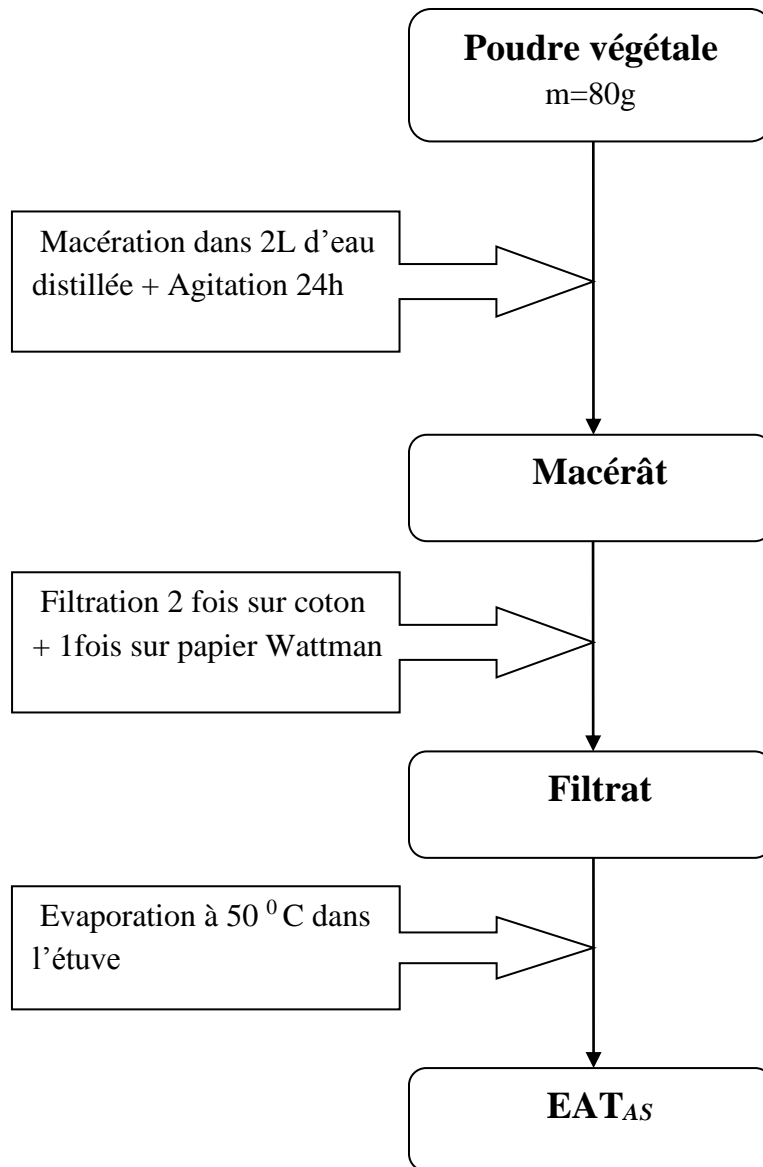


Figure 7: Préparation de l'extrait aqueux total

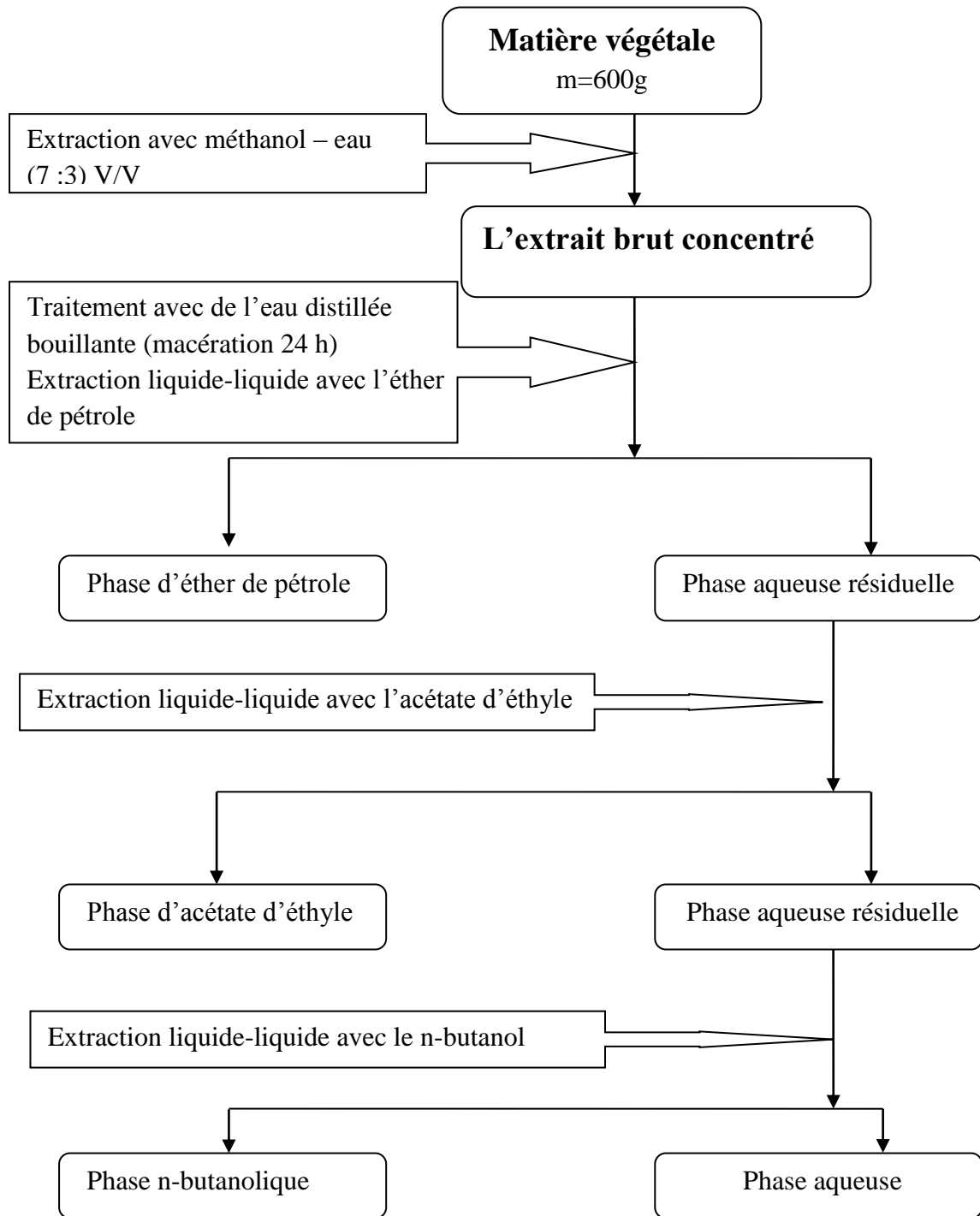


Figure 8 : Protocole résumant les étapes de fractionnement de l'EMB

IV- 3- Dosage des polyphénols :

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique Folin- Ciocalteu (37)

➤ **Principe :**

La teneur phénolique totale est habituellement déterminée colorimétriquement avec le spectrophotomètre UV-Vis en utilisant l'essai de Folin-Denis ou généralement Folin- Ciocalteu. Ces essais sont basés principalement sur la réduction du réactif acide phosphotungstique phosphomolybdique (réactif de Folin) dans une solution alcaline (82).

Brièvement 200µl de chaque extrait (dissous dans le méthanol) ont été ajoutés à 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué. Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 4 minutes. Après l'incubation 800µl de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (75g /l) a été ajoutée. Le mélange final a été secoué et puis incubé pendant 2 heures dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance de tous les extraits a été mesurée par un spectrophotomètre de type JENWAY 6305 UV /VIS à 765 nm.

➤ **Expression des résultats :**

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique (5-200µg/ml) et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg).

IV -4-Teneur en flavonoïdes:

IV-4-1- Test préliminaire (mise en évidence des flavonoïdes) :

A 5 ml du filtrat des extraits (aqueux et organiques) solubilisés dans l'eau distillée, on ajoute 1 ml HCl concentré, puis on ajoute quelques tournures de magnésium et on laisse agir 3 minutes. La coloration rouge ou orange indique la présence des flavonoïdes (115).

IV4 -2- Dosage des flavonoïdes :

La méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) cité par Djeridane (116) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits.

➤ Principe :

1 ml de chaque extrait et du standard (dissous dans le méthanol) avec les dilutions convenables a été ajouté à un volume égal d'une solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol). Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance à 430 nm a été lue après 10 minutes d'incubation.

➤ Expression des résultats :

La quantification des flavonoïdes à été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = a x + b$) réalisé par un standard étalon "la quercétine" à différentes concentrations (1.75-40 $\mu\text{g/ml}$) dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg}$).

