

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI CONSTANTINE  
FACULTE DES SCIENCES EXACTES  
DEPARTEMENT DE CHIMIE

N d'ordre :166/DS/2018

N°de série :19/Ch/2018

THESE

Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat en Sciences  
en Chimie organique

OPTION

Phytochimie

Par

NOUI Amira

THEME

**Etude phytochimique et évaluation des  
activités biologiques de la plante *Daucus  
muricatus (Apiaceae)***

Devant le jury :

Zahia Kabouche

Prof. UFM. de Constantine 1

Président

Salah AKKAL

Prof. UFM. de Constantine 1

Rapporteur

Noureddine Ghearraf

Prof. ULB. d'Oum EL Bouaghi

Examineur

Hocine Laouer

Prof. UFA. de Setif 1

Examineur

11/10/2018

# *Remerciements*

*Ce travail effectué au centre de recherche en biotechnologie (CRBt) Constantinesous la direction de Mr Ammar Azioune.*

*J'adresse mes sincères remerciements au directeur de thèse, Mr. AKKAL SALAH, Professeur au département de chimie, Professeur à l'Université frères Mentouri Constantine 1, pour m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail. Je lui suis reconnaissante pour la confiance et le soutien permanent qu'il m'a témoigné dans ce travail ainsi que pour la grande autonomie qu'il m'a accordé. J'espère être à la hauteur de sa confiance et de ses espérances.*

*Mes remerciements vont également à Madame KABOUCHE ZAHIA, Professeur à l'Université frères Mentouri Constantine, d'avoir accepté de présider le jury de cette soutenance de thèse.*

*Permettez-moi aussi de remercier les rapporteurs : Monsieur LAOUAR HOUCINE, Professeur à l'Université de Ferhat Abbas Setif et Monsieur GHEARRAF NOUREDDINE, Professeur à l'Université l'Arbi Ben M'Hidi Oum El Bouaghie . Vous avez accepté prendre de votre temps pour juger cette thèse.*

*Enfin je présente mes remerciements les plus distingués à tous les techniciens et ingénieurs, au centre de recherche en biotechnologie particulièrement Mme. Hassini Sarah et Mr.MAHDI Hamdi.*

*Mes vifs remerciements vont également à mes collègues qui ont contribué au bon fonctionnement des laboratoires surtout, Dr. BENSOUICI Chawki et Mme. GALI Lynda, sans oublier Mme. Asma AOUANE.*

*AMIRA.*

# *Dédicaces*

*A l'aide de Dieu Tout Puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*A la mémoire de ma sœur Samira qui a disparu très tôt.*

*A Ma mère.*

*A mes frères et sœurs.*

*A mes professeurs.*

*A mes amis.*

*A tous ceux qui ont une place dans mon cœur et surtout mes enfants : Ayoub et Loudjeine, je vous aime très fort.*

*A vous ...*

*AMIRA.*

# *Abstract*

This work is dedicated to the phytochemical study of *Daucus muricatus* species (Apiaceae), it was aimed at investigating the phytochemical components of butanolic extract using HPLC-DAD-ESI-MS/MS.

The proposed method provided tentative identification of 25 phenolic compounds, including, 13 hydroxycinnamic acid derivatives, 5 hydroxybenzoic acid derivatives, 8 flavonoids and other polar compounds as quinic acid.

Evaluation of the antioxidant activities by using four complementary tests (DPPH, ABTS, CUPRAC and carotene Bleaching) showed that both extracts exhibited important antioxidant activities.

**Keywords:** Apiaceae, *Daucus muricatus*, phenolic compounds, LC-UV-MS/MS, antioxidant activity.

# Résumé

Les travaux présentés dans cette thèse contribuent à la valorisation de la plante médicinale (*Daucus muricatus* L) (Apiaceae) et en la caractérisant par une chromatographie LC-ESI /MS/MS avec une évaluation des activités antioxydantes.

L'évaluation préliminaire de la composition phytochimique de la partie aérienne traitée a permis de mettre en évidence la présence de quelques groupes chimiques. Ceci a été confirmé par une analyse quantitative basée sur le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux.

L'identification chromatographique par la spectrométrie LC-UV-MS/MS, menée sur l'extrait butanolique a permis de caractériser 25 composés phénoliques, classés en 4 groupes : 13 dérivés de l'acide hydroxycinnamique, 5 dérivés de l'acide benzoïque, 8 flavonoïdes et autres composés polaires tels que l'acide quinique.

L'évaluation, *in vitro*, de l'activité antioxydante des différents extraits a été réalisée par cinq méthodes, à savoir : le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP), le piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>), le piégeage du radical-cation ABTS<sup>•+</sup>, le blanchiment du - carotène et le test de réduction du cuivre (CUPRAC).

Les résultats obtenus ont montré que les extraits étudiés peuvent agir en tant que piégeurs de radicaux.

**Mots clés:** Apiaceae, *Daucus muricatus*, LC-ESI-MS/MS, Composés phénoliques, Activité antioxydante.

# الملخص

العمل المقدم في هذه الأطروحة يساهم في تعزيز النباتات الطبية المتوطنة في الجزائر وهذا عن طريق تشخيص المركبات الفعالة لنبته *Daucus muricatus* بالإضافة الى دراسة الفعالية البيولوجية لها.

تنتمي النبتة المدروسة الى العائلة الخيمية. وقد تم الحصول عليها من جبل مغرس بمنطقة سطيف. سمحت التحاليل المخبرية بواسطة LC-MS/MS بالتعرف على 25 مركب من البوليفينولات الموجودة في المستخلص البيوتانولي، مصنفة الى 4 اقسام، 13 مشتق من حامض السينيك، 5 من مشتقات حامض البنزويك، 8 فلافونويدات بالإضافة الى مركبات قطبية اخرى. كما تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة لمختلف المستخلصات بواسطة خمس طرق (DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP,  $\beta$  carotène) اظهرت من خلالها ان لهذه المستخلصات نشاطا جيدا مضاد للأكسدة و ان المستخلصات العضوية (البيوتانول و خلات الايثيل) هي الاكثر فعالية، فالمستخلص الانشط بطريقة الجذور الحرة DPPH هي خلات الايثيل. أكدت الاختبارات ايضا ان جميع المستخلصات لها فاعلية مضادة للأكسدة تختلف باختلاف قطبية المذيب المستعمل و تركيز العينة.

الكلمات المفتاحية: العائلة الخيمية، *Daucus muricatus*، LC-MS/MS، البوليفينولات، الفعالية المضادة للأكسدة.

# *Liste des abréviations*

**ABTS:** Acide 2,2'- azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique

**BHA :** ButylHydroxyAnisole

**BHT :** ButylHydroxyToluene

**CI<sub>50</sub>:** Concentration Inhibitrice à 50%

**CCM :** Chromatographie sur Couche Mince

**CLHP :** Chromatographie Liquide Haute Performance

**Cu<sup>+2</sup>:** ion Cuivrique

**CUPRAC:** Capacité antioxydante par réduction de cuivre

**DPPH:** Diphenyl-picrylhydrazyle

**EDTA :** Ethylenediamine tetra acetic acid

**EAG:** Equivalent en acide gallique.

**ERO:** Espèces réactives de l'oxygène

**FRAP:** Ferric ion Reducing Antioxydant Parameter

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

**LC/MS :** Chromatographie Liquide couplée à la spectrométrie de masse

**Nc:** Néocuproïne

**NO:** Oxyde nitrique

**OH<sup>·</sup> :** Radical hydroxyle

**OMS:** Organisation mondiale de santé

**ppm:** partie par million

**ROO:** radical peroxyde

**RP :** Phase inverse

**SM :** spectrométrie de masse

**TEAC:** Trolox equivalent antioxidant capacity

**TRAP:** Total Radical -Trapping Antioxydant Parameter

**t<sub>r</sub> :** temps de rétention

**UV:** Ultra-Violet

**µg :** Micro-gramme

**RP-HPLC:** (Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography).

# Sommaire

Introduction .....	1
Synthèse bibliographique	
Chapitre 1 Étude botanique	
1.1. La famille des Apiaceae .....	3
1.2. Le genre <i>Daucus</i> .....	4
1.3. Données phytochimiques sur le genre <i>Daucus</i> .....	7
1.3.1. Identification chimique des huiles essentielles dans le genre <i>Daucus</i> : .....	7
1.3.2. Etudes antérieures sur la plante <i>D.muricatus</i> .....	8
1.3.3. Les acides phénoliques .....	9
1.3.3.1. Acides hydroxybenzoïques .....	9
1.3.3.2. Les acides hydroxycinnamiques et leurs dérivés .....	10
1.3.3.3. Les flavonoïdes .....	10
Chapitre 2 Spectrométrie de masse et couplage LC/MS/MS	
2.1. Définition.....	14
2.2. Principe de base.....	14
2.3. Applications pratiques .....	15
2.4. Appareillage .....	15
2.5. Techniques d'ionisation :.....	16
2.5.1. L'ionisation chimique.....	16
2.5.2. Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI) .....	16
2.5.3. Electronébulisation (ESI) .....	16
2.6. Quelques types d'analyseurs .....	17
2.6.1. Analyseur à temps de vol.....	17
2.6.2. Analyseur quadripolaire (Q) :.....	19
2.7. La spectrométrie de masse à plusieurs dimensions MS-MS ou en tandem .....	19
2.8. Chromatographie liquide haute performance .....	20
2.9. La spectrométrie de masse à plusieurs dimensions couplée à la HPLC : LC-MS-MS .....	21
2.10. Application de la spectrométrie de masse à l'étude de la fragmentation des flavonoïdes.....	23
2.10.1. Fragmentation en mode négatif des génines.....	25
2.10.2. Fragmentation des flavonoïdes-O-glycosylés : .....	25
Chapitre 3 Généralités sur les activités antioxydantes	
3.1. Le stress oxydatif.....	27
3.2. Conséquences biologiques du stress oxydant.....	27
3.3. Les antioxydants.....	27
3.4. Classification des antioxydants : .....	28



3. 4.1. Classification en fonction de type d'action .....	28
3. 4.2. Classification par voie d'obtention : .....	28
3.5. Les sources d'antioxydants : .....	28
3.5.1. Médicaments : .....	28
3.5.2. Source alimentaire : .....	28
3.5.3. La vitamine C ou acide ascorbique : .....	28
3.5.4. La vitamine E ou tocophérol : .....	29
3.5.5. Le B-carotène : .....	29
3.6. Antioxydants naturels : .....	29
3.6.1. Les flavonoïdes .....	29
3.6.2. Les tanins .....	29
3.6.3. Les coumarines .....	29
3.6.4. Les phénols .....	30
3.6.5. Les xanthones .....	30
3.7. Evaluation <i>in vitro</i> des activités biologiques .....	31
3.7.1. Capacité de piégeage d'espèces radicalaires (effet scavenger du radical (DPPH) : .....	31
3.7.2. Méthode TEAC : Trolox equivalent antioxidant capacity (ABTS) .....	32
3.7.3. Inhibition de blanchissement de $\beta$ -carotène.....	33
3.7.4. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC).....	33
3.7.5. Chélation du Fer ferreux : .....	34

### *Partie expérimentale*

1. Matériel végétal.....	36
1.1. Description de la plante <i>Daucus muricatus</i> .....	36
2. Provenance du matériel végétal et identification .....	37
3. Macération et extraction.....	37
4. Analyse colorimétrique par spectrométrie (UV-visible).....	40
4.1. Dosage des composés phénoliques par colorimétrie.....	40
4.2. Dosage des flavonoïdes totaux : .....	40
5. Analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en TANDEM (LC/MS/MS) .....	41
5.1. Calibration et courbe d'étalonnage.....	41
6. Evaluation <i>in vitro</i> des activités biologiques.....	42
6.1. Test DPPH .....	42
6.2. La méthode TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity (ABTS).....	42
6.3. Inhibition de blanchissement de $\beta$ -carotène.....	43
6.4. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC).....	43
6.5. Chélation du Fer ferreux (FRAP).....	44

## Résultats et discussion

1. Dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux : .....	47
2. Dosage des flavonoïdes totaux : .....	47
3. Identification des polyphénols contenus dans la plante <i>Daucus muricatus</i> : .....	48
3.1. Dérivés de l'acide hydroxycinnamique : .....	55
3.1.1. Identification du produit 10 : .....	55
3.1.2. Identification du composé 17 : .....	55
3.1.3. Identification du produit 18: .....	56
3.1.4. Identification des produits 19, 22 et 24 : .....	57
3.2. Identification des acides idroxybenzoïques: .....	60
3.2.1. Identification des produits 2 et 8 : .....	60
3.2.2. Identification du produit 5 : .....	61
3.2.3. Identification du produit 14 : .....	62
3.3. Identification des flavonoïdes : .....	63
3.3.1. Identification du produit 26 : .....	63
3.3.2. Identification du produit 34-35 : .....	63
3.3.3. Identification du produit 40: .....	65
3.3.4. Le composé 41 .....	66
3.3.5. Le composé 43 .....	67
3.3.6. Identification du produit 47 : .....	68
3.4. Autres composés polaires: .....	69
4. Etude <i>in vitro</i> de l'activité biologique de la plante <i>D.muricatus</i> .....	71
4.1. Test DPPH : .....	71
4.2. La méthode TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity (ABTS) : .....	72
4.3. Inhibition de blanchissement de $\beta$ -carotène : .....	72
4.4. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC) : .....	73
4.5. Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) : .....	74
Conclusion générale et perspectives .....	75
Références bibliographiques .....	77
Annexe	

# Liste des figures

Figure 1: Répartition géographique mondiale des Apiaceae .....	4
Figure 2: <i>Daucus carota</i> (carotte sauvage). .....	6
Figure 3: <i>Daucus. crinitus</i> . .....	6
Figure 4: <i>Daucus reboudii</i> . .....	7
Figure 5 : Structure de quelques composés identifiés dans l'huile essentielle du genre <i>Daucus</i> .....	9
Figure 6 : Structures de quelques acides phenoliques présents dans le genre <i>Daucus</i> . .....	10
Figure 7 : 2-phénylchromane ( benzo- $\gamma$ -pyrone. ....	11
Figure 8 : Classification des flavonoïdes. ....	12
Figure 9: Schéma d'un spectromètre de masse .....	16
Figure 10 : Schéma représentant l'ionisation par électronébuliseur. ....	17
Figure 11 : La différence de vitesse des ions qui n'ont pas les mêmes masses. ....	18
Figure 12 : Analyseur quadripolaire. ....	19
Figure 13 : Principe de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). ....	20
Figure 14 : Principe de fonctionnement de l'HPLC. ....	21
Figure 15 : Principe d'un couplage LC/MS-MS. ....	23
Figure 16 : Structure typique d'un flavonoïde avec la numérotation des carbones (A) et exemples de voies de fragmentation des flavonoïdes obtenues en MS/MS (B). ....	24
Figure 17 : Schéma de fragmentations obtenu pour la quercétine en mode négatif après.....	25
Figure 18 : Quelques antioxydants naturels et synthétisés. ....	31
Figure 19 : Mécanisme réactionnel d'un antioxydant avec le DPPH• .....	32
Figure 20 : Génération du radical-cation ABTS•+ avec le persulfate de potassium et sa réaction avec un antioxydant (AOH) .....	33
Figure 21 : Mécanisme de formation du complexe Cu+-Nc.....	34
Figure 22 : Mécanisme de formation du complexe Fe2+-Ferrozine.....	35
Figure 23 : Fruits du <i>D. muricatus L.</i> .....	35
Figure 24 : Structures de quelques composés de l'huile essentielle dans la plante <i>D. muricatus</i> .....	37
Figure 25 : Processus d'extraction.....	38
Figure 26 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	44
Figure 27 : Courbe d'étalonnage du quercétine.....	45
Figure 28 : Chromatogramme d'ionisation par HPLC-ESI-QTOF MS/MS de la plante <i>Daucus muricatus</i> en mode négatif.....	46
Figure 29 : Chromatogramme du produit 10. ....	55
Figure 30 : Spectre de masse du produit du produit 10. ....	52
Figure 31 : Schéma de fragmentation de l'acide caféique hexosidé.....	56
Figure 32 : Chromatogramme du produit 17 .....	53
Figure 33 : Spectre de masse du produit du produit 17. ....	53
Figure 34 : Chromatogramme du produit 18 .....	54
Figure 35 : Spectre de masse du composé 18 .....	54
Figure 36 : Chromatogramme des produits 19 et 22.....	54
Figure 37 : Spectre de masse du composé 19 .....	55
Figure 38 : Spectre de masse du composé 22 .....	55
Figure 39 : Chromatogramme des produits 24 .....	55
Figure 40 : Spectre de masse du composé 24 .....	55
Figure 41 : Fragmentation de quelques dérivés de l'acide cinnamique .....	56
Figure 42 : Chromatogramme du produit 2 .....	60
Figure 43 : Spectre de masse du produit 2.....	60
Figure 44 : Chromatogramme du produit 8 .....	60

Figure 45 : Spectre de masse du produit 8.....	61
Figure 46: Chromatogramme du produit 5 .....	61
Figure 47 : Spectre de masse du produit 5.....	61
Figure 48 : schéma de fragmentation de de l'acide Vanillique-O-hexoside.....	62
Figure 49 : Chromatogramme du produit14 .....	62
Figure 50 : Spectre de masse du produit14.....	62
Figure 51 : Chromatogramme du produit 26 .....	60
Figure 52 : Spectre de masse du produit 26.....	60
Figure 53 : Chromatogramme du produit 35 .....	61
Figure 54 : Spectre de masse du produit 35.....	61
Figure 55 : Chromatogramme du produit 34 .....	65
Figure 56 : Spectre de masse du produit 34.....	65
Figure 57 : Chromatogramme du produit 40 .....	66
Figure 58 : Spectre de masse du produit 40.....	66
Figure 59 : Chromatogramme du produit 41 .....	66
Figure 60 : Spectre de masse du produit 41.....	64
Figure 61: Chromatogramme du produit 43 .....	64
Figure 62 : Spectre de masse du produit 43.....	64
Figure 63 : Schéma fragmentation de l'Apigenine .....	68
Figure 64 : Chromatogramme du produit 47 .....	65
Figure 65 : Spectre de masse du produit 47.....	65
Figure 66 : Chromatogramme du produit1 .....	66
Figure 67 : Spectre de masse du produit 1.....	66
Figure 68 : Chromatogramme du produit 15 .....	70
Figure 69 : Spectre de masse du produit 15.....	70

# *Liste des tableaux*

Table 1: Liste des Daucus recensées en Algérie.	5
Table 2 : Calibration LC/MS/MS en présence des standards.	41
Table 3 Polyphénols totaux de <i>D.muricatus</i>	45
Table 4 : absorbances de la gamme d'étalonnage de la quercetine	45
Table 5 : Flavonoides totaux de la plante <i>D..muricatus</i>	45
Table 6 : Composés de l'extrait butanolique identifiés par LC/MS/MS.	50
Table 7 : Capacité antioxydante par le test DPPH des extraits étudiés de la plante <i>D.muricatus</i> .	71
Table 8 : Résultats de l'activité antioxydante ABTS des extraits de plante <i>D.muricatus</i> .	72
Table 9 : Activité de blanchissement du $\beta$ -carotène par les extraits de la plante <i>D.muricatus</i> .	73
Table 10 : Acivité chélatrice de CUPRAC des extraits de la plante <i>D.muricatus</i> .	73
Table 11: Inhibition du FRAP par les extraits de <i>D.muricatus</i> .	74

# ***Introduction générale***

## Introduction

---

Depuis plusieurs années, l'utilisation des plantes médicinales ou des préparations à base des plantes connaît un succès croissant. Ainsi, d'après les estimations, 80% de la population mondiale dépend principalement de la médecine traditionnelle (OMS, 2012) [1]. Elles jouent un rôle croissant dans la santé humaine. Environ 25% des médicaments d'ordonnances couramment utilisés proviennent de plantes médicinales traditionnellement utilisées [2].

Les plantes médicinales sont extrêmement nombreuses. En effet, les estimations indiquent que plus de 13000 espèces de plantes médicinales sont utilisées comme remèdes traditionnels par diverses cultures dans le monde entier [3]. Les propriétés médicinales des plantes sont dues à des produits synthétisés par les plantes elles-mêmes appelés métabolites secondaires. De nombreux métabolites secondaires essentiellement les polyphénols sont des antibiotiques au sens large, car ils protègent les plantes contre les champignons, les bactéries, les animaux et même les autres plantes [4].

Les polyphénols sont aussi connus pour leurs activités biologiques qui sont en relation directe avec la santé de l'être humain. Ils sont utilisés dans la chimiothérapie et dans le traitement de plusieurs types de cancer [5]. Ils sont présents comme ingrédients dans plusieurs préparations cosmétiques utilisées dans le traitement du vieillissement cellulaire et la protection de la peau [6]. Les polyphénols sont connus par leurs activités anti-oxydantes importantes, car ils peuvent agir par piégeage direct des ERO (espèces réactives de l'oxygène) [7]. Ils sont aussi connus pour leurs activités enzymatiques, car ils peuvent inhiber l'activité de certaines enzymes comme le cas de l'acétylcholinestérase [8].

En outre, au cours des décennies passées, l'intérêt public pour les thérapies naturelles a considérablement augmenté dans les pays industrialisés, en même temps que l'utilisation des plantes médicinales et des médicaments à base de plantes. Les formes nombreuses et variées des produits de la médecine traditionnelle ont évolué dans des contextes ethnologiques, culturels, climatiques, géographiques et même philosophiques largement différents.

Il existe donc un besoin de production de substances bioactives isolées, concentrées et purifiées, pour une utilisation dans un large champ d'application (cosmétiques, pharmaceutiques, additifs nutritionnels...).

L'Algérie, de part sa situation géographique et climatique, possède une flore particulièrement riche et diversifiée depuis longtemps exploitée par la médecine traditionnelle de ses habitants. Cette flore comprend environ 4000 taxons répartis en 131 familles et 917 genres. Le nombre d'endémiques nationales est de 464 (387 espèces, 53 sous espèces et 24 variétés [9]. Par ailleurs, on ne peut que se réjouir du fait que l'Algérie est un bon exemple de pays en développement qui a pris conscience de la richesse et de l'importance de sa médecine traditionnelle puisque tout en s'efforçant de

moderniser son système de santé sur le modèle occidental, elle rend prioritaire l'étude des plantes médicinales par les laboratoires de recherche universitaires, dans le but de rationaliser leurs utilisations encore très répandues dans ce pays .

C'est pourquoi le centre de recherche en biotechnologie (CRBt), concentre une partie de ses recherches sur la découverte de substances naturelles bioactives et étudie leurs effets pharmacologiques.

L'objectif de ce travail est d'apporter des éléments pour la validation de certaines propriétés de la plante étudiées (*Daucus muricatus*), l'identification de leurs principes actifs et la mise au point des méthodes de dosage et d'évaluation des activités biologiques.

- Dans une première partie, nous résumerons une étude bibliographique sur les connaissances botaniques et phytochimiques de la famille Apiaceae ainsi que l'espèce étudiée. Nous développerons également l'utilisation de la spectrométrie de masse comme outil d'analyse et d'identification de composés naturels et plus particulièrement des polyphénols. Cette partie comprend aussi des généralités sur les activités antioxydantes. La seconde décrit la partie expérimentale, avec une présentation des techniques d'extraction, les méthodes de séparation et analyse LC-ESI-MS/MS ainsi que les méthodes d'évaluation des activités biologiques. La troisième partie consiste en une analyse des résultats obtenus et une discussion qui mettra l'emphase sur leur signification. Enfin le manuscrit se termine par une conclusion générale.



# **1<sup>ère</sup> Partie**

## ***Synthèse bibliographique***

***Chapitre 1***  
***Etude botanique***

### 1.1. La famille des Apiaceae

Cette famille regroupe près de 3000 espèces, réparties en 420 genres qui sont surtout présentes dans les régions tempérées et plus particulièrement dans l'hémisphère Nord, Elle est très homogène, facilement reconnaissable par ses inflorescences en ombelles.

Cependant, il est parfois difficile de distinguer les unes des autres [10].

*Caractères morphologiques généraux des Apiacées :*

- sont généralement des herbes qui sont annuelles comme cerfeuil, bisannuelles comme la carotte ou, le plus souvent vivaces. L'appareil souterrain pérennant peut être une racine pivotante, un rhizome ou un tubercule.
- La tige est fistuleuse. Les cannelures sont occupées par des amas de tissus de soutien, généralement du collenchyme.
- Les feuilles sont alternes, sans stipules, et le plus souvent composées à folioles finement découpées, mais certaines espèces ont des feuilles entières (buplèvre par exemple).
- Souvent les pétioles sont élargis à leur base, engainant la tige.
- Les feuilles sont isolées, alternes, munies à leurs bases d'une gaine très développée, et dépourvue de stipule.
- L'inflorescence typique des Apiacées, justement appelées ombellifères, est l'ombelle qui peut être simple ou composée d'ombellules. Les ombelles sont souvent munies à leur base d'un involucre formé de bractées.
- Les fleurs, petites, à symétrie pentamère, sont le plus souvent blanches ou jaunâtres, quelquefois rougeâtres comme la fleur centrale de l'ombelle de carotte. Elles comptent 5 pétales et 5 étamines, et ont au centre un ovaire infère à deux carpelles. Les sépales sont absents ou très réduits du fait que le calice est presque complètement soudé à l'ovaire. Parfois, les fleurs périphériques de l'ombelle sont irrégulières, avec des pétales externes nettement plus grands, et contribuent à faire de l'ombelle une simili-fleur. L'ovaire porte deux styles qui s'élargissent à la base en un disque ou coussinet nectarifère (stylopode).

Les fruits, secs, sont des schizocarpes (diakènes) qui se scindent en deux à maturité, chaque partie contenant une graine. Ils sont très diversifiés par leurs formes externes : présence de crochets ou d'épines, de protubérances ou de poils, parfois d'ailes, qui sont importants à observer pour la détermination des espèces [11].

Cette famille riche en métabolites secondaires présente des intérêts économiques et médicaux, comportant des coumarines, flavonoïdes, composés acétyléniques et des lactones sesquiterpéniques [10].

Les genres se répartissent entre les divers continents, avec une prédominance pour le continent asiatique (265), Amérique (197), Europe (139), Afrique (126), Australie (36) [12].

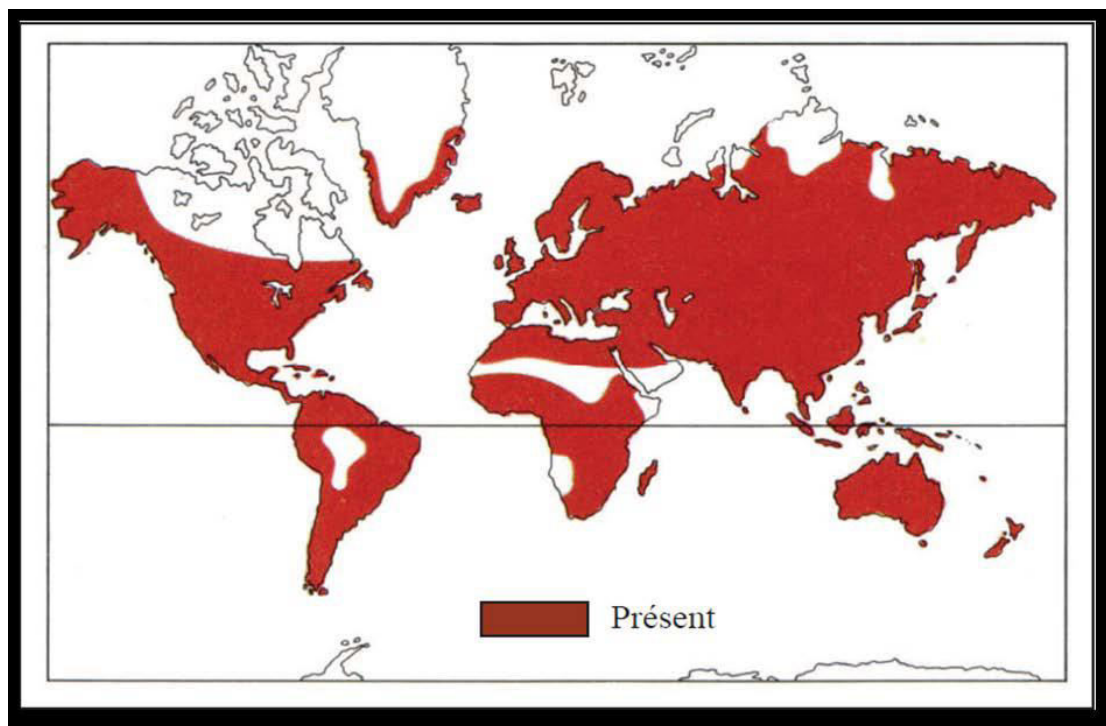


Figure 1: Répartition géographique mondiale des Apiaceae [12].

La famille des Apiaceae occupe une place importante dans la flore Algérienne où elle est représentée par 56 genres, 130 espèces (dont 24 endémiques) et 26 sous espèces [9].

### 1.2. Le genre *Daucus*

Le genre *Daucus* est considéré comme étant l'ombellifère le plus difficile à définir, il comprend environ 30 espèces, annuelles, bisannuelles et vivaces (Tableau 1).

C'est un genre de plantes herbacées de la famille des Apiaceae dont l'espèce la plus connue est la carotte cultivée. Il est largement distribué à travers le monde. Il semble avoir son centre de dispersion dans la Région de la Méditerranée, en particulier en Afrique du Nord. *D. carota* (carotte) est la principale espèce du genre *Daucus*, les racines des carottes ont été signalées être dotées de propriétés médicinales, c'est à dire, des propriétés hypotensives, diurétiques, carminatives, stomachiques, et hypolipémiantes. En Algérie, le genre *Daucus* est représenté par des espèces vivant dans les zones arides et incultes très répandues le long de la côte ouest algérienne [13].

Table 1: Liste des *Daucus* recensées en Algérie.

