

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE MOULOD MAMMARI DE TIZI-OUZOU
FACULTÉ DES SCIENCES**



DÉPARTEMENT DE CHIMIE



Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie Pharmaceutique

Thème

**ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET
ANTIBACTERIENNE DES POLYPHENOLS DES GRAINS
DE FENOUIL SAUVAGE**

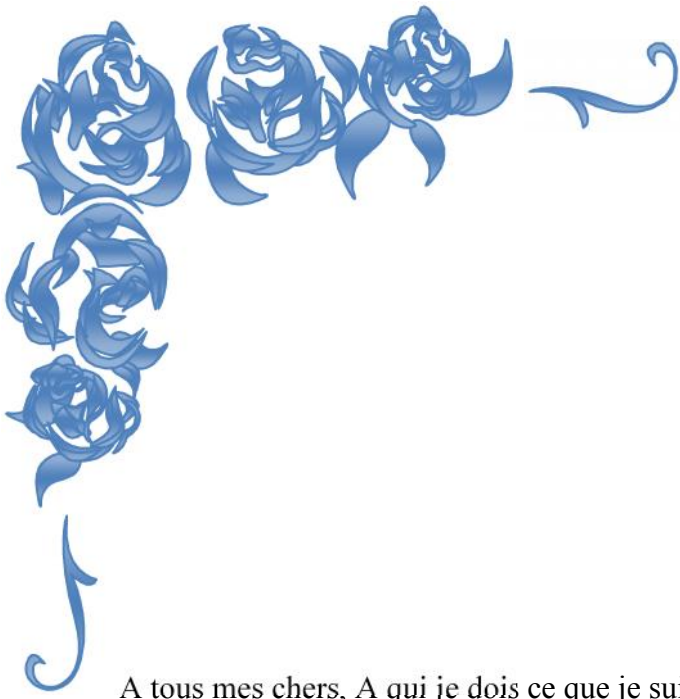
Présenté par : **M^{elle} RAHALI OUERDIA**

Soutenu devant les jurys composé de :

Mme KICHOU Noura
Mr BENCHOUAK Mounir
Mr BELAÏSSA Yahia
Melle TOUZOUIRT Saïda

MCB - UMMTO
MAA - UMMTO
MAB - UMMTO
MAB - UMMTO

Présidente
Rapporteur
Examineur
Examinatrice



A tous mes chers, A qui je dois ce que je suis, Qu'ils trouvent dans ce projet, le fruit de
Meilleur de leurs même, et l'expression de mon amour et de ma gratitude pour
La bienveillance avec laquelle ils m'ont toujours entouré.
Que Dieu vous préserve longue vie et bonne santé.

« Rahali Ouerdia.»





Remerciements

Je remercie tout d'abord **ALLAH** le tout puissant de m'avoir donné la santé, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire.

Mes sincères remerciements aux membres de jury :

Mme KICHOU

Mr BELAISSA

Melle TOUZOUIRT

Et surtout à mon encadreur Mr. Benchoulak,
Qui a fourni le meilleur de lui-même pour l'élaboration de ce modeste travail.

Ainsi qu'à tous mes amis et les personnes ayant participé de près ou de loin.

Et ; je reste très reconnaissante envers tous les responsables et employés de l'Hôpital Universitaire de Tizi-Ouzou et les responsables de laboratoires Chimie Pharmaceutique, de l'Université de Tizi-Ouzou pour leur collaboration.

Enfin, j'adresse ma haute reconnaissance à ma famille pour leur soutien.

Encore une fois, merci à tous ! Que Dieu vous bénisse !

«**Rahali Ouerdia** »



Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antioxydante antibactérienne de l'extrait méthanolique (E.Met) des grains de fenouil sauvage, une plante médicinale de la pharmacopée traditionnelle de l'Algérie. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant les tests de: piégeage du radical peroxyde d'hydrogène, peroxydation de l'acide oléique et le test du pouvoir réducteur. Dans un premier temps la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux de l'extrait a été effectuée. L'extrait méthanolique a montré une richesse en polyphénols totaux, en flavonoïdes avec des valeurs $C = 418 \pm 24.04$ mg AGE /g extrait, $C = 111 \pm 8,18$ mg QE/g(extrait) respectivement. Par ailleurs, l'extrait a montré une très forte activité anti-radicalaire vis-à-vis du radical H_2O_2 . De plus, l'extrait a exercé un effet inhibiteur de la peroxydation lipidique de 57% dans le test de la peroxydation de l'acide oléique. En outre, l'extrait possède également un pouvoir réducteur important. L'effet antibactérien de l'E.Met a été évalué par la méthode de diffusion en milieu gélosé ou encore méthode de disques, vis-à-vis quatre souches bactériennes. Les résultats révèlent que l'E.Met a exercé un effet antibactérien considérable. En conclusion, l'E.Met des grains de fenouil sauvage possède une excellente activité antioxydante et antibactérienne.

Mots clés: *Foeniculum vulgure Mill*, antibactérien, antioxydant, polyphénols

Abstract

The aim of this study is to evaluate antioxidant and antibacterial activities of methanolic extract (Met.E) of *Foeniculum vulgure Mill*, a medicinal plant from traditional pharmacopoeia of Algeria. Antioxidant activity was evaluated using the H₂O₂, oleic acid peroxidation and reducing power tests. Firstly, polyphenols, flavonoids and tannins content was determined. Results showed that Met.E is rich in polyphenols, flavonoids with values of C= 418 ± 24.04 mg EAG /g extract, C = 111 ± 8,18EAT/mg respectively on the other hand, extract showed a very strong antiradical activity against H₂O₂ radical. Moreover the extract inhibited oleic acid peroxidation with 57% in oleic acid peroxidation test. In addition extract showed important reducing power. Antibacterial effect of Met.E was evaluated by agar diffusion assay toward four bacterial strains. Results revealed that Met.E exerted significant effect antibacterial. In conclusion, Met.E of *Foeniculum vulgure Mill* has an excellent antioxidant activity and antibacterial one.

Key words: *Foeniculum vulgure Mill*, antibacterial, antioxidant, polyphenols.

Liste des Abréviations :

$\cdot\text{O}_2^-$: radical anion superoxyde.

OH^\bullet : radical hydroxyle.

NO^\bullet : monoxyde d'azote.

$^1\text{O}_2$: l'oxygène singulet.

H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène.

ONOO^- : peroxydinitrite.

AGE : acide gallique équivalent.

QE : quercétine équivalent.

ERO : Espèces réactives oxygénées.

ROS : reactive oxygen species.

HOO^\bullet : Radical hydroperoxyde.

ROO^\bullet : Radical peroxyde.

ClO^- : Hypochlorite.

SOD : Superoxyde dismutase.

HOCl : l'acide hypochloreux.

CAT : Catalase.

GSH : Glutathion.

NOS : Oxyde nitrique synthase.

ADN : acide désoxyribonucléique.

GSH : glutathion réduit.

GSSG : glutathion oxydé.

GPx : glutathion peroxydase.

AscH- : l'ascorbate.

Asc^{•-} : radical ascorbyle.

PP : polyphénols.

KCN :thiocyanate de potassium.

H₂SO₄ : acide sulfurique.

[K₃Fe(CN)₆]:ferricyanide de potassium.

FeCl₂ : Chlorure ferreux.

TCA : acide trichloracétique.

Na₂ CO₃ : Carbonate de sodium.

E.Met : l'extrait méthanolique.

UV : ultra violet.

Liste des Tableaux :

Tableau 1 : Les principales espèces réactives de l'oxygène	4
Tableau 2 : Classification de la <i>Foeniculum vulgare</i> Mill	22
Tableau 3 : Solutions préparé de l'extrait à différente concentration	30
Tableau 4 : La sensibilité des souches vis-à-vis des extraits	32
Tableau 5 : Résultats des tests chimique d'identification des constituants végétaux de l'extrait	33
Tableau 6 : Les résultats de dosage des phénols totaux	35
Tableau 7 : Les résultats de dosage des flavonoïdes totaux.....	36
Tableau 8 : Les résultats de l'activité antiradicalaire de l'extrais vis-à-vis le H ₂ O ₂	37
Tableau 9 : Les résultats de la peroxydation de l'acide oléique	38
Tableau 10 : Les résultats de pouvoir réducteur de l'extrait.....	39
Tableau 11 : Halos d'inhibition (mm) provoqués par l'extrait des grains de fenouil sauvage.....	40

Liste des figures :

Figure 1 : Principales sources endogènes d'espèces réactives oxygénées	6
Figure 2 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras Polyinsaturés et nature des produits terminaux formés	8
Figure 3 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire.....	9
Figure 4 : Espèces réactives oxygénées et systèmes de protection permettant de limiter leur effet toxique. GSH: glutathion, Cl ⁻ : anion chlorure, MPO: myéloperoxydase, SOD: superoxyde dismutase, Se-GPx: glutathion peroxydase sélénio-dépendante...	11
Figure 5 : structure chimique de la vitamine E	12
Figure 6: Structures chimiques de principaux polyphénols	14
Figure 7: Structure de base des flavonoïdes.....	15
Figure 8: Structures chimiques de quelques flavonoïdes	16
Figure 9: Structures de quelques flavonoles. Kaempférol: 2R=OH, 1R =3R =H; Quérétine: 1R=2R=OH, 3R=H; Myricétine: 1R=2R=3R=OH	17
Figure 10 : Sites possibles de la fixation de Fe ³⁺ aux cycles A et C des flavonoles. Le métal peut se fixer à la position 3-hydroxy-4-céto (gauche) ou la position 5-hydroxy-4-céto (droite).	17
Figure 11: La partie aérienne du fenouil sauvage (Foeniculum vulgare Mill.....	22
Figure 12 : Les souches utilisées	24
Figure 13 : Procédure expérimentale d'extraction des polyphénols totaux des grains de fenouil sauvage.....	26
Figure 14 : Activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique des grains de fenouil sauvage vis-à-vis du radical peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	36
Figure 15: Cinétique de la peroxydation de l'acide oléique en présence et en absence de l'extrait méthanolique à 500 nm	37
Figure 16: Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique à 700 nm	38
Figure 17 : Spectre UV/vis du l'H.E à 10 ⁻⁴ M	39

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction	1
---------------------------	---

Chapitre I. Le stress oxydant

I.1. Espèces réactives de l'oxygène	3
I.1.1. Définition	3
I.1.2. Origine des espèces réactives oxygénées	4
a- Production endogène de radicaux libres	4
b- Formation de radicaux libres par voie exogène	6
I.1.3. Rôle bénéfique des ROS	7
I.2. Le stress oxydatif	7
I.2.1. Définition	7
I.2.2. Conséquences biologiques de stress oxydant	7
a- Effets sur les lipides	8
b- Oxydation de l'ADN.	8
c- Oxydation des protéines	9
I.2.3. Les systèmes de protection (Antioxydants)	10
a-Antioxydants enzymatiques	10
b-Antioxydants non enzymatiques (Antioxydants naturels)	11

Chapitre II : Les polyphénols (les flavonoïdes)

II.1. Définition	13
II.2. Structures chimiques et classification	13

II.3. Les flavonoïdes	15
II.3.1. Structures chimiques et classification.....	15
II.3.2. Les flavonoïdes et les radicaux libres.....	16
II.4. Activités antibactériennes	18
II.4.1. Généralités.....	18
II.4.2. Définition de l'activité antibactérienne.....	18
II.4.3. Activités antimicrobiennes des polyphénols.....	18

Chapitre III: La Foeniculum Vulgare Mill

III.1 Généralités	20
III.2. Description générale	21
III .3.Composition chimique	23
III.4.Propriétés thérapeutiques	23

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Matériel	24
I.1. Matériel végétal	24
I.2. Souches bactériennes	24
I.3. Réactifs	25
I.4. Solutions de travail	25
II. Méthodes	26
II.1. Préparation de l'extrait méthanolique	26

I.2. Testes chimiques d'identification des constituants végétaux	27
II.2.1. Teste pour les flavonoïdes	27
II.2.2. Test pour les tanins hydrolysables	27
II.2.3. Test pour les tanins condensés	27
II.2.4. Test pour les saponines	27
II.2.5. Test pour les terpenoïdes	28
II.2.6. Test pour les glycosides	28
II.2.7. Test pour les stéroïdes	28
II.3. Dosage des polyphénols totaux	28
II.4. Dosage des flavonoïdes	29
II.5. Activité antioxydante	29
II.5.1. Piégeage de H ₂ O ₂	29
II.5.2. Peroxydation de l'acide oléique	30
II.5.3. Pouvoir réducteur	31
II.6. Activité antibactérienne (teste de diffusion sur disques)	31
III. Analyse spectroscopique	32

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Préparation de l'extrait	33
2. Tests chimiques d'identification des constituants	33
3. Dosages spectrophotométrique	34
3.1. Dosage des phénols totaux	34
3.2. Dosage des flavonoïdes totaux	35

4. L'activité antioxydante in vitro	37
4.1. Piégeage de radical peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	37
4.2. Effet sur la peroxydation de l'acide oléique	38
4.3. Pouvoir réducteur	39
5. Activité antibactérienne	40
6. Etude en spectroscopie UV/visible	41
CONCLUSION GENERALE	42

Références bibliographiques

Introduction

Introduction

Les espèces réactives oxygénées sont impliquées dans des processus physiologiques à des faibles quantités. Cependant, l'excès de la production des ROS peut devenir toxique pour les composants majeurs de la cellule, les lipides, les protéines et les acides nucléiques, et donne lieu au stress oxydatif qui sera impliqué dans diverses pathologies à savoir les maladies neurodégénératives (Alzheimer), le diabète, les cancers, les maladies inflammatoires, le vieillissement, etc. Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes pour éliminer ou minimiser le dommage oxydatif. Selon le type, les antioxydants peuvent agir en réduisant ou en dismutant les ROS, en les piégeant pour former un composé stable, en séquestrant les métaux de transition libres ou en générant des molécules biologiques antioxydantes d'importance. Sous certaines conditions, ces systèmes antioxydants ne peuvent pas fonctionner efficacement. Cependant, la dysfonction antioxydante qui en résulte peut être manipulée par la supplémentation en antioxydants exogènes alimentaires.