IV-5-Analyse de la composition chimique des flavonoïdes par CCM:**➤ Principe**

Cette méthode se repose sur la séparation des différents constituants d'un extrait selon leur force de migration dans la phase mobile qui est en générale un mélange de solvant, adapté au type de séparation rechercher, et leur affinité vis-à-vis la phase stationnaire qui peut être un gel de silice ou de polyamide. Les techniques chromatographiques ne sont pas suffisantes pour identifier un produit mais elles apportent des renseignements (Rapport frontal- R_f -et coloration) susceptible d'orienter vers une hypothèse de structures.

➤ Méthode

Les analyses par CCM ont été effectuées avec des plaques gel de silice sur support rigide en aluminium 20 /20 cm.

Les extraits sont déposés à l'aide d'une micropipette (2 μl) à des points repères à 1,5cm du bord inférieur de la plaque. En suite, les plaques sont placées dans les cuves de développement dans les quelles se trouve un système de solvants approprié appelé phase mobile à environ 1cm de l'hauteur. La migration est effectuée par l'utilisation des éluants suivants :

EMB_{As} : Butanol /Acide acétique/H₂O (40 /10/50)

Acétone/ H₂O (50 /50)

EEP_{As}: Chloroforme/Méthanol (96/4)

EAE_{As}: Toluène/Acétate d'éthyle / Méthanol (5/3/2)

En-B_{As}: Chloroforme/ Méthanol/Eau distillée (65 /35/10)

Après développement dans une cuve en verre et séchage, les plaques ont été observées sous lampe UV à 254 et 365 nm. Les couleurs des spots ont été enregistrées ainsi de même pour le calcul du rapport frontal **R_f** qui est égal à la distance parcourue par le soluté/la distance parcourue par le solvant.

IV-6-Etude de l'activité anti-oxydante par test au DPPH :

Dans cette analyse la capacité anti-oxydante est déterminée par l'activité du balayage des radicaux libres a été mesurée en employant le radical libre stable DPPH (C₁₈H₁₂N₅O₆) qui est l'un des essais principaux employés pour explorer l'utilisation des extraits d'herbes comme antioxydants (117)

➤ Principe :

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH. (2,2 diphenyl 1 picryl hydrazyl) (Figure 9) de couleur violette se réduit en 2,2 diphenyl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (118)

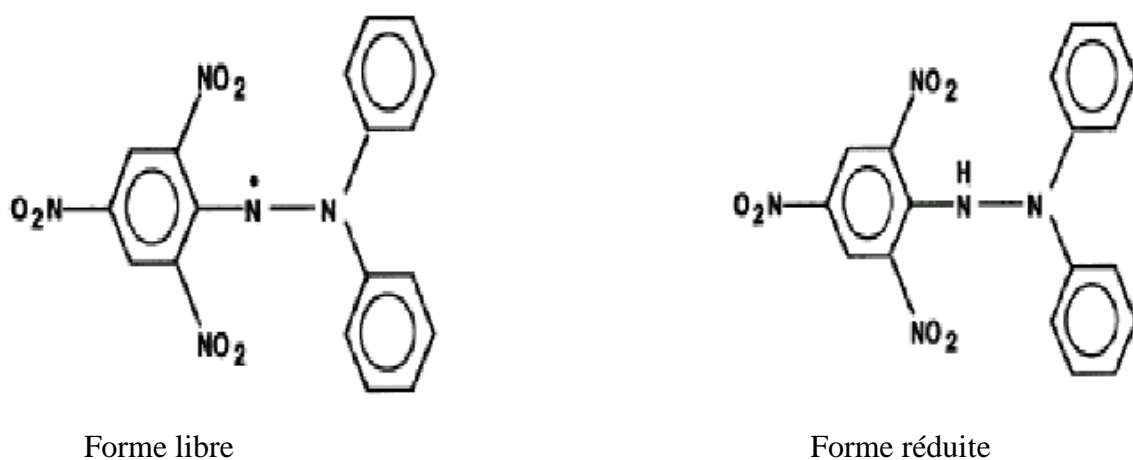
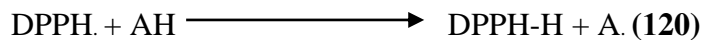


Figure 9 : Forme libre et réduite du DPPH (119)

Ce radical est un oxydant qui peut être réduit par l'antioxydant (AH) selon la réaction suivante :



L'Activité du balayage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par Lopes-Lutz. (121)

➤ **Méthode**

Le DPPH est solubilisé dans le méthanol pour avoir une solution de 0,3 mM. Dans des tubes on introduit 2,5 ml de chaque extrait (1mg/ml dans le méthanol avec des dilutions convenables) et on ajoute 1ml de la solution méthanolique au DPPH. Après agitation par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

Le contrôle négatif est composé de 1 ml de la solution méthanolique au DPPH et de 2.5 ml de méthanol. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard qui est l'acide ascorbique.

➤ **L'expression des résultats :**

En présence d'un antioxydant la force d'absorption est diminuée et la décoloration résultante est stœchiométrique en ce qui concerne le nombre d'électrons captés (117).

Les résultats sont exprimés en tant que l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante :

$$\text{Inhibition \%} = [(\text{Abs Control négatif} - \text{Abs Echantillon}) / \text{Abs Control négatif}] \times 100 \text{ (122).}$$

Où

Abs Echantillon : Absorbance de l'échantillon ;

Abs Control négatif : Absorbance du control négatif

IV-7-Etude statistique:

L'étude statistique a été réalisée par le logiciel statistique Minitab version 13. Toutes les expériences ont été réalisées en triple, Les résultats sont exprimés en moyenne avec son écart-type.

V-1-Détermination de rendement d'extraction :

Pour chaque échantillon, nous avons calculé le rendement de l'extraction, les résultats obtenus sont présentes dans le tableau suivant:

Tableau 4 : Tableau récapitulatif regroupant les rendements des différents extraits

Le poids du matériel végétal en (g)	Les extraits	Le poids des extraits en (g)	Le rendement en (%)	Couleur et aspect
80	ETA_{As}	45	56,25	Rouge visqueux
200	EMB_{As}	76,5	43,16	Marron visqueux
600	EEP_{As}	0,58	0,096	Marron poudre
	EAE_{As}	0,51	0,085	Vert foncé poudre
	En-B_{As}	0,75	0,12	Orange poudre

Le calcul des rendements par rapport au poids sec de la poudre végétale (Tableau 4) a montré que l' **ETA_{As}** représente le rendement le plus élevé (56,43%), suivi par l'**EMB_{As}** avec 43,16 % ,l' **En-B_{As}** a un rendement de (0,12%) et enfin les rendements de l'**EEP_{As}** (0,096%) et de l' **EAE_{As}**(0,085%) sont les plus faibles.

Selon Newman (123) et Markham (124) les flavonoïdes que pourraient contenir les différentes fractions issue de l'extrait méthanolique seraient comme suit :l'extrait n-butanolique est plus riche en flavonoïdes les plus polaires (di ,tri et tétra glycosylés),l'extrait éther de pétrole qui est en générale constitué de flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés et l'extrait d'acétate d'éthyle contient les flavonoïdes aglycones et flavonoïdes glycosylés en particulier monoglycosylés.

Car la macération est une méthode discontinue, le solvant devrait être remplacé jusqu'à ce que la matière végétale soit épuisée (125), il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie de manière générale. En effet, le rendement n'est pas relatif ; il dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée.

D'autre part, la méthode d'extraction affecte également le contenu total en phénol et flavonoïdes (126).

V-2- Teneur en polyphénols:

La méthode d'extraction doit permettre l'extraction complète des composés d'intérêt et doit éviter leur modification chimique. L'eau, les mélanges aqueux de l'éthanol, du méthanol et de l'acétone sont généralement utilisés pour l'extraction (108). La solubilité des composés phénoliques est en fonction de leur degré de polymérisation, l'interaction avec les autres constituants et le type de solvant utilisé.

Le méthanol a été recommandé et fréquemment employé pour l'extraction des composés phénoliques (77). Le méthanol aqueux 70% est deux fois plus efficace que le méthanol pur, pour l'extraction des composés phénoliques (82). La teneur en polyphénols a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. C'est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en polyphénols, des plantes médicinales et les nourritures (85).

L'acide gallique est le standard (Figure 10) le plus souvent employé dans la méthode de Folin-Ciocalteu (24).