Espèces	Synonyme(s)	Quelques Études
<i>D. carota</i> L. (sensu lato)		Extraction de H.E et étude de l'activité antibactérienne [13].
<i>D. carota</i> L. ssp. <i>carota</i>		Composition de H.E des ombelles du <i>D. carota</i> L. ssp. <i>carota</i> ) [14].
<i>D. carota</i> L. ssp. <i>dentatus</i>	<i>D. alatus</i> Poiret <i>D. bocconeii</i>	Pas d'étude
<i>D. carota</i> L. ssp. <i>gingidium</i>	<i>D. gingidium</i>	Composition de H.E du <i>D. carota</i> L. ssp. <i>gingidium</i> [15].
<i>D. carota</i> L. ssp. <i>mauritanicus</i>	<i>D. commutatus</i>	Pas d'étude
<i>D. carota</i> L. ssp. <i>maximus</i>	<i>D. mauritanicus</i>	H.E de <i>D. carota</i> ssp. <i>maximus</i> [16].
<i>D. carota</i> L. ssp. <i>parviflorus</i>	<i>D. glaberrimus</i> <i>D. micranthus</i> <i>Pomel</i>	Pas d'étude
<i>D. carota</i> L. ssp. <i>sativus</i>		Composition chimique des huiles des ombelles du <i>D. carota</i> L. ssp. <i>sativus</i> cultivées en Pologne [17].
<i>D. crinitus</i>	<i>D. meifolius</i>	Les phenylpropanoïdes bioactive du <i>D. crinitus</i> Desf. D'Algérie [18].
<i>D. durieua</i> Lange	<i>Durieua</i> <i>hispanica</i>	Pas d'étude
<i>D. gracilis</i>		Pas d'étude
<i>D. muricatus</i>		Extraction de H.E et étude de l'activité antibactérienne [23].
<i>D. reboudii</i>		Composition de H.E de l'espèce du <i>D. reboudii</i> Coss. [19].
<i>D. sahariensis</i>	<i>D. pubescens</i>	H.E du <i>D. sahariensis</i> d'Algérie riche en myristicine [20]

<i>D. setifolius</i>	<i>D. brachylobus</i> <i>D. setulosus</i>	Pas d'étude
<i>D. virgatus</i>	<i>D. laserpitioides</i> <i>D. =tenopterus</i> <i>Laserpitium</i> <i>daucoides</i>	Pas d'étude
<i>D. aureus</i>		Pas d'étude
<i>D. biseriatus</i>		Pas d'étude
<i>D. carota</i> L. ssp. <i>maritimus</i>		Analyse de l'Huiles des Fleurs et des racines de <i>D. carota</i> L. ssp. <i>maritimus</i> (Tunisie) [21].



Figure 2: *Daucus carota* (carotte sauvage) [13].



Figure 3: *Daucus. crinitus* [18].

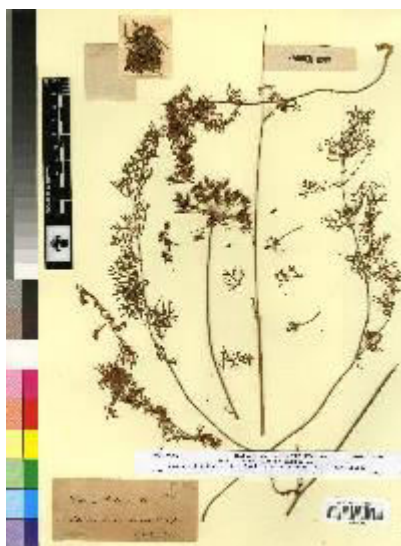


Figure 4: *Daucus reboudii* [19].

### 1.3. Données phytochimiques sur le genre *Daucus*

#### 1.3.1. Identification chimique des huiles essentielles dans le genre *Daucus* :

Le genre *Daucus* est un genre de plantes herbacées de la famille des Apiaceaes dont l'espèce la plus connue est la carotte cultivée (*Daucus carota*) qui a une variabilité dans la composition phytochimique [22]. Des études récentes ont révélé que les huiles de la partie aérienne étaient principalement composées de composés hydrocarbonés terpéniques (62,3-72,2 g / 100 g), tandis que l'hydrosol provenant des parties aériennes était composé de composés phénoliques volatils et phénylpropanoïdes tels que le thymol (11,7%), la myristicine (7,5 %), Isochavicol (7,4%) et isochavicol-2-méthylbutyrate (5,8%). Ces études ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse couplée au détecteur d'ionisation par flamme et à la spectrométrie de masse (MS) [23].

Bien que les carottes noires ou violettes (*Daucus carota* ssp. *Sativus* var. *Atrorubens* Alef. 2) sont considérés comme inconnues dans le monde occidental en dépit de leur consommation traditionnelle dans des pays tels que la Turquie, l'Afghanistan, l'Égypte, Pakistan et en Inde. Au milieu des années 1990, les carottes noires ont été reconnues comme une source de colorant. Les études effectuées sur les pigments de carottes noires ont montré la présence des Composés glycosidés de cyanidine qui sont souvent acylés avec hydroxybenzoïque et hydroxycinnamique acides [24]. Les analyses des huiles essentielles obtenues à partir de quelques espèces du genre *Daucus* ont permis d'identifier plus de 60 composants.

Pour l'espèce *D. crinitus*, les huiles des racines sont constituées principalement des composés aliphatiques et les huiles des parties aériennes ont comme composés majeurs les phénylpropanoïdes. Pour une répartition plus précise des composés dans les organes étudiés: les composés aliphatiques oxygénés sont bien représentés dans les racines (44,3-84,0 %), les composés aliphatiques hydrocarbonés sont dans les feuilles et les tiges (22,2-87,9 %) et phénylpropanoïdes se trouvent dans

les fleurs et les ombelles (47,9-64,2 %). Parmi ces derniers, il y a les composés non terpéniques, les monoterpènes, les sesquiterpènes et les diterpènes.

Par ailleurs, l'Edt-MEPS a permis l'identification de l'isochavicol (29,6-34,7%) en tant que composant principal dans les feuilles du *D. crinitus*[ 25]. Les huiles essentielles obtenues par hydrodistillation des différentes parties de *D. carota* ssp. *sativus*, recueillies dans la banlieue de Changchun en Chine, ont été analysées par Wu Yin et al[26]. Les pourcentages des huiles essentielles extraites sont de 0,27 % pour les fleurs, 0,07% pour les tiges et les feuilles et 0,01 % pour les racines. Cinquante-quatre, soixante-six et trente-trois composés ont été, respectivement, séparés et identifiés dans les fleurs, les tiges et les feuilles et les racines. Dans l'huile essentielle des fleurs, 54 composés ont été séparés et identifiés représentant 94.31 % du total de l'huile, parmi lesquelles, le carotol (16,36 %),  $\alpha$ -pinène (12,64 %) et le caryophyllène (9,62 %) représentent les produits majoritaires.

L'huile essentielle des fruits de l'espèce *D. glaber* Forssk se compose principalement d'hydrocarbures monoterpéniques et de phénylpropanoïdes. Les hydrocarbures mono terpéniques sont présents en quantités significatives (58,3 %) et se composent principalement de limonène (37,0 %), sylvestrène (18 %) et une petite quantité de  $\gamma$ -terpinène (2,9 %).

Le sylvestrène n'a jamais été signalé auparavant dans les huiles essentielles de toutes les espèces du genre *Daucus*. Les phénylpropanoïdes sont également majoritaires et se composent principalement de l'élémicine (23,7%) et de méthyleugénol (2,5 %)[27].

### 1.3.2. Etudes antérieures sur la plante *D. muricatus*

Plusieurs enquêtes portant sur la composition chimique des huiles essentielles de l'espèce *Daucus* ont été réalisés. Cependant, il reste de nombreuses espèces et sous-espèces de *Daucus* qui n'ont pas encore été examinées [87, 88].

D'après les travaux de **A. Bendiabdellah et al (2012)**, Les analyses CPG-IR et CPG-SM des huiles essentielles du *D. muricatus* obtenues à partir des racines, tiges, feuilles, fleurs, et des ombelles représentaient, respectivement, 92,8, 94,7, 94,5, 95,4, et 95,7 g/100 g d'huiles essentielles ; elles ont permis l'identification de 99 composés.

Parmi les composés identifiés : 39 monoterpènes, 32 sesquiterpènes, 22 composés non terpéniques, trois diterpènes, deux phénylpropanoïdes.

Deux types d'huiles essentielles étaient produits par *D. muricatus*. Les huiles des racines sont essentiellement composées par des composés oxygénés (59,8 g/100 g), et les huiles des parties aériennes (feuilles, tiges, fleurs et ombelles) sont dominées par la présence des composés hydrocarbonés (de 62,3 à 72,2 g/100 g).



Les principaux constituants de l'huile des racines étaient les composés aliphatiques nonterpenic qui représentaient 56,7 g/100 g, comme l'eicosane (18,6 g/100 g), undecan-2-one (10.2 g/100 g), et tridécanol (6,4 g/100 g). Inversement, les principaux composants des organes aériennes du *D. muricatus* étaient des monoterpènes hydrocarbonés (52,0 à 58,5 g/100 g).

Pour tous les organes étudiés, le limonène (21,9 à 24,0 g/100 g) et  $\alpha$ -pinène (9,9 à 21,8g/100 g) étaient les principaux composants. Leur abondance relative était suivie par celle de sabinène (4.7 à 8.1 g/100 g) dans les tiges, les feuilles et les fleurs, et l'acétate de trans-sabinyl en ombelles (12,1 g/100 g) [23].

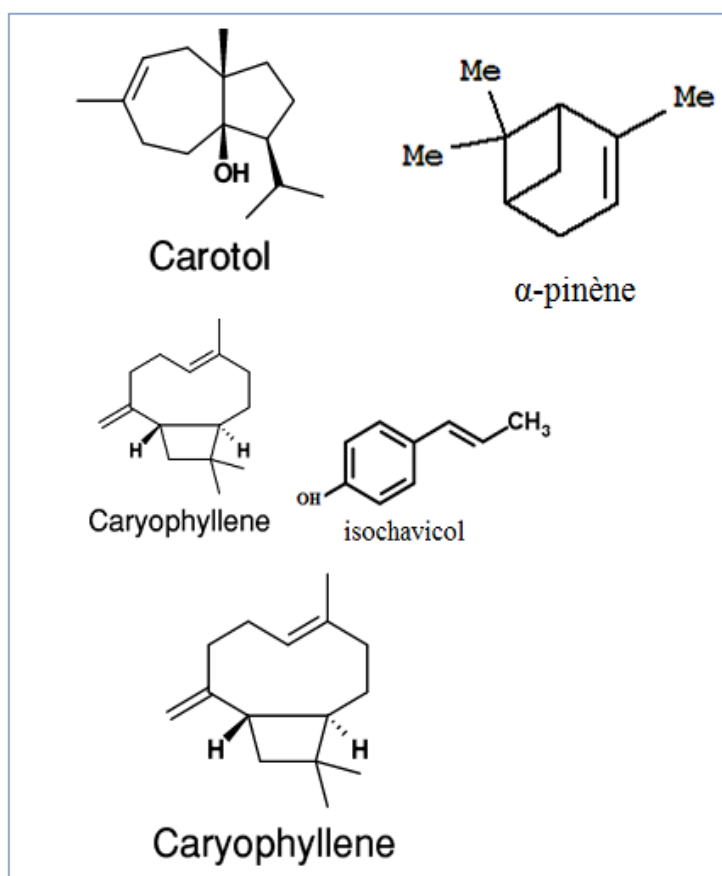


Figure 5: Structure de quelques composés identifiés dans l'huile essentielle du genre *Daucus*.

### 1.3.3. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes distincts que sont les acides hydroxybenzoïques (C6-C1) et les acides hydroxycinnamiques (C6-C3). Des composés de ces deux groupes ainsi que leurs dérivés estérifiés et glycosylés ont été trouvés dans les extraits de la plante *Daucus carotta* (racines) : d'acides *p*-coumaric, cafeique et ferulique. De plus, Les dérivés d'acide hydroxybenzoïque et ont été

détectés. 5-O-Caffeoylquinic, (acide chlorogénique) et d'autres types de polyphénols (Figure 6) [28].

### 1.3.3.1. Acides hydroxybenzoïques

Les acides hydro benzoïques (p-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique, salicylique, gentisique...) sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> (Figure 6). Ils sont particulièrement bien représentés chez les Gymnospermes et les Angiospermes d'où ils sont souvent libérés après hydrolyse alcaline du matériel végétal, en particulier de la

Lignine et de certains tannins. Les acides hydroxybenzoïques existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides, à l'exemple de l'acide salicylique dont le glucoside ou les esters méthyliques ou glucosylés (Figure 6) [29].

### 1.3.3.2. Les acides hydroxycinnamiques et leurs dérivés

Représentent une classe très importante dont la structure de base (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) dérive de celle de l'acide cinnamique. Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires (par méthylation chez les acides férulique ou sinapique) sont un des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules. De plus, l'existence d'une double liaison dans la chaîne latérale conduit à deux séries isomères (*cis* ou *Z* et *trans* ou *E*) dont les propriétés biologiques peuvent être différentes. Les formes *trans* sont cependant naturellement prépondérantes et il est possible que les formes *cis* ne correspondent qu'à des artefacts d'extraction [29].

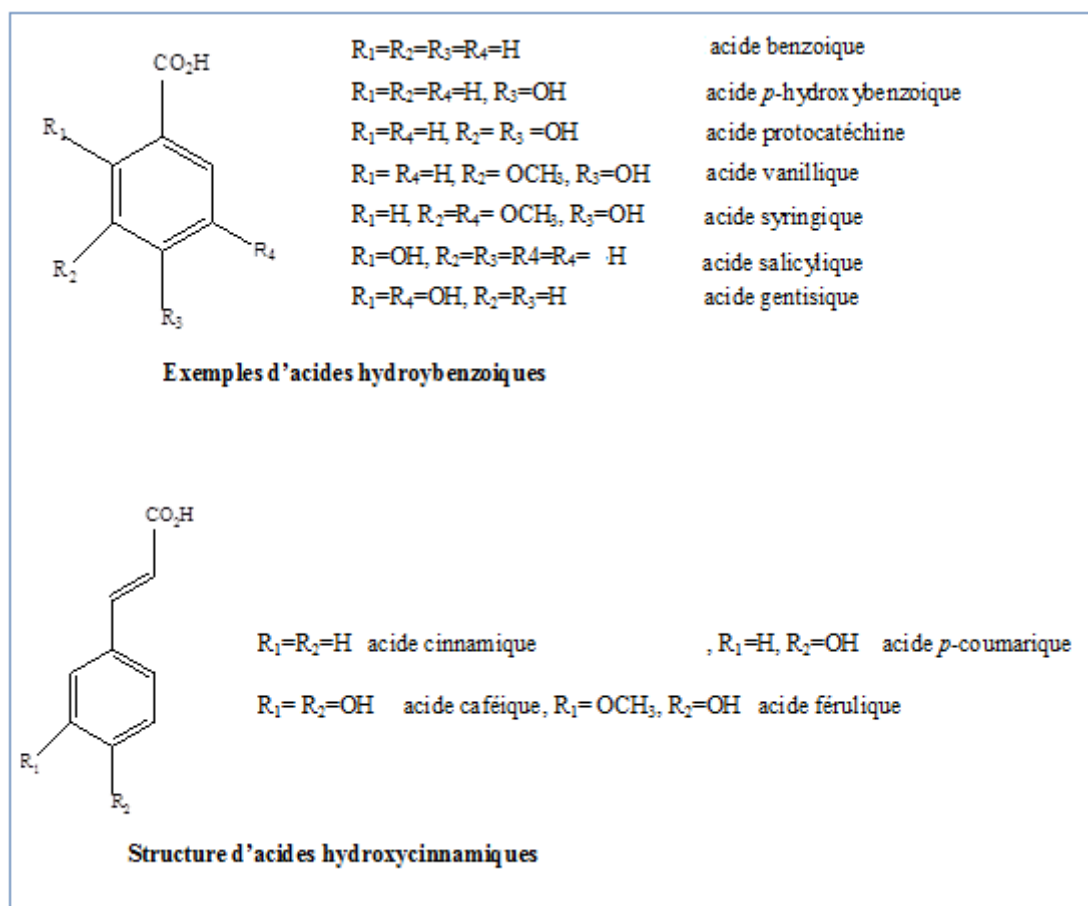


Figure 6 : Structures de quelques acides phénoliques présents dans le genre *Daucus*.

### 1.3.3.3. Les flavonoïdes

L'ensemble des flavonoïdes, de structure générale en C<sub>15</sub> (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), comprend à lui seul plusieurs milliers de molécules dont certaines ont une très grande importance biologique et technologique.

Le terme « flavonoïde » désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme les pigments quasiment universels des végétaux. Tous les flavonoïdes possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement 2-phénylchromane (Figure 7) [30].

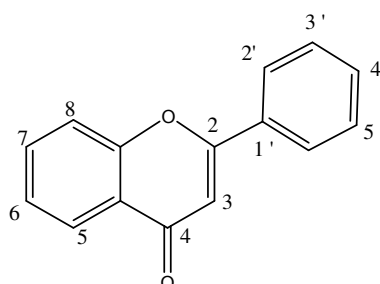


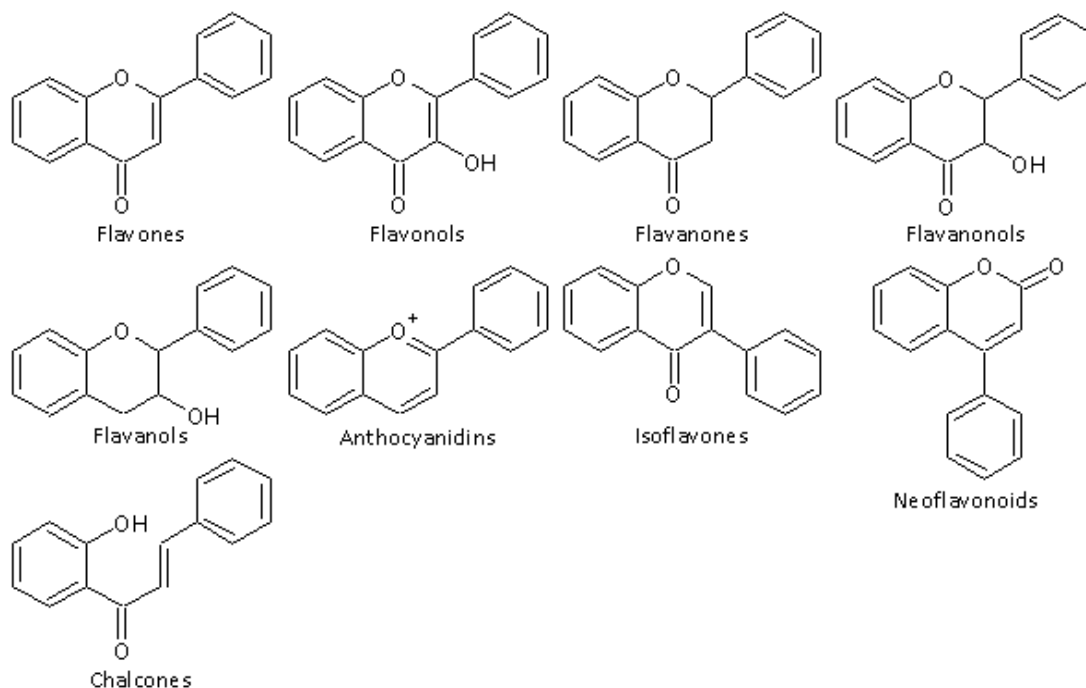
Figure 7 : 2-phénylchromane ( benzo- $\gamma$ -pyrone ) [31].

Ces composés existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides, c'est-à-dire liée à des oses et autres substances [24].

Les flavonoïdes constituent un groupe de composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires [24]. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux [36].

Ils peuvent être regroupés en une douzaine de classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central, lequel peut-être ouvert et recyclisé en un motif furanique (dihydrofuranone). La figure 8 illustre les principales classes de flavonoïdes.

Les travaux relatifs aux flavonoïdes sont multiples depuis la découverte du célèbre "french paradox" correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez les habitants des régions méditerranéennes, associant une consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées

**Classification:****Figure 8 : Classification des flavonoïdes.**

Tous les flavonoïdes dérivent de l'enchaînement benzo- $\gamma$ -pyrone et peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation du squelette benzo- $\gamma$ -pyrone [31].

Les flavonoïdes au sens strict sont des composés dont la substitution par un noyau benzénique se fait en position 2. Les composés présentant une substitution en position 3 sont désignés par le terme isoflavonoïdes [32]. Selon la nature de l'hétérocycle ( $\gamma$ -pyrone ou son dihydro-dérivé), on distingue :

- les flavones et les flavonols,
- les flavanones, les flavanols et les dihydroflavanols.

Les flavonoïdes peuvent se présenter sous forme d'aglycones ou génines (entités dépourvues de reste osidique) ou d'hétérosides (portant un ou plusieurs résidus osidiques).

Flavones et flavonols sont les composés flavonoïdiques les plus répandus dont notamment : la quercétine, le kaempférol, la myricétine et l'apigénine. Les flavanones (naringénine) et les flavanols (catéchine) ainsi que les dihydroflavanols (dihydrokaempférol, dihydroquercétine) et les dihydroflavan-3,4-diols (leucopélargonidol, leucocyanidol) sont considérés comme des flavonoïdes minoritaires en raison de leur distribution naturelle restreinte [33, 34].

## ***Chapitre 2***

### ***Spectrométrie de masse et couplage***

### ***LC/MS/MS***

### 2.1. Définition

La spectrométrie de masse (SM) désigne une méthode de caractérisation de la matière qui repose sur la détermination des masses atomiques ou moléculaires des espèces individuelles présentes dans l'échantillon [35]. Grâce à sa sensibilité (des limites de détection de l'ordre d'attomole sont souvent atteints), sa sélectivité et sa possibilité de faire des analyses quantitatives rapides, la spectrométrie de masse joue un rôle important dans plusieurs domaines, comme l'antidopage, la protéomique, la métabolomique, la médecine...

Le concept de spectrométrie de masse est relativement simple : un composé est ionisé (technique d'ionisation), les ions sont séparés selon leur rapport masse/charge (technique de séparation d'ions) et le nombre d'ions de chaque (unité) masse/charge est enregistré sous la forme d'un spectre [36].

### 2.2. Principe de base

La spectrométrie de masse est basée sur la détermination des masses des molécules ou atomes présents dans l'échantillon étudié. Cette technique transforme les molécules en ions et les trie selon le rapport de la masse sur la charge ( $m/z$ ). De plus, elle évalue la quantité relative de chacun des ions présents. Un petit échantillon de la substance est introduit dans une chambre à vide où il est vaporisé et bombardé avec des électrons hautement énergétiques. Pour arriver à ce résultat, on commence par transformer une très petite quantité du composé à analyser en ions par un moyen adapté (bombardement avec des électrons, des atomes, des photons...). Ces ions sont alors soumis, sous un très bon vide, à l'action d'un champ électrique et /ou magnétique selon les cas. Les forces qui s'exercent sur ces ions permettent de déterminer leur rapport *masse /charge*, donc éventuellement leur nature.

Le concept de la méthode apparaît dans la succession d'étapes auxquelles l'échantillon est soumis :

➤ *Ionisation*: l'échantillon porté sous forme de gaz ou de vapeur est ionisé dans la *source* de l'appareil. De nombreux procédés sont utilisables pour cette première étape. À ce stade, tout composé formé de molécules conduit à un mélange statistique d'ions de fragmentation.

➤ *Accélération*: aussitôt formés, les ions sont extraits de cette partie de l'appareil, *focalisés* et *accélérés* par des lentilles électroniques, pour accroître leur énergie cinétique.

➤ *Séparation*: les ions sont alors « filtrés » suivant leur rapport masse/charge par l'*analyseur*.

➤ *Détection*: après séparation, les ions terminent leur course en venant frapper le capteur d'un *détecteur* dont le signal est proportionnel aux charges des ions reçus [37].

Cette technique est applicable pour des composés solides, liquides et gazeux.

Elle permet :

➤ Détermination de la masse molaire

- Analyses structurales
- Explication des mécanismes de ruptures de liaisons...
- Analyses quantitatives :

Limites de détection < nanogramme  $10^{-9}$  g (parfois < picogramme)( $10^{-12}$ g)

### 2.3. Applications pratiques

- Biologie : Détermination de Masses molaires > 100000 (à 1 unité près) pour des macromolécules comme les protéines.
- Etudes de pollution de l'environnement.
- Etudes de pollution de l'environnement.
- Détection de dopants chez les sportifs.

### 2.4. Appareillage

Un spectromètre de masse est constitué de cinq éléments principaux :

- **Le système d'introduction** qui fait pénétrer l'échantillon dans le spectromètre
- **La source d'ions** dans laquelle les molécules sont ionisées.
- **L'analyseur** qui sépare les ions en fonction du rapport ( $m/z$ ) a application du champ magnétique et/ ou électrique.
- **Le détecteur** qui collecte les ions sortants de l'analyseur en fonction de leur abondance relative.
- **Un ensemble informatique** de traitement des données qui permet de transformer les informations reçues par le détecteur en spectre de masse.



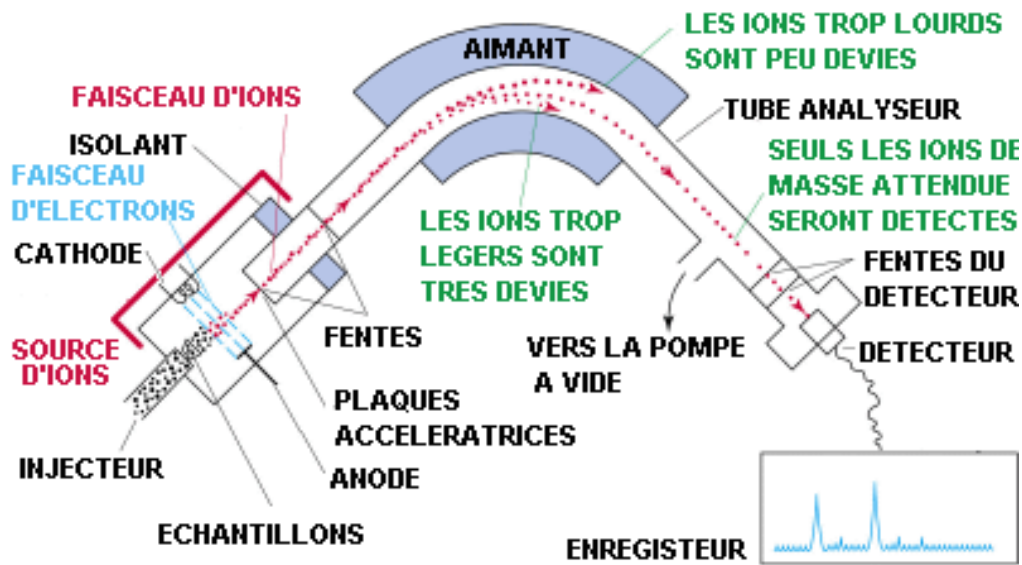


Figure 9 : Schéma d'un spectromètre de masse [38].

## 2.5. Techniques d'ionisation :

### 2.5.1. L'ionisation chimique

S'adresse à des composés volatils, apolaires et stables à la chaleur.

### 2.5.2. Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI)

S'adresse aux molécules polaires, peu volatiles comme peptides/protéines.

### 2.5.3. Electronébulisation (ESI)

L'électrospray est produit par application d'un **fort champ électrique** sur un liquide contenant l'analyte M traversant un capillaire. Ce champ provoque une accumulation de charges à la surface du liquide en sortie du capillaire, ce qui va former de fines gouttelettes **hautement chargées** (nébulisat). L'évaporation de solvant conduit au rétrécissement de la taille des gouttelettes jusqu'à ce que le champ électrique à leur surface soit suffisant pour provoquer la désorption des ions.

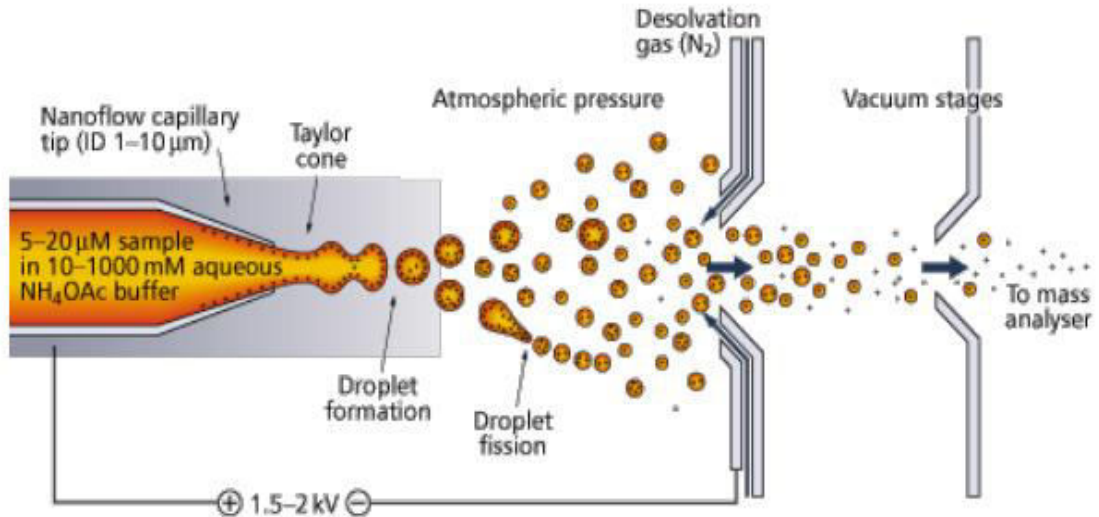


Figure 10 : Schéma représentant l'ionisation par électrospray.

☑ Avantage de l'électrospray :

- Fonctionne à basse T°C, à pression atmosphérique, pas de dégradation, pas de fragmentation.
- Génère des ions multichargés.
- Mesure précise de la masse moléculaire (0.1%) soit  $\pm 1$  Da sur  $M = 10000$  Da.
- Extraction des ions de large masse moléculaire (polymère, biomolécule).
- Sensible ( $C \sim \mu\text{M}$ ).
- Extraction des molécules polaires.

☑ Inconvénient de l'électrospray

- Peu d'information structurale, sauf si on effectue de la MS/MS
- Très sensible à la présence de sels ou additifs.

## 2.6. Quelques types d'analyseurs

### 2.6.1. Analyseur à temps de vol

Un analyseur à temps de vol est également appelé "Time of Flight" ou "TOF". Cet instrument possède plusieurs avantages, comme la vitesse d'analyse rapide, une transmission très élevée proche de 100%, la limite de haut  $m/z$  est aussi très élevée. L'analyseur à temps de vol a été inventé depuis de nombreuses années [39].

Mais, il a été vite dépassé par d'autres analyseurs à l'époque, comme le quadripôle ou l'analyseur à secteur magnétique. Aujourd'hui avec les progrès électroniques, il est beaucoup plus performant et peut rivaliser aux autres analyseurs modernes avec ses avantages. Le principe de cet analyseur est

## Spectrométrie de masse et couplage LC/MS/MS

simple, il repose sur le temps parcouru des ions dans un tube de vol. Au départ tous les ions reçoivent une même quantité d'énergie (plus ou moins, cela dépend de leurs positions initiales) qui les pousse vers le détecteur. Hors les ions n'ont pas les mêmes masses sur charge ( $m/z$ ), ce qui entraîne une différence d'accélération, par conséquent une différence de temps d'arrivée au détecteur (Figure 11). Le temps de vol des ions permet de mesurer le  $m/z$  des ions.

