



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



MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de

Master académique

FILIERE : Sciences Biologiques

OPTION : Biochimie Appliquée

Thème

**Etude phytochimique et évaluation des activités
biologiques des extraits aqueux et éthanoliques de la
plante *Bunium incrassatum* (Boiss) Batt et Trab.**

Présenté par : **DJARMOUNE Chahinez & HEZIL Ismahane**

Jury de soutenance :

Présidente: **Dr. KRIM Meriem**

MCB. Univ. Abbès Laghrou – Khenchela

Encadreur: **Dr. BOUHALIT Samira**

MCB. Univ. Abbès Laghrou - Khenchela

Examineur: **M^r RAHAL Khaled**

MAA. Univ. Abbès Laghrou - Khenchela

Promotion: Juillet 2019

Remerciement

Tout d'abord, je tiens à remercier le bon Dieu le tout Puissant de m'avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail...

À l'heure où nous apportons la touche finale à ce mémoire, Je suis reconnaissante envers les circonstances de la vie de m'avoir permis de rencontrer M^{me} Samira BOUHALIT, ma directrice de recherche. Je la remercie en tout premier lieu. Ses encouragements, sa confiance ainsi que ses commentaires m'ont été fort précieux tout au long de sa réalisation.

Je tiens aussi à remercier, M^{me} Meriem KRIM et Mr khaled RAHAL qui me font l'honneur d'assister et de juger ce Modest travail et de m'avoir offert des suggestions et des idées.

À un moment où je n'étais pas du tout certain s'il pouvait être réaliste et réalisable. Mes sincères remerciements vont également à tous les enseignants du département de Science de Nature et de Vie qui m'a appris beaucoup de chose durant notre cycle de formation ils m'ont été d'un grand secours pour le démarrer avec leurs idées et leurs mots d'encouragement.

Je tiens à remercier sincèrement et spécialement tous mes amis de promo qui m'ont extrêmement aidé pour mes recherches, leurs soutiens et leurs encouragements m'ont été très précieux,

Je remercie de tout cœur les ingénieures du laboratoire de Biologie cellulaire et moléculaire. Et je suis infiniment reconnaissante pour leur participation et implication dans ma recherche. Leur enthousiasme a certainement contribué à la réussite du projet Sans eux mon mémoire n'existerait pas.

Encore une fois un immense merci

Dédicace

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est

Tous simplement que Je dédie ce Travail a ;

A Mon très cher Père

L'épaule solide, l'œil attentif compréhensif et la personne la plus digne de mon estime ; aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments, dévouement et le respect que j'ai toujours pour toi. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être ; que dieu te préserve et te procure santé et longue vie.

Ma tendre mère

Tu m'as donné la vie la tendresse et le courage pour réussir. Tout ce que je peux t'offrir ne pourra exprimer l'amour et la reconnaissance que je te porte. En témoignage, je te remercie pour tes sacrifices et pour l'affection dont tu m'as toujours donné, Tu représente pour moi l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

*A mes frères *Ismail*, *Salah*, *Zakaria* et *Diaa**

*A mes chères sœurs *Amina*, *Rima*, *Ahlam**

*A ma cousine *Maya**

*A mes neveux *Anfel*, *Mayssem*, *Siraj*, *Jana*, *Safa**Dhoha**

Que dieu te protège, t'accorde santé, succès et plein de bonheur

*A mes très chères amis d'enfances *Imen*, *Hana* et bien sur tous mes amis et camarades de classe.*

*Aux personnes que j'ai passé le plus de temps durant ma vie et qui sont toujours été là pour moi et que je souhaite tous le bonheur du monde a vous *Afaf*, *Icha*, et *Khadija**

*A mon binôme et ma copine, *Chahinez**

Enfin, je dédie ce mémoire aux enfants qui ont participé à ma recherche et à qui je souhaite un milieu qui leur permette de s'épanouir en grandissant. J'ai le désir secret que plusieurs d'entre eux aient la curiosité, un jour, de le lire.

***ISMALHANE ***

Dédicace

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est

Tous simplement que Je dédie ce Travail a ;

Ma tendre mère *Bariza*

Tu m'as donné la vie la tendresse et le courage pour réussir. Tout ce que je peux t'offrir ne pourra exprimer l'amour et la reconnaissance que je te porte. En témoignage, je te remercie pour tes sacrifices et pour l'affection dont tu m'as toujours donné, Tu représente pour moi l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

A Mon très cher Père *Ounis*

L'épaulé solide, l'œil attentif compréhensif et la personne la plus digne de mon estime ; aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments, dévouement et le respect que j'ai toujours pour toi. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être ; que dieu te préserve et te procure santé et longue vie.

A ma sœur *Houda* que j'aime le plus au monde*

A qui je souhaite un avenir radieux plein de bonheur.

A mes frères *Abd Eldjalil ; Takï ; Abd Arahim*

Pour toute l'ambiance dont vous m'avez entouré, pour toute la spontanéité et vos élans chaleureux, Je vous dédie ce travail.

Puisse Dieu le tout puissant exhauser tous vos vœux

A mes grands parents *que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières. Que Dieu vous préserve santé et longue vie.*

*Enfin, je dédie ce mémoire Aux personnes avec lesquelles j'ai passé le plus de temps durant ma vie et qui sont toujours été là pour moi et que je souhaite tous le bonheur du monde a vous *Chaima*, Selwa**

****CHAHINEZ****

Résumé

Une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude des molécules antioxydantes d'origine naturelle, provenant de la flore terrestre ou même aquatique. Nous sommes intéressées dans ce travail à l'étude des composés phénoliques et l'évaluation des propriétés biologiques des extraits de *Bunium incrassatum*, qui est une plante alimentaire et médicinale utilisée en médecine traditionnelle en Algérie.

Les tests phytochimiques réalisés ont permis de mettre en évidence la présence des flavonoïdes, des tanins, des alcaloïdes, des coumarines et des terpénoïdes...

Les résultats du dosage des polyphénols montrent que l'extrait éthanolique est plus riche en composés phénoliques ($800,58 \pm 86,8$ mg EAG/g), alors le taux des flavonoïdes est supérieure dans l'extrait aqueux 1 ($63,3 \pm 3,05$ μ g EQ/g) que les deux autres extraits aqueux 2 et éthanolique EE-3 ($32,7 \pm 2,71$ μ g EQ/g et $41,13 \pm 3,21$ μ g EQ/g respectivement.).

L'évaluation quantitative du pouvoir piègeur des extraits vis-à-vis du DPPH confirme que les extraits aqueux EA-1 et EA-2 sont les plus actifs, avec des IC_{50} de l'ordre de 1,6 et 1,4 mg/ml respectivement et aussi l'EA-2 a une activité anti-inflammatoire, qui donnée une pourcentage d'inhibition plus élevé que celui du médicament de référence.

Les extraits aqueux et éthanolique du bunium étaient moyennement actifs sur les trois souches testées (*Escherichia coli*, *Listeria* et *Staphylocoque*). Les résultats de l'activité antifongique ont montré l'inefficacité de tous les extraits contre la souche fongique *penicillium*.

Les résultats obtenus sont très encourageants et ouvrent une voie prometteuse pour l'utilisation des extraits de *Bunium incrassatum* puisque elles constituent une source d'activité antioxydante et antibactérienne grâce à leur richesse a composés actifs.

Mots clés : *Bunium incrassatum*, Flavonoïdes, Polyphénols totaux, Activité antioxydante, Activité anti-bactérienne.

Abstract

Much of the current researches focus on the study of natural antioxidant molecules derived from terrestrial or even aquatic flora. In this work we are interested of phenolic compounds's study and the evaluation of the biological properties of the extracts of *Bunium incrassatum*, which is a food and medicinal plant used in traditional medicine in Algeria.

The phytochemical tests carried out demonstrate the presence of flavonoids, tannins, alkaloids, coumarins and terpenoids

The results of the polyphenol assay show that the ethanolic extract is richer in phenolic compounds (800.58 ± 86.8 mgEAG/g), whereas the level of flavonoids is higher in the aqueous extract 1 (63.3 ± 3.05 μ g EQ / g) than the other two aqueous extracts 2 and ethanol EE-3 (32.7 ± 2.71 μ g EQ / g and 41.13 ± 3.21 μ g EQ / g respectively.).

The quantitative evaluation of the scavenging power of the DPPH extracts confirms that the EA-1 and EA-2 aqueous extracts are the most active, with IC₅₀s of the order of 1.6 and 1.4 mg / ml. ml respectively and also EA-2 has anti-inflammatory activity, which gives a higher percentage inhibition than that of the reference drug.

The aqueous and ethanol extracts of bunium were moderately active on the three strains tested (*Escherichia coli*, *Listeria* and *Staphylococcus*). The results of the antifungal activity showed the inefficacy of all extracts against the fungal penicillium strain.

The results obtained are very encouraging and open up a promising avenue for the use of *Bunium incrassatum* extracts since they constitute a important source of antioxidant and antibacterial activity thanks to their active compound richness..

Key words: *Bunium incrassatum*, Flavonoids, Total polyphenols, Antioxidant activity, Anti-bacterial activity.

الملخص

تركز جزء كبير من الاهتمام البحثي الحالي في دراسة الجزيئات المضادة للأوكسدة الطبيعية من اصل النباتات البرية أو حتى المانية. في بحثنا هذا نهتم بدراسة المركبات الفينولية وتقييم الخصائص البيولوجية لمستخلصات *Bunium incrassatum*، وهو نبات غذائي وطبي يستخدم في الطب التقليدي في الجزائر.

أظهرت الاختبارات الكيميائية النباتية وجود مركبات الفلافونويد والعفص والقلويدات والكومارين واليربينويدات .. كما أظهرت نتائج اختبار البوليفينول أن مستخلص الإيثانول أكثر ثراءً في المركبات الفينولية (86.8 ± 800.58 ملغم / EAG جم) ، في حين أن مستوى الفلافونويد أعلى في المستخلص المائي 1 (3.05 ± 63.3 ميكروغرام مكافئ / جم) من المستخلصين الآخرين المائي والإيثانولي EE-3 (32.7 ± 2.71) ميكروغرام مكافئ / جم و 3.21 ± 41.13 ميكروغرام مكافئ / جم على التوالي.

يؤكد التقييم الكمي للنشاط المضاد للاكسدة DPPH أن المستخلصات المانية EA-1 و EA-2 هي الأكثر نشاطاً ، مع IC50 بترتيب 1.6 و 1.4 مجم / مل على التوالي وأيضاً EA-2 له نشاط مضاد للالتهابات ، مما يعطي نسبة تثبيط أعلى من مثيله في الدواء المرجعي المستخدم.

كانت المستخلصات المانية والإيثانول للبونيوم معتدلة النشاط في السلالات الثلاث التي تم اختبارها (الإشريكية القولونية والليستيريا والمكورات العنقودية). أظهرت نتائج النشاط المضاد للفطريات عدم فعالية جميع المستخلصات ضد سلالة البنسلوم الفطرية.

النتائج التي تم الحصول عليها مشجعة للغاية وتفتح طريقة واعدة لاستخدام مستخلصات *Bunium incrassatum* لأنها تشكل مصدرًا لنشاط مضاد للأوكسدة ومضاد للجراثيم بفضل محتواها العالي من المركبات النشطة.

الكلمات المفتاحية: *Bunium incrassatum* ، الفلافونويد ، البوليفينول الكلي ، نشاط مضاد للأوكسدة ، النشاط المضاد للبكتيريا.

Abréviation

AlCl₃	Chlorure d'Aluminium
ATP	Adénosine triphosphate
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DPPH	2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl
EAG	Equivalents acide gallique
EA-1-	Extrait aqueux par infusion
EA-2-	Extrait aqueux par décoction
EE-3-	Extrait éthanolique
EQ	Equivalents quercétine
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FeCl₃	Chlorure ferrique
HE	Huile essentiel
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine
HPLC	Chromatographie en phase liquide a haute performance
IC₅₀	Concentration inhibitrice médiane
MHA	Gélose Muller Hinton
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide-Phosphate
NaOH	L'hydroxyde de sodium
NH₄OH	Hydroxyde d'ammonium
NO.:	Monoxyde d'azote
OH.:	Radical hydroxyle
ONOO.- :	Anion peroxydinitrite
O₂.- :	Radical superoxyde
PDA	Potato dextrose agar
PI%	Pourcentage d'inhibition
TSH	Thyroid stimulating hormon
UV	Ultra violet

Liste des figures

Figure 01	Répartition géographique des Apiacées dans le monde	3
Figure 02	Schéma d'une Apiacées	4
Figure 03	Exemples de quelques composants des huiles essentielles contiennent dans la famille des Apiacées.	5
Figure 04	Distribution géographique du genre <i>Bunium</i>	6
Figure 05	La partie aérienne et les grains de <i>Bunium incrassatum</i>	7
Figure 06	Structure de base du flavonoïde	11
Figure 07	Les structures chimiques des principales familles des flavonoïdes	12
Figure 08	Voie de formation des radicaux libres de l'oxygène	16
Figure 09	Altération de l'ADN par l'attaque radicalaire	18
Figure 10	Mécanisme d'action de Superoxyde dismutase (SOD)	19
Figure 11	Cycle de détoxification par la glutathion peroxydase	20
Figure 12	Schéma des défenses antioxydants enzymatiques	20
Figure 13	Représentation de la plante de <i>Bunium Incrassatum</i>	23
Figure 14	Protocole d'obtention des extraits brute de <i>Bunium incrassatum</i>	25
Figure 15	Protocole de dosage des polyphénols	29
Figure 16	Dosage des flavonoïdes totaux	30
Figure 17	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH•entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant	31
Figure 18	Protocole d'inhibition de la dénaturation de l'albumin	34
Figure 19	Protocole de l'activité antifongique	38
Figure20	Rendements des extraits de <i>Bunium incrassatum</i>	37
Figure 21	Teneur en polyphénols totaux pour les différents extraits de <i>Bunium incrassatum</i>	39
Figure 22	Teneur en flavonoïdes pour les différents extraits de <i>Bunium incrassatum</i>	40
Figure 23	Pourcentages d'inhibition du DPPH• en fonction des différentes concentrations des extraits de la plante B. <i>incrassatum</i> et l'acide ascorbique	41
Figure 24	Activité antiradicalaire du DPPH des extraits des graines de <i>Bunium incrassatum</i>	41
Figure 25	IC ₅₀ des extraits et d'acide ascorbique	42

Figure 26	L'effet de l'extrait aqueux par décoction sur les bactéries étudiées	45
Figure 27	Zones d'inhibition d'extrait aqueux par décoction sur les bactéries ; S, aureus et E-coli	45
Figure 28	L'effet de l'extrait aqueux par infusion sur les bactéries étudiées	46
Figure 29	Zones d'inhibition d'extrait aqueux par infusion sur les bactéries ; S, aureus et E-coli	46
Figure 30	L'effet de l'EeOH sur les bactéries étudiées	47
Figure 31	Zones d'inhibition d'extrait éthanolique sur les bactéries ; S, aureus et E-coli	47
Figure 32	Pourcentage de la stabilité de SAH par les extraits des graines de B. incrassatum à différents concentrations	51

Liste des tableaux

Tableau 01 : principale classes des composées phénoliques.	10
Tableau 02 : Description générale de souches utilisées	32
Tableau 03 : Rendements et caractéristiques des extraits des tubercules de <i>B. incrassatum</i>	36
Tableau 04 : Les résultats de criblage phytochimique des familles chimiques contenues dans les différents extraits de <i>Bunium incrassatum</i>	38
Tableau 05 : Diamètre des zones d'inhibition de la croissance bactérienne par les différents extraits aqueux et éthanolique de <i>Bunium incrassatum</i> en (mm).	44
Tableau 06 : Les résultats de l'activité antifongique de différents extraits de <i>B. incrassatum</i>	49
Tableau 07 : Les pourcentages d'inhibition de la dénaturation du SAH des différents extraits	50

Table des Matières

Résumé.....	I
Abstract.....	II
المخلص.....	III
Introduction.....	1
CHAPITRE I : <i>Bunium incrassatum</i>	
I- La famille des apiaceae.....	3
I-1- Caractéristique des apiacées	4
I-2- Composition chimique	5
I-2-1- Les huiles essentielles	5
I-2-2- Les coumarines	6
II- Le genre de Bunium	6
III- <i>Bunium incrassatum</i>	7
III-1- Généralité sur l'espèce <i>Bunium incrassatum</i>	7
III-2- Description botanique et morphologique	8
III-3- Effet pharmacologique	8
CHAPITRE II : Les métabolites secondaires	
1- Généralité	9
2- Classification des métabolites secondaires	9
2-1- Les composées phénoliques	9
2-1-1- La voie de biosynthèse	9
2-1-2- Classification	10
2-2- Les alcaloïdes	13
2-3- Les terpénoïdes	14
CHAPITRE III : Le stress oxydatif	
I- Stress oxydant	15
1- Les radicaux libres	15
1-1- Les différents types des radicaux libres	15
1-2- Les sources des ERO	16
2- Les effets délétères du stress oxydant	17

2-1- Peroxydation des lipides	17
2-2- Oxydation d'ADN	17
2-3- Oxydation des protéines	18
II- Les antioxydants	18
1- Les antioxydants enzymatiques	18
1-1- Superoxyde dismutase (SOD)	19
1-2- Glutathion peroxydase (GSH-Px)	19
1-3- La catalase	20
2- Les antioxydants non enzymatiques	21
2-1- Les antioxydants endogènes	21
2-2- Les antioxydants exogènes	21

CHAPITRE IV : Matériels et méthodes

I- Matériels	23
I-1- Préparation du matériel végétal	23
I-2- Matériel biologique	23
I-3- Matériels et équipements	24
II- Méthodes	24
II-1- Préparation des extraits	24
II-1-1- Préparation d'extraits éthanolique	24
II-1-2- Préparation d'extraits aqueux par décoction	24
II-1-3- Préparation d'extraits aqueux par infusion	25
II-2- Calcul des rendements d'extraction	26
II-3- Screening phytochimique	26
II-4- Analyse quantitative des composés phénoliques	28
II-4-1- Teneur en phénols totaux	28
II-4-2- Teneur en flavonoïde	29
II-5- Evaluation de l'activité antioxydante	30
II-6- Evaluation de l'activité antibactérienne	31
II-7- Evaluation de l'activité antifongique	33
II-8- Evaluation de l'activité anti-inflammatoire	34

CHAPITRE V : Résultats et Discussion

1- Rendements des extraits	36
2- Tests de mise en évidence de certains composés phytochimiques	37

3- Analyse quantitative et des flavonoïdes des extraits	39
3-1- Dosage des polyphénols	39
3-2- Dosage des flavonoïdes	40
4- Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH	40
5- Etude de l'activité antibactérienne	44
6- L'activité antifongique	49
7- L'activité anti-inflammatoire	50
Conclusion	52
Références bibliographiques	54
Annexe.....	

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante que la chimiothérapie. Le présent travail avait pour but la recherche des métabolites secondaires, la détermination de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes, des extraits aqueux et hydroéthanolique de la plante médicinales *Bunium Incrassatum* de la famille des Apiacées originaire de la wilaya de Khenchela et la détermination de leur activité antioxydante, anti bactérienne, anti-inflammatoire et aussi anti fongique.

Les résultats de cette étude révèlent que cette plante possède un éventail de substances potentiellement bioactives (composés phénoliques, composés terpéniques, alcaloïdes...) susceptibles d'être exploités à plusieurs échelles thérapeutique : antibactérienne, anti-inflammatoire, antifongique, antioxydant...etc.

Le processus d'extraction des substances végétales montre que l'utilisation des trois méthodes d'extraction donne des rendements différents dont le plus élevés est celle de fraction aqueuse EA-1, alors que le plus faible rendement correspond la fraction hydro éthanolique EE-3-, cette fraction malgré son faible rendement elle présente une grande richesse en en polyphénol totaux par rapport aux extraits aqueux. Concernant les flavonoïdes, nous avons remarqué des teneurs plus élevées dans l'extrait aqueux (infusé), alors que les deux autres extraits (décocté et éthanolique à 80%) possèdent des teneurs plus faibles en flavonoïdes.

Les résultats du test au DPPH ont montré que l'extrait EA-2 du bunium a présenté une bonne activité anti-radicalaire, suivi par l'extrait EA-1- alors que l'extrait EE-3- a montré une activité antiradicalaire faible par rapport à l'acide ascorbique.

Et pour l'activité antimicrobienne des extraits ; le résultat obtenu montre que l'extrait hydro éthanolique possède un effet antibactérien considérable vis-à-vis les souches testées. L'effet des extraits sur la souche fongique isolé penicillium n'a pas donné de zone d'inhibition avec les trois extraits.

L'étude de l'activité anti-inflammatoire par la technique de la dénaturation protéique a révélé que les deux extraits exercent une forte activité antiinflammatoire. Notamment à partir de la concentration de 400 µg/ml avec un taux d'inhibition supérieur à 60 % pour l'extrait EA-2. Mais cette activité ds deux autres extraits EA-1 et EE-3 reste médiocre parrapport à

l'activité du diclofénac sodique qui a révélé un taux d'inhibition de 56 % à la même concentration.

Cependant, ce travail reste préliminaire. Il serait beaucoup plus intéressant de compléter ce travail pour ;

- Caractériser les constituants de cette plante par des méthodes analytiques plus performantes comme HPLC, GC-SM et le RMN.
- Tester les autres méthodes d'extraction et évaluer le rendement des substances obtenues
- Déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) de l'extrait sur une large gamme d'agents pathogènes (virus, parasites, bactéries et champignons).

Depuis l'antiquité l'homme utilise les plantes comme une source principale de nourriture, par la suite s'est développé pour les utiliser comme médicaments et remèdes à fin de soigner les différentes maladies. Jusqu'à maintenant les plantes sont encore destinées à la santé humaine malgré les efforts des chimistes qui essayent de synthétiser de nouvelles molécules. D'après les études statistiques, plus de 25% des médicaments dans les pays développés dérivent directement ou indirectement des plantes (Damintoti et al., 2005). Ces plantes représentent un réservoir immense de composés médicinaux potentiels attribués aux métabolites secondaires qui présentent l'avantage d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques.

Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études (Sanago, 2006). il existe plusieurs types des extraits, selon le solvant employé (eau distillée, éthanol) ainsi que la partie de végétal (feuille, écorce, fruit...) influençant le type de métabolites extraits (Atmani et al., 2009).

Ce travail, dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne en général et celle de la région de Khenchela en particulier, vise à étudier une plante médicinale locale d'un grand intérêt économique, commercial et thérapeutique majeur, *Bunium incrassatum*, appelée couramment Talghouda, qui croit abondamment dans les terres labourées du tell. Elle pourrait être vue comme une culture adaptée pour les régions de montagne et possède également un trésor à creuser pour le traitement du goitre et le dysfonctionnement de la thyroïde (Boumediou et Addoun, 2017).

Cette plante a plusieurs activités biologiques notamment l'activité anti-inflammatoire, antimicrobienne, et antioxydante qui sont attribuées à ses différentes composantes actives: les coumarines, les flavonoïdes, les tanins ...etc (El Kolli et al., 2017), L'objectif de notre travail, est l'estimation de contenu des graines de *Bunium* en polyphénol totaux, en flavonoïdes totaux, en, et l'évaluation de l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, antibactérienne et antifongique de cette plante.

