

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique
Filière : Sciences Biologiques
Option : Biochimie Appliquée



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Etude de l'activité antioxydante et enzymatique
des extraits d'*Ophrys tenthredinifera***

Présenté par :

ABBOU CHAFIAA & HAMADACHE RIMA

Soutenu le : **20 Juin 2017**

Devant le jury composé de :

Mme BAHLOUL- CHERAFT N	MAA	Président
Mme DJOUDAD-KADJI H	MCA	Encadreur
Mr TACHERFIOUT	MAA	Examinatrice
Mlle MEZAHM T	MAB	Invitée

Année universitaire : 2016 / 2017

Remerciements

Avant tout, nous tenons à remercier celui qui nous a protégé, aidé, et soutenu, jusqu'à pouvoir « mener la graine au fruit » nous nous inclinons pour dire « Dieu merci ».

Nous adressons nos profonds remerciements à notre promotrice, M^{me} Kadji ainsi que M^{lle} Mezahem pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique.

Nous remercions également et M^{lle} cheraft pour l'honneur qu'elles nous a fait d'avoir examiné notre travail ;

Ainsi que M^r tacherfiout D'avoir accepté de présider le jury.

On n'oublie pas de remercier vivement M^r Khebbache N. et M^r Abbas R. Qui nous ont aidés lors de la récolte de la plante. Ainsi que M^r Boughanem M. qui nous a ramené le champignon de Paris. On ne les remerciera jamais assez pour leur aide précieuse, merci infiniment.

Merci à tous ceux et celles qui nous ont soutenu d'une manière ou d'une autre, de près ou de loin.

Rima et Chafiaa

Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à Ma famille **ABBOU** et aux personnes les plus chères au monde.*

A mes Chers parents

A ma très chère mère Karima

Tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Et Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver t'accordera santé, longue vie et bonheur.

A mon très cher père Idir

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A mes très chers frères et sœurs

aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que je porte pour vous mes sœurs : Nassima, Souad, Nadia, Tiziri. sans oublier, mes nièces: Thanina, Aya, Thafath, Ines. mes neveux : salas, Abdelhak, Awal, Adam. Et mes frères: Massinissa, Kouceila, Lounes.

A mes chers grands parents

Smail ET Adada

A mes oncles

Hakim, Karim, Zahir, Mourad, Samir, Abdelouhab ET Ghanou

A mes tantes

Dalila, Fouzia, Zakia et Hayet

A mon binôme Rima qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce travail ainsi que sa famille.

A La promotion de Master 2 biochimie appliquée LMD.

Sans oublier mes amies et à Tous ceux qui ont connus CHAFIAA.

Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à Ma famille **HAMADACHE** et aux personnes les plus chères au monde.*

A mes Chers parents

A ma très chère mère Rachida

Tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Et Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver t'accordera santé, longue vie et bonheur.

A mon très cher père Ahmed

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est fruit de tes sacrifices qui tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A mes deux chers frères

Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que je porte pour vous Fouad et Oualid.

A la pensée de mes chers grands parents

A mon binôme Chafiaa qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce travail ainsi que sa famille.

A La promotion de Master 2 biochimie appliquée LMD.

A tous ceux qui aiment la science

A tous mes amies et à Tous ceux qui ont connus Rima.

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	01
Chapitre I : Revue bibliographique	
I.1. Les orchidacées (orchidées).....	02
I.1.1. Présentation de l'espèce <i>Ophrys tenthredinifera</i>	02
I.1.1.1. Description botanique.....	02
I.1.1.2. Position systématique	03
I.1.2. Répartition géographique.....	03
I.1.3. Composition chimique.....	04
I.1.4. Propriétés thérapeutiques.....	04
I.2. Le stress oxydatif et l'activité antioxydante.....	05
I.2.1. Les radicaux libres	05
I.2.1.1. Définition et origine.....	05
I.2.1.2. Les principaux types de radicaux libres.....	05
I.2.1.3. Les cibles biologiques des radicaux libres.....	06
I.2.2. Le stress oxydatif.....	07
I.2.3. Les antioxydants.....	07
I.2.3.1. Définition.....	07
I.2.3.2. Rôle des antioxydants.....	08
I.2.3.3. Type des antioxydants.....	08
I.3. La tyrosinase.....	10
I.3.1. Généralités.....	10
I.3.2. Classification et Nomenclature	10
I.3.3. Structure de la tyrosinase.....	11

I.3.4. Rôle de la tyrosinase.....	12
I.3.5. Mécanisme réactionnel.....	13
I.3.6. Les effecteurs de la tyrosinase	14
I.3.6.1. Les activateurs	14
I.3.6.2. Les inhibiteurs.....	14

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1.Récolte et préparation du matériel végétal.....	16
II.2.Procédure d'extraction des composées phénoliques.....	17
II.3.Dosage des phénols totaux	18
II.3.1.Dosage des polyphénols.....	18
II.3.2.Dosage des flavonoïdes.....	19
II.3.3.Dosage des tanins condensés.....	20
II.4.Tests des activités biologiques.....	20
II.4.1.Test de l'activité antioxydante	20
II.4.1.1.Test du DPPH.....	20
II.4.1.2.Pouvoir réducteur.....	22
II.4.2.Tests de l'activité enzymatique.....	23
II.4.2.1.Extraction de la tyrosinase du champignon <i>Agaricus bisporus</i>	23
II.4.2.2.Mesure de l'activité de la tyrosinase.....	24

Chapitre III : Résultats et discussions

III.1.Rendements des extraits bruts.....	26
III.2.Dosage des polyphénols, flavonoïdes et tanins.....	27
III.3.Activité antioxydante des extraits éthanolique d' <i>Ophrys tenthredinifera</i>	30
III.3.1.Activité scavenger du radical DPPH [•]	30
III.3.2.Pouvoir réducteur.....	30
III.4.Corrélations entre les teneurs (phénols, flavonoïdes, tanins) et les IC ₅₀	33
III.4.1.Le radical DPPH [•]	33

III.4.2.Pouvoir réducteur.....	34
III.5.Activité de la tyrosinase.....	35
III.5.1.Activité de la tyrosinase du champignon de paris <i>Agaricus bisporus</i>	35
III.5.2.Effet des extraits d' <i>Ophrys tenthredinifera</i> sur l'activité de la tyrosinase.....	36
III.5.3.Efficacité inhibitrice de la tyrosinase par les extraits tubercules de la plante....	38
Conclusion et perspectives.....	40
Références bibliographiques.....	41
Glossaire	
Annexes	

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- AlCl₃** : Chlorure d'Aluminium
- BHA** : Butyl-Hydrox-Anisol
- BHT** : Butyl-hydroxytoluène
- CAT** : Catalase
- Cu** : Cuivre
- Cys** : Cystéine
- DHI** : 5, 6 – dihydroxyindol
- DHICA** : acide 5, 6 – dihydroxyindol-2-carboxylique.
- DIECA** : Diéthylthiocarbamate de sodium
- DO** : Densité optique.
- DOPA** : 3,4-Dihydroxyphénylalanine
- DPPH** : Radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
- EC** : Enzyme commission
- EDTA** : Ethylène diamine tétra-acétique acide
- EqAG**: Equivalent en acide gallique.
- EqC** : Equivalent catéchine.
- EqQ** : Equivalent quercétine.
- GPx**: Gluthathion peroxydase
- His**: Histidine
- IC₅₀**: Concentration inhibitrice à 50%
- IUB** : Union Internationale de la Biochimie
- kDa** : kilodaltons.
- MS** : Matière sèche.
- NADPH** : nicotinamide adénine di nucléotide phosphate
- Phe**: Phenylalanine
- PM**: poids moléculaire.
- PPO**: polyphénols oxydase
- ROS** : Reactive oxygen species = Espèces réactives de l'oxygène
- SDS** : Sodium dodécyl sulfate
- SOD**: Superoxide dismutase
- TRP1**: Tyrosinase-related protein 1
- TRP2**: Tyrosinase-related protein 2

Liste des abréviations

UV: Ultraviolet.

Vit C: vitamine C

Numéro	Titre	Page
Figure 01	Illustration photographique de l'espèce <i>Ophrys tenthredinifera</i>	2
Figure 02	(a)Quercétine et (b) Kaempferol	4
Figure 03	Aperçu des différentes espèces oxygénées activées (EOA) et des antioxydants régulateurs de leur production	8
Figure 04	La géométrie du site actif de la protéine à cuivre de type III de la tyrosinase	11
Figure 05	Structure de la tyrosinase chez les mammifères	12
Figure 06	Mécanisme de synthèse de la mélanine dans les mélanocytes durant la mélanogénèse	13
Figure 07	Localisation géographique des stations de récolte de la plante	16
Figure 08	Protocole d'extraction des polyphénols	17
Figure 09	Protocole de dosage des polyphénols totaux	18
Figure 10	Protocole de dosage des flavonoïdes	19
Figure 11	Protocole de dosage des tannins condensés	20
Figure 12	Structure de DPPH et mécanisme de sa réduction par un antioxydant	21
Figure 13	Le protocole de l'activité scavenging du radical DPPH	21
Figure 14	Protocole du pouvoir réducteur	22
Figure 15	Champignon de paris <i>Agaricus bisporus</i>	23
Figure 16	Protocole d'extraction de la tyrosinase du champignon de paris <i>Agaricus bisporus</i>	23
Figure 17	Concentration des polyphénols en EqAG	27
Figure 18	Concentration des flavonoïdes en EqQ	28
Figure 19	Concentration des tanins en EqC	29
Figure 20	Histogramme présente les concentrations efficaces à piéger 50% (IC ₅₀) du radical DPPH par les différents extraits de la plante étudiée	31
Figure 21	Histogramme présente les concentrations efficaces réductrices en équivalent de l'acide ascorbique de différents extraits de la plante étudiée	32

Liste des figures

Figure 22	Histogramme présente les concentrations efficaces à piéger 50% (IC ₅₀) différents extraits de la plante étudiée.	33
Figure 23	Corrélation entre l'efficacité anti radicalaire (DPPH) exprimée en valeur IC ₅₀ et les teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tannins	34
Figure 24	Corrélations entre la réduction du fer exprimées en valeur IC ₅₀ et les teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tannins	34
Figure 25	Variation de l'absorbance à 475 nm en fonction du temps de l'activité durant la réaction d'oxydation de L- tyrosine (3 mM) par 100µl/ml d'extrait brut du champignon de Paris à pH 7 en présence de tampon phosphate (A) et l'éthanol (B)	35
Figure 26	Représentation graphique de l'activité enzymatique de la tyrosinase du champignon de paris en présence et en absence des différents extraits éthanolique d' <i>Ophrys tenthredinifera</i>	37
Figure 27	Représentation des IC ₅₀ de l'activité inhibitrice de la tyrosinase par les deux tubercules (morte et vivante) de la plante étudiée	39

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
I	Différences et similitudes entre les deux taxa de l' <i>O. tenthredinifera</i>	3
II	Les différentes espèces réactives de l'oxygène	6
III	Les différents types des antioxydants	9
IV	Rendements des extraits bruts éthanoliques	26
V	Teneur en phénols totaux, flavonoïdes, tanins de différentes parties étudiées de la plante <i>Ophrys tenthredinifera</i> .	27
VI	Effet des extraits éthanoliques de la plante sur l'activité tyrosinase du champignon de Paris	36

Introduction

*Le monde est un livre
dont chaque pas nous ouvre une page
Alphonse De Lamarine*

Au cours de ces décennies, l'Homme a pris conscience de l'importance des plantes pour la santé et le plaisir ainsi que pour la sauvegarde du patrimoine floristique propre à chaque région. En effet, les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité, pour soulager et guérir les maladies humaines. Il est admis que leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs appelés : les métabolites secondaires (Maurice, 1997) En revanche, la reconnaissance des propriétés antioxydantes de ces composés, leur abondance dans l'alimentation et leur rôle probable dans la prévention des maladies associées à un stress oxydatif sont les principales raisons de cet engouement (Achat, 2013).

D'autre part, de grands progrès ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes cellulaires et biochimiques de la biologie des pigments et des processus sous-jacents à la pigmentation de la peau. Les Troubles congénitaux de la formation de la mélanine dans des tissus impliqués provoquent une hypopigmentation, appelée albinisme (Tomita et Miyamura, 1998), tandis que la surproduction et l'accumulation subséquente de la mélanine est à l'origine d'une hyperpigmentation (Kim *et al.*, 2015). Parmi les facteurs influençant ou intervenant directement dans ces phénomènes citant, le stress oxydatif et la dérégulation des enzymes clés de la synthèse des mélanines dans les mélanocytes (Neyra *et al.*, 2003).

Ces anomalies sont considérées comme étant esthétiquement défavorables et ont conduit au développement de modalités de traitement cosmétique et thérapeutique d'efficacité variable. Par conséquent, plusieurs agents putatifs visant à moduler la pigmentation de la peau sont en cours de recherche (Ebanks *et al.*, 2009).

Les plantes étant exemptes d'effets secondaires, représentent une nouvelle source de composés actifs. Cependant, l'évaluation de leurs propriétés phytopharmaceutiques demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquente ou non connue dans la médecine traditionnelle (Teixeira de Silva, 2004).