Par ailleurs, la maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques ce qui a constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale.

Cependant, il y a une préoccupation concernant les effets indésirables des molécules synthétiques destinées à la lutte contre le stress oxydant et les infections bactériennes. Il semble donc important de trouver une alternative à l'utilisation des antioxydants synthétiques et des antibiotiques classiques. Les remèdes à base de plantes constituent une alternative dans les systèmes de soins primaires et donc, une voie prometteuse pour le développement des médicaments traditionnellement améliorés. Récemment, beaucoup de chercheurs s'intéressent aux plantes médicinales pour leur richesse en antioxydants naturels à savoir les polyphénols, les flavonoïdes, etc. qui possèdent des activités antioxydantes et antimicrobiennes.

De ce fait, l'exploitation de nouvelles molécules bioactives ayant des effets secondaires limités ou inexistantes depuis des sources naturelles et leur adoption comme une alternative thérapeutique aux molécules synthétiques sont devenues des objectifs prioritaires pour les recherches scientifiques et les industries alimentaires et pharmaceutiques.

Le présent travail a été entrepris afin d'évaluer les activités antioxydante et antibactérienne de l'extrait des grains de la *Foeniculum Vulgare* Mill, une plante largement utilisée en médecine traditionnelle en Algérie.

Les objectifs de ce travail sont :

- Préparation de l'extrait méthanolique des grains de *Foeniculum vulgare* Mill.
- Evaluation de la teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes de l'extrait méthanolique de *Foeniculum vulgare* Mill.
- Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait des grains de *Foeniculum vulgare* Mill par les tests de H₂O₂, la peroxydation de l'acide oléique et le test du pouvoir réducteur.
- Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait des grains de *Foeniculum vulgare* Mill vis-à-vis quatre souches bactérienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

REVUES
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I

Le stress oxydatif

I. Le stress oxydatif

I. 1. Les espèces réactives de l'oxygène

I.1.1. Définition

Un radical libre se définit comme toute molécule ou fragment d'une molécule possédant au moins un électron non apparié (célibataire) sur son orbitale externe [1]. Les radicaux libres apparaissent soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente (fission homolytique) pendant laquelle chaque atome conserve son électron, soit au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'électrons à partir d'un composé non radical [2].

Les radicaux libres sont des espèces chimiquement instables [3,4], leur durée de vie est généralement très courte [2]. La présence des électrons non appariés les confère une réactivité importante : ils réagissent avec des différentes molécules plus stables pour capter ou céder les électrons [5, 6] et ils peuvent initier des réactions en chaîne en engendrant de nouvelles espèces radicalaires [7, 8].

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaire qui jouent un rôle particulier en physiologie qui s'appellent « radicaux primaire ». Les autres radicaux libres, dits « radicaux secondaires », se forment par réaction des radicaux primaires sur les composés biochimique de la cellule. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels le radical anion superoxyde O_2^\ominus , le radical hydroxyle OH^\ominus [9] ou de l'azote tel le radical monoxyde d'azote (NO^\ominus) [10]. D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le peroxyde d'azote (ONOO^\ominus), ne sont pas des radicaux libres mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux libres [11]. L'ensemble de ces radicaux est souvent appelé « espèces réactives de l'oxygène : **ERO** » (ROS en anglais pour *Reactive Oxygen Species*) [12,10] (tableau 1).

Revue bibliographique

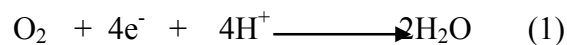
Tableau 1. Les principales espèces réactives de l'oxygène [13].

ROS	Formule chimique
Radical anion superoxyde	$\text{}^{\ominus}\text{O}_2^{\circ}$
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Trioxygène moléculaire (l'ozone)	O_3
Oxygène singulet	${}^1\text{O}_2$
Radical hydroxyle	OH°
Radical hydroperoxyde	HOO°
Radical peroxyde	ROO°
Peroxyde et hydroperoxyde	ROOR et ROOH
Radical alkoxyde	RO°
Radical oxyde nitrique	${}^{\circ}\text{NO}$
Peroxynitrite	ONOO°
Hypochlorite	ClO^{\ominus}

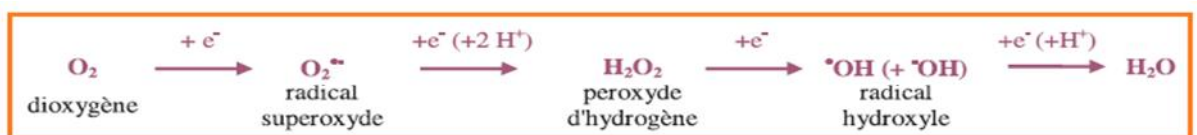
I.1.2 Origine des espèces réactives de l'oxygène *in vivo*

a. Production endogène de radicaux libres

La majeure partie de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente (addition de 4 électrons, réaction (1)) conduisant à la production d'eau. Cette réaction est catalysée par cytochrome oxydase, accepteur terminal d'électrons présents dans le complexe IV de la chaîne de transport des électrons située dans la membrane interne mitochondriale :

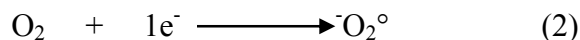


Toutefois, cette chaîne de transport peut laisser « fuir » une certaine proportion d'électrons qui vont réduire l'oxygène mais en partie seulement (14).

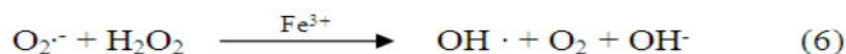
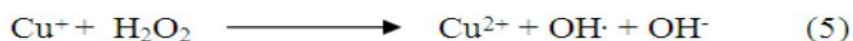
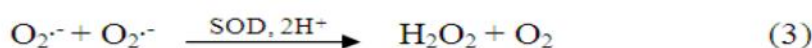


Revue bibliographique

C'est ainsi qu'environ 2 % de l'oxygène subit une réduction monoélectronique (addition d'un seul électron, réaction (2)) conduisant à la formation du radical superoxyde $\text{O}_2^{\circ-}$, au niveau de l'ubiquinone (ou coenzyme Q) [15].



Le radical superoxyde est soumis à une réaction de dismutation catalysée par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) pour former le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (réaction 3). Le H_2O_2 peut traverser les membranes biologiques et former le plus puissant des espèces réactives, le radical hydroxyle (OH°), par interaction avec les métaux de transition comme Fe^{2+} (réaction 4) et Cu^+ (réaction 5) via la réaction de Fenton. Le H_2O_2 et $\text{O}_2^{\circ-}$ donnent aussi naissance au radical hydroxyle (réaction 6) via une réaction dite de Haber et Weiss [16].



Le radical hydroxyle OH° est le plus réactif des ROS [11]. Dès qu'il se forme, il attaque rapidement les macromolécules de la cellule [21]. A cause de son temps de demi-vie très court, le radical libre réagit *in vivo* quasiment sur le lieu de sa production [16].

Au cours du processus d'inflammation cellulaire, les cellules du système immunitaire produisent une variété de ROS [22] y compris le peroxyde d'oxygène $\text{O}_2^{\circ-}$ et le radical $^\circ\text{NO}$. Ce dernier peut être produit aussi par plusieurs cellules à partir d'arginine et d'oxygène dans une réaction catalysée par la NO-synthase [23]. A forte concentration, le $^\circ\text{NO}$ devient délétère pour les cellules, notamment en réagissant avec le radical $\text{O}_2^{\circ-}$ pour former l'anion peroxynitrite ONOO^- (figure 2) [16].

Plusieurs d'autres ROS peuvent se produire dans l'organisme vivant, comme l'acide hypochloreux (HOCl), le radical alcoxyle (RO°) et le radical peroxy (ROO°) [2]. Les radicaux peroxy sont des espèces très énergétiques. Le plus simple radical peroxy est le dioxyde (hydroperoxyde : HOO°) qui est l'acide conjugué du radical $\text{O}_2^{\circ-}$ [16].

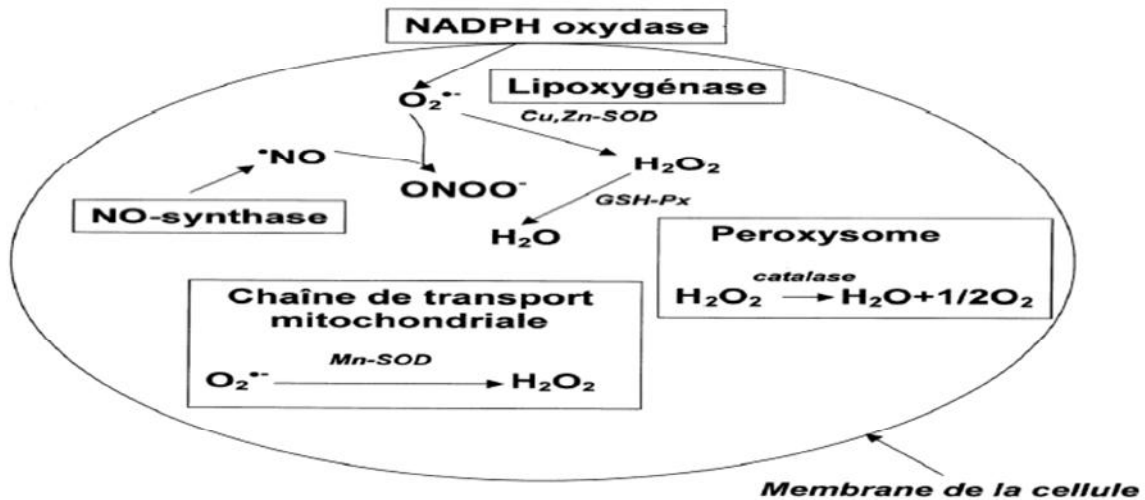


Figure 2 : Principales sources endogènes d'espèces réactives oxygénées [17].

b. Formation de radicaux libres par voie exogène

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des radicaux libres. Les rayonnements UV induisent la synthèse de radicaux libres (O_2^- , OH^\bullet , 1O_2) et de molécules génératrices de radicaux libres (H_2O_2) par l'intermédiaire d'agents photosensibilisants. Les radiations ionisantes provoquent également la génération de radicaux libres dérivés de l'oxygène.

L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes. *Schisler et Singh (1989)* ont montré que l'alcool pouvait diminuer l'activité des enzymes de protection (SOD-GSH). De même, les concentrations sériques en sélénium et vitamine E sont abaissées chez les alcooliques et corrélées avec une atteinte hépatique plus ou moins sévère.

Des toxiques tels que l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO_2), présents dans notre environnement (suies, goudron, tabac, polluants industriels), participent à la genèse de radicaux libres : ils sont responsables d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires.

Enfin, des antibiotiques anticancéreux, tels que les anthracyclines, sont également capables de générer des radicaux libres. La formation d'espèces radicalaires serait responsable de leur mode d'action anticancéreux et de leur toxicité [18].

I.1.3. Rôle bénéfique des ROS

Le paradoxe des radicaux libres en biologie est qu'ils constituent des espèces extrêmement dangereuses, susceptibles d'endommager un nombre considérable de maladies, tout en étant des espèces indispensables à la vie. Ils remplissent en effet de très nombreuses fonctions physiologiques utiles [10] : phagocytes, signalisation cellulaire, bactéricide [2]. Ils participent également au fonctionnement de certains neurones notamment ceux de la mémoire, au fonctionnement de certaines enzymes [10], à l'amélioration du captage musculaire du glucose, à la reconstitution des stocks en glycogène musculaire et à la régulation de nombreux facteurs de transcription qui activent des gènes dits « protecteurs » pour la cellule. Les ROS sont impliqués aussi dans les phénomènes d'apoptose (mort cellulaire programmée) et dans la prolifération des cellules musculaires lisses (cellule vasculaires) [5].

I.2. Le stress oxydatif

I.2.1. Définition

Le stress oxydatif, appelé aussi stress oxydant, se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes de l'organisme en faveur des premiers, ce qui conduit à des dommages cellulaires irréversibles [19]. Le stress oxydatif est un fonctionnement de l'organisme qui est normal tant qu'il ne dépasse pas certaines limites. En effet, tous les organismes vivants qui consomment de l'oxygène produisent des radicaux libres qui sont de petites substances chimiques très oxydées par le contact avec l'oxygène, et dont nos cellules savent normalement très bien se débarrasser. Le stress oxydatif devient anormal lorsque les cellules sont soit dépassées par la quantité de radicaux libres à éliminer, soit ne disposent pas de ressources antioxydantes (vitamines, oligoéléments, enzymes) suffisantes pour les éliminer [20].

I.2.2. Conséquences biologiques de stress oxydant

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. L'organisme peut aussi réagir contre ces composés anormaux par production d'anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des auto-anticorps créant une troisième vague d'attaque chimique [21,22].

Revue bibliographique

a. Effets sur les lipides

Parmi les cibles les plus susceptibles à l'action des ROS sont les acides gras polyinsaturés. L'abstraction d'un atome d'hydrogène à partir d'une molécule d'acide gras polyinsaturé initie le processus de la peroxydation lipidique. Un atome d'hydrogène est pris d'une deuxième molécule d'acide gras polyinsaturé résultant en un nouveau radical libre [23]. Ces radicaux peuvent déclencher une chaîne de réactions de peroxydation au niveau des acides gras des phospholipides membranaires, conduisant à l'altération de la membrane et la perte de l'organisation de sa structure de bicouche lipidique qui est nécessaire à la fonction des enzymes liées et des récepteurs (figure 3) [24].