Le présent travail est scindé en deux parties. La première est une étude bibliographique concernant des informations sur la plante *Bunium incrassatum*, des notions sur métabolites secondaires et les stress oxydatif. La deuxième partie à deux chapitres dont le premier décrit le matériel et les méthodes utilisées dans ce travail qui porte sur :

- L'analyse des tests phytochimiques des différents extraits organiques et aqueux, par décoction et par infusion des graines de *Bunium incrassatum*.
- Evaluation de taux des polyphénols totaux, et des flavonoïdes des différents extraits.
- L'étude de l'activité antioxydante des différents extraits de *Bunium incrassatum* avec le DPPH.
- L'étude des activités ; anti-inflammatoire, antibactérienne et antifongique des différents extraits organiques et aqueux des graines de *Bunium incrassatum*.

Le deuxième chapitre s'intéresse aux résultats et la discussion Le manuscrit est achevée par une conclusion générale résumant les principaux résultats obtenus.

INTRODUCTION

Introduction

Depuis l'antiquité l'homme utilise les plantes comme une source principale de nourriture, par la suite s'est développé pour les utiliser comme médicaments et remèdes à fin de soigner les différentes maladies. Jusqu'à maintenant les plantes sont encore destinées à la santé humaine malgré les efforts des chimistes qui essaient de synthétiser de nouvelles molécules. D'après les études statistiques, plus de 25% des médicaments dans les pays développés dérivent directement ou indirectement des plantes (Damintoti et al., 2005). Ces plantes représentent un réservoir immense de composés médicinaux potentiels attribués aux métabolites secondaires qui présentent l'avantage d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques.

Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études (Sanago, 2006). il existe plusieurs types des extraits, selon le solvant employé (eau distillée, éthanol) ainsi que la partie de végétal (feuille, écorce, fruit...) influençant le type de métabolites extraits (Atmani et al., 2009).

Ce travail, dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne en général et celle de la région de Khenchela en particulier, vise à étudier une plante médicinale locale d'un grand intérêt économique, commercial et thérapeutique majeur, *Bunium incrassatum*, appelée couramment Talghouda, qui croit abondamment dans les terres labourées du tell. Elle pourrait être vue comme une culture adaptée pour les régions de montagne et possède également un trésor à creuser pour le traitement du goitre et le dysfonctionnement de la thyroïde (Boumediou et Addoun, 2017).

Cette plante a plusieurs activités biologiques notamment l'activité anti-inflammatoire, antimicrobienne, et antioxydante qui sont attribuées à ses différentes composantes actives: les coumarines, les flavonoïdes, les tanins ...etc (El Kolli et al., 2017), L'objectif de notre travail, est l'estimation de contenu des graines de *Bunium* en polyphénol totaux, en flavonoïdes totaux, en, et l'évaluation de l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, antibactérienne et antifongique de cette plante.

Le présent travail est scindé en deux parties. La première est une étude bibliographique sur l'espèce, des notions sur métabolites secondaires et les stress oxydatif. La deuxième partie à deux chapitres dont le premier décrit le matériel et les méthodes utilisées dans ce travail qui porte sur :

- L'analyse des tests phytochimiques des différents extraits organiques et aqueux, par décoction et par infusion des graines de *Bunium incrassatum*.
- Evaluation de taux des polyphénols totaux, et des flavonoïdes des différents extraits.
- L'étude de l'activité antioxydante des différents extraits de *Bunium incrassatum* avec le DPPH.
- L'étude des activités ; anti-inflammatoire, antibactérienne et antifongique des différents extraits organiques et aqueux des graines de *Bunium incrassatum*.

Le deuxième chapitre s'intéresse aux résultats et la discussion Le manuscrit est achevée par une conclusion générale résumant les principaux résultats obtenus.

PREMIER PARTIE :

Synthèse bibliographique

Chapitre I :

Bunuim incrassatum

I- La famille des Apiaceae

Les Apiaceae, communément connues sous le nom de la famille de carotte ou de persil, est un groupe de plantes aromatiques la plupart avec des tiges creuses (Pimenov et Leonov, 1993 ; Menglan et al., 2005). C'est l'une des plus grandes familles de plantes à fleurs. Elle inclut des plantes bien connues: Anis, Carvi, Carotte, Céleri, Persil ...etc.

Les plantes de la famille des Apiacées sont des végétaux herbacés, des arbres et des arbustes, dicotylédones qui sont soit bisannuelles, annuelles ou vivaces, il présente une tige cannelée et noueuse (Lriushin, 2012).

Les Apiacées anciennement appelées Umbellifères, en relation avec la structure en ombelles des inflorescences (Filliat, 2012), comprennent environ 3000 espèces et 446 genres, se répartissant dans toutes les régions tempérées mais surtout dans l'hémisphère nord. C'est une famille très homogène facile à reconnaître grâce à son inflorescence en ombelles composées. Paradoxalement, les espèces de cette famille sont assez difficiles à différencier les unes des autres.

La famille est répartie sur la majeure partie du globe, plus commune dans les régions montagneuses tempérées et relativement rare en zone tropicale (Heywood et al., 1996).

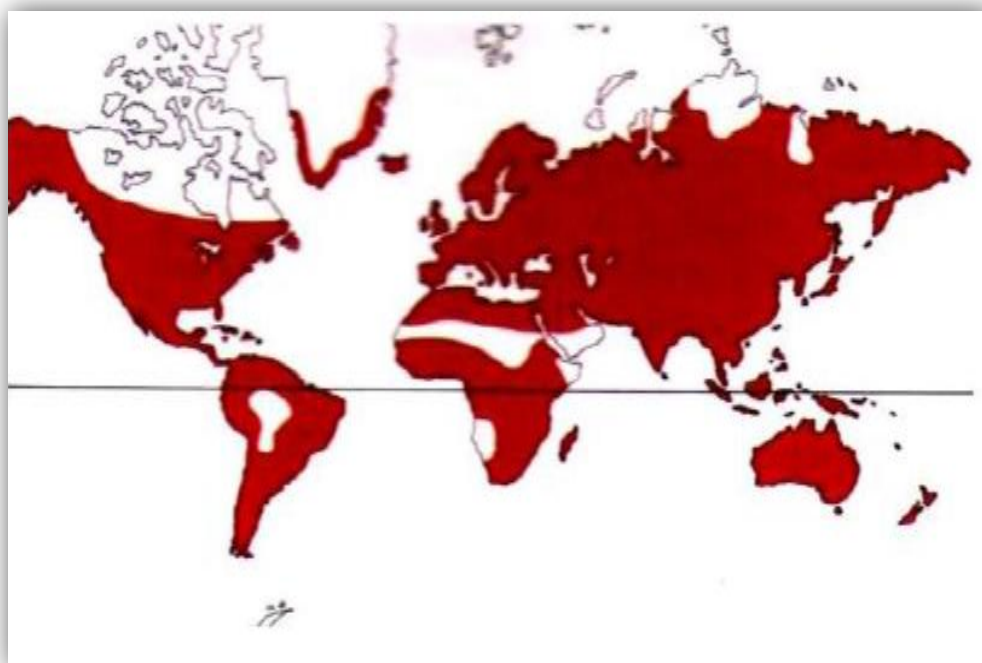


Figure 01 : Répartition géographique des Apiacées dans le monde (Banhamed, 2009).

I-1- Caractéristiques des Apiacées

Les Apiaceae sont relativement homogènes et caractérisées notamment par leur inflorescence typique, l'ombelle. Elles sont, à quelques exceptions presque toutes herbacées, rarement ligneuses et arbustives, à plan floral fixe, à fleurs hermaphrodites, rarement dioïques ou polygames, disposées en ombelles, souvent munies à la base d'un verticille de bractées (involucre) ou composées de plusieurs ombelles simples (ombellules) presque toujours pourvues de bractéoles (involucelle). Celles du centre de l'ombelle sont régulières et celles du bord ont souvent des pétales plus grands vers l'extérieur (Lejoly, 2005; Benahmed, 2009 ; Avakiantz, 2012; Filliat, 2012).

La tige : Des tiges à entre-nœuds souvent creux; La tige des Apiacées est cannelée. Elle est très riche en canaux sécréteurs à composés aromatiques dont l'odeur est parfois très caractéristique comme chez le Fenouil.

Les feuilles : Elles sont alternes, sans stipules, et généralement découpées, parfois entières.

Les fleurs : Les fleurs sont généralement blanches et plus rarement jaunâtres, verdâtres ou rosées. Leur disposition en inflorescence relativement condensée explique qu'elles soient généralement de petite taille. Ainsi, la fleur a toujours la même formule florale avec cinq pétales, cinq étamines libres, cinq sépales avec deux carpelles.

Les fruits: Sont des diakènes, chaque partie contenant une rhizome. Ils sont très diversifiés par leurs formes externes. Il s'agit à la base d'un fruit sec schizocarpique qui se fend à maturité le long d'un septum en deux méricarpes à une rhizome (**Bouderdara, 2013 ; Turcati, 2014**).

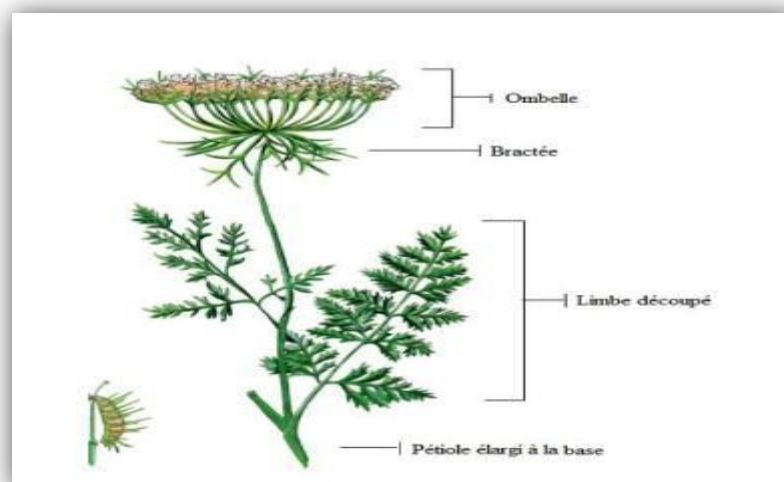


Figure 02 : Schéma d'une Apiacées (Turcati, 2014).

La médecine traditionnelle reconnaît à plusieurs espèces de la famille des Apiacées des vertus thérapeutiques certaines (Lefahal, 2014). Elles sont utilisées pour leurs activités anti-inflammatoire, antimicrobienne, antifongique, analgésique, antibactérienne, anti convulsivant, antirhumatismale, antioxydant, anti tumorale, cytotoxique et des propriétés chimio-préventives qui sont attribuées à différentes substances (Bouderdara, 2013)

I-2- Composition chimique

La famille des Apiacées est connue pour la grande diversité en métabolites secondaires et notamment pour ceux de leurs huiles essentielles. L'ensemble des résultats de la littérature a permis de recenser pour cette famille une grande variété de coumarines, de sesquiterpènes, de composés acétyléniques d'huiles essentielles, de flavonoïdes et de lactones sesquiterpéniques. Ces principes actifs sont les principaux métabolites secondaires de cette famille.

I-2-1- Les huiles essentielles

Les Apiacées sont le plus souvent des plantes aromatiques. On note la présence de canaux sécréteurs synthétise des huiles essentielles ou des gommés résines, leur conférant des odeurs et saveurs caractéristiques. Ces propriétés organoleptiques font que de nombreuses espèces sont largement utilisées comme légumes ou condiments.

Les huiles essentielles des Apiacées sont riches en dérivés phénylpropaniques tels que l'anéthol, l'apiol et la foeniculine.

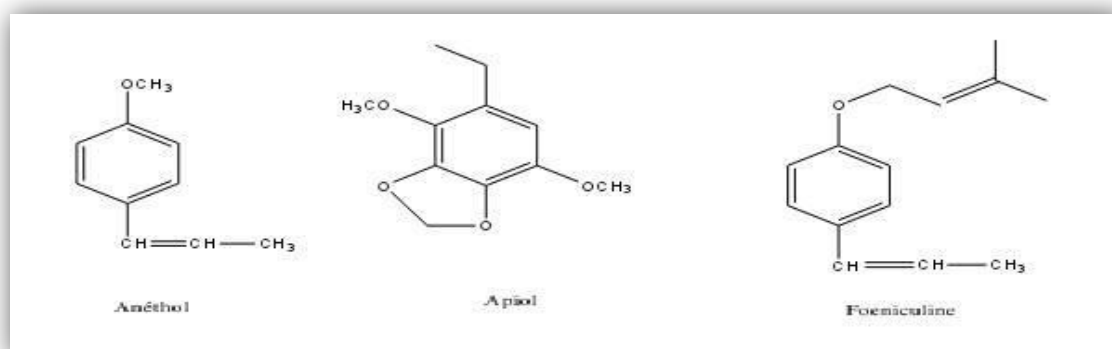


Figure 03 : Exemples de quelques composants des huiles essentielles contiennent dans la famille des Apiacées.

I-2-2- Les coumarines

Les coumarines sont des molécules dérivées du phenylpropane, très répandues chez les Apiacées. On rencontre majoritairement les furocoumarines, linéaires ou angulaires dont le noyau de base est le psoralène. Les coumarines simples à l'exception de l'ombéllifèrone sont moins répandues. De même que les pyranocoumarines, dont la forme linéaire est absente chez les Apiacées.

II- Le genre *Bunium*

Bunium est un genre de plantes à fleurs chez les Apiacées, avec 45 à 55 espèces (Lariushin, 2012) représenté en Algérie par 7 espèces principaux qui sont: *B. incrassatum*, *B. fontanesii*, *B. chaberti*, *B. elatum*, *B. crassifolium*, *B. alpinum*, *B. macuca* (Quezel et Santa, 1963). C'est un genre fleurissant appartient à la famille des Apiacées. Toutes les espèces de *Bunium* sont des géophytes arides ou semi-arides. Ils ont des racines tubérisées. Les pétales blancs avec rhizome terminaux infléchies. Les fruits ne sont pas significativement arrondis dorsalement ou latéralement. Ils sont filiformes plus ou moins égale à côtés (Degtjareva et al., 2009). Les fleurs sont blanches, rayons des ombelles et des ombellules s'épaississant à maturité, rigides très divergents. Tige de 1- 5 cm robustes. Feuilles à divisions linéaires (Quezel et Santa, 1963).

Bunium est un genre très répandu en Asie (Rehman et al., 1991 ; Meshkatalasadat et al., 2009 ; Azimzadeh et al., 2012), en Europe (Fenu et al., 2010) et en Afrique du Nord (Aafi et al., 2005 ; Shner et al., 2010. Bousetla et al., 2011).

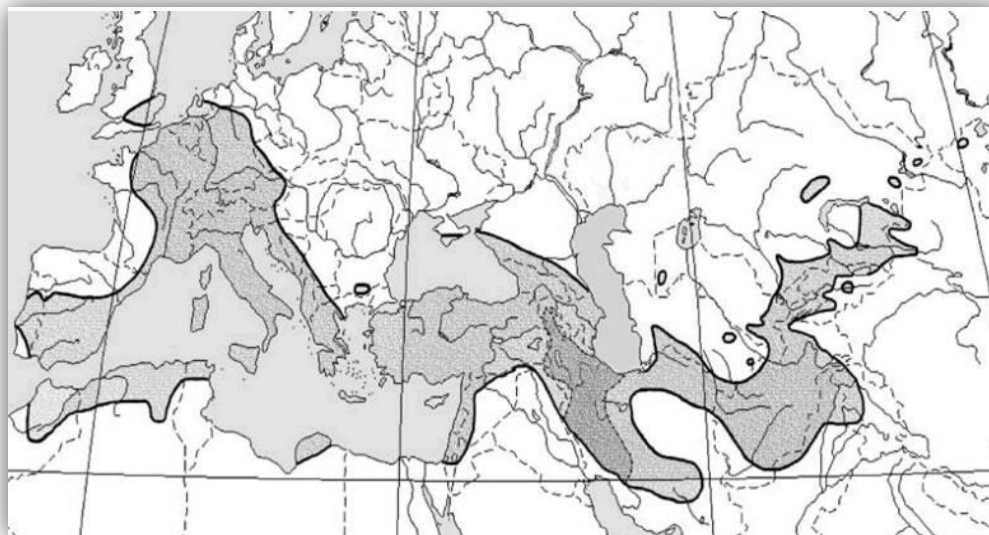


Figure 04 : Distribution géographique du genre *Bunium* (Degtjareva et al., 2009).

III- *Bunium incrassatum*

III-1- Généralité sur l'espèce *Bunium incrassatum*

Bunium incrassatum, est une plante médicinale de la famille des Apiacées, est largement distribuée dans l'est de l'Algérie et appelé "Talghouda". Pousse à l'état sauvage en bordure des champs et des jardins. La récolte ne peut se faire que tous les deux ans; les rhizomes de première année sont encore trop petits pour être utilisés.

Les Algériens la connaissaient bien en temps de famine. La partie comestible de la talghouda est son rhizome qui ressemble à celui du topinambour ou "batata terfas". En fait, il s'agit de la racine principale que la plante utilise pour emmagasiner des réserves alimentaires qui lui serviront, notamment, durant l'hivernage. Ils les consommaient également ces rhizomes crus, bouillis ou torréfiés. Durant la colonisation, il fut l'un des symboles de la pauvreté et de la misère.



Figure 05: la partie aérienne et les grains de *Bunium incrassatum* (photos personnelles)

Position systématique de l'espèce selon Quezel et Santa (1963)

Reigne	Plantae
Division	Tracheophyta
Subdivision	Spermatophytina
Classe	Magnoliopsida
Superordre	Asteranae
Ordre	Apiales
Famille	Apiaceae
Genre	<i>Bunium</i>
Espèce	<i>Bunium incrassatum</i>

III-2- Description botanique et morphologique

C'est une plante vivace de 40-60 cm, glabre. Sa racine est un bulbe arrondi, noirâtre, et pousse une tige haute de 5 dm, cylindrique, striée et un peu rameux. Ses feuilles sont deux ou trois fois ailées, et partagées en découpures étroites et linéaires. Les inférieures sont portées sur de longs pétioles, et les radicales ont des découpures un peu plus élargies et moins longues. Les fleurs sont blanches et forment des ombelles assez amples. La collerette générale est composée de sept à huit folioles linéaires, beaucoup plus courtes que les rayons. Les fruits sont cylindriques, un peu épaissis au sommet, terminés par deux styles d'abord réfléchis, puis caducs.

On trouve cette plante dans les champs et les pâturages un peu humides. Sa grandeur varie de 1-5 dm, d'où résulte qu'elle a été appelée par les uns *B. majus*, et par d'autres *B. minus*; sa racine est bonne à manger, elle porte le nom de terre-noix, moinson et suron. (Lariushin, 2014). Cette espèce est appelée aussi *Carum incrassatum* et *Bulbocastanum incrassatum*. Ce genre se trouve souvent en Espagne, en Baléares et en Afrique septentrionale (De Lamarck, 1805), sa période de récolte commence du début du mois de Mai et se termine à la fin du mois de Juillet.

III-3- Effet pharmacologique

B. incrassatum ayant des propriétés médicinales, leurs rhizomes ainsi que leur huile essentielle sont souvent utilisés dans l'alimentation et la médecine.

➤ Dans l'alimentation

Les racines de *Bunium incrassatum* sont généralement utilisées comme des patates et dans le kouskous, leines sont très nutritives. La poudre végétale est additionnée au D'han ou à la pâte des dattes ou au miel ou à soupe chaude ou au beurre ou à l'huile d'olive pour traiter l'angine, au même titre que le décocté (Lefahal, 2014). Les Algériens récoltent les rhizomes, les font dessécher, les réduisent en farine au moyen d'un moulin portatif et consomment cette farine en mélange avec l'orge, sous forme de galette.

➤ Dans la médecine

Cette espèce est connue pour ses propriétés thérapeutiques pour Astringent, Diarrhée, Inflammations hémorroïdales, bronchite, hémorroïdales (Boukazata, 2014). Et essentiellement utilisée pour les troubles thyroïdiens et des angines, et pour la diminution de taux de TSH chez l'homme.

Chapitre II :

Métabolite secondaire

1- Généralité

Les études sur les métabolites secondaires des plantes ont augmenté au cours des années précédemment. Ces molécules sont connues pour jouer un rôle majeur dans l'adaptation des plantes à leur environnement, mais aussi représentent une source très intéressante de produits pharmaceutiques actifs (Bourgaud et *al.*, 2001). Se sont des processus physico-chimique de produit dans une large gamme des organismes qui est contrairement au métabolite primaire (Delgoda et Murray, 2017).

2- Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques variés (composés phénoliques, composés acétyléniques, les cires, les terpènes, les alcaloïdes ...) qui sont très inégalement répartis chez les végétaux mais dans le niveau d'accumulation peut quelquefois atteindre des valeurs élevées (Jack, 2005); on distingue 3 classes principales :

2-1- Les composées phénoliques

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substance qu'il est difficile de définir ; d'un poids moléculaire élevé. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libre ou engagé dans une autre fonction (éther, ester) (Bruneton, 2008).

Elles sont essentiels pour la physiologie et le métabolisme cellulaire et sont aussi impliqués dans plusieurs fonctions des plants (couleur ; gout ; arôme...). Ces composés phénoliques jouent un rôle dans la protection contre les insectes et autres animaux de la plante (Lourdes Reis Giada, 2013).

2-1-1- La voie de biosynthèse

La biosynthèse des polyphénols se fait par deux voies principales, la voie de l'acide shikimique d'où la phénylalanine est le point de départ d'une classe importante de composés (Rambour, 2003), et la voie de l'acide malonique d'où la glycolyse et la β -oxydation aboutissent à la formation de l'acétylCoA donnant le malonate. C'est à travers

cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (Akroum, 2011).

2-1-2- Classification

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base allant d'un simple C₆ à des formes très polymérisées, ensuite par le degré de modification du squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation, ...) et par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, ou autres métabolites secondaires) (Macheix et al, 2006).

Tableau 01 : principale classes des composées phénoliques (Macheix et *al.*, 2006).

Squelettes carbonés	Classes	Exemples
C ₆	Phénols simples	Cathéchol
C ₆ -C ₁	Acide hydroxybenzoïque	P-hydroxybenzoïque
C ₆ -C ₃	Acide hydroxycinnamique Coumarine	Acide caféique Scopoléines
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglone
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Résvératrole
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes, iso flavonoïdes	Quercétine-cyanidine, diadzéine
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Pinorésinoles
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines	/
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tannins condensés	/

➤ L'acide phénolique

Ils ne possèdent pas de squelette flavane. Ils sont solubles dans l'éther. Ils peuvent être associés à la lignine, présents sous forme d'ester, ou bien localisés dans la partie de la feuille insoluble dans l'alcool (Barboni, 2006) ; ils sont divisés en deux classes :

*Les dérivés de l'acide benzoïque (constitués d'un squelette à sept carbones).

*Les dérivés d'esters hydroxycinnamiques (constitués d'une structure de type C₆-C₃).

➤ Flavonoïdes

Le terme flavonoïde est attribué à une classe de métabolites secondaires regroupés selon leur structure phénylbenzopyrone. Les flavonoïdes sont responsables de la couleur variée des fleurs et des fruits et représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation (Laurence , 1996 ; Ghedira , 2005).