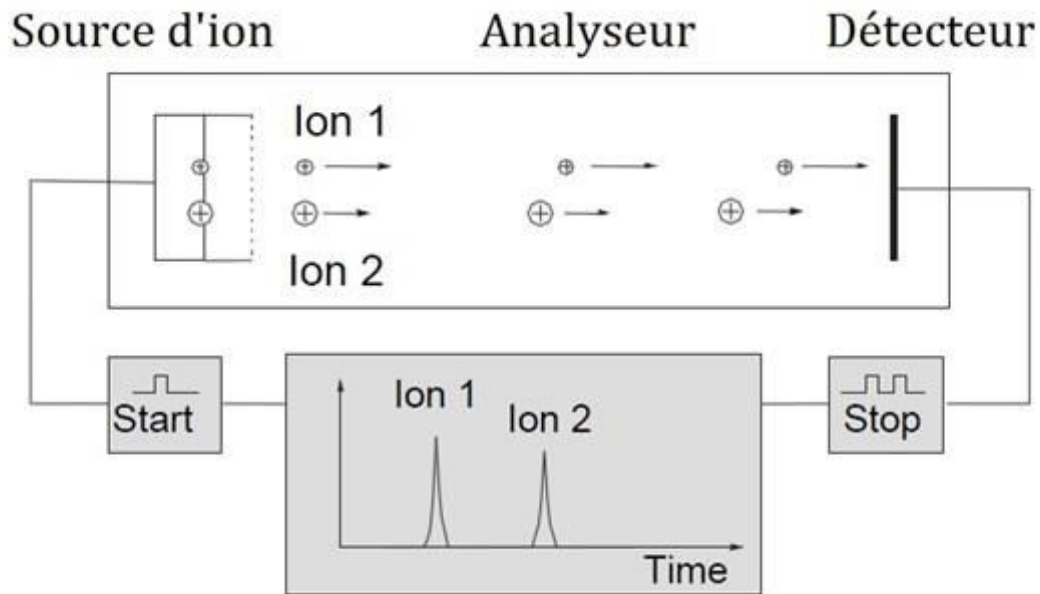


Figure 11 : La différence de vitesse des ions qui n'ont pas les mêmes masses.

### 2.6.2. Analyseur quadripolaire (Q) :

Les ions émanant de la source sont soumis à une tension continue (U) et une tension alternative (V) appliquées entre 4 électrodes. Le trajet des ions dans le quadripole est oscillant. Si l'amplitude des oscillations est trop grande, les ions sont collectés par les barres du quadripole et ils ne seront pas détectés.

On règle U et V de sorte que seul un ion de rapport m/z choisi puisse se frayer un chemin jusqu'au détecteur (trajectoire stable) (Figure 12).

Pour obtenir des mesures sur une gamme de rapports masse/charge, on modifie les réglages de l'appareil à haute fréquence.

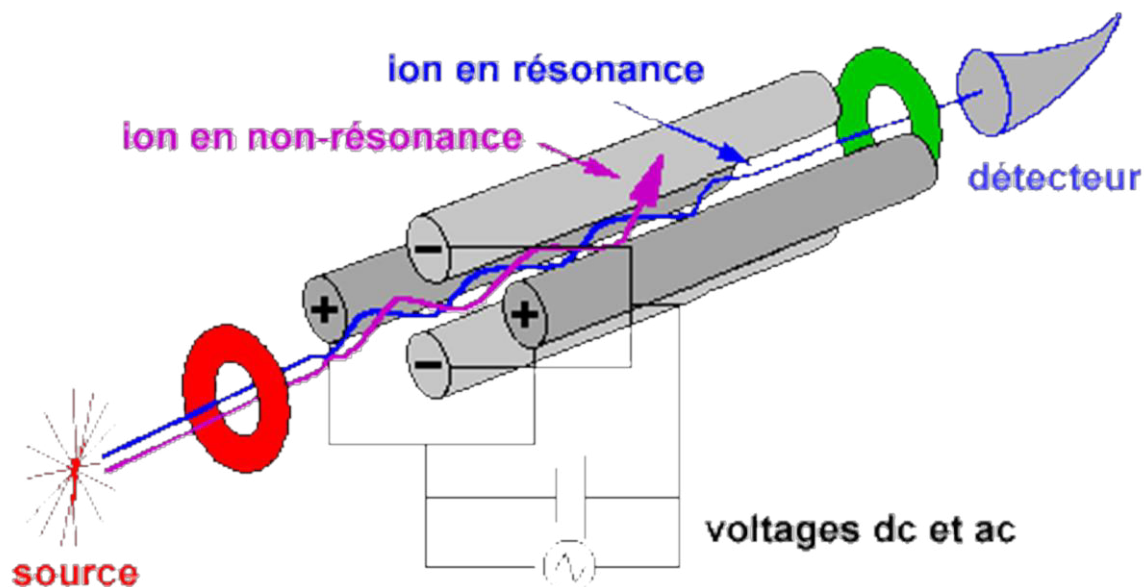


Figure 12: Analyseur quadripolaire.

### 2.7. La spectrométrie de masse à plusieurs dimensions MS-MS ou entandem

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) a introduit une nouvelle dimension dans l'analyse de mélanges complexes en permettant de déterminer la structure d'un ion sur la base de son profil de fragmentation. Elle permet d'isoler puis de fragmenter un ion parent, avant de reconstituer briques par briques sa structure à partir des ions fragments obtenus. Le développement des techniques de MS/MS a permis une multiplication de ses domaines d'applications, en particulier dans les sciences du vivant [40]. La spectrométrie de masse en tandem tire son nom de la conception des premiers instruments ayant permis son application, constitués de deux analyseurs de masse en tandem séparés par une zone de réaction (Figure 13). Les analyses de type MS/MS sont typiquement constituées de trois étapes. Au cours de la première étape (temps 1), le premier analyseur sépare les

ions formés dans la source d'ionisation selon leur rapport  $m/z$ . Durant la deuxième étape, ces ions sont fragmentés dans la zone de réaction. Dans la troisième étape, les fragments résultants, s'ils sont chargés, sont séparés en fonction de leur rapport  $m/z$  dans le second analyseur de masse. Enfin, les ions sont détectés par un multiplicateur d'électrons comme pour des spectromètres de masse conventionnels. Le spectre de fragmentation de l'ion parent apporte des informations supplémentaires sur celui-ci [41]. Différentes méthodes de fragmentation existent. Pour un même échantillon, les profils de fragmentation dépendent de la méthode utilisée. Le mode le plus répandu est appelé dissociation induite par collision (CID, *Collision-Induced Dissociation*) car les ions parents sont activés suite à leur collision contre une ou plusieurs molécules de gaz neutre. Cette méthode de fragmentation est basée sur une activation des ions parents par transfert d'énergie à la suite de collisions inélastiques contre un gaz neutre (Azote, Hélium...) (de Hoffmann et Stroobant, 2005). Le processus de collision s'effectue en deux étapes. La première correspond à la collision entre l'ion et le gaz cible amenant une partie de l'énergie cinétique de l'ion à se convertir en énergie interne et conduisant l'ion à un état d'excitation. La deuxième étape correspond à une décomposition unimoléculaire de l'ion activé : le chauffage vibrationnel global de la molécule induit la fragmentation de la molécule dès que les voies de dissociation nécessitant le moins d'énergie sont accessibles [41].

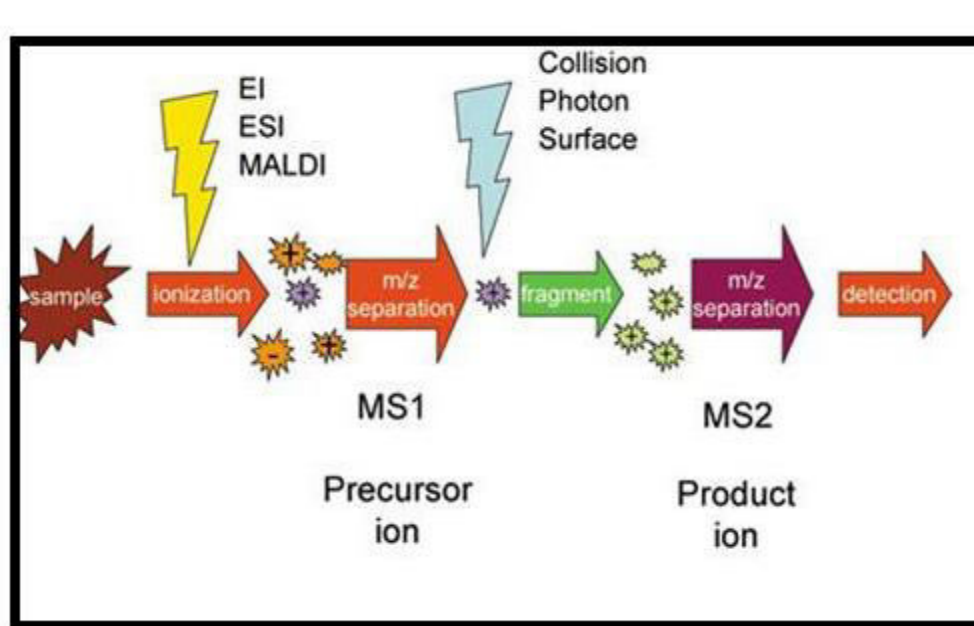


Figure 13 : Principe de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

### 2.8. Chromatographie liquide haute performance

L'HPLC est l'une des techniques les plus employées dans les laboratoires d'analyse chimiques. Elle permet l'identification, la séparation et le dosage de composés chimiques dans un mélange. Sa grande précision permet la recherche de traces et il est possible de la coupler à un spectromètre de

masse.

Quatre types sont couramment employés en fonction de la nature de la phase stationnaire.

- chromatographie d'adsorption :
- chromatographie de partage : c'est la plus utilisée des techniques avec une phase stationnaire apolaire
- chromatographie d'échange d'ions
- chromatographie d'exclusion : également appelée à "perméation de gel".

A chacune de ces méthodes, il correspond un type de colonne qui est l'élément vital de la chaîne d'HPLC. Elle met en jeu des forces d'adsorption qui vont varier en fonction de la polarité des produits chimiques et selon des isothermes d'adsorption spécifiques. Le choix du solvant d'HPLC va dépendre de la colonne et des composés à éluer et principalement de leur polarité.

Les techniques récentes des appareils d'HPLC assurent une grande vitesse de séparation ainsi qu'une grande fiabilité [42].

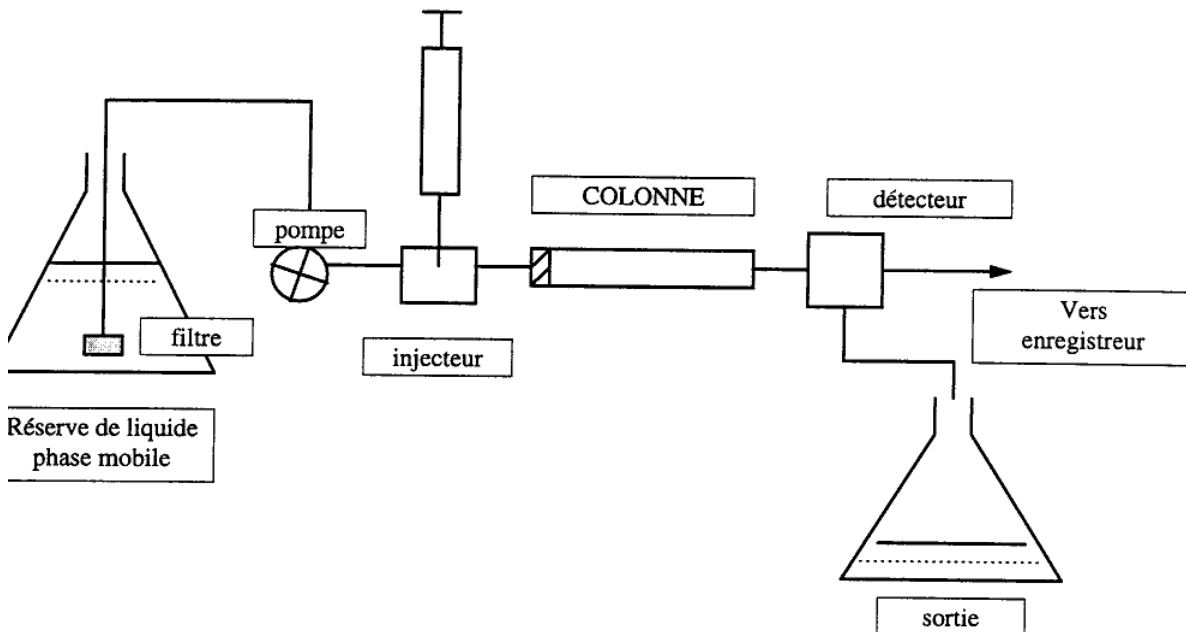


Figure 14 : Principe de fonctionnement de l'HPLC.

### 2.9. La spectrométrie de masse à plusieurs dimensions couplée à la HPLC: LC-MS-MS

Un système LC-MSMS est constitué de deux composants : - un appareil de chromatographie liquide - un spectromètre de masse (Figure 15).

D'une manière générale l'HPLC, qui fait intervenir une phase stationnaire solide constituée de particules fines et une phase mobile liquide, demeure la technique la plus souvent utilisée car elle

## Spectrométrie de masse et couplage LC/MS/MS

présente de nombreux avantages telles que sa simplicité de mise en œuvre, sa reproductibilité, une gamme étendue de phases stationnaires commercialement disponibles permettant de moduler les interactions avec le soluté, et ses diverses possibilités de couplages avec d'autres techniques chromatographiques et/ou des systèmes de détection. Parmi les différents systèmes de détection pouvant être couplés avec l'HPLC, les systèmes de détection les plus communément utilisés sont les détections par absorption dans l'ultraviolet visible (UV-vis), fluorescence, diffusion de lumière (DEDL), électrochimie, spectrométrie de masse

(MS, Mass Spectrometry) et résonance magnétique nucléaire (RMN). Outre ces avantages, cette technique peut être utilisée selon plusieurs modes de séparation en fonction des caractéristiques physico-chimiques des analytes à séparer dont le mode dit phase normale (NP, Normal Phase) dans lequel la phase stationnaire est polaire et la phase mobile est apolaire, et le mode dit phase inverse (RP, Reversed Phase) dans lequel les polarités sont inversées.

Le couplage entre la chromatographie liquide (LC) haute performance (ou haute pression) et la spectrométrie de masse (MS, nécessitant un vide poussé) a toujours été le maillon faible de la LC-MS, qui permet théoriquement d'allier la quasi universalité de l'une et de l'autre. Il s'agit, en effet, de résoudre deux problèmes majeurs : éliminer de larges volumes de gaz et de vapeur produits par la phase mobile et transformer les molécules en solution dans la phase mobile en ions en suspension dans une phase gazeuse, sans dégradation thermique et avec un faible coût [43].

Les couplages de la LC avec des systèmes à triple quadripôle, dits « en tandem » (LC-MS/MS) représentent aujourd'hui les plus fortes ventes dans l'industrie pharmaceutique (en particulier pour les études de toxicocinétique et de pharmacocinétique), ainsi probablement que dans les laboratoires de toxicologie médicale ou de suivi thérapeutique pharmacologique. Toutefois, avec l'avènement de la protéomique, on voit actuellement fleurir ou reflourir d'autres types de filtres de masse, de plus grande résolution, potentiellement applicables à la toxicologie (en particulier à l'identification de composés inconnus).

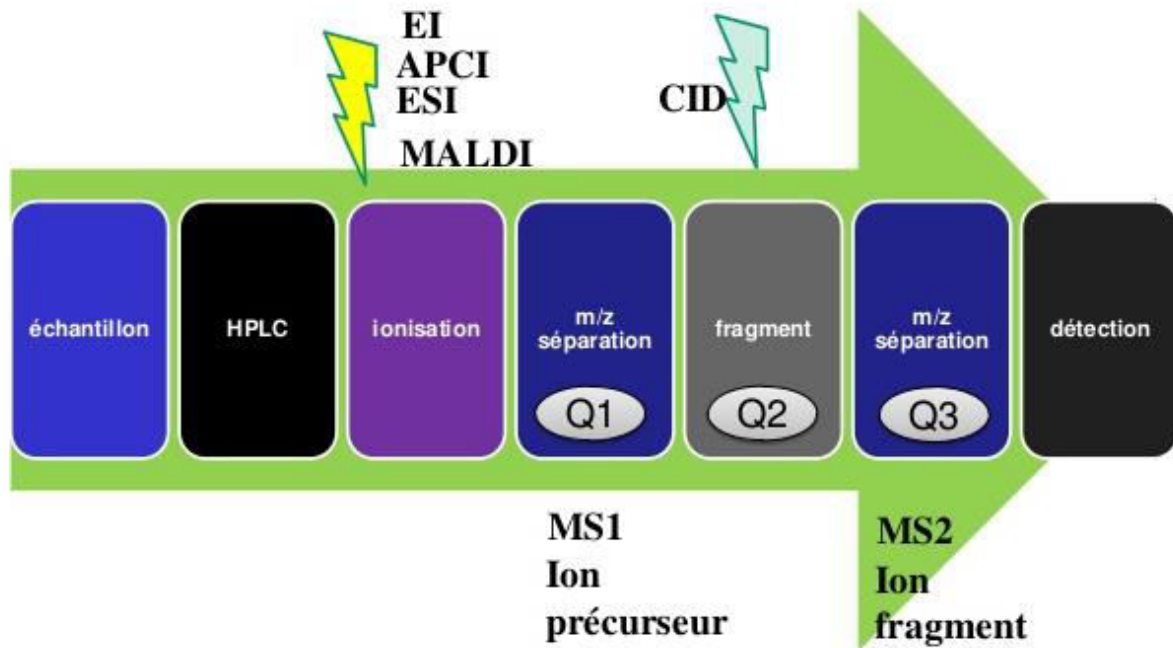


Figure 15: Principe d'un couplage LC/MS-MS.

## 2.10. Application de la spectrométrie de masse à l'étude de la fragmentation des flavonoïdes

La spectrométrie de masse reste la technique privilégiée pour la détermination de la masse des molécules. Différentes techniques d'ionisation existent dont les plus récentes sont les techniques d'ionisation douces que sont l'électrospray (ESI : electrospray ionization) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI : atmospheric pressure chemical ionization). Les flavonoïdes ont été largement étudiés en spectrométrie de masse en particulier les dérivés glycosylés [44,45].

Ces études ont permis d'établir des schémas de fragmentation de ces composés dans le but de pouvoir les identifier dans un extrait brut sans avoir procédé à les isoler [46, 47,48].

Ainsi, l'introduction de la LC/MS<sup>n</sup> dans l'analyse des extraits de plante représente une étape importante dans l'identification des produits naturels [49, 50].

C'est la technique de choix pour caractériser rapidement sans séparation chimique les éléments d'un mélange de composés naturels pour savoir s'ils sont connus ou non.

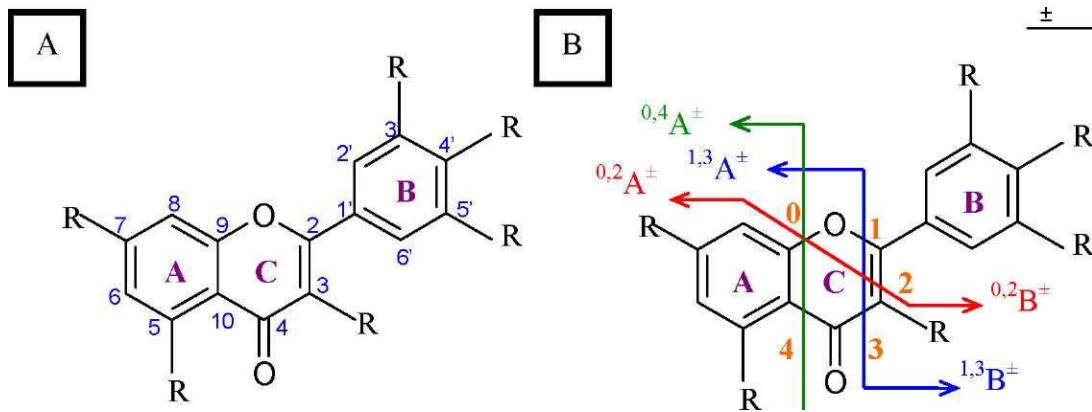
Ces composés sont caractérisés par une structure de type benzo- $\gamma$ -pyrrone (ou chromone). On distingue plusieurs grands types de noyaux (ou génines) : flavone, flavonol, isoflavone, ...

On trouve généralement un ou plusieurs hydroxyles portés par les noyaux benzéniques. Ce noyau (la génine) est souvent lié à des sucres soit par l'intermédiaire d'un hydroxyle (on parle alors de O-hétérosides) soit plus rarement par l'intermédiaire d'un carbone (C-hétérosides).

Le système de nomenclature utilisé pour décrire les fragments de flavonoïdes obtenus



par MS est celui qui a été proposé par Ma *et al* et qui est aujourd'hui largement répandu. Pour les génines, les mécanismes de fragmentation les plus courants impliquent la coupure entre deux liaisons carbone (C-C) du cycle C. Les ions fragments ainsi produits sont notés  $^{i,j}A^\pm$  et  $^{i,j}B^\pm$ , où A et B représentent les cycles A et B restés intacts, et *i* et *j* se réfèrent, quant à eux, aux liaisons du noyau C qui ont été rompues (Figure 16) [51].



**Figure 9 : Structure typique d'un flavonoïde avec la numérotation des carbones (A) et exemples de voies de fragmentation des flavonoïdes obtenues en MS/MS (B).**

R, correspond aux principales substitutions des flavonoïdes. Sur la structure de droite 0, 1, 2, 3 et 4 représentent les numéros de liaisons du cycle C qui subissent une rupture lors de la fragmentation. La fragmentation des flavonoïdes est explicable par des mécanismes rétro-Diels-Alder (RDA). Les réactions de RDA apparaissent sur des cycles à 6 carbones contenant au moins une double liaison. Une RDA du cycle C entraîne préférentiellement une coupure entre les liaisons 1 et 3 et forme ainsi deux ions fragments, généralement majoritaires. D'autres ruptures de liaisons peuvent intervenir selon le mode d'ionisation et la classe de molécules étudiées [52, 53].

Pour les flavonoïdes glycosylés, la nomenclature utilisée sera celle décrite par Domon et Costello dans laquelle la génine est décrite avec un  $Y_0$  alors que  $Y_n$  correspond à la génine liée à *n* monosaccharides. Les fragments glycosides correspondants sont notés respectivement B avec *n* le nombre de monosaccharides de la partie osidique [54].

L'étude spécifique de la génine nécessite de faire dans un premier temps une fragmentation MS/MS de l'ion moléculaire (fragmentation par dissociation induite par collision ou CID), puis de sélectionner l'ion correspondant à la génine, soit  $Y_0^+$  ou  $Y_0^-$ , et de lui faire subir une fragmentation par CID ( $MS^3$ ).

### 2.10.1. Fragmentation en mode négatif des génines

Le mode négatif est plus communément utilisé pour l'identification structurale par PLC-MS des flavonoïdes car il est plus sélectif et plus sensible [56, 55]. En mode négatif, la voie principale de fragmentation reste la coupure de la liaison 1/3 du noyau C. Les ions fragments obtenus  $^{1,3}A^-$ ,  $^{1,3}B^-$  et  $[^{1,3}A-CO_2]^-$  sont généralement les ions majoritaires. Cependant d'autres voies de fragmentation, 1/2, 1/4 et 0/4, peuvent être observées. Il a été remarqué que la rétro cyclisation liée à la coupure 1/2 et qui induit les ions  $[^{1,2}A-H]^-$ ,  $[^{1,2}B-H]^-$ ,  $[^{1,2}A-CO]^-$ ,  $[^{1,2}A-CO-CO_2]^-$  est spécifique aux molécules substituées par deux hydroxyles sur le noyau B (Figure 17). Ces ions étant très peu observables lorsque le noyau B est non substitué [52, 55].

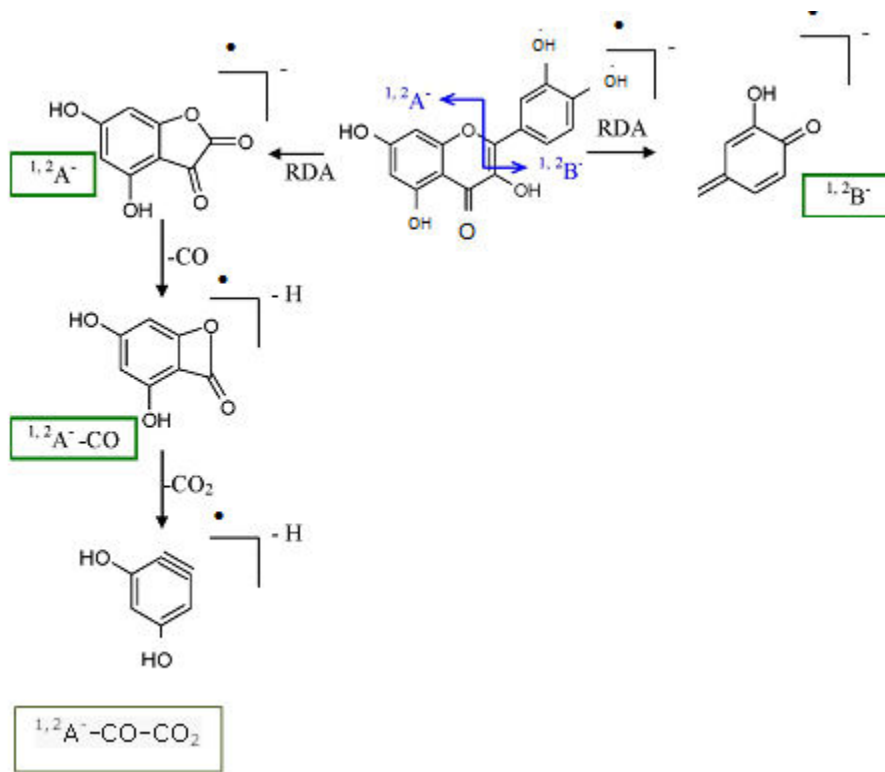


Figure 17 : Schéma de fragmentations obtenu pour la quercétine en mode négatif après

Les ions moléculaires peuvent être sujets à des pertes de neutres en mode négatif, dont les plus fréquentes sont la perte de CO (28 u), CO<sub>2</sub>(44 u), C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O (42 u), 2CO (56 u) ou la perte successive de CO et CO<sub>2</sub>(72 u), spécifique au mode négatif. Les composés méthylés sont caractérisés par la perte de 15 u correspondant à la perte du CH<sub>3</sub>et qui généralement forme l'ion le plus abondant du spectre  $[M-H-CH_3]^-$ . Dans certains cas, la perte directe du noyau B peut être observée, sans phénomène de rétrocyclisation [52, 56, 55].

### 2.10.2. Fragmentation des flavonoïdes-O-glycosylés

Selon leurs structures, les flavonoïdes-O-glycosylés peuvent subir à la fois un clivage

hétérolytique et homolytique permettant de déterminer la nature du sucre et sa position sur la génine [23]. Le clivage hétérolytique produit une coupure de la liaison osidique avec réarrangement des protons. L'ion fragment  $Y_0^\pm$  correspondant à la génine est alors formé et l'élimination du sucre produit des pertes caractéristiques qui permettent de déterminer facilement la nature de celui-ci. Par exemple les pertes de 162, 146, 132 et 308 u sont respectivement spécifiques de l'élimination d'un hexose, d'un déoxyhexose, d'un pentose et d'un disaccharide [56]. Le clivage homolytique de liaisons *O*-glycosidiques produit l'ion radicalaire de la génine  $[Y_0 - H]^\pm$ . Hvattum et Ekeberg [44] ont étudiés en mode négatif l'abondance de cet ion radicalaire pour différents types de flavonoïdes-*O*-glycosylés. Pour les flavonols, ils ont démontré que la proportion relative de  $[Y_0 - H]^-$  augmentait avec le nombre de groupements hydroxyles sur le noyau B, et que la nature et la position des sucres sur la génine avait une influence sur la formation de cet ion radicalaire. Une glycosylation en position 7 conduit à une proportion plus importante de  $[Y_0 - H]^-$  par rapport à une glycosylation en position 3.

## ***Chapitre 3***

### ***Généralités sur l'activité antioxydante***

### 3.1. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif correspond au déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs, c'est-à-dire un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants impliquant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) [58-59-60]. Ces espèces sont des radicaux libres qui dérivent de la molécule d'oxygène, par addition d'un électron.

Un radical libre est défini comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés [61], cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité, une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre [62].

Les principales espèces réactives de l'oxygène sont: l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) et le monoxyde d'azote  $NO^{\cdot}$  [63-64].

### 3.2. Conséquences biologiques du stress oxydant

Elles seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant : mutation, carcinogénèse, malformation des fœtus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, immunosuppression [65].

### 3.3. Les antioxydants

Les antioxydants sont des substances permettant de prévenir ou de retarder l'oxydation catalytique et le rancissement naturel ou induit par l'action de divers agents (l'air, la lumière, la chaleur) [66]. Ces propriétés expliquent le grand intérêt pour leur utilisation comme additif dans les domaines alimentaires, cosmétique et pharmaceutique.

Ces molécules sont capables d'interagir sans danger avec les radicaux libres et de mettre fin à la réaction en chaîne avant que les molécules vitales ne soient endommagées. Chaque molécule antioxydante ne peut réagir qu'avec un seul radical libre et par conséquent, il faut constamment refaire le plein de ressources antioxydantes [67]. Elles sont largement présentes dans nos aliments, soit sous forme naturelle, soit sous forme d'additifs utilisés dans l'industrie agroalimentaire [68].

### 3.4. Classification des antioxydants

#### 3.4.1. Classification en fonction de type d'action

Elle est basée sur le mécanisme d'action des antioxydants. Les antioxydants primaires sont les molécules qui permettent le piégeage des radicaux libres et celles qui n'impliquent pas directement la captation des radicaux libre sont considérées comme antioxydants secondaires ; elles agissent comme chélateurs d'ions capables de catalyser l'oxydation, kidnappeurs d'oxygène, en transformant les hydro peroxydes en espèces non radicalaires. Il existe aussi des antioxydants montrant une activité antioxydante uniquement en présence d'autres antioxydants comme l'acide citrique par exemple [69].

#### 3.4.2. Classification par voie d'obtention

Une autre classification concerne la voie d'obtention des molécules anti oxydantes. Elles peuvent être obtenues par : Synthèse chimique, on parle des antioxydants synthétiques, ou par extraction à partir des sources naturelles, on parle des antioxydants naturels.

### 3.5. Les sources d'antioxydants

En plus des substances propres à l'organisme, les médicaments, l'alimentation et les plantes peuvent être également des sources d'antioxydants.

#### 3.5.1. Médicaments

Ils constituent une source importante d'antioxydants. Actuellement, les classes thérapeutiques comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les anti-hyperlipoprotéïnémiques, les bêta-bloquants et autres antihypertenseurs ont été évalués pour leurs propriétés antioxydantes :

#### 3.5.2. Source alimentaire

Certaines substances ingérées sont utilisées par l'organisme comme antioxydants. Ce sont principalement : la vitamine C, la vitamine E, le sélénium et le *B*-carotène.

#### 3.5.3. La vitamine C ou acide ascorbique

C'est un puissant réducteur. Il joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E. Il est présent dans les légumes, le chou, le poivron, les agrumes [70].

### 3.5.4. La vitamine E ou tocophérol

Prévient la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en capturant les radicaux peroxydes. Elle est présente dans les huiles végétales, les noix, les amandes, les graines, le lait, les œufs et les légumes à feuilles vertes [71].

### 3.5.5. Le B-carotène

En outre l'activité pro vitaminique A, possède la capacité de capter l'oxygène singulet. Il est retrouvé dans les légumes verts, les épinards, la salade, les carottes, l'abricot, le melon, la papaye et d'autres fruits jaunes [71].