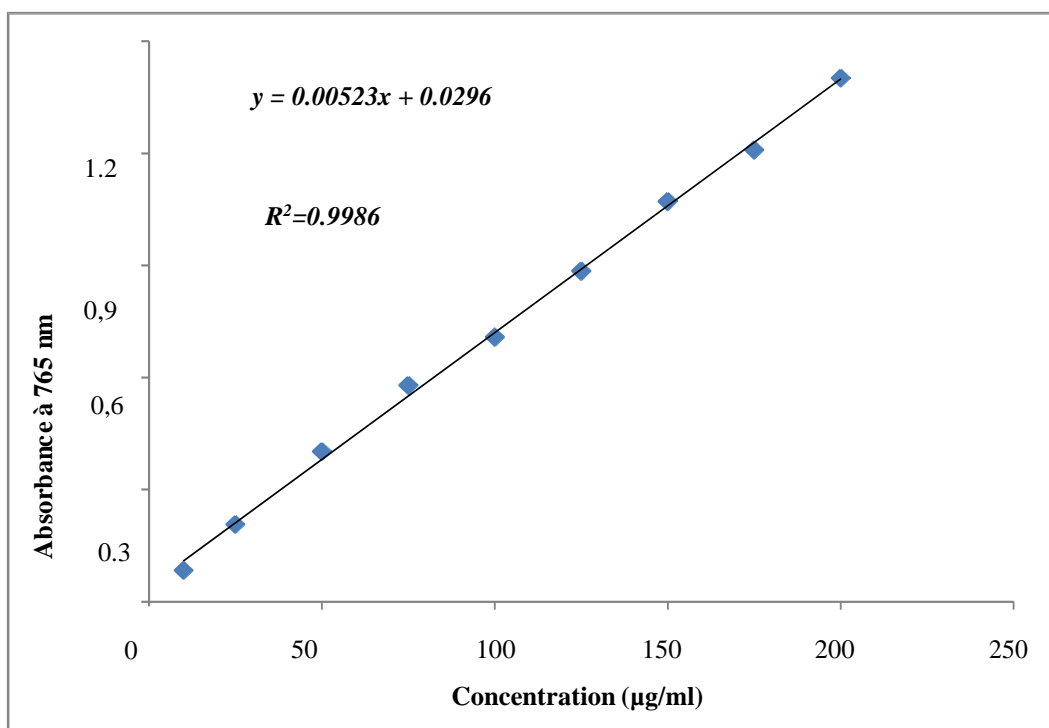


Figure 10 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois mesures).

Tableau 5 : Teneur en polyphénols des extraits d'*Allium sativum*.

Extrait	Teneur en polyphénols ^(a)
EAT_{As}	40.85± 1.67
EMB_{As}	58.53 ± 0.89
EEP_{As}	83.92± 1.32
EAE_{As}	113. 96 ± 1.89
En-B_{As}	117.92 ± 0.54

(a) mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures ±SD.

V-3- Teneur en flavonoïdes:

V-3-1- Test préliminaire:

On trouvera dans les tableaux ci-après les résultats du dosage préliminaire des flavonoïdes :

Tableau 6 : Virement de la couleur des extraits d'*Allium sativum*

Extrait	Couleur
EAT_{As}	Rouge brique clair
EMB_{As}	Rouge brique foncé
EEP_{As}	Rouge brique foncé
EAE_{As}	Rouge brique très foncé
En-B_{As}	Rouge brique très foncé

Le test préliminaire a indiqué la présence des flavonoïdes aglycones dans les extraits de l'ail. Au Préalable, l'intensité de la couleur observée indique la richesse de l'*Allium sativum* en flavonoïdes.

V-3-2- Dosage des flavonoïdes :

La raison principale pour la quelle on a choisi cette classe de polyphénols, réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits (28).

Selon Elâgoun (116) l'éther de pétrole est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes aglycones hautement methoxylés, l'acétate d'éthyle est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes aglycones ou flavonoïdes mono O- glycosides et partiellement di-O-glycosides, tandis que le n-butanol est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes di-O-glycosides et tri-glycosides et C- glycosides.

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode d' AlCl_3 en utilisant comme standard la quercétine (Figure 11), les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en $\mu\text{g EQ/g}$ d'extrait.

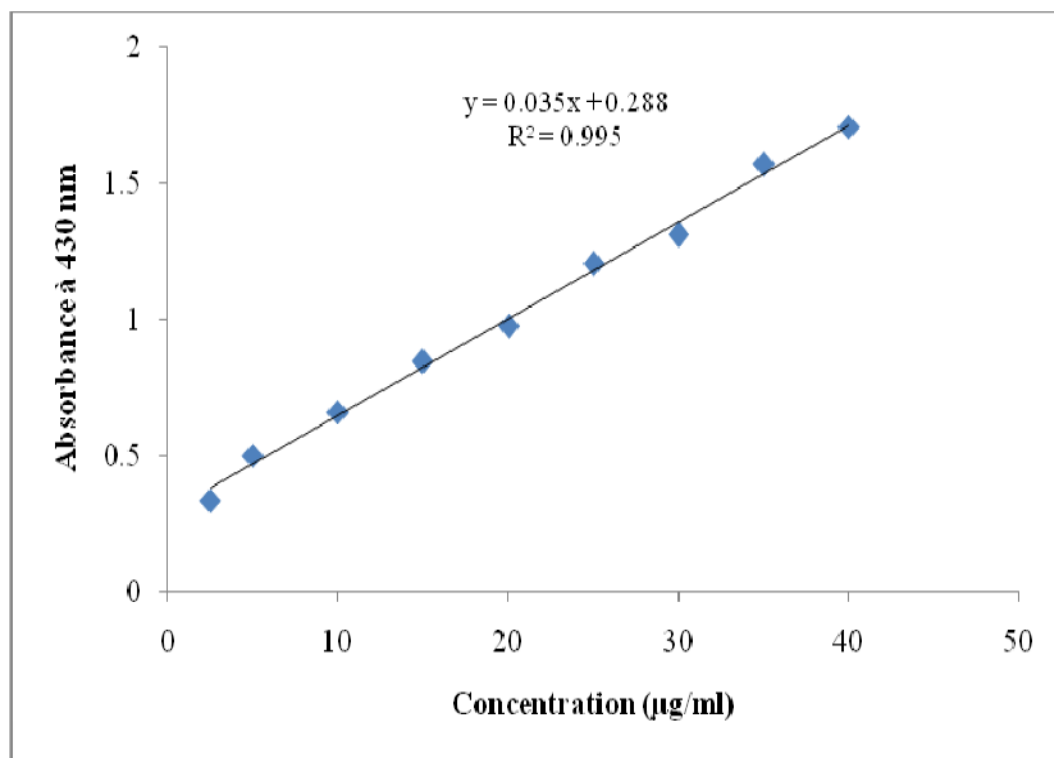


Figure 11 : Courbe d'étalonnage de la quercétine (moyenne \pm SD de trois mesures).

Les résultats du dosage quantitatif des flavonoïdes (Tableau.7) révèlent que l'**EAT_{As}** contient $57.14 \pm 1.32 \mu\text{g EQ/g}$, ses deux fractions représentent presque la même quantité avec une teneur de $200 \pm 1.89 \mu\text{g EQ/g}$ pour la fraction **EMB_{As}** et $142.8 \pm 2.12 \mu\text{g EQ/g}$ pour la fraction **EEP_{As}** et la fraction **En-B_{As}** est plus riche avec une teneur de $1485.7 \pm 7.14 \mu\text{g EQ/g}$.

Tableau7 : Teneur en flavonoïdes des extraits d'*Allium sativum*.

Extrait	Teneur en flavonoïdes ^(b)
EAT _{As}	57.14± 1. 32
EMB _{As}	200 ± 1.89
EEP _{As}	142.8± 2.12
EAE _{As}	1230± 5.16
En-B _{As}	1485.7 ± 7.14

(b) µg d'équivalent de la quercétine par gramme d'extrait.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures ± SD

Nos résultats montrent que la teneur totale des flavonoïdes, des extraits organiques et celui aqueux, est liée à la teneur des composés phénoliques totaux. De même nous avons trouvé que la teneur des flavonoïdes des extraits de notre espèce locale s'est corrélé significativement avec la teneur des polyphénols ($R_2 = 0.969$).

V-4-Résultat de la CCM des fractions issues d'extrait brut méthanolique :

La CCM nous a permis d'avoir les empreintes flavoniques de nos extraits de la plante des différentes phases issues d'extrait brut méthanolique. 5 systèmes de solvant ont été utilisés, les chromatogrammes résultants comportent une série de spots (figure 12, 13, 14, 15,16), l'identification des composés était basée sur la comparaison des Rfs des taches apparues sur CCM observés sous lampe UV.

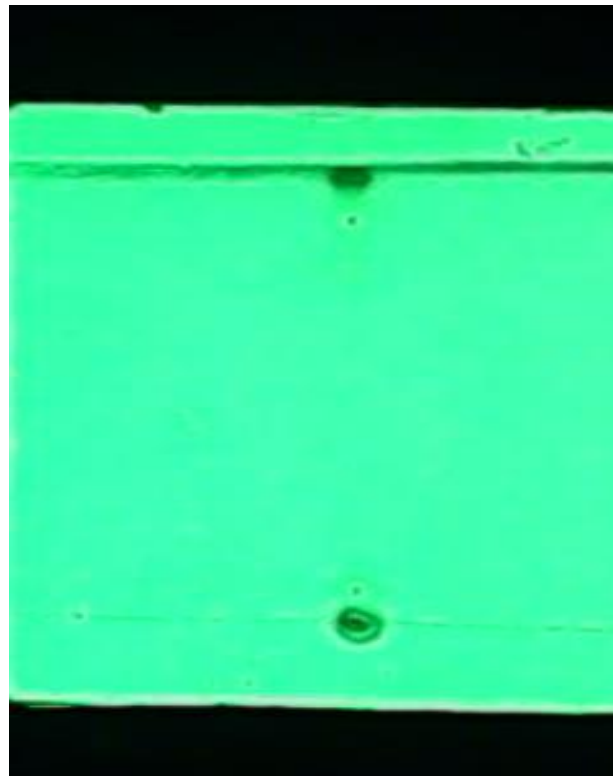
Les tableaux (8, 9, 10, 11,12) comportent les Rfs des différents spots apparus avec les différents systèmes solvants utilisés, ainsi que la couleur révélée sous une lampe UV. Un ensemble des spots a été obtenu par les différents systèmes solvants pour les quatre extraits, avec plus de composés pour l'extrait acétate d'éthyle.