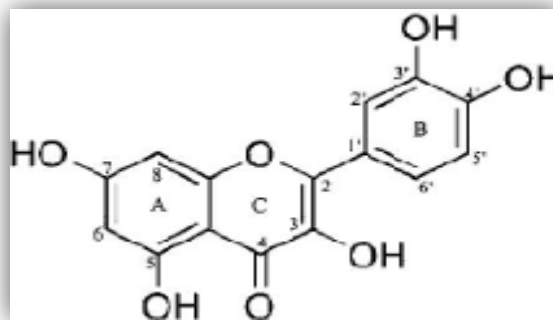


Figure 06 : structure de base du flavonoïde (Heim et *al.*, 2002).

Selon le degré d'hydroxylation et la présence de C₂-C₃ double liaison dans l'hétérocycle centrale les flavonoïdes peut être divisée en 13 classes le plus importants étant représentée par Flavonols, Flavanones, Flavones, Isoflavonne, Flavanes, les anthocyanes, les prénylchalcones et dihydrochalcones au seins de ces classes ils existent nombreuse variation structurelle selon le degré de hydrogénation et l'hydroxylation de différents cycles de ces composés. Flavonoïdes aussi se produire comme sulfaté et dérivés méthylés conjugués avec monosaccharide et disaccharide et forme un complexe avec les oligosaccharides ; lipides amines (Lourdes Reis Giada, 2013).

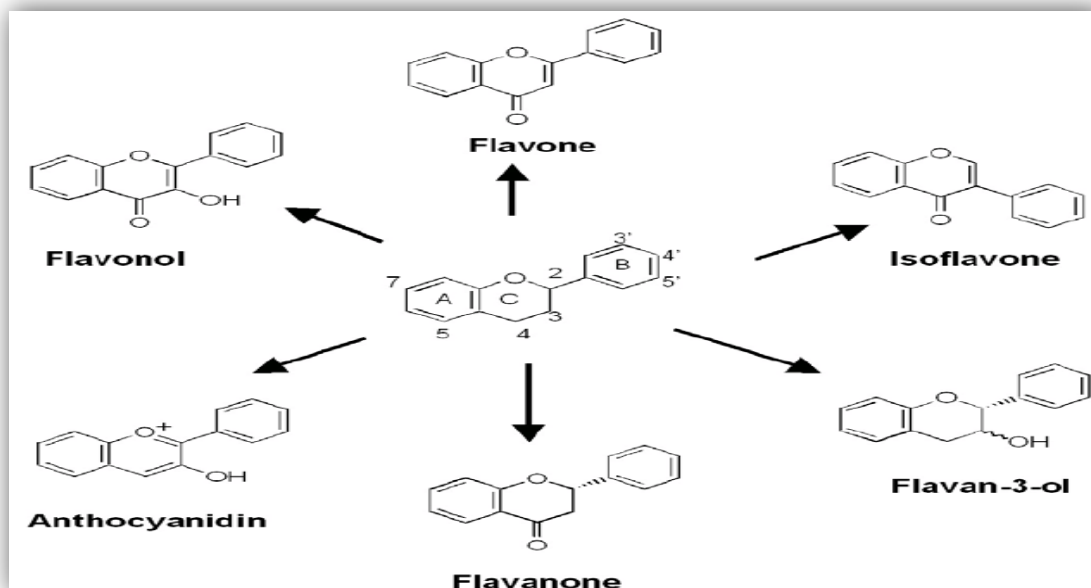


Figure 07: Les structures chimiques des principales familles des flavonoïdes (Ghedira, 2005).

Les flavonoïdes sont considérés comme des agents antimicrobiens ; grâce à leur structure caractérisée par la présence de groupe phénolique et d'autres fonctions chimiques (Harborne et Williams, 2000).

D'autres flavonoïdes extraits ont montré une forte activité antifongique contre différents types de moisissures (Kuster et al., 2009). Selon Choi et al. (2009), les flavonoïdes sont aussi connus pour leur activité antivirale, principalement contre le rétrovirus HIV responsable du symptôme d'immunodéficience acquise (SIDA), virus d'influenza, virus de l'herpès (HV), adénovirus (ADV) et virus de la grippe A.

Ils possèdent des propriétés anti-inflammatoires et antioxydant participeraient à la prévention de diverses pathologies impliquant le stress oxydant et le vieillissement cellulaire, les maladies cardiovasculaires ou dégénératives, l'ostéoporose et de moduler le fonctionnement du système immunitaire (Macheix et al., 2006 ; Stompor et al., 2017).

➤ Tannins

Les tannins sont les métabolites secondaires les plus abondants fabriqués par les plantes peut défendre les feuilles contre les insectes herbivores par la détergence et/ou toxicité (Raymond V Barebehene et al., 2011). Ils ont à haut degré de polymérisation et

solubles dans l'eau, de poids moléculaire élevé 500 -3000 Dalton (Labieniec et al., 2003). On peut classer les tannins en 2 grandes groupes :

- **Tanins hydrosoluble** : Qui ont un centre de glucose ou alcools poly hydriques partiellement ou complètement estérifiés avec hexahydroxydéshydroxygallique ou acide gallique.
- **Tanins condensée** : Ce sont des oligomères ou des polymères de flavane-3-ols dérivés de la catéchine ou de ses nombreux isomères. Ils sont résistants à l'hydrolyse contrairement aux tannins hydrolysables (Jean, 2005).

Selon Batrolomé et al. (1995) le tannin condensé peut être considéré indigestible ou au moins que digestibilité limitée tout au long de leur présence dans les fractions de fibre alimentaires de différents denrées alimentaires.

Les plantes riches en tanins sont utilisées pour retendre les tissus souples, pour drainer les sécrétions excessives, pour réparer les tissus endommagés par une brûlure (Nowitz et Bottet, 2000). Le rôle biologique des tanins dans la plante est lié à sa propre protection contre les infections, les insectes, et les animaux herbivores (Khanbaba et Ree, 2001), en plus de la protection contre les infections fongiques et bactériennes (Peronny, 2005).

➤ **Coumarine**

Les coumarines sont des molécules biologiquement actives, Substances naturelles aromatiques, ils appartiennent au groupe des composés connus par des benzo -a-pyrone et sont les dérivés de C₆-C₃. Les coumarines sont utilisées pour leurs propriétés vasculoprotectrices, diurétiques, stomachique...et ils ont la capacité de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes et aussi ces molécules responsables de l'odeur semblable à celle du foin (Cowan ,1999). Les coumarines possèdent une activité antibactérienne (Cottiglia et al., 2001 ; Khan et al., 2005 ; Laure, 2005).

2-2- Les alcaloïdes

Ils sont d'une très grande diversité chimique (12000 sont identifiés) : une classe particulière de composés se rencontrant en générale dans un groupe systématique bien défini (par exemple, la morphine, l'un des 30 alcaloïdes de l'opium chez les papavérer. (Heller et al., 2011).

Les alcaloïdes sont un groupe de composés azotés et faiblement basiques et douée à faible dose de propriétés physiologique marquées ; issus principalement des végétaux.

Les alcaloïdes sont regroupées en 3 genres : les alcaloïdes vrais, les proto alcaloïdes et les pseudo-alcaloïdes :

- **Les alcaloïdes vrais** qui représentent le plus grand nombre d'alcaloïdes sont toxiques et disposent d'un large spectre d'activités biologiques importantes. Ils dérivent d'acide aminé et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique.
- **Les pseudo-alcaloïdes** présentent les plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais ; mais ne sont pas des dérivés des acides aminés et ils ne possèdent pas un azote intra-cyclique (Ghedjati, 2015).
- **Les proto-alcaloïdes** : sont des amines simple n'est pas inclus dans un système hétérocyclique ils sont soluble dans l'eau. Diverses substances sont répondant à cette définition : des amines simple comme la sérotonine, la cathinone du thé des abyssins (Badiaga, 2011).

Les alcaloïdes sont utilisés pour protéger les prédateurs et pour fonctionner comme des régulateurs de croissances et substituts de minéraux comme K et le ca.

L'utilisation des alcaloïdes comme une drogue dans l'histoire humaine est à révéler l'importance de ces composés dans l'industrie pharmaceutique. Ils sont utilisés comme antimicrobien ; anti HIV aussi anti parasitaire et anti cancer (Kamarul et al., 2019).

Les propriétés toxiques ou médicamenteuses des alcaloïdes font de ce groupe de métabolites secondaires un intérêt particulier (kansol, 2009).

2-3- Les terpénoïdes

Sont des substances généralement lipophiles qui dérivent d'une entité simple à 5 atomes de carbone. La famille des terpènes comprend des hormones, des pigments caroténoïdes, des stérols, des dérivée de stérols ; le latex (Sabitha et al., 2015). Au vu de cette liste, il apparait que de nombreux composés terpéniques possèdent à la fois une valeur commerciale considérable et qu'ils ont des rôles physiologiques importants ; ils sont utilisés dans la parfumerie (Bruneton, 2009).

Ces terpènes sont connus par leurs activités cytostatiques, insecticides, anti-inflammatoires, molluscicides et analgésiques, toxique (sesquiterpènes), diurétique (β -eudesmol), irritant et calmant (mono et sesquiterpènes) (Hsiou, 2000 ; Veličković et al., 2003).

Chapitre III :

Stress Oxydatif

Tous les organismes aérobies sont strictement dépendants de l'oxydation phosphorylante mitochondriale pour la production de l'ATP et l'homéostasie énergétique. L'oxygène est ainsi strictement indispensable du fait de son potentiel oxydant très élevé, ce qui le rend très dangereux pour toutes les molécules organiques. Une puissante défense antioxydant et une signalisation très fine ont-ils développé par les organismes vivants (Xavier, 2009).

I. Stress oxydant

Le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production de radicaux libre et la capacité antioxydants cellulaire. La production excessive ou la non-neutralisation des (ERO) entraînent une altération des macromolécules et accélèrent le vieillissement cellulaire (Schlienger, 2018).

1- Les radicaux libres

La formation de radicaux libre (superoxyde et hydroxyle par exemple) est une conséquence normale du métabolisme aérobie chez l'homme (Goudable et Favier, 1997) ; et selon Favier (2006) ; les radicaux libres de l'oxygène et leurs précurseurs forment une famille de composés chimiques souvent réactifs appelés espèces réactives de l'oxygène. On définit par le terme de radicaux libres célibataire non apparié ; sont des substances chimiques très instables, de durée de vie très courte (10^{-9} à 10^{-6} s) (Garrel et Bigard, 2017).

1-1- Les différents types des radicaux libres

Parmi les espèces radicalaires les plus intéressantes se trouvent les espèces réactives de l'oxygènes principales (ERO) qui dérive de la molécule de l'oxygène. Les principales espèces réactives de l'oxygène sont des formes réduites de O_2 : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$, réduction à 1 électron), le radical hydroxyl (OH^{\cdot} , réduction à 3 électrons), mais aussi les radicaux oxyl (RO^{\cdot}), peroxy (ROO^{\cdot}) et le monoxyde d'azote ($NO^{\cdot-}$). Aussi certains dérivés non oxygénés non radicalaires notamment le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , réduction à 2 électrons), le dioxygène singulet (1O_2), l'acide hypochloreux ($HOCl$), l'ozone (O_3) et le peroxydinitrite ($ONOO^{\cdot-}$) (Baudin, 2006 ; Aron et Kennedy, 2008 ; Jacques et André, 2004).

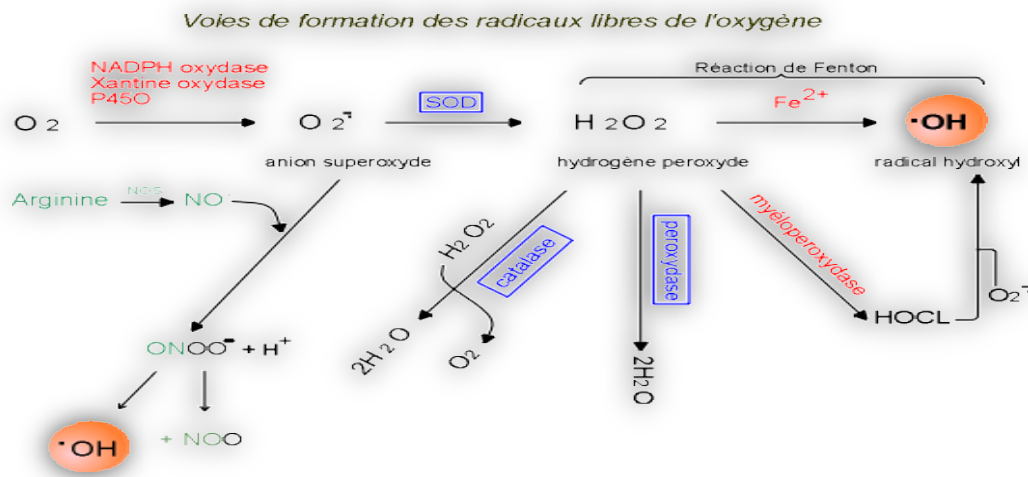


Figure 8 : Voie de formation des radicaux libres de l'oxygène (Hierso, 2015).

1-2- Les sources des ERO

Plusieurs facteurs endogènes et exogènes sont considérés comme responsables dans l'accroissement du stress oxydant. Ils se divisent en facteurs endogènes et exogènes :

A- Les sources endogènes : Divers types cellulaires et tissus donnent naissance au EOR par des réactions enzymatiques ou par auto-oxydation au cours de leur métabolisme normal et parfois en réponse à un stimulus spécifique. La principale source endogène est le dysfonctionnement de la mitochondrie par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire, elle produirait en effet 90% des ERO.

Les NADPH oxygénase (NOX) : on les retrouve surtout dans les globules blancs pour les mécanismes de défenses en créant volontairement des radicaux.

D'autres facteurs comme l'activation de la xanthine oxydase ou l'oxydation de l'hémoglobine favorisant la surproduction d'oxydant, elles servent à former l'acide urique en présence de son cofacteur, le NADPH et jouent un rôle important dans le catabolisme des bases puriques et sont responsables d'une des plus grosses productions de l'anion superoxyde après l'échappement de la chaîne respiratoire.

L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement via les cellules phagocytaires.

Les cytochromes p450 : On les retrouve dans le foie et les reins. Ils interviennent dans le métabolisme des xénobiotiques et peuvent conduire à la formation d' O_2° . (Aurousseau, 2002 ; Defraigne et Pincemail, 2008 ; De Moffarts et al., 2005)

B- Les sources exogènes : les êtres vivants sont exposés quotidiennement à des polluants, à des rayons ultraviolets ; tabagisme, la prise de médicaments, le sport intensif, l'excès d'alcool, le stress physiologique, le vieillissement naturel, la sédentarité, des contacts avec des produits CMR (Cancérogènes, Mutagènes, Reprotoxiques) susceptibles d'être à l'origine de la production de radicaux libres, une fois dans l'organisme (Priymenko, 2005).

2- Les effets délétères du stress oxydant

2-1- Peroxydation des lipides

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont la cible privilégiée des EOR en raison de leurs hydrogènes bis allyliques facilement oxydables. Comme ces derniers sont les lipides majeurs des membranes cellulaires et des lipoprotéines, on comprend leurs vulnérabilités particulières. Les produits d'oxydation formés peuvent participer en tant que second messager à la régulation de fonctions métaboliques, de l'expression des gènes et de la prolifération cellulaire. Ils peuvent aussi, et surtout, se comporter comme des substances toxiques responsables des dysfonctionnements et d'altérations cellulaires (perte d'acides gras polyinsaturés, diminution de la fluidité membranaire, modification de l'activité des enzymes et des récepteurs membranaires, libération du matériel à partir du compartiment subcellulaire) (Beckman et Ames B, 1998 ; Lehucher et al., 2001).

2-2- Oxydation d'ADN

Les ADN nucléaire et mitochondrial sont très sensibles à l'attaque des EOR. Les attaques radicalaires peuvent conduire à des modifications des bases, des cassures simples et doubles de la chaîne d'ADN, des sites abasiques et pontage avec des protéines (Favier, 2003).

Les radiations ionisantes ont pour principal effet l'oxydation de l'ADN. Les dommages de l'ADN par oxydation constituent donc un souci majeur. Les bases guanines sont les sites privilégiés d'oxydation de l'ADN. Ce sont les cibles préférentielles des réactions de transfert d'électron, elles sont également modifiées par les radicaux hydroxyles. La majorité des acides aminés peuvent être oxydés par les EOR, les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine, tryptophane) sont les plus sensibles.

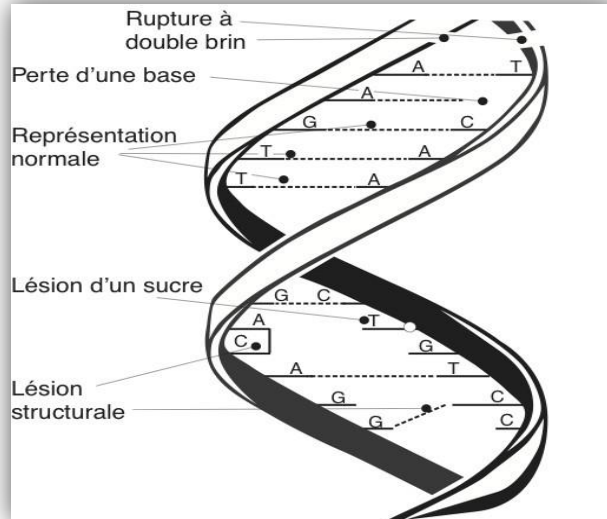


Figure 9 : Altération de l'ADN par l'attaque radicalaire (Favier, 2003)

2-3- Oxydation des protéines

L'oxydation des acides aminés génère des groupements hydroxyles et carbonyles sur les protéines mais peut également induire des modifications structurales plus importantes comme des réticulations intra ou intermoléculaires, ce qui affecte leurs fonctionnements, antigénicités et leurs activités (Martinez-Cayuela, 1995 ; Lehucher-Michel et *al.*, 2001 ; Valko et *al.*, 2007).

II- Les antioxydants

D'après Halliwell (1994) un antioxydant est toute molécule endogène ou exogène présente en faible concentration qui est capable de prévenir, de retarder et déduire l'ampleur de la destruction oxydante des biomolécules. Le système de lutte contre les ERO est classé dans trois catégories : la prévention à temps plein (la prévention passive), la détoxification active suite à une attaque oxydante et la détoxification passive (Virot, 2004) ; est classées-on :

1- Les antioxydants enzymatiques

Pour lutter contre les radicaux libres, l'organisme peut faire appel à des enzymes comme la peroxydase, la catalase, le superoxyde dismutase, la glutathionne réductase (enzyme utilisant NADH) et les enzymes produisant NADH. Elles vont limiter l'action des ERO (Garait, 2006).

1-1- Superoxyde dismutase (SOD)

Les superoxydes dismutase sont une classe des enzymes (métallo-enzymes) à manganèse ou à cuivre ou à fer qui catalysent la décomposition de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (Mandal, 2019).

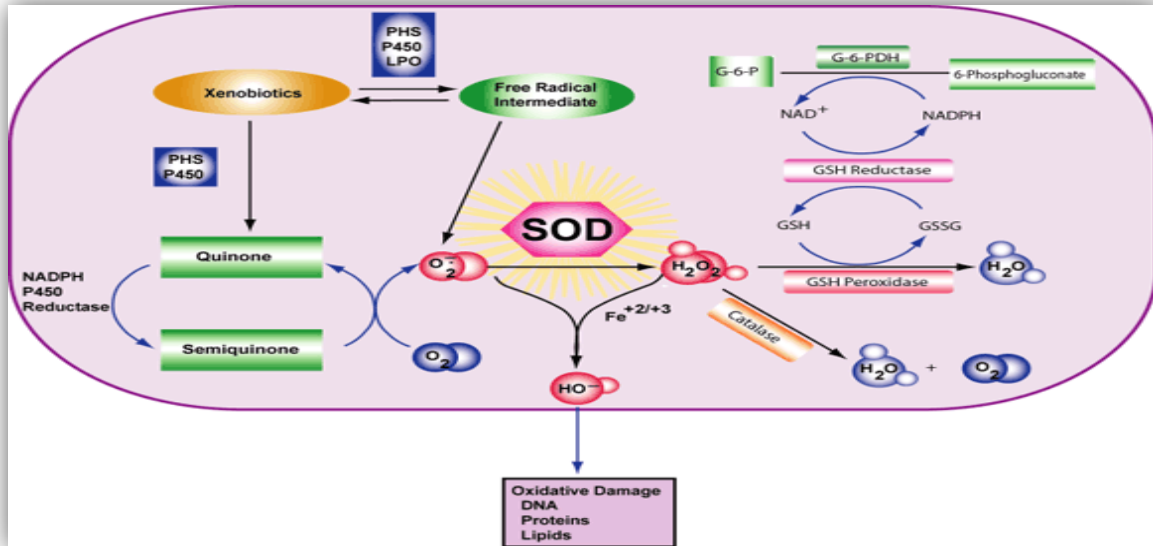
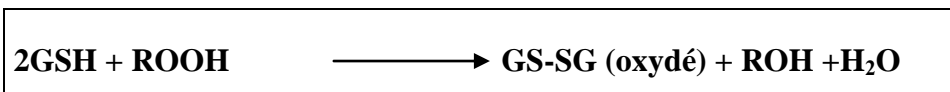


Figure 10 : Mécanisme d'action de Superoxyde dismutase (SOD)

1-2- Glutathion peroxydase (GSH-P_x)

Le glutathion peroxydase (GSH-P_x) est une enzyme à sélénium ayant la propriété de pouvoir catalyser la réduction des hydroxyperoxydes. Elle se retrouve dans les liquides extracellulaires ainsi que dans les cellules, au sein du cytosol et de mitochondrie.

Elle est constituée de 4 sous-unités contenant chacune un atome de sélénium et existe isoformede cette enzyme variant suivant la localisation dans l'organisme ; en présence de substrat de type ROOH, la réaction se traduit de la manière suivante avec formation d'une molécule d'eau et d'une molécule d'alcool (Juanito, 2016 ; Valko et al., 2007).



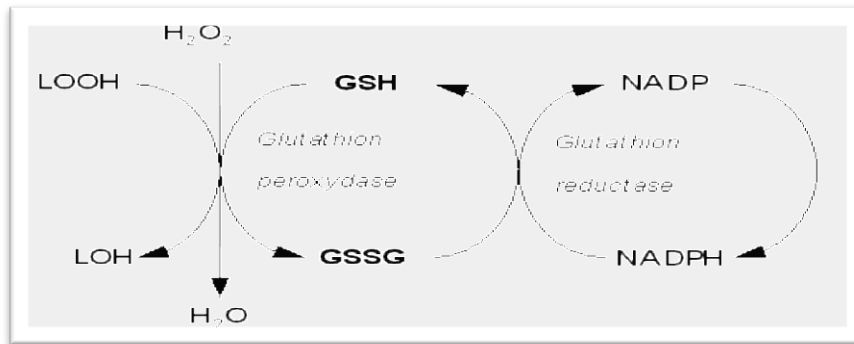
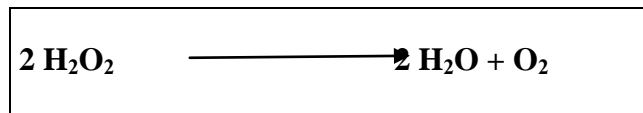


Figure 11 : Cycle de détoxification par la glutathion peroxydase

1-3- La catalase

La catalase est une enzyme que l’on retrouve principalement au sein des peroxysomes, dans les hépatocytes, les érythrocytes et les cellules rénales. Elle catalyse la dismutation de peroxyde d’hydrogène en oxygène et en eau.