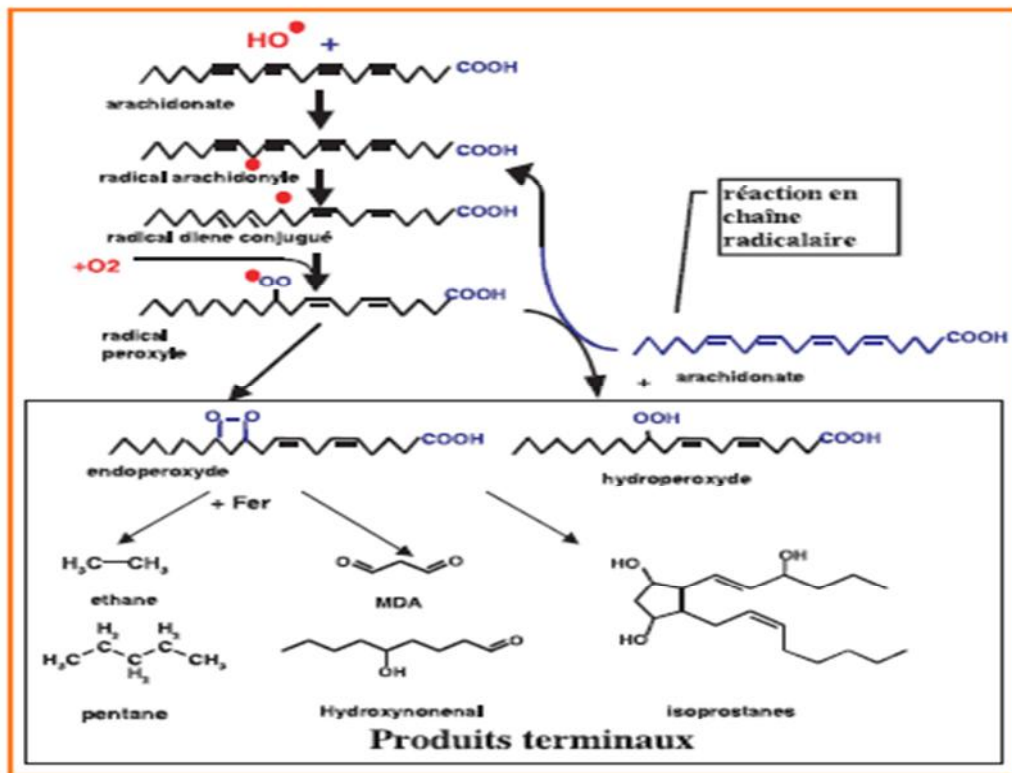


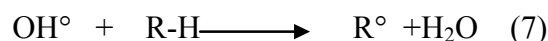
Figure 3 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras Polyinsaturés et nature des produits terminaux formés [25].

b. Oxydation de l'ADN

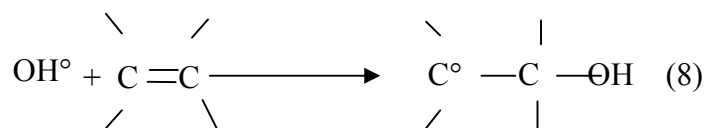
Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène [25]. Les radicaux hydroxyles (OH^\bullet) sont connus par leur capacité de réagir avec tous les composants moléculaire de l'ADN [2], ils réagissent soit:

Revue bibliographique

✚ En arrachant un atome d'hydrogène d'un substrat organique RH :



✚ En s'additionnant sur les doubles liaisons :



Cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par le radical hydroxyle peuvent être générées. Parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intracaténaux, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines (figure 4) [25].

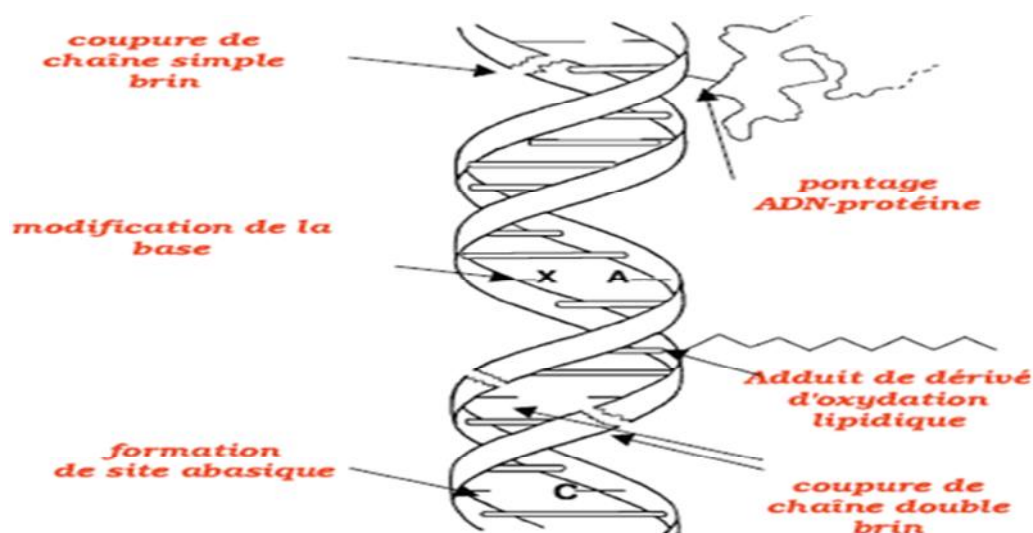


Figure 4 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire [25]

C. Oxydation des protéines

Les structures (primaire, secondaire et tertiaire) et les fonctions des protéines sont aussi altérées par les ROS. Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées. Les produits de la peroxydation lipidique peuvent réagir avec le groupement sulfhydryle de la cystéine ou avec les acides aminés basiques (histidine, lysine) affectant leurs caractéristiques

biologiques [23]. Le dommage oxydatif des protéines peut affecter la fonction des récepteurs, des enzymes et des protéines de transport, etc., et peut même générer de nouveaux antigènes qui provoquent des réponses immunitaires [10]. Les produits du dommage oxydatif des protéines peuvent contribuer au dommage secondaire comme l'inactivation des enzymes de réparation de l'ADN et la perte de fidélité des ADN polymérase [26].

I.2.3. Les systèmes de protection (Antioxydants)

Pour contourner les dommages causés par les ROS, la cellule fait appel à des systèmes de défense appelés antioxydants (figure 3). Un antioxydant est défini comme toute substance ayant la capacité de retarder, prévenir ou réparer un dommage oxydatif d'une molécule cible [27]. Ainsi, les antioxydants servent à contrôler le niveau des espèces réactives pour minimiser le dommage oxydatif [28].

a. Antioxydants enzymatiques

Les superoxydes dismutases (SODs) sont une classe d'enzymes apparentées qui catalysent la dégradation de l'anion superoxyde en O_2 et H_2O_2 . Les cellules humaines possèdent une enzyme SOD mitochondriale ayant le manganèse dans son site actif (MnSOD) ainsi qu'une enzyme SOD cytosolique et une SOD extracellulaire ayant le cuivre et le zinc (Cu-ZnSOD) comme coenzymes [10]. Due à sa relative stabilité, le H_2O_2 produit par les SODs est régulé enzymatiquement par les catalases et les peroxydases. Les catalases sont des enzymes localisées dans les peroxysomes et catalysent la conversion du H_2O_2 en H_2O et O_2 . Tandis que les glutathion peroxydases éliminent le H_2O_2 par son utilisation dans l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) et requièrent le sélénium dans leur site actif pour cette activité (figure 5) [26].

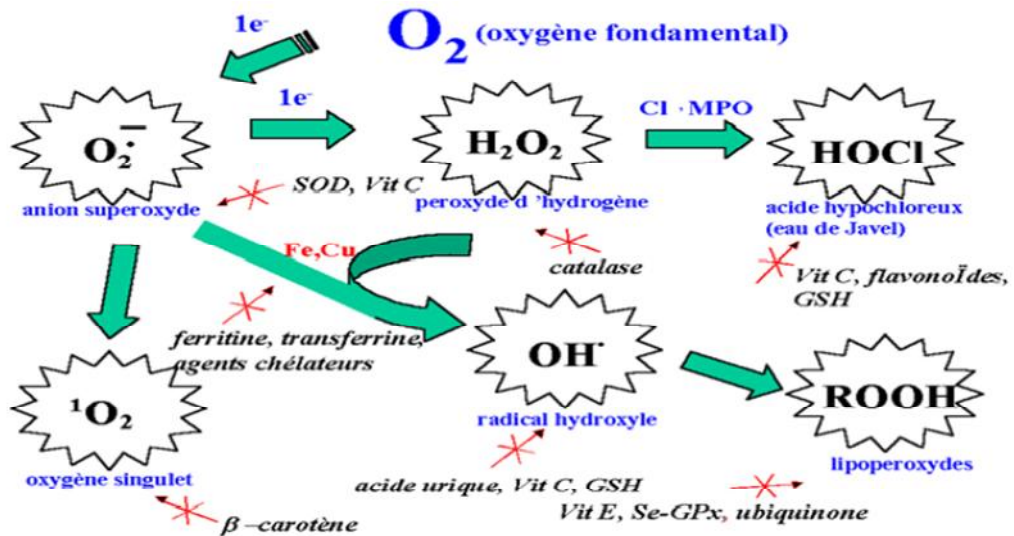


Figure 5 : Espèces réactives oxygénées et systèmes de protection permettant de limiter leur effet toxique. GSH: glutathion, Cl⁻: anion chlorure, MPO: myéloperoxydase, SOD: superoxyde dismutase, Se-GPx: glutathion peroxydase sélénio-dépendante [19].

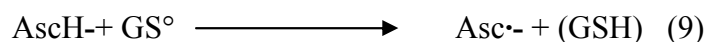
b. Antioxydants non enzymatiques (Antioxydants naturels)

L'organisme possède une seconde ligne de défense « les piègeurs des radicaux libres » qui sont des composés pour la plupart apportés par l'alimentation et dont le rôle essentiel est de neutraliser les effets toxiques des ROS, limitant ainsi toute atteinte de l'intégrité cellulaire [8]. Les piègeurs des ROS agissent en piégeant les radicaux libres et en captant les électrons célibataires, les transformant en molécules ou ion stables. Le piègeur va devenir un radical libre, puis soit détruit, soit régénéré par un autre système [10].

a- L'acide ascorbique

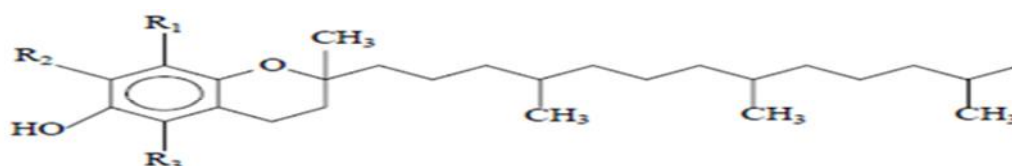
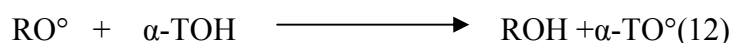
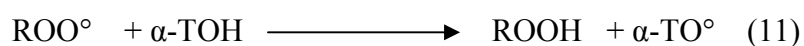
L'ascorbate (vitamine C) est un très bon capteur de radicaux libres oxygénés aussi bien hautement réactifs tels que les radicaux OH[•], que très peu réactifs tels que les radicaux O₂^{•-}. Sa capacité de donation d'électrons dans une large gamme de réactions enzymatiques et non enzymatiques le qualifie de meilleur agent de détoxification des radicaux oxygénés dans la phase aqueuse [29]. En réagissant avec ces divers radicaux, l'ascorbate (AscH⁻) est oxydé en radical ascorbyle (Asc^{•-}) qui est relativement inerte vis-à-vis des molécules biologiques. De plus, l'ascorbate est muni d'une propriété importante: la réparation de deux autres antioxydants, le glutathion (GSH) et l' α -tocophérol (α -TH) à partir de leurs formes radicalaires (réactions 9 et 10). L'ascorbate est recyclé, tout au moins en partie, par dismutation du radical ascorbyle [5].

Revue bibliographique



b. Le α -tocophérol

Parmi les tocophérols naturels, le α -tocophérol (vitamine E) est le plus efficace *in vivo*. Son rôle essentiel est de capter les radicaux lipidiques peroxydes (LOO \cdot), alkoxy (LO \cdot) et alkyl (L \cdot) qui propagent les chaînes de peroxydation lipidique. La réaction entre les radicaux lipidiques et le α -tocophérol (α -TH) se passe au niveau de l'interphase membrane-eau où ce dernier perd un atome d'hydrogène et se transforme en radical α -tocophéryle (α -T \cdot), tandis que le radical peroxyde est réduit en une molécule d'hydroperoxyde (réaction 11) [29]. Le recyclage de la vitamine E par des systèmes réducteurs dont le plus important est l'ascorbate (réaction 12) lui permet de jouer son rôle d'antioxydant à plusieurs reprises [5].