La flore algérienne est riche par beaucoup d'espèces endémiques citant l'espèce faisant l'objet de notre étude, *Ophrys tenthredinifera*, une orchidée vivace. Peu de travaux scientifiques ont été réalisés pour déterminer la composition chimique et les propriétés pharmacologiques de cette espèce.

Le présent travail a pour objectif d'extraire les polyphénols, avec la détermination de leur concentration, comme il vise à tester les activités biologiques des différents extraits organiques notamment l'activité antioxydante et l'activité tyrosinasiq.

*Revue
bibliographique*

I.1. Les orchidacées (orchidées)

L'orchidaceae est une vaste famille, avec une étonnante 20 000 à 30 000 orchidée, en particulier avec 600 à 800 genres et 25 000 à 35 000 espèces (Arditti, 1980).

C'est une très grande famille de plantes monocotylédones qui regroupent les *orchis*, les *vanilliers* et les *ophrys* (Deysson, 1979).

Le genre *ophrys* signifie « sourcil », le nom du genre fait allusion à la forme arquée des divisions du périanthe (Delforge, 2001).

I.1.1. Présentation de l'espèce *Ophrys tenthredinifera*

I.1.1.1. Description botanique

Ophrys tenthredinifera est une plante vivace de 12 à 40 cm de haut, d'aspect robuste, à l'inflorescence plutôt lâche (**Fig.1**), dont:

- ✓ **Les feuilles :** de 5 à 8 basiliaires et caulinaires qui sont vertes, ovales à lancéolées ;
- ✓ **Les fleurs:** grande à teintes vives, au nombre de 3 à 8, périanthe étalé à grands sépales plus ou moins ovales (de blanc-verdâtre à pourpre) et à pétales très courts ;
- ✓ **Le labelle :** est en forme de guêpe, brun pourpre et velouté. . Grand labelle brunâtre à rougeâtre et à macule variable (parfois absente) vers le centre. Très velu et plus ou moins clair vers les bords, à faible gibbosité et avec appendice dressé.
- ✓ **Floraison :** de mars à Mai. (Quezel et Santa, 1962, Delforge, 2001).



Figure 1 : Illustration photographique de l'espèce *Ophrys tenthredinifera*(Original)

Cette espèce se présente en deux taxa, précoce et tardif (**Tab.I**) (De Belair et *al.*, 2005).

Tableau I : Différences et similitudes entre les deux taxa de l'*O. tenthredinifera*.

Le taxon précoce	Le taxon tardif
présente souvent des plantes grêle et pauciflore (1-5 fleurs en général) avec un labelle plus petit (10-14 mm de long) assez anguleux et fleurs à coloration terne. L'appendice est de taille modeste et de consistance peu épaissie. Les pétales sont larges (environ 3mm).il fleuri généralement de début février au début d'avril.	présente plutôt des plantes robustes (jusqu'à 45cm) et multiflores (4-10 fleurs, parfois plus) avec un labelle plus gros (12-16 mm de long, jusqu'à 18 mm de large) d'aspect arrondi et fleurs à coloration souvent très vive .L'appendice est imposant et de consistance épaisse. Les pétales paraissent plus larges (au moins 4 mm) il fleurit généralement de début d'avril à la fin de mai.

Par ailleurs, en Algérie, ils existent plusieurs autres espèces représentatives du genre *Ophrys* (Annexe 1).

I.1.1.2. Position systématique

Embranchement :	<i>Plantae</i>
Sous embranchement	<i>Tracheobionta</i>
Classe	<i>Liliopsida</i>
Sous classe	<i>Liliidae</i>
Ordre	<i>Asparagales</i>
Famille	<i>Orchidaceae</i>
Genre	<i>Ophrys</i>
Espèce	<i>Ophrys tenthredinifera</i> (Quezel et Santa, 1962).

Noms vernaculaires : Haïa, couret anahl en arabe local (Quezel et Santa, 1962).

I.1.2. Répartition géographique

C'est une espèce circumméditerranéenne, elle est commune dans le Tell Algérien. Elle pousse dans les broussailles, les pâturages et les forêts à 1800 mètres environ (Quezel et Santa, 1962).

I.1.3. Composition chimique d'*Ophrys tenthredinifera*

Peu d'études ont été réalisées sur la phytochimie de cette espèce, en 1979 ; Williams a montré que les feuilles d'*O.tenthredinifera* sont riches en flavonols notamment la quercétine et le kaempferol (Fig.2 a et b). Ainsi que autres composés tels que la lutéoline et les flavonesC- glycoside caractérisent d'autres espèces de la famille des orchidées.

D'autres recherches ont montré que les tubercules de diverses espèces indigènes et exotiques des genres *Ophrys* et *Orchis* sont riches en mucilage et en amidon (Ait Youcef, 2006).

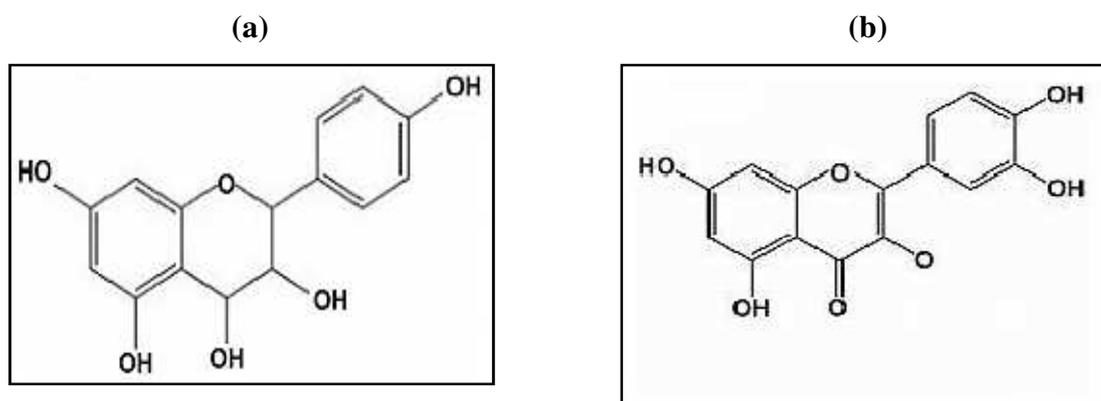


Figure 2 : (a)Quercitrine. (b) Kaempferol (Jain et Patil, 2010).

I.1.4. Propriétés thérapeutiques

Les tubercules de diverses espèces du genre *Ophrys* sont employés au Maroc comme ceux d'espèce du genre *Orchis* :

- ✓ **Pour les pratiques magiques** : les tubercules de l'année, dits vivants (soit *hayy* : d'où le nom vernaculaire « *l-hayya* » (la vivante), sont censés lever les sortilèges qui visent à rendre un homme impuissant ; les tubercules flétris de l'année précédente, dits morts (*miyyet* : d'où le nom vernaculaire « *wa l-mayta* » (la morte) sont censés provoquer l'impuissance masculine (Ait Youcef, 2006).
- ✓ **La poudre des tubercules** séchés et broyés d'*O.tenthredinifera* est utilisée pour la fabrication du « *Salep* » qui est une boisson nutritive. Cette poudre peut être ajoutée au pain et aux céréales, elle est apaisante sous forme de gelée et utilisée pour le traitement des irritations du canal gastro-intestinal. Ses racines sont consommées cuites (Ait Youcef , 2006).

I.2. Le stress oxydatif et activité antioxydante

I.2.1. Les radicaux libres

I.2.1.1. Définition et origine

Un radical libre est une espèce chimique, neutre ou chargée, qui a la particularité de porter un électron célibataire (non apparié) sur sa couche externe (Goudable et *al.*, 1997). Ce qui le rend généralement instable et capable de réagir plus ou moins rapidement avec d'autres molécules chimiques environnantes (un fort pouvoir oxydant) et une demi-vie très courte (de la nano à la milliseconde) (Carrière et *al.*, 2006).

La mitochondrie représente le site majeur de production cellulaire des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Milane, 2004). Elles sont aussi produites dans différentes réactions enzymatiques par le nicotinamide adénine di nucléotide phosphate (NADPH), les oxydases et d'autres enzymes d'oxydation localisées dans les phagocytes, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales (Halliwell et Cross 1994).

Les espèces réactives de l'oxygène ainsi que les espèces réactives de l'azote sont bien reconnues pour jouer un double rôle, espèces nuisibles et bénéfiques (Valko et *al.*, 2006). Ces dernières sont utilisées par les cellules phagocytaires de l'organisme (les macrophages) pour combattre les agents infectieux tels que les bactéries et les virus. Toutefois, les bienfaits de ces composés hautement toxiques ne restent pas sans conséquences principalement pour les structures biologiques des cellules (protéines, lipides, ADN) (Bossokpi, 2002).

I.2.1.2. Les principaux types de radicaux libres

Les différentes espèces réactives de l'oxygène sont énumérées dans le tableau suivant :

Tableau II : Les différentes espèces réactives de l'oxygène.

Nom	Fonctions	Réaction chimique	Références
Anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$	Produit à partir de l'oxygène moléculaire, principalement par les cellules phagocytaires, participe à l'inactivation des virus et bactéries. Faible action oxydative, mais peut générer des radicaux plus réactionnels.	$O_2 + 1e^- \rightarrow O_2^{\cdot -}$	(Favier, 1997).
Radical hydroxyle $\cdot OH$	Il est surtout formé par la réaction de Fenton à partir d' H_2O_2 . Il très oxydant. Il peut initier une peroxydation lipidique qui pourra continuer en chaîne. C'est le radical le plus dangereux pour l'organisme.	Reaction d'haber –Wiss : $H_2O_2 + O_2^{\cdot -} \rightarrow O_2 + OH + OH^{\cdot -}$ $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH + OH^{\cdot -}$	(Goudable et al., 1997)
Oxygène singulet 1O_2	Forme excitée de l'oxygène moléculaire. Molécule non radicalaire, extrêmement réactive a une durée de vie très limité.	$O^{\cdot +} + O^{\cdot -} \rightarrow O_2$	(Salvayre, 2005)
Peroxyde d'hydrogène H_2O_2	Précurseur de $\cdot OH$ et de $HOCl$ Soluble dans l'eau, il pénètre facilement dans la cellule. Dangereux même à faible concentration	$O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$	(Gardès-Albert et al., 2003)
Monoxyde d'azote (l'oxyde nitrique) NO^{\cdot}	Peu réactif mais peut se combiner avec $O_2^{\cdot -}$ pour former du $ONOO^-$, ou avec H_2O_2 pour former NO_2^{\cdot} ou NO_3^{\cdot} . Joue également le rôle de médiateur biologique au cours de la vasodilatation.	$NO^{\cdot} + RSH \rightarrow RS-NO + H^+$	(Vuillemin et al., 1999).
L'anion peroxonitrique $ONOO^-$	Non radicalaire, instable et très oxydant, il peut générer le radical dioxyde de l'azote.	$O_2^{\cdot} + NO^{\cdot} \rightarrow ONOO^-$	(Lee et al., 2004)

I.2.1.3. Les cibles biologiques des radicaux libres

Formés en trop grande quantité, les radicaux libres deviennent «pathologiques». En outre, leur nature instable les rend très réactifs vis-à-vis de substrats biologiques et capables d'induire des modifications oxydatives délétères (Haleng et al., 2007). Tous les tissus et tous

leurs composants peuvent être touchés : lipides, protéines, glucides et ADN (Valko et *al.*, 2006).

Des modifications oxydatives des protéines provoquent l'introduction d'un groupement carbonyle dans la protéine (Levine, 2002), la plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (non reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique) (Haleng et *al.*, 2007).

L'ADN également est une cible privilégiée pour les ERO (Favier, 2003). Entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique, impliquées ainsi dans le déclenchement du cancer et le vieillissement (Haleng et *al.*, 2007).

La peroxydation lipidique provoque une augmentation croissante de la perméabilité des membranes cellulaires, en modifiant sa fluidité (Gutteridge et Halliwell, 2000), induisant une altération irréversible des protéines fonctionnelles de la cellule, pouvant aller jusqu'à la lyse complète (Judde, 2004). Cette attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires (Favier, 2003).

I.2.2. Le stress oxydatif

Le stress oxydant est le résultat d'une situation où l'organisme ne contrôle plus la présence excessive de radicaux libres. Cette situation peut se produire quand le système de défense des antioxydants est surmené par l'augmentation des oxydants ou lorsque les défenses sont affaiblies suite à une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants (Kirschvink et *al.*, 2008).

Ce déséquilibre peut avoir diverses origines : déficit nutritionnel en antioxydant, surproduction endogène d'origine inflammatoire, exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (Favier, 1997).

I.2.3. Les antioxydants

I.2.3.1. Définition

Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables, et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Pincemail et *al.*, 2002).

I.2.3.2. Rôle des antioxydants

L'avènement de la biologie moléculaire a montré que les antioxydants sont des molécules qui possèdent des propriétés allant bien au-delà de leur capacité à piéger les ERO (Pincemail et *al.*, 2002).

Les antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires (**Fig. 3**) (Haleng et *al.*, 2007).