Cette enzyme est une composée de quatre chaînes polypeptidiques, comportant chacune un atome de fer sous forme ferrique (Fe^{3+}) (Démarchez, 2012). Le mécanisme de dismutation du peroxyde d’hydrogène est le suivant :

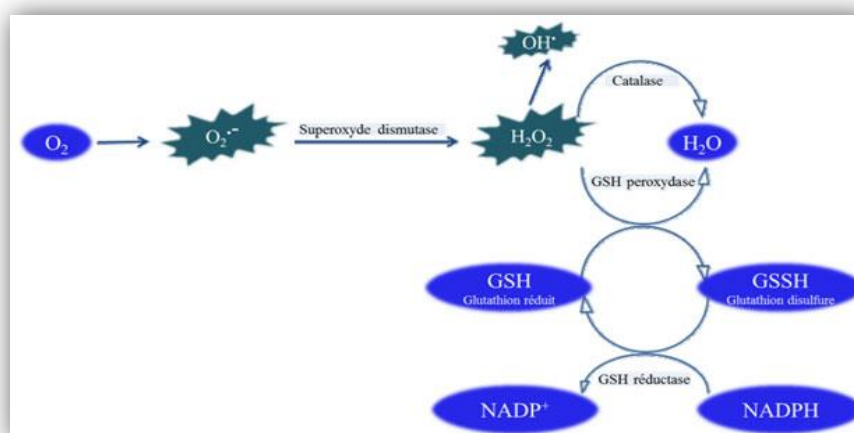
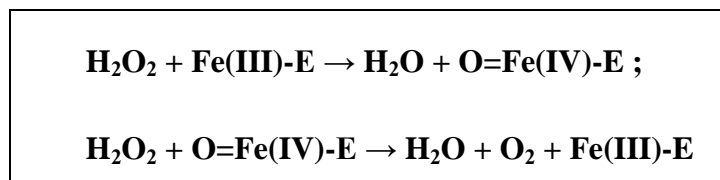


Figure 12 : Schéma des défenses antioxydants enzymatiques (Blandine, 2006).

2- Les antioxydants non enzymatiques

2-1- les antioxydants endogènes

A- Glutathion GSH

Le glutathion (GSH) est un tripeptide composé de trois acides aminés : l'acide L-Glutamique, la L-Cystéine et la L-Glycine. Le site principal de la synthèse du GSH au niveau cellulaire est le cytosol, à partir duquel il est distribué aux autres compartiments cellulaires. Le GSH est synthétisé par l'action séquentielle de la glutamate-cystéine ligase et la glutathion synthétase (Fauntaine, 2004).

B- Acide urique

L'acide urique est un antioxydant connu pour se lier avec le fer, le cuivre et piéger certains radicaux libres. L'augmentation de la concentration en acide urique plasmatique, qui dans différents types d'exercices intenses (aérobies ou anaérobies), résulterait d'une accélération du métabolisme des purines au niveau du muscle avec activation de la xanthine oxydase, enzyme bien connue pour produire des radicaux libre (Groussard et al., 2003).

2-2- les antioxydants exogènes

A- Vitamine C

Acide ascorbique, c'est un agent réducteur et chélateur sous forme d'acide déhydro-L-ascorbique (DHA), il agit directement sur les ERO (majoritairement $l'O^{\cdot-}$ et $l'OH^{\cdot}$) (Bensakhria, 2018).

B- Vitamine E

Valako et al. (2004) et Pryor (2000) Ils ont considérés la vitamine E comme le principal antioxydant attaché à la membrane utilisé par la cellule pour inhiber la peroxydation lipidique. Durant la réaction antioxydant, le α -tocophérol est converti en radical α tocophérol beaucoup plus stable en perdant un hydrogène arraché par une espèce radicalaire (radical peroxy).

C- Caroténoïdes

Caroténoïdes sont des pigments qui se trouvent dans les plantes et les micro-organismes mais pas synthétisé par l'animale. Sont principalement responsable pour la

capacité de β -carotène pour interagissent physiquement avec l'O singulet ex (OH^\cdot) (ROO^\cdot). On générale plus que la chaine polyène est longue plus la capacité de stabilisation des radicaux libres peroxydes est grande et aussi le (ROO^\cdot) plusieurs réactifs avec le CAR que l'hydroxyallylique site génétique sur les acides gras insaturés (Valko et al., 2004).

D- Les polyphénols

Doivent leur activité à comme leur nom, l'indique, un très grand nombre des résidus hydroxyles, qui sont autant de munitions pour lutter contre les radicaux libre et stopper la réaction en chaine (Rolland, 2004).

E- Les flavonoïdes

Ces dernières années, une importance particulière a été accordée aux propriétés antioxydantes des flavonoïdes qui sont attribuées à : leur capacité de piéger directement les RL, de chélater les ions métalliques impliqués dans la production des EOR via les réactions de Fenton et Haber-Weiss, d'inhiber quelques enzymes en particulier les oxydases, d'activer les enzymes antioxydantes et de réduire les radicaux α -tocophéryl (Cotelle, 2001 ; Lin et Weng, 2006 ; Heim et al., 2002).

DEUXIEME PARTIE :

ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre I :

Matériels et Méthodes

Matériel et méthodes

I- Matériel

I-1- Matériel biologique

Les souches bactériennes retenues pour le présent travail proviennent du laboratoire de recherche scientifique et technique Abbès laghrour-Khenchela. Il s'agit d'*Escherichia-coli*, *Listéria*, *Staphylocoque*. La souche utilisée pour déceler l'activité antifongique des extraits de *Bunium incrassatum* est: *Penicillium* proviennent du laboratoire de recherche scientifique et technique Abbès laghrour-Khenchela et l'identification a été faite par Mr Benghanem chargée de cours à université Abbès-Laghrour de Khenchela

I-2- Préparation du matériel végétal

Cette étude à été réalisée sur la plante de *Bunium incrassatum*, récoltées au niveau du village Ain Mimoune de la région de Khenchela durant le mois de Mars 2019, l'identification a été effectuée par Mm BOUHALIT. S maître de conférences à université Abbès-Laghrour de Khenchela. Une fois récoltées, les rhizome (fruits) fraîches de talghouda ont été séchées à l'air libre pendant 15 jours, puis transférées dans l'étuve pendant 02 jours pour affiner le séchage et pour obtenir un meilleur broyage et meilleur extraction. Après séchage, les morceaux des rhizomes sont broyées à l'aide d'un broyeur électriques jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Les particules ainsi obtenues sont tamisés sur un tamis de diamètres 250 μm pour avoir une poudre homogène. La poudre obtenue est conservée dans un récipient en verre et stocké à l'abri de lumière et de l'humidité jusqu'à l'extraction.

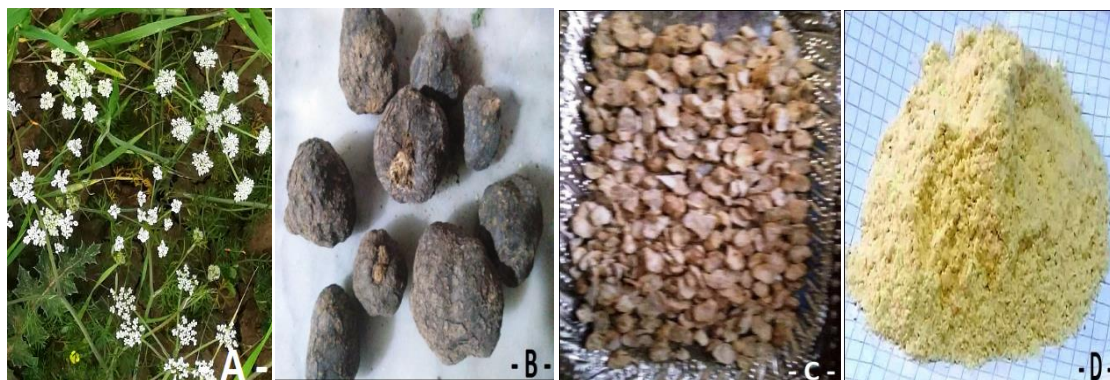


Figure 13 : Représentation de la plante de *BuniumIncrassatum*(photos personnelles)

I-3- Appareillages

Le travail expérimental et les différents tests ont été réalisés au laboratoire de biochimie, Université Abbès Laghrour Khenchela. Pour effectuer ce travail, un ensemble d'équipements, verreries, d'appareillages et de produits chimiques, solvants, milieux de culture ont été utilisés, parmi ces produits:

L'éthanol, méthanol, l'acétate d'éthyle, le chloroforme, l'hydroxyde de sodium (NaOH), l'ammoniaque (NH₄OH), le sulfate de potassium, l'acide sulfurique (H₂SO₄), l'acide chlorhydrique (HCl), le formol, l'éther éthylique, l'acide acétique, le trichlorure d'aluminium (AlCl₃), Dichlorométhane, le lugol, la gélose, les réactifs de Fehling, Bouchardat, l'acide ascorbique et le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).

Les appareillages utilisés : Rotavapeur UV-Vis à double faisceau, chambre d'observation UV, étuve universelle de 5 à 220°C avec ventilation, agitateur magnétique, balance de précision, la haute, bec benzène, autoclave, bain marie, vortex, réfrigérateur.

II- Méthodes

II-1- Préparation des extraits

II-1-1- Préparation d'extraits éthanolique

La préparation d'extrait éthanolique est effectuée en utilisant 40g de la poudre de *Bunium incrassatum* introduit dans un bécher qui contient 200ml d'un mélange hydroalcoolique : éthanol / eau « 8/2 v/v », pendant 72h avec agitation continue à température ambiante ; après la filtration de l'extrait par un papier filtre, le filtrat obtenu est évaporé sous pression réduite à l'aide d'une rotavapeur à une température de 45°C, l'extrait éthanolique obtenu est conservé à +4°C jusqu'à l'utilisation.

II-1-2- Préparation d'extraits aqueux par décoction

En introduisant 30g de la poudre dans 300ml d'eau distillée jusqu'à l'ébullition ; Après refroidissement et filtration, le filtrat récupéré est évaporé à 45°C dans une étuve (Boubacar Souley, 2005).

II-1-3-Préparation d'extraits aqueux par infusion

En mettant 30g dans 300ml d'eau bouillante a 45 °C le récipient et laisse avec couverture de bicher infuser pendant 30 min après refroidissement et filtration, puis on met le filtrat dans l'étuve a45 °C (Boubacar Souley, 2005).

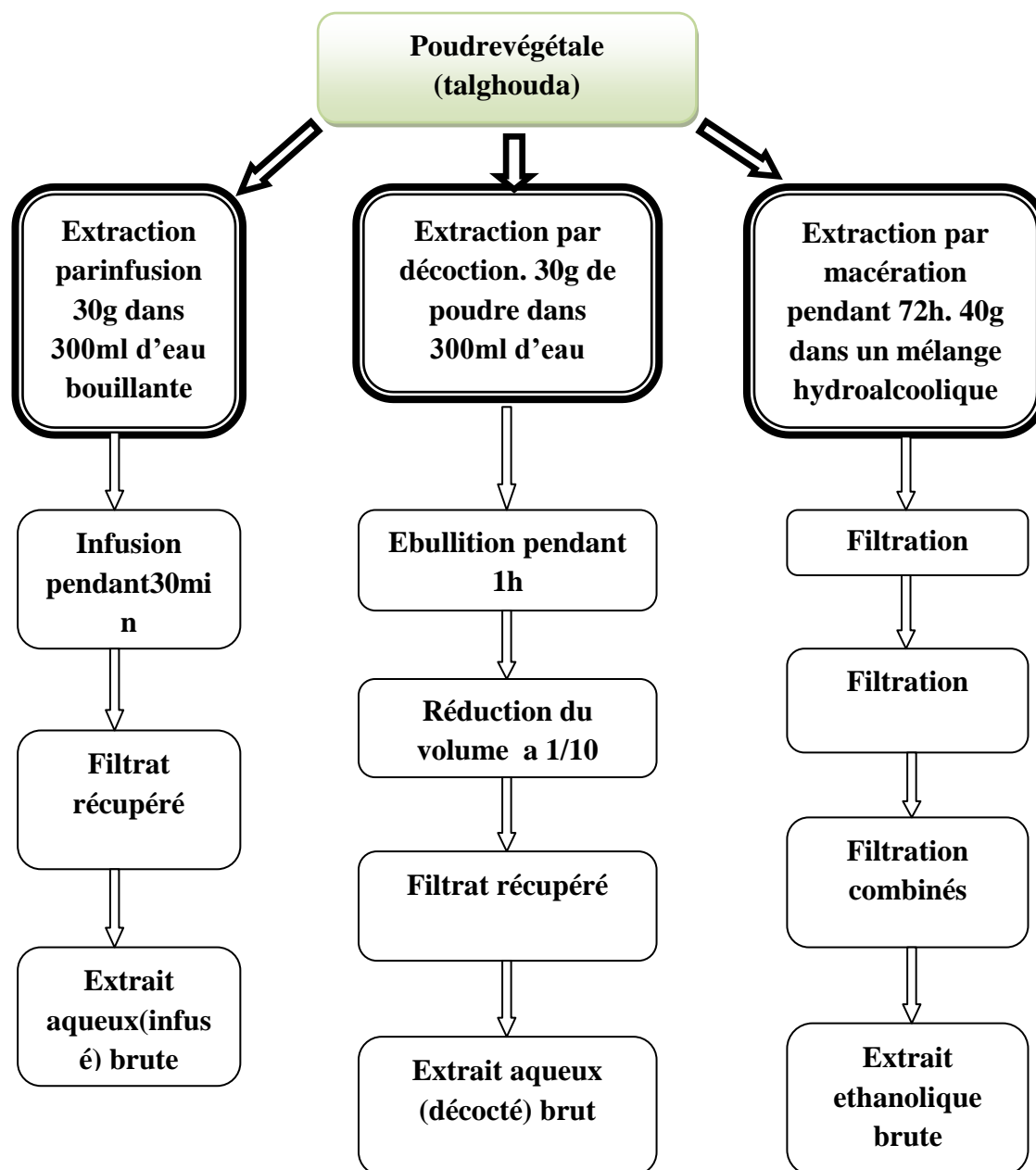


Figure 14: Protocole d'obtention des extraits bruts de *Bunium incrassatum*

II-2- Calcul des rendements d'extraction

Le rendement de l'extrait est le rapport entre le poids de l'extrait et le poids de la plante sèche. Le rendement ; exprimé en pourcentage, est calculé par la formule suivante (Dinzedi,2015):

$$R(\%) = (Me / Mv) \times 100$$

R (%) : Rendement en %.

Me : Masse de l'extrait après l'évaporation du solvant.

Mv : Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction

II-3- Screening phytochimique

Le screening chimique est un ensemble de réactions chimiques qui permettent d'identifier la présence des principales catégories des substances chimiques naturelles contenues dans une plante et qui pourraient être responsables de propriétés pharmacologique. Les testes phytochimiques sont réalisés sur les trois phases de la plante à savoir l'extrait éthanolique et décocté et infusé. Les résultats obtenus ont été évalués comme suit :(+++) : Présence plus forte, (++) : Présence forte, (+) : Présence faible, (-) : Absence.

➤ Les tanins

La détection des tanins est réalisée au moyen du test de Soulama et ces collaborateurs(2014).2 à 3 gouttes de la solution de chlorure ferrique ($FeCl_3$ à2%) sont ajoutées à 1ml de chaque extrait. L'apparition d'une coloration bleu foncé signalé la présence des tanins galliques, tandis qu'une coloration vert foncé indique la présence des tanins catéchines. Une coloration bleue-verdâtre indique la présence des deux types de tanins.

➤ Les flavonoïdes

2 à 3 gouttes de la solution de($AlCl_3$ à 1%) sont ajoutées à2ml de chaque extrait. L'apparition d'une coloration jaune indique la présence des flavonoïdes (Edeagaet al.,2005).

➤ **Les alcaloïdes**

La présence d'alcaloïdes est révélée par la méthode d'Amana (2007), quelques gouttes du réactif de Bouchardât sont ajoutées à 2ml d'extrait. La formation d'un précipité brun-noir, brun-terne ou jaune-brun indique la présence de ces métabolites dans le milieu.

➤ **Les terpénoïdes**

La méthode d'Aziman et al. (2012), permet de mettre en évidence la présence de terpénoïdes, 2.5 ml d'extrait est ajouté à 1 ml de chloroforme. Après homogénéisation 1.5ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) sont ajoutés au mélange. La formation d'une couleur brun-rouge à l'interface indique la présence des composés.

➤ **Les quinones libres**

2ml d'extrait plus quelques gouttes de lessive de soude (NaOH 1 %) développent une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet en présence des quinones libres (Oloyede et Aina, 2005).

➤ **Les composés phénoliques**

1 ml d'extrait dans 3ml d'eau distillée et 5gouttes de $FeCl_3$ ont été ajoutées. La présence des composés phénoliques a été marquée par l'apparition de la coloration bleu-verdâtre (Rosine et Momo, 2009).

➤ **Les sucres réducteurs**

1 ml de chaque extrait on ajoute 2ml de solution Fehling puis les tubes sont incubés au bain marie pendant 20 min. Un test positif est indiqué par l'apparition d'un précipité de couleur rouge brique (Caiet *al.*, 2011).

➤ **Les anthocyanes**

La recherche des anthocyanes repose sur le changement de la couleur de l'infusé à 10% avec le changement de pH: On ajoute quelques gouttes d'HCl, puis quelques gouttes d'ammoniac (NH_4OH). Le changement de la couleur indique la présence des anthocyanes (Debrayet *al.*, 1971).

➤ **Test de mousse pour les saponosides**

La détection des saponines est réalisée au moyen du test de Yadav et Agarwala, (2011) 1ml d'extrait, ajoutés 3ml d'eau distillée. Après agitation pendant 2 min la formation d'une mousse persistant indique la présence des saponines.

➤ **Les anthraquinones**

Ajoute 5 ml de NH_4OH à 10 ml d'extrait, après agitation leur présence est indiquée par une coloration violette (Okerulu et Aina, 2001).

➤ **Les coumarines**

1 ml d'extrait est déposé sur papier filtre plus 0,5ml de NH_4OH à 25% et l'observation de la fluorescence sous une lampe UV à 366 nm. Une fluorescence intense dans le tube où il a été ajouté l'ammoniaque indique la présence de coumarines (Okerulu et Aina, 2001).

➤ **Les amines**

L'extrait est déposé sur papier filtre à l'étuve 80°C puis pulvérisé avec quelques gouttes de ninhydrine puis séché à l'étuve à 110 °C pendant 5 min. Des taches violettes sur le papier indiquent la présence des amines (Oloyede, 2005).

➤ **Les mucilages**

1ml d'infusé est ajouté à 5ml d'éthanol après quelque minute. La formation d'un précipité indique la présence des mucilages (Rwandaises, 1977).

➤ **L'amidon**

On ajoute quelques gouttes de légole à 1ml d'infusé 5%, une coloration bleu foncé confirme la présence de l'amidon (Kanoun, 2011).

II-4- Analyse quantitative des composés phénoliques

II-4-1- Teneur en phénols totaux

La quantité de composé réactifs polyphénol des extraits étaient déterminés avec Folin-Ciocalteu réactifs utilisant la méthode colorimétrique de Singleton et Rossi (1965).

Le mélange réactionnel contenu 200 μ l de différents extraits, 1ml de Folin-Ciocalteu réactif (1/10) et après 4 min on ajoute 1 ml de Na₂CO₃ (2%). Laisser ce mélange à l'obscurité pendant 2h puis lire la densité optique à 760 nm utilisant le spectrophotomètre. Dans les mêmes conditions le dosage de la courbe d'étalonnage est effectué par l'acide gallique à différentes concentration. Les résultats sont exprimés en milligramme d'acide gallique par gramme d'extrait mg EAG/g (Wright et al., 2017). En appliquant la formule suivante : $C = (c \times V) / m$

C : La teneur en phénols totaux (μ g d'acide gallique/g de matière sèche).

c : La concentration de l'acide gallique établie à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml).

V : Volume de l'extrait éthanoïques ou aqueux

m : Prise d'essai de la matière sèche (mg)

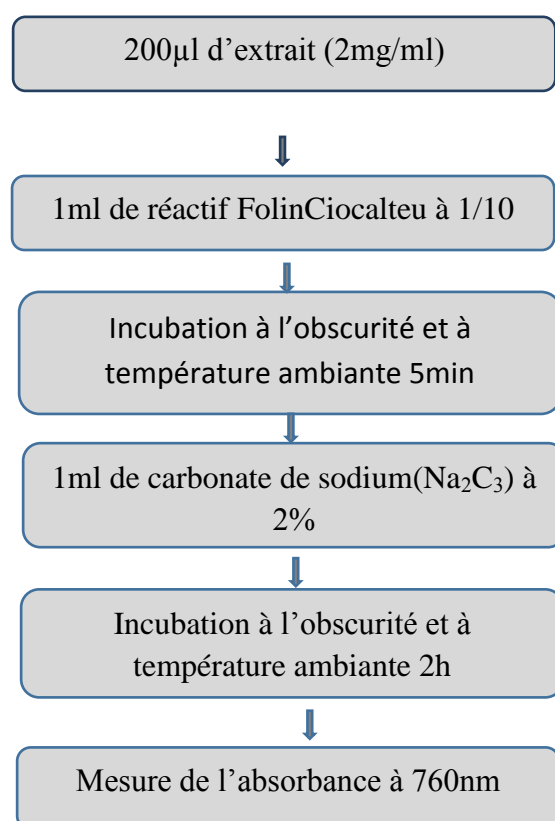


Figure 15 : protocole de dosage des polyphénols (Singleton et Ross, 1965)

II-4-2- Teneur en flavonoïde

La méthode du trichlorure d'aluminium est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits de *Bunium incrastum* ; 1 ml de chaque extrait est ajouté à 1 ml de la solution d'AlCl₃ de 2%. Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 415 nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine et est

exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{gEQ}/\text{mg}$ d'extrait). (Talbi et al., 2014)

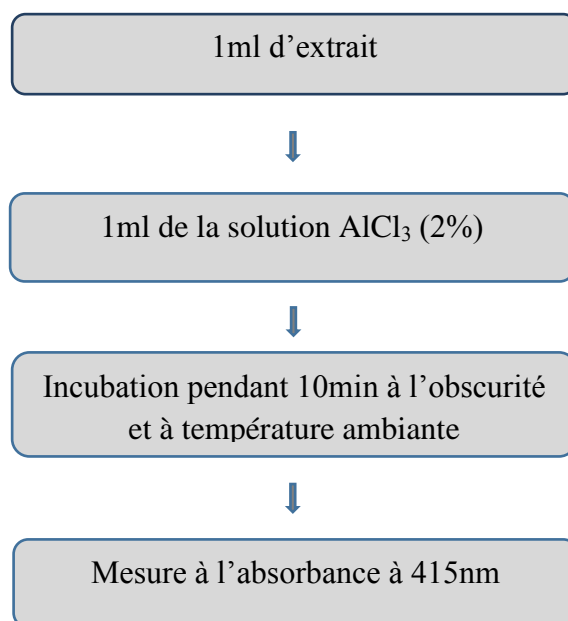


Figure16 : dosage des flavonoïdes totaux(Djerdiane et al., 2006)

II-5- Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH

Le test antioxydant a été réalisé avec la méthode au DPPH (le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) le principe d'évaluation est basé sur la diminution de l'absorbance mesurée à 515nm résultant du changement de coloration violette au jaune comme le radical libre devient piégé par l'antioxydant à travers les transferts d'un atome d'hydrogène à partir d'un DPPH stable. (Ngo-Nlend et al., 2012)

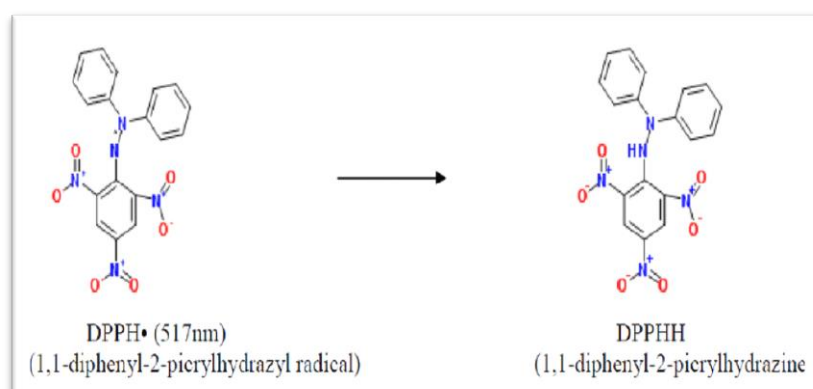


Figure17 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH•entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH) (Molyneux, 2004)

50 µl d'extrait à différentes concentrations (de 0.5 à 2 mg/ml) sont ajoutés à 1,95 ml de la solution méthanolique du DPPH (0.025 g/l). [Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélange 50 µl du méthanol avec 1.95 ml de la solution méthanolique de DPPH]. Après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, la lecture de l'absorbance est faite contre un blanc.