V-4-1-Composés identifiés dans la fraction éther de pétrole :

Deux spots ont été ségrégués des dépôts de la fraction éther de pétrole par le système de solvant utilisé (Chloroforme /Méthanol) appartenant aux différentes classes polyphénoliques et précisément Anthocyanidine 3-glycosides, Flavonones et auronnes.

Tableau 8 : résultat de la CCM de la fraction éther de pétrole**système solvant : Chloroforme /Méthanol (96 /4)****Adsorbant : gel de silice**

Couleur sous UV 365(nm)	Rf (cm)	Type flavonoïde possible
Mauve	0 ,06	Anthocyanidine 3-glycosides
Bleu sombre	0,87	Flavonones, auronnes

**Figure12: Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait éther de pétrole****par chromatographie sur gel de silice par****le système solvant : Chloroforme/Méthanol (96/4)****(révélation à l'UV), $\lambda = 365$ nm**

V-4-2-Composés identifiés dans la fraction acétate d'éthyle :

Quinze spots ont été ségrégués des dépôts de l'extrait par le système (Toluène /acétate d'éthyle /Méthanol) appartenant aux différentes classes polyphénoliques, mais une grande partie appartiennent probablement surtout aux classes des flavonols et flavones.

Tableau 9: résultat de la CCM de la fraction acétate d'éthyle :

Système solvant : Toluène /acétate d'éthyle /Méthanol (5 /3/1)

Adsorbant : gel de silice

Couleur sous UV 365(nm)	Rf	Type flavonoïde possible
Violet	0,07	Flavones
Mauve	0,15	Flavonols, isoflavones, flavanones
Violet	0,22	Flavones
Bleu blanc fluorescent	0,35	Flavonols
Jaune	0,42	Flavonols
Jaune	0,48	Flavonols
Violet	0,55	Flavones
Mauve	0,59	Anthocyanidine 3-glycosides
Bleu sombre	0,66	Flavonones, auronnes
Bleu blanc fluorescent	0,69	Flavonols, flavones, isoflavones, flavanones
Mauve	0,71	Flavonones ,auronnes
Violet	0,75	Flavones
Jaune	0,78	Flavones
Bleu	0,80	Flavonols
Jaune	0,82	Flavonols

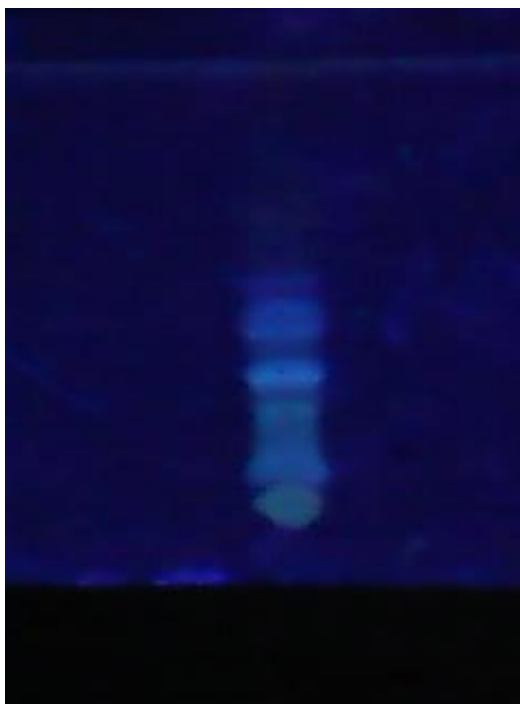


Figure 13: Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait acétate d'éthyle par chromatographie sur gel de silice par le système solvant : Toluène/acétate d'éthyle /Méthanol (5/3/1) (révélation à l'UV), $\lambda=365$ nm

V-4-3-Composés identifiés dans la fraction n-butanolique:

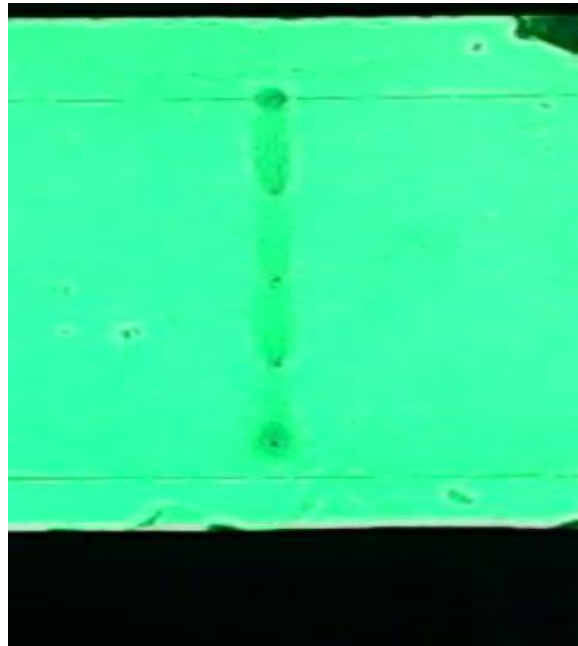
Quatre taches révélées par le système (Chloroforme/ /Méthanol /H₂O), les composés font partie des flavones, anthocyanidine 3-glycoside, Flavone glycoside, flavonol glycoside, Flavonones, aurones.

Tableau 10: résultat de la CCM de la fraction n-butanolique

système solvant : Chloroforme/ /Méthanol /H₂O (65 /45/12)

Adsorbant : gel de silice

Couleur sous UV 365(nm)	Rf	Type de flavonoïde possible
Violet	0,22	Flavones
Mauve	0,43	Anthocyanidine 3-glycoside
Marron foncé	0,63	Flavone glycoside, flavonol glycoside
Bleu sombre	0,82	Flavonones, aurones



**Figure 14 : Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait butanolique
par chromatographie sur gel de silice par
le système solvant : Chloroforme/ /Méthanol /H₂O (65 /45/12)
(révélation à l'UV), $\lambda = 365\text{nm}$**

V-4-3-Composés identifiés dans la fraction méthanolique:

Les spots ont été ségrégués des dépôts de l'extrait par deux systèmes de solvants (butanol /a. acétique/ H₂O) et (Acétone/ H₂O).

Tableau 11: résultat de la CCM de la fraction méthanolique**Système solvant : butanol /a. acétique/ H₂O (40 /10/50)****Adsorbant : gel de silice**

Couleur sous UV 365(nm)	Rf	Type flavonoïde possible
Violet	0,22	Flavones
Mauve	0,43	Anthocyanidine 3-glycoside
Mauve	0,51	Anthocyanidine 3-glycoside
Jaune très clair	0,60	Anthocyanidine 3-glycoside
Brun noir	0,69	Flavonols,flavones,isoflavones,flavanones
Violet	0,77	Flavonols,flavones,isoflavones,flavanones
Jaune très clair	0,82	Flavonones,aurones

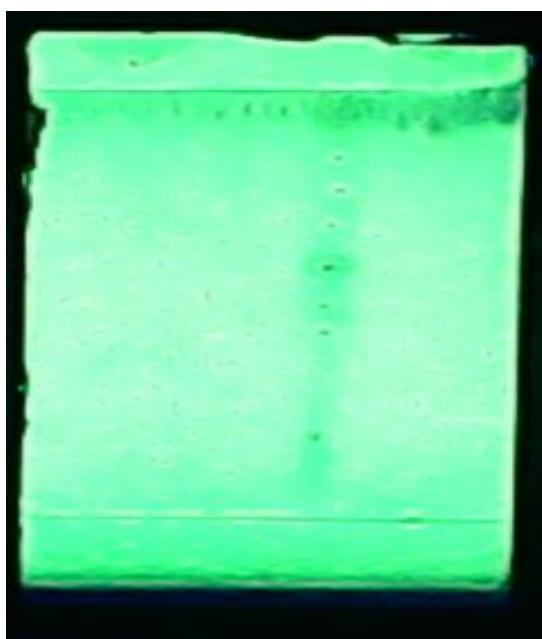


Figure 15 : Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait méthanolique par chromatographie sur gel de silice par le système solvant : butanol /a. acétique/ H₂O (40 /10/50) (révélation à l'UV), $\lambda=365\text{nm}$