## 3.6. Antioxydants naturels

En ce qui concerne les plantes médicinales bien connues et économiquement importants, nous pouvons citer l'ail et le ginkgo qui sont utilisés dans le traitement des maladies cardio-vasculaires et circulatoires dues au vieillissement [72].

### 3.6.1. Les flavonoïdes

Ces métabolites secondaires sont présentes dans la plupart des plantes, les flavonoïdes sont des pigments polyphénoliques qui sont responsables dans la plupart des colorations des fleurs et des fruits. Ils possèdent de nombreuses vertus thérapeutiques. Ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation. Certains ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et anti virales, d'autres ont des effets protecteurs sur le foie.

Des flavonoïdes comme l'héspéridine et la rutine, présentes dans plusieurs plantes, dont le Sarrasin et le Citronnier, renforcent les parois capillaires et préviennent l'infiltration dans les tissus voisins.

Les relations structure activités antioxydantes des flavonoïdes et des composés phénoliques ont montré que l'activité antioxydante était déterminée par la position et le degré d'hydroxylation [72].

### 3.6.2. Les tanins

Toutes les plantes en contiennent à des degrés différents. Ce sont des composés polyphénoliques qui permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections. Les plantes riches en tanins sont utilisées pour retendre les tissus souples, comme dans le cas des veines variqueuses, pour drainer les sécrétions excessives, comme dans la diarrhée et pour réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure . Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides [73].

### 3.6.3. Les coumarines

Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses.

Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Les conditions structurales requises pour l'activité antiperoxydante des coumarines sont similaires à celles signalées pour les flavonoïdes [72].

### 3.6.4. Les phénols

Il existe une très grande variété de phénols, de composés simples comme l'acide salicylique, molécule donnant par synthèse l'aspirine, à des substances plus complexes comme les composés phénoliques auxquels sont rattachés les glucosides. Les phénols sont anti-inflammatoires et antiseptiques. On suppose que les plantes, en les produisant, cherchent à se prémunir contre les infections et les insectes phytophages. Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales.

Parmi les dérivés phénoliques, le resvératrol est le composé qui est le plus étudié. En effet, ce stilbène, isolé du raisin possède de fortes propriétés antioxydantes [72].

### 3.6.5. Les xanthones

Les propriétés pharmacologiques reconnues des xanthones sont essentiellement : leur activité antimicrobienne, leur cytotoxicité et surtout l'inhibition de la monoamine-oxydase [74].

La manguférine est une xanthone qui possède la propriété d'inhibition envers la peroxydation des lipides, ainsi que des propriétés de capteurs de radicaux libres contre les anions super oxydes.



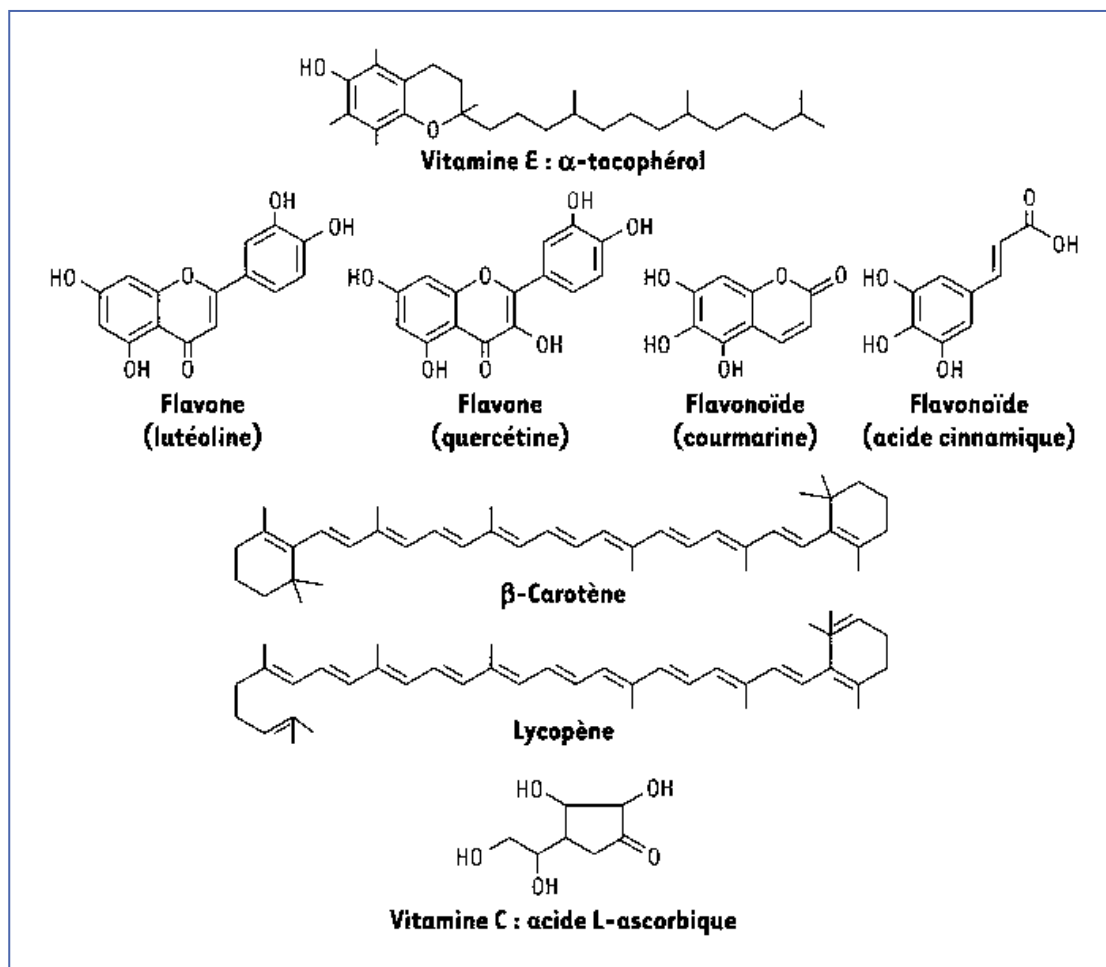


Figure 18 : Quelques antioxydants naturels et synthétisés.

### 3.7. Evaluation *in vitro* des activités biologiques

Diverses méthodes de dosage de l'activité antioxydante *in vitro* induisent la mesure de l'inhibition de l'oxydation des lipides et des lipoprotéines. Celles-ci ne seront pas abordées, ni celles mesurant le pouvoir antioxydant *in vivo* sur le modèle animal ou chez l'Homme. Cette étude se focalisera sur les méthodes témoignant de l'aptitude d'une molécule ou d'un extrait naturel à piéger des radicaux libres – par transfert d'électron et/ou de proton -issus de phénomènes d'oxydations. On parlera alors d'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante [75].

#### 3.7.1. Capacité de piégeage d'espèces radicalaires (effet scavenger du radical (DPPH) :

##### Réaction entre le radical libre DPPH<sup>•</sup> et l'antioxydant:

D'un point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH<sup>•</sup> est recommandé pour des composés contenant des groupes -SH, -NH et -OH. Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle possède un électron non apparié sur un atome d'azote. Ce radical ne forme pas des dimères, il reste donc sous sa forme monomère qui est relativement stable [76].

La réduction du DPPH<sup>•</sup> par un agent antioxydant en DPPH-H induit une perte de sa couleur violette foncée qui va se transformer en jaune pâle (figure 19). Cette réaction qui s'effectue à température ambiante pour éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles peut être suivie spectrophotométriquement en mesurant la diminution de son absorbance entre 515-518 nm [76].

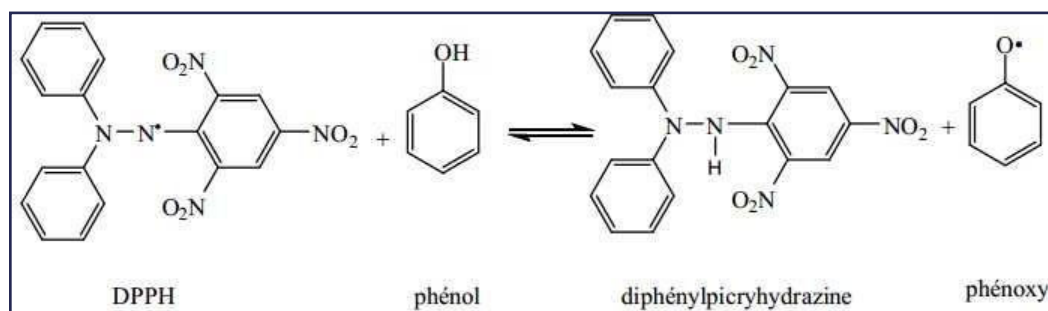
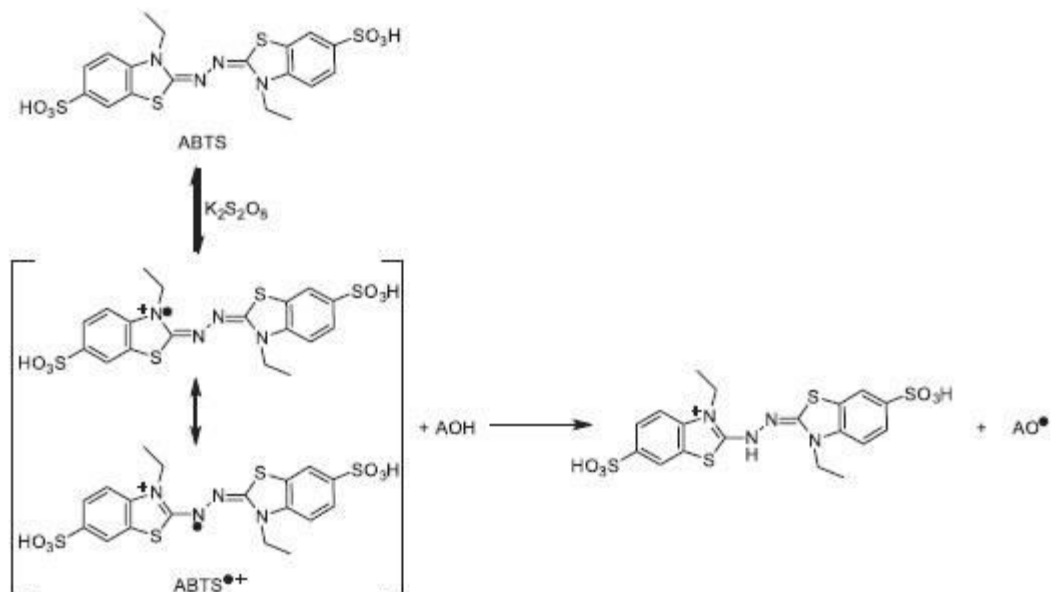


Figure 19 : Mécanisme réactionnel d'un antioxydant avec le DPPH<sup>•</sup> [76].

### 3.7.2. Méthode TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity (ABTS)

Cette méthode est basée sur la capacité des composés à piéger le radical-cationique ABTS<sup>•+</sup>, (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique), qui présente un spectre d'absorption dans le visible avec trois maxima à 645, 734 et 815 nm [77]. En réagissant avec le persulfate de potassium (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), l'ABTS forme le radical ABTS<sup>•+</sup>, de couleur bleue à verte. L'ajout d'un antioxydant va réduire ce radical et provoquer la décoloration du mélange (Figure 20).

La décoloration du radical, mesurée par spectrophotométrie à 734 nm, est proportionnelle à la concentration en antioxydants. Le radical cationique ABTS<sup>•+</sup> est formé par arrachement d'un électron (e<sup>-</sup>) à un atome d'azote de l'ABTS. En présence d'un 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 [78].



**Figure 10 : Génération du radical-cation  $ABTS^{\bullet+}$  avec le persulfate de potassium et sa réaction avec un antioxydant (AOH) [79].**

### 3.7.3. Inhibition de blanchissement de $\beta$ -carotène

La décomposition des acides gras est une des causes principales de détérioration de la nourriture. La lutte contre l'oxydation des lipides, par l'utilisation des conservateurs naturels, représente donc un enjeu considérable pour les industries alimentaires. C'est dans ce contexte que nous avons évalué l'activité antioxydante de la plante *D.muricatus*.

Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique (un acide gras insaturé s'oxyde par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produits par l'eau oxygénée. Le produit formé lancera l'oxydation du  $\beta$ -carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur orange qui est suivie spectrophotométriquement à 490 nm [80]. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique, et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement de  $\beta$ -carotène [81].

### 3.7.4. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

La méthode CUPRAC (Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) est une méthode développée par Apak et al. Le principe de ce test se base sur la conversion des hydroxyles phénoliques en quinones à travers la réduction du complexe  $Cu^{+2}$ -Nc, produisant ainsi un complexe chromogène de  $Cu^+$ -Nc qui absorbe à 450 nm.

A cette longueur d'onde, le complexe cuivre-néocuproïne est réduit et cette réaction est quantifiée spectrophotométriquement (Figure 21) [82]. .



C'est une méthode de mesure du potentiel antioxydant utilisée pour une grande variété de polyphénols, y compris les acides phénoliques, les acides hydroxy cinnamiques, flavonoïdes, les caroténoïdes, les anthocyanines, ainsi que pour des thiols et les antioxydants synthétiques, les vitamines C et E [83].

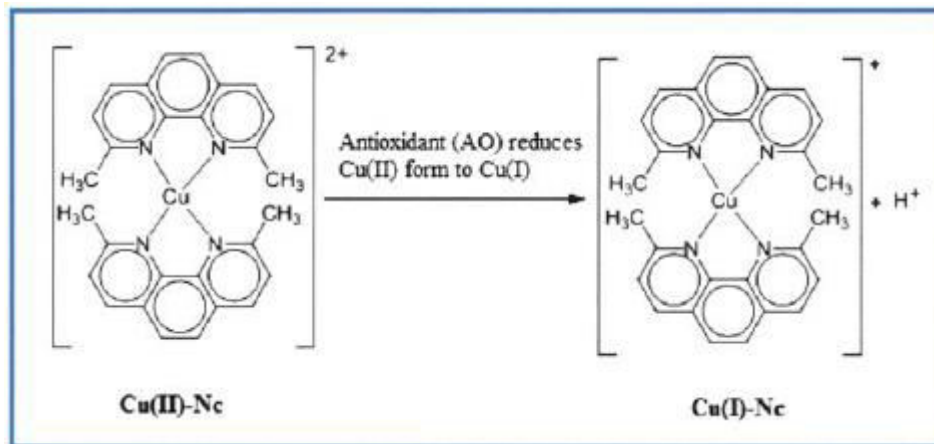


Figure 21 : Mécanisme de formation du complexe  $\text{Cu}^+$ -Nc.

### 3.7.5. Chélation du Fer ferreux

La chélation des ions ferreux est déterminée suivant une méthode basée sur l'inhibition de la formation du complexe  $\text{Fe}^{+2}$ -Ferrozine (Figure 22), chromophore de couleur violette ayant un maximum d'absorption à 562 nm [84]. En présence d'agents chélateurs, la formation de ce complexe est perturbée aboutissant à une diminution intense du couleur qui sera suivie spectrophotométriquement. Plus la coloration de la solution contenant l'extrait testé est claire, plus le pouvoir chélateur est important.

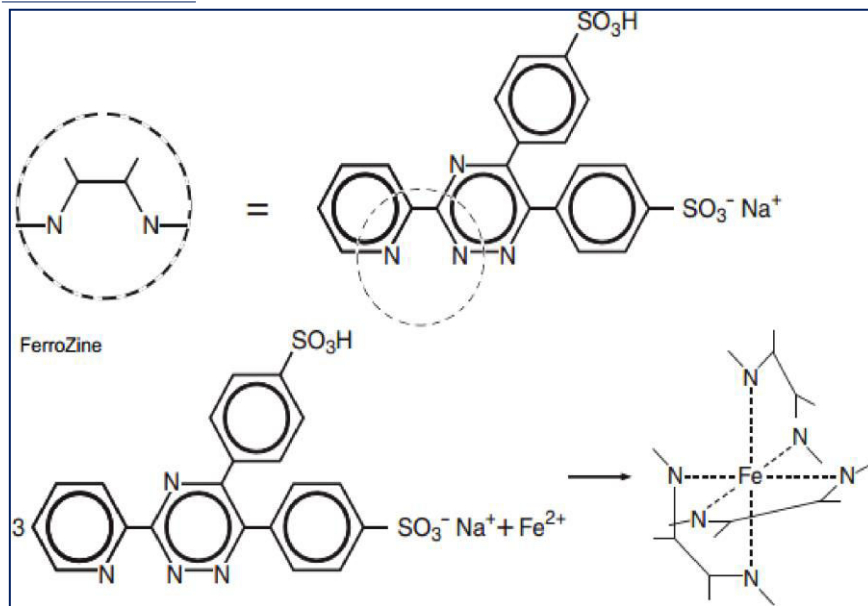


Figure 22 : Mécanisme de formation du complexe  $\text{Fe}^{2+}$ -Ferrozine.

## **2<sup>ème</sup> Partie**

### ***Partie expérimentale***

## 1. Matériel végétal

### 1.1. Description de la plante *Daucus muricatus* L

Nom en Français : *Daucus* épineux.

L'espèce a pour nom commun «*Ouarzdel.*» chez les habitants du maroc; elle est connue aussi par le nom « Hasket el arbiya » et « rechad » [85]

- Plante annuelle de 30-50 cm, d'un vert obscur, hérissée à la base
- tige épaissie aux noeuds, à rameaux étalés-dressés
- feuilles molles, lancéolées dans leur pourtour, tripennatiséquées, à segments découpés en lanières étroites et mucronulées
- fleurs blanches, celles de la circonférence rayonnantes, la centrale non purpurine
- ombelles opposées aux feuilles, à la fin contractées, la terminale plus courte que les latérales
- réceptacle ombellaire non dilaté
- involucre à folioles linéaires-sétacées
- fruit gros, elliptique, comprimé, armé d'aiguillons très élargis et confluent à la base, égalant sa largeur
- côtes de la commissure contiguës, parallèles.

Floraison Juin-juillet [86] .

#### Habitat

Sables maritimes de la Corse, où il est très rare. Trouvé aussi sur les côtes de la Provence. Espagne et Portugal ; Sardaigne, Italie, Sicile, Grèce, Turquie ; Afrique septentrionale [86].

#### Synonymes

*Ballimon muricatus* (L.) Raf., *Artedia muricata* L *Caucalis muricata* (L. *Platyspermum muricatum* [86].



Figure 23 : Fruits du *D. muricatus* L

## 2. Provenance du matériel végétal et identification

La reconnaissance botanique de la plante a été faite par Monsieur professeur Laouar Houcine du département de biologie. Université Ferhat Abbas Setif).

Le matériel végétal utilisé correspond à la partie aérienne composée des tiges et des feuilles de l'espèce *Daucus muricatus*. La récolte s'est effectuée en Juin 2012 niveau de la localité de région djbel el Meghres (Wilaya de Setif).

Le séchage s'est fait à la température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité afin d'éviter la dégradation des principes actifs. Après séchage, les deux parties de la plante ont été broyées séparément et stockées soigneusement dans un endroit sec en vue de leurs analyses [89].

## 3. Macération et extraction

Différents extraits sont préparés à partir de la poudre de la plante selon la solubilité des métabolites à mettre en évidence:

- Un extrait chloroformique; préparé par macération pendant 24 h dans un flacon bouché et bien protégé de la lumière de 900g de la poudre dans 2 L de chloroforme. Après filtration cet extrait est destiné à l'élimination de la chlorophylle et la détection des composés de faible polarité tels les stéroïdes et les terpénoïdes, les triterpènes en l'occurrence (le procédé est répété trois fois) (Daniel, 2013).
- Un extrait méthanolique; le reste de la plante (résidu) subit une macération par un mélange hydro-alcoolique (MeOH/H<sub>2</sub>O ; 80 :20 ; V/V) 3× 24 heures. Un extrait brut est récupéré après évaporation à sec à une température de 40 °C maximum.
- Extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol ; L'extrait brut obtenu est dilué avec de l'eau distillée (4°C) puis laissé au repos pour décantation. Après, on filtre pour obtenir une solution aqueuse qui subit des extractions liquide-liquide par des solvants de polarité croissante, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol successivement.

Les fractions organiques récupérées sont concentrées et pesés conduisant à 34.60 g pour la fraction chloroformique, 82.55 g pour la fraction méthanolique, 8.55g pour la fraction acétate d'éthyle et 14.49 g pour la fraction butanolique (Figure 25).



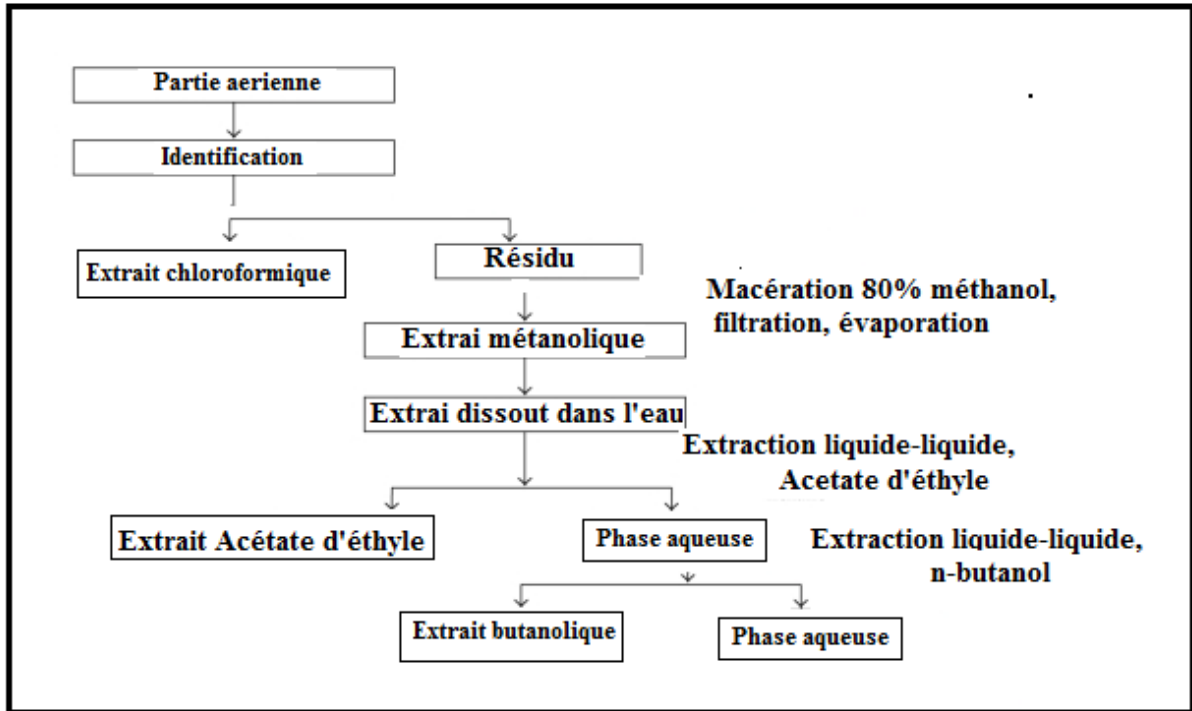


Figure 25: Protocole d'extraction.

#### 4. Analyse colorimétrique par spectrométrie (UV-visible)

##### 4.1. Dosage des composés phénoliques par colorimétrie

La teneur en composés phénoliques des différents extraits est déterminée par le test de Folin-Ciocalteu, décrite par Singleton et Rossi 1999 qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) du réactif de Folin par les groupements réducteurs des composés phénoliques, conduisant à la formation de produit de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 760 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans l'échantillon. Les solutions des différents échantillons. Les solutions des différents déchantions à doser et la gamme étalon sont préparée de la même manière et dans les mêmes conditions [90].

##### Procédure :

A 125  $\mu$ l de chaque extrait (1 mg dans 1 ml d'eau distillée), sont ajouté 500  $\mu$ L d'eau distillée puis 125  $\mu$ l de réactif de Folin-Ciocalteu, trois minutes plus tard, 1.25 ml carbonate de sodium (20 g/L) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 90 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 760 nm. La quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire de la forme  $y = a x$  réalisée en utilisant l'acide gallique comme référence.

La quantité des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (50-500µg/mL). Le résultat est exprimé en µg d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg d'extrait).

### 4.2. Dosage des flavonoïdes totaux :

Les teneurs en flavonoïdes des extraits étudiés ont été mesurées selon la méthode de Turkoglu et al. (2007), extraits est basée sur la complexation avec  $Al^{+3}$ .

L'extrait de concentration (1 mg) a été dilué avec 1 ml d'éthanol aqueux à 80% (v / v) contenant 0,1 ml de nitrate d'aluminium ( $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ ) à 9.8% (v / v) et 0,1 ml d'acétate de potassium aqueux ( $CH_3COOK$ ) 1 M et laissé reposer pendant 40 minutes. à température ambiante.

L'absorbance a été déterminée par spectrophotométrie à 415 nm. La teneur totale en flavonoïdes a été mesurée en traçant la courbe d'étalonnage d'un étalon de quercétine (0 - 200 µL/mL ) , déterminée en milligrammes d'équivalents de quercétine par gramme de champignon séché [91].

### 5. Analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en TANDEM (LC/MS/MS)

Dans le cadre d'analyse chimique qualitative de l'extrait butanolique de la plante *D.muricatus*, , la méthode appliquée est la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem; Le choix de cette technique s'est appuyé sur la littérature [92]. L'instrument (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) est équipé d'un dégazeur à vide, un échantillonneur automatique, une pompe binaire et une DAD D'après la littérature, la phase stationnaire classiquement employée pour analyser les molécules organiques est une phase C18. C'est ainsi qu'une colonne Zorbax-SB C18 avec des particules de 1,8 µm et une longueur de 5 cm a été choisie),le taux du flux utilisé était de 0,80 mL. min- et l'analyse a été effectuée à température ambiante [93].

L'extrait butanolique de la plante *D.muricatus* a été injecté dans des mélanges de solvants eau/ acide formique (0,1%) (éluant A). et Acétonitrile (éluant B).

Les données de masse précises pour les ions moléculaires ont été traitées à l'aide du logiciel d'analyse de données Agilent Mass Hunter Workstation, qui a fourni une liste de formules élémentaires possibles en utilisant la formule moléculaire Editor TM Générer. Elle utilise un

algorithme de CHNO offrant des fonctionnalités standard comme la bande minimum/maximale d'intervalle élémentaire, configuration électronique n et de l'anneau-plus de doubles liaisons équivalentes, ainsi que la comparaison théorique sophistiquée avec le modèle isotopique mesurée (Sigma-Value), pour plus de précision dans la formule moléculaire suggérée. Le seuil de précision largement accepté pour la confirmation des compositions élémentaires a été établi à 5 ppm pour la plupart des composés. Il est important d'ajouter que, même avec une très grande précision de masse <1 ppm, de nombreuses formules chimiques peuvent être obtenues, en fonction des régions de masse considérées, ainsi une grande précision de la masse <1 ppm n'est pas en soi-même suffisante pour exclure les formules candidates suffisantes avec des compositions élémentaires complexes. L'utilisation de modèles de teneur isotopique en une seule contrainte supplémentaire élimine plus de 95% de fausses candidates. Ce filtre orthogonal permet de réduire plusieurs milliers de formules candidates à un petit nombre de formules moléculaires [93].

### 5.1. Calibration et courbe d'étalonnage

Le calibrage externe du spectromètre de masse a été effectué en utilisant une seringue (74900-00-05) Cole Palmer pompe (Vernon Hills, Illinois, USA), directement connectée à l'interface, équipé d'une seringue Hamilton (Reno, Nevada, Etats-Unis) contenant des groupes de solutions d'ester de formiate de sodium (hydroxyde de sodium à 5 mM et de l'eau : 2 propanol 1: 1 (v / v) avec 0,2% d'acide formique. La solution d'étalonnage a été injectée au début de l'analyse et tous les spectres ont été étalonnés avant l'identification pour l'obtention des valeurs de masse précises grâce à la compensation du changement de la température dans l'analyseur de masse. Pour la détermination quantitative, quatre mélanges de standards ont été utilisés pour le calibrage de la spectrométrie de masse par l'utilisation de composés de référence authentique en utilisant comme phase mobile le méthanol: eau (80:20) (Tableau2).

Table 2 : Calibration LC/MS/MS en présence des standards.

Mélange standards plus C18, 1.8 microm			méthode: tarek0.8, colum zorbax eclipse			
Mélange standards-1	Concentration (ppm, mg/L)	Volume ajouté (mL)	Concentration dans le Vial (ppm) (méthanol: eau, 80:20)	formule	m/z mono isotopique	TR <sup>a</sup> (min)
1 Acide vanillique	10000	1	20	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	167,0350	9,2
2 Acide gallique	500	10	10	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	169,0142	4,193
3 (+)-catechine	1000	10	20	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	289,0718	8,378
4 (-)-epicatechine	1000	10	20	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	289,0718	9,0723
5 Procyanidine A2	1000	10	20	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	575,1195	12,497
6 Quercétine 3-O-glucoside	100	10	2	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	463,0882	12,197
7 Kaempférol 3-O-glucoside	1000	10	20	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	447,0933	13,259
8 Kaempférol 3-O-rutinoside	1000	10	20	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	593,1512	12,621
9 Kaempférol	1000	10	20	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	285,0405	19,515
10 Kaempféride	600	10	12	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	299,0561	24,876
Mélange standards-2						
1 Acide chlorogénique	1000	10	20	C <sub>16</sub> H <sub>8</sub> O <sub>9</sub>	353,0878	8,285
2 Acide caféique	500	10	10	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	179,0350	9,504
3 Acide <i>p</i> -coumarique	1000	10	20	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	163,0401	11,603
4 Acide benzoïque	1000	10	20	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	121,0295	
5 Acide 2,5-Dihydroxybenzoïque	1000	10	20	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	153,0193	8,595
6 Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	1000	10	20	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	137,0244	8,471
7 Quercétine- 3-O-rutinoside	500	10	10	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	609,1461	11,77
8 Quercétine -3-O-rhamnoside	1000	10	20	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	447,0933	13,449
9 Quercétine	1000	10	20	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	301,0354	17,185
10 Myricétine	1000	10	20	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>	317,0303	14,648
Mélange standards-3						
1 Acide syringique	1000	10	20	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	197,0455	9,718
2 Acide ferulique	1000	10	20	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	193,0506	12,429
3 Acide <i>m</i> -coumarique	1000	10	20	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	163,0401	12,973
4 Acide sinapicque	1000	10	20	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	223,0612	12,367
5 Quercétine 3-O-galactoside	500	10	10	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	463,0882	12,182
6 Acide 2,4-dihydroxybenzoïque	1000	10	20	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	153,0193	9,78
7 Naringénine	1000	10	20	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	271,0612	19,152
8 Lutéoline 7-O-glucoside	333	10	6,66	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	447,0933	12,305
9 Lutéoline	500	10	10	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	285,0405	17,118
10 Genistéine	1000	10	20	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	269,0455	19,214

Mélange standards-4						
1 Acide Ellagique	inconnu	10	inconnu	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	300,9990	12,284
2 Acide 3,4 dihydroxybenzoïque	1000	10	20	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	153,0193	6,555
3 7-hydroxycoumarine	1000	10	20	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	161,0244	12,284
4 Apigénine	500	10	10	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	269,0455	19,136
5 Tryptophane	800	10	16	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	203,0826	6,493
6 Tyrosine	500	10	10	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	180,0666	2,702
7 Phénylalanine	500	10	10	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	164,0717	4,426

**Méthode:**

5% B to 100%B, 45 min

A, leau avec 0.1% acide formique

B, acetonitrile

\*Temps de rétention

## 6. Evaluation *in vitro* des activités biologiques

### 6.1. Test DPPH

Dans ce test l'activité anti-radicalaire des différents extraits a été testée par la méthode du radical libre DPPH. Pour chaque extrait et pour chaque concentration, 40 µL d'extrait préparé dans le méthanol est additionné à 160 µL de solution DPPH préparée à 0.4mM dans de méthanol.

