



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة الشاذلي بن جديد - الطارف

Université Chadli Bendjedid – El Tarf

كلية العلوم والتكنولوجيا

Faculté des Sciences et de la Technologie

قسم الكيمياء

Département de Chimie

## Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la matière

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie Analytique

### Thème

**Etude phytochimique et évaluation de l'activité  
anti-oxydante de *Calendula suffruticosa***

Présenté par :

M<sup>lle</sup> BOUTELDJIA Fadhila

Devant le Jury :

<b>TOUDERT Nadia</b>	<b>MCB</b>	Univ Chadli Bendjedid El Tarf	Rapporteur
<b>MOKRANI Karima</b>	<b>MAA</b>	Univ Chadli Bendjedid El Tarf	Présidente
<b>BELAID Souraya</b>	<b>MAA</b>	Univ Chadli Bendjedid El Tarf	Examinatrice

Année Universitaire 2019-2020

## Remerciements

Je remercie Dieu qui m'a donné la foi et la volonté d'étudier et m'a orienté dans le droit sentier. Je remercie Dieu qui m'a aidé à élaborer ce modeste travail.

*Ce travail a été réalisé au Laboratoire Synthèse et Biocatalyse Organique (LSBO), Université BADJI-Mokhtar Annaba, sous la direction de madame TOUDERT Nadia, maître de conférences à l'université Chadli BENDJEDID*

*El Tarf*

*Je tiens à lui exprimer mon profond respect pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant de diriger ce travail avec attention et fermeté.*

*Merci pour votre compréhension.*

*Que les membres du jury : madame MOKRANI Karima et madame BELAID Souraya, soient remerciés à l'avance et je les prie de croire à ma très haute considération.*

*Je tiens à remercier le professeur DJILANI SALAH EDDINE et Monsieur SAMAI ZAKARIA pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apporté tout au long de ce travail.*

*Je remercie monsieur le professeur DJEROUROU ABDELHAFID pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et aussi toute l'équipe pharmacognosie du laboratoire (LSBO).*

*Mes chaleureuses remerciements à mes parents, qui m'ont supporté et encouragé tout au long de ce projet, leur support moral a été d'une grande importance durant ces années.*

*J'adresse mes plus sincères remerciements à tous les collègues de ma promotion et à tous ceux qui m'ont aidé.*

## Dédicace

- ✓ *A mes chers parents.*
- ✓ *A mes frères et ma sœur.*
- ✓ *A toute ma famille.*
- ✓ *A tous les amis(es)s.*
  
- ✓ *A tous ceux qui m'ont donné mains fortes pour réaliser ce  
travail.*
  
- ✓ *Louange à Dieu.*

## TABLE DES MATIERES

Titre	Page
Résumé	I
Abstract	II
ملخص	III
Index des tableaux	IV
Index des photos	V
Index des figures	VI
Abréviations	VII
Introduction	01

### PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

#### CHAPITRE I : Les composés phénoliques

1. Généralités	04
2. Classe des polyphénols	05
Flavonoïdes	07
Anthocyanosides	09
Tannins	10
Coumarines	11
Quinones	11
Stilbène	12
Lignanes	12
3. Propriétés biologiques des polyphénols	12

#### CHAPITRE II : Présentation de la plante étudiée

1. <i>Calendula suffruticosa</i>	16
2. Description botanique de <i>Calendula suffruticosa</i> .	16
3. Propriétés et usages thérapeutiques	17

#### CHAPITRE III : Radicaux libres et pouvoir antioxydant

1. Généralités	19
2. Différents types des radicaux libres	19
3. Origine de production des ERO	19
4. Dommages oxydatifs des radicaux libres	20
5. Moyens de défense contre les radicaux libres	20
6. Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes <i>in vitro</i>	21

## **PARIE EXPERIMENTALE**

### **CHAPITRE I : Extraction et teneurs en composés phénoliques**

1. Introduction	24
2. Matériel végétal	24
2.1 Récolte	24
2.2. Traitement des échantillons	25
3. Matériels	25
4. Matières	25
5 Screening phytochimique	25
6. Dosage des composés phénoliques	29
6.1 Dosage des polyphénols totaux	29
6.2 Dosage des flavonoïdes	31
7. Résultats et discussion	32

### **CHAPITRE II : Evaluation du pouvoir antioxydant d'extrait des fleurs de la plante**

1. Test DPPH	35
2. Test ABTS	36
3. Résultats et discussion	37
Conclusion	40
Références Bibliographiques	42

## ملخص:

تعتبر المركبات المضادة للأكسدة موضوع الكثير من الاعمال والبحوث لأنها، بالإضافة إلى استخدامها كمواد حافظة للمواد

الغذائية عن طريق استبدال مضادات الأكسدة الاصطناعية، فهي تشارك في علاج العديد من الأمراض.

في سياق اكتشاف مضادات الأكسدة الجديدة من المصادر الطبيعية، نهتم في هذا العمل بدراسة المستخلص الإيثانولي

لأزهار نبات الكاليندولا السافروتيكوزا.

يتعلق الجزء الأول من هذه الدراسة باستخراج وتقدير إجمالي الفينولات والفلافونيدات بواسطة كاشف Folin-Ciocalcu

وبواسطة ثلاثي كلوريد الألومنيوم على التوالي.

الجزء الثاني مخصص لدراسة النشاط المضاد للأكسدة باستخدام تقنيتين: اختبار ABTS واختبار DPPH.

أظهرت النتائج المتحصل عليها ثراء زهور النبات بمادة البوليفينول، والتي يساوي محتواها 477.555 مجم EAG / جم من

المادة الجافة. محتوى الفلافونويد المعبر عنه كمكافئ كاتشين هو حوالي 147 مجم / جم من المادة الجافة.

بينت دراسة النشاط المضاد للأكسدة أن مستخلص النبات المدروس يمتلك قدرة مضادة للأكسدة جد قوية وذلك باستخدام

اختبار ABTS واختبار DPPH ( 353 و 317 مجم مكافئ من فيتامين ج لكل 100 جرام من المادة الجافة على التوالي).

**الكلمات المفتاحية:** نباتات طبية-بوليفينول-الفلافونويد-أنشطة مضادات الأكسدة- DPPH - ABTS.

## **Abstract**

Antioxidant compounds are the subject of numerous studies because, in addition to their use as preservatives in foodstuffs by replacing synthetic antioxidants, they are involved in the treatment of many diseases.

In the context of the discovery of new antioxidants from natural sources, we are interested in this work in the study of phenolic compounds and the evaluation of the antioxidant properties of the ethanolic extract of the flowers of the plant *Calendula suffruticosa*.

The first part of this study concerns the extraction and quantification of total phenols, flavonoids by the Folin-Ciocalciu reagent and by aluminium trichloride respectively.

The second part is devoted to studying the antioxidant activity using two techniques: the ABTS test and the DPPH test.

The results obtained show the richness of the flowers of the plant in polyphenols, the content of which is equal to 477,555 mg EAG / g of dry matter. The content of flavonoids expressed as catechin equivalent is of the order of 147 mg / g DM.

The study of the antioxidant activity showed that the extract of the studied plant has a very strong antioxidant power, using the ABTS test and the DPPH test (353 and 317 mg vitamin C equivalent per 100 g of dry matter respectively).

**Keywords:** Medicinal plants; Polyphenols; Flavonoids; antioxidant activity; DPPH<sup>•</sup>; ABTS<sup>•+</sup>

## Résumé

Les composés antioxydants font l'objet de nombreux travaux car, en plus de leur utilisation comme des conservateurs dans les denrées alimentaires en remplaçant les antioxydants de synthèse, ils interviennent dans le traitement de nombreuses maladies.

Dans le cadre de la découverte de nouveaux antioxydants à partir des sources naturelles, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude de l'extrait ethanologique des fleurs de la plante *Calendula suffruticosa*.

La première partie concerne l'extraction et la quantification des phénols totaux, des flavonoïdes par le réactif du Folin-Ciocalcu et par le trichlorure d'aluminium respectivement.

La deuxième partie est réservée à l'étude de l'activité antioxydante en utilisant deux techniques : le piégeage du radical DPPH et le piégeage du radical ABTS.

Les résultats obtenus montrent la richesse des fleurs de la plante en polyphénols dont la teneur égale à **477.555** mg EAG/ g de matière sèche. Les teneurs en flavonoïdes exprimée en équivalent de catéchine sont de l'ordre de **147** mg/ g MS.

L'étude de l'activité antioxydante a montré que l'extrait de la plante étudiée possède un très fort pouvoir antioxydant, en utilisant le test ABTS et le test DPPH (**353** et de **317** mg équivalent en vitamine C par 100 g de matière sèche respectivement).

**Mots clés :** Plantes médicinales ; Polyphénols ; Flavonoïdes ; Activités antioxydantes ; DPPH<sup>□</sup> ; ABTS.

## Abréviations

**ABTS:** Acide 2, 2'-azinobis 3-ethylbenzo-triazoline-6 sulphonate

**ADN :** Acide désoxiribonucléique.

**ClO<sup>-</sup> :** Hypochlorite.

**DMPD :** N, N- dimethyl-phenylenediamine

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

**EAA :** équivalent d'acide ascorbique

**EAG :** équivalent d'acide gallique

**EC :** équivalent de catéchine

**ERO :** Espèces Réactives de l'Oxygène

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

**HOCl:** Acide hypochloreux.

**MS :** Matière sèche.

**NO<sup>•</sup> :** Monoxyde d'azote.

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

**O<sub>2</sub> :** Oxygène singulet.

**OH :** Groupe hydroxyle

**ONOOH :** Nitroperoxyde.

**ROO<sup>•</sup> :** Radical peroxyde.

**ROOH :** Peroxydes organiques.

**TEAC :** Capacité antioxydante équivalente de Trolox (*trolox-equivalent antioxidant capacity*).

**UV :** Ultraviolet.

**XO :** Xanthine oxydase.

## Liste des tableaux

<b><u>Tableau</u></b>	<b><u>Titre</u></b>	<b><u>Page</u></b>
<b>Tableau 1 :</b>	Structure des squelettes des polyphénols	06
<b>Tableau 2 :</b>	Screening phytochimique des fleurs de calendula	28
<b>Tableau 3 :</b>	Absorbances de l'acide gallique et de la catéchine en fonction de leurs concentrations	32
<b>Tableau 4 :</b>	Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux de l'extrait Ethanolique des fleurs	33
<b>Tableau 5 :</b>	Résultats de l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique des fleurs	38

## Liste des photos

<u>Photo</u>	<u>Titre</u>	<u>Page</u>
<b>Photo 1 :</b>	<i>Calendula suffruticosa</i>	17

## Liste des figures

<u>Figure</u>	<u>Titre</u>	<u>Page</u>
<b>Figure 1</b>	Structure du 2-phényle chromane	07
<b>Figure 2</b>	Structure générale des flavonoïdes	07
<b>Figure 3</b>	Structures des squelettes de base des flavonoïdes	09
<b>Figure 4</b>	Structure des anthocyanosides	10
<b>Figure 5</b>	Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B)	11
<b>Figure 6</b>	Mécanisme de réduction du radical libre DPPH par un antioxydant	22
<b>Figure 7</b>	Formation et piégeage du radical ABTS+• par un antioxydant donneur de H <sup>+</sup>	23
<b>Figure 8</b>	La structure de l'acide gallique (Acide 3, 4,5-trihydroxybenzouique)	30
<b>Figure 9</b>	Structure de la (+)-catéchine	31
<b>Figure 10</b>	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux	32
<b>Figure 11</b>	Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes	33
<b>Figure 12</b>	Teneur en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes totaux des fleurs	34
<b>Figure 13</b>	Structure chimique du DPPH	35
<b>Figure 14</b>	Courbe d'étalonnage de la vitamine C en utilisant le test DPPH	37
<b>Figure 15</b>	Courbe d'étalonnage de la vitamine C en utilisant le test ABTS	38
<b>Figure 16</b>	Capacité antioxydante exprimée en vitamine C (mg VCE / 100g de matière sèche) Selon les tests d'ABTS et DPPH	39

# *Introduction*

Depuis la nuit des temps, les hommes se sont soignés avec les plantes qu'ils avaient à leur disposition contre les maladies bénignes, rhume ou toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria. Ni le hasard, ni la religion et ni la superstition qui a guidé la médecine traditionnelle à employer une plante plutôt qu'une autre. Certainement, c'est l'expérience où les gens apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes (**Iserin, 2001**).