Tableau 12: résultat de la CCM de la fraction méthanolique
système solvant : Acétone/ H₂O (50/50)
Adsorbant : gel de silice

Couleur sousUV 365(nm)	Rf (cm)	Type flavonoïde possible
Bleu blanc fluorescent	0,15	Flavonols,flavones,isoflavones,flavanones
Jaune fluorescent	0,27	Flavone glycoside,flavonol glycoside
Marron	0,28	Flavone glycoside,flavonol glycoside
Jaune très clair	0,55	Flavones
Violet	0,75	Flavones
Jaune très clair	0,78	Flavonols
Vert clair	0,82	Anthocyanidine 3-glycoside
Violet	0,89	Anthocyanidine 3-glycoside

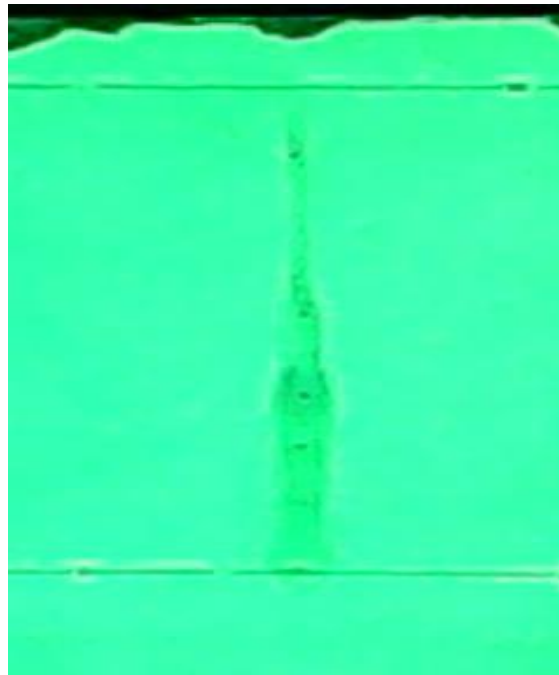


Figure 16: Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait méthanolique
par chromatographie sur gel de silice par
Le système solvant : Acétate/ H₂O (50/50)
(révélation à l'UV), $\lambda=365\text{nm}$

V-5- Test au DPPH :

Le radical DPPH est un radical libre organique stable, avec une bande maximum d'absorption entre 515-528 nm. Dans cet essai les antioxydants réduisent et décolorent le radical DPPH, à un composé *jaune le diphenyl picryl hydrazine*, l'ampleur de la réaction dépendra de la capacité des antioxydants de donner l'hydrogène (**133**).

L'En-B de l'*Allium sativum* a présenté l'activité antioxydante la plus élevée (99.62%), suivie par l'EAE (99.02%) qui sont comparables à celle de l'acide ascorbique (99.67%), l'EMB (90.67%), l'EEP (82.97%) et en dernier l'ETA avec un pourcentage de 67.46%.

Nos résultats exprimés en tant que pourcentage de l'activité anti-radicalaire et le changement d'absorbance (Figure 17 et 18), révèlent que tous les extraits testés sont pourvus d'un potentiel antioxydant très puissant et qui est dose-dépendant.

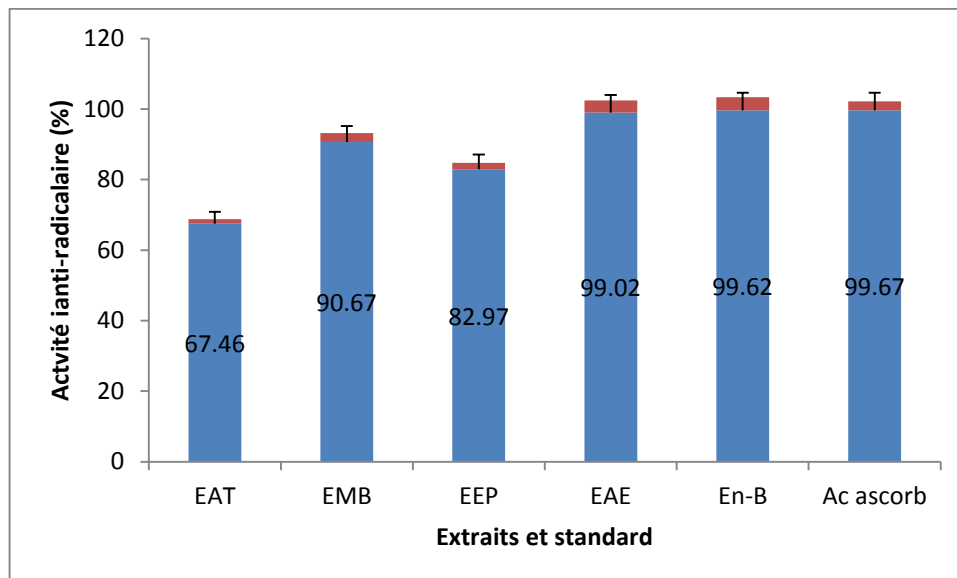


Figure 17 : Activité anti-oxydante relative des extraits d'*Allium sativum*

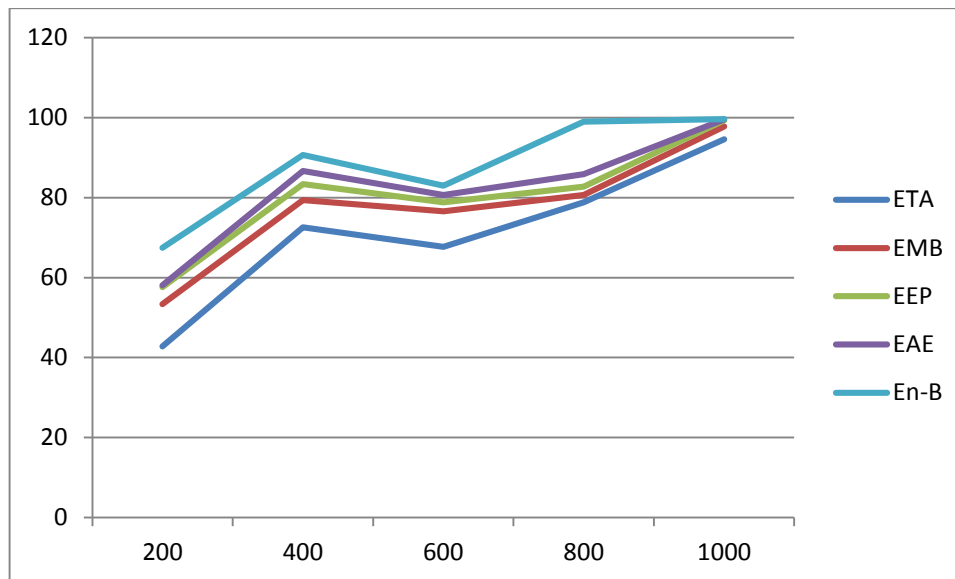


Figure 18 : Changement d'absorbance des extraits d'*Allium sativum* (moyenne \pm SD de trois mesures).

La teneur des polyphénols totaux des extraits de notre espèce locale s'est corrélée significativement ($R^2 = 0.977$) avec leurs activité anti-radicalaire. (127) Les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur chimie structurale idéale. Les autres composés phénoliques mineurs ne devraient pas être négligés, par ce que la synergie entre les différents produits chimiques l'un avec l'autre devrait être pris en considération dans l'activité biologique. D'un autre coté, la fraction phénolique n'incorpore pas tous les antioxydants et les interactions synergiques entre les antioxydants dans un mélange fait que l'activité antioxydante dépend non seulement de la concentration, mais également de la structure et la nature des antioxydants (77). L'activité antiradicalaire peut être expliqué aussi par la richesse de l'ail en sélénium d'une part (127, 128), et par ses principes actifs (alliine, alicine et composés soufrés) qui sont doués d'une activité antioxydante élucidée in vitro et in vivo d'autre part (129, 130).

CONCLUSION & PERSPECTIVES

L'utilisation des plantes médicinales est aujourd'hui la forme de médecine la plus répandue à travers le monde. Le recours au traitement par les plantes ainsi que la recherche des nouvelles substances à activités biologiques constituent une des plus grandes préoccupations scientifiques.

De ce fait, plusieurs travaux ont été réalisés pour l'évaluation des secrets des plantes médicinales dont la présente étude qui est consacrée à la recherche d'éventuels effets antioxydants à partir des extraits organiques et aqueux d'une espèce locale d'*Allium sativum*.

Notre étude nous a permis en premier lieu d'identifier quantitativement et qualitativement les polyphénols et les flavonoïdes présents dans l'ail. Les résultats obtenus peuvent être, ardemment, attribués à un des composés ou une conjugaison de substances.

L'étude du pouvoir antioxydant par la méthode du DPPH a confirmé les propriétés puissantes que possèdent les flavonoïdes, caractérisant nos extraits d'*Allium sativum*, à piéger les radicaux libres.