L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre après 30min à la longueur d'onde de 517 nm [94]. Le pourcentage d'inhibition du DPPH est déterminé par la formule suivante :

Pourcentage d'inhibition= [(Absorbance du contrôle -Absorbance Extrait)/Absorbance du contrôle] x100

Où le contrôle est préparé, en parallèle, en mélangeant 40µL de méthanol avec 160µL de la solution méthanolique de DPPH.

Pour valoriser le pouvoir anti-radicalaire de nos extraits, BHT et l'α- tocophérol ont été utilisés comme normes anti-oxydantes.

Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant de nous extraits, nous avons introduit le paramètre CI<sub>50</sub> qui montre les concentrations de l'antioxydant nécessaires pour faire décroître la concentration initiale du DPPH avec 50%. La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que son IC<sub>50</sub> est petite [95]. Les résultats sont exprimés en g/L et les écart-types ont été calculés à partir de trois séries d'expériences.

### 6.2. La méthode TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity (ABTS)

Le test est basé sur le protocole de Re et al, (1999) en y apportant de légères modifications.

Le radical cation ABTS est généré en mélangeant à volume égal une solution de 2.45 mM de persulfate de potassium K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> et une solution aqueuse d'ABTS à 7 mM, le tout est conservé à l'abri de la lumière et à la température ambiante durant 12 h avant utilisation). La solution

la solution mère de ABTS<sup>•+</sup> est obtenue en diluant la solution mère de ABTS<sup>•+</sup> avec de l'éthanol jusqu'à obtention d'une absorbance d'environ 0.7 à 734 nm. Ensuite, 160µl de la solution de L'ABTS<sup>•+</sup> ont été ajoutés à 40µl de la solution d'extrait dissout dans l'éthanol à différentes concentrations. Après 10 min, l'absorbance a été mesurée à 734 nm en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits [96].

Les pourcentages d'inhibition ont été calculés pour chaque concentration par rapport à une absorbance à blanc de l'éthanol. La capacité de piégeage de L'ABTS<sup>•+</sup> a été calculée en utilisant l'équation suivante:

$$\text{ABTS Inhibition (\%)} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$$

### 6.3. Inhibition de blanchissement de β-carotène

La méthode décrite par Miller (1971) a été employée avec une légère modification.

Une émulsion de β-carotène/ acide linoléique été préparée par solubilisation de 0,5 mg de β-carotène dissoute dans 1 ml de chloroforme puis ajouté a un volume de 25µl d'acide linoléique et de 200 mg de Tween 40. Après évaporation du Chloroforme, 100 ml d'eau distillée aérée sont ajoutés. L'émulsion résultante est rigoureusement agitée. Des aliquotes de 40µl d'extrait à différentes concentrations sont placés dans une plaque à 96 puits en présence de 160 µl d'émulsion . Deux témoins (positif ou l'échantillon est remplacé par l'antioxydant et négatif sans antioxydant) ont été préparés avec la même procédure [97]. Les microplaques sont alors mises en incubation pendant 120 min et l'absorbance a été mesuré à( t = 0 min et t = 120 min à 470 nm grâce à un lecteur microplaques.

Le BHA et l'α-tocophérol ont été utilisés comme standards.

### 6.4. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

Dans un tube Eppendorf, 50 µl de H<sub>2</sub>O sont mélangés avec 60 µl de tampon acétate d'ammonium (1 M, pH 7), 20 µl de l'extrait à tester, 50 µl de Néocuproine (7,5 mM) et 50 µl de CuCl<sub>2</sub> (10 mM). Le mélange est incubé pendant 1 heure à 37°C. Le complexe réduit Cu<sup>+</sup> Nc est quantifié spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 450 nm. Les microplaques de 96 puits ont été mises à l'abri de la lumière, et après 1h, l'absorbance est mesurée à 450 nm. La capacité de réduction des extraits a été comparée à celles de l-tocophérol et du BHT. Les résultats ont été calculés à titre de A<sub>0,5</sub> µg / mL correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance [82].

Les pourcentages d'inhibition sont déterminés graphiquement grâce au logiciel statgraphics.

### 6.5. Chélation du Fer ferreux (FRAP)

Une prise de 40 µl d'extrait à différentes concentrations est ajoutée à 40 µl de Chlorure de Fer ( $\text{Fe Cl}_2$ ) (2 mM) et 40 µl d'éthanol. Après une agitation vigoureuse et un repos de 5 min, 80 µl de Ferrozine (0.5 mM). Le mélange est laissé au repos à une température ambiante pendant 10 min permettant ainsi la complexation du complexe Ferrozine- $\text{Fe}^{+2}$ . Un contrôle négatif (sans extrait) est préparé dans les mêmes conditions [98].

L'absorbance est mesurée à 562 nm contre un blanc (sans extrait). L'effet sequestrant des échantillons vis-à-vis du Fer est exprimé en pourcentage de chélation selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$$

Les résultats sont alors exprimés en  $\text{CI}_{50}$  et comparés avec un antioxydant de synthèse (EDTA).

## ***Résultats et discussion***



### 1. Dosage des polyphénols totaux :

Les teneurs des polyphénols totales (PPT) des différents extraits de cette plante sont représentées dans le tableau 3, ces valeurs montrent que cette plante est riche en polyphénols surtout les deux extraits : Butanolique et acétate d'éthyle.

Table 3 : Polyphénols totaux de *D.muricatus*

Extrait butanolique de	Extrait butanolique	Extrait Acetated'ethyl	Extrait méthanoliquede	Extrait chloroformique
Total phénolique (µg EAG/mg d'extrait)	164.42±10.20	169.66±11.50	119.16±2.37	16.52±1.01

Les valeurs des absorbances de la gamme d'étalonnage de l'acide gallique sont rapportées dans le tableau ci-dessous (Figure 26)

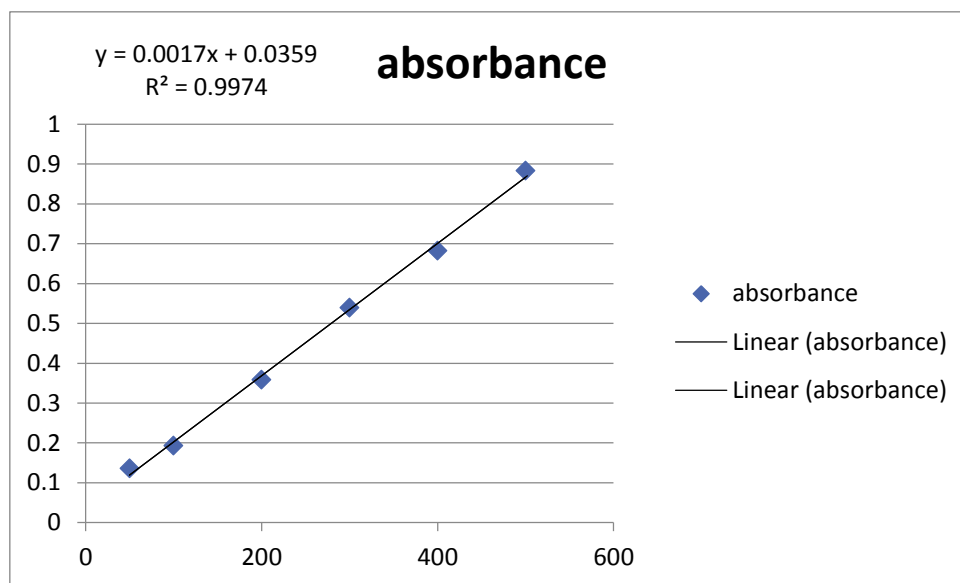


Figure 26 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

### 2. Dosage des flavonoïdes totaux :

Les flavonoïdes totaux (FT) sont déterminés en mg équivalent de quercetine par gramme de matière sèche total (MSR). Les FT ont été quantifiés par la méthode de Turkoglu et al. (2007), la quercetine est le flavonoïde pris comme référence pour la courbe d'étalonnage (figure 28).

Les valeurs des absorbances de la gamme d'étalonnage de la quercetine sont rapportées dans le tableau 4 .

Table 4 : absorbances de la gamme d'étalonnage de la quercétine

A <sub>0</sub>	A <sub>25</sub>	A <sub>50</sub>	A <sub>75</sub>	A <sub>100</sub>	A <sub>125</sub>	A <sub>150</sub>	A <sub>175</sub>	A <sub>200</sub>
0.073	0.154	0.153	0.203	0.244	0.336	0.420	0.490	0.561

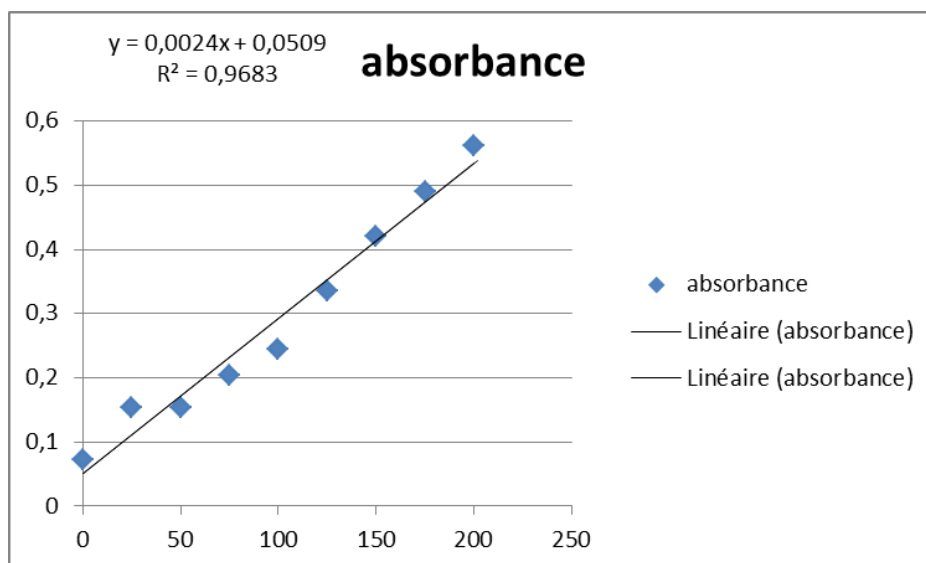


Figure 27 : Courbe d'étalonnage du quercétine.

L'évaluation quantitative des flavonoïdes montre que les extraits suivants : butanolique, Acétates d'éthyle et méthanolique sont les plus concentrés en flavonoïdes), alors que l'extrait chloroformique y est le moins, (tableau 5).

Table 5 : Flavonoïdes totaux de la plante *D.muricatus*

Extrait butanolique de la plante <i>D.muricatus</i>	Extrait butanolique	Extrait Acetated'éthyl	Extrait méthanolique	Extrait chloroformique
<b>Flavonoïdes Totales (µg EAG/mg d'extrait)</b>	<b>158.09±9.76</b>	<b>89.34±6.18</b>	<b>65.87±0.83</b>	<b>04.87±2.16</b>

### 3. Identification des polyphénols contenus dans la plante *Daucus muricatus* :

La caractérisation des composés phénoliques contenus dans l'extrait butanolique de la plante *Daucus* a été effectuée en comparant les temps de rétentions et des masses à ceux des standards authentiques. Pour les composés restants, l'identification a été basée sur des mesures de masse précises [M - H] des ions pseudo-moléculaire d'ions et des fragments de CID.

On a injecté à l'instrument LC-ESI-MS/MS une solution de 20000 ppm, cette dernière a été préparée après extraction des substances en utilisant un système de solvants MeOH/H<sub>2</sub>O (80/20). Le chromatogramme en mode négatif a été présenté dans la figure 28.

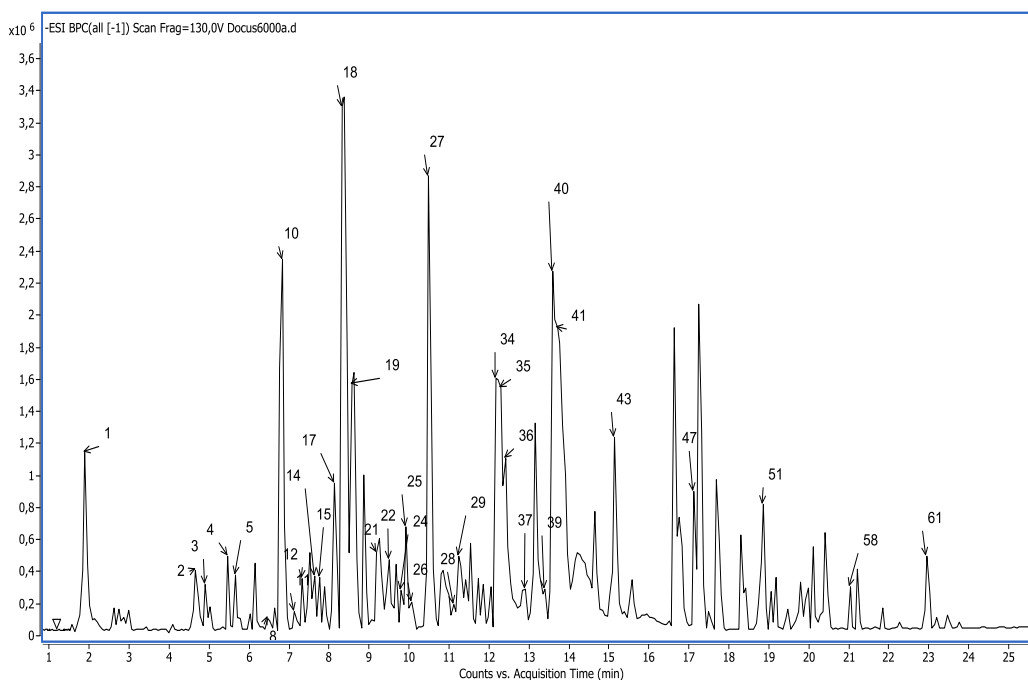


Figure 28 :

**Chromatogramme d'ionisation par HPLC-ESI-QTOF MS/MS de la plante *Daucus muricatus* en mode négatif.**

Le chromatogramme de base des parties aériennes de la plante *D.muricatus* résultant de la méthode LC / ESI / MS / MS précédemment développé est montre la présence de 61 produits dont Vingt-cinq sont identifiés et classés en quatre groupes: flavonoïdes, dérivés d'acide hydroxycinnamique, dérivés d'acide benzoïque et autres composés polaires. Tous ces composés ont été identifiés en interprétant leurs spectres MS et MS / MS obtenus. Ces composés sont présentés dans le tableau 6.

Table 6 : Composés de l'extrait butanolique identifiés par LC/MS/MS.

Numéro du pik	Temps de rétention (min)	Composés	Formule moléculaire	m/z expérimental	m/z calculé	erreur (ppm)	Fragments majoritaires (intensité) m/z
1	1.874	Acide quinique	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O	191.0566	191.0567	-2.15	191.00 (13), 127.00 (7), 85.02 (100), 78.00 (17)
2	4.641	acide hydroxy benzoïque isomère 1	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	137.0245	137.0322	-0.93	137.02 (44 ), 93.03 (100)
3	4.889	NI	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>15</sub>	365.0550	365.0573	7.25	119.03 (28 ), 113.024 (25 ), 101.02(45 ), 89.02 (100)
4	5.447	acide dihydroxy benzoïque O-glu	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	315.0728	315.0722	-1.87	153.01 (20 ), 152.01 (70 ), 109.02 (93 ), 108.02 (100)
5	5.663	acide vanillique hexosidé isomère	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	329.0883	329.0878	-1.26	167.03 (69 ), 125.01 (67), 123.04 (61), 108.02 (100 )
6	6.005	NI	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	313.0934	313.0929	-1.33	105.03 (10 ), 93.03(48 )
7	6.129	NI	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>11</sub>	451.219	451.2185	- 1.06	119.03 (23 ), 113.02 (28), 89.02 (100 ), 71.0145 (30)
8	6.439	acide hydroxy benzoïque isomère 2	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	137.0251	137.0244	- 4.83	93.03 (100 )
9	6.625	NI	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	351.1298	351.1297	- 0.08	207.08 (92 ), 191.05 (10 ), 161.04 (16 ), 125.02 (19 ), 113.02 (25 ), 101.02 (93 ), 99.04 (100 ), 85.02 (20 ), 73.02 (19 ), 71.01 (33 )
10	6.811	acide cafféoylquinique isomère 1	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353.0883	353.0878	-1,13	192.05 (87 ) , 191.05 (100 ), 180.03 (4 ) 179.03 (49 ), 135.045 (71 ), 134.06 (3 )
11	7.121	Derivé de l'acide quiniique	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>11</sub>	451.2185	451.2185	0,15	191.05 (14 ), 119.03 (35 ), 113.02 (25 ), 101.02 ( 39 ), 89.02 ( 100 ), 71.01( 50 )
12	7.307	Penstemide	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>10</sub>	443.1924	443.1923	- 0,36	119.03 (27 ), 113.02(49 ), 101.02(90), 89.02(100), 85.02(27), 73.02(22), 71.01(85)

13	7.492	NI	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>11</sub>	451.2188	451.2185	- 0,55	119.03 ( 26 ), 113.02 ( 23 ), 101.02 ( 38 ), 71.01 ( 47 )
14	7.616	Acide Hydroxy benzoïque <i>O</i> -hexoside	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	299.0772	299.0772	0,31	137.03 (84 ), 93.03 ( 100 )
15	7.74	acide metyl glycopyraosyloxy pentanoic	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	293.1246	293.1242	- 0.94	131.07 (100), 113.02(14), 101.02 (21 ) 89.02 (40 ), 71.01 (41 ), 25.06 (34 )
16	7.864	NI	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	175.0611	175.0612	0.33	115.04 (43 ), 113.06 (16 ), 85.06 (100 )
17	8.112	acide caféique hexosidé	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	341.0882	341.0878	- 0.98	179.03 (91 ), 135.45 (100 )
18	8.298	acide cafféoyl quinique, isomère 2 (acide Chlorogenique)	C <sub>32</sub> H <sub>36</sub> O <sub>18</sub>	707.1844	707.1892	- 1.69	353.08 (13 ), 191.05 (100 )
19	8.546	Acide caféoyl quinique isomère 3 (acide cryptochlorogenique)	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	355.1038	335.0878	- 1.58	191.05 (100 ), 179.03 ( 9 ), 173.04 (18 ), 135.04 (19 )
20	8.856	NI	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>10</sub>	431.1928	431.1923	- 1.59	119.03 (20 ), 113.02 (20 ), 101.02 (29 ) 89.02(100) , 83.05 (10 ) , 71.01(45 )
21	9.166	acide ferulic <i>-O</i> -hexoside	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> O	355.1038	355.1035	-0.93	193.05 (47 ), 178.02 (49 ), 175.03 (30 ), 149.06 (34 ), 134.03 (100 )
22	9.476	Acide caféoyl quinique isomère 4	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353.0881	353.0878	- 0.9	191,05 (100 ), 161.02 (2 ), 135,04 (1 )
23	9.662	NI	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>10</sub>	433.2080	433.2079	- 0.01	189.12 (20 ), 153.09 (18 ), 119.03 (13 ), 113.024 (24 ), 101.02 (60 ), 89.02 (100 ), 85.02 (13 ), 73.02 (23 ), 71.01 (87 )
24	9.786	Acide caféoyl quinique isomère 5	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>9</sub>	353.1818	353.1817	-0.12	192.05 (11 ), 191.05 (100 )
25	9.91	acide Coumaroylquinic	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	337.0932	337.0929	-0.78	191,05 (100 ), 173,04 (15 ), 163,04 (11 ), 119,05 (11 )

26	10.034	Luteoline C-pentoside C-hexoside	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub>	579.1361	579.1355	-1.01	579.13 (68 ), 460.09 (26 ), 459.09 (100 ) 430.08 (11), 429.08 (47 ), 357.06 (25 ) 339.05 (15 ), 327.05 (17 ), 298,04 (34 )
27	10.467	acide 5-O-Feruloylquinic	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	367,1046	367,1035	- 2,8	191,0562(100%) 173,0457(9%) 134,0373(19%) 111,0451(7%) 93,035(33%) 87,0089(13%)
28	11.087	Derivé de l'acide caffeique et acide quinique)	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>13</sub>	531.1148	531.1144	- 1.25	340.05 (23.05 ), 339.35 (100 ) 295.06 (35 ), 229.01 (32 ), 191.05 (60 )
29	11.397	NI	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> O <sub>10</sub>	391,1613	391,161	-0,96	125,02 (20), 119,03 (24), 113,02 (29), 101,02 (75), 99,04 (100), 89,02 (98), 73,02 (35), 71,01 (51)
30	11.521	NI	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>9</sub>	401.1819	401.1817	-0.59	401.18 (63 ), 221.11 (18), 195.13 (17 ) 177.12 (24 ), 119.03 (11 ), 101.02 (100 ), 89.02 (54 ), 85.0294 (44 ), 83.01 (20 ), 73.02 (32 ), 71.01 (84 )
31	11.707	NI	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> O <sub>13</sub>	565.1937	565.1927	- 1.69	340.12 (17 ), 339.12 (75 ), 328.12 (20 ), 327.12 (100 ), 324.10 (22 )
32	11.831	NI	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>	417.2132	417.213	-0.47	313.03 (16 ), 304.46 (19 ), 95.10 (16 ), 165.05 (18 ), 113.02 (45 ), 107.05 (16 ), 101.02 (63 ), 99.00 (35 ), 96.96 (20 ), 89.02 (100 ), 85.02 (31 ), 71.01 (74 )
33	12.017	NI	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>19</sub>	559.0224	559.0213	-0.83	480.06 (24 ), 479.06 (100 ), 317.01 (10 )
34	12.14	Luteoline-7-O-glucoside	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	447.0944	447.0933	-2.45	447.09 (11 ), 286.04 (15 ), 285.04 (100 ), 284.03 (47 )

35	12.203	lutéoline-3-O-glucuronide	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>	461.0727	461.0725	-0.25	286.0434 (15 ), 285.0402(100 )
36	12.3989	Kaempferol-3-glucuronide	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	463,0867	463,0882	2,95	287.05 (56 ), 286.04 (19 ), 285.03 (20 ), 151.00 (100 ), 135.04 (38 ), 113.02 (20 ), 85.02 (11 )
37	12.88	acide dicaffeoylquinique isomère 1	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	515.1197	515.1195	-0.23	353.08(19), 335.07 (12 ), 191.055 (45 ) 179.03 (97 ), 161.02 (19 ), 173.04 (100 ) 135.04 (23 )
38	13.133	NI	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>14</sub>	439.1072	439.1093	5.55	439.10 (54 ), 424.08 (10 ), 96.96 (100 ), 95.9524 (12 ), 79.95 (53 )
39	13.381	acide dicaffeoylquinique isomère 2	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	515.12	515.1195	-0.72	353.08 (12 ), 191.05 (100 ), 179.03 (67 ), 135.04 (16 )
40	13.567	apigénine-7-O-glucoside	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	431.0996	431.0984	- 2.53	431.00 (29 ), 269.00 (42 )
41	13.629	Luteoline 7-O-(6''-O- malonyl)-β-D-glucoside	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	489.1049	489.1038	-2.92	286.04 (16 ), 285.04 (100 )
42	14.62	NI	C <sub>32</sub> H <sub>56</sub> O <sub>19</sub>	743.3324	743.3343	2.94	743.33 (100 ), 781.27 (9 )
43	15.116	Apigenine	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	269.0458	229.0455	-1.27	269.04 (100 ), 159.04 (14 ), 117.03 (46 )
44	15.55	NI	C <sub>21</sub> H <sub>10</sub> O <sub>9</sub>	405.0287	405.0252	-7.62	281.08(21), 237.09(40), 179.03(37), 135.04(100), 117.03(15).
45	16.604	NI	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>9</sub>	409.1515	409.1504	-2.61	179.03 (79 ), 161.02 (22 ), 135.04 (100 )
46	16.78	NI	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	325.1298	325	-1.22	325.12 (21 ), 282.14 (14 ), 281.14 (100 ), 239.12 (24 ), 221.11 (13 )
47	17.1	Luteoline	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	285.0409	285.0405	-1.49	175.03 (16 ), 151.00 (44 ) 149.02 (21 ) 133.0295 (100 )
48	17.224	NI	C <sub>26</sub> H <sub>46</sub> O <sub>14</sub>	581.2799	581.2815	3.31	No fragment
49	17.657	NI	C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> O <sub>13</sub>	567.3006	567.3022	3.48	No fragment

50	18.277	NI	C <sub>32</sub> H <sub>56</sub> O <sub>18</sub>	727.3368	727.3394	3.81	727.33 (100 ), 565.28 (12 )
51	18.835	Dérivée de Luteoline	C <sub>22</sub> H <sub>38</sub> O <sub>9</sub>	445.2446	445.2443	-0.46	285.04 (44 ), 284.03 (15 ), 119.03 (23 ), 113.02 (28 ), 101.02 (45 ), 71.01 (64 )
52	19.021	NI	C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> O <sub>13</sub>	395.1377	395.1348	-7.65	395.13 (71 ), 328.07 (17 ), 327.074 (100 ), 96.95 (84 )
53	19.145	NI	not find	993.1612	not find	not find	479.19 (100 ), 96.95 (22 )
54	19.97	NI	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	479.1965	479.1981	5.12	No fragments
55	19.951	NI	C <sub>29</sub> H <sub>42</sub> O <sub>16</sub>	645.2405	645.24	-0.86	567.29 (15 ), 566.28 (33 ), 565.28 (100 )
56	20.075	NI	C <sub>23</sub> H <sub>38</sub> O <sub>8</sub>	441.2501	441.2494	-1.46	113.02 (42 ), 101.02 (56 ), 73.03 (100 ), 71.01 (61 )
57	20.385	NI	C <sub>29</sub> H <sub>40</sub> O <sub>11</sub>	563.2523	563.2498	-4.93	563.25 (100 ), 521.20 (12 ), 479.65 (19 ), 477.18 (10 )
58	21.004	Dérivée de l' apigénine	C <sub>28</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	573.162	573.1614	-1.00	431.09 (36 ), 270.04 (17 ), 269.04 (100 )
59	21.19	NI	C <sub>31</sub> H <sub>42</sub> O <sub>13</sub>	621.2561	621.2553	-1.42	396.19 (26 ), 395.18 (93 ), 384.19 (31 ), 383.18 (100 ), 380.16 (11 )
60	12.81	NI	C <sub>32</sub> H <sub>58</sub> O <sub>17</sub>	713.3586	713.3601	2.76	313.35 (100 )
61	22.926	Dérivée de l'acide chlorogénique	C <sub>24</sub> H <sub>42</sub> O <sub>9</sub>	473.2763	473.2765	-1.44	473.14 (13 ), 340.20 (11 ), 311.17 (12 ), 141.05 (28 ), 119.03 (18 ), 113.02 (54 ), 92.46 (13 ), 89.0245 (100 ), 71.01 (89 )

NI: Non identifié



### 3.1. Dérivés de l'acide hydroxycinnamique :

Cette étude a montré que les dérivés de l'acide hydroxy cinnamique Présentent les composés majeurs dans l'extrait butanolique de la plante *D.muricatus*, la plupart d'entre eux présentent l'acide caféoylique et ses dérivés, l'acide coumarique et l'acide férulique.

#### 3.1.1 Identification du produit 10 :

Ce produit a donné un ion précurseur à  $m/z$  353.0883 et son MS / MS a montré un fragment majeur à  $m/z$ 191 avec le fragment acide quinique et  $m/z$ 179 représentant le fragment caféoyle. Ce composé a été caractérisé comme (stéréoisomère 1) de l'acide caféoylquinique, ce qui est en accord avec les résultats de la littérature et mène à proposer qu'il présente l'acide 3-*O*-Caféoylquinique [99-100]. Les résultats sont montrés dans les deux figures (Figure 29 et Figure 30).

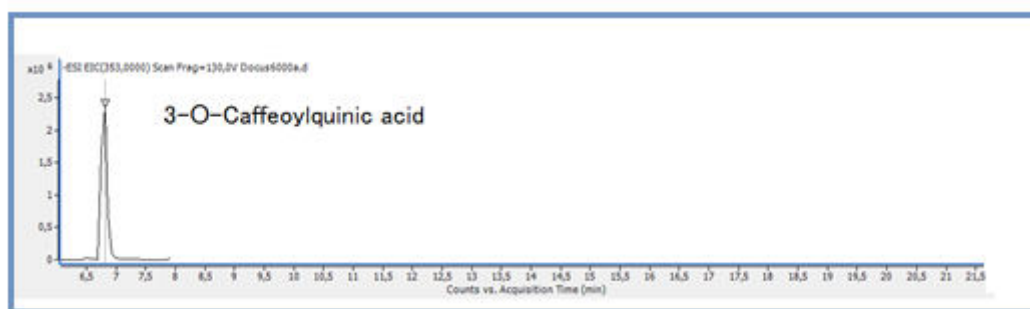


Figure 29 : Chromatogramme du produit 10.

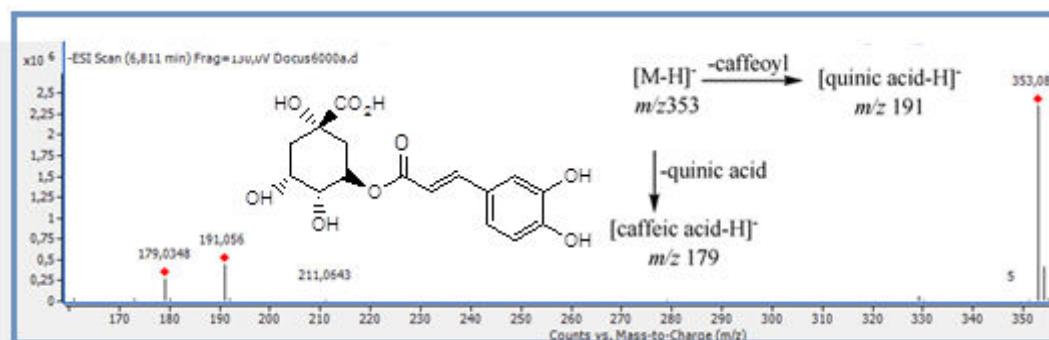


Figure 30 : Spectre de masse du produit du produit 10.

#### 3.1.2. Identification du composé 17 :

Ce composé a été caractérisé comme acide caféique hexosidé avec un  $m/z$  341,0882. Il avait un fragment représentatif à 179,03 correspondant à la perte du fragment hexose et de l'acide caféique déprotoné selon la figure 31. [101-102].