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes (**Iserin, 2001**). Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours aux propriétés curatives des plantes et que les traitements à base de ces dernières reviennent au premier lieu car l'efficacité des médicaments décroît vue leurs effets secondaires sur la santé publique.

Actuellement, la société scientifique, biologiste et chimiste, met en évidence le rôle tragique du processus oxydatif incontrôlable induit par les espèces réactives oxygénées (ERO). Ces oxydants sont à l'origine directe de différents états pathologiques tels que le vieillissement et le cancer et indirecte sur la peroxydation des lipides des denrées alimentaires. Quel que soit le cas, le risque est aggravé avec l'accumulation de ces molécules dans l'organisme en aboutissant à une chaîne réactionnelle radicalaire qui dégrade les molécules vitales biologiques à savoir l'ADN, les lipides, les protéines et les glucides. En appuyant sur cette vision, un renouveau de la phytothérapie vers cette vague verte qui produit une foule des antioxydants à fin de contrer et piéger ces oxydants.

En effet, les antioxydants naturels font l'objet de nombreuses recherches et une nouvelle haleine vers l'exploitation des métabolites secondaires généralement et les polyphénols particulièrement tant dans la santé et vis-à-vis des maladies pernicieuses (cancer) que dans l'industrie agro-alimentaire. Ces composés qui sont représentés par la famille des flavonoïdes (flavonoles ; isoflavonoles ; flavones ; isoflavones ; flavanes ; isoflavanes ; flavanols ; isoflavanols ; flavanones ; isoflavanones ; auronnes et anthocyanidines), sont largement recherchés pour leurs propriétés biologiques :

antioxydantes, anti-inflammatoires, antiallergiques et anti-carcinogènes. Notant que l'efficacité puissante de ces substances à stopper les réactions radicalaires en neutralisant les radicaux libres est due principalement à leurs structures phénoliques avec la présence des groupements hydroxyles.

Pour cela, les progrès dans le domaine des antioxydants sont accentués d'où le nombre de plantes médicinales disponibles commercialement est de l'ordre de 1800 espèces aux Etats-Unis entre 1940 et 2002, 40 % des médicaments anticancéreux étaient des produits naturels et leurs dérivés, par contre seulement 8 % ont été synthétiques et même imités de ces produits (**Newman *et al.*, 2003**).

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche des antioxydants naturels en évaluant les propriétés antioxydantes de l'extrait d'une plante de l'est Algérien à savoir *Calendula suffruticosa*.

Nous avons commencé notre travail par une étude bibliographique des composés phénoliques, leur biosynthèse et quelques activités biologiques attribués à différentes familles de ces composés.

Dans le deuxième chapitre, nous décrivons les différentes espèces végétales (les caractères botaniques et la systématique), l'intérêt biologique et quelques travaux antérieurs réalisés sur ces plantes.

Le troisième chapitre portera sur l'étude des radicaux libres, ceci est suivi par un rappel de quelques méthodes les plus utilisées pour évaluer le pouvoir antioxydant *in vitro* (piégeage du radical DPPH et piégeage du radical ABTS).

Dans la deuxième partie, nous avons envisagé la partie expérimentale qui se déroule en deux axes :

Dans le premier axe, nous avons réalisé l'extraction et la détermination des teneurs en composés phénoliques (phénols totaux et flavonoïdes totaux). Dans le deuxième axe, nous nous sommes intéressés à l'évaluation du pouvoir antioxydant de l'extrait éthanolique des fleurs de la plante par deux tests différents.

Enfin, dans la troisième partie, nous avons rapporté les résultats obtenus entre autre les rendements, les teneurs des composés phénoliques et l'étude de l'activité antioxydante de l'extrait des fleurs de la plante.

Nous terminerons notre travail par une conclusion.

*Partie*  
*bibliographique*

*- CHAPITRE I -  
Les composés  
phénoliques*

## **1. Généralités :**

Les polyphénols ou composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement (**Bruneton, 1993**). A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolés et identifiés. Selon leurs caractéristiques structurales, ils se répartissent en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (**Hennebelle et al., 2004**).

Ils sont divisés en plusieurs catégories : anthocyanes, coumarines, lignanes, flavonoïdes, tannins, quinones, acides phénols, xanthones et autres phloroglucinols où les flavonoïdes représentent le groupe le plus commun et largement distribué . La grande diversité structurale des composés phénoliques rend difficile une présentation globale des méthodes qui permettent leur extraction et leur isolement, des processus mis en jeu au cours de leur biosynthèse, de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques (**Bruneton, 1993**).

Les polyphénols sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Les principales sources alimentaires sont les fruits et légumes, les boissons ( thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs. Les fruits et légumes contribuent environ à la moitié de notre apport en polyphénols, les boissons telles que jus de fruits et surtout café et thé apportant le reste.

Les recherches des quinze dernières années ont démontré que les composés phénoliques ne sont nullement des produits inertes du métabolisme. Ils subissent dans les tissus végétaux d'importantes variations quantitatives et qualitatives et interviennent dans des processus vitaux les plus divers. Le mode de leur action et sa signification physiologique ne sont pas encore toujours claires. Un rôle important est attribué aux phénols dans la résistance des plantes aux maladies, comme c'est le cas de la résistance du cotonnier à la maladie de flétrissement ou flétrissures et la verticilliose. Le

phénomène d'accumulation des substances phénoliques dans les tissus végétaux infectés ou dans les zones proximales est également observé à la suite de blessures causées par des facteurs mécaniques et dans le cas de carence en certains éléments minéraux comme l'azote et le soufre (**Loche, 1966**).

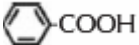
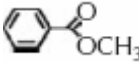
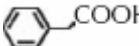
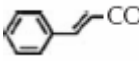
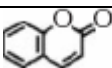
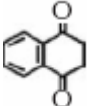
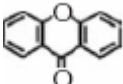
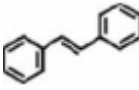
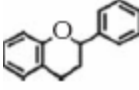
Des travaux plus anciens (**Nitsch, 1961; Alibert *et al.*, 1977**) ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation organogène, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation. Les polyphénols sont aussi connus pour leurs effets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

A partir des années quatre-vingt, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt des polyphénols en particulier les flavonoïdes dont les propriétés antioxydantes sont très marquées.

## **2. Classe Des Polyphénols :**

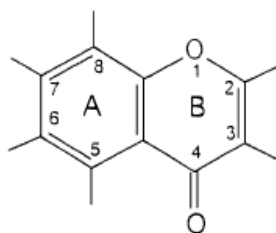
Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones (**Tableau 1**). Ces molécules sont généralement trouvés conjuguées aux sucres et des acides organiques.

Tableau 1 : Structure des squelettes des polyphénols (Crozier *et al.*, 2006).

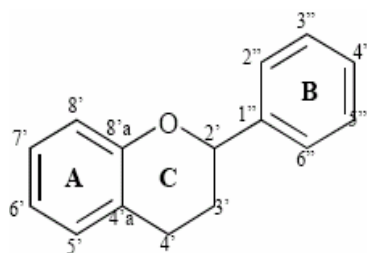
Nombre de carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Acides phénols	Acide gallique	
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acétophénone	Gallacetophénone	
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acide phénylacétique	Acide hydroxyphényl-acétique	
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Acides hydroxycinamiques	Acide coumarique	
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Coumarines	Esculetine	
10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naphthoquinones	Juglone	
13	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xanthones	Mangiférine	
14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbènes	Resveratrol	
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoïdes	Naringénine	

- **Flavonoïdes :**

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont omniprésentes dans les boissons, les fruits, les légumes, les graines, et d'autres parties de la plante (Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006). Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques, dans la régulation des gènes et dans le métabolisme de croissance (Havsteen, 2002). Actuellement, environ 4000 composés flavoniques sont connus (Edenharder et Grünhage, 2003) et ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> de type phényl-2-benzopyrane ce qui est synonyme avec la structure 2-phényle chromane (Yao *et al.*, 2004) (Figures 1 et 2).



**Figure 1 :** Structure du 2-phényle chromane

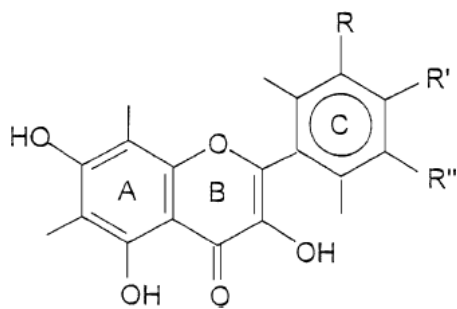


**Figure 2 :** Structure générale des flavonoïdes

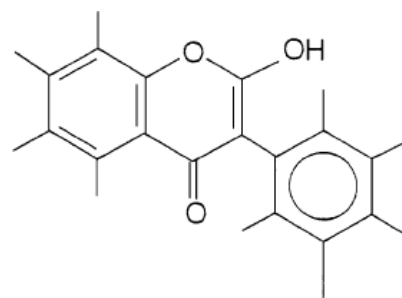
La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, de degré d'hydroxylation et de méthylation, de degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C c'est-à-dire la présence : de double liaison C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>, du groupe 3-O et la fonction 4-oxo (Yao *et al.*, 2004 ; Tsimogiannins et Oreopoulou,

2006).