L'acide ascorbique est représenté par une solution d'un antioxydant standard, ce contrôle a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration le test est répété 3 fois. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{(\text{Abs c} - \text{Abs t})}{\text{Abs c}} \times 100$$

Abs c : Absorbance du contrôle

Abs t : Absorbance de l'échantillon testé

• Evaluation du potentiel anti-radical par le calcul de l'IC₅₀

L'IC₅₀ est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH. Les IC₅₀ sont calculés graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés (Torres et al., 2006).

II-6- Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits de *B. incrassatum*

Afin de tester l'activité antimicrobienne des extraits, nous avons utilisé la méthode de l'aromatogramme par diffusion à partir de disques imprégnés ; nous avons utilisé comme milieu de culture, la gélose Muller-Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries à différentes concentrations de *Bunium incrassatum*.

• Préparation de la suspension des souches

Les souches microbiennes tester ont été repiquées par la méthode des stries dans le gélose nutritif, puis incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées qui ont servi par la suite à préparer l'inoculum.

Tableau 02 : Description générale de souches utilisées

Espèce	Référence	Famille	Description générale
E-Coli		Entero-bacteriaceae	Bacille à coloration de Gram ⁻ , aéro-anaérobie facultatif, oxydase négative, mesurant de 2 à 4 µm de long et d'un diamètre d'environ 0,6 µm et qui fermente le glucose
Listeria monocytogène		Listeriaceae	Listeria est une bactérie Gram positive ayant la forme de petits bacilles(0,5 - 2 µm x 0,5 µm). Elle ne forme pas de spore et cultive en absence ou en présence.
S. aureus		Staphelococcacea	Ce sont des bactéries ubiquitaires, a un Gram ⁺ . Ces Staphde mesure (0,5 à 1µm de diamètre), ne sporule pas, est immobile, aéro-anaérobie facultatif et possède une catalase et une coagulase(Matthew et Arduino, 2001).

- **Préparation des suspensions microbiennes (l'inoculum)**

Après 18h d'incubation à 37 °C et à l'aide d'une anse de platine des suspensions microbiennes d'une densité optique de 0.5 Mc Farland ont été préparées, pour chaque microorganisme, dans 5 ml d'eau distillée stérile.

- **Ensemencement (Ecouvillonnage)**

L'ensemencement a été faite sur milieu gélose Muller Hinton, coulé en boîte de pétrie sur une épaisseur de 4mm. L'ensemencement se fait par inondation de façon à recouvrir entièrement la surface gélosée, l'excès est ré-aspiré

- **Dépôts des disques**

Disques en papier filtre n 1 de 6 mm de diamètre(sont stérilisés dans du papier aluminium à l'autoclave à 121 °C pendant 15 mn) mis sur la surface du boîtes coulées ; ces disques sont imprégnés chacun avec 10µl des extraits à tester des différentes concentrations

de différents extraits préalablement dissouts dans le (DMSO), à l'aide d'une pince stérile. En parallèle, nous avons utilisé un disque témoin négatif imbibé par le DMSO (10µl/disque) et des témoins positifs : antibiotiques oxacilline (10µg/disque),

Les boites sont ensuite fermées et laissées diffuser à la température ambiante pendant 30 mn et mise à l'étuve à une température de 37°C pendant 24 heures. La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque, en mm (Mouas et al., 2017 ; Braz, 2017)

La lecture se fait après 18 à 24h d'incubation à 37°C, l'obtention d'un halo claire autour du disque indique l'inhibition de la croissance microbienne. Le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré en mm incluant le diamètre du disque.

Cette sensibilité est classée selon Ponce, Del Valle, et Roua, (2003) comme suit :

- ❖ Non sensible pour un diamètre inférieur à 8mm
- ❖ Sensible pour un diamètre de 9-14mm
- ❖ Très sensible pour un diamètre de 15-19mm
- ❖ Extrêmement sensible pour diamètre supérieur à 20mm

II-7- L'activité anti fongique

Pour la réalisation de l'activité anti fongique on a adopté la méthode de diffusion de disque (même méthode de l'activité antimicrobienne) sauf que le milieu choisis est le PDA et un antifongique *Penicillium italicum*.

Les souches fongiques ont été obtenues auprès du laboratoire l'Université de Khenchela. Les cultures pour l'espèce fongique ont été maintenues dans le milieu Potato Dextrose Agar (PDA) inclinées et conservées à la température de 4°C.

Préparation du milieu de culture PDA :

Faire cuire 200 g de pommes de terre pelées, lavées et coupées en tranches fines dans 1L d'eau distillée pendant 1h. Filtrer sur plusieurs couches d'étamine puis presser pour exprimer le liquide restant. Ajouter 20 g d'agar agar et 20 g de glucose. Compléter à 1L si nécessaire.

Préparation des pré-cultures

Dans des boites de pétri coulées par le milieu PDA. On dispose un disque de souche provenant d'une culture pure. Le disque est centré, chaque boite contient une seule souche et un seul extrait à différents concentration L'incubation est réalisée à 28°C pendant 7 jours

- Les tests d'activité antifongique

L'effet antifongique contre le *penicillium italicum* a été estimé par la méthode de contact direct ; on utilise des dilutions différentes. Des boîtes de pétrie ont été coulé par le milieu PDA puis des quantités appropriées de *penicillium* sont ajoutés à ses boîtes

II-8- Evaluation de l'activité anti-inflammatoire :

L'activité anti-inflammatoire La dénaturation des protéines, dans laquelle les protéines perdent leur structure, est l'une des causes de l'inflammation et conduit à diverses maladies inflammatoires. Par conséquent, la capacité d'une substance d'inhiber la dénaturation des protéines signifie un potentiel apparent d'activité anti-inflammatoire (Habibur et al., 2015; Osman et al., 2016) L'effet inhibiteur *in vitro* des différents extraits de la plante *Bunium Incrassatum* a été déterminé en utilisant une méthode de dénaturation protéique décrite par Habibur et al. (2012) avec certaines modifications, l'activité a été effectuée avec trois concentrations (100, 200 et 400 µg/ml) des extraits aqueux et hydro-alcoolique des feuilles et des amandes plus le diclofinac de sodium utilisé comme standard avec les mêmes concentrations.

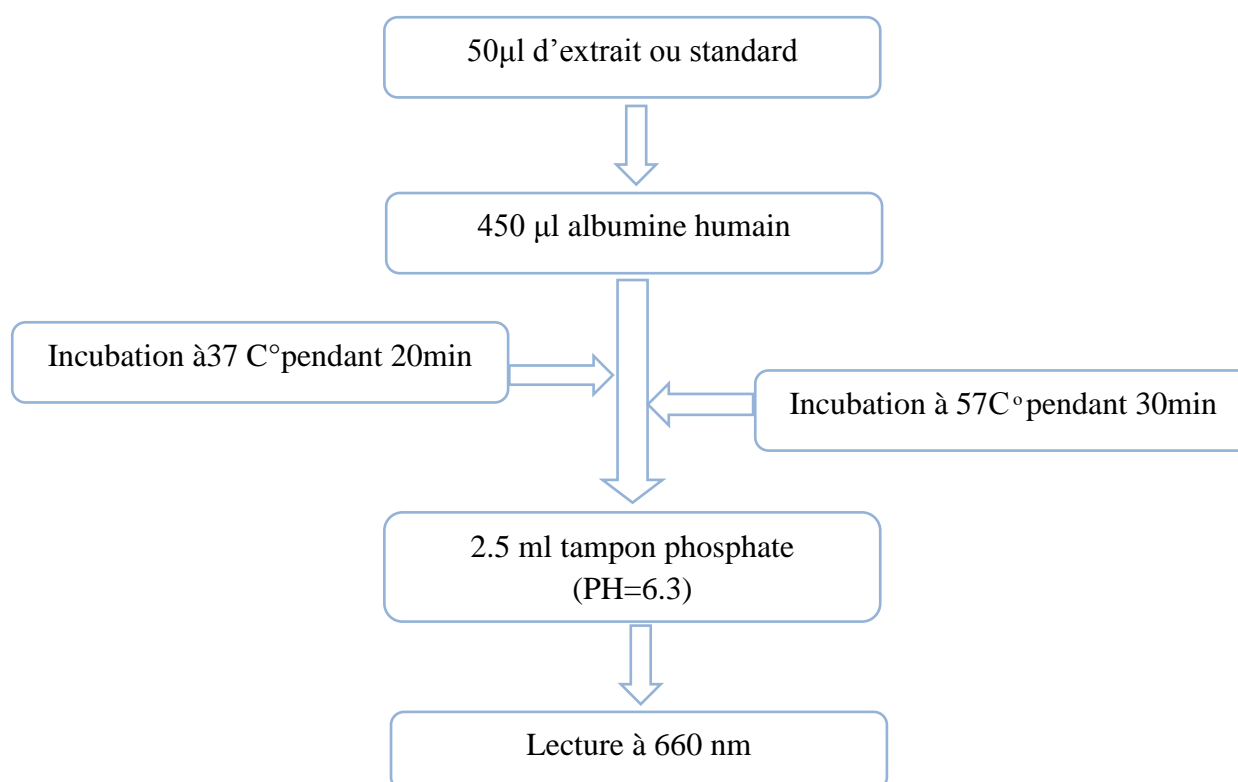


Figure 18 : Protocole d'inhibition de la dénaturation de l'albumine humaine (Habibur et al., 2012).

Les résultats exprimé on calcule :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(absC - absT) / AbsC] \times 100$$

Abs C : absorbance de control.

Abs T : absorbance de test.

Analyse statistique

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm l'écart type. En utilisant l'Excel 2013, Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05 ($p < 0.05$) dans l'ensemble des analyses statistiques en utilisant le Mini Tab V13. ANOVA

Chapitre II :

Résultats et discussions

Le présent travail porte sur l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydants, anti-inflammatoires, antibactériennes et antifongiques des différents extraits de la plante médicinale « *Bunium incrassatum* »

1. Rendement d'extraction

La préparation des extraits de la plante médicinale *Bunium incrassatum* a été effectuée selon la méthode proposée par Souley (2005). Les procédés d'extraction ont permis d'obtenir trois extraits pour la plante. Les extraits récupérés par évaporation à sec pour les extraits aqueux (EA-1 obtenue par infusion ; et EA-2 obtenus par décoction) et les extraits hydro-ethanolique EE-3.

La couleur l'aspect ainsi que le rendement de chaque extrait par rapport au poids de cette plante séchées et pulvérisées sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 03 : Rendements et caractéristiques des extraits des tubercules de *B. incrassatum*

Extraits	Masse (g)	Aspect	Couleur	Rendement(%)
Aqueux-1-	5.82	Pâteux	Miel	18.06
Aqueux-2-	2.8	Cristaux	Miel foncé	9.33
Ethanolique-3-	3.86	Pâteux	Miel	9.65

Les rendements représentés dans le tableau ci-dessus sont illustrés sous forme d'histogramme permettant de faire une comparaison entre les rendements des différents extraits de la plante.

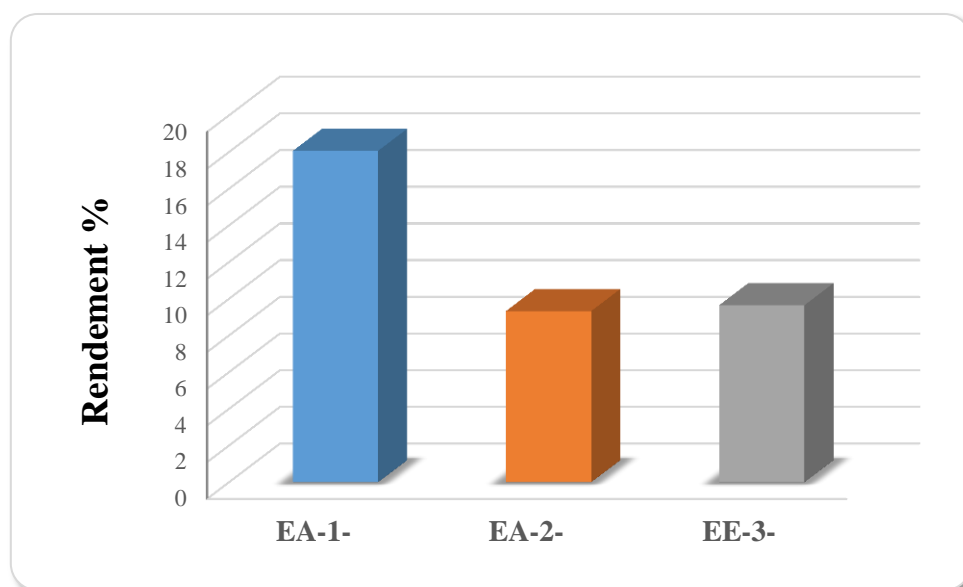


Figure 20: Rendements des extraits de *Bunium incrassatum*

Le calcul des rendements par rapport au poids sec de la poudre végétale (Tableau 3) a montré que l'EA-1 représente le rendement le plus élevé de 18.06% par rapport à l'EA-2 et l'EE-3 par un rendement de 9%. 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 (Daoudi et al., 2015).

La région et la période de la récolte sont aussi des facteurs déterminants du rendement (Keskes et al., 2014). D'autre part, la méthode d'extraction affecte également le contenu total en phénol et flavonoïdes. Ce rendement, est beaucoup plus élevé que celui rapporté par El Kolli (2017) pour les huiles essentielles de la partie aérienne de *Bunium* obtenus par extraction hydro-méthanoliques, contenant les biomolécules totaux, de la poudre sèche des deux plantes ont été de 0.89 % pour *B. alpinum* et 1.82 % pour *B. incrassatum*.

2. Tests de mise en évidence de certains composés phytochimiques

Nous avons réalisé des tests phytochimiques des différents extraits préparés à partir du tubercule de *Bunium incrassatum*. Ces tests sont en relation avec l'intensité du précipité, et la coloration qui sont proportionnelles à la quantité de la substance recherchée.

La mise en évidence par des tests qualitatifs des principaux métabolites secondaires synthétisés par la plante a révélé la présence des tannins, des flavonoïdes, des terpénoïdes, des coumarines, des terpènes, d'alcaloïdes et de saponines, avec une absence des anthocyanes

dans les trois extraits. Ces composants possèdent des intérêts thérapeutiques différents. Les résultats du screening phytochimique réalisé sont représentés dans le tableau ci-dessous

Tableau 4: Les résultats de criblage phytochimique des familles chimiques contenues dans les différents extraits de *Bunium incrassatum*

	Infusé	Décocté	Ethanolique	Résultats positive
Alcaloïdes	+++	+++	+	Précipite brun-noir, ou jaune-brun
Composé phénolique	-	+	+++	Bleue verdâtre
Terpenoïde	++	++	+++	Brun-rouge
Flavonoïde	++	+	+	Jaune
Tanins	++	++	+++	Bleue noir et un précipite
Coumarine	++	++	++	Fluorescence
Les amines	+++	+++	+++	Tache violette
Saponine	+	+	-	Mousse persistante
Quinones libre	+	+	+	Jaune, rouge ou violet
Amidon	+++	+++	-	Coloration bleue foncé
Sucres réducteur	+++	+++	+++	Un précipité rouge brique
Les anthocyanes	-	-	-	Changement de la couleur

- Test fortement positif : (+++)
- Test moyennement positif : (++)
- Test faiblement positif : (+)
- Test négatif : (-)

La différence de la composition chimique peut être expliquée par l'influence des facteurs sur la présence, l'absence et la répartition des différents principes actifs comme, le climat, la nature du sol, eau, altitude ...etc. (Boughrara, 2016).

Les résultats obtenus par d'autres travaux et qui sont réalisés sur des espèces du même genre en dehors de l'Algérie, ont montré les composés majoritaires des huiles essentielles pour le genre *B. persicum* après une extraction des graines par hydrodistillation est les caryophyllène (27.8%) et δ terpène (44.2%) (Shahsavari et al., 2008 ; Kayser et al., 2009). L'étude faite par Meshkadalsadat et Zarei (2011) a montré que le mono terpène de α - pinène (16.2%) et le phénylpropène anéthole-E (60.9%) sont les composés majoritaires de genre *B. luristanicum* d'Iran.

3. Analyse quantitative et des flavonoïdes des extraits

3.1. Dosage des polyphénols

L'analyse quantitative des phénols totaux des extraits de la plante étudiée a été déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage dressée à partir d'une gamme de solutions standard d'acide gallique établie séparément. La quantité des phénols totaux dans les extraits est exprimée en milligramme d'équivalents d'acide gallique par ($\mu\text{gEAG}/\text{mg MS}$).

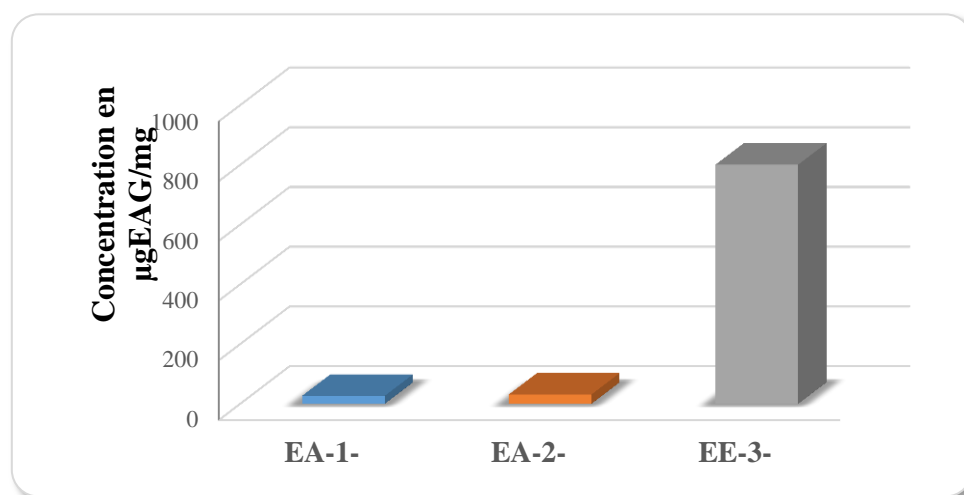


Figure 21 : Teneur en polyphénols totaux pour les différents extraits

de *Bunium incrassatum*

La teneur en flavonoïdes dans l'extrait éthanolique est supérieure à celle des l'extraits aqueux. La figure 21 montre que les teneurs en polyphénols totaux de *B. incrassatum* sont généralement faibles. Elles sont comprises entre $31 \pm 0,5$ mg EAG/g MS pour l'extrait EA-2 et $26,64 \pm 0,5$ mgEAG/gMS pour l'extrait et EA-1 et $800,58 \pm 86,8$ mg EAG/g MS pour l'extrait éthanolique des graines. Wojdylo et al. (2007), ont rapporté que toutes les plantes étudiées, appartenant à la famille des Apiacées, présentent des teneurs très basses en polyphénols. Ceci est en accord avec nos résultats.

L'étude faite par El Kolli (2017) a montré que l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *B. alpinum* contient $268,2 \mu\text{g Eq}/\text{mg}$ d'extrait et l'extrait de *B. incrassatum* contient $236,6 \mu\text{g Eq}/\text{mg}$ d'extrait.

La différence entre la teneur en polyphénols des différents extraits s'explique par la différence en solubilité de ces composés dans le solvant extracteur choisi et l'eau, sachant que les composés phénoliques sont généralement solubles dans les solvants organiques

polaires et les solutions aqueuses et peu solubles dans les solvants organiques apolaires (Macheix et al., 2005).

3.1. Dosage des flavonoïdes :

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3), en adaptant la même procédure utilisée pour l'établissement de la courbe d'étalonnage, en remplaçant la quercétine par des dilutions des extraits jusqu'à une concentration appropriée. La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par 1 gramme de l'extrait (mg EQ/ g MS).

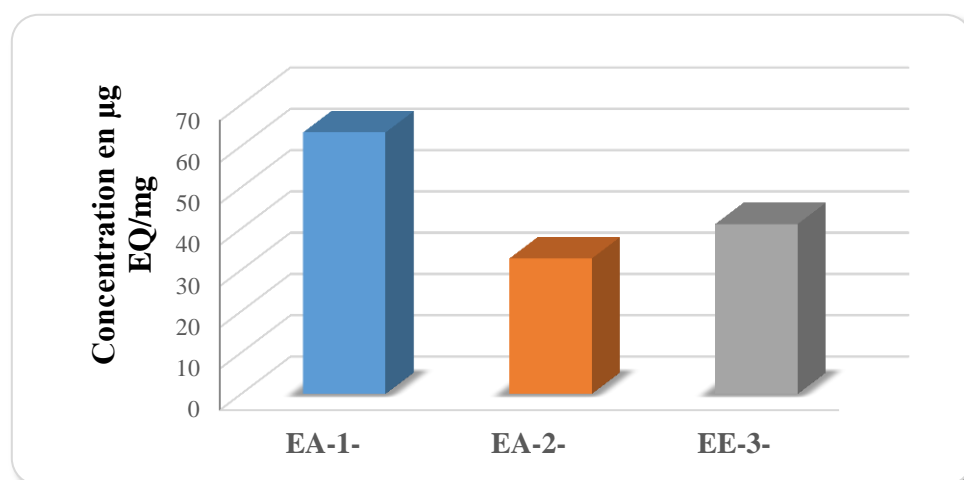


Figure 22 : Teneur en flavonoïdes pour les différents extraits de *Bunium incrassatum*

Les résultats du dosage quantitatif des flavonoïdes (figure 21) révèlent que l'extrait aqueux décocté EA-1 contient $63,3 \pm 3,05 \mu\text{g EQ/gMS}$. Les deux autres extraits représentent une teneur de $32,78 \pm 2,71 \mu\text{g EQ/g MS}$ et $41,13 \pm 3,21 \mu\text{g EQ/g MS}$ respectivement.

Dans notre recherche, non exhaustive, nous n'avons pas trouvé d'étude concernant de taux de flavonoïdes d'un extrait éthanolique chez le tubercule d'une plante du genre *Bunium*.

4. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH

L'activité antiradicalaire des extraits éthanolique et aqueux des grains de *Bunium incrassatum* a été évaluée dans la présente étude par le test du radical DPPH qui permet de mesurer la capacité de piégeage des radicaux libres. Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits étudiée par le test de DPPH sont exprimés par le pourcentage d'inhibition et la concentration inhibitrice 50 du radical DPPH par les extraits et sont représentés graphiquement (Figure 22 et 23).

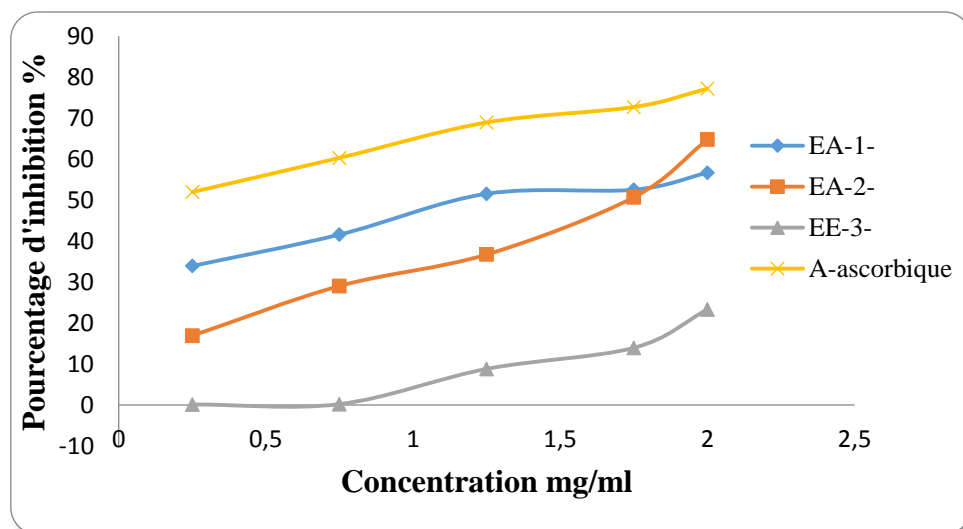


Figure 23: Pourcentages d'inhibition du DPPH[•] en fonction des différentes concentrations des extraits de la plante *B. incrassatum* et l'acide ascorbique.

D'après les résultats ci-dessus, on remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente significativement avec l'augmentation de la concentration, et les taux d'inhibition du DPPH enregistrés en présence des différents extraits de la plante sont inférieurs à l'acide ascorbique.

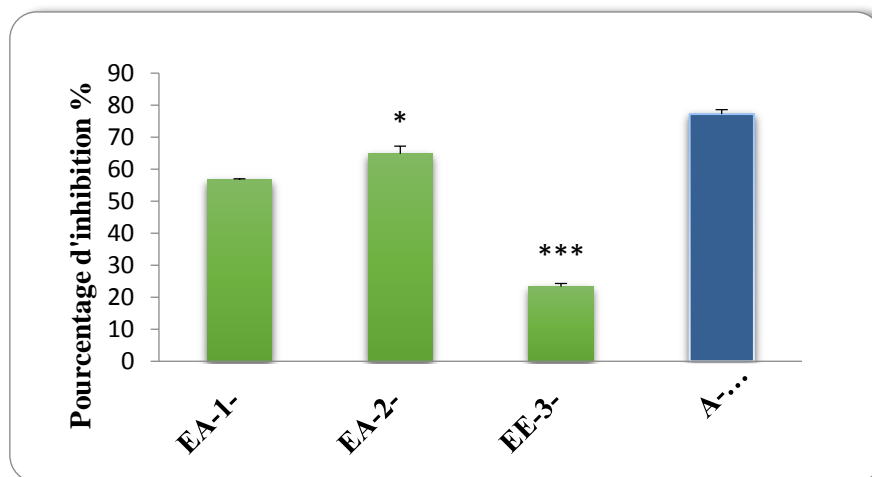


Figure 24 : Activité antiradicalaire du DPPH des extraits des graines de *Bunium incrassatum*.

- (P<0,05); Différence significative.*
- (P<0,001); Différence très hautement significative. ***

A partir des résultats obtenus dans la figure ci-dessus, nous constatons que les deux extraits aqueux de la plante présentent un très bon pouvoir antioxydant par rapport à l'extrait éthanolique. En effet, à la concentration de 2 mg/ml les extraits testés réduisent plus de 50%

du radical DPPH (figure 23). Ainsi, on constate que l'extrait aqueux (infuse) possède une activité anti-radicalaire de 64.79 ± 2.4 % supérieure aux autres extrais. L'extrait aqueux (décocté) avec une activité anti-radicalaire significative ($p < 0,05$) par rapport à celle de l'acide ascorbique de 56.68 ± 0.34 %. Tandis que pour l'extrait éthanolique, nous n'avons trouvé qu'une faible inhibition de 23.31 ± 1.07 % et représente une activité hautement significative ($p < 0,001$) par rapport à celle de l'acide ascorbique.

✓ Calcul des IC_{50}

L' IC_{50} est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50 %. Plus la valeur d' IC_{50} est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande.

Les IC_{50} de chacun des différents extraits ont été déterminées. A partir des courbes des taux d'inhibition (figure 23), nous avons pu déduire graphiquement les valeurs d' IC_{50} du l'acide ascorbique et des trois extraits; représentées dans la figure 24.

Les résultats obtenus montrent que l'extrait aqueux EA-2 présente un effet antioxydant plus important vis à vis du radical DPPH. En effet, La concentration inhibitrice piégeant 50 % du radical DPPH (IC_{50}) est de 1,6 mg/ml pour l'extrait aqueux EA-1, 1,4 mg/ml pour l'extrait aqueux EA-2, et finalement l'extrait éthanolique qui semble être la moins performante avec un IC_{50} de 4,34 mg/ml en comparaison avec l'antioxydant standard l'acide ascorbique qui présente un IC_{50} de 0.04mg/ml.

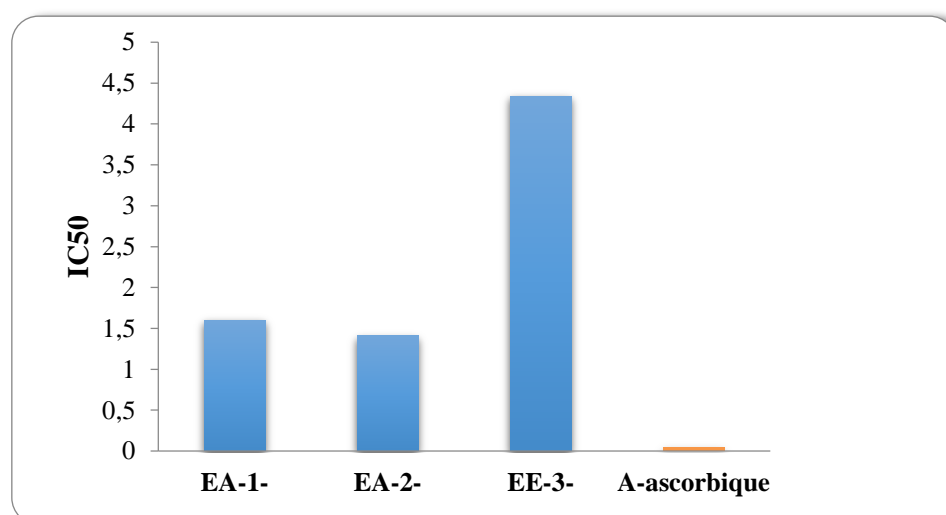


Figure 25: IC_{50} des extraits et d'acide ascorbique

Ce pouvoir antioxydant des extraits aqueux est expliqué par la présence des composés phénoliques notamment les flavonoïdes présents dans le tubercule de la plantes étudiée, et qui sont connus comme substances antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène. Il est aussi à signaler que ce n'est pas uniquement les composés majoritaires qui sont responsables de cette activité, il est souligné dans plusieurs rapports dans la littérature qu'il peut y avoir des composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres (Benzie et Stain, 1996; Brunton, 1999 ; Lu et Fu, 2001).

La présence de certaines molécules minoritaires telles que; Le géraniol, le bisabolol (*B. alpinum* en contient 4,05%), le carvacrol et le thymol (*B. incrassatum* en contiennent 1,41%) se sont avérés attribuer un degré élevé de propriété antioxydante par synergie aux radicaux libres (Nalina et Rahim, 2007). Il a été prouvé que l'effet anti-oxydant est dû à la présence de groupes hydroxyle dans la structure chimique, tels que la quercétine et le carnosol, bien connus pour être de bons piègeurs de radicaux libres (Kulisic et al., 2004)

Le travail réalisé par Boustela et al., (2015) a détaillé la composition chimique de l'extrait de *B. incrassatum* et il montre que cet extrait contient comme composés majoritaires des coumarines; β -sitosterol et le sucrose en plus de l'acide oléique. La présence des coumarines dans l'extrait renforce son activité antioxydante (Kulisic et al. 2004; Surveswaran et al., 2007; Barkat et Laib , 2011 ; Kapoor et al., 2010; Bougandoura et Bendimrad, 2013).

Les résultats obtenus par El Kolli (2017), qui étudiaient le pouvoir antioxydant (par la technique du DPPH) de l'extrait méthanolique de *B. alpinum* et *B. incrassatum*, montrent des IC_{50} de $21,85 \pm 1,32 \mu\text{g/ml}$ et $55,77 \pm 3,25 \mu\text{g/ml}$ respectivement contre $2,63 \mu\text{g/ml}$ pour la quercétine et $5,94 \mu\text{g/ml}$ pour la rutine.

L'étude réalisée par Lefehal (2010), sur l'extrait méthanolique de *B. alpinum*, envisage que le composé majoritaire de cet extrait est une flavone 3-O-R qui est la quercétine -3-O- β -glucoside. Cette flavonone se trouve dans plusieurs espèces de la famille des Apiaceae comme : *Foeniculum vulgare*, *Caucalis platycarpos* et *Peucedanum tauricum* dont leurs activités antioxydantes sont attribuables à la présence de cette flavone.

Selon Ahmed et al. (2014) les fractions de l'acétate d'éthyle et la fraction aqueuse de fruits de *B. bulbocastanum* peuvent être utilisés comme agents thérapeutiques contre les réactions d'oxydation nocives et par conséquent, les extraits de fruits de *B. bulbocastanum* pourraient

déboucher sur des thérapeutiques permettant de réduire les complications du diabète et le processus de vieillissement.

5. Etude de l'activité antibactérienne :

L'activité antimicrobienne des différents extraits aqueux obtenus par infusion et décoction et d'extraits ethanologique de la plante *Bunium* était testée in vitro par la méthode de diffusion sur un milieu gélosés solides, Mueller-Hinton. (Liao et al., 2010). Cette méthode a exactement le même principe que celui des tests d'antibiogramme. C'est-à-dire, l'application de patchs imprégnés de principes actifs sur des milieux de cultureensemencés de microorganismes. L'activité antibactérienne se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier imprégné d'extrait brut étudié. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous, on utilisant l'antibiotique Oxacilline comme un contrôle positif.

Tableau 05: Diamètre des zones d'inhibition de la croissance bactérienne par les différents extraits aqueux et ethanologique de *Bunium incrassatum* en (mm).

Extraits [] mg/ml Souches	EA-1-			EA-2-			EE-3-		
	6.25	12.5	25	6.25	12.5	25	6.25	12.5	25
Listeria	-	5±0.1	8±0.9	8±0.8	9±0.1	-	9±0.2	10.06±0.21	10.56±0.125
E-Coli	6±0.6	9±0.1	10.03±0.057	-	8±0.5	9±0.2	7.2±0.2	7.93±0.21	9±0.21
S.aureus	-	7±0.871	14±0.2	8±0.2	9±0.519	18±0.6	8.1±0.2	10.16±0.32	13±0.2

La variation de l'activité antimicrobienne des extraits expliquent les variations de leurs compositions chimiques. Comme cela a été rapporté dans la littérature, nous avons considéré qu'un extrait a une activité antibactérienne si son diamètre d'inhibition est supérieur à 10 mm (Ponce et al., 2003). Les résultats exprimés dans les figures (25 à 30) montrent que les espèces bactériennes étudiées présentent des degrés de sensibilité différente vis-à-vis des extraits étudiées.

➤ L'extrait aqueux par décoction

Le pouvoir antibactérien de l'extrait aqueux décocté des graines le plus avéré a été observé avec *S. aureus* dont le diamètre de la zone d'inhibition est de 18 mm à une concentration de 25mg/ml (figure 25). Les autres souches se comportent différemment avec des diamètres compris entre 12mm et 9mm pour *Listeria* et *E-coli* respectivement. L'extrait aqueux décocté semble inactif sur les souches *E-coli* testées. La faible activité antibactérienne de l'extrait peut s'expliquer par leur teneur faible en flavonoïdes.

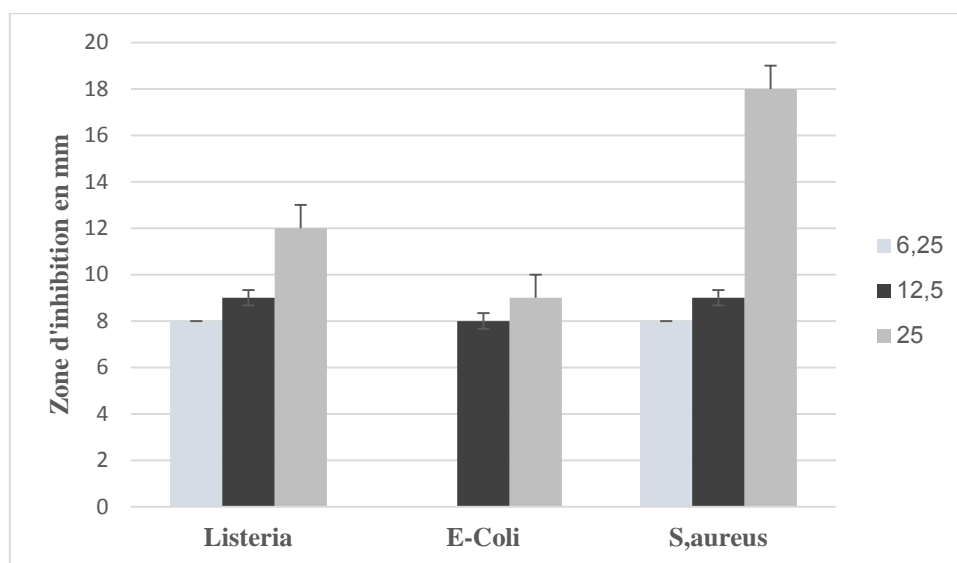


Figure 26: L'effet de l'extrait aqueux par décoction sur les bactéries étudiées

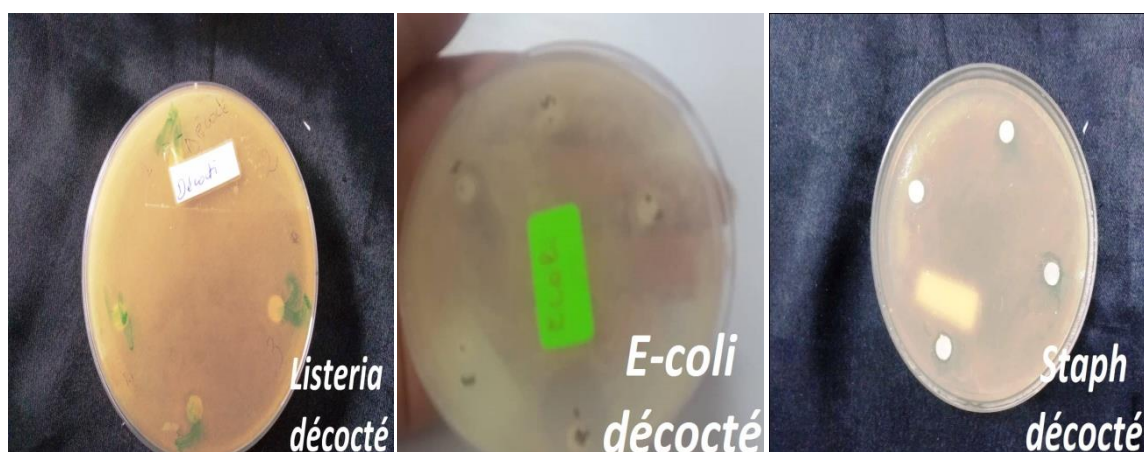


Figure 27 : Zones d'inhibition d'extrait aqueux par décoction sur les bactéries ; *S. aureus* et *E-coli*

➤ L'extrait aqueux par infusion

Les activités les plus élevées de l'E AQ par infusion des graines ont été remarquées avec *S. aureus* dont le diamètre de la zone d'inhibition est 14mm dans la concentration 25mg/ml (figure 27).

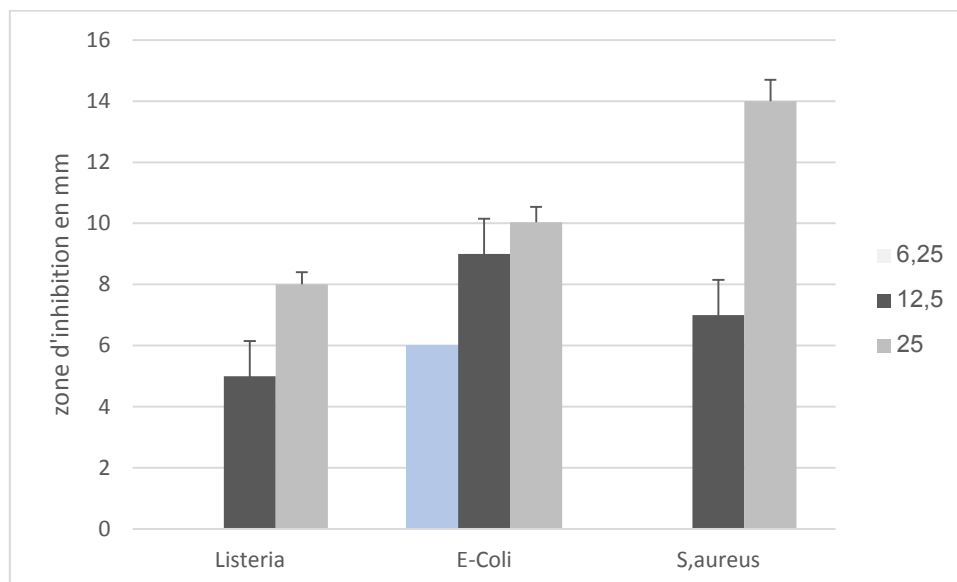


Figure 28: L'effet de l'extrait aqueux par infusion sur les bactéries étudiées



Figure 29 : Zones d'inhibition d'extrait aqueux par infusion sur les bactéries ; *S. aureus* et *E-coli*

Nous constatons, d'un part que quelque soit la souche bactérienne considérée, le composé étudié est actif lorsqu'elle est concentrée, plus elle est diluée, moins elle est active donc l'activité est inversement proportionnelle à la diminution de concentration. D'autre part, pour les bactéries *S. aureus* et *E-coli* sont sensibles par contre *Listeria* semble être la plus résistante.

➤ **L'extrait éthanolique :**

Selon la figure 29, on remarque que toutes les bactéries sont sensibles à l'extrait éthanolique a une concentration de 25 mg/ml. La plus grande surface d'inhibition est enregistrée par la souche S.aureus (13mm)), suivie par E.coli (12mm) et Listeria (10mm) avec l'extrait éthanolique des graines.

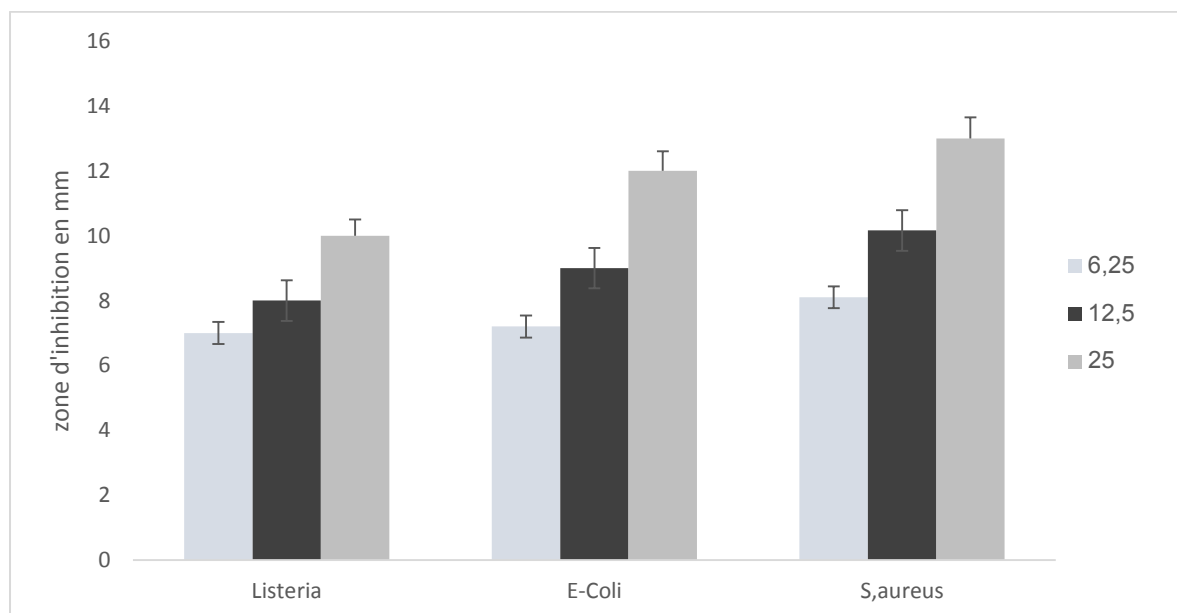


Figure 30: L'effet de l'EeOH sur les bactéries étudiées

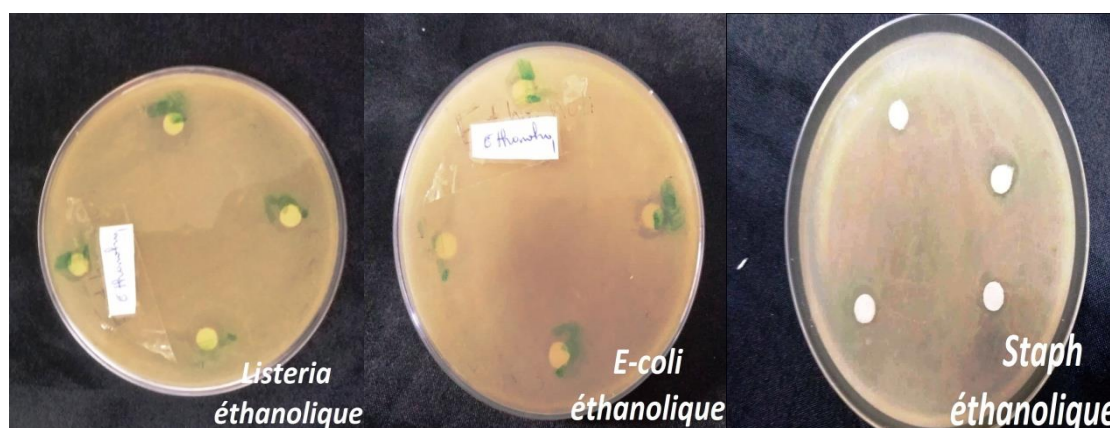


Figure 31: Zones d'inhibition d'extrait éthanolique sur les bactéries ; S, aureus et E-coli

En revanche, les 3 bactéries sont légèrement moins sensibles à l'extrait éthanolique des graines (figures 29 et 30). Ces diamètres ont été enregistrés avec la concentration la plus élevée (25 mg/ml). De plus, tous les extraits de *B. incrustatum* présentent un effet pertinent sur la bactérie *S. aureus* (Gram+) où le diamètre de la zone d'inhibition le plus élevé est observé avec l'extrait aqueux par décoction (18.5 ± 0.6 mm).