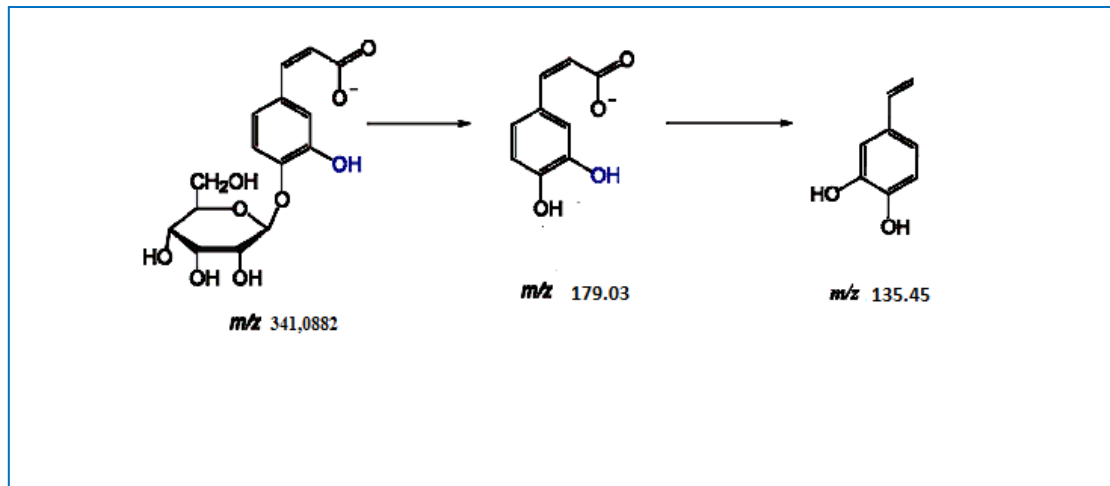


Figure 31 : Schéma de fragmentation de l'acide caféique hexosidé.

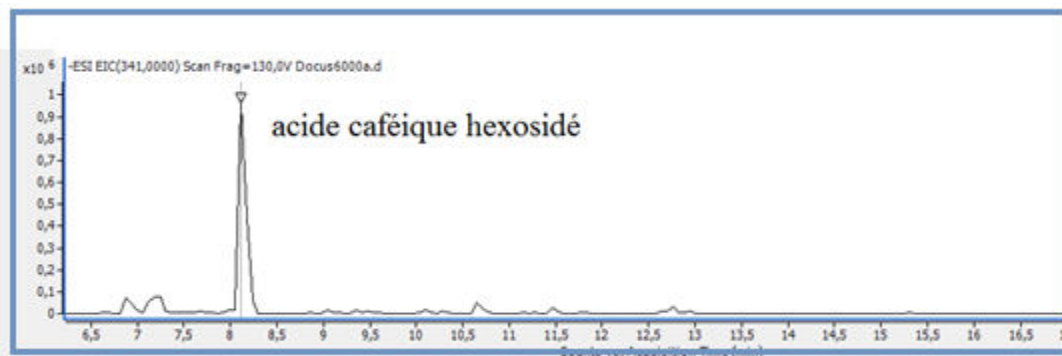


Figure 32 : Chromatogramme du produit 17

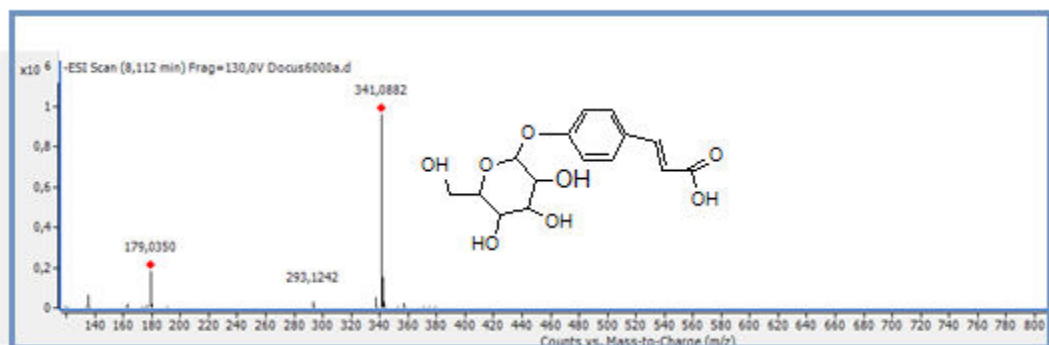


Figure 33 : Spectre de masse du produit du produit 17.

### 3.1.3. Identification du produit 18:

Le composé 18 a été identifié comme l'acide chlorogénique, (acide caffeoyl quinique, (isomère 2)) avec apparition d'un ion précurseur  $[2M-H]^-$  à  $m/z$  707,184 qui est dû à la

formation de dimères lors de l'ionisation par électrospray et le fragment majeur  $m/z$  191,05 correspondant à la perte de l'acide quinique (Figure 34 et Figure 35) [102].

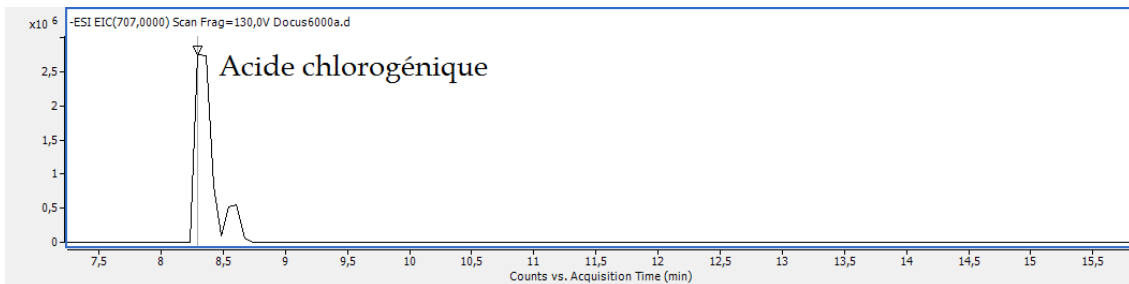


Figure 34 : Chromatogramme du produit 18

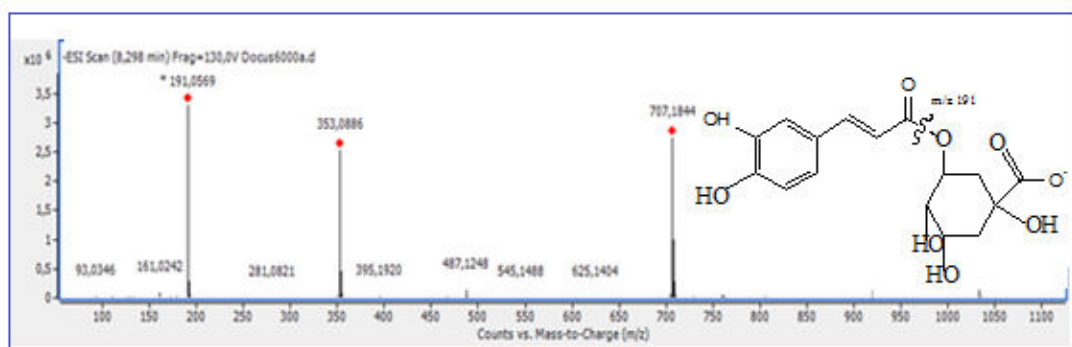


Figure 35 : Spectre de masse du composé 18

### 3.1.4. Identification des produits 19, 22 et 24 :

Les composés 19, 22 et 24 ont été conçus comme d'autres isomères de l'Acide caféoylquinique avec un ion pseudomoléculaire  $[M-H]^-$  à  $m/z$  353 donnant l'ion prédominant à  $m/z$  191 qui présente la perte du fragment acide quinique comme il est montré dans les figures suivantes (Figure 36 ; 37 ; 38 ; 39 ; 40 ; 41 ) [103-104] .

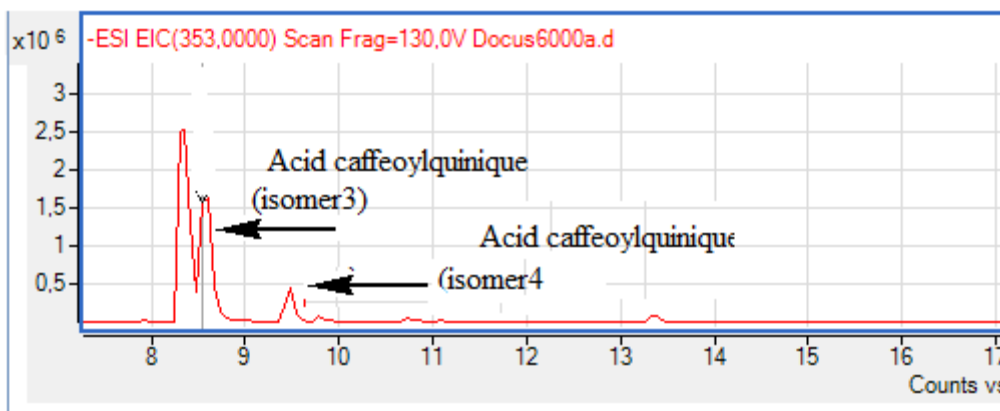


Figure 36 : Chromatogramme des produits 19 et 22

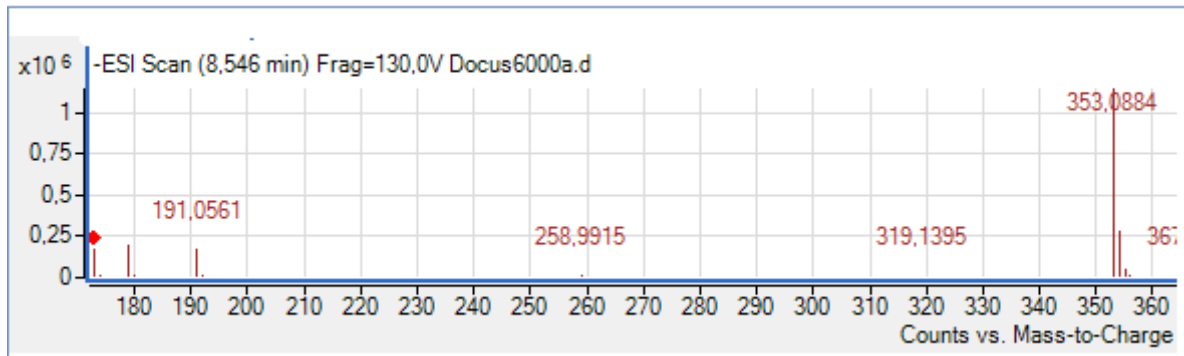


Figure 37 : Spectre de masse du composé 19

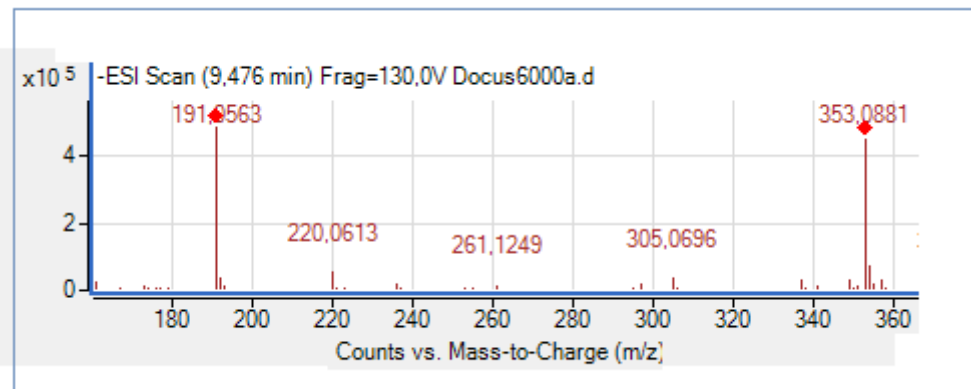


Figure 38 : Spectre de masse du composé 22

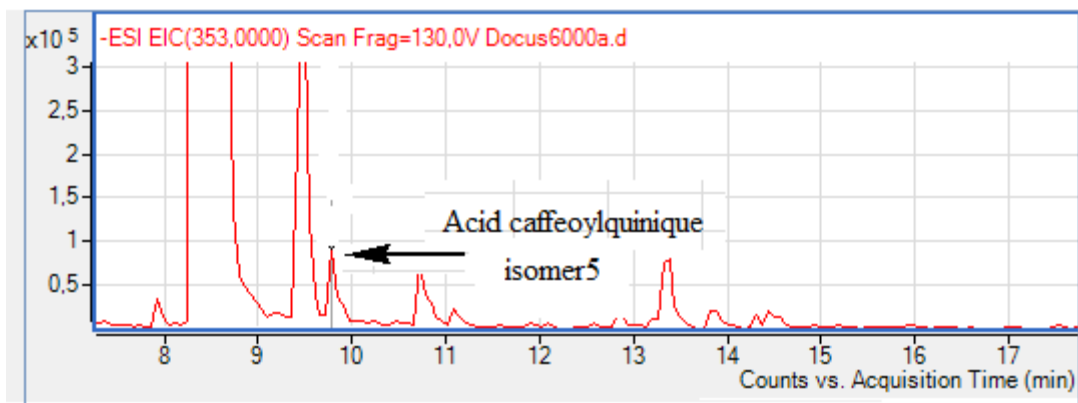


Figure 39 : Chromatogramme des produits 24

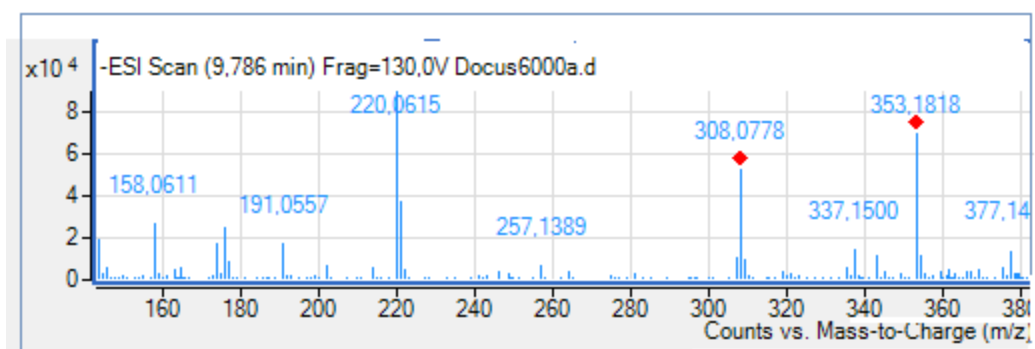
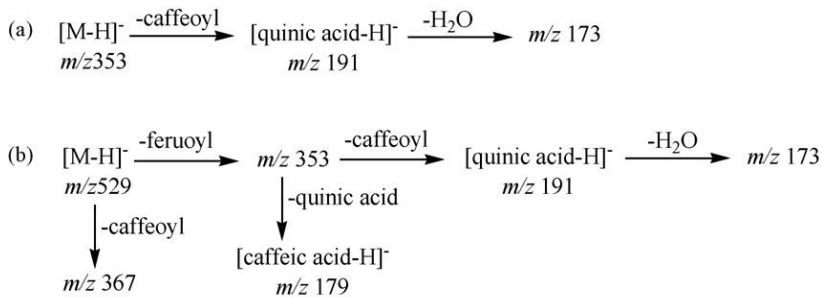
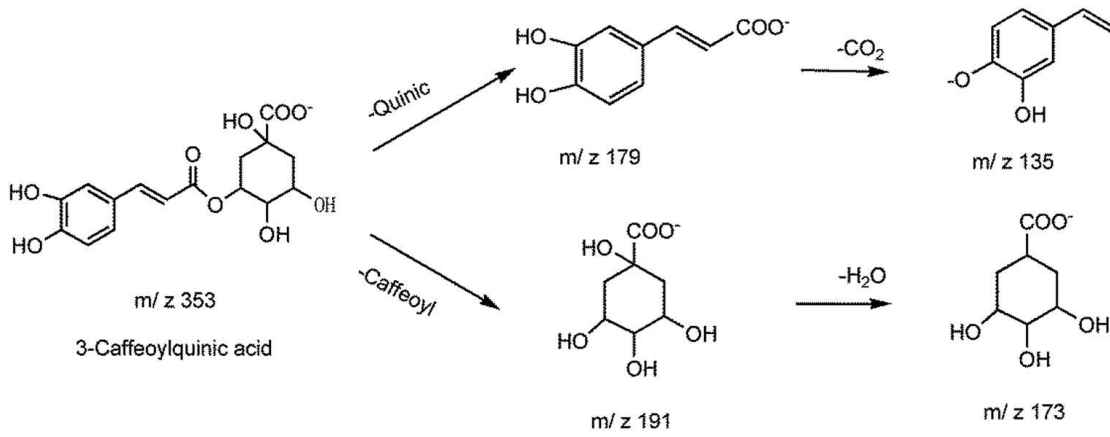
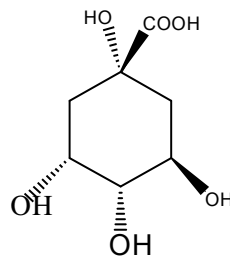
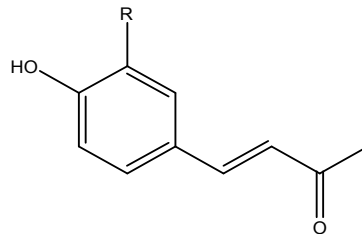
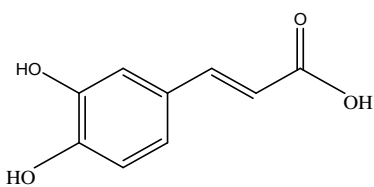


Figure 40 : Spectre de masse du composé 24



R=OH caffeoyl, R=OCH<sub>3</sub> feruloyl

Acide caffeique



Acide quinique

Figure 41 : Fagmentation de quelques dérivés de l'acide cinnamique

### 3.2. Identification des acides hydroxybenzoïques :

La spectrométrie LC-ESI /MS /MS de l'extrait de But OH a révélé cinq dérivés de l'acide hydroxybenzoïques.

#### 3.2.1. Identification des produits 2 et 8 :

Les composés 2 et 8 ont révélé l'apparition des ions précurseurs à  $m/z$  137.0245 et  $m/z$  137.0251 successivement. La dissociation induite par collision (CID) des deux produits a donné le fragment majeure à  $m/z$  93 due à la perte de l'ion  $\text{CO}_2$  comme il est mentionné dans les figure ce qui mène à déduire que ces deux composés sont des isomères de l'acide hydroxy benzoïque [101-103].

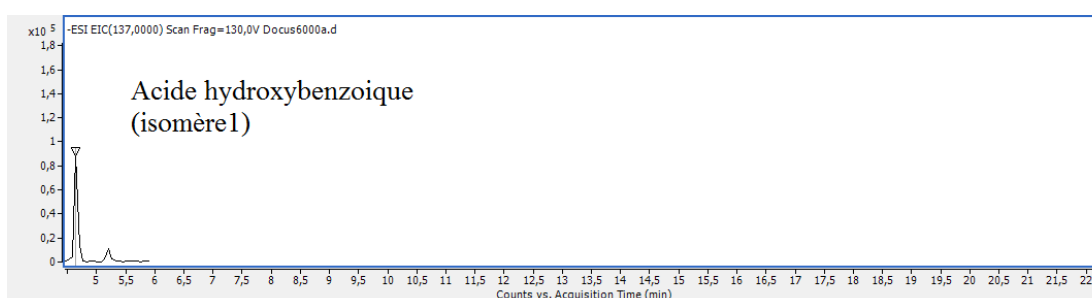
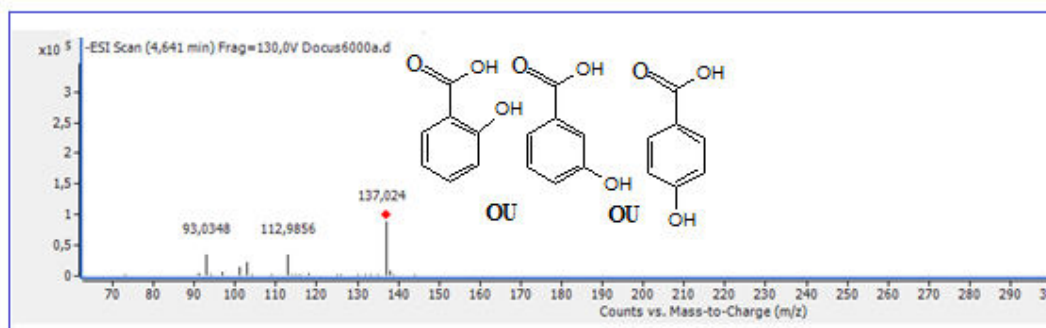


Figure 42 : Chromatogramme du produit 2



43 : Spectre de masse du produit 2

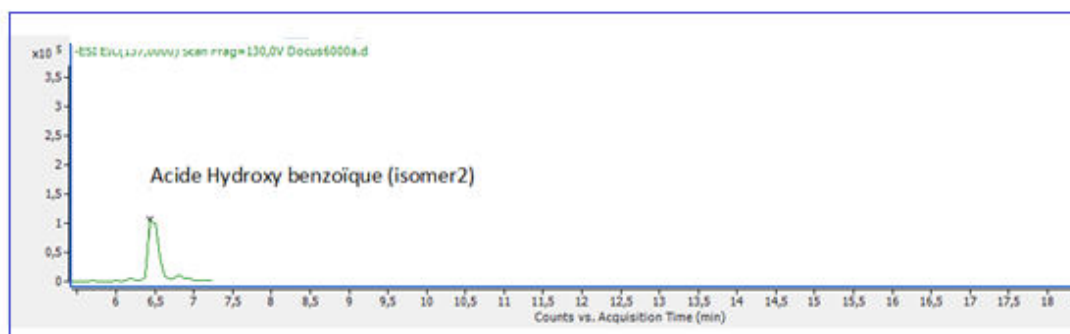


Figure 44 : Chromatogramme du produit 8

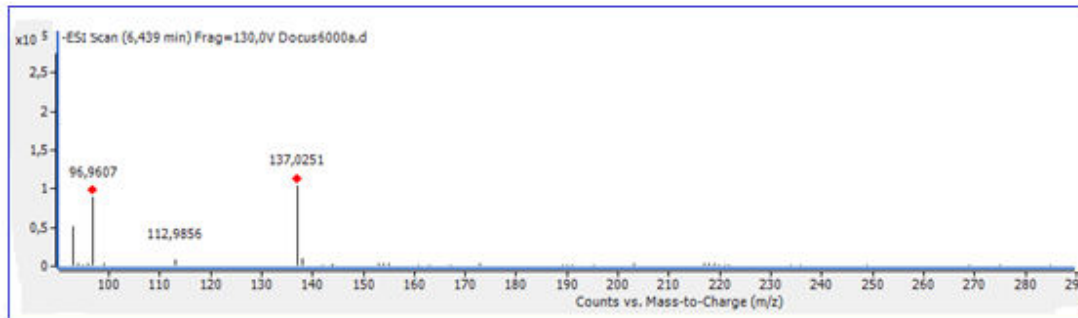


Figure 45 : Spectre de masse du produit 8

### 3.2.2. Identification du produit 5 :

Le spectre de masse de l'acide vanillique hexosidé a montré un ion moléculaire  $[M - H]^-$  à  $m/z$  329.0878, il a aussi présenté les fragments majeures par CID à  $m/z$  167.03 et  $m/z$  108.02 qui expliquent la perte de la partie hexose suivie de la perte du dioxyde de carbone et le groupe méthyl comme il est indiqué dans La figure 47 [103].

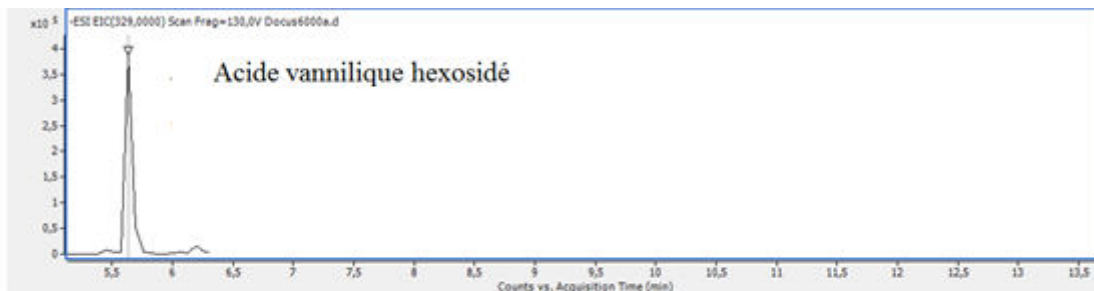


Figure 46 : Chromatogramme du produit 5

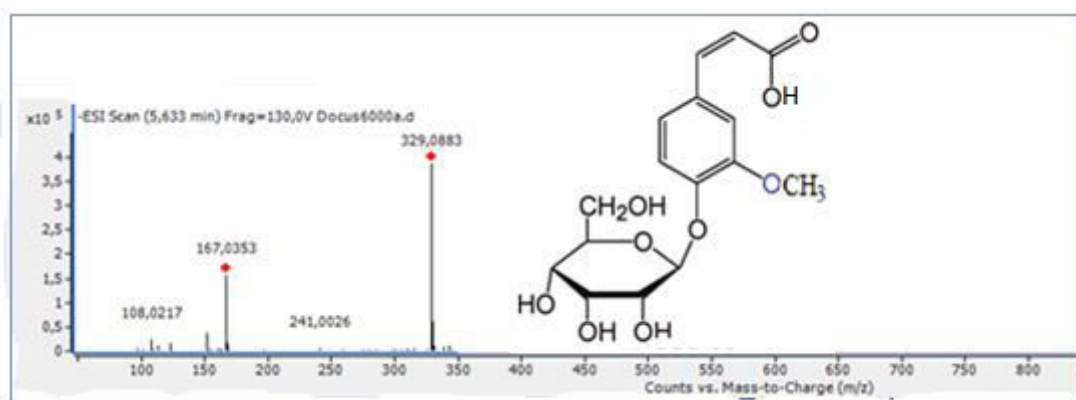


Figure 47 : Spectre de masse du produit 5

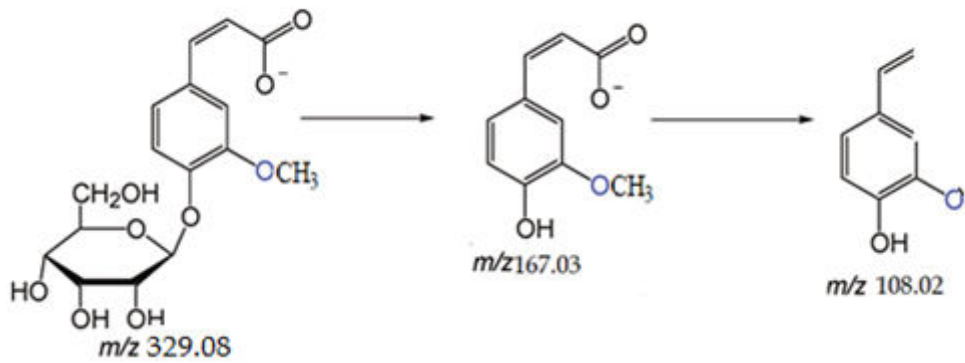


Figure 48 : schéma de fragmentation de de l'acide Vanillique-O-hexoside

### 3.2.3. Identification du produit 14 :

Le sucre conjugué qui a donné un ion précurseur [M-H]<sup>-</sup> à m/z 299,0772 suggéré comme acide Hydroxy benzoïque O-hexoside; le spectres MS/MS a révélé l'apparition du fragment m/z 137 du à la perte du fragment hexose (Figure 50) [101-104].

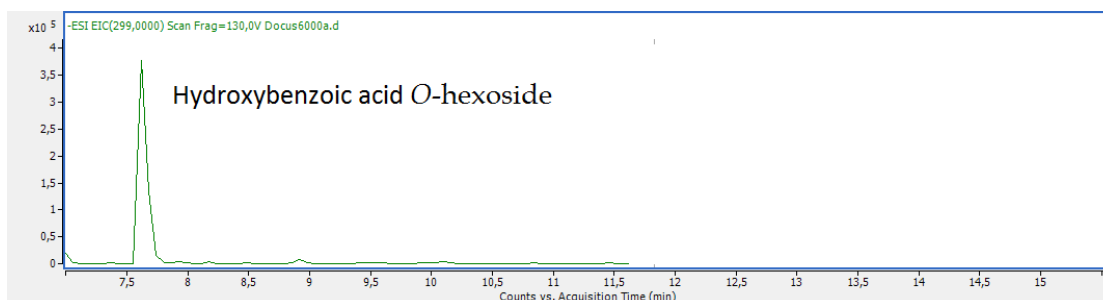


Figure 49 : Chromatogramme du produit 14

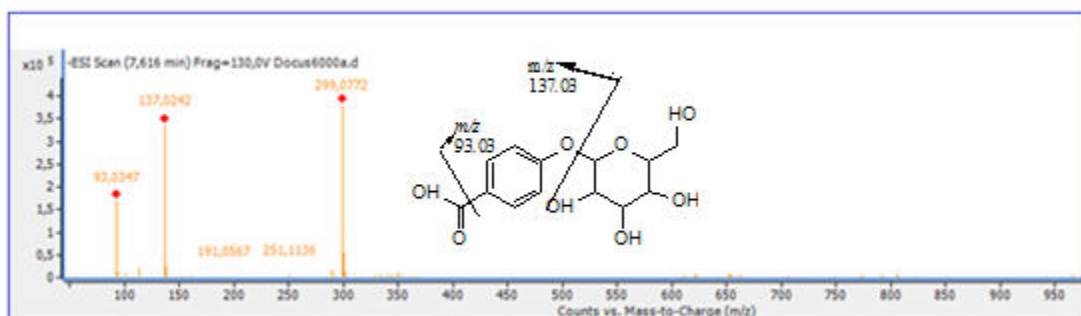


Figure 50 : Spectre de masse du produit 14



### 3.3. Identification des flavonoïdes :

#### 3.3.1. Identification du produit 26 :

Le composé 26, avec un ion précurseur  $[M-H]^-$  à  $m/z$  579 a révélé les fragments majeurs à  $m/z$  459  $[M-H-120]^-$  et  $m/z$  429  $[M-H-150]^-$  a été identifié comme Luteoline C-pentoside C-hexoside [105].