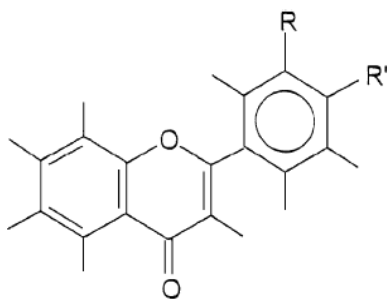
En se basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines ; flavonoles ; isoflavonoles ; flavones ; isoflavones ; flavanes ; isoflavanes ; flavanols ; isoflavanols ; flavanones ; isoflavanones ; aurones (**Havsteen, 2002 ; Edenharder et Grünhage, 2003**) (**Figure 4**)



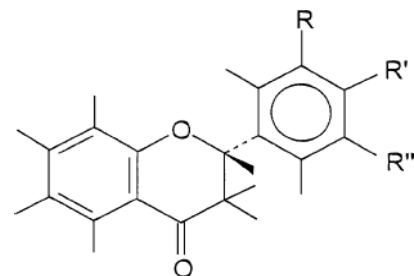
flavonoles



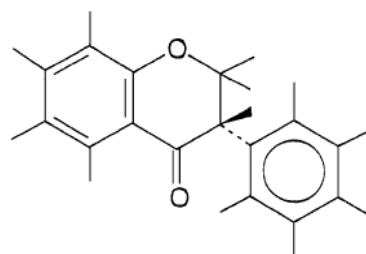
Isoflavonoles



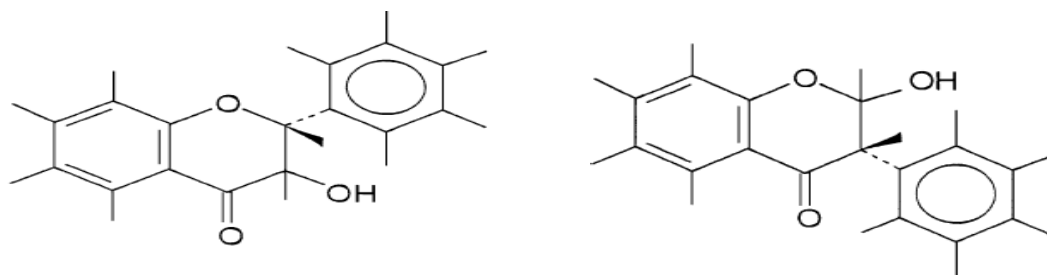
Flavones



Flavonones

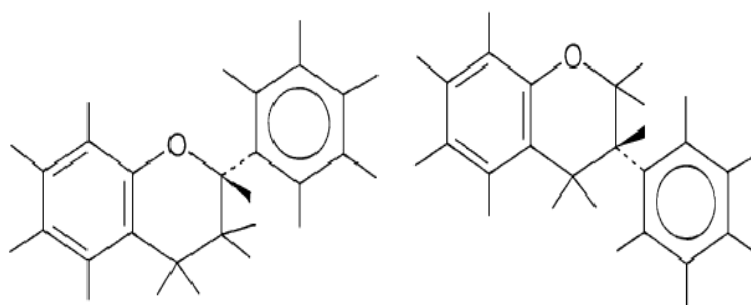


flavanols



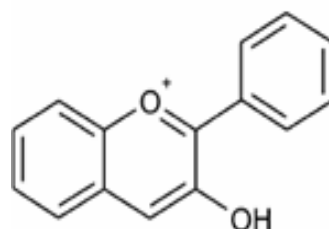
Isoflavanones

Isoflavones



Isoflavanes

Flavanes



Anthocyanidines

**Figure 3 :** Structures des squelettes de base des flavonoïdes (**Havsteen, 2002**)

- **Anthocyanosides :**

Ce sont des pigments vacuolaires rouges, roses, mauves, pourpres, bleus ou violets de la plupart des fleurs et des fruits (**Bruneton, 1993**). Ils sont caractérisés par l'engagement de l'hydroxyle en position 3 dans une liaison hétérosidique (les anthocyanosides). Leurs génines (les anthocyanidols) sont des dérivés du cation 2-phényl-benzopyrylium plus communément appelé cation flavylium. Ces pigments

représentent des signaux visuels qui attirent les animaux pollinisateurs (insectes, oiseaux) (Brouillard et al., 1997 in Bahorum, 1997).

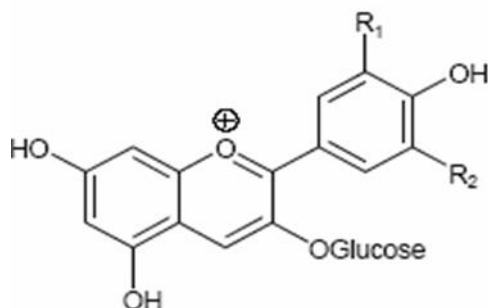
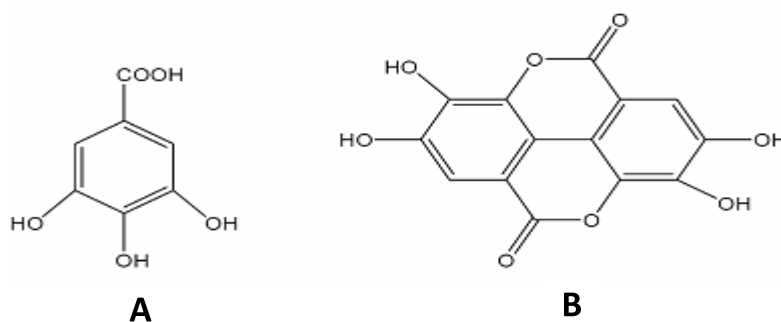


Figure 4 : Structure des anthocyanosides

- **Tannins :**

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise qui présente à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (Haslam, 1996 ; Cowan, 1999). Les tannins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toutes les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (Scalbert, 1991). On distingue deux groupes de tannins différents par leur structure et par leur origine biogénétique :

**Tannins hydrolysables** qui sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins soit l'acide ellagique dans le cas des tannins classiquement dénommés ellagitannins (Figure 5) (Bruneton, 1993 ; Cowan, 1999).



**Figure 5 :** Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B)

**Tannins condensés ou tannins catechiques ou proanthocyanidols** qui se différencient fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes végétaux, Gymnospermes et Fougères (**Bruneton, 1999**).

- **Coumarines :**

Les coumarines qui sont aussi les dérivés de C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, appartiennent au groupe des composés connus par des benzo- $\alpha$ -pyrone (**O'Kennedy et Thornes, 1997**) et toutes sont substituées en 7 par un hydroxyle. Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combiné avec des sucres. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique du foin (**Cowan, 1999**).

- **Quinones :**

Ce sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques avec deux substitutions cétoniques. Elles sont caractérisées par un motif 1,4-dicéto cyclohexa-2,5-diéniq (para-quinones) ou, éventuellement, par un motif 1,2-dicéto cyclohexa-3,5-diéniq (ortho-quinones) (**Bruneton, 1993**). Elles sont ubiquitaires dans la nature, principalement dans le règne végétal et sont fortement réactives (**Cowan, 1999**).

- **Stilbène :**

Les membres de cette famille possèdent la structure C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> comme les flavonoïdes, ce sont des phytoalexines, composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes.

- **Lignanes :**

Ce sont des composés dont la formation implique la condensation d'unités phénylpropaniques (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>). Leur distribution botanique est large, plusieurs centaines de composés ont été isolés dans environ soixante-dix familles.

### **3. Propriétés biologiques des polyphénols :**

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs divers propriétés physiologiques comme les activités antiallergique, anti-atherogénique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire. Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes (Nijveldt *et al.*, 2001).

Les effets bénéfiques **des polyphénols** intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire (Leong et Shui, 2002). D'après les études multiples attestant de l'impact positif de la consommation de polyphénols sur la santé et la prévention des maladies, les industriels commercialisent maintenant des aliments enrichis en polyphénols ou des suppléments alimentaires. De plus, leur activité antioxydante assure une meilleure conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidique. Dans l'industrie cosmétique, les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes dans la santé et la beauté de la peau. En phytothérapie, même si certaines indications sont communes à plusieurs classes (les propriétés vasculoprotectrices, sont

par exemple aussi bien attribuées aux flavonoïdes qu'aux anthocyanes, tanins et autres coumarines), chaque classe chimique semble être utilisée pour des bénéfices spécifiques (Hennebelle *et al.*, 2004).

En ce qui concerne **les flavonoïdes**, ces composés peuvent empêchés les dommages oxydatifs par différentes mécanismes d'actions : soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxyles et peroxydes ; soit par chélation des métaux (le fer et le cuivre) qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires ; soit l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres. Ils jouent un rôle très important dans le traitement du diabète (inhibant l'aldose réductase), de la goutte (inhibant la xanthine oxydase), des inflammations (inhibant la lipoxygénase, la phospholipase et la cyclooxygénase), des hépatites, des tumeurs, de l'hypertension (quercétine), des thromboses (flavonols), des allergies et des affections bactériennes et viraux (anti-HIV) (Anderson *et al.* 1996 ; Cowan, 1999 ; Yao *et al.*, 2004). Mais, on attribue également aux flavonoïdes des propriétés neurosédatives, antispasmodiques, diurétiques, anti-œstrogènes (isoflavones), contre la sénescence cérébrale et ses conséquences telles que l'altération de la mémoire et la confusion. D'autres part, les citroflavonoïdes (flavonoïdes provenant de divers *Citrus*) et la fragilité capillaire (insuffisance veino-lymphatique, crise hémorroïdaire) (Hennebelle *et al.* 2004).

**Les anthocyanes** sont également utilisés dans les troubles de la fragilité capillaire (vigne rouge, *Vitis vinifera* L.), mais aussi comme diurétiques, voire même antiseptiques urinaires. Leur plus grande spécificité reste cependant leur propriété d'améliorer la vision nocturne en facilitant la régénération du pourpre rétinien (myrtille, *Vaccinium myrtillus* L. ; cassis, *Ribes nigrum* L.) (Hennebelle *et al.*, 2004). Présente comme des couleurs brillant dans les fruits et les légumes, les anthocyanidines ont montré leur effet inhibiteur de la croissance des lignées cellulaires humaines (Zhang *et al.*, 2005).

**Les tanins** sont considérés comme des anti-nutriments grâce aux divers effets nuisibles à savoir la digestion réduite des aliments, la faible biodisponibilité des micronutriments et les dommages du foie. Ils sont dotés d'un certain pouvoir astringent, par lequel on explique leurs propriétés vasculoprotectrices, cicatrisantes et anti-

diarrhéiques (chêne, *Quercus* spp.). Les proanthocyanidines dimères de l'aubépine (*Crataegus* spp.) seraient de bons sédatifs cardiaques (**Hennebelle et al., 2004**). Concernant le pouvoir antioxydant des tannins, cette propriété est très remarquable due à leurs noyaux phénols et la présence des groupes di- ou trihydroxyles sur le cycle B et les groupes méta 5, 7 dihydroxyles sur le cycle A. Les tannins catéchiques du thé vert : gallate d'épicatéchine, gallate d'épigallocatechine et l'épicatéchine sont des puissants extracteurs des radicaux libres (**Rahman et al., 2006**), ils inhibent les ions  $\text{Cu}^{2+}$  qui catalysent l'oxydation des lipoprotéines dans les macrophages *in vitro*.