L'activité antibactérienne des extraits de plantes est due aux différents agents chimiques présent dans ces extraits, y compris les flavonoïdes, les alcaloïdes et les tannins ainsi que d'autre composés de nature phénolique ou groupes hydroxyle libre, qui sont classifiés comme composés antibiotiques très actifs (Marjorie, 1999). La variation de la composition chimique explique donc les variations observées dans l'activité antibactérienne des extraits d'une même plante. L'efficacité optimal d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif principal, mais à l'action combinée (synergie) de différents composée de l'origine de cet extrait (Essawi et Srour, 2000).

Les espèces de *Bunium* présentent généralement, un spectre d'activité antibacterienne étroit (moyen ou faible) vis à vis beaucoup de souches testées. Boustila et al. (2014), ont testé l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *B. incrassatum* sur *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*, ils ont trouvé des diamètres d'inhibition variant de 6 à 22 mm seulement.

Nos résultats vont dans le même sens que ceux trouvés par El Kelli et al, (2017) qui ont montré que les huiles essentiels de *Bunium incrassatum* a une activité antibactérienne remarquable sur *Salmonella typhimurium*, *E.coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* avec des diamètres d'inhibition de 10,6 mm et 34,5mm respectivement avec des pourcentages de dilution de (100, 50, 20 et 10) dans le DMSO (v/v).

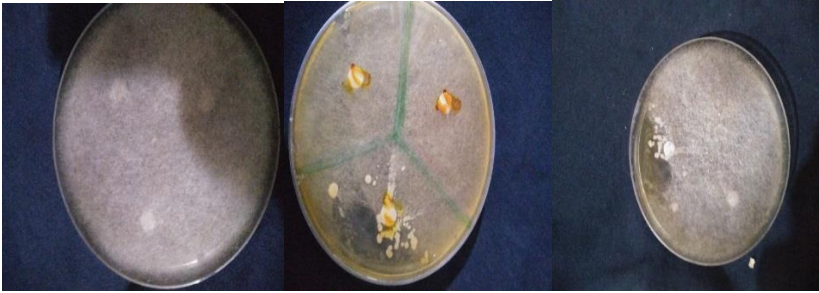



Aussi, Gohari et al. (2011), ont évalué l'activité antibactérienne de l'HE de *B. persicum* et ont constaté sa faible activité antibactérienne vis à vis *Streptococcus pneumoniae* et *Bacillus cereus*. L'analyse chimique de *Bunium* étudiées a montré qu'elles comportent des composés phénoliques comme qui sont supposés être responsables de cette activité (Baydar et al., 2004; Tepe et al., 2005).

Selon Khan et ces collaborateurs (2013), l'extrait méthanoliques de *B. bulbocastanum* a montré a montré une bonne activité antibactérienne contre *S. aureus* (89%) et modéré contre *P. aerogenosa* (59%), *B. subtilis* (48%) et *E. coli* (37%) mieux que les fractions de n-hexane et d' acetate d'éthyl EtOAc. Alors que la fraction aqueuse a montré une activité significative contre *B. subtilis* (85%), modéré contre against *S. aureus* (34%) et *E. coli* (33%) et faible activité contre *P. aerogenosa* (29%).

6. L'activité antifongique:

L'effet de l'activité antifongique des extraits aqueux et éthanolique des graines de *Bunium Incrassatum* à différents concentrations contre la souche isolé *penicillium* est évalué dans cette étude. Les résultats obtenus montrent que la souche a une résistance aux substances végétales contenues vis-à-vis les trois extraits des grains de la plante.

Tableau 6: Les résultats de l'activité antifongique de différents extraits de *B. incrassatum*

L'extrait	Résultats
EA-1-	
EA-2-	
EE-3-	
Antifongique	

Aucune zone d'inhibition n'a été constatée autour des disques imprégnés des différents extraits. Les résultats de Khan et al. (2013), ont indiqué que l'extrait méthanoliques et des

fractions de *B. bulbocastanum* étaient incapable de supprimer la croissance fongique. Les résultats ont montré que tous les échantillons étaient inactifs contre tous les champignons de test *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium notatum*, *Fusariumoxysporum*, *Trichoderma harzianum* et *Alternaria alternata*. À la lumière de ces résultats, on a dit que les extraits de la plante ne contiennent pas d'agent antifongique.

7. Activité anti-inflammatoires

Le tableau montre les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits aqueux et éthanolique de tubercules de *B. incrassatum* qui consiste à évaluer les pourcentages d'inhibition de la dénaturation de l'albumine humaine (SAH). (Tableau 7)

Tableau 7: Les pourcentages d'inhibition de la dénaturation du SAH des différents extraits

Concentration	100 µg/ml	200 µg/ml	400 µg/ml
EA-1	26.68 ±2,8	30±3	42,91±4.01
EA-2	35±2,16	42.91±1.9	62.5±3.3
EE-3	10.41±1.9	20.58 ±2.2	39.16±0.72
Diclofenac sodium	40,62 ±1.93	53.12± 3.8	56,25± 1.1

On remarque d'après les résultats présentés dans le Tableau13 que l'extrait aqueux EA-2 à la concentration de 0,4 mg/ml, il a été donné une meilleure inhibition de la dénaturation de SAH par 62,5% par rapport à la diclofenac sodium qui présente un pourcentage de 56,26 %.

De plus, on a trouvé que les deux extraits EA-1 et EE-3 exercent une bonne activité anti-inflammatoire à partir de la concentration de 400 µg/ml avec un taux d'inhibition de 42.91% pour l'extrait aqueux EA1 de et 39.16 % pour l'extrait éthanolique de *B. incrassatum*. Mais le diclofénac sodique (anti-inflammatoire synthétique) demeure le plus actif à la même concentration avec 56.26 %. L'inhibition de la dénaturation est dose dépendante. La comparaison des extraits aqueux avec le diclofénac montre que la différence entre les activités est non significative seulement pour EE-3 une différence hautement significative et significative a été enregistré avec les différentes concentrations par rapport au diclofinac, comme c'est représenté par l'histogramme suivant :

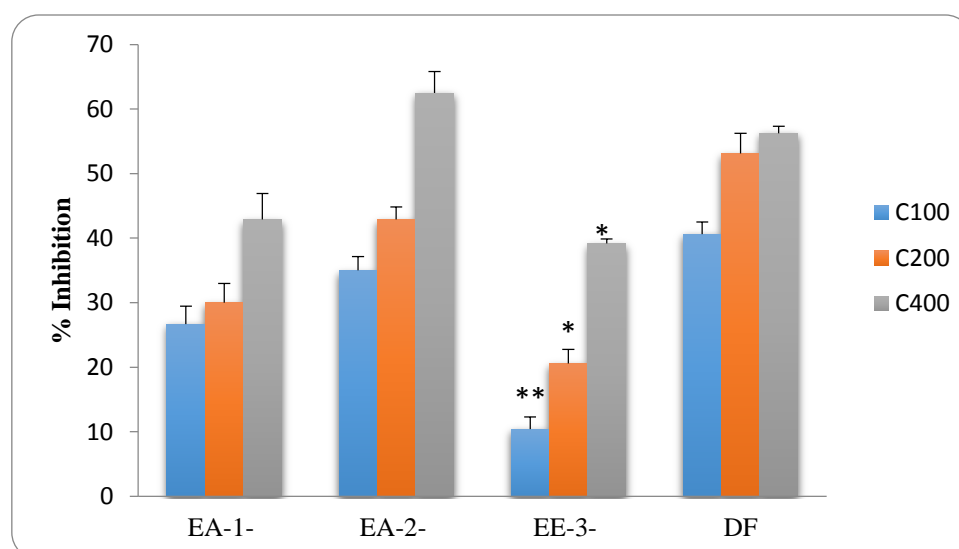


Figure 32 : Pourcentage de la stabilité de SAH par les extraits des graines de *B. incrassatum* à différents concentrations.

*Significative ($p \leq 0.05$)

**Hautement significative ($p \leq 0.01$)

La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation (Chandra et al., 2012; Williams et al., 2012). La production d'auto-antigènes dans les maladies inflammatoire peut être due à la dénaturation des protéines in vivo. Le mécanisme possible de la dénaturation consiste à l'altération des liaisons électrostatique, hydrogène, hydrophobe et disulfure qui maintien la structure tridimensionnelle des protéines (Mizushima et Kobayashi, 1968 ; Barros et al., 2008).

L'activité inhibitrice de la dénaturation de SAH est peut être attribuée a la présence de différents composés bioactifs tels que les flavonoïdes, stéroïdes, sesquiterpènes et les tannins dans les l'extrait trouvés lors des criblages phytochimiques. Peu d'études ont évalué l'effet inhibiteur de différents extraits de plante sur l'activité anti-inflammatoire in vitro par la méthode de la dénaturation des protéines. Selon El Kolli (2017), l'activité anti-inflammatoire des extraits méthanoliques de *B. incrassatum* et *B. alpinum* collectées à Sétif, évaluée par la méthode de dénaturation des protéines d'œufs, a révélé que les deux extraits exercent une forte activité antiinflammatoire. Notamment à partir de la concentration de 300 $\mu\text{g/ml}$ avec un taux d'inhibition supérieur à 50 %. Mais cette activité reste médiocre par rapport à l'activité du diclofénac sodique qui a révélé un taux d'inhibition de 64.68 % à la même concentration. D'autres études définitives sont nécessaires pour déterminer les mécanismes et les électeurs derrière ses actions anti-inflammatoires

Conclusion et perspectives

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante que la chimiothérapie. Le présent travail avait pour but l'étude phytochimique et évaluer la teneur en composés phénoliques et flavonoïde de la plante médicinales *Bunium Incrassatum* de la famille des Apiacea originaire de la wilaya de Khenchela et la détermination de leur activité antioxydante, anti bactérienne, anti-inflammatoire et aussi anti fongique.

Le processus d'extraction des substances végétales montre que l'utilisation des trois méthodes d'extraction donne des rendements différents. L'extraction aqueux par infusion (EA1-) a permis un rendement élevé (18,066%) suivi par un rendement moins élevé (9,65%) est obtenu après extraction à l'éthanol (EE-3-) et enfin un faible rendement (9,33%) est obtenu par extraction aqueux par décoction (EA-2-).

Les résultats de cette étude révèlent que cette plante possède un éventail de substances potentiellement bioactives (composés phénoliques, composés terpéniques, alcaloïdes...) susceptibles d'être exploités à plusieurs échelles thérapeutique : antiallergique, antibactérienne, anti-inflammatoire, antifongique, antivirales...etc.

La quantification par des méthodes spectrophotométrique nous a permis de déterminer les teneurs en phénols totaux ; Les résultats obtenus nous ont révélé que l'extrait éthanolique représente un teneur de polyphénols plus élevé. Les extraits aqueux obtenue par infusion et décoction ont des teneurs presque proche on considération l'extrait EA-1- est plus élevé que l'extrait EA-2-.

Par ailleurs,pour antioxydante importante in vitro ; dont l'extrait EE-3- présente l'effet antiradicalaire le plus puissant suivi par l'extrait EA-2- alors que l'extrait EA-2- a montré une activité antiradicalaire faible par rapport à l'acide ascorbique.

Les extraits de l'espèce végétale *Bunium Incrassatum* ont été également soumis à un criblage pour leur possible activité antimicrobienne in vitro, contre trois souches de bactéries, en employant la méthode de diffusion sur disque. Nous avons constaté que l'extrait éthanolique EE-3- est sensible pour les trois souches bactérienne et dans les différentes concentrations suivi par l'extrait aqueux par infusionEA-1- et enfin l'extrais aqueux décocté EA-2-. De plus la plus grand zone d'inhibition est observé dans l'extrait aqueux infusé avec la souche S, aureus et dans la concentration 25mg/ml.

Pour évaluer l'activité antifongique des trois extraits, nous avons adopté la technique de contact direct sur PDA. Les résultats ont montré que les extraits de cette plante n'ont pas une activité antifongique et que le test a un résultat négatif.

Références bibliographiques

A

Aafi, A., Achhal Elkadmiri, A., Benabid, A., Rochdi, M. (2005). Diversité floristique Mamora (Maroc). Acta Botanica Malacitana; (30): 127-38.

Ahmad,H., Khan, I.,Nisar, W. (2014) .Antioxidation and Antiglycation Properties of Bunium Bulbocastanum Fruits Various Fractions and its Possible Role in Reducing Diabetes Complication and Ageing. Vitam Miner ;(3):118.

Akroum, S. (2011). Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat en science.Université de Mentouri Constantine : 10

Aron,P., Kennedy, J. (2008). Flavan-3ols: Nature, occurrence and biological activity. Molecular Nutrition and Food Research ;(52): 79-104.

Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud,H., Debbache. N., Atmani, D. (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. Food Chimistry1C ;(22) : 303-09.

Aurousseau, B. (2002). Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. INRA Prod. Anim ; 15 (1) :67-8.

Aziman, N., Abdullah, N., Noor, Z., Zulkifli, K., Kamarudin,W. (2012). Phytochemical constituents and in vitro bioactivity of ethanolic aromatic herb extracts. Sains Malaysiana. 41(11): 1437-44.

B

Badiaga, M. (2011). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali, thèse de doctorat, université de Bamako :10

Banhamed, M. (2009). Contribution à l'étude phytochimique de deux plantes de la famille des apiaceae *Carum montanum* Coss. et *Dur. Et Bupleurum montanum* Coss. Université de Mentouri-Constantine:13

.Barkat, M., Laib, I. (2011). Composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle de la fleurs sèches de *Lavandula officinalis*. Revue de génie industriel ; (6) :46-54

Barboni.(2006).Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie.Thèse Pour obtenir le grade de Docteur de l'universite de CORSE école Doctorale Environnement et societe : 26

Barros, L., Falcão, S., Baptista, P., Freire, C., Vilas-Boas, M., Ferreira, I.(2008). Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chem*; (111): 61–6

Batrolomé, L., Jiménez, R., Butler, L.(1995).Nature of the condensed tannins present in the diertyfibre fractions in foods.*Foodchimestry* :362-75

Baydar H, Sagdic O, Ozkan G etKaradoganT. 2004. Antibacterial activity and Composition of essential oils of *Origanum*, *Thymbra* and *Sajureja* species with Commercial Importance in Turkey. *Journal of Food. Control*; (15): 169-72.

Baudin, B. (2006). Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *MT Cardio*; 2(1):43-52

Beckman, K., Ames, B. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews*; (78):547-81

Bensakhria, A.(2018).Le stress oxydatif .*Toxicologie Générale*. Chapitre 9

Boubacar, S. (2005). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Combretumglutinosum* Perr. Ex DC (*Combretacea*), Thèse de doctorat en Pharmacie. Université de Bamako, Mali.

Benzie, I., Strain, J.(1996). The ferricreducingability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Journal of Analytic biochemistry* ;(239) : 70-6.

Bouderdara, N. (2013). Séparation et détermination de structures des métabolites secondaires de *Cachryslibanotis*L:9-26.

Bougandoura, N., Bendimerad, N. (2013). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Sature jacalaminthassp.Nepeta* (L.) Briq. *Journal of Nature & Technologie* ; B(9): 14-9

Boughrara Boudjema.(2016). Inventaire et étude ethnobotanique et chimique des plantes à intérêt thérapeutiques et nutritif de parc nationale El-kala. Thèse de doctorat :

Université Badji Mokhtar- Annaba :136

Boukazata, A. (2014). La Composition chimique et l'activité antibactérienne d'une plante Algérienne (*Bunium Incrassatum*). Mémoire Master. Université de Setif

Boumediou, A., Addoun, S. (2017). Etude ethnobotanique sur l'usage des plantes toxiques, en médecine traditionnelle, dans la ville de Tlemcen (Algérie). Diplôme de Docteur en Pharmacie, Faculté de Médecine, Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen:118

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. *Plant Science* ; 161(5) :839-51

Bousetla, A., Zellagui, A., Rhouati, S. (2011). Chemical constituents of the roots of Algerian *Bunium incrassatum* and evaluation of its antimicrobial activity. *Arabian Journal of Chemistry*; 30(3):313-16

Braz, J. (2017). Antioxidant and antimicrobial properties of ethanolic extracts of guarana, boldo, rosemary and cinnamon. *Food Technol*; 20: 3-8

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} ed., TEC et DOC, Paris.

Bruneton J. (2008). Phytochimie plantes médicinales. 4^{ème} édition, revue et augmentée, Technique et Documentation. édition médicales internationales, Paris :1288

Bulletin. (1986). L'organisation de la santé ; 64(2) :159-17

C

Cai, L., Shi, F., Gao, X. (2011). Preliminary phytochemical analysis of *Acanthopanax trifoliatum* (L) Merr. *Journal of Medicinal Plants Research* ; (5): 4059-64.

Caratini, R. (1971). BORDAS encyclopédie : La vie des plantes. Tome 10, Ed. BORDAS, Belgique.

Chandra S, Chatterjee P, Dey P et Bhattacharya S. (2012). Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* ; 178-80.

Choi, H., Sog, J., Parl, K. (2009). Inhibitory effects of quercetin 3-O-rhamnoside on influenza A virus replication. *E J Pharm* ; 37(3-4) :329-30

Cotelle, N. (2001). Role of flavonoids in Oxidative Stress. *Medicinal Chemistry* ; 1(6):569-90

Cottiglia, F., Loy, G., Garau, D., Floris, C., Casu M., Pompei R., Bonsignore, L. (2011). Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedicine*; 8 (4): 302-05.

Cowan. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents *Clin Microbiol Rev* ; 12(4) :564-82

D

Damintoti, K., Mamoudou, H., Jacques, S., Saydou, Y., Souleymane, S., Alfred, S. (2005). Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. Mémoire de l'université de Burkina Faso

Daoudi, A., Sabiri, M., Bammou, M., Zair, T., Ibjibjen, J., Nassiri, L. (2015). Valorisation des extraits de trois espèces du genre *Urtica*: *Urtica urens* L., *Urtica membranacea* Poiret et *Urtica pilulifera* L. *Journal of Applied Biosciences* ; (87) :8094-104.

Debray, M., Jacquemin, H., Razafindrambo, R. (1971). Phytochemical Screening of *Pentadesmabutyraea Sabine* (Clusiaceae) Acclimated in Benin by GC/MS. *Travaux et documents de l'Orstom, Paris, France* ;(213) : 8.

Defraigne, J., Pincemail, J. (2008). Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités ;(63) :10-19.

De Moffarts, B., Kirschvink, N., Pincemail, J., Lekeux, P. (2005). Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. *Animale. Médecine. Vétérinaire* ; (149): 1-9

De Lamarck, M. (1805). Flore Française, Description succincte de toutes les plantes qui croissent naturellement en France, Tome 4. 3^{ème} éd, Paris.

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 -60

Delgoda, R., Murray, J. (2017). Perspectives on the Role of Plant Secondary Metabolites. *Pharmacognosy in Science Direct* :93-100

Démarchez, M. (2012). antioxydant/systèmes antioxydants

Degtjareva, G., Kljuykove, E., Samigullin, T., Valiejo-Roman, C., Pimenov, M. (2009). Molecular appraisal of *Bunium* and some related arid and subarid geophilic Apiaceae-Apioideae taxa of the Ancient Mediterranean. *Botanical Journal of the Linnean Society* ;

60(2) : 149-70.

Damintoti, K., Mamoudou, H., S.acques, Y., Saydou, S., Souleymane, S., Alfred, T. (2005). Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. Mémoire de l'université de Burkina Faso :

23-4

Dinzedi, M. (2015). Activités antibactériennes de extraits de *Terminaliacatappa* et *Thonningias anguinea* sur *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* multi résistantes d'origine humaine. Thèse de Doctorat de l'Université Félix Houphouët Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire : 133.

E

Edeaga, H., Okwu, D., Mbaebie, B.O. (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African. journal of biotechnology*. 4 (7): 685-688

El Kolli, H., Laouer, H., El Kolli, M. (2017). Chemical composition and biological activities of the essential oils and the methanolic extracts of *Bunium incrassatum* and *Bunium alpinum* from Algeria. *J. Chil. Chem. Soc*; 62(1) : 3335-41

Essawi ., Srour M.(2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharm* ; (70) : 343-49.

F

Favier, A. (2003). Le stress oxydants. Intérêt conceptuel et expérimentale dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique* :108-15

Favier, A. (2006). Stress oxydant et pathologie humaines *Oxydative stress in humandiseases*. *Annales Pharmaceutique Françaises* ; 64(6) :390-96

Fattorusso, W., Ritter, O. (2001). *Vademecum cliniques, Du diagnostic au traitement*. 16ème édition Masson m, Italie : 1915

Fauntaine, E. (2004). Production et élimination des radicaux libres, thèse de doctorat.

Fenu, G., Mattana, E., Congiu, A., Bacchetta, G. (2010). The endemic vascular flora of supramontes (Sardinia), a priority plant conservation area. *Journal of Candollea* ; 65(2): 347-58.

Filliat, P. (2012). Les plantes de la famille des Apiacées dans les troubles digestifs. *Journal of Applied Pharmaceutical sciences* ; 02(07): 92-5.

G

Garrel, X., Bigard. (2017). Stress oxydatif et micronutriments antioxydants nutrition du sportif (3 ème édition) : p 151-96

Garait., B.(2006). Docteur de l'université Joseph Fourier : Biologie Cellulaire

Ghedjati, N. (2005).Toxicité aigue et subaigüe des alcaloïdes naturels et synthétiques des graines du *Datura stramonium* obtention du diplôme de Magister en Biologie Spécialité: Biochimie: Toxicologie, Environnement et Santé.

Ghedira, K. (2005).Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique.*Phytotyrapie* ; 3(4) :162-69

Gohari, A., Hajimehdipoor, H., Saeidnia, S., Ajani , Y.,Hadjiakhoondi, A. (2011).

Antioxydant Activity of some medicinal species using FRAP assay. *Journal of Medicinal Plants* ; 10(37): 44-9

Goudable, J., Favier, A.(1997). Nutrition clinique et métabolisme ; radicaux libres oxygénés et antioxydant oxydative free radicals and antioxydants :115-20

Groussard, C., Machefer, G., Rannou, F., Faure, H., Cillard, J., Gratas-Delamarche, A.(2003). Effet d'un exercice de sprint de 30 s sur le statut antioxydant plasmatique Effect of a 30s sprint exercise on plasma non-enzymatic antioxidant status. *Science & Sports* ;(18): 108–10

H

Halliwel, B.(1994). Free radicals, antioxydants and humains diseases curiosity cause or conséquences .*The lancet* ; 344 (8924) :721-4

Habibur, R., Chinna Eswaraiah, M., Dutta, A. M. (2015). In-Vitro anti inflammatory and anti-arthritic activity of *Oryza sativa* Var. Joha Rice (An Aromatic Indigenous Rice of Assam). *American-Eurasian J Agric Environ Sci*; 15 (1): 115-21.

Habibur, R., ChinnaEswaraiah, M., Vakati, K., Madhavi, P. (2012). In Vitro studies suggest probable mechanism of *Eucalyptus* oil for anti inflammatory and anti-arthritic activity. *Int J Phytopharm*; 2(3): 81-3.