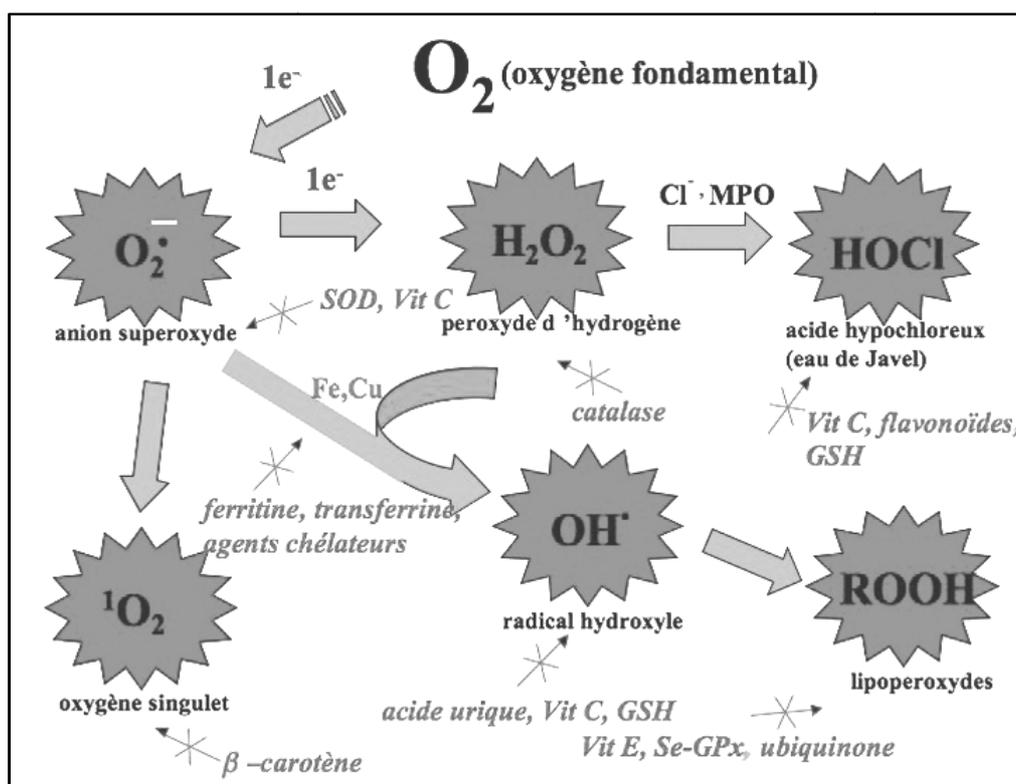


Figure 3 : Aperçu des différentes espèces oxygénées activées (EOA) et des antioxydants régulateurs de leur production (Haleng et *al.*, 2007).

I.2.3.3. Type des antioxydants

Pour maintenir l'équilibre antioxydant pro-oxydant, le corps humain est protégé contre le stress oxydatif par un système d'antioxydant complexe (**Fig.3**). Le système de défense antioxydant consiste en un réseau enzymatique et non enzymatique aussi bien endogène qu'exogène, agissant synergiquement (**Tab.III**) (Masella et *al.*, 2005).

Tableau III : Les différents types des antioxydants.

Type d'antioxydants	Antioxydant	Caractéristiques
Endogène (enzymatique)	SOD (superoxydedis mutase)	Constitue la première ligne de défense, elle catalyse la dismutation du superoxyde : $2O_2^{\bullet} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ (Zelko et <i>al.</i> , 2002).
	CAT (catalase)	Les catalases permettent de soustraire l' H_2O_2 à la réaction d'Haber-Weiss et d'éviter ainsi la genèse du radical hydroxyle.catalyse la dismutation de H_2O_2 en oxygène et en eau $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ (Scholz et <i>al.</i> , 1997).
	GPx (Gluthathion peroxydase)	Elle catalyse la réduction des hydroperoxydes (H_2O_2), et des peroxydes lipidiques en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène. $2 GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2 H_2O$ $2GSH + ROOH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$ (Valko et <i>al.</i> , 2006).
Exogène (non enzymatique)	La vitamine E (α -tocophérol)	Composé liposoluble.Elle a pour principal effet de réagir avec les radicaux peroxydes, arrêtant ainsi la chaîne d'oxydation lipidique $VitE + RO_2^{\bullet} \rightarrow Vit E^{\bullet} + RO_2H$ (Herrera et Barbas,2001).
	La vitamine C (acide ascorbique)	agit comme un piègeur de radical libre,souvent couplé au tocophérol (agit en régénérant la vitamine E)(Goudable et <i>al.</i> , 1997).
	Les caroténoïdes (B-carotène)	précurseurs de la vitamine A, ils réagissent avec l'oxygène singulet 1O_2 et sont d'excellents piègeurs de radicaux peroxydes RO_2^{\bullet} et alkyles R^{\bullet} issus de l'oxydation des lipides (Kinsky et <i>al.</i> , 1989).
	Composés phénoliques	Ces substances sont très utilisées dans la médecine traditionnelle et moderne pour leurs activités antioxydantes (Kolesnikov et Gins, 2001).Vue leurs propriétés redox les plus élevées, les polyphénols agissent comme des agents réducteurs, donneur d'hydrogène en piégeant les radicaux libres et en chélatant les ions (Valko et <i>al.</i> , 2006).
Synthétiques	Exemple : BHA, BHT, PG	Dérivés phénoliques qui agissent comme la vitamine E. Ils sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels (Salvayre, 2005).

I.3. La tyrosinase

I.3.1. Généralités

La couleur de la peau est le résultat de la distribution homogène d'un pigment, la mélanine, synthétisé et acheminé par des cellules spécialisées de l'épiderme ; les mélanocytes (Audition et *al.*, 1987).

La pigmentation, ou mélanogénèse, résulte des interactions de plusieurs gènes et de leurs produits, et conduit à la production des mélanines. La régulation de ce processus s'effectue à différents niveaux ; cependant, l'enzyme tyrosinase est principalement responsable du contrôle de la biosynthèse des mélanines (Bouchard, 1993).

Bien que de nombreux facteurs déterminent le type, la quantité et la qualité de cette dernière, l'activité tyrosinase est le facteur critique qui règle en définitive la mélanogénèse (Audition et *al.*, 1987).

La tyrosinase est une métalloprotéine à centre binucléaire de cuivre (Seo et *al.*, 2003). Elle se réfère à son substrat principal la tyrosine, Elle a été découverte pour la première fois en 1856 par Schoenbein dans le champignon *Boletus luciferus*. Il a noté que l'extrait de ce champignon catalyse l'oxydation en aérobie de certains composés en formant un pigment brun dans les plantes (Whitaker, 1995).

La tyrosinase a été extraite pour la première fois simultanément par Kubowitz (1938) à partir des pommes de terre et par Keilin et Mann (1938) à partir d'*Agaricus bisporus* (Kiabuned et *al.*, 1998). C'était la première enzyme purifiée par chromatographie d'affinité (Lerch, 1982).

Chez les mammifères, la tyrosinase est localisée principalement dans les mélanocytes de la rétine et de la peau sous une forme transmembranaire, responsable dans la production et la sécrétion de granules de pigments (Claus et Decker, 2006). Chez les plantes saines, la tyrosinase est majoritairement présente dans les plastides, alors qu'elle est libérée dans le cytoplasme des fruits murs ou endommagés (Whitaker et Lee, 1995).

I.3.2. Classification et Nomenclature

La tyrosinase (EC 1.14.18.1) ou la crésolase, la catécholase, la diphénolase, la phénolase, la phénol oxydase, l'o-diphénol oxydase et l'acide chlorogénique oxydase (Whitaker, 1995), est une monophenol oxygénase oxydoréductase appartenant à la famille des polyphénols oxydase (PPO) (Zawistowski et *al.*, 1991; Papa et *al.*, 1994).

La commission sur les enzymes de l'Union Internationale de la Biochimie (IUB) a placé la PPO dans deux catégories principales comme (EC 1. 14. 18. 1) monophénol monooxygénase, également connue sous le nom de tyrosinase et (EC 1. 10. 3. 2) o-diphénol: O₂ oxydoréductase. Cette classification différencie seulement les deux activités crésolase et catécholase, de la même enzyme (Mayer, 1987 ; Zawistowski et *al.*, 1991).

I.3.3. Structure de la tyrosinase

La tyrosinase du champignon de paris : *Agaricus bisporus*, est la première structure décrite pour une tyrosinase d'origine fongique (Ismaya et *al.*, 2011). C'est une protéine oligomérique, constituée de 569 acides aminés, de forme globulaire. La structure primaire de la sous unité principale des tyrosinases, dite catalytique, présente un PM de 30 et 50kDa quel que soit leurs sources. La structure secondaire de la PPO est principalement α - hélicoïdale. Le cœur de l'enzyme est constitué de quatre paquets spiraux composés d'hélices α Le paquet hélicoïdal est adapté au centre catalytique binucléaire de cuivre et qui est entouré par les hélices, α et de plusieurs coudes β . Dans la PPO d'*Agaricus bisporus*, l'isoleucine est le N-terminal, tandis que la valine est le C-terminal (Van Gelder et *al.*, 1997; Fan et Flurkey, 2004).

La paire de cuivre (CuA et CuB), est le site de l'interaction de la PPO avec l'oxygène moléculaire et ses substrats phénoliques (**Fig.4**) (Van Gelder et *al.*, 1997).

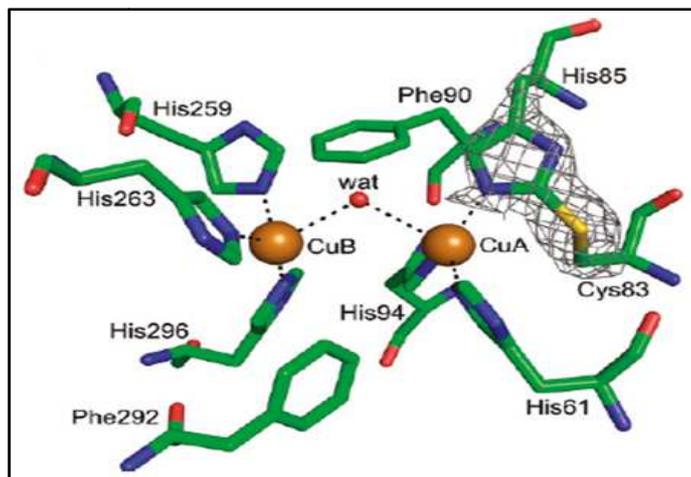


Figure 4: La géométrie du site actif de la protéine à cuivre de type III de la tyrosinase (Van Gelder et *al.*, 1997).

Chez les mammifères, la molécule de la tyrosinase est constituée de plusieurs domaines distincts, dont trois régions riches en cystéines, et une région transmembranaire hydrophobe par laquelle la protéine s'intègre dans la membrane des mélanosomes (**Fig. 5**).

Lors de son passage dans l'appareil de Golgi, la tyrosinase est glycosylée avant d'être déversée dans les mélanosomes, qui constituent son lieu d'action, par le biais de vésicules cytoplasmiques (Bouchard, 1993).

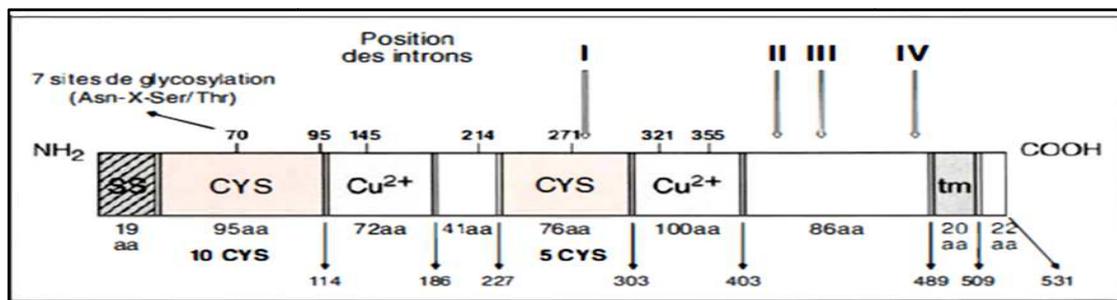


Figure 5 : Structure de la tyrosinase chez les mammifères, code pour un polypeptide de 531 acides aminés, dont le poids moléculaire serait de 60 kDa. tm : domaine transmembranaire, SS : séquence signal (Bouchard, 1993).

I.3.4. Rôle de la tyrosinase

La tyrosinase est impliquée dans divers processus tels que la pigmentation des vertébrés et mammifères, ainsi que le brunissement des fruits et des légumes (Whitaker, 1995).

Dans les plantes, elle joue un rôle de résistance contre les infections microbiennes, virales et aussi contre les mauvaises conditions climatiques (Martinez et Whitaker, 1995).

L'activité PPO joue aussi un rôle important dans la qualité des produits alimentaires (Mayer et Harel, 1991). Elle est essentielle pour la coloration bénéfique de nos nourritures, telles que les prunes, les raisins noirs et le thé (Whitaker et Lee, 1995).

Chez les mammifères, la tyrosinase est l'enzyme limitante dans l'initiation à la mélanogenèse, utilisant l'oxygène moléculaire et la tyrosine comme substrat, elle catalyse trois réactions dans la voie de biosynthèse des mélanines (Bouchard, 1993), qui en plus de son rôle de pigmentation, la mélanine joue un rôle important dans la protection de la peau par l'absorption des rayonnements UV qui causent des dommages de l'ADN et la formation des espèces oxygénées réactives, qui accentuent le processus du vieillissement et les risques de cancer de la peau (Bouchard, 1993).