R1	R2	R3	Tocophérols
CH ₃	CH ₃	CH ₃	α
CH ₃	H	CH ₃	β
CH ₃	CH ₃	H	γ
CH ₃	H	H	δ
H	H	H	Tocol

Figure 6 : structure chimique de la vitamine E [9]

C. Les caroténoïdes

Ils forment une grande famille de polyènes conjugués pigmentaires aux capacités antioxydantes similaire à celle des tocophérols. Grâce à leur longue chaîne carbonée riche en double liaisons, ils sont d'excellents piègeurs de radicaux singulet. Une molécule de caroténoïdes peut piéger plusieurs espèces radicalaires avant d'être finalement détruite [5].

d. Les polyphénols

Seront détaillés dans le chapitre suivant

Chapitre II
Les polyphénols

Revue bibliographique

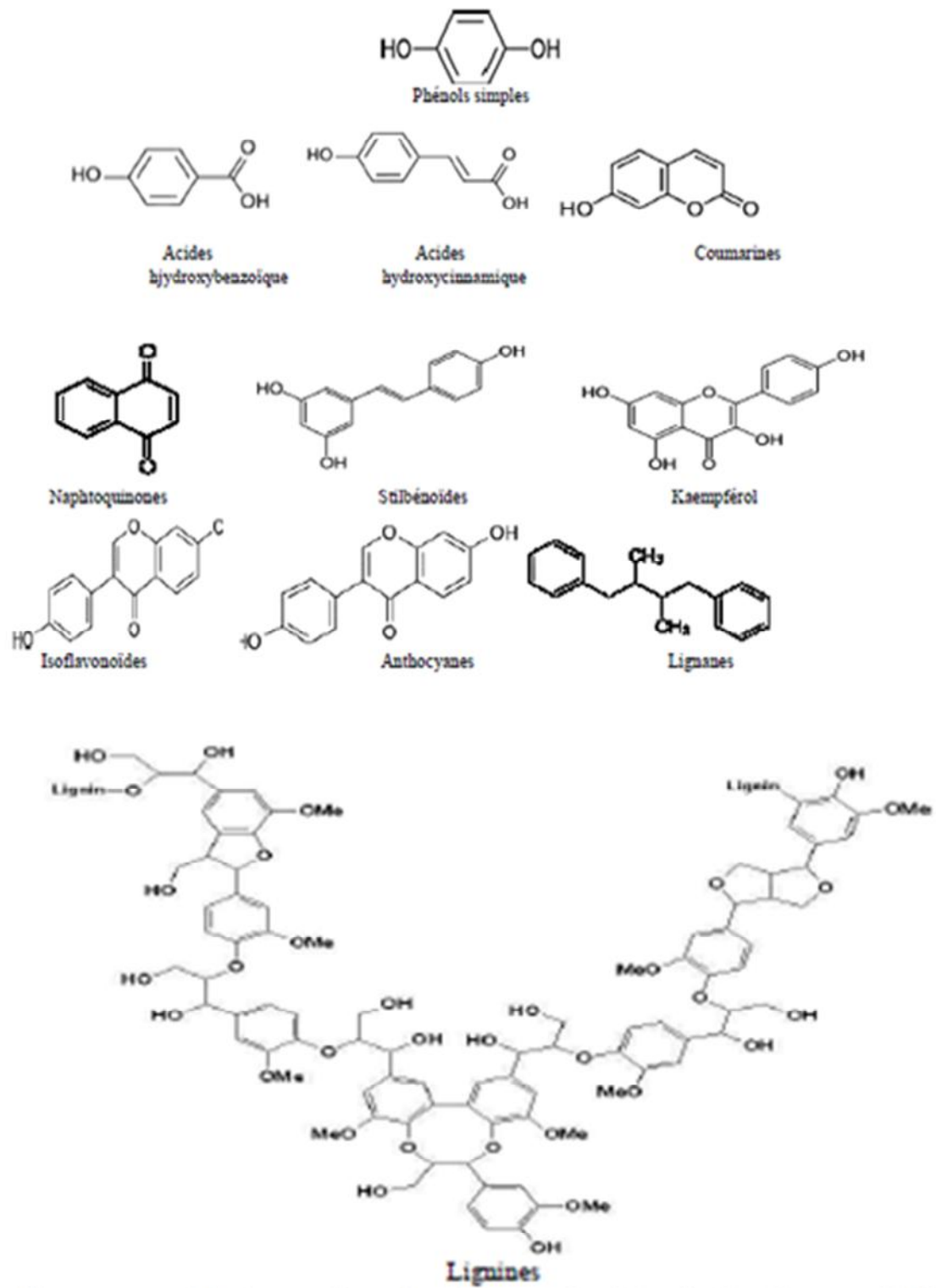


Figure 7: Structures chimiques de principaux polyphénols [34].

II-3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des substances naturelles issues des plantes, présentes dans tout le règne végétal. Ce sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. Ils sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, et sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement.

II.3.1. Structures chimiques et classification

Les flavonoïdes présentent un squelette de base à 15 atomes de carbone, fait de deux cycles benzéniques C₆ reliés par une chaîne en C₃ [3]. Le pont à 3 carbones entre les deux phényles forme généralement un troisième cycle pyrane. La distinction des sous-classes se fait sur la conformation de cette structure centrale (figure 8).

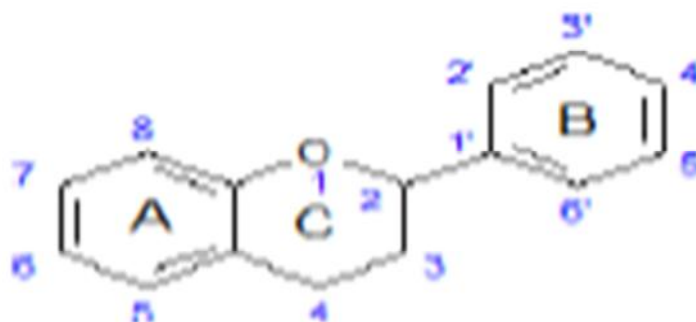


Figure 8: Structure de base des flavonoïdes [35].

Selon le degré d'oxydation du noyau pyranique centrale, les flavonoïdes peuvent être regroupés en une douzaine de classes (figure 9) [36, 37] :

- 2-phenylbenzopyrylium : les anthocyanes.
- 2-phenylchromones :
 - Flavones, flavonols, et leurs dimères
 - Flavonones et dihydroflavonols (dérivés 2,3-dihydrogènes)
 - Isoflavones, isoflavanones.
- 2-phenylchromanes :
 - Flavanes
 - Flavan-3-ols, flavan-3,4-diols.
- Chalcones et dihydrochalcones (le cycle pyranique est ouvert).

- 2-benzylidènes coumaranones (aurones) [38].

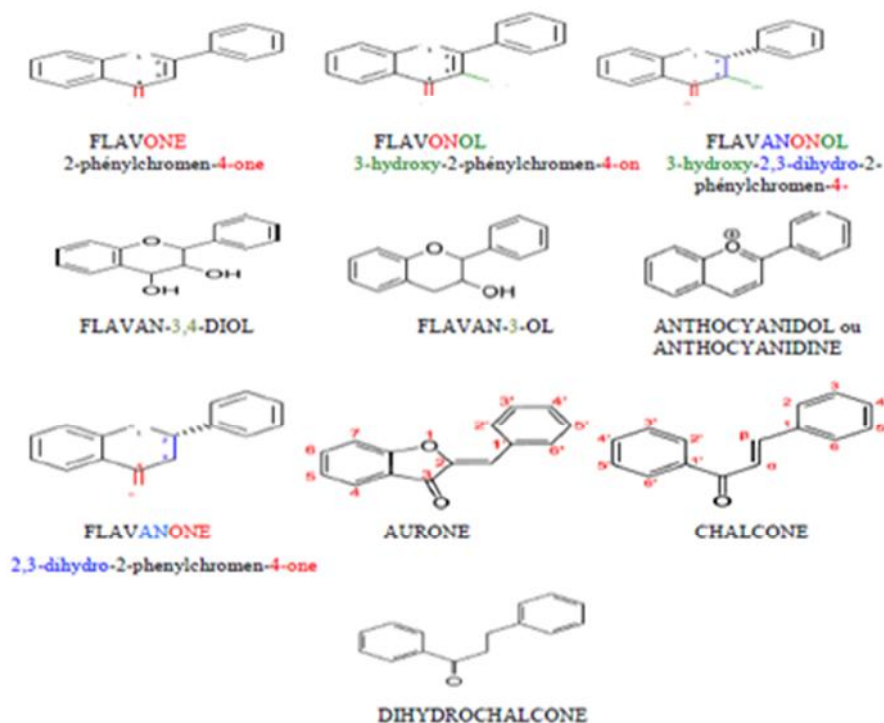


Figure 9: Structures chimiques de quelques flavonoïdes [34].

II. 3.2. Les flavonoïdes et les radicaux libres

Les flavonoïdes sont des composés avec une activité anti-oxydante prononcée. Ils expriment les propriétés antioxydantes par le piégeage direct des espèces réactives de l'oxygène (ERO), La suppression de la formation des ERO par l'inhibition de quelques enzymes ou par chélation des ions métalliques [39].

a. Le piégeage direct des ROS

Les flavonoïdes sont de puissants antioxydants vis-à-vis des radicaux libres dus à leur propriété de donation d'atomes d'hydrogène disponibles dans les substituants hydroxyles de leurs groupes phénoliques. Leur capacité de donation d'hydrogène augmente avec l'augmentation de l'hydroxylation de leurs cycles phénoliques. Cette caractéristique structurale peut être observée dans les flavonoles comme le kaempférolquercétine et myricétine ou l'activité antioxydante est croissante en fonction du nombre des groupements OH dans la molécule (figure 10) [40].

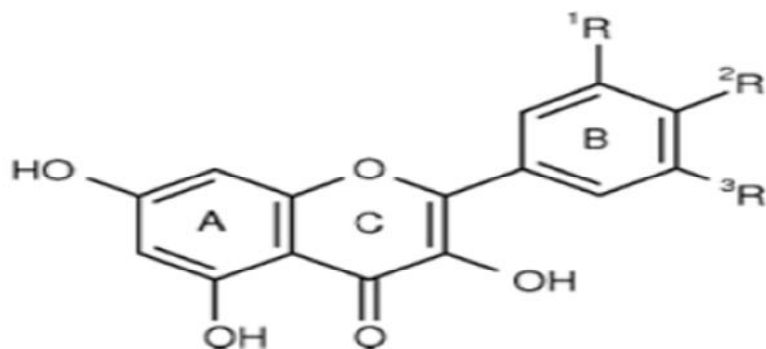


Figure 10: Structures de quelques flavonoles. Kaempférol: $2R=OH$, $1R=3R=H$; Quercétine: $1R=2R=OH$, $3R=H$; Myricétine: $1R=2R=3R=OH$ [40].

b. La chélation des traces métalliques

Les flavonoïdes exercent des effets antioxydants aussi par la chélation des ions métalliques. Il a été postulé par Verdan et ses collaborateurs (2011) que la quercétine et myricétine forment des complexes avec les différents métaux (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , etc.) via les groupements hydroxyle des trois cycles: les groupes hydroxyles du cycle B ainsi que les groupes 3-hydroxy-4-céto et 5-hydroxy-4-céto des cycles A et C. Néanmoins, les deux groupes 3-hydroxy et 5-hydroxy sont particulièrement intéressants car ils sont en compétition pour la fixation du métal (figure 11).

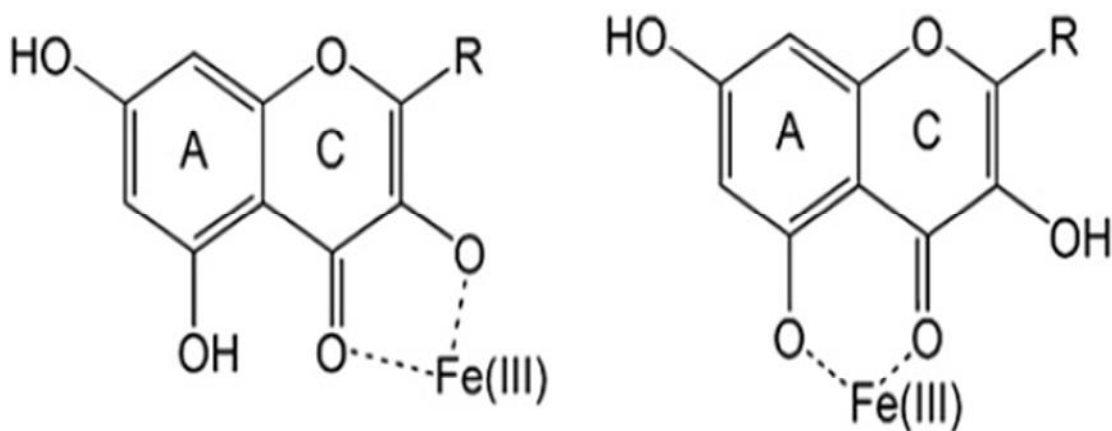


Figure 11 : Sites possibles de la fixation de Fe^{3+} aux cycles A et C des flavonoles. Le métal peut se fixer à la position 3-hydroxy-4-céto (gauche) ou la position 5-hydroxy-4-céto (droite) [41].

II.4. Activités antibactériennes

II.4.1. Généralités :

Il est connu que le traitement des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. Hélas, la consommation à grande échelle de ces « médicaments » a entraîné la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouveaux substituts, surtout les végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration dans les recherches médicales [42].

Toujours dans cet ordre d'idée, les extraits de diverses plantes restent d'un grand intérêt pour la valorisation des ressources naturelles comme remèdes alternatifs dans le traitement de nombreuses maladies et comme de moyens de préservation des aliments contre les processus d'oxydation ont été soulignées dans la littérature scientifique [43].

Plusieurs travaux sont consacrés à l'étude du pouvoir antimicrobien des extraits méthanolique des végétaux.

II.4.2. Définition de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne correspond à l'activité d'une molécule ou composé présent au sein d'un végétale qui à très faible concentration inhibe le développement d'une bactérie ou la tue. La sensibilité d'une bactérie à un antibactérien varie selon la nature de l'antibactérien. Face à un antibactérien, la sensibilité d'une bactérie peut être très différente selon la souche d'appartenance [44].

II.4.3. Activités antimicrobiennes des polyphénols

Les polyphénols sont doués d'activités antimicrobiennes importantes et diverses, probablement dû à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité. Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés et plus ils sont inhibiteurs des microorganismes [45].

Les flavane-3-ols, les flavonols et les tannins ont reçu plus d'attention du à leur large spectre et forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols, à leur capacité de supprimer un nombre de facteurs de virulence microbienne telle que l'inhibition de la formation de biofilms, la neutralisation des toxines bactériennes ainsi qu'à leur capacité d'établir une synergie avec certains antibiotiques.

Revue bibliographique

Les flavonones ayant un groupement de sucre ont aussi montré une activité antimicrobienne, tandis que certaines flavonolignanes n'ont montré aucune activité inhibitrice envers les microorganismes [46].

Les mécanismes responsables de la toxicité des polyphénols envers les microorganismes incluent l'inhibition enzymatique par les composés oxydés, probablement via la réaction avec les groupes sulfhydryle ou par les interactions non spécifiques avec les protéines [47]. L'hydrophobicité des polyphénols tels que les flavonols est aussi un critère de toxicité qui leur permet de s'insérer dans les phospholipides membranaires et exercer leurs effets antibactériens à l'intérieur de la cellule. La déstabilisation de la membrane cytoplasmique et la rendre perméable, l'inhibition des enzymes bactériennes extracellulaires, l'action directe sur le métabolisme bactérien et la privation des substrats requis pour la croissance bactérienne, spécialement les micronutriments minéraux essentiels comme le fer et le zinc (via la propriété de chélation des métaux) sont des mécanismes adaptés par les proanthocyanidines dans l'inhibition des bactéries [46].

Chapitre III
La Foeniculum
Vulgare Mill.

III.1 Généralités

La famille « Apiaceae » (Umbelliferae), qui comporte près de 300 espèces, est représentée dans la plupart des régions du globe [38]. Elle est très importante dans la flore algérienne ou elle est représentée par 55 genres [48].