Heim, E., Tagliaferro, A., Bobilya, D. (2002). Flavonoid antioxidants : chemistry , metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* ; (13): 572-84.

Heller, R., Esnault, R., Lance, C. (2001). *Physiologie végétale. Nutrition*. 6^{ème} édition: 281-83

Hierso, R. (2015). Implication du stress oxydant dans la physiopathologie de la drepanocytose : crises vaso-occlusives, taux d'anticorps anti-bande 3 et oxydation du globule rouge. mémoire de doctorat en sciences de la vie, université des Antilles et de la Guyane.

Hsiou, Y., Yang, Ch., Wu., Hang-Ch, L. (2000). *Journal of the Chinese chemical society*; (47) :556-61

J

Jacques, D., Nicholas Moore, N., Mathieu, M., Karin Latery, K., Haramburu, F., Miremont-Salame, G., Titer, K. (2006). *Pharmacologie générale*.

Jacques, B., André, R. (2004). *Biochimie métabolique* Ed ellipses .Paris :217-25

Jassbi, A., Mehrdad, M., Soleimani, M., Mirzaeian, M., Sonboli, A. (2005). Chemical Composition of the essential oils of *Bunium elegans* and *Bunium caroides*. *Journal of Chemistry of Natural Compounds*; (41): 415-7.

Juanito, C. (2016). Les antioxydants. Le Véritable bouclier contre les radicaux libres ; *Musculation-Nutrition-coaching*

K

Kamarul, Z., Munirah, A., Azzeme Azzreena, M. (2019). plants toxins : alkaloids and their toxicities. *Biological and Pharmaceutical Sciences* ; 06(02) :21-9

Kanoun, K. (2011). Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine). Mémoire de magistère en Biologie. Université de Tlemcen.

Kansole, M. (2009). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucosmartinicansis* (Jacquin). Mémoire pour obtenir un diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso

Kapoor, I., Singh, B., Singh, G., De Heluani, C., De Lampasona, M., Catalan, C. (2010). Chemistry and antioxidant activity of essential oil and oleoresins of black caway (*Carum bulbo-castanum*) fruits. *Journal of Science Food Agriculture* ; 90(3):385-90

Kayser, O., Azizi, M., Davareenajad, G., Bos, R., Woerdenbag, H. (2009). Essential oil content and constituents of Black zira (*Bunium persicum* [Boiss] B.Fedtsch.) from Iran during field cultivation (Domestication). *Journal of Essential Oil Research* ; (21): 49-54.

Keskes, H., Mnafigui, K., Hamden, K., Damak, M., ElFeki, A., Allouche, N. (2014). In vitro antidiabetic, anti-obesity and antioxidant properties of *Juniperus phoenicea* L. Leaves from Tunisia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*; (2): 649-55.

Khan, I., Kulkari, V., Gopal, M., Shahabuddin M. (2005). Synthesis and biological evaluation of novel angularly fused polycyclic coumarins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* ; (15) : 3584-7

Khan, I., Ahmad, H., Ali, N., Ahmad, B., Tanoli, H. (2013) Screening of *Bunium bulbocastanum* for antibacterial, antifungal, phytotoxic and haemagglutination activities. *Pak. J. Pharm.Sci* ;26(4):787-91.

Khanbaba, K., Ree, T.(2001). Tannins: classification and Definition. *Journal of royal society of chemistry* ;(18):641-9.

Kohen, R., Nyska, A. (2002). Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology* ;(30): 620-50.

Kothe, H.(2007). 1000 plantes aromatiques et médicinales. Ed:Terre édition : 7-13.

Kulicic, T., Radonic, A., Katalinic, V., Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidant activity of oregano essential oil. *Journal of Food Chemistry* ; (85): 633-40.

Kuster, R., Arnold, N., Wessjohann, L.(2009). Anti-fungal flavonoids from *tibonchinagrandidifolia*-*Biochem. System.Ecol* ; 37(1) :63-5

ℒ

Labieniec M., Gabryelak T., Falcioni G. (2003). Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*. *Mutation Research* ; 539(1) :19-28.0

Laurence, V. (1996). Structures et propriétés spectroscopiques de la flavone, de la 3 hydroxy- et de la 5 hydroxy-flavone : Etude des liaisons hydrogène intra- et inter-moléculaires. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'université de Lille : 5

Lariushin, B. (2014). Apaceae family, vol 2, edition Amazon: 18-25

Lefahal, M. (2014). Etude phytochimique, biologique et activité anticorrosion de trois plantes médicinales Algériennes appartenant aux familles Plumbaginaceae, Tamaricaceae et Apiaceae. Thèse doctorat. Université Constantine 1 :164. .

Lefahal, M. (2014). Etude phytochimique, biologique et activité anticorrosion de trois plantes médicinales Algériennes appartenant aux familles Plumbaginaceae, Tamaricaceae et Apiaceae. These doctorat. Université constantine 1 :102- 07

Lehucher-Michel, M., Lesgards, J., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., Prost, M. (2001). Stress oxydant et pathologies humaines. La Presse médicale ;(30): 1076-81

Lin, J-K., Weng, M-S. (2006). Flavonoids as Nutraceuticals. The science of flavonoids 213-38.

Liao, C., Lai, C., Hsu, M., Chu, F., Wu, M., Huang, Y., Hsueh, P.(2010).Antimicrobial susceptibility of Neisseria gonorrhoeae isolates determined by the agar dilution, disk diffusion and Etest methods: comparison of results using GC agar and chocolate agar. Int. J. Antimicrob. Agents; 35 (5): 457-60.

Lourdes Reis Giada, M.(2013). Food phenolic compounds : Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power PAGE

Lu, F., Foo, L. (2001). Antioxidant activity of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). Journal of Food Chemistry; (75): 197-202

M

Macheix, J., Fleuriet, A., Jay- Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques utilisés par l'homme et leur importance économique: les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolite secondaire d'importance économique. Ed. Presses polytechniques universitaires romandes :185

Macheix, J., Fleuriet, A. Sarni- Machado, P.(2006). Composés phénoliques dans la plante : Structure, biosynthèse, et rôles. Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Tec &Doc Lavoisier: 1-28 .

Mandal, A.(2019).Systèmes antioxydants d'enzymes

Marjorie, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *ClinMicrobiol Rev* 12(4): 564-82

Meshkatalasadat, M., Zarei, S.(2011). Determination of volatile components of *Bunium Luristanicum* rech .Fusing MAHD and HD extraction techniques and antioxydative activity of methanolic extract- a green chemistry aproach Digest. *Journal of Nanomaterials and Biostructures*; 6(2):515-21.

Mizushima, Y., Kobayashi, M. (1968).Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with same biologically active proteins.*Journal of Pharmacy and Pharmacology*; 20 (1):169-73.

Molyneux, P.(2004).The use of the stable free radical diphenyl picryl hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J. Sci. Technol*; 26(2).

Mouas Y., Benrebiha.,Chaouia C.(2017). Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentiel et de l'extrait méthanolique du romarinromsmarinus officinalis L; 7(1): 363-70

N

Ngo Nlend, M., Nyangono, C., Fokunang, C., Ngondi, J., Oben, J., Ngameni, B., Tembe-Fokunang, E., Awoussong, K., Ngadjui, B.(2012).Phytochmchemical screening, evaluation of in-vitro antioxydant activities and acute toxicity effect of organic extracts of *dorsteniamanni* (moraceae). *Health* ;12 (3)

Nowitz, T., Bottet, J. (2000). *Encyclopédie des plantes médicinales: identification, préparation, soins*. Edition Larousse

O

Okerulu. I., Aina. J. (2001). The Phytochemical analysis and antibacterial screening of extracts of *Tetracarpium Conophorum*. *Journal of Chemistry Society of Nigeria*; 26(1): 53-5.

Oloyede, O. (2005). Chemical profile of unripe pulp of *Caricapapaya*. Pakistan. *Journal of Nutrition*;4(6): 379-81.

P

Peronny ; S. (2005). La perception gustative et la consommation des tannins chez le Maki (Lemurcatta). Thèse de doctorat du Muséum national d'histoire naturelle .Discipline Eco-Ethologie. :151

Pimenov, M., Leonov, M. (1993).The genera of the Umbelliferae. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey. UK.

Ponce,A., Del Valle, C., Roua, S. (2003). Natural essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables. LWT- Food Science and Technologie; 37(2):199-204

Priymenko, J. (2005). Intérêts de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse pour obtenir le grade de Docteur vétérinaire :14

Pryor,W. (2000). Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials, Free Rad. Biol. Med ; (28): 1-141.

Q

Quezel, P., Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algerie et des regionsdeseristiques méridionales. Centre National des Recherches Scientifiques. Paris.

R

Raymond, V., Barebehenn, A.,Peter, C. (2011). Tannins in plant- herbivoren interactions. Phytochimesty ;72(19): 1551-65

Rehman-Jamil, U., Ahmad, M., Saeed, M., Younas, M. (1991). Antioxydative activity of essential oils of some species of Umbelliferae family of Pakistan: Part –I. *Journal of Chemistry Society of Pakistan*; 13(1): 55-57.

Reynaud, J. (2002). La flore du pharmacien. Ed.TEC et DOC, Paris : 89-94

Rolland, y. (2004). Actualités des lipides en cosmétique ; Antioxydants naturels végétaux. OCL ; (6) :419-24.

Rosine, C., Momo, D. (2009). Évaluation de l'activité anti dermatophytique des extraits auméthanol et fractions d'Acalyphammahirtum (melastomatacees). Université de Dschang– Master en biochimie clinique et pharmacologie.

S

Sabitha, K., Vikram ,G., Pragna, R.,Ramana K.(2015).Biomedical Significance of Terpenes. An Insight Biomedicine and Biotechnology ;3 (1) :8-10

Sanago, R. (2006). Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université Bamako(Mali): 53

Schlienger, J.(2018). Stress oxydant et alimentation manuel nutrition pour les patient diabétiques :115 -7

Serge K. (2012). Les plantes de la famille des Apiacées dans les troubles digestifs. Université de Joseph Fourier : 42-71

Shahsavari, N., Barzegar, M., Sahari, M., Naghdibadi, H. (2008). Antioxidant activity and chemical characterization of essential oil of *Bunium persicum*. *Journal of Plant Foods and Human Nutrition*; (63):183–8.

Stompor, M., Podgórski, R., Kubrak, T. (2017). Combined effect of favonoid compounds and cytostatics in cancer treatment. *Eur J ClinExp Med*;15 (2):157–64.

Surveswaran, S., Cai, Y., Corke, H., Sun, M. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Journal of Food Chemistry*; (102): 938-53

T

Talbi1, A., Boumaza, K., El-mostafa, J., Talbi, A., Hilali.(2015). Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L. *JMSE* ; 6(4) :1111-7.

Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and Antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Journal of Food. Chemistry*; (90): 330-40

Turcati, L. (2014). Les plantes en familles; Guide pour reconnaître les 10 familles les plus communes d'île de France, éd. Natureparif Agence Régionale pour la Nature et la Biodiversité en Île-de-France Paris : 43-8

V

Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M.(2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxydative stress-induced cancer. *Chem BiolInteract* ;(160) :1-40

Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C., Telser, J.(2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* ; (37) :256-66.

Veličković, A., Ristić S., Veličković D., Ilić S., Mitić, N. (2003). *Serb. Chem. Soc.* Vol ;68 (6) : 435-45

Virot, S.(2004). Les petites protéines de stress et leur rôle dans la mort cellulaire. Etude de leur fonction chaperon à travers l'exemple de la mutation R1 β 0G de l' α -cristalline. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard-Lyon 1: 37-9

W

Williams, L., O'Connar, A, Latore, L., Dennis, O., Ringer, S., Whittaker, J. (2008). The in vitro anti-denaturation effect induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumine is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug process West Indian. *Medicinal Journal* ; (57) :327-31

Wright, R., Lee, K., Hyacinth, H., Hibbert., J., Reid, M., Wheatley, A., Asemota, H. (2017). An Investigation of the Antioxidant Capacity in Extracts from *Moringa oleifera* Plants Grown in Jamaica; 6(4):48

Wojdylo, A., Oszmianski, J., Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds. *Journal of Food Chemistry*; (105): 940-9

X

Xavier, L.(2009). Stress oxydant et antioxydants ? oxidative stress And antioxidants ? *.Cahiers de Nutrition et Diététique* : 219-24.

Y

Yadav, R., Agarwala, M. (2011). Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of Phytology*; 3(12):10-14.

Les Annexes

Annexe n°1 : Réactifs de caractérisation

- **Bouchardate** : 2g de l'iode bisubliné (I₂) +2 g de KI ajusté a100de l'eau distillée
- **Tampon phosphate** : On dissout 2g dechlorure de sodium (Na Cl), 0,05g de chlorure depotassium (K Cl), 0,36 g d'hydrogénophosphate disodique (Na₂HPO₄), 0,06 g dedihydrogénophosphate de potassium(KH₂PO₄) dans 200 ml d'eau distillée. Le pH a étéajusté à 6,3 en utilisant de l'HCl(1 N) et mélange le volume à 100 ml avec l'eau distillée.
- **Liqueur de Fehling**
 - **Solution A** : 35 g CuSO₄+ 500 ml Eau distillée + 5 ml H₂SO₄. Laisser refroidir et compléter à unlitre avec l'eau distillée.
 - **Solution B** : 150 g Sel de Seignette + 500 ml Eau distillée.Refroiridir et ajouter 300 ml delessive non carbonaté et compléter à un litre avec l'eau distillée.

Annexe n°2 :

Concentration des extraits : 2mg/ml

- **Préparation des extraits**
 - **Préparation d'extrait éthanolique**



Figure 32: préparation de l'extrait éthanolique (A- Macération 24h ; B- Filtration ; C- Evaporation au Rotavapeur (45°C) ; D- extrait éthanolique).

- Préparation d'extrait aqueux par décoction



Figure 33 : préparation de l'extrait aqueux par décoction (A- 30g de poudre ; B- filtration , C- ébullition ; D- extrait décocté).

- Préparation d'extrait aqueux par infusion



Figure 34: préparation de l'extrait aqueux par infusion (A- 30g de poudre dans l'eau bouillon; B- filtration , C- l'extrait dans l'étuve ; D- extrait infusé).

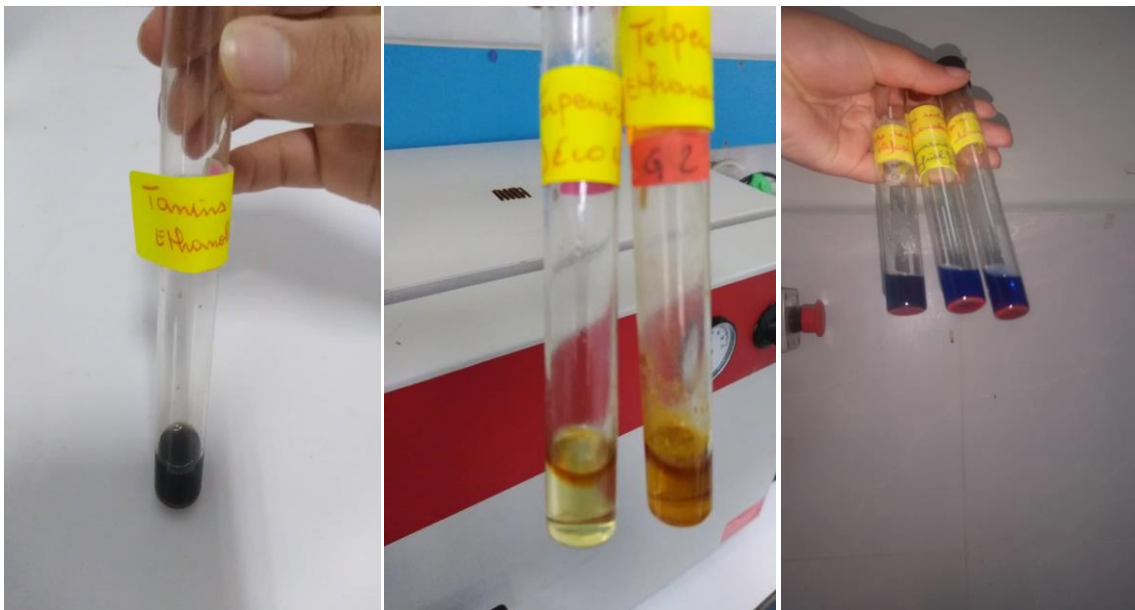
Annexe n°3 : Screening phytochimique



a- Test des anthocycne

b- Test des saponine

c- Test des amidon



d- Test des tanins

e- Test des terpenoides

f- Test des sucres réducteurs

Annexe n°4 : Les courbes d'étalonnages

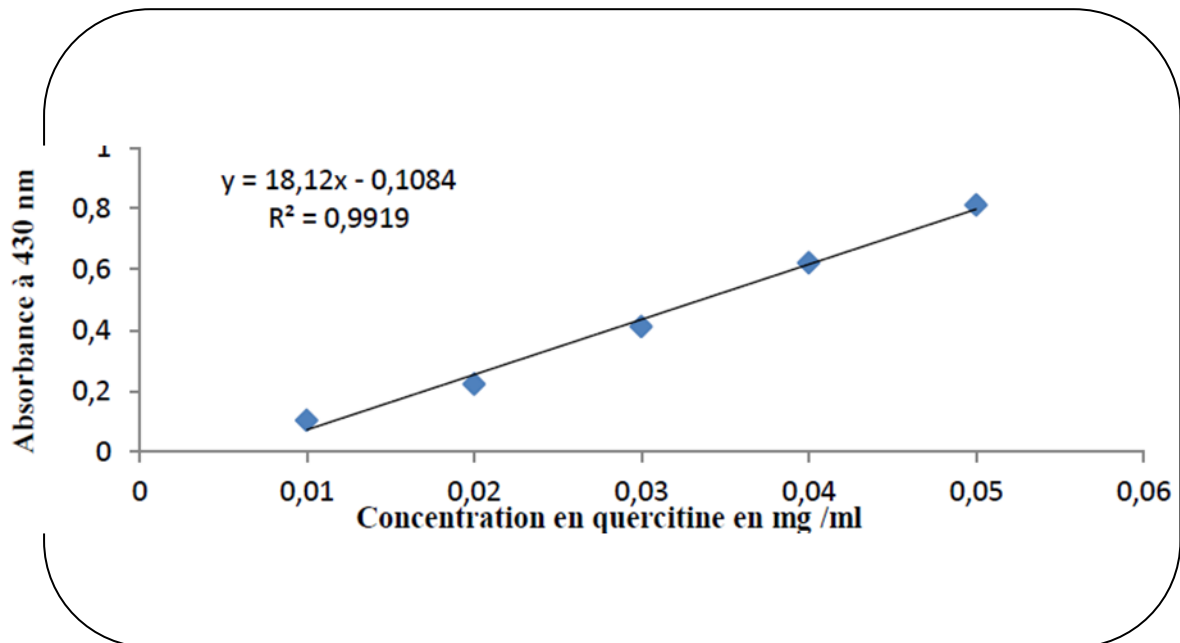


Figure 35: Droite d'étalonnage de la quercétine

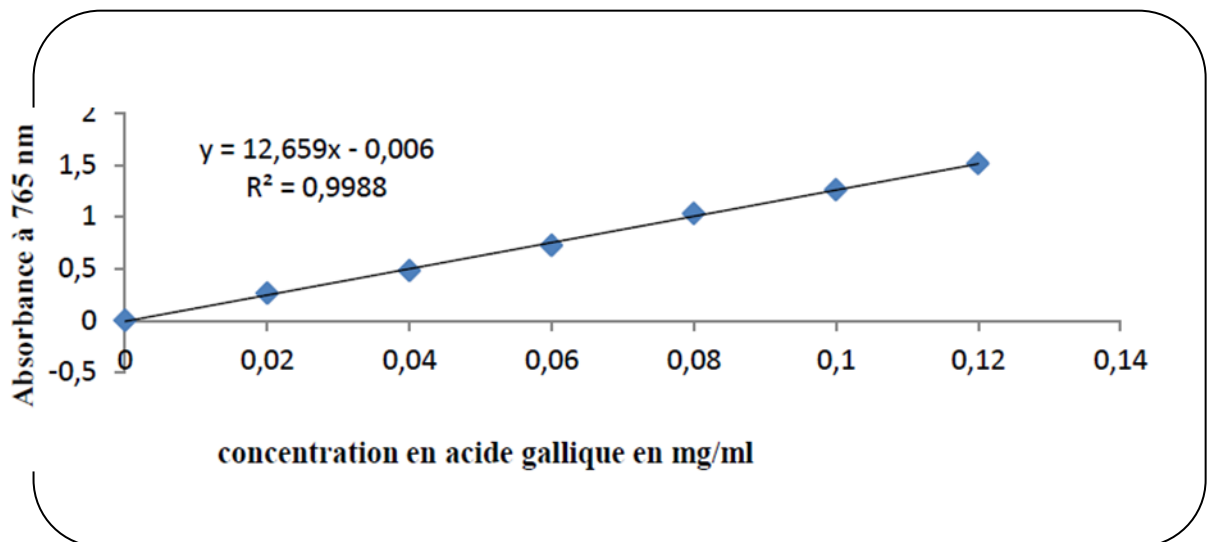


Figure 36: Droite d'étalonnage de l'acide gallique

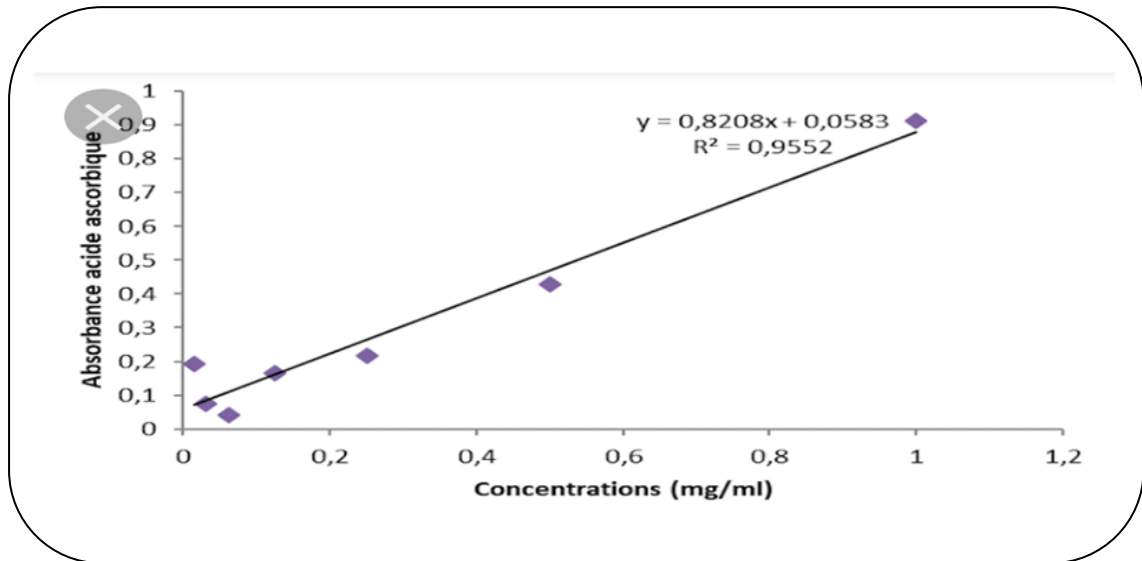


Figure 37: Droite d'étalonnage de l'acide ascorbique