La tyrosinase sécrétée par les bactéries du sol est probablement impliquée dans la formation de l'humus via un couplage aléatoire de différents composés aromatiques. Ce qui ouvre un nouveau potentiel d'application dans la détoxification de xénobiotiques à structures phénoliques (Marino et al., 2011).

I.3.5. Mécanisme réactionnel

En présence de l'oxygène moléculaire, la tyrosinase présente deux activités différentes. Capable d'hydroxyler les monophénols en o-diphénols, connue sous le nom d'activité crésolasique ou monophénolasique. Ces o-diphénols, sont à leur tour oxydés pour donner des o-quinones, connue sous l'appellation d'activité catécholasique ou o-diphénoxydasique. Ces derniers se polymérisent pour former des pigments brun, rouge ou noir appelé mélanine (Varoquaux, 1978; Arsian et Dogan, 2005; Kolcuoglu et al., 2006).

Les o-quinones formés sont impliqués dans des réactions qui conduisent à la formation des eumélanines de type noir (responsables de la pigmentation noire de la peau) et des phaeomélanines de type jaune ou rouge (responsables de la couleur des cheveux et des yeux) (Okombi, 2005).

En présence de cystéine, un acide aminé riche en soufre, la DOPAquinone est transformée en Cystéinyl-DOPA, intermédiaire dans la synthèse de phaeomélanine. En absence de cystéine, de l'indole 5-6quinone est formé et c'est l'eumélanine qui sera synthétisée (Fig.6) (Cichorek et al., 2013).

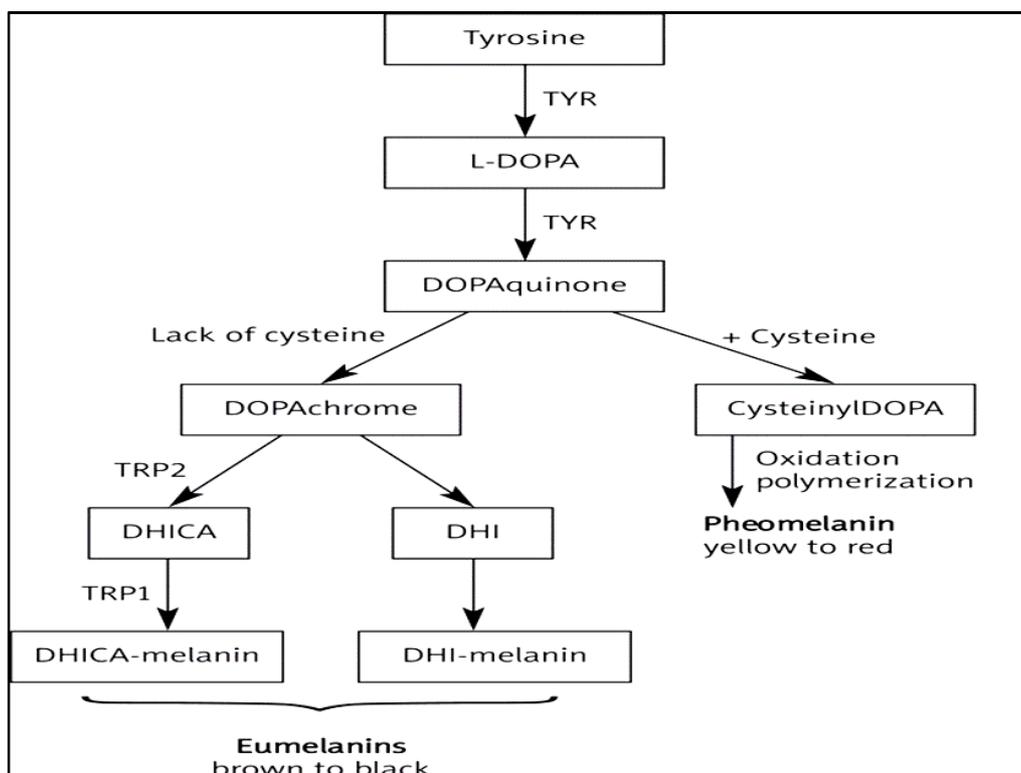


Figure 6 : Mécanisme de synthèse de la mélanine dans les mélanocytes durant la mélanogénèse (Cichorek et al., 2013).

I.3.6. Les effecteurs de la tyrosinase

Le contrôle de l'activité de la PPO est important pour la prévention de la synthèse de la mélanine, du brunissement des champignons et d'autres végétaux et fruits (Jolivet et *al.*, 1998; Qiu et *al.*, 2009).

I.3.6.1. Les activateurs

La PPO peut être activée par choc acide ou basique, par l'urée, les acides gras, les alcools, les protéases et par les détergents anioniques, tel que le sodium dodécyl sulfate (SDS) (Seo et *al.*, 2003 ; Pérez-Gilabert et *al.*, 2004 ; Gandía-Herrero et *al.*, 2005). De même, l'addition des ions du Cu^{2+} dans le milieu augmente l'activité enzymatique de la PPO (Vámos-Vigyázó, 1981; Fan et Flurkey, 2004; Van Leeuwen et Wichers, 1999).

I.3.6.2. Les inhibiteurs

Une large gamme de composés est connue pour inhiber la tyrosinase :

- ✓ **Les agents de chélation généraux pour le cuivre** : petites molécule ou ions qui se lient au centre de cuivre dans le site actif compétitif en ce qui concerne l'oxygène) (Robb, 1984; Bruneton, 1994).
- ✓ **Les inhibiteurs non-compétitifs** en ce qui concerne le substrat phénolique.
- ✓ **Les analogues des phénols** compétitifs vers des substrats (phénol et/ou diphénol) (Robb, 1984; Bruneton, 1994).

Exemples d'inhibiteurs de la tyrosinase :

Les molécules capables d'inhiber la tyrosinase sont de nature chimique très diverse. Ces molécules peuvent être d'origine synthétique ou naturelle :

Le cyanure, le monoxyde de carbone, le diéthylthiocarbamate de sodium (DIECA), l'éthylène diamine tétra-acétique acide (EDTA), le 2-mercaptobenzothiazole, le méthyle xanthate de potassium, l'acide kojique, L-mimosine et le tropolone (Mayer et Harel, 1979 ;Vámos-Vigyázó, 1981; Jolivet et *al.*, 1998;).L'acide ascorbique peut également agir directement sur la PPO par chélation avec son groupement prosthétique et réduit ainsi le Cu_2^+ en Cu^+ (Zawistowski et *al.*, 1991).Les analogues de substrat comme les acides aromatiques, tel que l'acide benzoïque et l'acide cinnamique (Gasowska et *al.*, 2002).

Les plantes sont considérées actuellement comme une source potentielle d'inhibiteurs de la PPO (Baurin et *al.*, 2002). Deux grand groupes ont été identifiés : les polyphénols et les

aldéhydes et d'autres dérivés (Rescigno et *al.*, 2002 ; Chang, 2009). Parmi les composés isolés et considérés comme des inhibiteurs puissants de la PPO, citant le cuminaldéhyde, l'oxyrésveratrol, le kaempferol, la quercetine, la morine, la lutéoline, l'ansaldéhyde, la kurarinone et l'acide gallique (Parvez et *al.*, 2007).

*Matériel et
méthodes*

Cette étude a été effectuée sur les différentes parties d'*Ophrys tenthredinifera*. Celle-ci s'est portée sur l'extraction des polyphénols suivi du test d'évaluation des activités antioxydantes et tyrosinase.

II.1. Récolte et préparation du matériel végétal

La cueillette a été réalisée en mois de mars 2017 durant la période de la floraison, au niveau de la région d'Amizour (Taddert Tamokrant), la wilaya de Bejaia (Fig. 6). La récolte a été effectuée en pleine matinée, période où la plante est à son maximum de concentration en principes actifs (l'identification de l'échantillon a été confirmée par Mr Bachir Seddik (botaniste de la FSNV de l'université de Bejaia).

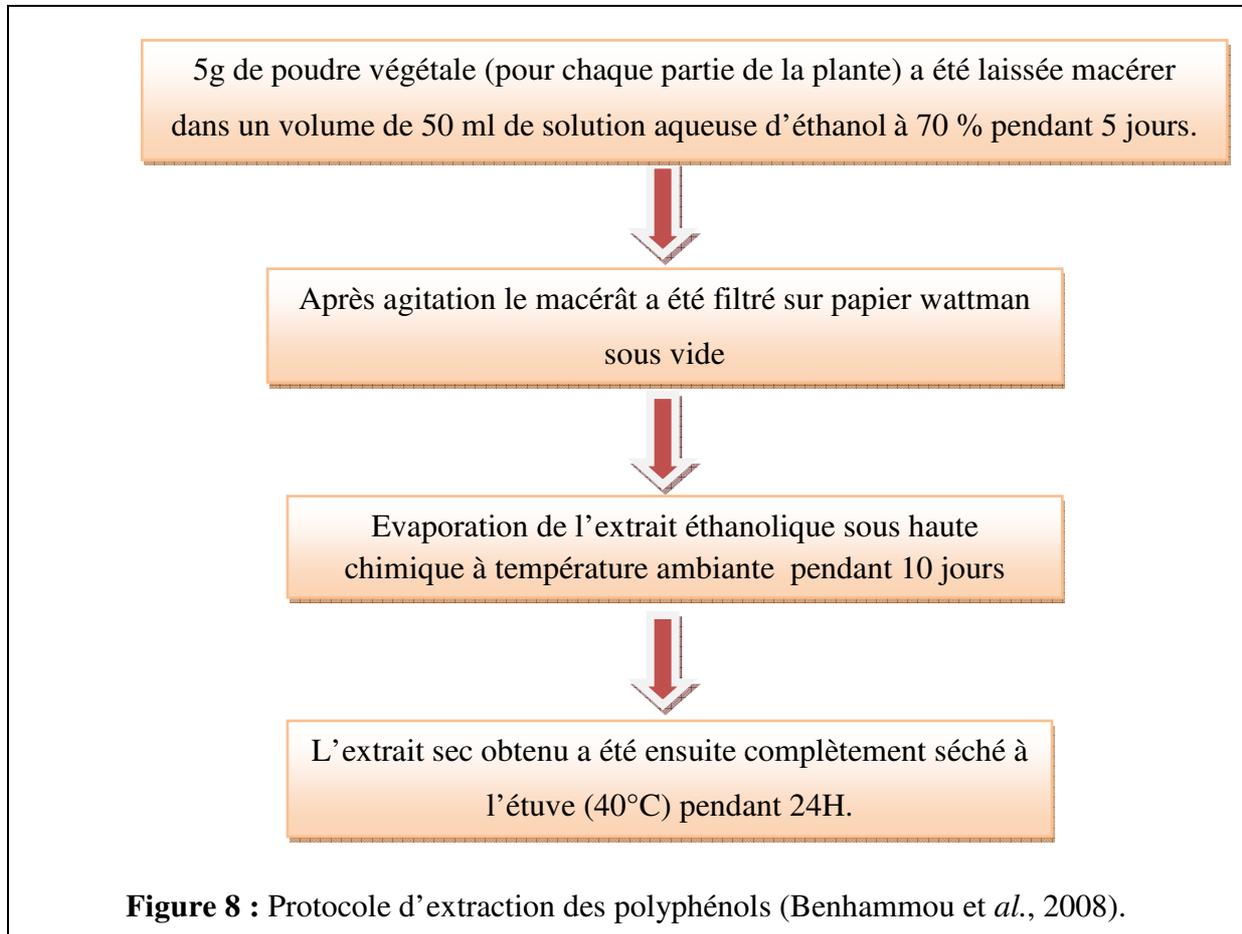


Figure 07 : Localisation géographique de la station de la récolte d'*Ophrys tenthredinifera* (www.google map.com).

La plante récoltée a été nettoyée de tous les contaminants à l'eau courante, puis séchée à l'étuve à 37°C pendant une semaine jusqu'à la stabilité de leurs poids. La matière sèche obtenue a été ensuite réduite en poudre à l'aide d'un broyeur électrique et tamisée jusqu'à l'obtention d'une poudre fine d'un diamètre $\leq 125 \mu\text{m}$. Les poudres obtenues ont été conservées dans des bocaux en verre à l'abri de la lumière.

II.2. Procédure d'extraction des composés phénoliques

L'extraction des polyphénols de différentes parties de la plante étudiée a été réalisée par une extraction solide/liquide suivant le protocole décrit par Benhammou et *al.*, (2008) (Fig.8).



Le rendement d'extraction est calculé selon la formule suivante :

$$RE (\%) = [(P_1 - P_0) / P] \times 100$$

P_1 : poids du bécher après évaporation du solvant

P_0 : Poids du bécher vide (g);

p : poids initial de poudre végétale exprimé en gramme.

RE : rendement d'extraction exprimé en (%).