En perspectives, il serait intéressant de développer cette recherche de point de vue opérationnel par approfondissement de la connaissance sur :

- L'identification et l'isolement des composés actifs pour augmenter l'efficacité des extraits.
- Appréciation de l'activité antioxydante de cette espèce d'*Allium sativum in vivo* à travers l'analyse de tous les éléments de la cascade enzymatique du système de détoxification.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1-Lhuillier A. (2007)** Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissantrichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae) .Thèse de doctorat.Toulouse.
- 2- Schnaubelt K. (1998)** Advanced aromatherapy. Vermont Healing Arts Press.
- 3- Fouché J.G., Marque T.A . et Hambukers A. (2000)** Les plantes médicinales, de la plante au médicament. Observatoire du Monde des Plantes Sart–Tilman.
- 4-Bérubé Gagnon J. (2006)** Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Mémoire comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables.Quebec.
- 5-Ferrari J. (2002)** Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles: *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich. Thèse de doctorat. Lausanne.
- 6-Bahorun T. (1997)** Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Food and agricultural resarch council, Réduit. Mauritius.83-94.
- 7-Marfak A. (2003)** Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de Leur reactivite avec les radicaux issus des Alcools: formation de depsides. Thèse de doctorat. Limoges.
- 8- Lambert N. (2013)** apport de la phytothérapie dans la gestion medicale des chevaux ages.These de Doctorat.l'universite claud-bernard lyon i.31-47.
- 9-Belfadel A. (2013)** Etude phytochimique et évaluation in vitro de l'activité antibactérienne de la partie aérienne de la plante médicinale *Ruta montana*.memoire de master. l'universite de Abbès Laghrour Khenchela. 3-5.
- 10-Bruneton J. (2009)** Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales 4ème édition. Ed.Tec et Doc, paris.
- 11-Medjdoub H. (2007)** Etude Phytochimique et Activité Biologique de *Zygophyllum geslini* Coss. Mémoire de magister.Université Abou Bekr Belkaid.2.
- 12-Mohammedi Z. (2013)** Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie.These de Doctorat. Université de Tlemcen.22-25.
- 13-Firenzuoli F., et Gori 1. (2007)** Herbai medicine today: clinical and research issues. Evid Based Complement Alternat Med. 4 (1), 37-40.

- 14- Rao M . R ., Palada M .C. et Becker B . N. (2004)** Medicinal and aromatic plants in agroforestry systems. *Agroforestry Systems*. 61,107-122.
- 15-Ekoumou C. (2012)** Etudes phytochimiques et pharmacologiques de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite.
- 16-Krippeit Drews P., Lang F., Haussinger D. and Drews G. (1994)** H₂O₂ induced hyperpolarization of pancreatic B-cells. *Pflügers Arch.* 426-554.
- 17-Zeghad N. (2009)** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité. Mémoire de magister. Université Mentouri Constantine. 2-4.
- 18- Dohou N., Yamni K. et Tahrouch S. (2003)** Screening phytochimique d'une Endémique ibéro-Marocaine *Thymelaea lythroides*. *Bull. Soc Phrm. Bordeaux*.
- 19-Rehman A., Nourooz J., Moller W. et al. (1999)** Increased oxidative damage to all DNA bases in patients with type II diabetes mellitus. *FEBS Lett.* 448, 120-122.
- 20-Avaoto P. et coll. (2000)** *phytomédecine*. 7, 239-243.
- 21-Hivin B. (2008)** Phytothérapie et aromathérapie en élevage biologique bovin enquêté auprès de 271 éleveurs de France.
- 22-Vacca D.D. et Walsh R.A. (1954)** The antibacterial activity of an extract obtained from *Ascophyllum nodosum*. *Journal of the American Pharmaceutical Association*. 43, 24-26.
- 23-Iriti M., et Faoro F. (2009)** Chemical diversity and defence metabolism: how plants cope with pathogens and ozone pollution. *Int J Mol Sci.* 10 (8), 3371-3399.
- 24-Maisuthisakul P., Pasuk S., Ritthiruangdej P. (2008)** Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *J Food Composition and Analysis*. 21, 229-240.
- 25-Trease G. F. and EVANS W. C. (1983)** *Pharmacognosy*, Bailliére, Tindall, London, Philadelphia, Toronto, Mexico City, Rio De Janero, Tokyo, Hong Kong. 225-514.
- 26-Fortuna A. M., Riscalá E. C., Catalan C. A. N., Gedris T. E. et Herz W. (2001)** Sesquiterpene lactones from *Centaurea tweediei*, *Biochemical Systematics and Ecology*. 29, 967-971.
- 27-Depoërs P., Ledoux F. and Meurin P. (2008)** De la lumière à la guérison. La phytothérapie entre science et tradition. Ed. Amyris, Bruxelles. 509p.
- 28-Gomez Caravaca A.M., Gomez-Romero M., Arraez-Roman D., Segura-Carretero A., Fernandez Gutierrez, A. (2006)** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41, 1220-1234

- 29- Bahrun T. (1996)** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel for schung /Drug Research*. 46 II (11),1086-1099.
- 30- Scientific correspondence. (2003)** Broad spectrum antimycotic drug for the treatment of ringworm infection in human beings. 85(1), 30-34.
- 31- Svoboda K.P. et Hampson J.B. (1999)** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants :antibacterial, antioxidant . antiinflammatory and other related pharmacological activities.Plant Biology Department. SAC Auchincruive. Ayr.Scotland, UK.KA65HW.
- 32- Narayana K.R. (2000)** Bioflavonoids: Classification, Pharmacological, Biochemical Effects and Therapeutic Potential. *Indian Journal of pharmacology*. 33,2-13.
- 33- Pedneault K. (2001)** Influence de la culture hydroponique de quelques plantes médicinales sur la croissance et la concentration en composés secondaires des organes végétaux.
- 34- Amjad Hossain M. (2005)** Neem Seed oil: Bangladesh. Examples of the Development of pharmaceutical Products from Medicinal Plants. Bangladesh Council of Scientific and Industrial Research (BCSIR).10,59-63.
- 35- Annie Shirwarcar. (2004)** Antidiabetic activity of aqueous leat extract of *Annona squamosa* in streptozotocin-nicotinamide type 2 diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 91,171-175.
- 36- Adeneye A.A. (2007)** Hypoglycaemic and antidiabetic activities on the stem bark aqueous and ethnom extracts of *Musanga cecropioides* in normal and alloxan–induced diabetic rats. *Fitoterapia*.78,502-5.
- 37-Wong C.C., Li H.B., Cheng K.W., Chen F. (2006)** A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem*. 97,705-711.
- 38- Cuvelier M.E. (1996)** Antioxidative activity and phenolic composition of pilot –plant and commercial extracts of sage and rosmar. *Jam. Oil. Chem. Soc*. 73,645-652.
- 39- Dastidar S.G. (2004)** Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 23,99-102.
- 40- Lyons L et Nambiar D. (2005)** Un guide pratique des plantes médicinales pour les personnes vivantes avec le VIH.CATIE.60 p.
- 41- Wilson C.L. (1997)** Rapid evaluation of plant extract and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea* .*Plants Dis*. 81,2004-210.
- 42- Porter N. (2001)** Essential oils and their production. *Grop & Food Research*. 39p.

- 43- Smallfield B. (2001)** Introduction to growing herbs for essential oils. medicinal and culinary purposes. Crop & Food Research. 45, 4p.
- 44- Delaveau P. (1957)** Les épices : Histoire, description et usage des différents épices, aromates et condiments. Albin Michel Editeur.372p.
- 45- Richard H. et Multon J.L. (1992)** Les aromes alimentaires. Tec & Doc. Lavoisier. Paris. 438p.
- 46- Takoeka G. (1998)** Flavor chemistry of vegetables.In Flower chemistry. Thirty years of progress .Teranishi R et al (Ed). Cluwer Academic / Plenum Publishers .New York. 287- 304.
- 47- Belitz H.D. et Grosh W. (1999)** Food chemistry. Second édition. Springer Verlag. Berlin Heidelberg.992 p. Report. 8, 5p.
- 48- Callery et Emma. (1998)** Le grand Livre des herbes le guide pratique de la culture, du séchage et des vertus de plus de 50 herbes .Ed.Koineman.cologne.128 p.
- 49- Fournier P. (1999)** Plantes médicinales et vénéneuses de France. Connaissance et Mémoires Européennes.49-53.
- 50-Santos R .I. (1999)** Metabolismo Basico E Origem Dos Metabólitos Secundarios. In: Farmacognosia Da Planta Ao Medicamento. Simoes et al. (Ed.). Porto AlegreFlorianópolis: Ed. Da UFRGS/Ed.UFCS.323-354.
- 51- Jean Michel Clément. (1990)** Larousse Agricole.39-40.
- 52- Max Wichd et Bbert. (2003)** Plantes thérapeutiques : Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Tec et Doc. Lavoisier. Paris. 19-22.
- 53-Lefrançois P. (1999)** Phytomedical reviews: Allium sativum. The Natural Products.
- 54- Sticher O. et Dtsch. (1991)** A Poth. Ztg. 131,403-413.
- 55- Steiner M., Khan H.A., Hobbert D. et Lin R.I. (1996)** A double-blind crossover study in moderately hypercholesterolemic men that compared.The effect of aged garlic extract and placebo administration on blood Lipids. Am. J. Clin. Nut. 64(6),866-70.
- 56-Koh H.P. (1996)** Pharm.Unserer Zeit. 25,186-191.
- 57- Lamm D.L. et Riggs D.R. (2000)** The potential application of Allium sativum (garlic) for the treatment of bladder cancer. Urol Clin North Am. 27(1),157-62.
- 58- Béliveau R .et Gingras D. (2005)**Les aliments contre le cancer. La prévention et le traitement du cancer par l'alimentation .Ed du Trécarré. Canada.
- 59- Wildman R.E.C. (2001)** Hand book of neutraceuticals and functional foods. CRC Press Ed.