Les **coumarines** sont utilisées pour leurs propriétés vasculoprotectrices, neurosédatives, diurétiques, stomachiques et carminatives (**Hennebelle et al., 2004**). Ils ont la capacité de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes, et peroxydes. Ils préviennent également la peroxydation des lipides membranaires (**Anderson et al., 1996**).

Les **acides phénols et ces dérivés** sont considérés comme responsables de l'activité cholérétique de l'artichaut et les propriétés antipyrétiques et anti-inflammatoires des dérivés salicylés (**Hennebelle et al., 2004**). Les composés possédant les activités antioxydantes et antiradicalaires sont l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide chlorogénique (**Bossokpi, 2002**). Pour l'acide caféique, il se montre très efficace contre les virus, bactéries et champignons (**Cowan, 1999**). Alors, l'acide gallique a pour pouvoir de réduire la viabilité des cellules cancéreuse du poumon chez les souris et que la combinaison de cet acide avec les médicaments anticancéreux comme la cisplatine peut être un traitement efficace pour ce type de cancer (**Kawada et al., 2001 in Rangkadilok et al., 2007**). Il peut aussi prévenir les dommages oxydatifs d'ADN cellulaire à une faible concentration et exerce une forte activité antiproliférative tel que la quercétine sur les cellules humaines cancéreuses du colon et les cellules épithéliales du foie chez les rats normaux (**Lee et al., 2005**).

Certaines **quinones**, dérivant de l'anthraquinone, sont des laxatifs stimulants. Elles sont rencontrées dans la bourdaine (*Rhamnus frangula* L.), les sénés (*Cassia* spp.) et les aloès (*Aloe* spp.). D'autres activités antidépressives (hypericin), anti-protozoaires,

antivirales, antibactériennes, fongicides et antiallergiques ont été décrites et plusieurs molécules du groupe ont une toxicité non négligeable. (**Bruneton, 1993 ; Hennebelle et al., 2004.**

*- CHAPITRE II -  
Présentation de la  
plante étudiée*

1. **Calendula suffruticosa** (Photo 1) :

**Position systématique (QuezeletSanta, 1963 ; HAMEL.T,2015) :**

**Classe :** Equisetopsida

**Sous classe :** Magnoliidae

**Ordre :** Asterales

**Famille :** Asteraceae

**Genre :** Calendula

**Genre Espèce :** Calendula suffruticosa

**Synonymes :**

Calendula fulgida auct.

Calendula fulgida var. foliosa (Batt.) Qu.

Calendula suffruticosa var. trimorphocarpa Lanza.

Calendula madernsis DC

2. **Description botanique de *Calendula suffruticosa* Vahl subps.boissieri (lanza) :**

L'espèce *Calendula suffruticosa* Vahl subps est une plante vivace, herbacée visqueuse, appartenant à la famille des Asteraceae et atteignant environ 40 cm de hauteur ; la tige est droite. Elle est généralement boisée à une certaine distance au-dessus de la base, simple ou peu ramifié. Les feuilles sont de couleur vert pâle et lancéolées, légèrement ondulées et denté. Les fleurs sont unies en capitules excédant 2 cm de diamètre et jaune ou orange couleur, les fleurs périphériques sont liées et unies en deux les rangées, tandis que celles du centre sont tubulaires et dentées ; le fruit est un akène souvent courbé et équipé de pics.

Le nom de genre du «Calendula» remonte à la Moyen Âge, il vient du latin «Calendrier» : le calendriers étant dans le calendrier romain le premier jour du mois, probablement avec un sens analogue au calendrier, indicateur métrologique en raison de

sa longue période de floraison car les têtes s'ouvrent et se ferment avec l'apparence du soleil. (Couplan F., 2012). Alors que suffruticosa, dérivé du latin "frutex" signifie buisson qui apporte cette espèce ligneuse plus près des sous-arbustes. (Beniston N., 1984).



**Photo 1 :** *Calendula suffruticosa*.

### **3. Propriétés et usages thérapeutiques :**

Les espèces du genre *Calendula* occupent une place appréciable dans la médecine traditionnelle et pharmaceutique depuis l'antiquité. Elles attirent l'attention des chercheurs grâce à ces potentiels antioxydants et ces activités antimicrobienne, anti-inflammatoire, antipyrétique, antidiabétique, antiradicalaire et cytotoxique (Hamdan et Afifi, 2004 ; Topçu *et al.*, 2007; Benhammou *et al.*, 2007, Benhammou *et al.*, 2008). Elles sont employées dans le traitement d'eczéma, les infections de la gorge, la lithiase rénale, l'asthme et l'estomac.

**Travaux antérieurs :**

Comme toutes les espèces appartenant à la famille des Astéracée, les composés terpéniques sont doués de plusieurs propriétés biologiques et pharmacologiques telles que les activités cytotoxique, anti-tumorale, antimicrobienne et phytotoxique. Parmi ces substances, les cinq lactones sesquiterpéniques (isoinuviscolide, gaillardine, 1 beta-hydroxy-3beta-acetoxy-eudesme-4(15) ,11(13)-dien-12-8beta-olide, pulchelline-C et pulchelline- E) (**Gonzalez-Romero *et al.*, 2000**).

Une autre étude a montré la présence des 4 flavonoïdes aglycones : luteoline (5, 7,3',4'-hydroxyflavone), hispiduline (5, 7,4'-hydroxy-6-méthoxyflavone), nepetine (5, 7,3'- hydroxy-6-méthoxyflavone) et cirsimaritrine (5,4'-hydroxy-6,7-diméthoxyflavone) (**Reynaud et Lussignol, 1999**).

*- CHAPITRE III -  
Radicaux libres et  
pouvoir antioxydant*

## **1. Généralités :**

Nos cellules et tissus peuvent être soumis à une grande variété d'agression physiques (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant, dû à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé, la production de radicaux dérivés de l'oxygène.

## **2. Différents types des radicaux libres :**

Un radical libre est une espèce caractérisée par une instabilité et /ou un pouvoir oxydant fort, il se différencie par la présence d'un électron non apparié sur la couche électronique la plus externe.

Parmi toutes les espèces réactives oxygénées (ERO), on distingue un ensemble restreint de ces composés qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appelons les **radicaux primaires** à savoir : l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le radical hydroxyle ( $HO^{\bullet}$ ), le monoxyde d'azote ( $NO^{\bullet}$ ), le radical peroxyde ( $ROO^{\bullet}$ ) et le radical alkoxyde ( $RO^{\bullet}$ ).

Les autres radicaux libres, dits **radicaux secondaires** telles que l'oxygène singulet  $^1O_2$ , le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le nitroperoxyde ( $ONOOH$ ), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (**Favier, 2003**).

## **3. Origine de production des ERO :**

Les radicaux libres nocifs sont produits dans l'organisme au cours du métabolisme normal. Cette production augmente en rapport avec l'élévation de la consommation d'oxygène (**Gauche et Hauswirth, 2006**). Plusieurs mécanismes et systèmes responsables de la production de radicaux libres ont été identifiés jusqu'à présent, parmi eux nous citons :

- des fuites d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie (**Aurousseau, 2002**) ;
- des processus inflammatoires produits par les cellules phagocytaires activées.
- du système xanthine déshydrogénase/ oxydase activé lors d'ischémie-reperfusion (**Li et al., 2002 ; Valko et al., 2004 ; Valko et al., 2006**) ;
- d'exposition à des agressions de l'environnement, comme les agents infectieux, la pollution, les UV, la fumée de cigarette et le rayonnement (**Tamer, 2003**).

#### **4. Dommages oxydatives des radicaux libres :**

Les phénomènes radicalaires de base sont utiles au bon fonctionnement de l'organisme. L'altération des composants cellulaires et des structures tissulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement et dépasse la quantité d'antioxydants disponibles. La conséquence de ce déséquilibre va entraîner une agression appelée « stress oxydatif » (**Rahman, 2002**). Tous les tissus et tous leurs composants peuvent être touchés : lipides, protéines, glucides et ADN (**Aurousseau, 2002 ; Valko et al., 2006**). Toutes ces altérations augmentent le risque de plus de 30 processus de différentes maladies. Parmi les, nous citons, les maladie d'Alzheimer de Parkinson (**Bolton et al., 2000**), de Creutzfeldt Jacob et de méningo-céphalites (**Ali et al., 2008**), les maladies cardiovasculaires et déficience cardiaque (**Jha et al., 1995**), les œdèmes et vieillissement prématuré de la peau (**Georgetti et al., 2003**) et le cancer (**Ali et al., 2008**).

#### **5. Moyens de défense contre les radicaux libres :**

D'après **Halliwel (1994)**, un antioxydant est toute molécule endogène ou exogène présente en faible concentration qui est capable de prévenir, de retarder et de réduire l'ampleur de la destruction oxydante des biomolécules.

Les systèmes de lutte contre les ERO sont classés dans 3 catégories : la prévention à temps plein (la prévention passive), la détoxification active suite à une attaque oxydante et la détoxification passive.

- **Prévention à plein temps :**

Ce type est un système qui agit en permanence pour but de prévenir la surproduction de radicaux libres de l'oxygène en inactivant les molécules endogènes (Fe, Cu) ou exogènes (quinone) susceptibles de les générer. Par exemple, la liaison de la transferrine (protéine chélatrice) avec deux atomes de fer ferrique par molécule à pH physiologique rend ce métal incapable d'être impliqué dans les mécanismes d'oxydoréduction générateurs de radicaux libres.

#### **6. Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes *in vitro* :**

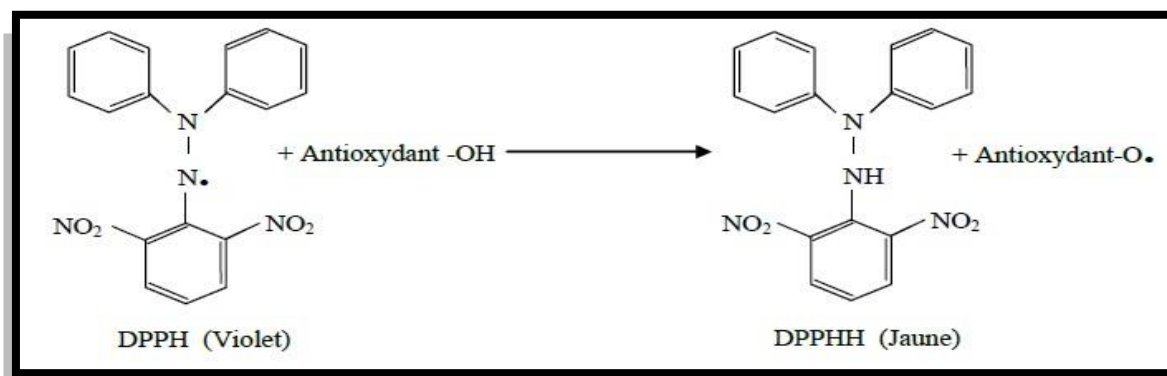
Plusieurs méthodes sont disponibles pour mesurer l'activité antioxydante des aliments et les systèmes biologiques (Ali *et al.*, 2008 ; Scherer et Godoy, 2009). Elles peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes : soit par le transfert d'atome d'hydrogène, soit par le transfert d'un simple électron (Sanchez-Moreno, 2002 ; Huang *et al.*, 2005).