II.3. Dosage des phénols totaux

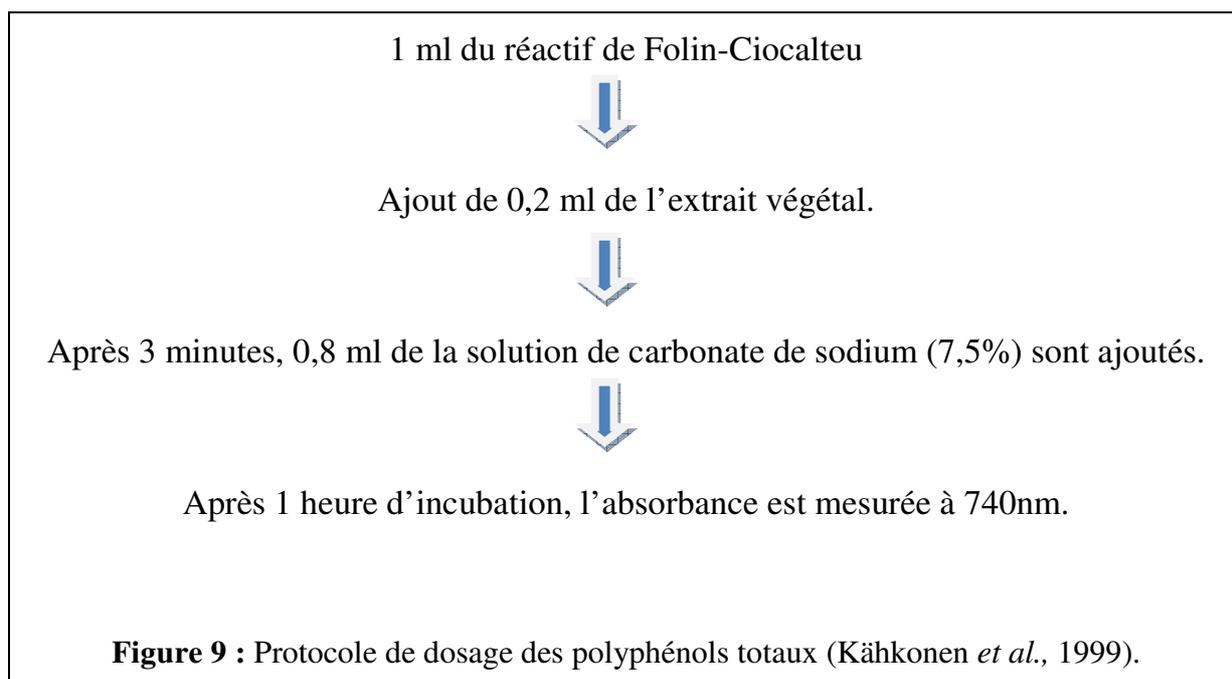
II.3.1. Dosage des polyphénols

A. Principe

Le réactif de Folin- Ciocalteu est un réactif de couleur jaune, constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent ce réactif en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés (Boizot et charpentier, 2006).

B. Mode opératoire

Le dosage des polyphénols a été réalisé selon le protocole décrit par Kähkönen *et al.*, (1999).



C. Expression des résultats

Les teneurs en phénols totaux dans les extraits éthanoliques de différentes parties de la plante sont exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAG/ g MS).

Une courbe d'étalonnage à différentes concentrations d'acide gallique a été préparée (Annexe 4).

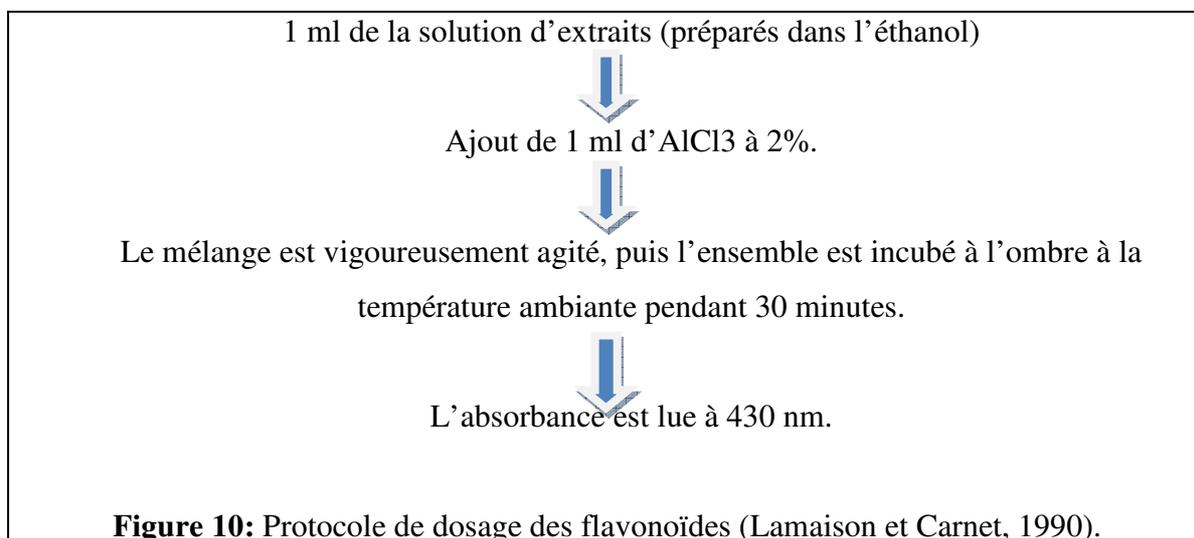
II.3.2. Dosage des flavonoïdes

A. Principe

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (Ribéreau-Gayon et *al.*, 1972)..

B. Mode opératoire

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon le protocole décrit par Lamaison et Carnet, (1990).



C. Expression des résultats

La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de poids sec de la plante (mg EqQ/g MS).

La quantification des flavonoïdes se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un flavonoïde standard, la Quercétine (Annexe 4).

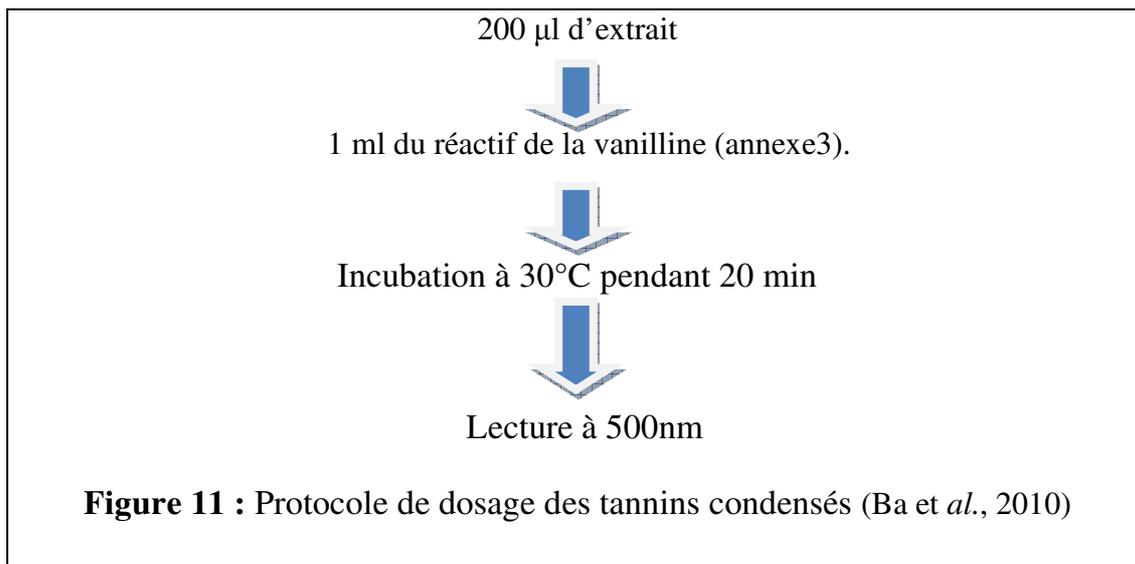
II.3.3. Dosage des tanins condensés

A. Principe

Le dosage des tannins condensés est basé sur la condensation des composés polyphénoliques (flavanes -3-ols) avec la vanilline en milieu acide (Price *et al.*, 1978).

B. Mode opératoire

Le dosage des tannins a été réalisé selon le protocole décrit par Ba *et al.*, (2010)



NB : Un Blanc a été préparé en mélangeant le méthanol (37 %) et de HCl (8%) à volume égal.

C. Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine/g de matière végétale sèche en se référant à la courbe d'étalonnage du catéchine (Annexe 4).

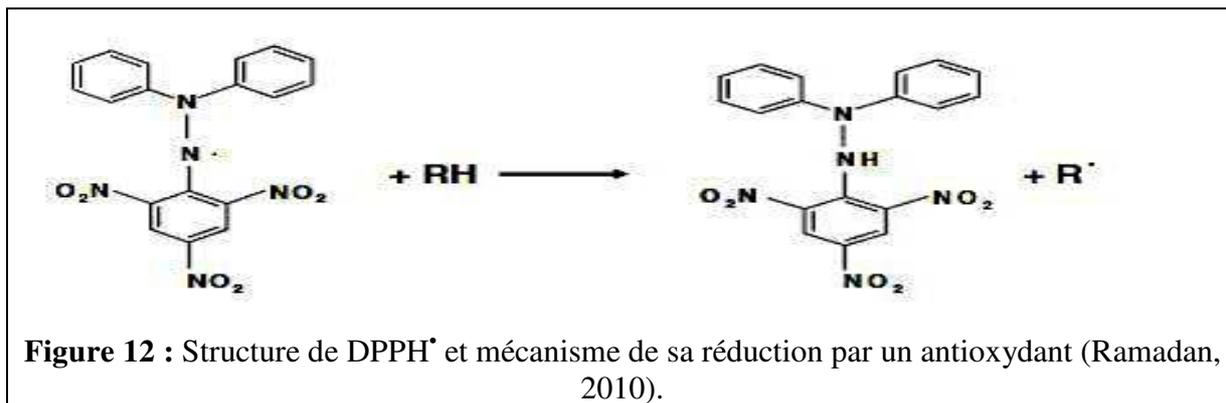
II.4. Tests des activités biologiques

II.4.1. Test de l'activité antioxydante

II.4.1.1. Test du DPPH^{*}

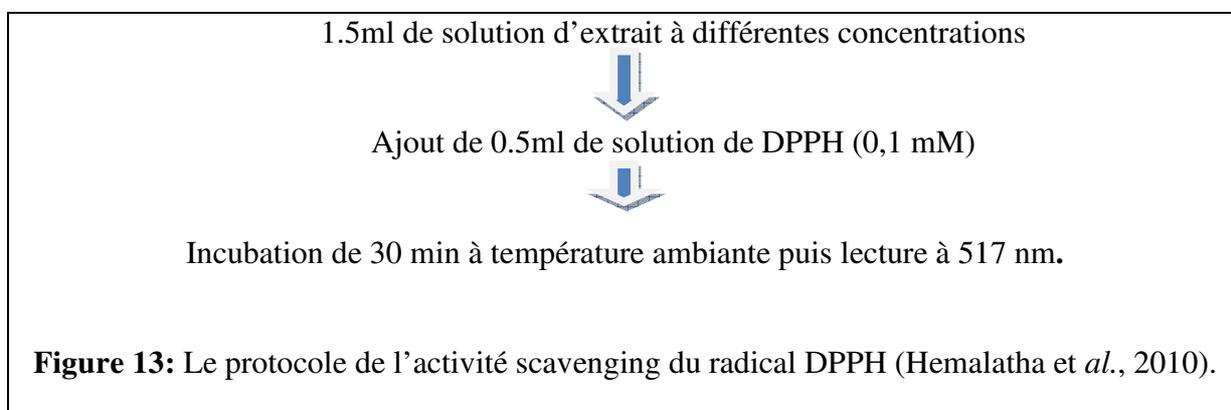
A. Principe

Le DPPH^{*} (2,2 diphenyl-1-picryl hydrazyl) est un radical stable qui possède un électron célibataire sur l'atome d'azote, caractérisé par une couleur violette et un pic d'absorption spectral maximal à 517nm. En présence d'antioxydant l'électron célibataire devient apparié, ce qui conduit à la décoloration de DPPH^{*} du violet (forme radicalaire DPPH^{*}) au jaune (forme réduite DPPH-H) (**Fig. 12**) (Ramadan, 2010). Cette décoloration représente donc la capacité d'échantillon de piéger ce radical.



B. Protocole

Le protocole de l'activité scavenging du radical DPPH suivis est celui de Hemalatha et *al.*, (2010)



NB : Un blanc pour chaque extrait a été préparé en mélangeant 0.5 ml du méthanol avec 1.5 ml de solution d'extrait et le contrôle a été préparé en remplaçant l'extrait par du méthanol.

C. Expression des résultats

L'évaluation de l'activité antioxydante en utilisant la méthode DPPH est exprimée en pourcentage selon la relation suivante :

$$\text{Taux d'activité anti-radical DPPH (\%)} = \frac{A_{517C} - (A_{517T} - A_{517B})}{A_{517C}} \times 100.$$

DO_{517C}: absorbance à 517nm du contrôle (solution ne contenant que du DPPH)

DO_{517B}: absorbance à 517nm de l'extrait (solution ne contenant que l'extrait végétale)

DO_{517T}: absorbance à 517nm de l'essai (mélange de solution de DPPH et extrait de plante).