Très homogène sur le plan botanique, cette famille est caractérisée par son inflorescence en ombelles d'où l'appellation ancienne, mais encore souvent utilisée, d'ombellifères.

Les Apiacées sont des plantes vasculaires à fleurs herbacées, leurs feuilles sont en générale très divisées et leurs fruits sont des diakènes qui se scindent à maturité en deux méricarpes [38].

Le *Foeniculum* (fenouil) est un genre qui appartient à la famille « Apiaceae ». Les plantes appartenant à ce genre ont l'odeur d'anis (*Pimpinella anisum* L), et leurs fruits sont de 5-7* 2-3 mm à bandelettes bien marquées [48].

Le *Foeniculum* est un genre qui comprend une seule race, la *Foeniculum vulgare* Mill, duquel quelques variétés ont été obtenues. La *Foeniculum Vulgare* Mill est une espèce très polymorphe dont on distingue 02 sous-espèces :

- Sous-espèce *piperitum* (fenouil d'âne).
- Sous-espèce *Vulgare* : présente 03 variétés.
 - Variété *azoricum* (fenouil bulbeux).
 - Variété *dulce* (fenouil doux).
 - Variété *vulgare* (fenouil sauvage).

➤ *Foeniculum Vulgare* subsp. *Piperitum*

Comme sous le nom de « fenouil d'âne », cette plante est caractérisée par des segments glauques, charnus, généralement courts [49]. Elle est plus large que le fenouil sauvage (*Foeniculum vulgare* subsp. *vulgare* var. *vulgare*) et le fenouil doux (*Foeniculum vulgare* subsp. *vulgare* var. *dulce*) et elle possède des longues de feuilles qui enveloppent les tiges fleurissantes.

➤ *Foeniculum vulgare* subsp. *vulgare* var. *dulce*

Une variété à feuillage bronze, qui est particulièrement décorative

➤ **Foeniculumvulgaresubsp. Vulgarevar.dulce**

Communément connue sous le nom « fenouil doux ». La forme de cette plante est similaire à celle de la foeniculumvulgaresubsp. Vulgare mais ses fruits sont généralement plus larges. Elle peut être distinguée du foeniculumvulgare par le parfum anisé de ses feuilles et de ses fruits. Cette variété se cultive essentiellement pour ses fruits.

➤ **Foeniculumvulgaresubsp.vulgarevar.azoricum**

Connue sous le nom de « fenouil bulbeux » ou « fenouil de florence ». Cette variété trouve facilement sa place dans les jardins potagers. Les pétioles de ses feuilles sont renflés et fortement imbriqués à la base, formant une « pomme » charnue, ferme, blanche et sucrée, qui se consomme cuite ou crue [48].

III.2. Description générale

La *Foeniculumvulgare* Mill. (*Foeniculumvulgaresubsp. Vulgare* var.) (figure12) communément appelée « fenouil sauvage », « fenouil amer », « fenouil commun » ou « fenouil officinale » (appellation populaire : besbas, non classique : choumra) est une plante médicinale, aromatique et industrielle, appartient à la famille « Apiaceae » (Umbelliferae). Elle est l'une des principales sources d'anéthole, principe des boissons anisées, avec l'anis vert (*Pimpinella* L, Apiaceae) et la badiane de chine (*Illiciumverumhook*, Illiaceae) [50].

C'est une plante annuelle ou persistante dont toutes ses parties sont fortement aromatiques (parfum anisé) [51]. Elle est vivace, à tiges rameuses [52], droites et debouts, vertes grisés ou vertes foncées [51], élevées de 0.8 à 2m, striées, luisantes et pleines [52]. Feuilles glauques, divisées en lanière filiformes, munies de gaines au niveau des bifurcations des rameaux de haut ; inflorescence jaune en grande ombelles de 6 à 20 rayons, sans involucre ni involucelle ; corolle très petite à 5 pétales, 5 étamines et 2 styles. Fruits diakènes [53], oblongs, fuselés, côtelés, à saveur d'anis [52], produisent une huile essentielle aromatique de couleur jaune claire, utilisée dans l'industrie des parfums, des liqueurs et des produits alimentaires [54, 55]. Pétioles charnus à la base, non renflés et beaucoup moins larges que ceux du fenouil doux (*Foeniculumvulgare* var. dulce) ; souche épaisse et ligneuse [52].

Initialement originaire de la méditerranée, la *Foeniculumvulgare* Mill. est cultivé de nos jours en Europe, en Asie, dans certaines parties d'Afrique et en Amérique du sud. Ses fruits se récoltent au début de leur jaunissement [53].



Figure 12: La partie aérienne du fenouil sauvage (*Foeniculum vulgare* Mill) (Photos)

Tableau 2: Classification de la *Foeniculum vulgare* Mill [56].

Règne	plantae	Plantes
Sous-règne	Tracheobionta	Plantes vasculaires
Superdivision	Spermatophyta	Plantes à graines
Division	Magnoliophyta	Plantes fleurissantes
Classe	Magnoliopsida	Dicotylédones
Sous-classe	Rosidae	-
Ordre	Apiales	-
Famille	Apiaceae (Umbellifereae)	Famille des carottes
Genre	<i>Foeniculum</i>	Fenouil
Espèce	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Fenouil sauvage

III.3. Composition chimique

Huile grasse (environ 20%), protéines (environ 20%), flavonoïdes hétérosidiques comportant du quercetol et du kaempferol [52] (3-glycosylés) détectés dans les feuilles et les fruits, flavonoïdes aglycones (kaempferol et quercétine) détectés dans les feuilles [56], acides organiques (acides phénoliques divers : acides quiniques et caféique), traces de coumarines et de furanocoumarines. La stabilité de l'huile grasse est considérable en raison de sa teneur en antioxydants naturels.

- **Huile essentielle**

Trans-anéthole (2-8.5%), (+)-fenchone (50-70%, min 60%), estragole=méthylchavicol (12-18%, min 15%), autres monoterpènes (2-8%, min 5%) : α -pinène, limonène et cis-ocimène (caractéristique du fenouil amer).

La composition de l'huile essentielle peut varier en fonction de l'origine et du degré de maturation des fruits [53].

III.4. Propriétés thérapeutiques

La *Foeniculum vulgare* Mill. était connue et utilisée par les êtres humains depuis l'antiquité [57]. Elle était l'une des neuf herbes sacrées des Anglo-saxons. Les soldats romains en mangeaient pour rester en bonne santé et leurs épouses pour ne pas grossir. Les égyptiens, les chinois, les indiens et les grecs l'ont tous utilisés pour s'assurer une longue vie et s'attirer courage, force et puissance [58].

La *Foeniculum vulgare* Mill. est expectorante, sécrétolytique, antiseptique, elle est utilisée comme un remède naturel dans les troubles digestifs légers [55]. C'est la raison pour laquelle elle est encore souvent ajoutée aux laxatifs pour d'éventuels spasmes fréquemment associés. Les essences de fenouil et les deux variétés de fenouil (dulce et vulgare) sont des carminatifs spasmolytiques et non des carminatifs stimulants [53].

La *Foeniculum vulgare* Mill. est utilisée comme antispasmodique, stimulant d'appétit, diurétique, stomachique, anti-inflammatoire, anti-diarrhéique, anticolique et comme un promoteur de lactation [54]. Elle est un excellent détoiquant de l'organisme après un excès de nourriture ou d'alcool [57].

En médecine traditionnelle, la *Foeniculum vulgare* Mill. est utilisée comme galactagogue et par voie externe en lotion oculaire (décoction), lors de fatigue oculaire et de troubles fonctionnels de la vision [53].

PARTIE
EXPERIMENTALE

Matériels et méthodes

L'étude expérimentale a été effectuée au laboratoire chimie pharmaceutique du Département de Chimie de l'UMMTO.

I. Matériel

I.1. Matériel végétal

La plante (*Foeniculum vulgure* Mill.) utilisée dans cette étude a été cueillie de la région de Mekla (Tizi-Ouzou) en fin Juin 2013, les grains de la plante sont laissés à l'abri de l'humidité et de la chaleur, puis broyées par un mortier. La poudre obtenue est utilisée pour la préparation de l'extrait des polyphénols totaux.

I.2. Souches bactériennes

Le test d'activité antibactérienne de l'extrait des grains de fenouil sauvage a été réalisé au laboratoire microbiologie du centre hospitalier universitaire de Tizi-Ouzou (CHU).

Les souches bactériennes utilisées dans l'essai antibactérien sont : *S. aureus*, *B. cereus*, *S. paratyphi A.*, et *E. coli*.

Ces quatre souches bactériennes qui ont été utilisées dans notre travail sont : deux bactéries Gram positif (G⁺) (*S. aureus A*, *B aureus*) et deux bactéries Gram négatif (G⁻) (*S paratyphi A* et *E coli*). Ces souches bactériennes ont été fournies par l'Hôpital Universitaire de Tizi-Ouzou.

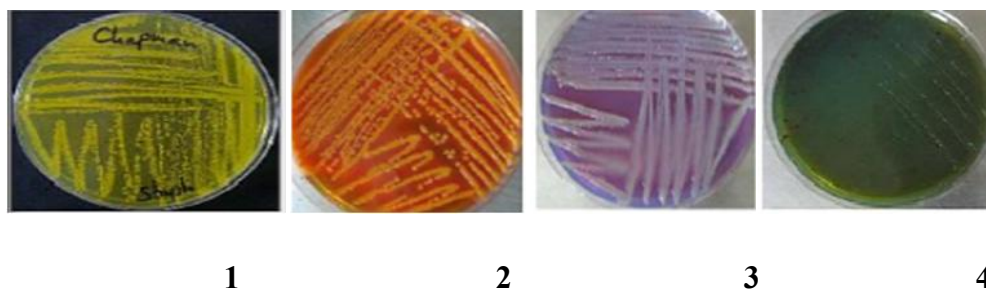


Figure 13 : les souches utilisées.

1-*Staphylococcus aureus*.

2-*Escherichia coli*.

3-*Bacillus cereus*.

4-*Salmonella paratyphi A*.

I.3. Réactifs

Les réactifs chimiques utilisés dans cette étude sont : méthanol, chloroforme, acide acétique glacial, le tampon phosphate, Tween 80, acide trichloracétique (TCA), thiocyanate de potassium (KCN), acide sulfurique (H_2SO_4), $FeCl_3$, réactif de Folin-Ciocalteu, ferricyanide de potassium [$K_3Fe(CN)_6$], Na_2CO_3 . Chlorure ferreux ($FeCl_2$), Acide oléique.

I.4. Solutions de travail

- Solution d'ammoniaque
- Carbonate de sodium Na_2CO_3 (1M) : préparé dans l'eau distillée.
- Réactif de Folin : dilué au 1/10 avec de l'eau distillée.
- Solution de l'acide chlorhydrique aqueux (HCl à 1%).
- $AlCl_3$ (2%) : préparé dans le méthanol.
- Solution de $FeCl_2$ (10%).
- Solution de peroxyde d'hydrogène (2mmol/L).
- $FeCl_2$ (0,4%) : préparée dans l'eau distillée.
- $FeCl_2$ (0,4%) : préparé dans de l'HCl 3,5% (test de peroxydation de l'acide oléique).
- $FeCl_3$ (0,1%) : préparé dans l'eau distillée.
- TCA (10%) : préparé dans le tampon phosphate (0.2M, pH 6,6).

II. Méthodes

II.1. Préparation de l'extrait méthanolique

Selon la méthode de Motamed et Naghibi (2010). Un poids de 25g de la poudre végétale des grains de la plante, est mis en macération dans 100 ml de méthanol 96% pendant 24 heures puis filtré par un papier filtre. Cette opération est réalisée (04) fois. Le filtrat obtenu dans les (4) opération est mélangé dans un erlenmayer puis évaporé à pression atmosphérique et à 40 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif de type HEIDOLPH pendant 2 heures. Le résidu d'évaporation est l'extrait des polyphénols totaux, qui est utilisé dans cette étude. Sachant que cette opération est réalisée 3 fois afin d'obtenir la quantité suffisante pour les expériences effectués.

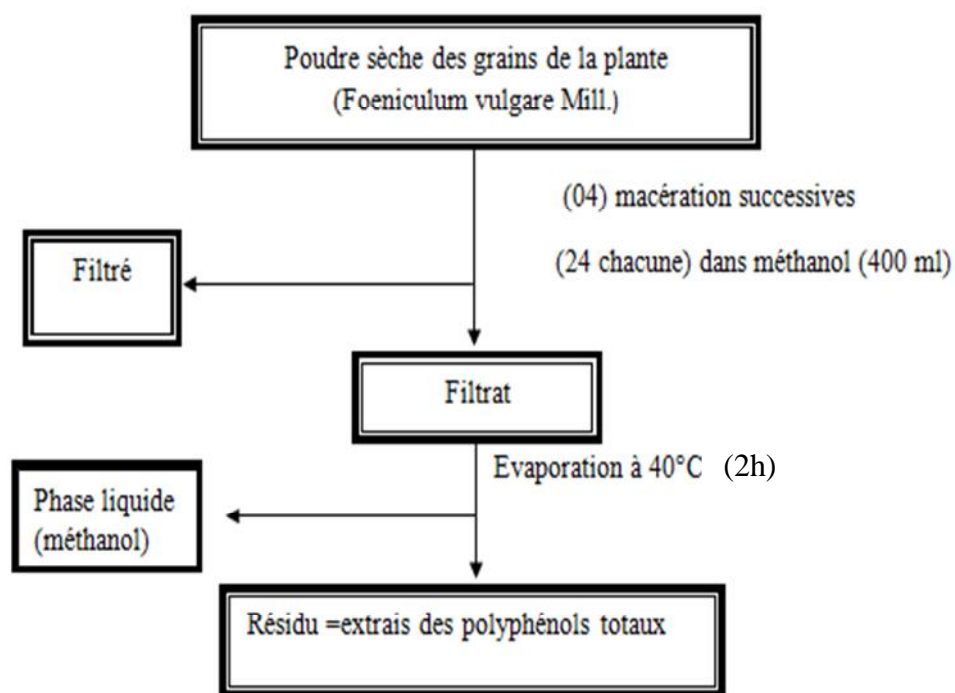


Figure 14 : Procédure expérimentale d'extraction des polyphénols totaux des grains de fenouil sauvage.