- 60- Gardner C.D. et Messina M. (2003)** Soy, garlic and ginkgo.
- 61- Gouen A .et Harats D. (2005)** The antiatherogenic effect of allicin: Possible mode of action. *Pathobiology*. 72(6), 325-34.
- 62- Medic Saric M., Jasprica I., SmolicBubalo A. et Momar A. (2003)** Optimization of chromatographic conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids. *Croatica Chemica Acta* .77 (1-2),361-366. (Cited in Mohammedi Z, 2005).
- 63- Amagase H. (2006)** Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J .Nutr.* 3S,716S-25S.
- 64- Jakubowski H. (2003)** On the health benefits of *Allium* sp. 19(2),167-8.
- 65- Edeltrant Kroger. (2002)** L'ail: plus qu'un simple aliment ? Québec Pharmacie. 49-10.
- 66- Willcox J.K., Ash S.L. et Catignani G.L. (2004)** Antioxidant and prevention of chronic disease. *Grit Rev Food. Sci Nutr.* 44(4),275-95.
- 67- Miesan K.H. et Mohamed S. (2001)** Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *J Agric Food Chem.* 49(6),3106-12.
- 68- Lee Iarungrayub N and Rattanapanone V. (2006)** Quantitative evaluation of the antioxidant properties of garlic and shallot preparations. *Nutrition.* 22(3),266-74.
- 69- Gorinstein S. et Leontonucy H. (2006)** Raw and boiled garlic enhances plasma antioxidant activity and improves plasma lipid metabolism in the cholesterol-fed rats. *Life Sci.* 78(6),955-63.
- 70- Cao G., Sofic T et Prior R.L. (1996)** Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric. Food. Chem.* 44,426-31.
- 71- Vinson J.A. et Hao Y. (1998)** Phenol antioxidant quantity and quality in foods vegetable. *J. Agric. Food. Chem.* 46,3630-4.
- 72- Silagy C.A. et Neil H.A. (1994)** A meta-analysis of the effect of garlic on blood pressure. *J. Hypertens.* 12 (4), 463-8.
- 73- Voberg G. et Schneider B. (1990)** Therapy with garlic: Results of a placebo controlled, double blind study. *Br. J. Clin. Pract.* 69,7-11.
- 74- Martinez Cayuela M. (1995)** Oxygen free radicals and human disease. *Biochem.* 77, 147-161.
- 75- Jacques B. et André R. (2004)** *Biochimie métabolique* Ed ellipses .Paris. 217-225.

76-Bruneton J. (1999) Pharmacognosie. Phytochimie .Plantes médicinales . 3ème Ed Techniques et documentations. Paris. 227-494.

77-Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C. (2008) Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities .*C. R. Biologies.* 331, 372-379.

78-Favier A. (2003) Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique . L'actualité chimique. 108-115.

79-Boyd B., Ford C., Koepke M.C., Gary K., Horn E., McAnalley S., and McAnalley B. (2003) Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. *Glycoscience & Nutrition.* (Cited in Mohammedi Z, 2005). 4 (6),7p.

80-Pincemail J., Meurisse M., Limet R et Defraigne J. O. (1999) L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons.* 4 (5).

81- Negre-Salvayre C., Coatrieux C., Ingueneau R., Salvayre Br. J. (2008) *Pharmacol.* 6(20) , 153p.

82- Vuorela S. (2005) Analysis, isolation. and bioactivities of rapeseed phenolics. Helsinki

83-Kato R., Nakadate T., Yamamoto S., Sugimura T. (1983) Inhibition of 12-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced tumor promotion and ornithine decarboxylase activity by quercetin: possible involvement of lipoxygenase inhibition. *Carcinogenesis.* 4(10),1301-5.

84-Ganther H.E. (1999) Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention. complexities with thioredoxinreductase. *Carcinogenesis.*20 (19), 1657- 1666.

85-Abdel Hameed E.S., (2009) Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chem.* 114,1271-1277.

86-Diplok A.T. (1991) Antioxydant nutriments and disease prevention: an Overview. *Am J Clin Nutr:* 53 (suppl),189S-93S.

87-Aruoma O. I., Spencer J. P. E., Rossi R., Aeschbach R., Khan A., Mahmood N., Munoz A., Murcia A., Butler J., Halliwell B. (1996) An Evaluation of the Antioxidant and Antiviral Action of Extracts of Rosemary and Provençal Herbs. *Food and Chemical Toxicology.* 34,449-456.

88-Frankel E. N., Meyer A. S. (2000) The problems of using one-dimensional methods to evaluate multidimensional food and biological antioxidants. *Journal of Science and Food Agriculture.* 80, 1925-1941.

89-Miller N.J. Sampson J., Candeias L.P. et al. (1996) Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett.* 384,240-2.

90-Burillo J., Codina C. (2002) Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J Agric Food Chem.* 50, 6882-90.

91-Namiki M. (1990) Antioxidants/Antimutagens in Food. *CRC critical reviews in Food Science and Nutrition.* 29, 273-300.

92-Antwerpen P.V. (2006) Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système myclopéroxydase / Peroxyole d'hydrogène / Clilorure. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Science Pharmaceutiques Bruxelles.

93-Lindau-sehpard B., Shaffer J. (1993) Expression of human catalase in acatalasemic murine SVB2 cells confers protection from oxidative damage, free rad boil Med. 15,581-8.

94-Verma A. K., Johnson J. A., Gould M. N., Tanner M. A. (1988) Inhibition of 7, 12-dimethylbenz (a)anthracene- and N-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by the dietary flavonol quercetin. *Cancer Res.* 48(20),5754-8.

95-Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1999) Free radicals in biology and medicine, Oxford, UK.

96-Marfak A. (2003) Thèse de doctorat Radiolyse Gamma des flavonoïdes ; Etude de leur réactivité avec des radicaux issus des alcools. 6-10.

97-Ardestani A., Yazdanparast R. (2007) Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chem.* 104, 21-29.

98-Smirnoff N. (2005) Antioxidants and reactivities oxygen species in plants.

99- Escargueil Blanc I., Salvayre R., Vacaresse N., Ju"rgens G., Darblade B., Arnal JF., Parthasarathy S. et Ne`gre Salvayre A. (2001) Mildly oxidized LDL induces activation of platelet-derived growth factor beta-receptor pathway. *Circulation.* 104, 1814-2000.

100- Esterbauer H., Schaur R . J and Zollner H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxy nonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 11, 81–128.

101- Fang Y . Z., Yang S. et Wu G. (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* 18, 872–879.

102- Galvani S., Coatrieux C., Elbaz M., Grazide MH., Thiers JC., Parini A., Uchida K., Kamar N., Rostaing L., Baltas M., Salvayre R. et Ne`gre-Salvayre A. (2008) Carbonyl scavenger and antiatherogenic effects of hydrazine derivatives. *Free Radic Biol Med.* 45, 1457-1467.

103- Go"rlach A., Brandes R . P., Nguyen K., Amidi M., Dehghani F. et Busse R. A. (2000) gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res.* 87, 26–32.

104-Lhuillier A. (2007) Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae). Thèse de doctorat. Toulouse.

105- Griendling K . K., Sorescu D and Ushio-Fukai M. (2000) NAD (P) H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 86, 494–501.

106- Georgiou C . D., Papapostolo I., Patsoukis N., Tsegenidis T. et Sideris T. (2005) An ultrasensitive fluorescent assay for the in vivo quantification of superoxide radical in organisms. *Anal Biochem.* 347, 144–151.

107-Da Silva E.J.A., Oliveira A. B., Lapa A.J. (1994) Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 46(2) , 118-22.

108- Turkmen, N., Velioglu, Y. S, Sari, F., Polat, G. (2007) Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black.

109-Milane H. (2004) La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur. 13-36..

110-Fuhrman B., Lavy A. et Aviram M. (1995) Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J.Clin. Nutr.*61,549-554. (Cited in Yakhlaf G, 2009).

111-Halliwel B. (1994) Free radicals and antioxidants.*Nutr.Rev.*52,253-265.(cited in Yakhlaf G,2009).

112-Jovanovic S.V., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B.,and Simic M.G. (1994) Flavonoids as antioxidants.*J. Am. Chem. Soc.*116, 4846-4851.