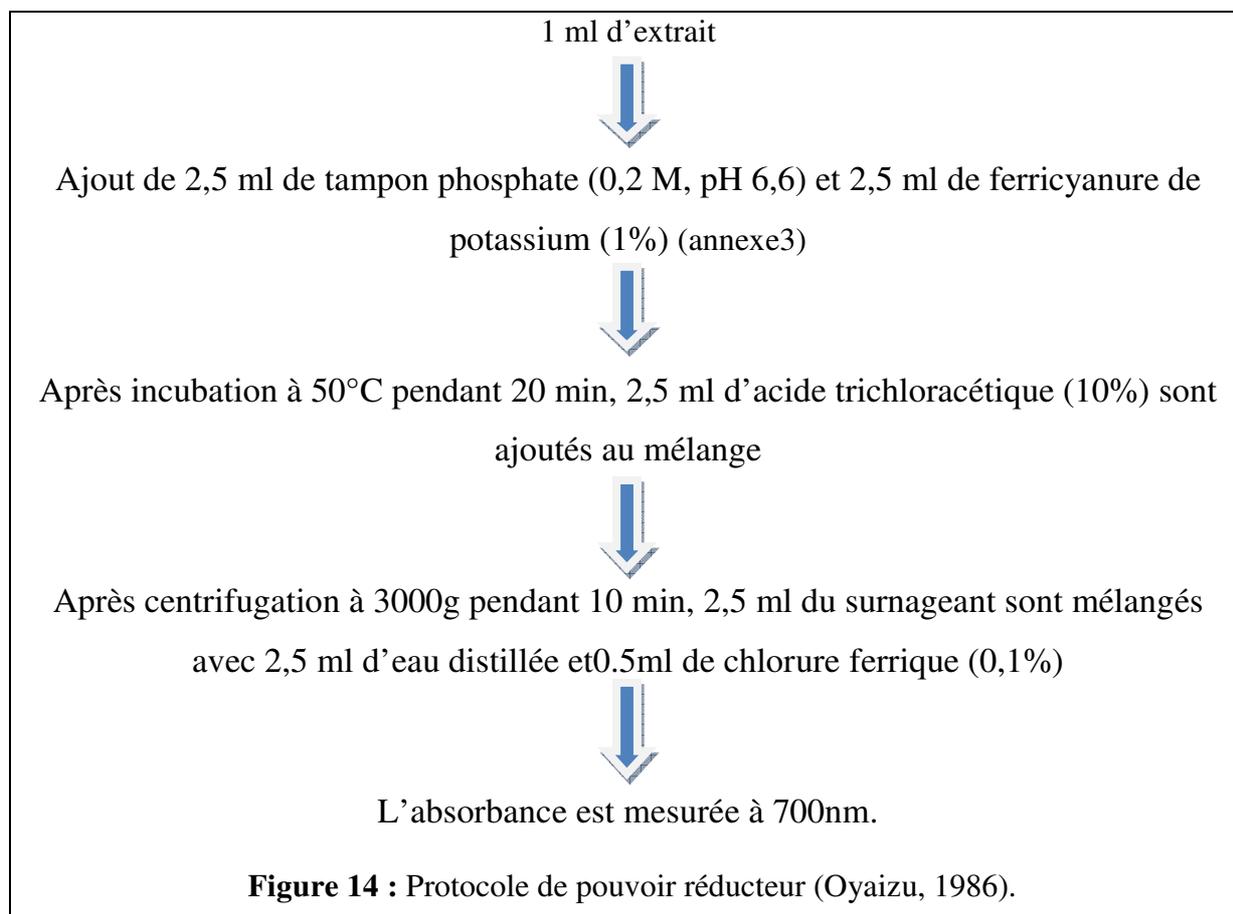
Le pourcentage d'inhibition est exprimé ensuite par la valeur de la CI_{50} , sachant que l' IC_{50} est la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH. La BHA a été utilisée comme standard à différentes concentrations.

II.4.1.2. Pouvoir réducteur

A. Principe

L'analyse du pouvoir réducteur est basée sur la réduction du complexe fer ferrique (Fe^{3+}) du complexe ferricyanure- Fe^{3+} en fer ferreux (Fe^{2+}), en présence des antioxydants réducteurs. La forme réduite donne une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait (Gülçin *et al.*, 2003).

B. Protocole



C. Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en gramme équivalent d'acide ascorbique par 100 g de matière sèche à partir d'une courbe d'étalonnage (Annexe 4).

Le pourcentage d'inhibition est exprimé ensuite par la valeur de la CI50. La BHA et l'acide ascorbique ont été utilisés comme standards à différentes concentrations.

II.4.2. Test de l'activité enzymatique

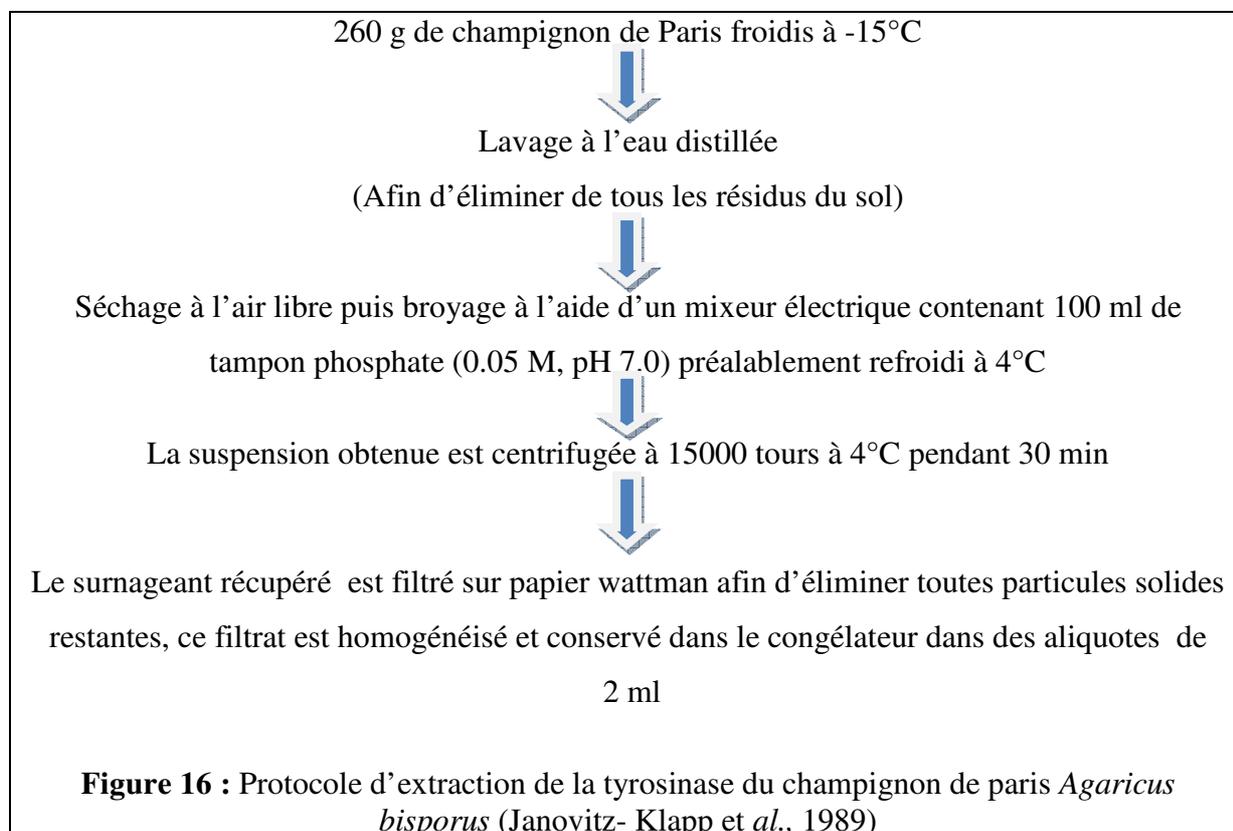
II.4.2.1. Extraction de la tyrosinase du champignon *Agaricus bisporus*

Le champignon de couche *Agaricus bisporus* ou champignon de Paris a été utilisé comme source de la tyrosinase. Le champignon doit être de couleur blanchâtre, frais et jeune (**Fig.15**)



Figure 15 : Champignon de paris *Agaricus bisporus* (Okombi, 2005).

L'extraction de la tyrosinase du champignon de Paris « *Agaricus bisporus* » a été obtenue selon la méthode décrite par Janovitz- Klapp et *al.* (1989).



II.4.2.2. Mesure de l'activité de la tyrosinase

L'activité tyrosinase de l'extrait brut est déterminée spectrophotométriquement par la mesure de l'augmentation de l'absorbance (formation des o-dopaquinones) à 475 nm. en utilisant la L-tyrosine comme substrat expérimental (Espin *et al.*, 1995).

A. Principe

En présence de l'enzyme la L-tyrosine est oxydée en o-quinone, un composé qui présente une absorbance maximale à 475 nm (Espin *et al.*, 1995).

B. Protocole

L'activité tyrosinase a été mesurée en absence et en présence d'extrait végétal (Vanni *et al.*, 1990 in Zong-Ping *et al.*, 2008).

Dans des conditions de température ambiante, 1ml de L-tyrosine (3mM) a été mélangé avec 100µl de tampon phosphate (0.05 M, pH7) et 100µl d'extrait enzymatique d'*Agaricus bisporus*. La variation de l'absorbance a été suivie pendant 10min à 475 nm.

NB :

- Pour l'activité tyrosinase, le tampon phosphate (0.05 M, pH 7) a été remplacé par les extraits de plantes diluer dans le même tampon.
- La solution de L-tyrosine a été préparée dans un tampon phosphate 0.05 M, pH 7.

C. Expression des résultats

- L'activité enzymatique de la tyrosinase est le résultat de la variation de l'absorbance pendant un laps de temps (ΔDO (nm) / Δ temps (min)).
- Le pourcentage d'inhibition et d'activation par l'extrait phénolique est calculé selon la formule donnée par Zong-Ping *et al.*, (2008).

$$\% \text{d'inhibition} = \frac{\text{Abs}_{475} \text{ A} - \text{Abs}_{475} \text{ B}}{\text{Abs}_{475} \text{ A}} \times 100$$

$$\% \text{ d'activation} = \frac{\text{Abs}_{475} \text{ B} - \text{Abs}_{475} \text{ A}}{\text{Abs}_{475} \text{ B}} \times 100$$

A = Activité tyrosinase en DO_{475nm}/min mesurée en absence d'extrait végétal.

B = Activité tyrosinase en DO_{475nm}/min mesurée en présence d'extrait végétal.

La concentration inhibitrice à 50% (IC_{50}) qui correspond à la concentration d'extrait végétal nécessaire pour réduire 50% de l'activité enzymatique de la tyrosinase est déterminée graphiquement à partir de la variation du taux d'inhibition de la tyrosinase en fonction de la concentration de l'extrait végétal en utilisant l'acide ascorbique comme standard.

II.5. Traitement statistique

Trois mesures ont été réalisées pour chaque échantillon analysé et les résultats ont été exprimés sous forme : moyenne \pm écartype. Des comparaisons statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel Statistica 5.5. Les différences ont été considérées comme étant significatives à $\alpha = 0,05$. Les valeurs des IC_{50} ont été calculées en utilisant le logiciel Origin 9, L'analyse des données des régressions linéaires et des régressions non linéaires a été faite par l'utilisation des programmes suivants : Excel® (Microsoft Excel 2007).

*Résultats et
Discussions*

III.1. Rendements des extraits bruts

L'utilisation de l'éthanol comme solvant, permet d'extraire par excellence les composés phénoliques, en raison de sa polarité et pour le fait qu'il est moins altérant que le méthanol, qui peut exercer un effet méthanolyse sur les tannins (Bruneton, 1999 ; Mueller-Harvey, 2001).

L'extraction des composés phénoliques des différentes parties de la plante étudiée, nous a permis de déterminer les rendements de leurs extraits bruts (Tableau IV).

Tableau IV : Rendements des extraits brutes éthanoliques

Extraits de plante	Rendements (%)
La morte	35.6
La vivante	22.6
Racine	31.8
Tige	37.8
Feuille	35.4
Fleur	36.4

Nous constatons que les rendements d'extractions diffèrent en fonction des différentes parties de la plante, dont la tige et la fleur enregistrent les rendements les plus élevés en moyenne de 37.8% et 36.4% respectivement.

En revanche, ces résultats sont supérieurs à ceux trouvés par Dalar et ses collaborateurs en 2015 sur *Dactylorhiza chuhensis*; une orchidée endémique d'Anatolie orientale, où ils ont signalé des rendements élevés dans l'extrait de feuille avec un pourcentage de 28.2%, suivi de l'extrait de tige (24.5%), des tubercules (19.6%) et de l'extrait de fleur (19.4%).

Dactylorhiza chuhensis a été rassemblée dans la région orientale d'Anatolie de la Turquie. La période de la récolte a eu lieu durant mai-août, contrairement à notre échantillon récolté en mois de mars.

En effet, les conditions d'extraction, l'état et l'origine de l'échantillon en terme de provenance géographique, saison de collecte et cultivar, les conditions biotiques (espèce, organe et l'état physiologique) et le type du microclimat peuvent influencer sur les taux d'extraction (Ranalli et al., 2006 ; Falleh et al., 2008 ; Atmani et al., 2009 ; Li et al., 2009).