II-2. Testes chimiques d'identification des constituants végétaux

II.2.1.. Teste pour les flavonoïdes

- **Test 1**

5ml d'une solution d'ammoniaque diluée sont ajoutés à une portion du filtrat d'une solution aqueuse de l'extrait. L'observation de la couleur jaune, et sa disparition après l'addition de quelques gouttes de l'acide sulfurique concentré, indique la présence des flavonoïdes dans l'extrait [59].

- **Test 2**

Quelques gouttes d'une solution d'aluminium (AlCl_3 à 1%) sont ajoutées à une portion du filtrat aqueux de l'extrait. L'observation de la couleur jaune indique la présence des flavonoïdes dans l'extrait [59].

II.2.2. Test pour les tanins hydrolysables

0.250 g de l'extrait sont ajoutés à 10 ml de l'eau distillée dans un tube à essai et porter à ébullition puis filtrer. Quelques gouttes du chlorure ferrique (FeCl_3 à 1%) sont ajoutés au filtrat, l'observation de la couleur verte-marron (tanins catéchiques) ou bleue nuit (tanins gallique), qui sont les signes de présence des tanins hydrolysables dans l'extrait [59].

II.2.3. Test pour les tanins condensés

Déposition d'un précipité rouge quand un extrait aqueux est porté à ébullition avec l'acide chlorhydrique aqueux (HCl à 1%) [59].

II.2.4. Test pour les saponines

Pour mettre en évidence les saponines, nous avons introduit 10 ml de l'extrait aqueux dans un tube à essai. Le tube est agité pendant 15 secondes puis laissé au repos pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence des saponines [60].

II.2.5. Test pour les terpeno des

5 ml de la solution aqueuse de l'extrait sont ajoutés à 2 ml du chloroforme, après une simple agitation, nous avons ajouté quelques gouttes de H_2SO_4 [61].

II.2.6. Test pour les glycosides

1ml d'acide acétique glacial, quelques gouttes de $FeCl_3$ et de H_2SO_4 concentré sont mélangés. la disposition d'un précipité vert-bleu indique la présence des glycosides [61].

II.2.7. Test pour les stéroïdes

1 ml de l'extrait des phénols totaux est mélangé à 2 ml de chloroforme L'obtention d'une couleur marron violacé indique la présence des stéroïdes [61].

II.3. Dosage des phénols totaux

La détermination quantitative des phénols totaux dans l'extrait préparé a été réalisé par la méthode de McDonald et al, 2001 [62], basé sur le réactif de Folin-Ciocalteu.

Principe

L'ensemble des composés phénoliques de l'extrait est oxydé par le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PM_{12}O_{40}$) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}).

La coloration bleue produite de l'oxydation possède une absorption maximal aux environ de 750 nm. Elle est proportionnelle aux taux des composés phénoliques présents dans l'extrait.

- A 0.125 ml d'une solution méthanolique de l'extrait (0.1 mg/ml), un volume de 1.250 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (dix fois dilué par l'eau distillée) est ajouté. Après agitation, un volume de 1ml de Na_2CO_3 aqueux à 1M est ensuite ajouté. Le mélange obtenu est agité puis chauffé à $45^\circ C$ pendant 15 minutes dans un bain Marie. L'absorbance du mélange réactionnel est mesurée à 750 nm, contre un blanc préparé dans les mêmes conditions, remplaçant le volume de l'extrait par le même volume de l'eau distillée.

Une courbe de calibration se prépare de la même façon à celle de l'échantillon, par la préparation de différentes concentrations de l'acide gallique dans le méthanol-eau (50 :50 , v / v) allant de 0 à 250 mg /l.

II.4. Dosage des flavonoïdes totaux

Le contenu des flavonoïdes totaux dans l'extrait préparé a été déterminé par la méthode colorimétrique du chlorure d'aluminium (AlCl_3) de Chang et *al.*, 2002 [63].

Principe

Le chlorure d'aluminium AlCl_3 forme des complexes acides stables avec le groupe cétoné en position (4) et l'un des deux groupes hydroxyle sur les positions C3 et C5 chez les flavones et les flavonols, comme il forme aussi des complexes acides labiles avec les groupes ortho-dihydroxyles dans les deux cycles A et B des flavonoïdes. Ces complexes sont caractérisés par la longueur d'onde d'absorption moyenne de 415 nm.

La solution méthanolique de l'extrait utilisé (1g /ml) a été utilisée pour la réalisation de ce dosage.

- 0.250 ml de la solution méthanolique de l'extrait est séparément mélangé avec 0.75 ml de méthanol, 50 μl de AlCl_3 aqueux à 10%, 50 μl d'acétate de potassium aqueux (1M) et 1.4ml d'eau distillée. Après incubation à température ambiante pendant 30 minutes, les absorbances du mélange réactionnel sont mesurées à 415 nm avec spectrophotomètre UV-visible.

Le volume du chlorure d'aluminium aqueux à 10% est substitué par le même volume d'eau distillée dans l'échantillon blanc.

Une courbe de calibration est préparée de la même manière à celle de l'échantillon, par la préparation de différentes solutions méthanoliques de la quercétine allant de la concentration de 25 à 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

II.5. Activité antioxydante

II.5.1. Piégeage de H_2O_2 :

Le piégeage du radical peroxyde d'hydrogène a été déterminé par la méthode de (Ruch, Cheng, et Klauning 1989).

- Quatre solutions de l'extrait à des concentrations différentes ont été préparées.

Tableau 3 : solutions préparé de l'extrait à différente concentration.

solution	1	2	3	4
Concentration (mg/ml)	50	100	150	200

- Une solution de H₂O₂ à une concentration de 2mmol/l a été préparée dans le tanpon phosphate (PH 7.4).
- Un volume de 0.6ml de chaque solution de l'extrait a été mélangé avec 10ml de la solution de H₂O₂.
- D'autre part on a préparé un blanc dans les même conditions son la présence de l'antioxydant (l'extrait).
- Après 10min l'absorbance de peroxyde d'hydrogène a été mesuré à 230nm.

$$\% \text{ de piégeage H}_2\text{O}_2 = [(A_0 - A_1)/A_0] / 100$$

Telle que :

A₀ représente l'absorbance sans l'antioxydant.

A₁ représente l'absorbance en présence de l'antioxydant.

II.5.2. Peroxydation de l'acide oléique

L'activité antioxydante totale de l'extrait méthanolique de *Foeniculum vulgure Mill.* est déterminée selon la méthode de thiocyanate ferrique décrite par Gulcin et ses collaborateurs (2005) avec légères modifications. Premièrement, une émulsion de l'acide oléique est préparée en mélangeant 0,028 g d'acide oléique, 0,028 g de Tween 80 et 10 ml de solution tampon phosphate (0,04 M, pH 7.0). Le milieu réactionnel contient 50ml de solutions d'extraits à une concentration bien définie (1mg/ml) et 50ml de l'émulsion de l'acide oléique. Le contrôle négatif contient tous les réactifs sauf l'échantillon à tester (extrait) qui est remplacé par un volume égal de la solution tampon. Après agitation, le mélange est incubé à 37°C. La lecture est faite après 15 min d'incubation puis chaque 24 heures pendant 72 heures, en mélangeant 10ml KCN, 15ml d'échantillon et 10ml de FeCl₂ et après 3min, l'absorbance est lue à 500 nm contre un blanc de méthanol. Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique est calculé selon l'équation suivante:

$$\% \text{ d'inhibition de peroxydation} = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

Ac : absorbance du contrôle.

At : Absorbance du test.

II.5.3. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique de *FoeniculumvulgureMill.* est déterminé selon la méthode d'Oyaizu (1986) avec quelques modifications. Différentes concentrations d'extrait ou de l'antioxydant (50-200mg/ml) sont mélangées avec 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 6.6) et 2,5 ml de ferricyanide de potassium [K₃Fe(CN)₆] (1%). Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min. Ensuite l'absorbance est lue à 700 nm.

II.6. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *FoeniculumvulgureMill.* est évaluée par la technique de diffusion sur disque selon la méthode décrite par Falleh et ses collaborateurs (2008) vis-à-vis de quatre souches bactériennes.

Méthode de diffusion sur disques (aromatogrammes) :

L'aromatogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode de disques est une technique qualitative permettant de déterminer la sensibilité des microorganismes vis-à-vis d'une substance réputée antimicrobienne.

Le principe de cette méthode repose sur le pouvoir migratoire de l'extrait à l'intérieur d'une boîte de Pétri, dans un milieu nutritif solide (Mueller Hinton) ou des disques stériles de papier Wattman (D=6 mm) imprégnés d'une quantité de l'extrait, sont déposés au centre de ces boîtes. Celles-ci sont ensuite fermées et laissées diffuser pendant 20 mn puis incubées à 37°C pendant 24 h. Après incubation, l'absence de croissance bactérienne exprimant une activité antimicrobienne se traduit par un halo translucide autour du disque, de même couleur que la gélose stérile et dont le diamètre est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse (ou une règle) (exprimé en mm) [64].

La sensibilité des différentes souches vis-à-vis des H.Es étudiées est classée selon le diamètre d'inhibition (tableau 4).

Tableau 4 : La sensibilité des souches vis-à-vis des extraits [64]

le diamètre d'inhibition « D »	Sensibilité
<8 mm	non sensible (-)
Compris 9-14 mm	sensible (+)
15-19 mm	très sensible (++)
>20 mm	extrêmement sensible (+++)

III. Analyse spectroscopique

Spectroscopie ultra-violet /vis (UV/Vis)

Les échantillons (4) de l'extrait ont été dissouts dans l'eau distillée à $10^{-4}M$ et les mesures d'absorbance ont été enregistrées sur un appareil de marque Shimadzu de type UV-1601PC, dans des cellules en quartz suprasil Hellma (laboratoire de Chimie Appliqué de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou).

Résultats et discussion

RESULTATS

1. Préparation de l'extrait

La macération de 25g de la poudre dans le méthanol a donné 9,78 g d'extrait de couleur brune foncée avec un rendement de 39,12%.

Les études précédentes montrent que le méthanol est l'un des solvants les plus utilisés pour une haute récupération de composés phénoliques et l'obtention d'une meilleure activité antioxydante, encore les solvants alcooliques sont capables d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires en facilitant l'extraction d'un plus grand nombre de molécules. [66]. Ce solvant a été utilisé dans cette étude pour obtenir les extraits à partir des grains de Fenouil sauvage.

L'utilisation de la poudre à la place des grains entière a pour but d'améliorer l'extraction du fait de rendre l'échantillon plus homogène, augmenter la surface du contact avec le solvant et faciliter sa pénétration à l'intérieur des cellules qui ne sont pas détruites après le broyage,. De plus, le déroulement de la macération pendant un temps étalé (96 h) et à température ambiante permet respectivement, d'extraire au maximum les différents composés de la poudre et la prévention de leur altération ou modification probable par la température élevé.

2. Tests chimiques d'identification des constituants

Tableau 5:Résultats des tests chimique d'identification des constituants végétaux de l'extrait.

Test pour		Résultat
Les flavonoïdes	Test1	+
	Test 2	+
Les tanins hydrolysables		+
Les tanins condensés		-
Terpeno des		+
Glycosides		-
Stéroïdes		+
Saponine		+

(+) = présence du constituant dans l'extrait.

(-) = absence du constituant dans l'extrait.

Les deux tests d'identification des flavonoïdes et les tests chimique d'identification des (tanins hydrolysable, des Terpeno des, saponine et des Stéroïdes) étaient positifs. Cependant, les tests chimiques d'identification des tanins condensés et des glycosides étaient négatifs.

Ces tests chimiques d'identification montrent que notre extrait préparé des polyphénols totaux des grains de la *Foeniculum vulgare Mill.* Contient des flavonoïdes, des tanins hydrolysables, des Terpeno des, des saponines et des stéroïdes et il ne contient pas des tanins condensés et les glycosides.

3. Dosages spectrophotométrique

3.1. Dosage des phénols totaux

Le dosage des phénols totaux dans l'extrait préparé, réalisé par la méthode spectrophotométrique de McDonald et al, 2001 [62] a donné les résultats suivants :

L'équation de la courbe de calibration préparée par l'acide gallique est :

$$y = 0.0051x - 0.035, \quad r^2 = 0.9974 \quad (21)$$

y = l'absorbance mesurée par le spectrophotomètre.

x = la concentration de la solution de l'acide gallique (mg/l) dans le méthanol-eau (50 :50, v/v).

La concentration des phénols totaux dans l'extrait, exprimée comme acide gallique équivalent (AGE), est calculée par l'équation précédente comme suit :

$$C = x = (y + 0.035) / 0.0051 \quad (\text{mg/l})$$

y = l'absorbance de la solution analysée de l'extrait, mesurée par le spectrophotomètre.

C = la concentration recherchée des phénols totaux dans la solution analysée de l'extrait, exprimée comme (AGE) en (mg /l).

Le taux des phénols totaux calculés (en mg/g de l'extrait) dans l'extrait préparé, exprimés comme (AGE) sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 6 : les résultats de dosage des phénols totaux.

		Solution méthanolique de l'extrait (1mg/ml)
Taux des phénols totaux (mg AGE /g extrait)	Essai 1	428
	Essai 2	408

Le taux moyen des phénols totaux dans l'extrait préparé des grains de *Foeniculum vulgare Mill.*, exprimée comme acide gallique équivalent (AGE), est :

$$C=418 \text{ mg AGE /g (extrait)}$$

3.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes totaux réalisé par la méthode spectrophotométrique de chang et al, 2002 [63] a donné les résultats suivants:

L'équation de la courbe de calibration préparée par la quercetine est :

$$y = 0.006 x + 0.025, \quad r^2 = 0.9971$$

y = l'absorbance mesurée par le spectrophotomètre.

x = la concentration de la solution méthanolique de la quercetine (ug/ml).