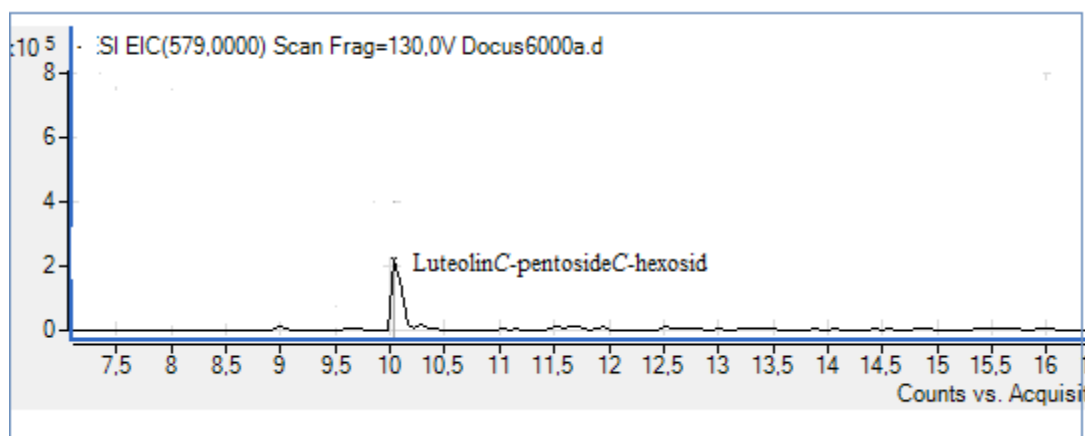


Figure 51 : Chromatogramme du produit 26

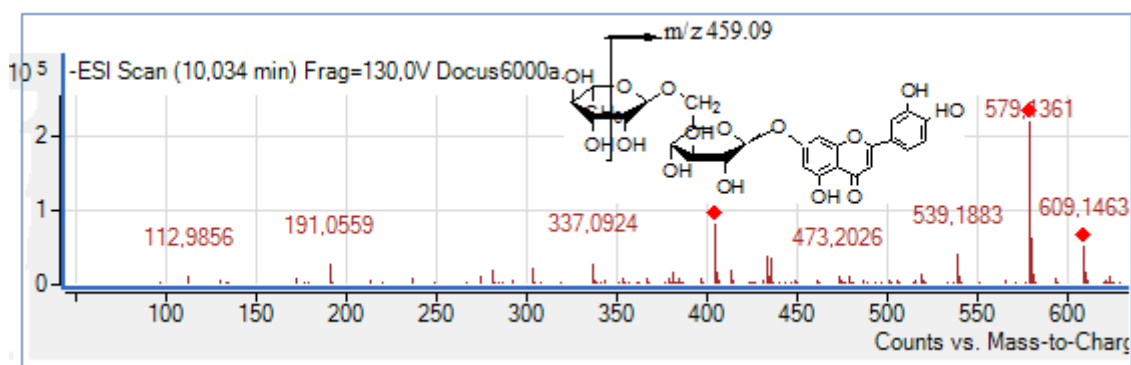


Figure 52 : Spectre de masse du produit 26

#### 3.3.2. Identification des produits 34 et 35 :

Les autres dérivés de la lutéoline ont été caractérisés par la présence d'ions fragments majeurs à  $m/z$  285 avec des substituants O. Par exemple, le composé 34 correspondant à la lutéoline-7-O-glucoside avec un ion précurseur  $[M-H]^-$  à  $m/z$  447. Sa fragmentation MS / MS a montré que le fragment majeur à 285 correspond à la perte d'un fragment glucosyle (162 u).

Le composé 35 éluant à 12,203 min et qui a donné un ion précurseur à  $m/z$  461.0727 a été caractérisé en tant que lutéoline-3-*O*-glucuronide. Le CID de ce composé a produit le fragment principal en ( $m/z$  285) qui est dû à la perte de l'acide glucuronide ( $m/z$  176) [106] (Figure 54).

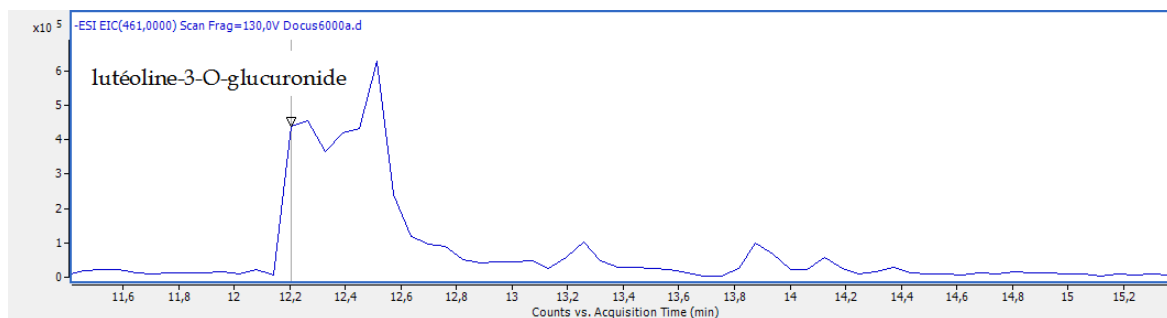


Figure 53 : Chromatogramme du produit 35

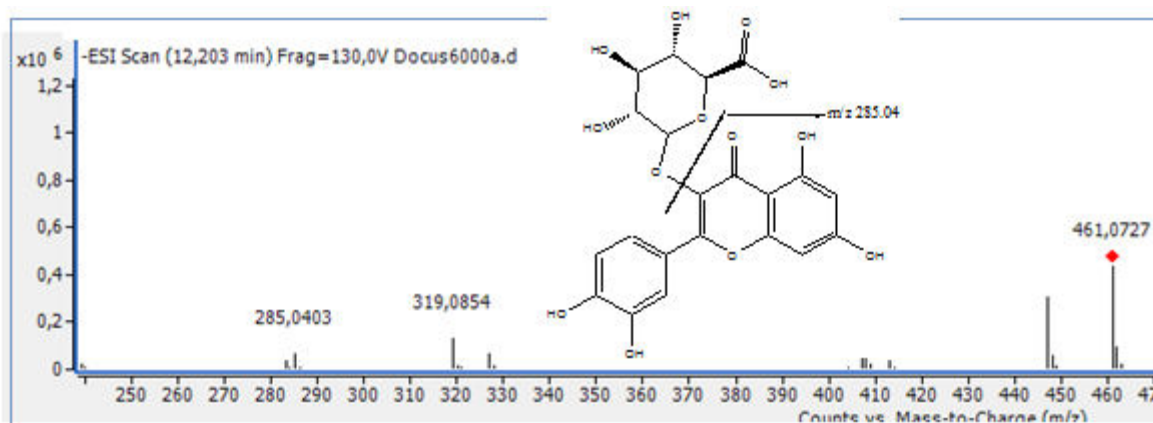


Figure 54 : Spectre de masse du produit 35

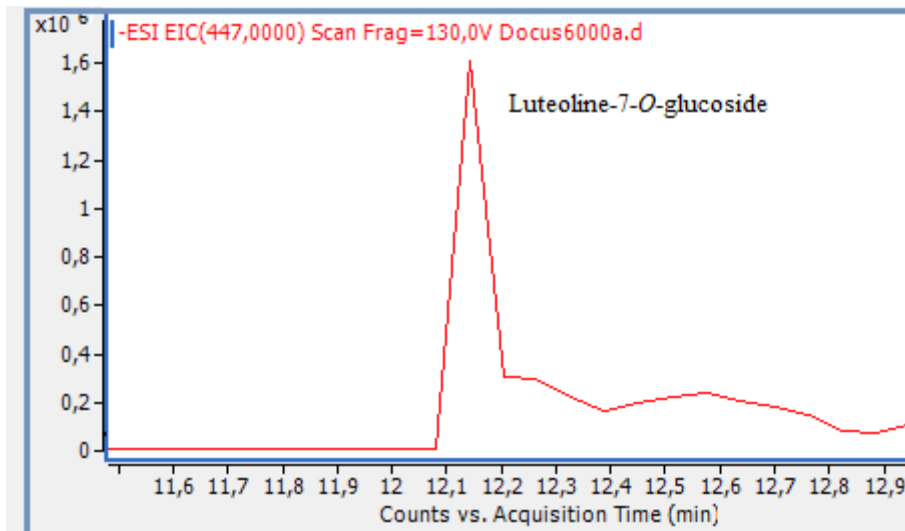


Figure 55 : Chromatogramme du produit 34

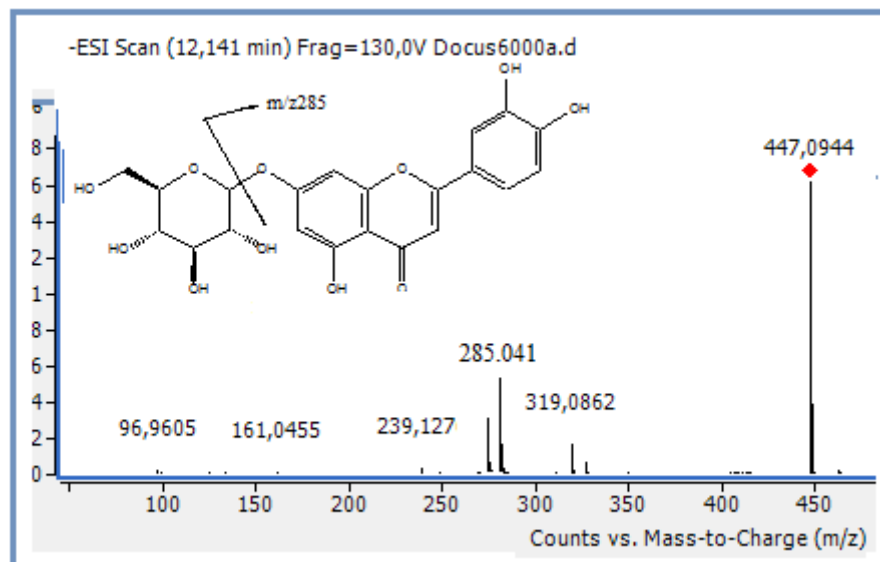


Figure 56 : Spectre de masse du produit 34

### 3.3.3. Identification du produit 40

L'apigénine-7-*O*-glucoside qui a l'ion  $[M-H]^-$  à  $m/z$  431,0996 a été identifiée par son pic de MS / MS intense à  $m/z$  269 en raison de la perte la molécule de glucose [101].

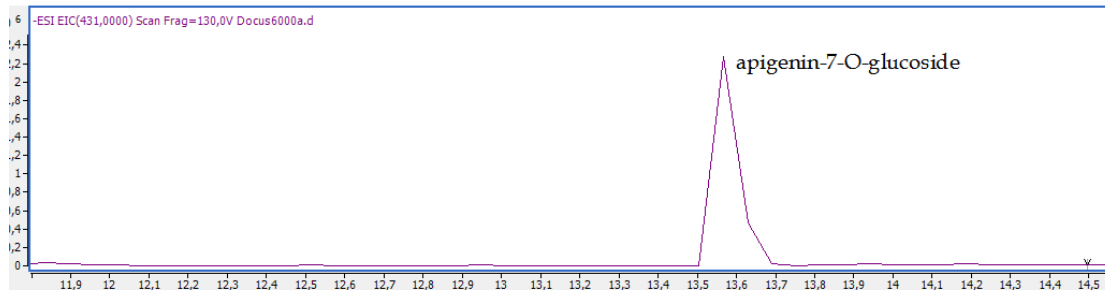


Figure 57 : Chromatogramme du produit 40

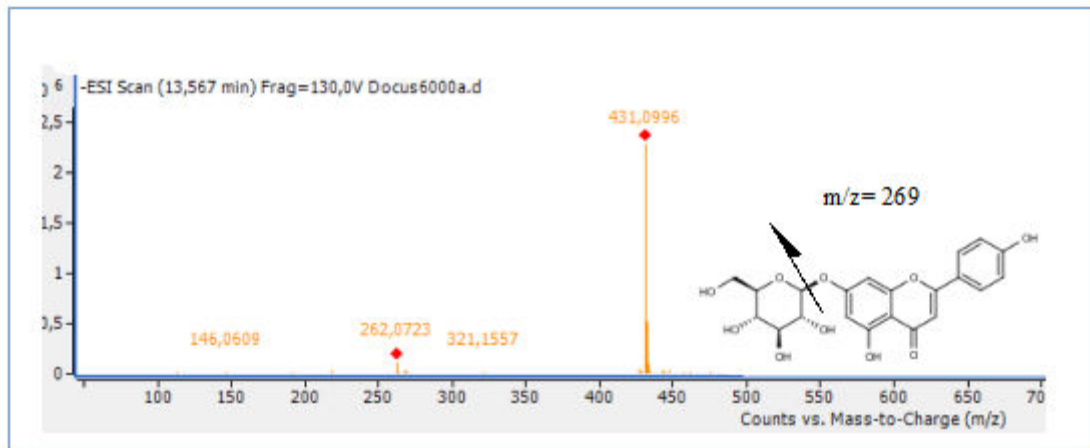


Figure 58 : Spectre de masse du produit 40

### 3.3.4. Identification du produit 41:

a été proposé comme Lutéoline 7-O- (6 « -O-malonyl)) -β-D-glucoside, il a montré un ion précurseur  $[M-H]^-$  à  $m/z$  489.1049 et a donné un fragment majeur à  $m/z$  285.04 correspondant à la perte de la molécule de Lutéoline [107].

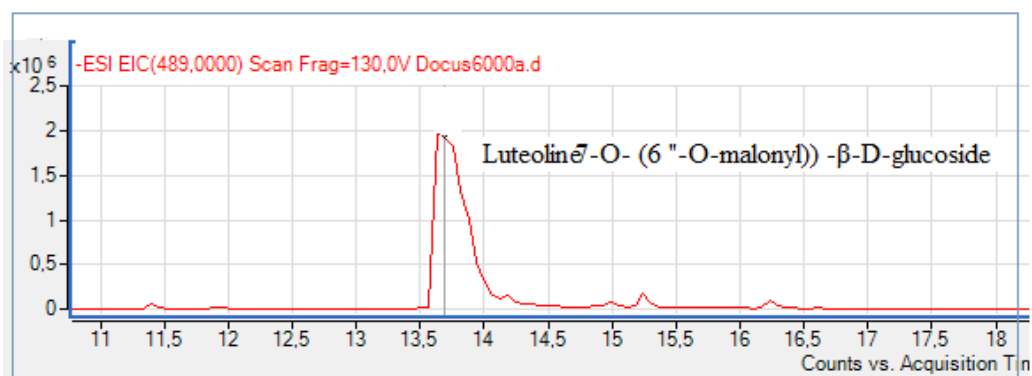


Figure 59 : Chromatogramme du produit 41

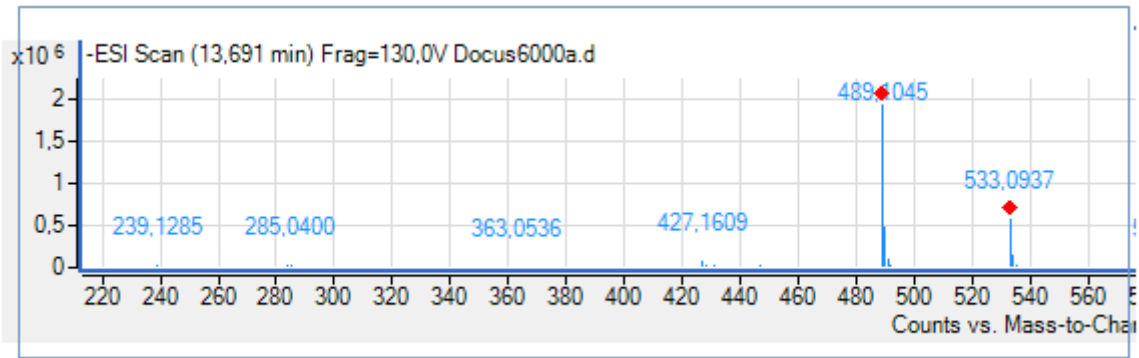


Figure 60 : Spectre de masse du produit 41

### 3.3.5. Identification du composé 43

Ce composé a été caractérisé en tant qu'Apigénine avec  $m/z$  269,0458, l'ion prédominant à  $m/z$  117 pour  $[C_8H_5O]^-$  [108].

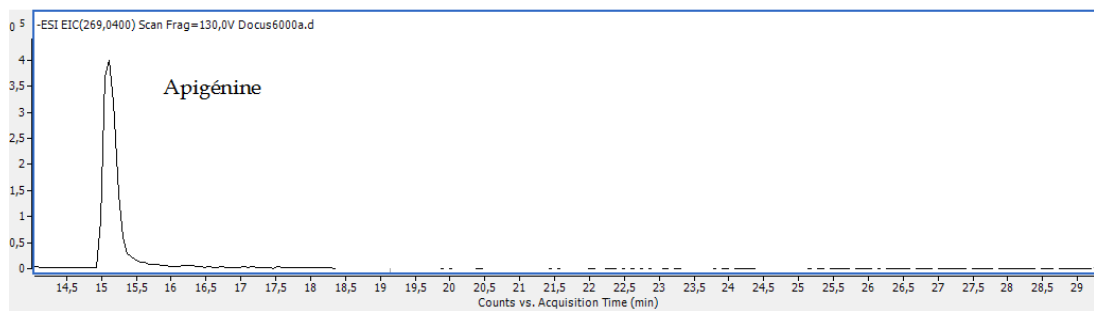


Figure 61 : Chromatogramme du produit 43

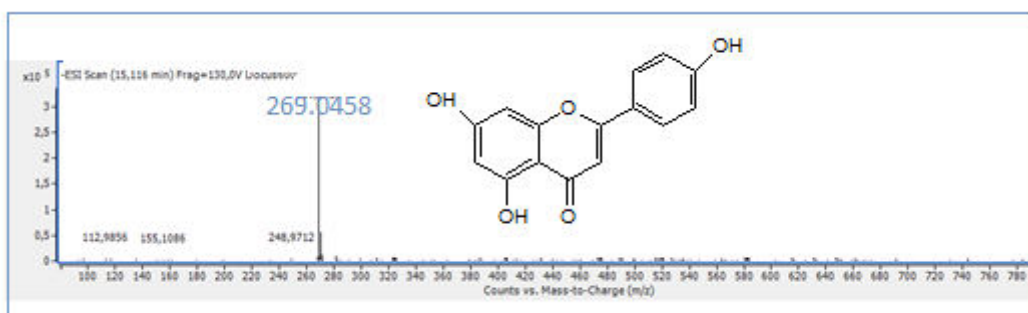


Figure 62 : Spectre de masse du produit 43

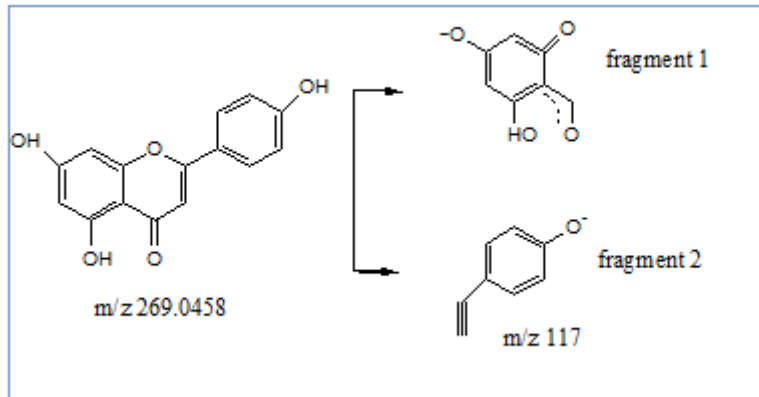


Figure 63 : Schéma de fragmentation proposée de l'Apigénine

### 3.3.6. Identification du produit 47:

Le composé 47 éluant à un temps de rétention 17.1 min ayant l'ion précurseur  $[M-H]^-$  à  $m/z$  285,0409 est suggéré comme Lutéoline, ce composé a donné un pic majeur à  $m/z$  133 ( $[C_8H_5O_2]^-$ ) [109].

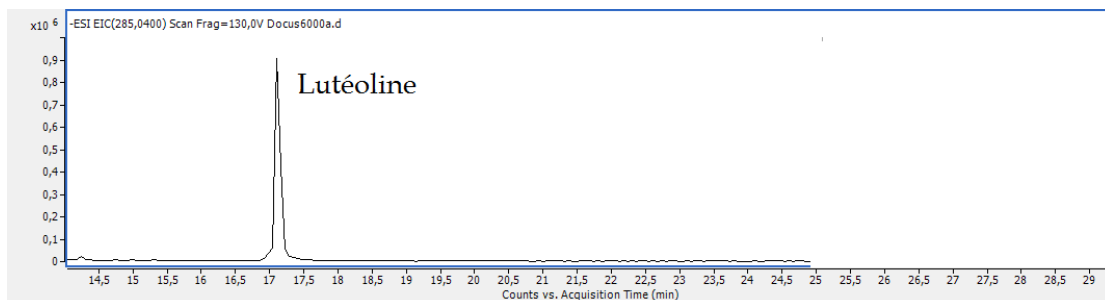


Figure 64 : Chromatogramme du produit 47

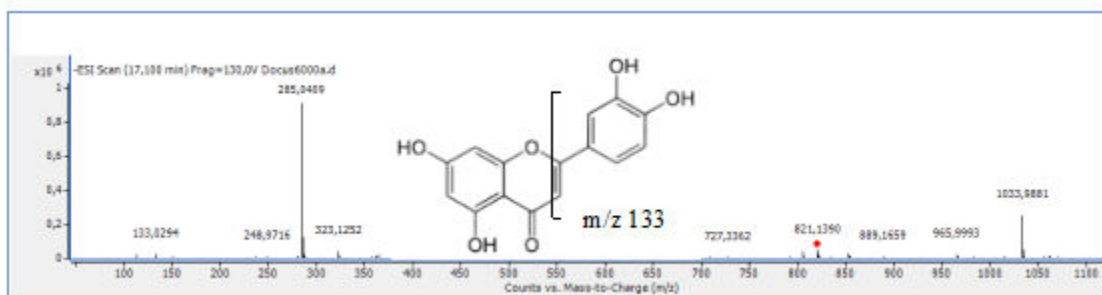


Figure 65 : Spectre de masse du produit 47

### 3.4. Autres composés polaires :

Le composé 1 avait un  $[M-H]^-$  à  $m/z$  191,0566, il a été identifié comme étant l'Acide quinique, pour lequel apparaît un fragment à  $m/z$  127 ( $[M-H-CO-H_2O]^-$ ) [101-110].

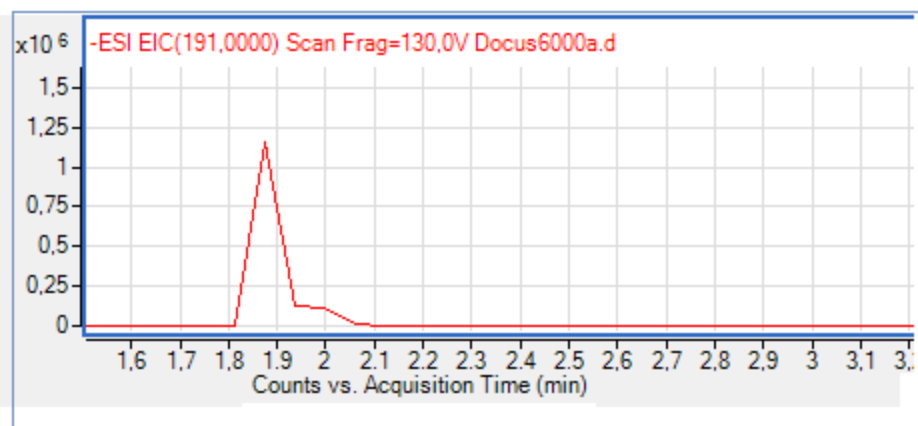


Figure 66 : Chromatogramme du produit 1

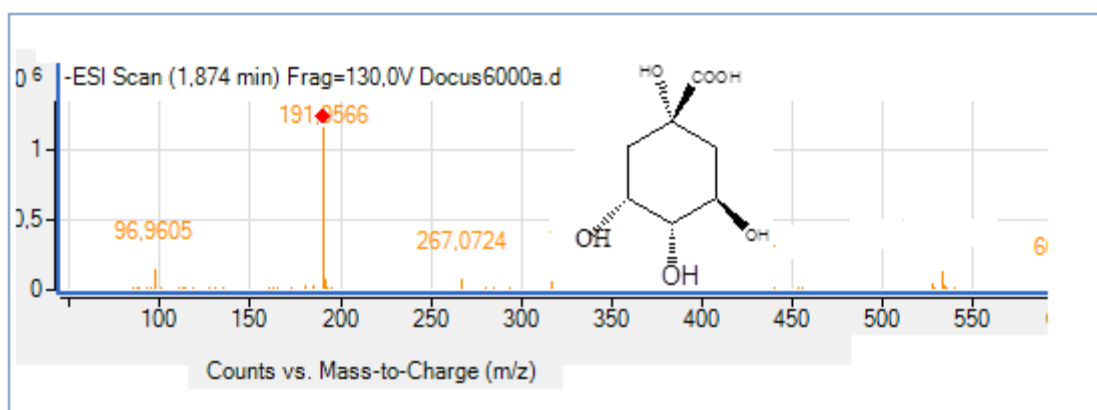


Figure 67 : Spectre de masse du produit 1

Le composé 15 qui a apparait à un temps de rétention 7.74 min ayant l'ion précurseur  $[M-H]^-$  à  $m/z$  293.1246 est suggéré comme acide méthyl glucopyranosyloxy pentanoïque (Figure 68) et (Figure 69). La fragmentation proposée de ce composé a donné une perte de la chaîne aliphatique, présentée par le fragment majoritaire à  $m/z$  131.0712 [110].

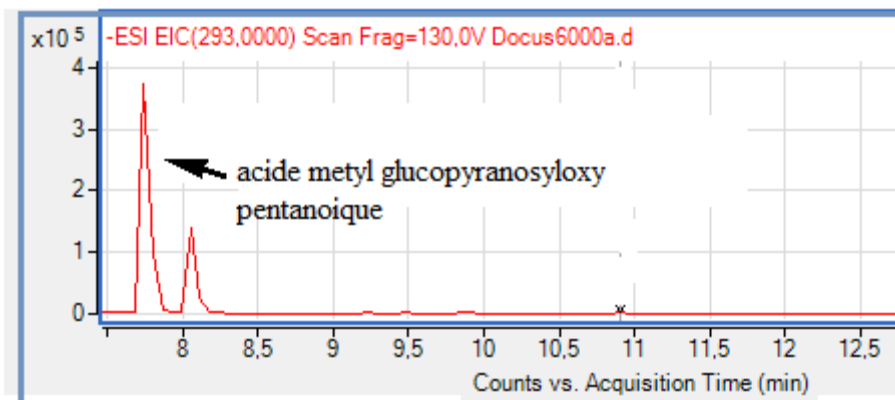


Figure 68 : Chromatogramme du produit 15

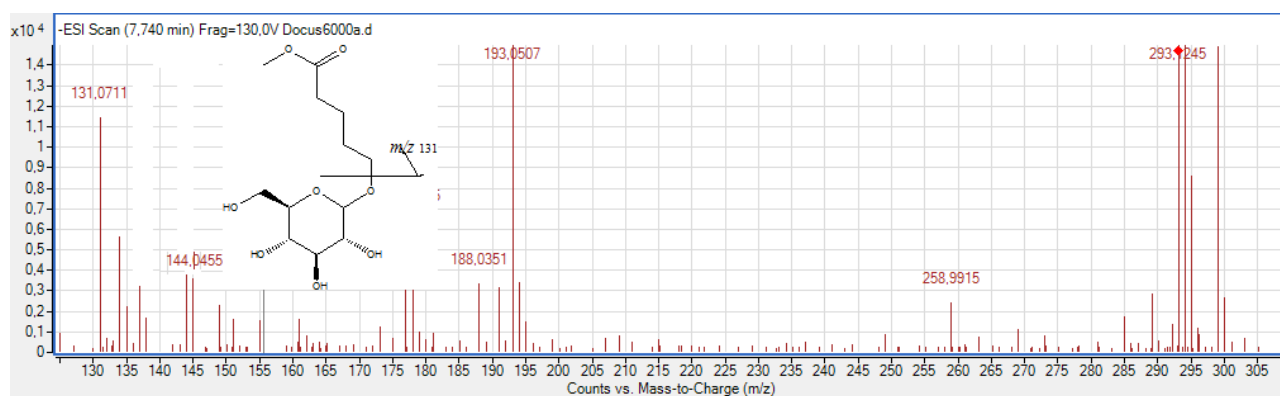


Figure 69 : Spectre de masse du produit 15

Le spectre de masse de la phase butanolique a montré également l'existence d'autres composés polaires, dérivés de l'Apigénine et la Lutéoline ainsi que l'Acide chlorogénique (tableau 6).



#### 4. Etude *in vitro* de l'activité antioxydante de la plante *D.muricatus*

##### 4.1. Test DPPH :

L'activité antioxydante des différents extraits (obtenus à partir de la plante *D.muricatus*) est évaluée en suivant la réduction du radical DPPH qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm .

Les résultats du tableau1, révèlent que tous les extraits testés pris, sont des anti radicalaires qui se diffèrent en pouvoir oxydant.

**Table 7 : : Capacité antioxydante par le test DPPH des extraits étudiés de la plante *D.muricatus***

L'extrait Acétate d'éthyle présente l'activité anti-radicalaire la plus élevée, et qui est

Extrait	% Inhibition Du radical <sup>a</sup> DPPH							CI <sub>50</sub>
	12.5	25	50	100	200	400	800	
<b>Conc</b> μg/mL								
<b>Acétate d'éthyle</b>	54.37 ±0.61	82.80 ±1.75	86.03 ±0.26	86.55 ±0.72	86.03 ±0.56	NT	NT	<b>12.33</b> <b>±0.69</b>
<b>BuOH<sup>a</sup></b>	25.3 1±1.30	42.17 ±3.30	79.65 ±.84	85.80 ±0.30	86.67 ±0.00	86.73 ±0.1	NT	<b>30.51</b> <b>±2.24</b>
<b>MeOH<sup>a</sup></b>	19.72 ±2.29	26.32 ±1.84	32.82 ±2.72	62.14 ±2.86	85.28 ±0.60	85.74 ±0.36	85.46 ±0.6	<b>81.96</b> <b>±2.1</b>
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	3.84 ±0.44	5.29 ±3.18	6.15 ±2.72	14.46 ±0.73	21.62 ±1.15	31.09 ±2.34	50.65 ±1.22	<b>439.001</b> <b>±4.26</b>
<b>BHT<sup>b</sup></b>	28,95 ±1,16	22,2 1±1,30	37,12 ±1,80	52,63 ±2,70	56,02 ±0,53	83,60 ±0,23	87,28 ±0,26	<b>22.32</b> <b>±1.19</b>
<b>BHA<sup>b</sup></b>	28,95 ±1,16	54,33 ±1,59	76,76 ±1,65	84,09 ±0,35	87,53 ±0,82	87,73 ±0,15	88,43 ±0,23	<b>5.73</b> <b>±0.41</b>

inferieure

deux fois du standard BHA, suivie par l'extrait butanolique (CI<sub>50</sub> :12.33±0.69).

Cependant, l'extrait chloroformique présente l'antioxydant le plus faible avec une

$$CI_{50} = 439.001 \pm 4.2$$

<sup>a</sup>Valeurs exprimées  $\pm$ SD, de trois mesures parallèles

<sup>b</sup> composés de référence. NT : Non testé

#### 4.2. La méthode TEAC : Trolox equivalent antioxidant capacity (ABTS) :

Les résultats de l'activité antioxydante déterminée à l'aide du test ABTS sont résumés dans le tableau 8.