III.2. Dosage des polyphénols, flavonoïdes et tannins

Les différents extraits bruts obtenus par extraction solide-liquide, ont été analysés quantitativement par spectrophotomètre UV-visible pour leur contenu en polyphénols. Les résultats sont exprimés en termes d'équivalent acide gallique à l'aide d'une courbe étalon. Ainsi que le taux des flavonoïdes et tanins condensés en se référant aux courbes d'étalonnages quercitrine et catéchine respectivement (voir l'annexe 4).

Le tableau V résume les résultats obtenus des teneurs en phénols totaux, tannins et flavonoïdes des extraits bruts éthanoliques des différentes parties de la plante.

Tableau V: Teneur en phénols totaux, flavonoïdes, tanins de différentes parties étudiées de la plante *O. tenthredinifera*.

Espèce	Partie de la plante	Phénols totaux (mg Eq AG/ g MS)	Flavonoïdes (mg Eq Q /g MS)	Tanins (mg Eq C / g MS)
<i>Ophrys tenthredinifera</i>	La morte	108.118 ± 23.842	84.253 ± 12.502	2,233 ± 12.502
	La vivante	94.585 ± 18.165	18.833 ± 11.148	1,339 ± 11.148
	La racine	461.688 ± 51.728	112.36 ± 16.318	1,684 ± 16.318
	La Tige	541.800 ± 15.143	182.700 ± 11.548	2,388 ± 11.548
	La feuille	1224.577 ± 50.575	967.600 ± 29.688	2,498 ± 29.688
	La fleur	1336.014 ± 23.350	1025.266 ± 40.587	2,363 ± 40.587

Le taux de polyphénols de l'échantillon d'*O. tenthredinifera* a été déterminé puis représenté en histogramme (Fig.17).

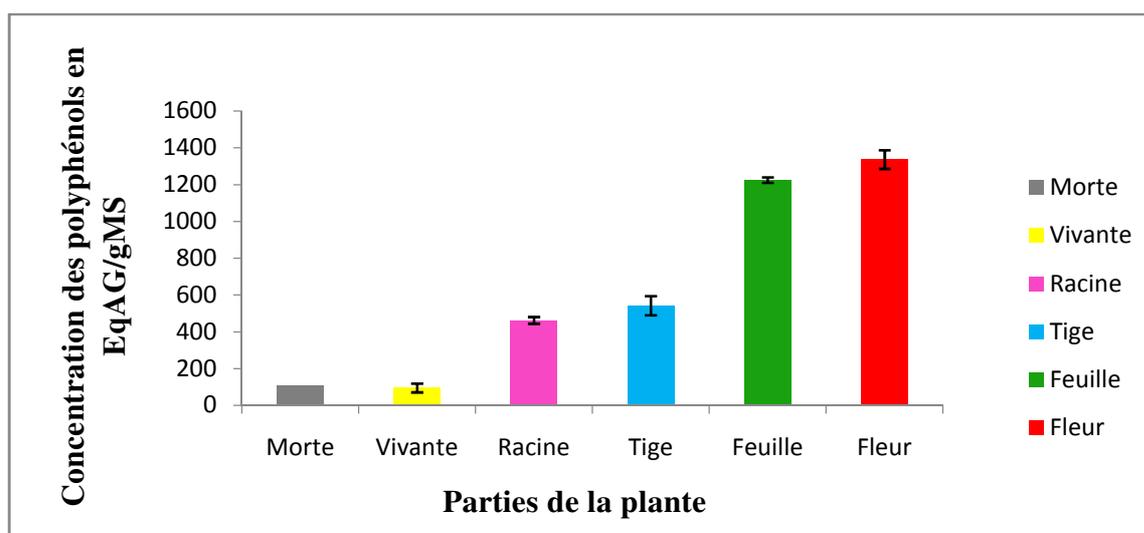


Figure 17 : Concentration des polyphénols en EqAG/gMS

Le taux des phénols totaux montre que les différentes parties de la plante renferment des quantités non négligeables en substances actives polyphénoliques, avec une différence importante entre elles.

Les fleurs donnent les teneurs les plus élevées soit 1336.01 ± 23.35 (mg EqAG/ g MS), suivis de la feuille avec un taux de 1224.57 ± 50.57 (mg Eq AG/ g MS). Alors que les teneurs les plus faibles sont enregistrées dans la vivante soit 94.58 ± 18.16 (mg Eq AG/ g MS).

Les résultats trouvés dans la présente étude sont semblables à ceux enregistrés pour la plante *Dactylorhiza chuhensis* où les teneurs les plus élevées des composés phénoliques totaux (TP), ont été notés dans les extraits de feuille et de fleur, suivis de la tige et des extraits de tubercule, mais à des concentrations largement différentes (inferieurs par rapport à nos extraits testés).

Le contenu polyphénolique varie qualitativement et quantitativement d'une plante à l'autre, cela peut être attribué à plusieurs facteurs (Ebrahimi et *al.*, 2008) :

- Facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol, agressions et maladies, etc. ;
- Le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante.

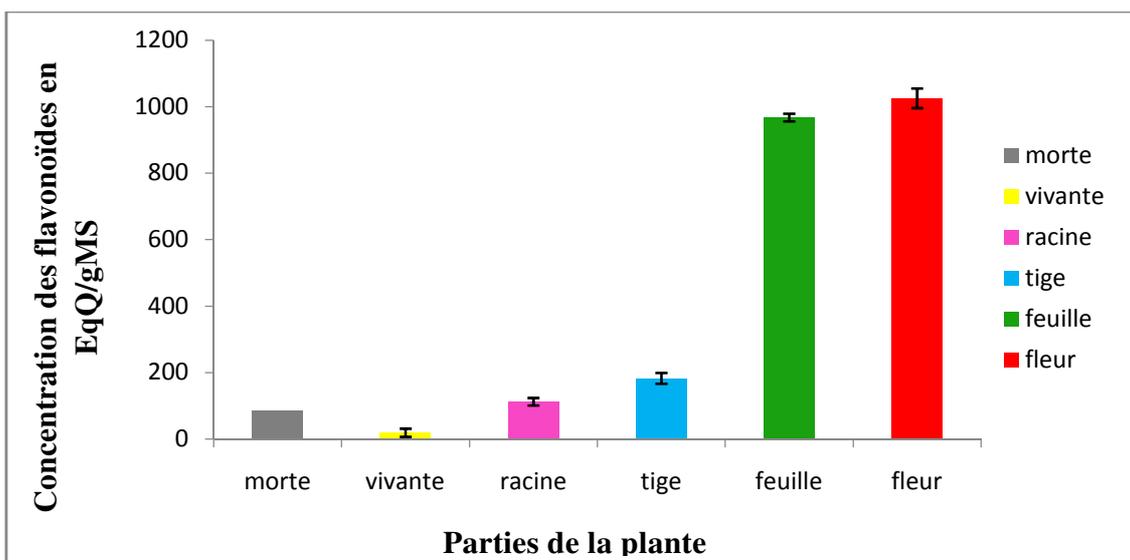


Figure 18 : Concentration des flavonoïdes en EqQ/gMS

Des concentrations importantes en flavonoïdes ont été révélées dans la partie aérienne notamment dans la fleur soit 1025.26 ± 40.58 (mg Eq Q /g MS), suivis par la feuille avec 967.6 ± 29.68 (mg Eq Q /g MS), alors que, le taux le plus faible est révélé dans la vivante soit 18.83 ± 11.14 (mg Eq Q /g MS).

Le dosage des flavonoïdes a donné des valeurs variables en fonction de la partie de la plante. Ces valeurs étant supérieures à celles de l'échantillon de *Dendrobium nobile*, une orchidée, qui a fait l'objet d'étude de Bhattacharya et ses collaborateurs (2014), dont la concentration la plus élevée de flavonoïdes a été trouvée dans l'extrait de feuille méthanolique des plantes cultivées *in vitro* ($14,39 \pm 0,3$ mg EqQ / g MS) alors que la plus faible a été notée dans l'extrait de tige chloroforme de la plante mère ($0,53 \pm 0,1$ mg EqQ / g MS).

Cette différence constatée entre nos résultats et ceux des autres travaux, en relation avec le contenu de divers métabolites secondaires, peut être expliquée par le type du solvant d'extraction utilisé ainsi que les parties de la plante exploitées.

L'auteur Williams (1979) a observé qu'il n'y avait aucun modèle de distribution des flavonoïdes au sein de la famille des Orchidacées, et la situation géographique jouait un rôle important en présence de ce type de composé.

Cependant, étant donné que ces composés ne se trouvent pas uniformément et que leur répartition présente une forte corrélation avec la géographie des plantes, il n'est pas possible de représenter les Orchidacées par un seul profil flavonoïdal (Williams, 1979).

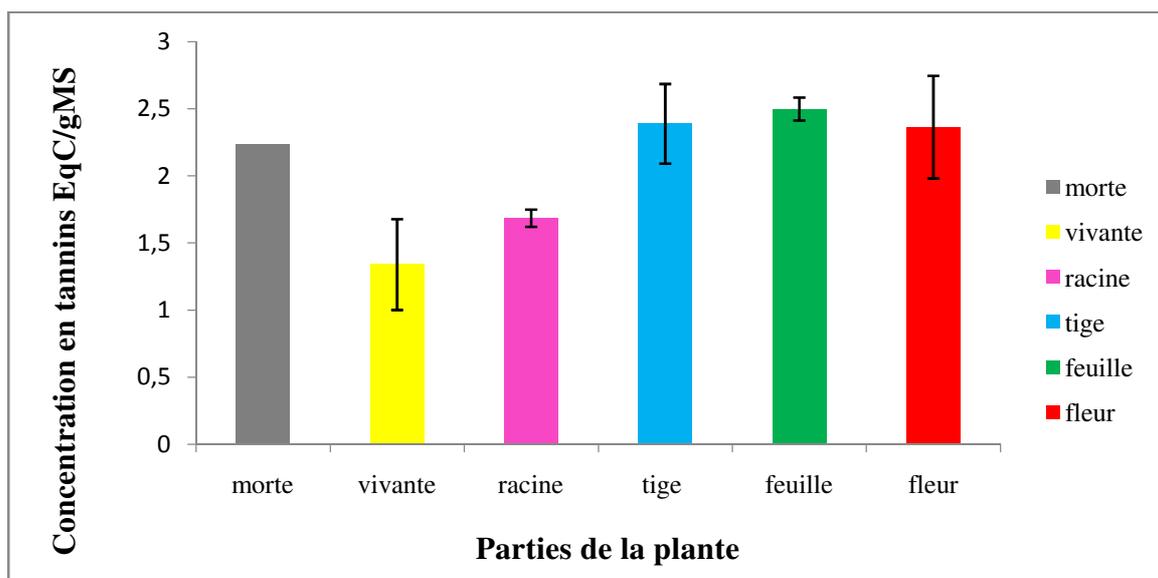


Figure 19 : Concentration des tanins en EqC/gMS

Nous constatons que les teneurs en tanins ne diffèrent pas significativement en fonction des différentes parties de la plante ($P < 0,05$).

Les tanins de tous les extraits ont des teneurs dans l'intervalle qui varie de $1,34 \pm 11.14$ (mg EqC / g MS) dans la vivante à $2,50 \pm 29.68$ (mg EqC / g MS) dans la feuille.

Dans les orchidées, les rapports de tannins sont très peu nombreux. Récemment, une étude préliminaire a été menée chez *Dendrobium panduratum* où l'activité des tannins a été signalée, où l'extrait méthanolique a montré la plus grande quantité de dépôt de tannins soit 23.22 ± 0.3 (mg de EqC/g MS), alors que la plus faible était dans l'extrait de feuille de chloroforme de la plante mère (3.11 ± 0.23 mg EqC/g MS) (Johnson et Janakiraman, 2013).

III.3. Activités antioxydantes des extraits éthanoliques d'*O. tenthredinifera* :

III.3.1. Activité scavenger du radical DPPH

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) est un radical libre largement utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (Brand-williams et al., 1995).

Pour la mise en évidence du pouvoir anti-radicalaire de nos extraits par le radical DPPH on a réalisé un premier test à une concentration de $100\mu\text{g/ml}$ pour tous les extraits. On a constaté des pourcentages d'inhibition importants pour les différentes parties de la plante. Par la suite, on a testé une gamme de concentration pour chaque extrait afin de se renseigner sur la puissance anti-radicalaire de nos extraits contre ce radical.

L'analyse statistique des résultats obtenus a montré une différence significative ($P < 0,05$) entre les différentes parties de la plante, dont les meilleurs rapports, sont enregistrés dans la fleur et la feuille, les moyens dans la tige et la racine, alors que les tubercules dits morte et vivante présentent de faibles rapports.

Pour évaluer le pouvoir de nos échantillons à piéger ce radical nous avons déterminé la concentration inhibitrice à 50% (IC_{50}).

À des fins comparatives, un antioxydant standard est utilisé; la BHA. Il a montré une activité anti radicalaire très puissante soit un IC_{50} de $1.25 \mu\text{g/ml}$.