Les techniques du premier groupe sont employées pour évaluer la peroxydation lipidique en utilisant un substrat lipidique ou lipoprotéique. La quantification de cette propriété est exprimée par la mesure du degré d'inhibition de l'oxydation (Sanchez-Moreno et Larrauri, 1998).

Alors, les méthodes du deuxième groupe sont celles qui interviennent dans la mesure de l'habilité du piégeage des radicaux libres. Elles comportent le balayage du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), de l'acide hypochloreux (HOCl), de l'hydroxyle, des anions superoxyde, du peroxyde et de l'oxyde nitrique (Sanchez-Moreno, 2002).

Parmi ces techniques, nous citons :

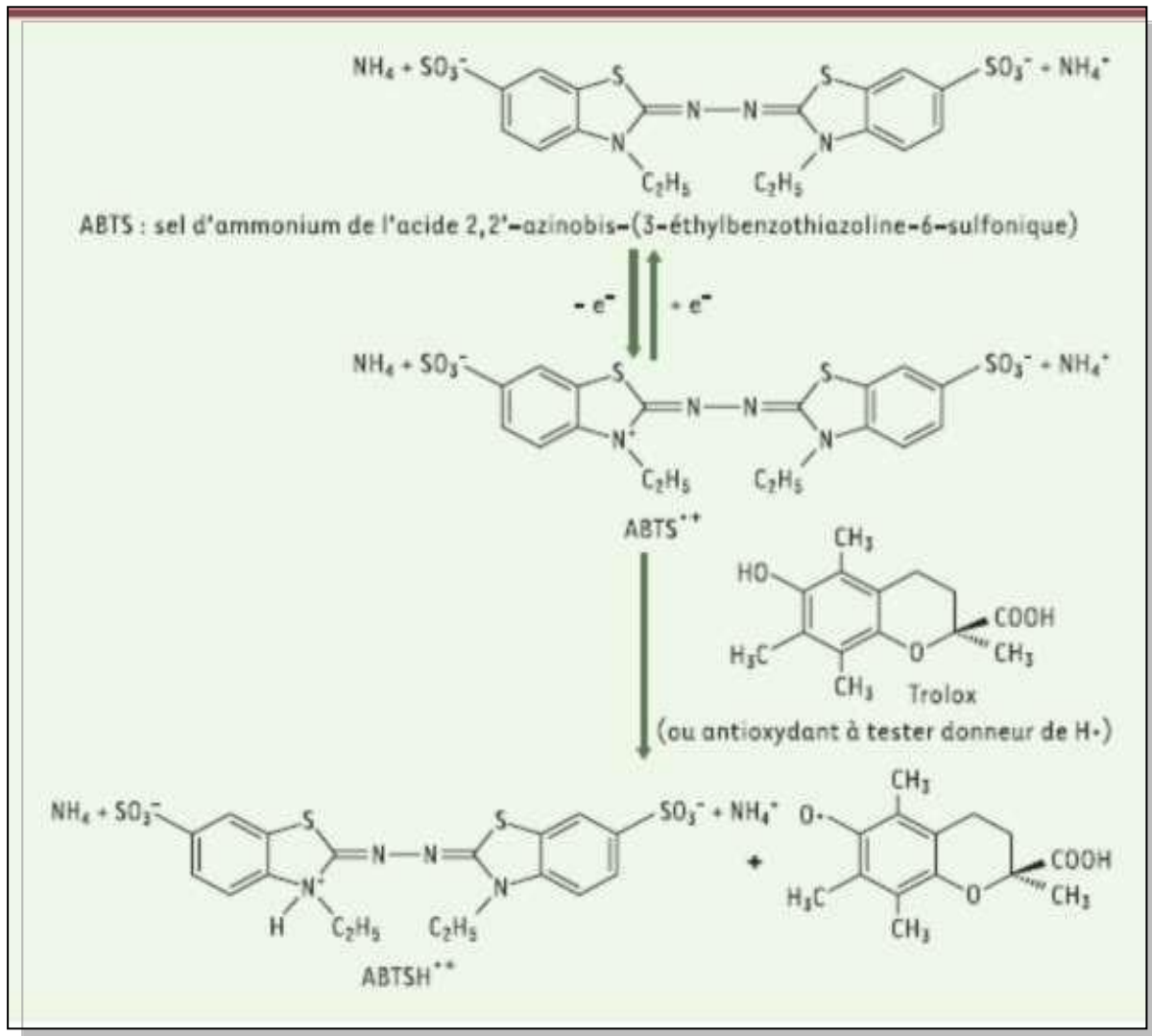
✓ **la méthode du radical DPPH** (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl). Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), qui est un radical libre stable, violet en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm, cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons.



**Figure 6 :** Mécanisme de réduction du radical libre DPPH par un antioxydant.

✓ **La méthode d'ABTS**

Ce test est basé sur le mécanisme d'oxydoréduction de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2, 2'- azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique). Au cours de ce test un radical cation  $ABTS^{\bullet+}$  (absorbant à 734 nm) est formé par arrachement d'un électron ( $e^-$ ) à un atome d'azote de l'ABTS. Ainsi, la présence de l'extrait (ou d'antioxydant donneur de  $H^+$ ), l'atome d'azote concerné piège un  $H^+$ , ce qui conduisant à l'oxydation de l'ABTS entraînant la formation du radical  $ABTS^{\bullet+}$ , ce qui entraîne la décoloration de la solution.



**Figure 7 :** Formation et piégeage du radical ABTS<sup>•+</sup> par un antioxydant donneur de H<sup>•</sup>

*Partie*  
*Expérimentale*

*- CHAPITRE I -  
Extraction et  
teneurs en composés  
phénoliques*

## **1. Introduction :**

La famille des polyphénols devient le point de départ de toutes les recherches scientifiques en particulier la découverte des molécules naturelles à très forte activité antioxydante. Notant que, les oxydants quel que soit leurs origines constituent un très grave problème non seulement au niveau de la santé publique mais aussi au niveau de l'industrie agro-alimentaire.

Dans le contexte de recherche des antioxydants naturels, nous nous sommes intéressés à évaluer l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante de l'espèce végétale *Calendula suffruticosa*.

Deux axes ont été envisagés :

Le premier axe concerne l'extraction des composés phénoliques par l'éthanol suivi par la quantification des teneurs de ces composés. Les quantifications exprimées en mg/g, sont déterminées en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu pour les polyphénols et le trichlorure d'alumine pour les flavonoïdes.

Dans le deuxième axe, nous nous sommes intéressés au pouvoir antioxydant de l'extrait éthanolique des fleurs de la plante étudiée. Deux méthodes complémentaires ont été choisies :

- ✓ Méthode du piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil).
- ✓ Méthode du piégeage du radical ABTS<sup>•+</sup>.

## **2. Matériel végétal :**

### **2.1. Récolte**

La récolte de l'espèce *Calendula suffruticosa* a été réalisée en mois d'avril 2019 dans la région de Ben Azouz, wilaya de Skikda (nord-est de l'Algérie).

Les fleurs sont séchées pendant plusieurs semaines à l'ombre, à l'abri de l'humidité et à une température ambiante.

## **2.2. Traitement des échantillons :**

Un nombre de traitements initiaux sont nécessaires en vue d'obtenir des extraits de plante sur lesquels différentes analyses seront réalisées. Les fleurs ont été broyées à l'aide d'un moulin électrique, les poudres ainsi obtenus sont conservées dans des flacons en verre bien fermés jusqu'aux utilisations ultérieures.

## **3. Matériel :**

Spectrophotomètre ; Bain ultrasonique ; Etuve ; Rotavapeur de type Buchi R-200 ; Balance de précision ; Plaque chauffante ; Agitateur ; ballon ; Réfrigérant ; Micropipette ; Papier Filtre ; Bécher ; Erlenmeyer (fiolle) ; Verre de montre ; Eprouvette graduée ; pipettes ; Cristallisoir ; Tubes à essai ; Pince stérilisée ; Réfrigérateur ; Boîtes de pétri ; Entonnoir.

## **4. Matière :**

Acide chlorhydrique (HCl) ; réactif de Mayer ; hydroxyde d'ammonium (NH<sub>4</sub>OH) ; éthanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) ; méthanol (CH<sub>3</sub>OH) ; Chlorure de fer (FeCl<sub>3</sub>) ; anhydre acétique (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>) ; chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) ; Méthanol (CH<sub>3</sub>OH) ; Acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ; réactif de Folin-Ciocalteu ; Acide gallique ; Carbonate de sodium ; trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) ; Nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>) ; La soude (NaOH) ; Catéchine ; DPPH ; vitamine C (acide ascorbique) ; ABTS ; Persulfate de potassium ; Chlorure de fer (FeCl<sub>3</sub>) ; TCA (acide trichloroacétique) ; ferricyanure de potassium [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>].

## **5. Screening phytochimique :**

Le criblage phytochimique a été réalisé selon la méthode classique de Harborne. Les différents protocoles sont décrits ci-dessous :

### **5.1. Alcaloïdes**

Macérer 1g de la poudre sèche dans 10 ml de HCl à 1%, pendant 2h. Après filtration, on ajoute au filtrat, le réactif de Mayer (quelques gouttes). L'apparition d'un précipité blanc indique la présence des alcaloïdes.

### **5.2. Flavonoïdes**

Macérer 2g de poudre pulvérisée de la matière végétale dans 40ml de HCl dilué à 1% pendant 24h. Après avoir filtré le mélange, prendre 2 ml du filtrat, le rendre basique par l'ajout de  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

L'apparition d'une couleur jaune claire dans la partie supérieur du tube indique la présence des flavonoïdes.

### **5.3. Tanins**

Prendre 2g de matériel végétal, les macérer pendant 2 heures dans du  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  à 1%. Filtrer puis ajouter quelques gouttes d'une solution de  $\text{FeCl}_3$  à 2% (2g  $\text{FeCl}_3$  dans 100ml de  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ). L'apparition d'une couleur verte indique la présence des tanins.

### **5.4. Saponines**

On prend 2g de matériel végétal dans 50ml de  $\text{H}_2\text{O}$ , on chauffe jusqu'à ébullition puis on filtre le mélange et on laisse refroidir.

Quelques millilitres du filtrat sont mis dans un tube à essais puis on agite fortement. L'apparition d'une mousse qui persiste quelques secondes indique la présence des saponines.

### **5.6. Cardenolides**

Macérer 2g de matériel végétal dans 40ml d'eau distillée pendant 2 heures. Filtrer et prélever 5ml du filtrat, l'extraire avec un mélange de 5ml de  $\text{CHCl}_3$  et de  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ . Evaporer la phase organique et dissoudre le précipité dans 1,5ml de  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Ajouter quelques gouttes de  $\text{FeCl}_3$  suivi de 0,5ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré.