L'extrait butanolique présente la valeur la plus faible de la  $CI_{50}$  ( $22,58 \pm 0,93$ ) et donc une activité anti radicalaire la plus importante comparativement aux autres extraits. L'activité des extraits Acétate d'éthyle et methanolique, est importante aussi. Nous notons que Le BHT et le BHA présentent un pouvoir anti-radicalaire très puissant par rapport à nos extraits. De toute façon, selon Moure *et al.* (2001) [14], Les antioxydants naturels indiquent souvent un pouvoir antioxydant inférieur à celui des antioxydants synthétiques.

**Table 8 : Résultats de l'activité antioxydante ABTS des extraits de plante *D.muricatus*.**

Extrait Conc µg/mL	% Inhibition ABTS							$CI_{50}$
	12.5	25	50	100	200	400	800	
<b>Butanolique</b>	0,41	0,56	0,98	1,47	2,73	3,42	4,40	<b>22,58</b>
	$\pm 0,05$	$\pm 0,06$	$\pm 0,08$	$\pm 0,08$	$\pm 0,40$	$\pm 0,76$	$\pm 0,05$	<b><math>\pm 0,93</math></b>
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	0.32	9.94	22.37	43.91	61.86	64.55	66.35	<b>151,77</b>
	$\pm 8.32$	$\pm 16.6$	$\pm 26.5$	$\pm 43.75$	$\pm 49.57$	$\pm 47.2$	$\pm 44.6$	<b><math>\pm 0,9</math></b>
<b>Acétate d'éthyle</b>	27.01	40.46	61.17	85.09	90.06	nt	nt	<b>36.05</b>
	$\pm 1.17$	$\pm 1.67$	$\pm 0.47$	$\pm 0.35$	$\pm 0.1$			<b><math>\pm 2.28</math></b>
<b>MeOH</b>	17,07	29,2	43,79	71,45	91,72	92,89	93,06	<b>51,90</b>
	$\pm 1,42$	$4 \pm 1,7$ 8	$\pm 3,94$	$\pm 3,67$	$\pm 0,10$	$\pm 0,10$	$\pm 0,19$	<b><math>\pm 0,59</math></b>
<b>BHT<sup>b</sup></b>	59.22	78.55	90.36	92.18	93.37	94.87	96.68	<b>1.29</b>
	$\pm 0.59$	$\pm 3.43$	$\pm 0.00$	$\pm 1.27$	$\pm 0,86$	$\pm 0,87$	$\pm 0,39$	<b><math>\pm 0.3</math></b>
<b>BHA<sup>b</sup></b>	83.42	93.52	93.58	93.63	93.63	94.20	95.39	<b>1.81</b>
	$\pm 4.09$	$\pm 0.09$	$\pm 0.09$	$\pm 0,16$	$\pm 0,95$	$\pm 0,9$	$\pm 2.62$	<b><math>\pm 0.1</math></b>

#### 4.3. Inhibition de blanchissement de $\beta$ -carotène :

Les données expérimentales obtenues par le test de blanchiment de  $\beta$ - carotène sont représentées dans le tableau 9. Les valeurs des  $CI_{50}$  ont été calculées aussi et sont présentées dans le même tableau, permettant ainsi d'évaluer et de comparer l'efficacité de nos extraits. L'analyse de l'ensemble des résultats obtenus pour cette activité montre que l'extrait acétate

d'éthyle affiche la  $CI_{50}$  la plus faible :  $24,60 \pm 2,92$ , puis les extraits butanoliques et méthanoliques qui donnent des  $CI_{50}$  rapprochées :  $43,76 \pm 0,98 \mu\text{g/ml}$  et  $47,05 \pm 0,8 \mu\text{g/ml}$ . Par ailleurs l'extrait chloroformique a démontré le pouvoir anti-radicalaire le plus faible avec une  $CI_{50}$  égale à  $138,16 \pm 2,25 \mu\text{g/mL}$ .

**Table 9 : Activité de blanchissement du  $\beta$ -carotène par les extraits de la plante *D.muricata*.**

Extrait Conc $\mu\text{g/mL}$	% Inhibition							$CI_{50}$
	12.5	25	50	100	200	400	800	
<b>Acetate d'éthyle</b>	30,94±	61,69±	80,81±	90,30±	95,72±	99,80±	Nd	<b>24,60±</b>
	2,18	0,62	0,78	0,51	0,17	7,98		<b>2,92</b>
<b>Chloroformique</b>	NA	NA	NA	13,36±	17,43±	41,62±	69,23±	<b>138,16±</b>
				2,64	3,13	0,53	0,19	<b>2,25</b>
<b>Butanolique</b>	NA	NA	7,11±	26,33±	57,94±	73,02±	83,95±	<b>43,76±</b>
			1,87	0,13	1,66	2,56	1,26	<b>0,98</b>
<b>Méthanolique</b>	NA	NA	0,65±	22,36±	53,19±	74,59±	86,42±	<b>47,05±</b>
			0,15	1,75	1,39	2,62	0,24	<b>0,81</b>
<b>BHT</b>	81.14±	86.0.9±	87.52±	91.67±	94.11±	94.41±	95.28±3.25	<b>1.05±</b>
	0.84	1.04	4.24	0.52	0.42	0.32		<b>0.01</b>
<b>BHA</b>	84.23±	90.11±	94.59±	96.09±	97.35±	99.59±	99.76±	<b>0.90±</b>
	1.14	0.68	0.77	0.02	1.08	0.14	0.98	<b>0.02</b>

#### 4.4. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC) :

Les résultats de la capacité antioxydante évaluée à l'aide du test de réduction du cuivre (CUPRAC) sont résumés dans le tableau 4. Les extraits (butanolique et acétate d'éthyle et méthanolique) sont capables de réduire le cuivre. Ce pouvoir réducteur augmente proportionnellement avec la concentration de l'extrait testé, mais reste toujours inférieur au pouvoir réducteur du standard.

Table 10 : Acivité chélatrice de CUPRAC des extraits de la plante *D.muricatus*.

% d'inhibition								
Extrait / Conc μg/mL	12.5	25	50	100	200	400	800	A <sub>0,50</sub>
<b>Butanolique</b>	0,06± 0,01	0,07± 0,01	0,11± 0,04	0,17± 0,04	0,42± 0,05	0,69± 0,15	1,61± 0,13	<b>223,08± 5,93</b>
<b>Acetate d'éthyle</b>	0,15± 0,04	0,17± 0,03	0,24± 0,02	0,41±0,0 2	0,63± 0,07	1,24± 0,16	1,78± 0,12	<b>150,14± 1,05</b>
<b>Methanolique</b>	0,04± 0,00	0,06± 0,01	0,07± 0,01	0,08± 0,01	0,18± 0,00	0,39± 0,03	0,51± 0,03	<b>685,00± 63,64</b>
<b>Chloroformique</b>	0,11± 0,02	0,11± 0,01	0,11± 0,03	0,11± 0,01	0,15± 0,01	0,21± 0,02	0,38± 0,04	<b>&gt;800</b>
<b>BHA</b>	0,09± 0,0	0,11± 0,01	0,18± 0,02	0,36± 0,04	0,78± 0,07	1,74± 0,07	3,53± 0,19	8,41± 0,67

A<sub>0,50</sub>: la concentration à l'absorbance 0,5.

#### 4.5. Chélation du Fer ferreux

L'analyse de l'activité antioxydante des extraits de *D.muricatus* via le test FRAP (tableau 11.) nous a permis de déduire que cette plante n'a aucun effet chélateur du Fer ferreux à avec les concentrations utilisées.

Table 11 :Inhibition du FRAP par les extraits de *D.muricatus*.

% d'inhibition								
Extrait / Conc μg/mL	12.5	25	50	100 μg	200 μg	400 μg	800 μg	CI <sub>50</sub>
<b>Butanolique</b>	4,84± 2,01	5,55± 0,89	6,38± 1,12	7,51± 2,60	11,27± 0,24	14,03± 1,88	17,37± 2,05	<b>&gt;800</b>
<b>Methanolique</b>	1,94± 0,80	4,87± 1,30	6,84± 0,38	10,63± 1,13	16,79± 1,65	21,10±1,9 1	36,31± 2,83	<b>&gt;800</b>
<b>Chloroformique</b>	5,17 ±1,30	11,44± 2,06	12,50 ±2,26	18,46 ±3,69	24,26± 0,77	35,42 ±1,89	44,82 ±1,24	<b>&gt;800</b>
<b>EDTA</b>	9,69 ±1,32	20,59 ±0,50	51,15 ±0,31	95,80 ±0,06	95,87 ±0,06	95,84 ±0,22	95,76 ±0,06	<b>12,11± 0,32</b>

### Conclusion générale et perspectives

---

Ce travail a été réalisé dans le but de valoriser les connaissances de la flore Algérienne par l'étude phytochimique d'une plante issues de cette flore appelée *Daucus muricatus* et la mise en évidence des propriétés pharmacologiques de cette plante.

Cette plante appartenant à la famille des Apiaceae a été récoltée de la région de Setif

L'objectif était d'apporter des éléments pour la validation de certaines propriétés de la plante étudiée, l'identification de ses principes actifs et l'évaluation de l'activité antioxydante.

Notre travail nous a permis de réaliser une étude phytochimique de la partie aérienne de la plante *D.muricatus*. Cette étude a été l'occasion de mettre en œuvre les différentes facettes de l'analyse développée au cours de cette thèse telles que l'extraction, le fractionnement, l'identification par LC/MS/MS ainsi que les tests d'activité antioxydante.

L'extraction des composés phénoliques est une étape cruciale pour la valorisation des principes actifs. Elle dépend surtout du solvant utilisé. Nous avons tenté d'extraire les polyphénols totaux en utilisant quatre solvants de polarités différentes de manière à solubiliser un maximum de composés.

Les différents extraits obtenus ont été analysé quantitativement par spectrophotomètre UV-visible pour leur contenu en polyphénols et en flavonoïdes. Considérant les fractions séparées, les phases acéttae d'éthyle et phase butanolique sont les plus riches en polyphénols ( $169.66 \pm 11.50 \mu\text{g EAG/mg d'extract}$ ) et ( $164.42 \pm 10.20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) successivement et en flavonoïdes ( $0.457 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

La fraction butanolique a été soumise à un fractionnement guidé par LC/ESI/MS/MS ; Cette méthodologie est considérée comme une nouvelle approche pour la séparation et l'identification rapide de produits naturels.

Le couplage HPLC-UV-MS/MS simplifie le regroupement des fractions, et réduit le temps de manipulation post-séparation en combinant analyse et identification des fractions en une seule et même étape. De plus, elle offre la possibilité d'obtenir des informations structurales sur les molécules d'intérêt directement après l'étape de fractionnement, ce qui est très utile dans le cas de réplification d'extraits végétaux.

25 composés ont été caractérisés et classés en 4 groupes : 13 dérivés de l'acide hydroxycinnamique, 5 dérivés de l'acide benzoïque, 8 flavonoïdes et d'autres composés polaires tels que l'acide quinique.

L'aptitude de nos extraits bruts à inhiber la peroxydation des lipides *in vitro* a été évaluée par la technique de décoloration de la  $\beta$ -carotène. Les résultats montrent que l'oxydation de l'acide linoléique est efficacement inhibée par les extraits testés. En effet, la capacité antiradicalaire la plus

## Conclusion générale et perspectives

élevée des extraits est démontré avec l'extrait acétate d'éthyle ( $CI_{50} 24,60 \pm 2,92 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) puis les extraits butanolique et méthanolique.

L'activité antiradicalaire *in vitro* est aussi étudiée avec la méthode de réduction du radical libre 1,1-diphényl-2-picryl-hydrasyl (DPPH) ; Les extraits polaires surtout; possèdent des capacités de neutralisation du radical libre DPPH puissantes, puisqu'ils agissent à de faibles doses. Notons que l'extrait acétate d'éthyle qui a donné une activité supérieure à celle du BHT ( $CI_{50} 12,33 \pm 0,69 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

En outre, une étude comparative de capacité antioxydante (ABTS) a menée entre les extraits de la plante, a démontré que l'extrait butanolique présente l'activité anti radicalaire la plus importante comparativement aux autres extraits  $CI_{50} (22,58 \pm 0,93 \mu\text{g.mL}^{-1})$ .

Les résultats de la capacité antioxydante évaluée à l'aide du test de réduction du cuivre (CUPRAC) montrent que tous les extraits issus des solvants polaires ont un pouvoir réducteur important, ce pouvoir est dû aux composés phénoliques présents dans les extraits étudiés.

Contrairement aux résultats précédant, des extraits de la plante *D. muricatus* n'ont aucun effet chélateur du Fer ferreux avec les concentrations utilisées.

Du point de vue phytochimique, il nous semblerait pertinent, d'étendre nos investigations à l'identification et la purification d'autres métabolites secondaires, appartenant à des classes différentes comme les coumarines et les terpénoïdes potentiellement intéressants ainsi qu'effectuer des tests toxicologiques avec les extraits étudiés de la plante *D.muricatus*.

Partant du fait qu'une substance pouvant être très active *in vitro*, peut perdre cette activité une fois pénétrée dans le corps; une étude *in vivo* est souhaitable, pour obtenir une vue globale sur l'activité antioxydante des extraits testés.

L'évaluation d'autres effets biologiques *in vitro* comme *in vivo* des extraits bruts et de leurs composés actifs en utilisant différentes techniques est recommandée aussi.

## ***Références bibliographiques***

## Références bibliographiques

---

### Références bibliographiques

1. Organisation mondiale de la Santé, (2012). Médecine traditionnelle : des textes anciens aux nouveaux médicaments, 90 (8), pp 557-632.  
<http://www.who.int/bulletin/volumes/90/8/12-020812/fr/>
2. Duke, J. A., Cseke, L. J., Warber, S., Kirakosyan, A., Brielmann, H. L., & Kaufman, P. B. (2016). Natural products from plants. CRC press.
3. Tyler, Varro E, (1993). The honest herbal, Pharmaceutical Products Press (Haworth Press) Binghamton, New York, 3rd edition, p 375.
4. Buchanan B., Grisse, W., Jones R., (2000). American Society of Plant Physiologists, chapitre 24: 1250-1318.
5. Manach, C., Regeat, F., Texier, O., Agullo, G., Demigne, C., Remesy, C. (1996). Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. Nutrition Research, 16(3), 517-544.
6. Mena F., Menna A., Tréton J, (2014). Polyphenols against skin aging in polyphenols in human health and disease, (1) 819-830.
7. Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. Nutrition reviews, 52(8), 253-265.
8. Heinrich, M., Teoh, H. L. (2004). Galanthamine from snowdrop—the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. Journal of Ethnopharmacology, 92(2-3), 147-162.
9. Quézel, P., Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Ethnopharmacology, 92(2-3), 147-162.
10. Moreau F, (1960). Botanique: Procaryotes (cyanophytes et bactéries). (Eucaryotes(algues, champignons et végétaux supérieurs). La plante dans ses rapports avec l'environnement, "Ed.Paris, Gallimard.
11. Guignard JI, (1989). Abrege de botanique , Ed Masson, 73 :178-183.
12. Jabrane, A., Jannet, H. B., Harzallah- Skhiri, F., Mastouri, M., Casanova, J., & Mighri, Z.(2009). Flower and Root Oils of the Tunisian *Daucus carota* L. ssp. *maritimus* (Apiaceae): Integrated Analyses by GC, GC/MS, and <sup>13</sup>C- NMR Spectroscopy, and in vitro Antibacterial
13. Mazzoni, V., Tomi, F., & Casanova, J. (1999). A daucane- type sesquiterpene from *Daucus carota* seed oil. Flavour and fragrance journal, 14(5), 268-272.
14. Staniszewska M., Kula J, (2001). Composition of the essential oil from wild *carrot*. L. ssp. *carota* growing in Poland, J Essent Oil Res, 13: 439-441.



15. Flamini G, Cioni PL, Maccioni S, Baldini R, (2003). Composition of the essential oil of *Daucus gingidium* L. ssp, *Gingidium*, *Food Chem*, 103: 1237-1240.
16. Saad H., ElSharkawy SH., Halim AF, (1995). Essential oils of *Daucus carota* ssp. *Maximus*, *Pharmaceutica Acta Helvetiae* , 70: 79–84.
17. Kula, J., Izydorczyk, K., Czajkowska, A., & Bonikowski, R. (2006). Chemical composition of carrot umbel oils from *Daucus carota* L. ssp. *sativus* cultivated in Poland. *Flavour and fragrance journal*, 21(4), 667-669.
18. Lanfranchi, D. A., Laouer, H., El Kolli, M., Prado, S., Maulay-Bailly, C., & Baldovini, N. (2010). Bioactive phenylpropanoids from *Daucus crinitus* Des. from Algeria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(4), 2174-2179.
19. Djarri, L., Medjroubi, K., Akkal, S., Elomri, A., Seguin, E., Vérité, P. (2006). Composition of the essential oil of aerial parts of an endemic species of the Apiaceae of Algeria, *Daucus reboudii* Coss. *Flavour and fragrance journal*, 21(4), 647-649.
20. Smaili, T., Zellagui, A., Cioni, P. L., Flamini, G, (2011). A myristicin-rich essential oil from *Daucus sahariensis* growing in Algeria. *Natural product communications*, 6(6), 883-886.
21. Jabrane, A., Jannet, H. B., Harzallah-Skhiri, F., Mastouri, M., Casanova, J., & Mighri, Z, (2009). Flower and Root Oils of the Tunisian *Daucus carota* L. ssp. *maritimus* (Apiaceae): Integrated Analyses by GC, GC/MS, and <sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy, and in vitro Antibacterial Activity. *Chemistry & biodiversity*, 6(6), 881-889. spectroscopy, and in vitro antibacterial activity, *Chem. Biodiv*, 6: 881.
22. Spooner, D., Rojas, P., Bonierbale, M., Mueller, L. A., Srivastav, M., Senalik, D., Simon, P. (2013). Molecular phylogeny of *Daucus* (Apiaceae). *Systematic Botany*, 38(3), 850-857.
23. Bendiabdellah, A., Dib, M. E. A., Djabou, N., Allali, H., Tabti, B., Muselli, A., Costa, J, (2012). Biological activities and volatile constituents of *Daucus muricatus* L. from Algeria. *Chemistry Central Journal*, 6(1), 48.
24. Kammerer, D., Carle, R., Schieber, A. (2004). Characterization of phenolic acids in black carrots (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(12), 1331-1340.
25. Dib, M. A., Bendahou, M., Bendiabdellah, A., Djabou, N., Allali, H., Tabti, B., ...& Costa, J. (2010). Partial chemical composition and antimicrobial activity of *Daucus crinitus* Desf. extracts. *grasas y aceites*, 61(3), 271-278.

26. Wu, Y., Xu, Z., Li, H. J., Meng, X., Bao, Y. L., & Li, Y, (2006). Components of essential oils in different parts of *Daucus carota* L. var. *sativa* Hoffm. *Chemical Research in Chinese Universities*, 22(3), 328.
27. Mansour, E. S. S., Maatooq, G. T., Khalil, A. T., Marwan, E. S. M., Sallam, A. A, (2004). Essential oil of *Daucus glaber* Forssk. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59(5-6), 373-378.
28. Kammerer, D., Carle, R., & Schieber, A, (2004). Characterization of phenolic acids in black carrots (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(12), 1331-1340.
29. Macheix, J. J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C, (2005). *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. PPUR presses polytechniques.
30. Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales*, 3 ème édition, Lavoisier.
31. Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A., Capasso, F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life sciences*, 65(4), 337-353.
32. Erlund, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24(10), 851-874.
33. Birt, D. F., Hendrich, S., Wang, W. (2001). Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & therapeutics*, 90(2-3), 157-177.
34. Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics*, 96(2-3), 67-202.
35. Rouessac, F., & Rouessac, A. (2000). *Analyse Chimique: Méthodes et techniques instrumentales modernes*. Dunod.
36. Silverstein., Webster, Kiemle, *Identification spectrométrique de composés organiques*, 2eme édition, Belgique, 2007, p1.
37. Rouessac, F., Rouessac, A., & Cruché, D. (2004). *Analyse chimique-6e éd.: Méthodes et techniques instrumentales modernes*. Dunod.
38. Vollhardt, KPC et Shore, NE. *Traité de chimie organique 3e éd.*, DeBoeck Université p. 797.)
39. Stephens, W. E. (1946). A Pulsed Mass Spectrometer with Time Disaersion. *Phys. Rev.*, 69, 691.
40. McLafferty, F. W. (2008). Mass spectrometry across the sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(47), 18088-18089.

41. Hunt, D. F., Yates, J. R., Shabanowitz, J., Winston, S., & Hauer, C. R. (1986). Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(17), 6233-6237.
42. Schlesinger, W. H. (1977). Carbon balance in terrestrial detritus. *Annual review of ecology and systematics*, 8(1), 51-81.
42. *Anal. Chem.*, 1977, 49 (1), pp 71A-74A.
43. Niessen, W. M. A. (1998). Advances in instrumentation in liquid chromatography-mass spectrometry and related liquid-introduction techniques. *Journal of Chromatography A*, 794(1-2), 407-435.
44. Hvattum, E., & Ekeberg, D. (2003). Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 38(1), 43-49.
45. Stobiecki, M. (2000). Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry*, 54(3), 237-256.
46. Lee, J. S., Kim, D. H., Liu, K. H., Oh, T. K., & Lee, C. H. (2005). Identification of flavonoids using liquid chromatography with electrospray ionization and ion trap tandem mass spectrometry with an MS/MS library. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(23), 3539-3548.
47. Ye, M., Yan, Y., & Guo, D. A. (2005). Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug Tu-Si-Zi by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(11), 1469-1484.
48. Zhou, D. Y., Xu, Q., Xue, X. Y., Zhang, F. F., & Liang, X. M. (2006). Identification of O-diglycosyl flavanones in Fructus aurantii by liquid chromatography with electrospray ionization and collision-induced dissociation mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 42(4), 441-448.
49. Justesen, U., Knuthsen, P., & Leth, T. (1998). Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 799(1-2), 101-110.
50. Wollenweber, E., Wehde, R., Dörr, M., Lang, G., & Stevens, J. F. (2000). C-Methyl-flavonoids from the leaf waxes of some Myrtaceae. *Phytochemistry*, 55(8), 965-970.
51. Ma, Y. L., Li, Q. M., Van den Heuvel, H., & Claeys, M. (1997). Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 11(12), 1357-1364.

52. de Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M., Ariese, F., Gooijer, C., & Udo, A. T. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of chromatography A*, 1112(1-2), 31-63.
53. Sharma, U.K., Sharma, K., Sharma, N., Sharma, A., Singh, H.P. and Sinha, A.K. (2008) Microwave-assisted efficient extraction of different parts of *Hippophae rhamnoides* for the comparative evaluation of antioxidant activity and quantification of its phenolic constituents by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(2), 374-379.
54. Domon, B., & Costello, C. E. (1988). A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate journal*, 5(4), 397-409.
55. Fabre, N., Rustan, I., de Hoffmann, E., & Quetin-Leclercq, J. (2001). Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12(6), 707-715.
56. Cuyckens, F., & Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass spectrometry*, 39(1), 1-15.
57. Justino, G. C., Borges, C. M., & Florêncio, M. H. (2009). Electrospray ionization tandem mass spectrometry fragmentation of protonated flavone and flavonol aglycones: a re- examination. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23(2), 237-248.
58. Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., & Defraigne, J. O. (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*, 4(5), 12-23.
59. Boyd, B., Ford, C., Koepke Michael, C., Gary, K., Horn, E., McAnelley, S., & McAnelley, C. (2003). Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *GlycoScience et Nutrition*, 4(6), 7.
60. Pelletier E., Campbel P., Denizeau F., 2004. *Ecotoxicologie moléculaire*. Ed. Presses de l'universite du Quebec.canada : 182p.
61. (Jacques B., André R., (2004). *Biochimie métabolique* Ed ellipses .Paris. pp: 217-219220-223-225.
62. Martinez-Cayuela, M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, 77(3), 147-161.
63. Gutteridge, J. M., & Halliwell, B. (1993). Invited review free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free radical research communications*, 19(3), 141-158.

64. Jacques B., André R., (2004). Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris. pp: 217-219220-223-225.
65. Favier, A. (2003). Le stress oxydant. L'actualité chimique, 108.
66. Madrid Vicente, J. (2000). *Los aditivos en los alimentos: según la Unión Europea y la legislación española.*
67. PELLI K., LYLY M., 2003. Les antioxydants dans l'alimentation. VTT Biotechnology Finlande. (3) :9p
68. Tanguy, M., & Begué-Simon, A. M. (2009). Antioxydants Première partie: les antioxydants dans l'alimentation. *Médecine*, 5(6), 256-260.
69. Pokorný, J. (2007). Are natural antioxidants better—and safer—than synthetic antioxidants?. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(6), 629-642.
70. Ekoumou, C. (2003). Etude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. *Bamako: Thèse de doctorat en pharmacie de l'Université de Bamako.*
71. Ahamet, S. (2003). *Etude phytochimique et des activités biologiques de Balanites aegyptiaca L.(Balanitaceae)* (Doctoral dissertation, Thèse de pharmacie, Bamako).
72. Igor Passi, L. B. (2002). *Etude des activités biologiques de Fagara zanthoxyloides Lam.(Rutaceae)* (Doctoral dissertation, Thèse de pharmacie, Bamako, p 133).
73. Cavin, A. (1999). *Investigation phytochimique de trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires: " Tinospora crispa"(Menispermaceae)," Merremia emarginata"(Convolvulaceae) et" Orophea enneandra"(Annonaceae).*
74. Sidibé, F. (2003). *Etude phytochimique et pharmacologique de Stereospermum kunthianum Cham.(Bignoniaceae)* (Doctoral dissertation, Thèse de Pharmacie, Bamako).
75. Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.
76. Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J. Sci. Technol*, 26(2), 211-219.
77. Belkheiri, N. (2010). *Dérivés phénoliques à activités Antiathérogènes* (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
78. Lien, E. J., Ren, S., Bui, H. H., & Wang, R. (1999). Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(3-4), 285-294.
79. Oliveira, S. D., Souza, G. A. D., Eckert, C. R., Silva, T. A., Sobral, E. S., Fávero, O. A., ... & Baader, W. J. (2014). Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Química Nova*, 37(3), 497-503.

80. Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
81. Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H. A., & Sokmen, A. (2006). Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chemistry*, 95(2), 200-204.
82. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.
83. Özyürek, M., Güçlü, K., Tütem, E., Başkan, K. S., Erçağ, E., Celik, S. E., ...& Apak, R. (2011). A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical methods*, 3(11), 2439-2453.
84. Zhao, G. R., Xiang, Z. J., Ye, T. X., Yuan, Y. J., & Guo, Z. X. (2006). Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. *Food chemistry*, 99(4), 767-774.
85. Trabut L. Répertoire des noms indigènes des plantes dans le nord de l'Afrique, 1935, 91 pp.
86. Saenz Lain, C. (1981). Research on *Daucus* L.(Umbelliferae) Anal. Jard.Bot. Madrid. 37. 481-533. Includes fruit anatomy.Umbelliferae. *Fruits (PMBD, 185707307)*.
87. Harborne JB. Phytochemical Methods.A guide to modern techniques of plantanalysis, Chapman & Hall, London, 1998.
88. Kula, J., Izydorzyc, K., Czajkowska, A., & Bonikowski, R. (2006). Chemical composition of carrot umbel oils from *Daucus carota* L. ssp. sativus cultivated in Poland. *Flavour and fragrance journal*, 21(4), 667-669.
89. Catier O., Roux D., 2007- Botanique pharmacognosie phytothérapie. Wolters Kluwar (3<sup>eme</sup>Ed.), 141 p.).
90. Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178).Academic press.
91. Turkoglu, A., Duru, M. E., Mercan, N., Kivrak, I., & Gezer, K. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry*, 101(1), 267-273.
92. Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M., & Guwy, A. J. (2007). Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1161(1-2), 132-145.
93. Linares, I. B., Arráez-Román, D., Herrero, M., Ibáñez, E., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2011). Comparison of different extraction procedures for the comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in *Rosmarinus officinalis* by reversed-phase

- high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7682-7690.
94. Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199.
  - 95 Popovici, C., Saykova, I., & Tylkowski, B. (2010). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH.
  96. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
  97. Miller, H. E. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 48(2), 91-91.
  98. Decker, E. A., & Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 38(3), 674-677.
  99. Weisz, G. M., Kammerer, D. R., & Carle, R. (2009). Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*Helianthus annuus* L.) kernels and shells by HPLC-DAD/ESI-MSn. *Food Chemistry*, 115(2), 758-765.
  100. Long, H. S., Stander, M. A., & Van Wyk, B. E. (2012). Notes on the occurrence and significance of triterpenoids (Asiaticoside and Related Compounds) and caffeoylquinic acids in *Centella* species. *South African journal of botany*, 82, 53-59.
  101. Hossain, M. B., Rai, D. K., Brunton, N. P., Martin-Diana, A. B., & Barry-Ryan, C. (2010). Characterization of phenolic composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10576-105
  102. Abu-Reidah, I. M., Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R. M., Arráez-Román, D., & Segura-Carretero, A. (2015). HPLC-DAD-ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L.(Sumac) fruits. *Food Chemistry*, 166, 179-191.
  103. Vallverdú-Queralt, A., Regueiro, J., Martínez-Huélamo, M., Alvarenga, J. F. R., Leal, L. N., & Lamuela-Raventos, R. M. (2014). A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chemistry*, 154, 299-307. and bay *Food Chemistry* 154 (2014) 299-307.
  104. María, C., Fernández-Arroyo, S., Joven, J., & Segura-Carretero, A. (2013). Comprehensive characterization by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS from an *Eryngium bourgatii* extract and their antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Research International*, 50(1), 197-204.
  105. Sonda, A., María, C., Olfa, B.H., Segura-Carretero, A., Mohamed, B. (2015).

Assessment of the distribution of phenolic compounds and contribution to the antioxidant activity in Tunisian fig leaves, fruits, skins and pulps using mass spectrometry-based analysis, *Food & Function*.

106. Justesen, U. (2000). Negative atmospheric pressure chemical ionisation low-energy collision activation mass spectrometry for the characterisation of flavonoids in extracts of fresh herbs. *Journal of Chromatography A*, 902(2), 369-379.
107. Feeny, P., Sachdev, K., Rosenberry, L., & Carter, M. (1988). Luteolin 7-O-(6''-O-malonyl)- $\beta$ -D-glucoside and trans-chlorogenic acid: Oviposition stimulants for the black swallowtail butterfly. *Phytochemistry*, 27(11), 3439-3448.
108. Hossain, M. B., Rai, D. K., Brunton, N. P., Martin-Diana, A. B., & Barry-Ryan, C. (2010). Characterization of phenolic composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10576-10581.
109. Wang, D. D., Liang, J., Yang, W. Z., Hou, J. J., Yang, M., Da, J., ... & Guo, D. A. (2014). HPLC/qTOF-MS-oriented characteristic components data set and chemometric analysis for the holistic quality control of complex TCM preparations: Niu Huang Shangqing pill as an example. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 89, 130-141.
110. Rodríguez-Pérez, C., Quirantes-Piné, R., Amessis-Ouchemoukh, N., Madani, K., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutierrez, A. (2013). A metabolite-profiling approach allows the identification of new compounds from *Pistacia lentiscus* leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 77, 167-174.