La concentration des flavonoïdes totaux dans l'extrait préparé, exprimé comme quercetine équivalent (QE), est calculée par l'équation précédente comme suit :

$$C = x = (y - 0.025)/0.06 \text{ (ug/ml)}$$

y = l'absorbance de la solution analysée de l'extrait, mesurée par le spectrophotomètre.

C = la concentration recherchée des flavonoïdes totaux dans la solution analysée de l'extrait, exprimé comme (QE) en (ug/ml).

Les taux des flavonoïdes totaux calculés (en mg/g) dans l'extrait préparé, exprimés comme (QE), sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 7: Les résultats de dosage des flavonoïdes totaux.

		Solution méthanolique de l'extrait (1mg/ml)
Taux des flavonoïdes totaux (mg QE/g extrait)	Essai 1	120
	Essai 2	104
	Essai 3	109

Le taux moyen des flavonoïdes totaux dans l'extrait préparé des grains de la *Foeniculum vulgure Mill.*, exprimée comme quercetine équivalent, est :

$$C = 111 \text{ mg QE/g(extrait)}$$

Les composés phénoliques comme les acides phénoliques, les flavonoïdes sont considérés comme les contributeurs majeurs à la capacité anti-oxydante des plantes. Ces composés possèdent aussi diverses activités biologiques telles que les activités anti-inflammatoire, antibactérienne [68]. C'est la raison pour laquelle, les dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes de l'extrait des grains de *Foeniculum vulgure Mill* ont été effectués dans cette étude.

Le dosage des polyphénols totaux est fait par la méthode de Folin-Ciocalteu. Cette méthode est considérée comme la meilleure méthode de détermination du taux des polyphénols totaux des extraits de plantes [79] car elle est standardisée et simple, elle a donné une valeur de 418 ± 24.04 mg /g (extrait), indiquant la nature phénolique de l'extrait.

Les flavonoïdes comme composés les plus intéressants des polyphénols sont aussi déterminés dans ce travail par la méthode du trichlorure d'aluminium. Le dosage a donné une valeur de $111 \pm 8,18$ mg /g(extrait) montrant aussi la présence des flavonoïdes en quantité importante dans l'extrait.

4. L'activité antioxydante *in vitro*

Les processus oxydatifs sont multiples et la nature de l'activité antioxydante peut être multiforme et attribuée à différents mécanismes [70].

4.1. Piégeage de radical peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Tableau 8 : Les résultats de l'activité antiradicalaire de l'extrait vis-à-vis le H₂O₂.

Solution	Blanc	1	2	3	4
Absorbance à (230nm)	48	37	29	24	22

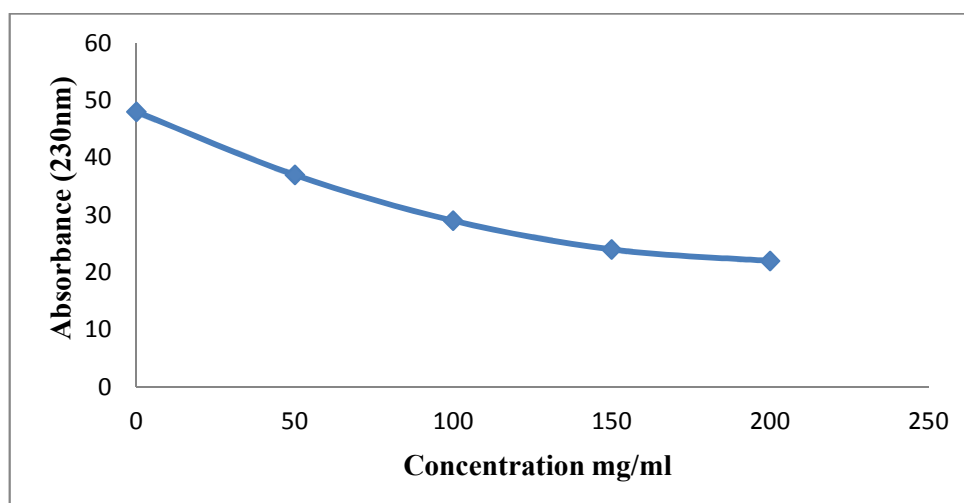


Figure 15 : Activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique des grains de fenouil sauvage vis-à-vis du radical peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

L'activité anti-radicalaire est très importante dû au rôle délétère des radicaux libres dans les systèmes biologiques. La méthode du radical de H₂O₂, utilisée dans le présent travail, est une procédure commune dans laquelle l'activité antioxydante de l'échantillon étudié est estimée par l'absorbance de H₂O₂.

D'après les résultats obtenus et qui sont exprimé sous forme de graphe on remarque que l'absorbance de peroxyde d'hydrogène diminue avec l'augmentation de la concentration des solutions en extrait des grains de fenouil sauvage (antioxydant).

4.2. Effet sur la peroxydation de l'acide oléique

La figure (16) montre la cinétique de la peroxydation de l'acide oléique en présence et en absence de l'extrait méthanolique de *Foeniculum vulgure Mill.* Les absorbances sont presque stables tout au long de 72 heures, indiquant une forte activité antioxydante par rapport au contrôle négatif.

Tableau9: Les résultats de la peroxydation de l'acide oléique.

	Temps (h)	0	24	48	72
Absorbance (nm)	contrôle	0.22	0.5	0.63	0.82
	test	0.39	0.36	0.35	0.35

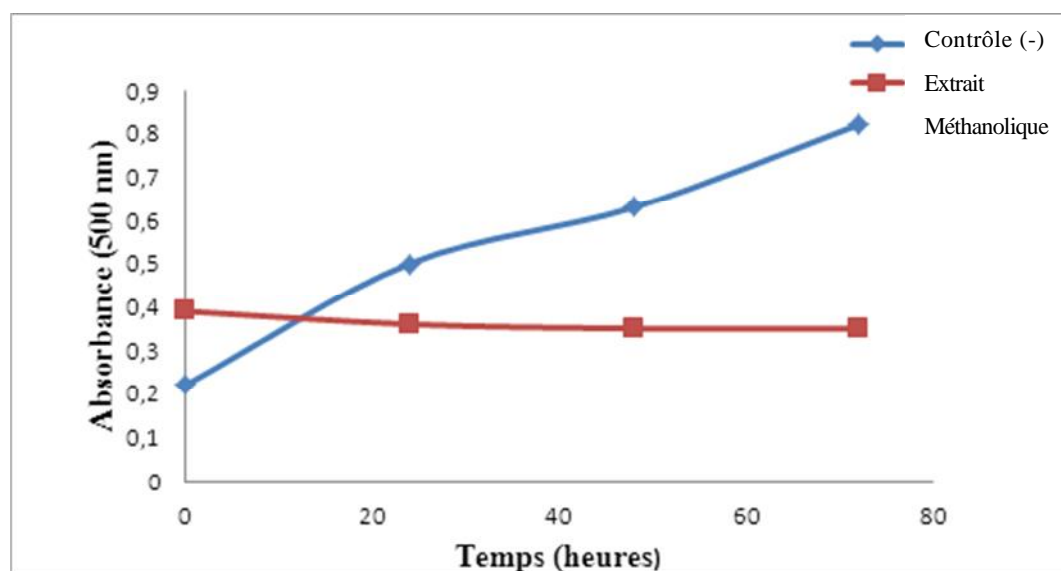


Figure 16: Cinétique de la peroxydation de l'acide oléique en présence et en absence de l'extrait méthanolique à 500 nm.

L'oxydation des lipides dans les aliments pose de sérieux problèmes pour l'industrie alimentaire. Elle est à l'origine des mauvais goûts, odeurs et produits toxiques qui touchent à la santé des consommateurs [68]. L'oxydation lipidique peut aussi avoir lieu *in vivo*. Il est très important de chercher des inhibiteurs de la peroxydation lipidique dans l'organisme [65].

Dans le présent travail, un test de peroxydation lipidique est effectué, qui est le test de peroxydation de l'acide oléique pour évaluer l'activité inhibitrice de l'oxydation lipidique de l'extrait méthanolique des grains de *foeniculum vulgure* Mill. Cet effet de l'extrait méthanolique est déterminé par la méthode de thiocyanate ferrique dans un système contenant l'acide oléique. Durant l'oxydation de l'acide oléique, les peroxydes sont formés et sont à l'origine de l'oxydation des ions Fe^{2+} en Fe^{3+} . Ces derniers forment un complexe avec l'ammonium thiocyanate qui a un maximum d'absorption à 500 nm indiquant l'oxydation de l'acide oléique [68]. La peroxydation lipidique *in vivo* est une altération oxydative des acides gras polyinsaturés dans les membranes cellulaires catalysée par les radicaux libres [65]. Ainsi, l'acide oléique pourrait servir comme modèle d'acides gras trouvés dans les membranes. Les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanolique exerce un très bon effet et suggèrent que l'extrait a une capacité considérable de réagir avec les radicaux libres pour les convertir en espèces non réactives et interrompre la chaîne de réactions radicalaires. Cela reflète aussi la solubilité des composés antioxydants de l'extrait dans l'huile voire les émulsions.

4.3. Pouvoir réducteur

Les résultats montrent que l'extrait possède un pouvoir réducteur remarquable, et qui sont regroupé dans le tableau suivant:

Tableau 10 : Les résultats de pouvoir réducteur de l'extrait.

Essai	1	2	3	4
Absorbance	0.2	0.7	1.4	1.8

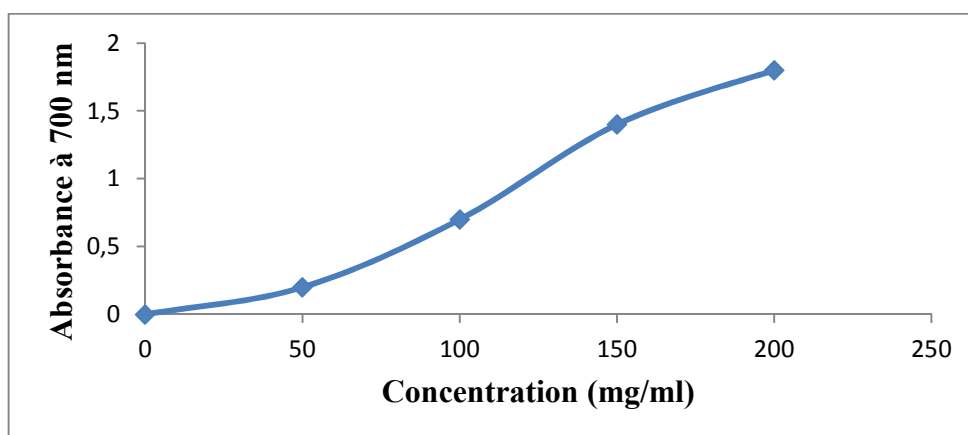


Figure 17 : Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique de *Foeniculum vulgare* Mill à 700 nm.

La capacité de donation d'électrons dans une réaction d'oxydoréduction peut être aussi utilisée dans la mesure de l'activité antioxydante d'un composé. Cette capacité de donation d'électrons est appelée pouvoir réducteur. Le pouvoir réducteur de notre extrait est mesuré dans cette étude par la réduction directe de $\text{Fe}^{3+}(\text{CN})_6$ en une forme ferreuse $\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6$ qui est déterminée par la détection spectrophotométrique du complexe $(\text{Fe}^{3+})_4[\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6]_3$ ayant une forte absorption à 700 nm [71]. La couleur jaune du milieu réactionnel change en vert dont l'intensité est en fonction du pouvoir réducteur de l'échantillon étudié. Cela démontre la propriété de donation d'électrons et par conséquent la capacité de l'extrait à neutraliser les radicaux libres. Les flavonoïdes sont des principaux donneurs d'électrons. Et d'après le graphe obtenu nous remarquons que l'absorbance augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait dans les solutions et cela s'explique par la capacité des antioxydants à réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} .

5. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *Foeniculum vulgure Mill* est testée vis-à-vis quatre souches bactériennes via la méthode de diffusion sur disque. Les résultats révèlent que l'extrait méthanolique exerce un effet antibactérien très important sur *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* avec des zones d'inhibition de 15mm et 16,5 mm, et un effet moyenne pour les deux autres bactéries *Escherichia coli* et *Salmonella paratyphi A* avec des zones d'inhibitions de 11,5 et 13 mm.

Les résultats expérimentaux sont présentés dans le Tableau.

Tableau 11 : Halos d'inhibition (mm) provoqués par l'extrait des grains de fenouil sauvage.

Souches	Le diamètre d'inhibition (mm)	Sensibilité
Staphylococcus aureus	15	++
Escherichia coli	11.5	+
Bacillus cereus.	16.5	++
Salmonella paratyphi A.	13	+

(++) = très Sensible

(+) = sensible

D'après les résultats obtenus, nous pouvons dire que toutes les espèces testées présentent une certaine sensibilité vis-à-vis l'extrait des grains de fenouil sauvage. Cependant, *E. coli* et *Salmonella paratyphi A* sont moins sensibles, tandis que *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* sont révélées très sensibles.

Des bactéries Gram- se sont montrées généralement plus résistantes que les Gram+ en raison des lipopolysaccharides présents dans la membrane externe.

6-Etude en spectroscopie UV/visible

Les échantillons ont été dissous dans l'eau à $10^{-4}M$, puis en faisant un balayage sur un intervalle de 200 à 800 nm.

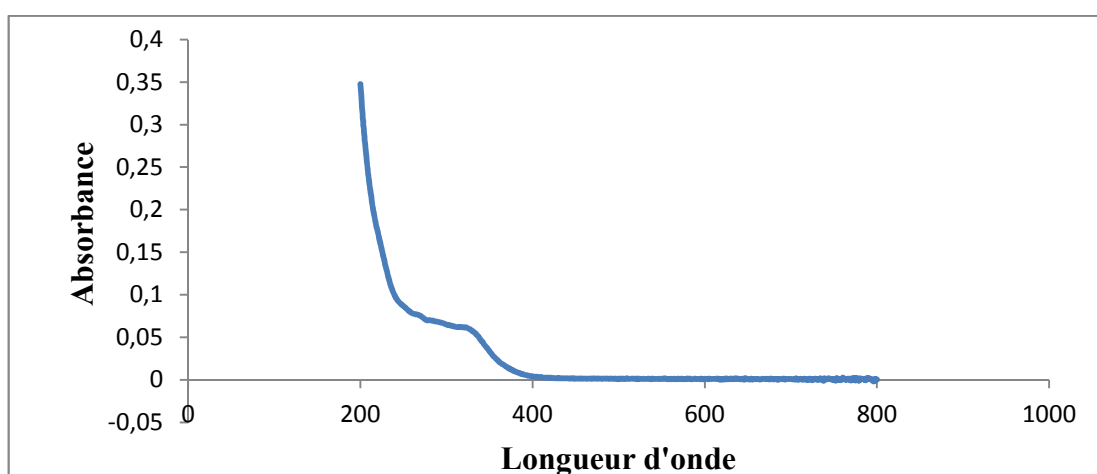


Figure 18 : Spectre UV/vis du l'H.E à $10^{-4}M$.