Sur les parois du tube à essai, l'apparition d'une couleur vert-bleu dans la phase d'acide indique la présence des cardénolides.

### **5.7. Stérols et terpènes**

Prendre 2g de matériel végétal dans 30ml d'éther de pétrole, pendant 24 heures. Filtrer et évaporer ; le résidu obtenu est dissout dans 0,5ml d'anhydre acétique et 0,5ml de  $\text{CHCl}_3$ . Puis 1ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré est ajouté. Un cercle violet ou marron est formé puis il devient gris, ce qui indique la présence des stérols et terpènes.

### **5.8. Coumarines**

La solution à analyser est obtenue après une macération durant 24 heures de 0,5 g du matériel végétal dans 10 ml d'éther éthylique. Le mélange est ensuite filtré.

5ml du filtrat sont évaporé à sec, puis on ajoute 4ml d'eau chaude au résidu. On prend la moitié du mélange obtenu dans un tube à essai et on ajoute 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25%). La présence des coumarines est indiquée par une fluorescence dans le tube à 366 nm.

### **5.9. Lipides**

On met 50 ml d'hexane sur 3g de poudre. On laisse le mélange au repos pendant 24 heures. Après filtration, Le solvant est évaporé sous pression réduite à 40°C. L'extrait obtenu est un extrait lipidique brut (huile).

Les résultats de screening phytochimique sont regroupés dans le tableau suivant :

**Tableau 2 :** Screening phytochimique des fleurs de calendula.

<i>Métabolites</i>	<i>FLEURS de calendula</i>
<i>secondaires</i>	
<b>Alcaloïdes</b>	+
<b>Flavonoïdes</b>	+
<b>Saponines</b>	+
<b>Tanins</b>	++
<b>Cardénolides</b>	+
<b>Stérols et terpènes</b>	+
<b>Lipides</b>	+
<b>Coumarines</b>	+

- : absent    + : présent

Sur l'ensemble de ces résultats, on remarque que la plante étudiée est riche en métabolites secondaires :

On constate une forte présence des tanins, Une présence, en quantité minime, des flavonoïdes, saponines, cardénolides, lipides, stérols et terpènes et coumarines est aussi observée.

## **6. Dosage des composés phénoliques**

### **6.1 Dosage des polyphénols totaux :**

L'estimation des polyphénols se fait généralement par des méthodes spectrophotométriques. Ces méthodes sont couramment utilisées, principalement pour leur simplicité et leur sensibilité élevée.

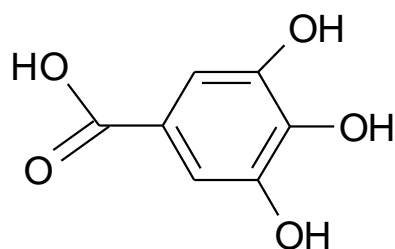
- **Principe**

La teneur en polyphénols totaux est déterminée par le test de Folin-Ciocalteu (**D.O. Kim et al. ,2003**).

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le réactif de Folin-Ciocalteu, en milieu alcalin, oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ces hétéropolyacides, d'où la formation d'un complexe molybdotungstique bleu qui absorbe fortement à une longueur d'onde de l'ordre 760 nm. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

La quantification des polyphénols a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ( $y = ax+b$ ) réalisé par un extrait d'étalon standard à différentes concentrations dans les mêmes conditions que l'échantillon.

Sachant que le standard utilisé est l'acide gallique dont la structure chimique est présentée par la figure suivante :



**Figure 8 :** *Structure de l'acide gallique (Acide 3, 4,5-trihydroxybenzouique).*

- **Mode opératoire**

1ml d'extrait de plante ou de la solution de l'acide gallique (5, 20, 40, 60, 80, 100, 150 et 200 mg/l) convenablement dilué est introduit dans une fiole jaugée de 25 ml contenant initialement 9 ml d'eau distillée. On ajoute ensuite 1 ml du réactif de Folin et on l'agite.

Après 5 minutes, une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 7% (10 ml) est ajoutée tout en agitant. La solution est immédiatement diluée et ajustée au trait de jauge avec de l'eau distillée et le mélange est agité vigoureusement.

Après une incubation de 90 min dans l'obscurité et à la température ambiante, l'absorbance est mesurée à 750 nm en utilisant le méthanol comme blanc à l'aide d'un spectrophotomètre biochrom WPA light wave II UV/visible spectrophotometre.

La teneur en polyphénols totaux est exprimée en mg équivalent d'acide gallique (GAE) / 100 g du poids sec de matière sèche. Tous les essais sont réalisés en triplicata.

La teneur en polyphénols des échantillons analysés sont déterminées par la relation suivante :

$$\text{Teneur en polyphénols (mg / 100 g)} = 100 (C.V) / m$$

C : Concentration de l'extrait (en mg /l)

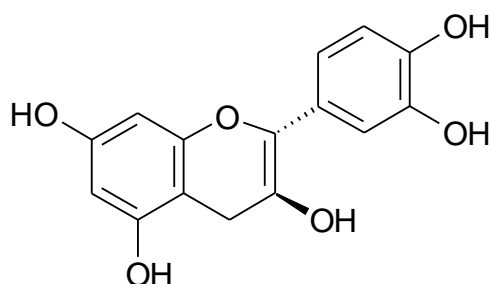
V : Volume de solvant utilisé pour l'extraction (en litres).

m : Masse en grammes de la prise d'essai.

## 6.2 Dosage des flavonoïdes totaux (FVT)

- **Principe**

Le dosage des flavonoïdes totaux a été réalisé selon la méthode d' $\text{AlCl}_3$  (trichlorure d'aluminium), **D-J. Huang, et al.(2004)** en utilisant comme standard la catéchine qui est un flavonoïde de type flavonol présent chez les plantes comme métabolite secondaire. Sa formule chimique est représentée par la figure suivante :



**Figure 9 :** *Structure de la (+)-catéchine.*

- **Mode opératoire :**

L'extrait convenablement dilué (1 ml) ou la solution du composé étalon, catéchine (5, 20, 40, 60, 80, 100, 150 et 200 mg/l) est introduit dans une fiole jaugée de 10 ml contenant au préalable 4 ml d'eau distillée. A l'instant  $t = 0$ , on y introduit 0,3 ml de  $\text{NaNO}_2$  à 5 % (p/v). A  $t = 5$  mn on y ajoute 0,3 ml de  $\text{AlCl}_3$  à 10 % ; 6 minutes après, on y ajoute 2 ml de  $\text{NaOH}$  à 1M. Immédiatement le mélange réactionnel est dilué avec 2,4 ml d'eau distillée et est agité vigoureusement.

L'absorbance de la solution rose est déterminée à 510 nm contre un blanc (contenant du méthanol). La teneur en flavonoïdes totaux est exprimée en équivalents de mg de catéchine (mg CE) par gramme de plante sèche. Tous les essais sont reproduits au moins trois fois. Sachant qu'une droite d'étalonnage est préalablement réalisée avant l'analyse avec la catéchine dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser.

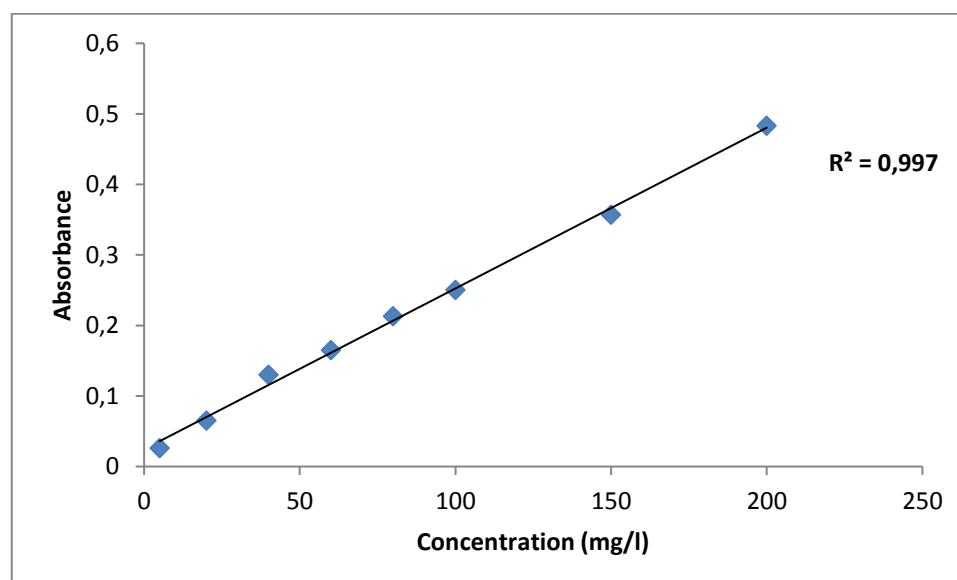
## 7. Résultats et discussion

A partir d'une solution mère standard de 200 mg/l, on prépare des solutions filles de concentrations respectives (5, 20, 40, 60, 80, 100, 150 et 200 mg/l). En suivant le protocole décrit ci-dessus on obtient les absorbances correspondantes à chaque concentration d'acide gallique et de Catéchine (**tableau 3**).

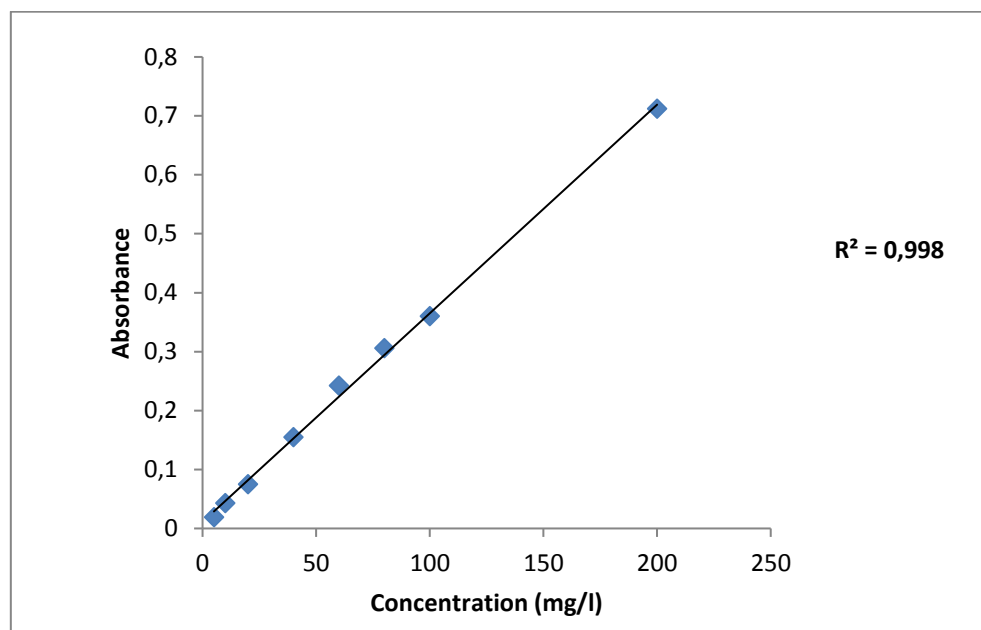
**Tableau 3** : Absorbances de l'acide gallique et de la catéchine en fonction de leurs concentrations.