113-Bouakaz I. (2006) Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. Mémoire de magister.Batna.

114-Brown J.E., Khodr H., Hider R.C. et Rice-Evans C. (1998) Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.* 330, 1173-1178.

115-Ciulei I. (1982) Methodology for analysis of vegetable drugs. 67p.

116-Djeridane, A., Yous, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006) Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 97,654-660.

117-Markowicz Bastos D. H., Saldanha L. A., Catharino R. R., Sawaya A.C.H. F., Cunha I B.S., Carvalho P. O. Eberlin M. N. (2007) Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules.* 12,423-432.

118-Maataoui B. S., Hmyene, A., Hilali S. (2006) Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*. 7, 3-8.

119-Mohammedi Z. (2006) Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de magister.Tlemcen.

120-Celiktas O.Y., Hames Kocabas E.E., Bedir E., Vardar Sukan F., Ozek T., Baser K.H.C. (2007a) Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem*. 100, 553-559.

121-Lopes Lutz D., S. Alviano D., S. Alviano C., P. Kolodziejczyk P. (2008) Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils *Phytochemistry*. 69, 1732-1738.

122-Wang, W., Wu, N., Zu, Y.G., Fu, Y.J. (2008) Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chem*. 108, 1019-1022.

123 – Nwman P. R.,Timmerman B .N.and Marby T.J (1974) laboratory manual for the systematic identification of flavonoids.125.

124-Markham K. R. (1982) Techniques of flavonoids identification.Academic press.london. Chap. 1 and 2, 1-113.

125-Yrjonen T. (2004) Extraction and planar chromatographic separation techniques in the analysis of natural products. Conference room 513 at Viikki info center. Faculty of pharmacy of the university Helsinki. 64.

126-Lee et al. (2003) Cacao has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine.J Agric Food chem.51.7292-7295.

127-Turkmen N., Velioglu Y. S., Sari F., Polat G. (2007) Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules*. 12, 484-496.

128- Yang W., Yang X and Xia Y. (1997) Active anticarcinogenic chemical components in ordinary garlic and selenium enriched garlic. *Chung Hua Yu Fang I Hsueh Tsa Chih*. 31, 304-6.

129- Pedraza Chaverri J., Medina Campos O.N. and Segoviano Murillo S. (2007) Effect of heating on peroxynitrite scavenging capacity of garlic. *Food and Chemical Toxicology*. 45,622-627.

130- Banerjee S.K., Dinda A.K., Manchanda S.C and Maulik S.K. (2002) Chronic garlic administration protects heart against oxidative stress induced by ischemic reperfusion injury. *BMC. Phamacol*. 2, 2-16.

RESUME

Les espèces oxygénées réactives (EOR) ont une grande capacité d'endommager presque tous les types de constituants cellulaires dans l'organisme, ce qui explique leur implication dans l'induction et/ou l'amplification de plusieurs pathologies. La supplémentation de l'organisme par des antioxydants exogènes s'avère très utile pour lutter contre ces espèces nocives.

Le présent travail a pour objectif d'évaluer l'activité anti-oxydante par le biais de la méthode au DPPH des extraits ETA, EMB, EEP, EAE et En-Bu d'une espèce locale d'*Allium sativum*.

Nous avons tout d'abord procédé aux dosages quantitatifs colorimétriques par un spectrophotomètre UV-Vis des polyphénols totaux, ainsi que les flavonoïdes comme étant la classe la plus importante de la famille des polyphénols et à une analyse qualitative des flavonoïdes par chromatographie sur couche mince (CCM).

Les dosages quantitatifs des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu et des flavonoïdes par la méthode d' AlCl_3 ont révélé une richesse des extraits (EAE et En-Bu) d'*Allium sativum* et une corrélation entre les teneurs en polyphénols (113.96 ± 1.89 et 117.92 ± 0.54 mg EAG/g) et celles en flavonoïdes (1230 ± 5.16 et 1485.7 ± 7.14 μg EQ/g) respectivement.

L'analyse qualitative par CCM a révélé une abondance des flavones, flavonols et anthocyanidine 3-glycoside, flavones glycosides, flavonols glycosides, Flavonones et les aurones dans les extraits d'ail.

L'expression des résultats du test DPPH ont confirmé les potentiels anti-radicalaire dose-dépendant très puissant, caractérisant les extraits organiques (EAE et En-bu) à piéger les radicaux libres, qui sont respectivement (99.02 et 99.62%), ces derniers sont comparables au control positif avec un pourcentage d'inhibition de 99.67%.

En conclusion; cette espèce locale d'*Allium sativum* constitue une ressource naturelle pour les futures études sur le stress oxydatif et ses complications.

Mots clés : Activité anti-oxydante, *Allium sativum*, CCM, DPPH, flavonoïdes.

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) have a high potential to damage almost all types of cellular constituents, which explains their involvement in the induction and/or amplification of a number of human pathologies. The supplementation of the body by exogenous antioxidants seems to be very helpful to fight these harmful species.

The present work aims to evaluate the antioxidant activity through the DPPH method of ETA, EMB, EEP, EAE and En-Bu extracts of a local species of *Allium sativum*.

We have first performed the quantitative colorimetric assays by UV-Vis spectrophotometer of total polyphenols and flavonoids as the most important class of the polyphenol family and a qualitative analysis of flavonoids by thin layer chromatography (CCM).

Quantitative determinations of total polyphenols by the Folin-Ciocalteu reagent and flavonoids by AlCl₃ method revealed a wealth and a correlation in (EAE, En-Bu) extracts of *Allium sativum* between polyphenol contents (113.96 ± 1.89 and 117.92 ± 0.54 mg EAG / g) and those of flavonoids (1230 ± 5.16 and 7.14 ± 1485.7 μ g EQ / g) respectively.

Qualitative analysis by CCM revealed an abundance of flavones, flavonols and anthocyanidin 3-glycoside, flavone glycosides, flavonol glycosides, flavonones and aurones in garlic extracts.

The expression of the results of DPPH test confirmed the anti-radical potential dose-dependent powerful characterizing organic extracts (EAE and En-bu) to scavenge free radicals, which are respectively (99.02 and 99.62%), the latter are comparable to the positive control with a percentage of inhibition of 99.67%.

In conclusion; this local species of *Allium sativum* is a natural resource for future studies on oxidative stress and its complications.

Keywords: antioxidant activity, *Allium sativum*, CCM, DPPH, flavonoids.

Noms et prénoms : Hamoudaoui hanan Boulebiar fairouz Ayadi ghania	Date de soutenance : 25/06/2014
Master académique en : BIOCHIMIE APPLIQUEE	
TITRE : Investigation phytochimique et étude in vitro du potentiel antioxydant des flavonoïdes extraits d'une espèce locale d' <i>Allium sativum</i>	
<p>Résumé :</p> <p>Les espèces oxygénées réactives (EOR) ont une grande capacité d'endommager presque tous les types de constituants cellulaires dans l'organisme, ce qui explique leur implication dans l'induction et/ou l'amplification de plusieurs pathologies. La supplémentation de l'organisme par des antioxydants exogènes s'avère très utile pour lutter contre ces espèces nocives.</p> <p>Le présent travail a pour objectif d'évaluer l'activité anti-oxydante par le biais de la méthode au DPPH des extraits ETA, EMB, EEP, EAE et En-Bu d'une espèce locale d'<i>Allium sativum</i>.</p> <p>Nous avons tout d'abord procédé aux dosages quantitatifs colorimétriques par un spectrophotomètre UV-Vis des polyphénols totaux, ainsi que les flavonoïdes comme étant la classe la plus importante de la famille des polyphénols et à une analyse qualitative des flavonoïdes par chromatographie sur couche mince (CCM).</p> <p>Les dosages quantitatifs des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu et des flavonoïdes par la méthode d'$AlCl_3$ ont révélé une richesse des extraits (EAE et En-Bu) d'<i>Allium sativum</i> et une corrélation entre les teneurs en polyphénols (113.96 ± 1.89 et 117.92 ± 0.54 mg EAG/g) et celles en flavonoïdes (1230 ± 5.16 et 1485.7 ± 7.14 μg EQ/g) respectivement.</p> <p>L'analyse qualitative par CCM a révélé une abondance des flavones, flavonols et anthocyanidine 3-glycoside, flavones glycosides, flavonols glycosides, Flavonones et les aurones dans les extraits d'ail.</p> <p>L'expression des résultats du test DPPH ont confirmé les potentiels anti-radicalaire dose-dépendant très puissant, caractérisant les extraits organiques (EAE et En-bu) à piéger les radicaux libres, qui sont respectivement (99.02 et 99.62%), ces derniers sont comparables au control positif avec un pourcentage d'inhibition de 99.67%.</p> <p>En conclusion; cette espèce locale d'<i>Allium sativum</i> constitue une ressource naturelle pour les futures études sur le stress oxydatif et ses complications.</p>	
Mots clés : Activité anti-oxydante, <i>Allium sativum</i> , CCM, DPPH, flavonoïdes.	