Nous avons obtenu un graphe qui montre l'apparition de deux bandes ; une qui absorbe entre 200 et 230 nm et l'autre entre 250 et 280 (figure 18) est très probablement en faveur de flavonoïdes de type flavonols substitué en position 3.

Conclusion générale

Plusieurs antioxydants de synthèse sont utilisés comme additifs alimentaires pour prévenir la détérioration biologique. Bien que ces antioxydants synthétiques montrent une activité antioxydante plus puissante que celle des antioxydants naturels, il y a une préoccupation concernant leurs effets néfastes sur la santé, car ils peuvent être impliqués dans les dommages biologiques [65].

Ce sont les raisons pour lesquelles, la recherche scientifique s'est focalisée récemment sur l'investigation de nouveaux agents antioxydants et antibactériens d'origine végétale particulièrement les polyphénols qui peuvent être des alternatives aux substances synthétiques [65]. Dans ce cadre s'inscrit ce travail qui consiste à tester les activités antioxydantes et l'activité antibactérienne de la plante *Foeniculum vulgure Mill.*

Les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes ainsi que les effets anti-oxydants et l'effet antibactérien de l'extrait méthanolique des grains de fenouil sauvage ont été évalués dans le présent travail.

Les résultats montrent que l'extrait est riche en composés polyphénoliques.

Par ailleurs, l'extrait possède une activité antioxydante importante *in vitro*. Il montre une inhibition très importante vis-à-vis du radical H_2O_2 , un excellent effet inhibiteur de la peroxydation lipidique et un puissant pouvoir réducteur.

En outre, l'extrait méthanolique des grains de fenouil sauvage a montré une activité antibactérienne remarquable vis-à-vis de quatre souches bactériennes.

La plante de *Foeniculum vulgure Mill* est une source prometteuse d'agents antioxydants et antibactériens ce qui est expliqué par la nature des composés présents dans cette plante. D'autres études concernant l'identification des molécules bioactives, la confirmation de la capacité antioxydante de *Foeniculum vulgure Mill* par des tests *in vivo* ainsi que l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de cette plante et des extraits vis-à-vis d'autres souches bactériennes sont nécessaires.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- [1] **Tessier F., Marconnet P., 1995.** Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice-revue. *Science and Sports*, 10: 1-13.
- [2] **Koechlin-Ramonatxo C., 2006.** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20 : 165-177.
- [3] **Milane H., 2004.** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. *Thèse de doctorat, université de Louis Pasteur, Strasbourg I*, pp : 37-36.
- [4] **Savard S., 2005.** Etude de la surexpression *in vivo* du monoxyde d'azote synthase endothéliale chez le rat urémique : Effets sur la dysfonction endothéliale en insuffisance rénale. Mémoire de l'université de Laval, pp : 42-45.
- [5] **Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D., 2003.**
Espèces réactives de l'oxygène, comment l'oxygène peut-il devenir toxique. *L'Actualité Chimique : novembre-décembre*, pp : 91-96.
- [6] **Girotti-Chanu C., 2006.** Etude de la lipolyse et de la synthèse de composés du derme sous l'effet de la cirsimarine, flavone extraite de *Microtea debilis*. *Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon*, pp : 36-37.
- [7] **Ghisolfi-Marque A., Boyer M-J., Vellas B., Thouvenot J-P., Albared J-I., Ghisolfi J., 1996.** Activité anti-oxydante, lipoperoxydation et vieillissement chez l'homme. *Nutr.Clin .Métabol . 10* : 151-160.
- [8] **Soares A.F., 2005.** Effets du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes : Adiponectine et prostaglandines. Thèse de doctorat, Institut National des sciences Appliquées de Lyon, pp : 35-43.
- [9] **Januel C., 2003.** Stress oxydant au niveau des plaquettes sanguines humaines dans le contexte du diabète, étude du glutathion et de la glutathion peroxydase 4. *Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon*, pp : 41-57.

- [10] **Favier A., 2003.** Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique, novembre-décembre*, pp : 108-115.
- [11] **Scheibmier H-d., Christensen K., Whitaker S.H., Jegaethesan J., Clancy R., Pierce J.D., 2005.** A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive and Critical Care Nursing*, 21:24-28.
- [12] **Oktay M., Gülçin İ., Küfrevioğlu Ö.İ., 2003.** Determination of in vivo antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologies*, 36: 236-271.
- [13] **Fiorucci S., 2006.** Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. *Thèse de doctorat, université de Nice-Sofia Antipolis*, pp: 19-20.
- [14] **Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Free Radicals in Biology and Medicine**, 3rd ed., Oxford University Press, 1999.
- [15] **Cadenas E., Davies J.A., Free Radic. Biol. Med., 2000, 29, p. 222.**
- [16] **Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M., 2006.** Free radicals, metals and oxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological interaction*, 160:1-40.
- [17] **Bonnefont-Rousselot D, Peynet J, Beaudoux J L, Thérond P, Legrand A and Delattre J (2002).** Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16, 260-267.
- [18] **Singal P.K., Petkau A. Gerrard J.M.** Free Radicals in health and disease. *Mol. Cell. Biochem.* 121-122, 1988.
- [19] **Pincemail J, Meurisse M, Limet R et Defraigne J O (1999).** L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Cœur, Poumons*, 4 (5).
- [20] **Chu W L, Lim Y W, Radhakrishnan A K and Lim P E (2010).** Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10 (53), 2-8.

- [21] **Nafia I., Nieoullon A., Kerkerian Le Goll L., Had-Aissouni L., 2005.** Stress oxydatif cerebral: les astrocytes sont-ils vulnérable aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate, Implications sur la survie neuronale, *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 24 :502-509.
- [22] **Boots A.W., Haenen G.R.M.M., Bast A., 2008.** Health effects of quercetin: From ontioxidant to nutraceutical. *European journal of pharmacology*, 585: 325-337.
- [23] **Ahsan H, Ali A and Ali R (2003).** Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clinical and Experimental Immunology*, **131**, 398-404.
- [24] **Evans W J (2000).** Vitamin E, vitamin C and exercise. *American Journal of Clinical Nutrition*, **72**, 647-652.
- [25] **Cadet J., Bellon S., Berger M., Bourdat A.G., Douki T., Duarte V., Frelon S., Gasparutto D., Muller E., Ravanat J.L., Sauvaigo S., 2002.** Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases, *Biol. Chem.*, **383(6)**, p. 93.
- [26] **Aruoma O I (1999).** Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, **8 (1)**, 53-63.
- [27] **Halliwell B and Gutteridge J M C (2007).** Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford (fourth edition).
- [28] **Tang S Y and Halliwell B (2010).** Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **394**, 1-5.
- [29] **Blokhina O, Virolainen E and Fagerstedt K V (2003).** Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a Review. *Annals of Botany*, **91**, 179-194.
- [30] **Bahorun, T. (1997).** Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne .une source d'approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research council Mauritiias*, p83-94.
- [31] **Akowauh, G.A., Zhari, I., Norgyati, I., Sadikun, A., Khamsah, S.M. (2004).**The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphénols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food chemistry*, **87**: 559-566.

- [32] **B., Jakabova, S., Dorneyi, A., Horvath, G., Pluhar, Z., Kilar, F., Felinger, A.** (2010). Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*, **1217**: 7972–7980.
- [33] **Paraskevi, Moutsatsou.** (2007). The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. *Hormones*, **6** (3): 173-193.
- [34] **Scalbert, A., Williamson, G. (2000).** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, **130** : 2073-2085.
- [35] **Dacosta, E. (2003).** Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (éd). Paris, p317.
- Das, Manika., Das, Dipak. K.**2010). Resveratrol and cardiovascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, **31**: 503–512.
- [36] **Dragan A., Dusanka D-A., Drago B., Nenad T., 2003.** Structure- radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croat. Chem. Acta.*, 76 (1): 55-61.
- [37] **Harborne J.B., 1984.** Phytochemical methods, a guide to modern techniques of plant analysis. *Chapman and Hall*, 2^{ème} édition, pp: 37-85.
- [38] **Brunto J., 1993.** Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales. Eds Thechnique et documentation-lavoisier, pp : 200-311.
- [39] **Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M.**(2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*, **139**:1-21.
- [40] **Marfak A., 2003.** Radiolyse gamma des flavonoids: étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation des depsides. *Thèse de doctorat, université de Limoges*, pp : 30-35.
- [41] **Verdan A M, Wang H C, García C R, Henry W P and Brumaghim J L (2011).** Iron binding of 3-hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonated morin: Implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **105**, 1314-1322.

- [42] **Ali-Shtayeh, MS., Yaghmour, RM-R, Faidi.YR, Salem, K.,Ali-Nuri, MA.1988** . Antimicrobial activity of 2 plants in folkloric medicine in the palastinian area. *Journal of Ethnopharmacology*, 60, 265-271.
- [43] **Kelen, M., B.2008**.Chemical composition , antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three salvia species from Turkish flora, *Bioresource Technology*, 99, 4096-4104.
- [44] **Nicolas, M., et Daniel, C.1998**.Activités technologique en microbiologie-Technique de base et méthodologie. Editeurs CRDP D'aquitaine- Bordeaux, PP : 152.
- [45] **Cowan M .1999**. Plant Products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4), 564-582.
- [46] **Daglia M, 2011**. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 1-8.
- [47] **Mason T L and Wasserman B P, 1987**. Inactivation of red beet betaglucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. *Phytochemistry*, 26, 2197-2202.
- [48] **J., Santa S., 1963**. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, tome II. Eds CNRS, pp : 643-645.
- [49] **Badoc A., Lamarti A., Bourgeois G., Carde J-P., Deffieux G., 1995**. Hybridation intraspécifique chez le fenouil *Foeniculum vulgare* MILL. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 134 :107-126.
- [50] **Badoc A., Lamarti A., Bourgeois G., Carde J-P., 1993**. Etude chromatographique de l'huile essentielle de la plantule de fenouil amer (*Foeniculum vulgare* Mill.) ; caractéristiques spectrales (UV, IR, SM) de ses constituants. Bull. Pharm. Bordeaux , 132 :73-89.
- [51] **Menglan S., Watson M.F., 2005**. Foeniculum Miller, gard.dict.Abr. ed.4.1754. *Flora of china*, 14:134.
- [52] **Baba Aissa F., 2000**.Enc, Encyclopédie des plantes utile, flore d'Algérie et du Maghreb. Eds EDAS, page 105.
- [53] **Wichtl M., Anton R., 1999**. Plantes thérapeutiques. Eds *Thecnique and documentation*, pp : 187-189.

- [54] **Stefanini M.B., Ming L.C., Marques M.O.M., Facanali R., Meireles M.A.A., Moura L.S., Marchese J.A., Sousa L.A., 2006.** Essential oil constituents of different organs of fennel (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare*). *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*. V8, n. esp. , pp: 193-198.
- [55] **Choi E-M., Hwang J-K., 2004.** Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *foeniculum vulgare*. *Fitoterapia*, 75:557-565.
- [56] **Wardman P., Candeias L.P., *Radiat. Res.*, 1996, 145, p. 523.**
- [57] **Soliman F.M., Shehata A.H., Khaleel A.E., Ezzat S.M., 2002.** An acylated kaempferol glycoside from flowers of *Foeniculum vulgare* and *foeniculum dulc.* *Molecules*, 7: 245-251.
- [58] **Walters C., 1988.** Aromathérapie, guide illustré du bien-être. Eds *element Books Limited*, pp: 82-83.
- [59] **Edeoga H.O., Okwu D.E., Mbaebie B.O., 2005.** Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *Afr. J. Biotechnol.*, 4(7):685-688.
- [60] **Alain dit philippe Bide., Banga B., Adou F., 2011.** Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Science et nature*, 8, 1, 1-11.
- [61] **Muhammad Q.S., Adeela S., Shahnila S., .2013. Phytochemical screening of tamarix dioica. Ex roch. Pharmacy research, 7, 181-183.**
- [62] **McDonald S., Prenzier P.D., Antolovich M., Robards K., 2001.** Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food chemistry*, 73:73-84.
- [63] **Pourmorad F., Hosseinimehr S.J., Shahabimajd N., 2006.** Antioxidant activity, phenol and flavonoids contents of some selected Iranian medicinal plants. *Afr. J. Biotechnol.*, 5 (11):1142-1145.
- [64] **Pibiri M.C. ;(2005).** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorale. Ecole polytechnique fédérale, EPFL. Lausanne (Suisse) ; pp : 54-68.
- [65] **Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Ellouz Y and Nasri M (2009).** Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, **114**, 1198-1205.

- [66] **Barros L, Heleno S A, Carvalho A M and Ferreira I C F R (2010)**. Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: vitamins and phenolics. *LWT*, **43**, 544-550.
- [67] **Jones W P and Kinghorn A D (2005)**. Extraction of plant secondary metabolites. *In*: Sarker S D, Latif Z and Gray A I. Natural products isolation. Humana Press (Totowa), pp: 323-411.
- [68] **Gulcin I, Huyut Z, Elmastas M and Aboul-Enein H Y (2010)**. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, **3**, 43-53.
- [69] **Djeridane A, Yousfi M, Brunel J M and Stocker P (2010)**. Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 2599-2606.
- [70] **Ozen T (2009)**. Investigation of antioxidant properties of *Nasturtium officinale* (Watercress) leaf extracts. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, **66** (2), 187-193.
- [71] **Li H B, Cheng K W, Wong C, Fan K W, Chen F and Jiang Y (2007)**. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, **102**, 771-776.