C (mg/l)		5	20	40	60	80	100	150	200
<b>Absorbance</b>	Acide gallique	0,026	0,065	0,130	0,165	0,213	0,250	0,357	0,483
	Catéchine	0,019	0,043	0,075	0,155	0,242	0,306	0,360	0,712

Ce qui nous permet de tracer les deux courbes d'étalonnage (**figures 10 et 11**) :



**Figure 10** : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.



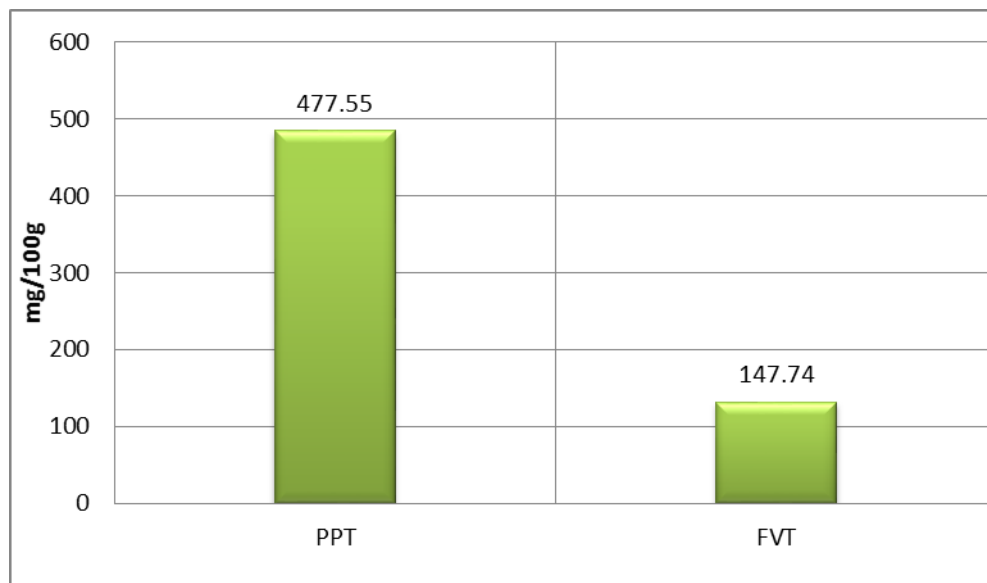
**Figure 11** : Courbe d'étalonnage de la catéchine.

En se basant sur les valeurs d'absorbance des solutions d'extrait, et comparées à celles des solutions étalons (en équivalent d'acide gallique et en équivalent de catéchine comme décrit ci-dessus), on obtient les résultats de l'analyse spectrophotométrique des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes totaux.

Ces résultats sont résumés dans le **tableau 4**. La teneur en composés phénoliques est exprimée en milligrammes équivalents à l'acide gallique (mg GAE) et la teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme équivalents à la catéchine. Ils se rapportent à 100 gramme de matière sèche et les valeurs représentent les moyennes de trois mesures  $\pm$  déviation standard.

**Tableau 4** : Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux de l'extrait éthanolique des fleurs.

Teneur en polyphénols (mg acide gallique/100g MS)	Teneur en flavonoïdes (mg catéchine/100g MS)
<b>477.55<math>\pm</math>16.96</b>	<b>147.74 <math>\pm</math> 12,77</b>



**Figure 12 :** Teneur en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes totaux des fleurs.

Il ressort que les fleurs de plante (*Calendula Suffruticosa*) sont riches en polyphénols, en l'occurrence les flavonoïdes, ce qui confère certainement des activités biologiques à la plante étudiée.

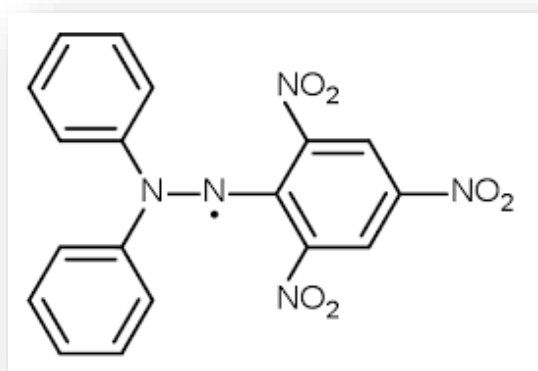
*- CHAPITRE II -  
Evaluation du  
pouvoir antioxydant*

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* de nos extraits a été réalisée par deux techniques chimiques à savoir : le piégeage du radical libre DPPH, le piégeage du radical ABTS.

### 1. Test DPPH :

- **Principe**

L'activité anti-radicalaire libre est déterminée par spectrophotométrie par le dosage du DPPH (M.S. Blois ,1958), le principe de ce test se résume en la capacité de l'extrait à réduire le radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) **Figure 13** , de couleur violette foncée, qui se transforme en coloration jaunâtre (après réduction). Cette décoloration est mesurable par spectrophotométrie à 517 nm.



**Figure 13 :** Structure chimique du DPPH.

- **Méthode**

L'extrait de la plante (0,1ml) est ajouté à 2,9 ml de DPPH à 0,004% (P/V) dans une solution du méthanol. Le mélange réactionnel formé a ensuite été mis à l'obscurité pendant 30 minutes à la température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 517 nm en utilisant un blanc constitué de 50 % de méthanol et la solution de DPPH qui accompagne la lecture de chaque série.

A partir d'une solution mère standard de 200 mg/l de la vitamine C (acide ascorbique), on prépare des solutions filles de concentrations respectives (1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 et 150 mg/l). L'activité antioxydante mesurée est exprimée en mg équivalent vitamine C par 100 grammes de matière sèche (mg EVC/ 100g).

Compte tenu de l'instabilité des réactifs, la solution radicalaire de DPPH est préparée fraîchement et les essais sont réalisés au moins en triplicata afin de minimiser les erreurs.

La préparation des échantillons et du blanc est réalisée dans les mêmes conditions opératoires.

## **2. Test ABTS<sup>•+</sup> :**

- **Principe**

Le radical ABTS<sup>•+</sup> (absorbant à 734nm) est formé par arrachement d'un électron (e<sup>-</sup>) à un atome d'azote de l'ABTS. En présence d'antioxydant donneur de H<sup>•</sup>, l'atome d'azote concerné piège un H<sup>•</sup>, conduisant à l'ABTS<sup>+</sup>, ce qui entraîne la décoloration de la solution

- **Protocole**

L'activité ABTS est déterminée par la méthode de **Ré et al. 1999**. Le radical cationique ABTS<sup>•+</sup> est produit par la réaction entre 7 mM de l'ABTS dans l'eau et 2,45 mM de persulfate de potassium. Le mélange est mis en incubation, à l'obscurité, pendant 16 heures à température ambiante. Avant l'utilisation du radical ABTS<sup>•+</sup> la solution obtenue est diluée avec l'éthanol pour obtenir une absorbance de  $0,7 \pm 0,020$  à 734 nm.

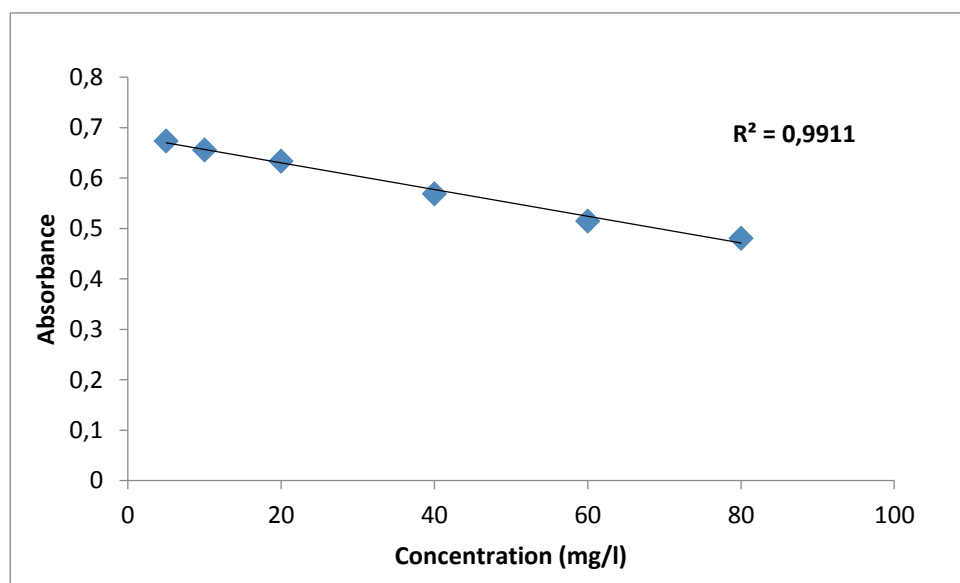
L'extrait de plante (0,1ml) est ajouté à 4,9 ml de la solution radicalaire d'ABTS. Le mélange est incubé à 37 °C dans un bain marie à l'abri de la lumière pendant 20 mn à 37 °C. Un contrôle constitué de 0,1ml de méthanol et de 4,9 ml de la solution d'ABTS est lu avec chaque série d'extrait à 734 nm.

A partir d'une solution mère standard de 200 mg/l, on prépare des solutions filles de concentrations respectives (1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 et 150 mg/l).

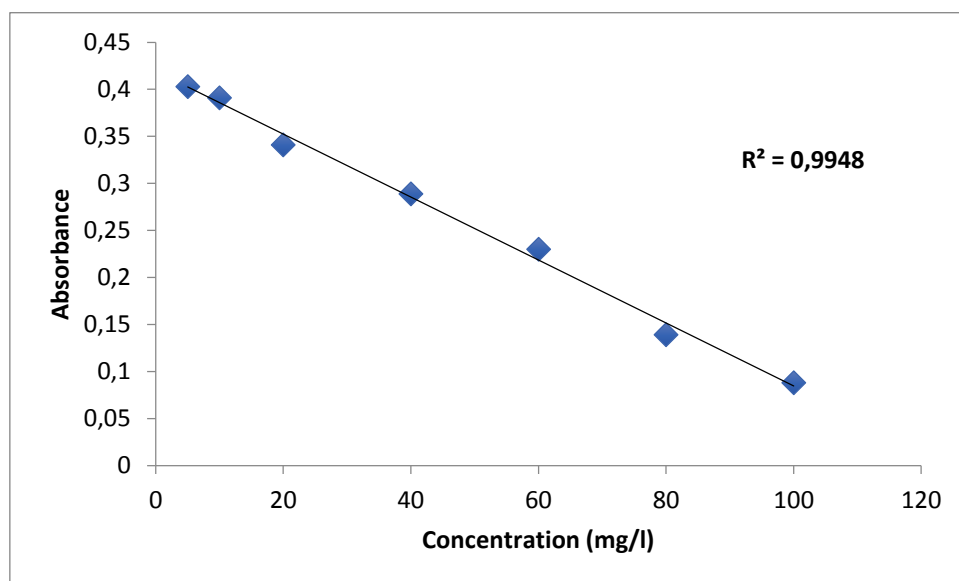
La capacité antioxydante totale des extraits de plante ainsi déterminée est exprimée en mg de vitamine C équivalent (mg VCE) par 100g de matière sèche. La solution radicalaire d'ABTS est préparée fraîchement. Tous les tests sont reproduits au moins trois fois.

### 3. Résultats et discussion

Nous présentons dans les deux figures suivantes les courbes d'étalonnage de la vitamine C réalisées pour les deux tests :



**Figure 14 :** Courbe d'étalonnage de la vitamine C en utilisant le test DPPH.

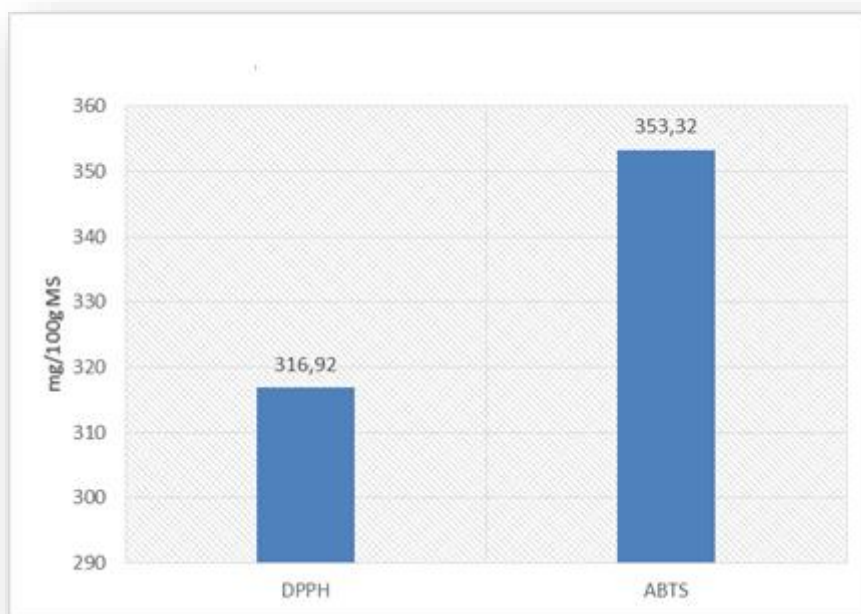


**Figure 15 :** Courbe d'étalonnage de la vitamine C en utilisant le test ABTS.

En se basant sur les valeurs d'absorbance des solutions d'extrait, ayant réagi, et comparées à la solution étalon en vitamine C comme décrit ci-dessus, les résultats de l'activité antioxydante déterminée à l'aide des tests d'ABTS et DPPH sont mentionnés dans le (**tableau 5**) où l'activité antioxydante est exprimée en milligramme équivalents à la vitamine C (mg VCE). Ces résultats se rapportent à 100 gramme de matière sèche et les valeurs représentent les moyennes de trois mesures  $\pm$  déviation standard.

**Tableau 5 :** Résultats de l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique des fleurs.

DPPH test (mg Vitamine C/100g MS)	ABTS Test (mg Vitamine C/100g MS)
<b>316.92 <math>\pm</math> 3,07</b>	<b>353.32 <math>\pm</math> 3,33</b>



**Figure 16 :** Capacité antioxydante exprimée en vitamine C (mg VCE / 100g de matière sèche) selon les tests d'ABTS et DPPH.

On observe que l'extrait éthanoïque des fleurs de plante exhibe des valeurs d'activité antioxydante très remarquables. On s'aperçoit aussi que le test du DPPH donne une valeur faible par rapport au test ABTS.

Cette sous-estimation de la capacité antioxydante par le test du DPPH est aussi observée par **Kim et al**, elle s'expliquerait par les interférences qui se produiraient à 417 nm et par le non solubilité du DPPH en milieu aqueux.

Malgré ces difficultés liées à l'usage du DDPH, il continue toujours à être utilisé.

*Conclusion*

La connaissance et l'usage des plantes médicinales constituent un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique est très accentuée dans ces dernières années grâce aux thérapeutiques qu'elles procurent. Cette diversité en propriétés biologiques est liée certainement aux vertus thérapeutiques attribuées à une gamme extraordinaire de molécules bioactives synthétisées par la plante non seulement comme des agents chimique contre les maladies, les herbivores et les prédateurs mais aussi comme des agents médicinaux tels que les antioxydants.

Ces molécules naturelles de nature phénolique sont très recherchées en phytothérapie vue les effets secondaires des médicaments et les séquelles néfastes des antioxydants de synthèse.

L'objectif primordial assigné par cette étude englobe le même contexte afin d'évaluer les propriétés antioxydantes des plantes médicinales de la région méditerranée.

Dans la première partie, la quantification par des méthodes spectrophotométriques nous a permis de déterminer les teneurs en phénols totaux par le réactif du Folin-Ciocalteu et en flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium. Les résultats obtenus nous ont révélé que les fleurs de *calendula suffruticosa* possèdent des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes très importantes (**477.555±16.963** mg EAG/ g MS et **147.743 ± 12,777**mg EC/ g MS respectivement).

Dans la deuxième partie, nous nous sommes intéressés à l'étude des propriétés antioxydantes de cette plante par deux techniques complémentaires.

L'ensemble des résultats montre que l'extrait éthanolique des fleurs de la plante dévoile des valeurs d'activité antioxydante très remarquables (353 et de 317 mg équivalent en vitamine C par 100 g de matière sèche en utilisant le test ABTS et le test DPPH respectivement).

De nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- Elargir le panel des activités antioxydantes *in vitro* et *in vivo* et pourquoi pas d'autres tests biologiques : antitumorale, anticancéreuse et anti-inflammatoire.

## **Conclusion** \_\_\_\_\_

---

- Caractériser et isoler les principes actifs responsables à ces propriétés pharmacologiques.

*Références  
Bibliographiques*



- 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) : 67-82.
- Beniston N, Beniston W.( 1984)** Fleurs d'Algérie. Entreprise National du Livre., p.359.
- Bahorun, T. (1997).** Substances naturelles actives : La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food. Agric. Res. Council, Réduit, Mauritius*, 83-94.
- Benhammou, N., Atik Bekkara, F., Kadifkova Panovska, T. (2007).** Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L and *Pistacia atlantica* Desf. *Adv. Food Sci*, 29 (3): 155-161.
- Benhammou, N., Atik Bekkara, F., Kadifkova Panovska, T. (2008).** Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *Afr. J. Pharm Pharmacol*, 2 (2): 022-028.
- Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G., & Monks, T. J. (2000).** Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol*, 13: 135.
- Bossokpi, I.P.L. (2002).** Etude des activités biologiques de *Fagara xanthoxyloïdes* LAM (Rutaceae). *Thèse de pharmacie, Bamako*, p 133.
- Bruneton, J (1993).** Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 2<sup>ème</sup> Ed. Lavoisier, paris.
- Bruneton, J (1999).** Pharmacognosie phytochimie plantes medicinales, 3<sup>ème</sup> Ed.C.H Stirton (fabaceae) et cantarea dimorphaviv (asteraceae). Thèse de doctorat.
- Couplan F,** Les plantes et leurs noms : Histoires insolites. Editions Quae. p.223; 2012.
- Cowan N. M., (1999)** Plant products as anti microbial agents. *Clinical microbiology science*. Vol.12(4): 564-582.
- D-J. Huang, C-D Lin, H-J. Chen et Y-H. Lin (2004).** Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam 'Tainong 57') constituents *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45,179-186.
- D.O. Kim, W.J. Seung and C.Y. Lee (2003).** Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of polums. *Food Chemistry*, 81 321-326.
- Edenharder, R., Grünhage, D. (2003).** Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res*, 540: 1-18.
- Favier, A. (2003).** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.

**Gauche, E., Hausswirth, C. (2006).** Stress oxydant, complémentation nutritionnelle en antioxydants et exercice. *Science & Motricité*, 58 : 43-66.

**Georgetti, S.R., Casagrande, R., Di Mambro, V.M., Azzolini Ana, E.C.S., Fonseca Maria, J.V. (2003).** Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the Chemiluminescence Method. *AAPS Pharm Sci*, 5 (2) : 1-5.

**Gonzalez-Romero, M.A., Villaescusa-Castillo, L., Diaz-Lanza, A.M. (2000).** Sesquiterpene lactones from *Inula montana* L. *Z Naturforsch C*, 55(9-10): 697-700.

**Halliwel, B. (1994).** Free radicals, antioxidant and human disease: curiosity, cause or consequence? *The Lancet*, 344 (8924): 721-724.

**Hamdan, I., Afifi, F.U. (2004).** Studies on the in vitro and in vivo hypoglycemic activities of some medicinal plants used in treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine. *J. Ethnopharmacol*, 93: 117–121.

**Haslam, E. (1996).** Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat Pro*, 59: 205 215.

**Havsteen, B.H. (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut*, 96: 67– 202.

**Iserin, P. (2001).** Larousse encyclopédie des plantes médicinales. Identification, Préparations, soins. 2<sup>nd</sup> edition, Dorling Kindersiey Limited, Londres.

**Jha, P., Flather, M., Lonn, E., Farkouh, M., Yusuf, S. (1995).** The antioxidant vitamins and cardiovascular disease. A critical review of epidemiologic and clinical trial data. *Ann. Intern Med*, 123: 860.

**Lee, K.W., Hur, H.J., Lee, C.Y. (2005).** Antiproliferative effects of dietary phenolic substances and hydrogen peroxide. *J. Agric. Food Chem*, 53 : 1990-1995.

**Leong, LP., Shui, G. (2002).** An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem*, 76: 69-75.

**Li, C.Y., Jackson, R.M. (2002).** Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol*, 282: C227–C241. M.S. Blois (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, pp 1199-1200.

**Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., (2003).** Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *J. Nat Prod*, 66 (7): 1022– 1037.

**Nijveldt, R. J., Nood, E., Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Norren, K., Leeuwen, P. (2001).** Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin Nutr*, 74 : 418–425.

**Nitsch, J.P., Nitsch, C. (1961).** Synergistes naturels des auxinex et des giberellines.

*Bull. Soc.Fr*, 26: 2237-2240.

**O’Kennedy, R., and Thornes, R.D. (ed) (1997).** Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action. John Wiley & Sons Inc. New York. N.Y.

**Rahman, I., Biswas, S.K., Kirkham, P.A. (2006).** Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol*, 72: 1439-1452.

**Sanchez-Moreno, C. (2002).** Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Sci Tech Int*, 8(3): 121-137.

**Tamer Fouad, M.D. (2003).** Free radicals, Types, sources and damaging reactions, Internal Medicine Articles(<http://www.doctorslounge.com/primary/articles/>).

**Tsimogiannins, D.I., Oreopoulou, V. (2006).** The contribution of flavonoid C-ring on DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3’, 4’-hydroxy substituted members. *Innovat Food Sci Emerg Tech*, 7: 140-146.