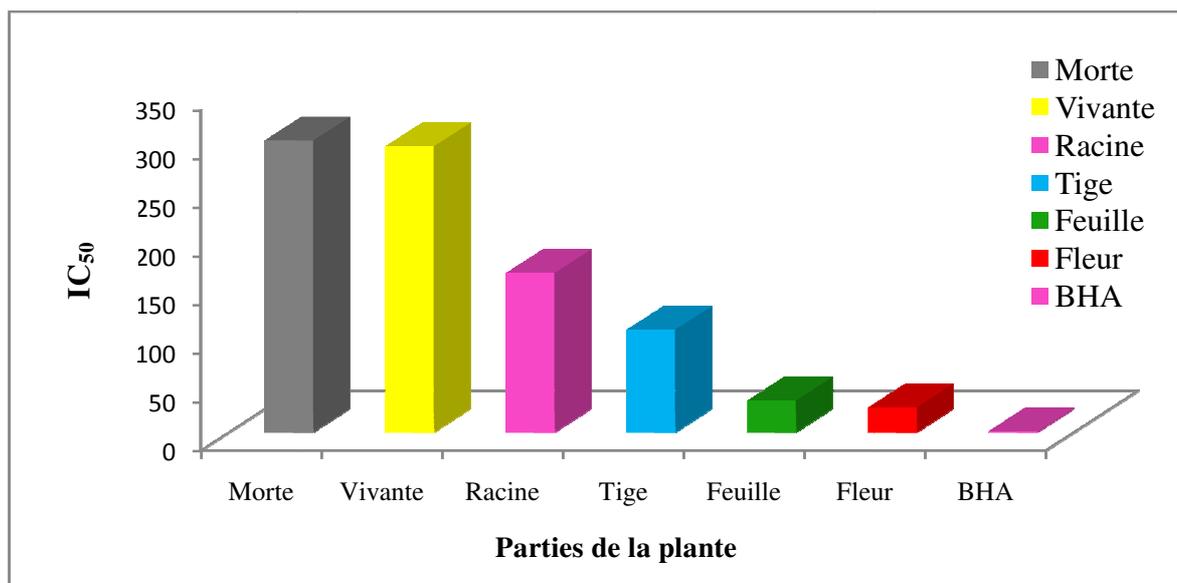


Figure 20 : Histogramme présente les concentrations efficaces à piéger 50% (IC₅₀) du radical DPPH* par les différents extraits de la plante étudiée.

Malgré la puissance de l'activité anti radicalaire de nos extraits contre le radical DPPH*, mais elle reste toujours moins active que le standard qui présente un IC₅₀ de 1.25 µg/ml.

Une vue générale sur la représentation graphique, nous permet de montrer que tous les extraits ont un pouvoir anti-radicalaire envers le DPPH, mais il y'a eu une variation dose-dépendante dans les activités de balayage radical de ces extraits.

Les IC₅₀ sont inversement proportionnelles à l'effet scavenger dont les valeurs faibles reflètent un effet anti-radicalaire important (Villano et al, 2007).

Cela montre que les deux extraits (feuille et fleur) ne nécessitent pas une concentration élevée pour piéger 50% du radical DPPH* (32.78 µg/ml et 25.56 µg/ml respectivement), contrairement aux deux extraits (morte et vivante) qui nécessitent des concentrations importantes pour balayer ce radical (300.1 µg/ml et 294.1 µg/ml respectivement).

Les résultats de Mary et ses collaborateurs, (2016) sur les extraits éthanoliques des feuilles d'une orchidée sauvage épiphyte *Acampe praemorsa* montrent un pourcentage de 54.93% qui est inférieur à celui noté dans cette présente étude soit 85.97%.

III.3.2. Pouvoir réducteur

La révélation du pouvoir réducteur se manifeste par l'apparition d'une coloration verdâtre dont l'intensité de la couleur mesurée à 700 nm, dépend essentiellement de la

quantité des réducteurs dans le milieu testé. En effet, l'absorbance augmente au fur et à mesure que cette quantité augmente.

L'analyse statistique des résultats obtenus a montré une différence significative ($P < 0,05$) entre les différentes parties de la plante, dont le meilleur rapport est enregistré dans la feuille.

Les résultats de l'activité réductrice des extraits éthanoliques de différentes parties de la plante étudiée sont illustrés dans la figure 21.

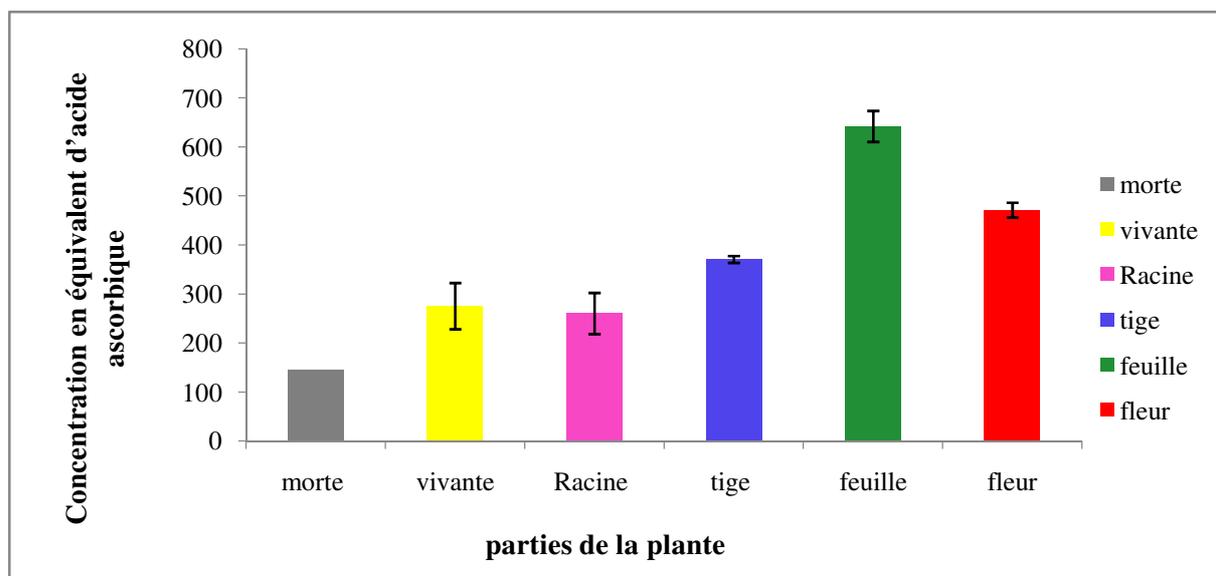


Figure 21 : histogramme présente les concentrations efficaces réductrices en équivalent de l'acide ascorbique de différents extraits de la plante étudiée.

Nous constatons que la capacité réductrice est proportionnelle à l'augmentation de la concentration, dont la partie aérienne (feuille, fleur et tige) de la plante enregistre des concentrations importantes ($642,25 \pm 15,17\mu\text{g/ml}$, $471,46 \pm 93,21\mu\text{g/ml}$ et $370,8 \pm 31,64\mu\text{g/ml}$ respectivement), ce qui explique qu'elle présente une forte activité réductrice. Contrairement à la partie sous-terreine (morte, vivante et racine) qui présente des concentrations faibles ($145,79 \pm 47,25\text{mg/ml}$, $275,50 \pm 42,01\text{mg/ml}$ et $260,45 \pm 6,93\text{mg/ml}$ respectivement), qui exprime un pouvoir réducteur faible.

Nous avons déterminé la concentration IC_{50} pour comparer l'activité réductrice de nos extraits, les résultats sont résumés dans la figure 22.

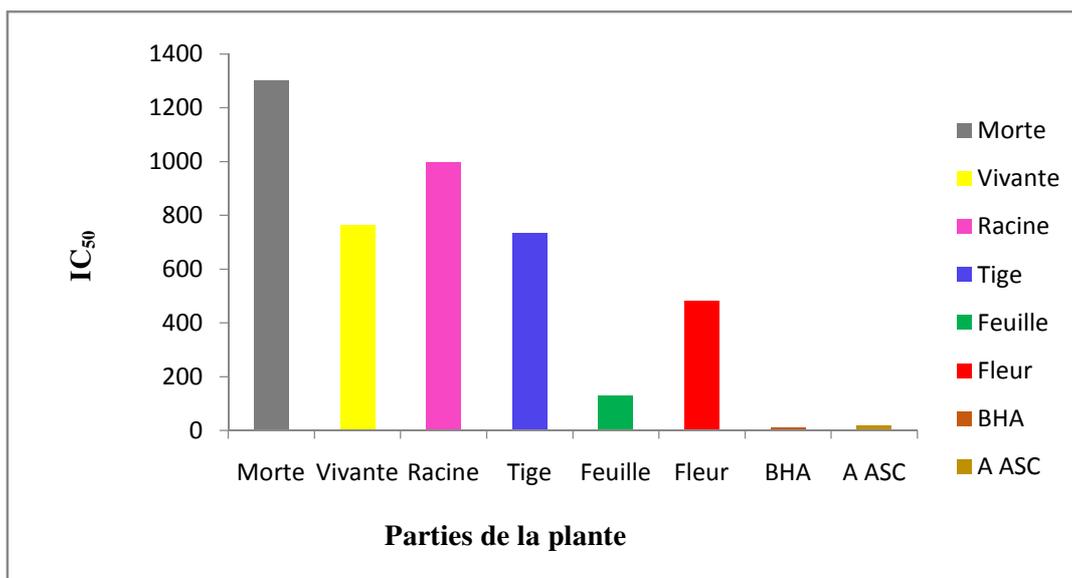


Figure 22 : Histogramme présente les concentrations efficaces à piéger 50% (IC₅₀) différents extraits de la plante étudiée.

Malgré la puissante activité réductrice des extraits de la plante, elle reste toujours moins active que les standards BHA et Acide ascorbique

L'efficacité de réduction du fer des extraits est inversement proportionnelle à la valeur IC₅₀. En effet, les concentrations IC₅₀ les plus fortes sont signalées dans la partie sous-terrain de la plante, Racine, Morte et Vivante (998.26 ± 6.93 mg/ml, 1302 ± 47.25 mg/ml et 908.49 ± 42.01 mg/ml respectivement). La partie aérienne de la plante enregistre des IC₅₀ plus faibles.

III.4. Corrélations entre les teneurs (phénols, flavonoïdes, tannins) et les IC₅₀ :

III.4.1. Le radical DPPH'

L'établissement d'une corrélation entre l'efficacité anti radicalaire et les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tannins montre la présence d'une corrélation meilleure entre l'activité antioxydante anti radical DPPH' et les teneurs en polyphénols totaux ($R^2 = 0.898$), ainsi que les teneurs en flavonoïdes ($R^2 = 0.715$) et un peu plus faible avec les tannins ($R^2 = 0.334$) (**Fig.23**).

Ceci nous permet de déduire que la capacité anti radicalaire est probablement due à la participation de 89.8% des polyphénols, 71.5% des flavonoïdes et 33.4% des tannins.

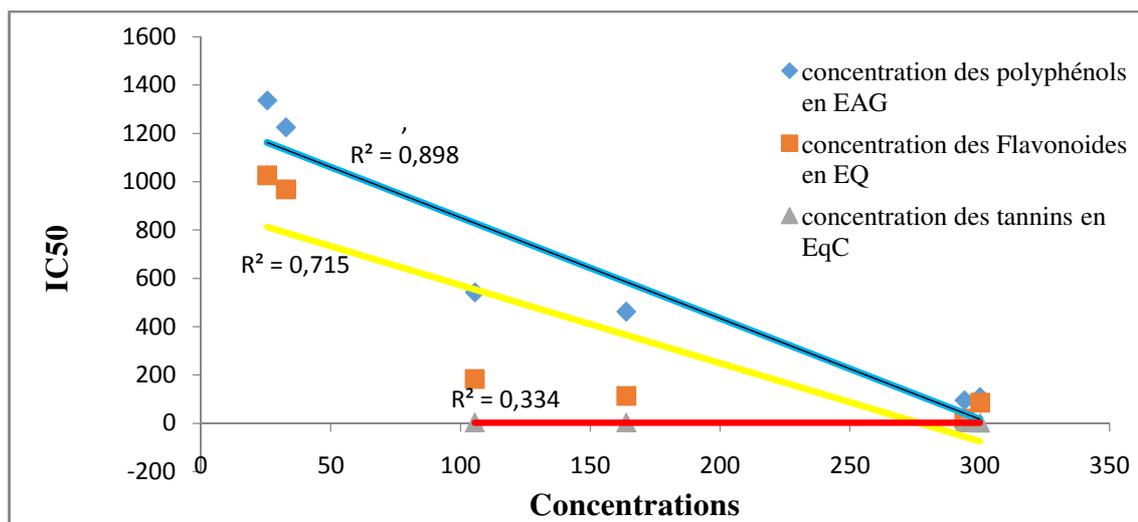


Figure 23 : Corrélation entre l'efficacité anti- radicalaire(DPPH) exprimée en valeur IC_{50} et les teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tannins.

La corrélation positive observée est due à la présence des phénols totaux (acides phénoliques et flavonoïdes) qui possèdent des propriétés antioxydantes puissantes.

III.4.2. Pouvoir réducteur

Dans le but d'établir une relation entre la réduction du fer et les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tannins, la figure 24 illustre la variation d' IC_{50} en fonction des teneurs.

Nous remarquons la présence d'une faible corrélation entre les teneurs en flavonoïdes, polyphénols et tannins (par ordre décroissant) de la plante et les concentrations IC_{50} de réduction de fer avec un $R^2 = 0.261$, $R^2 = 0.248$ et $R^2 = 0.006$ respectivement.

Ceci représente 26.1 % et 24.8 % de l'activité antioxydante des composés phénoliques et flavonoïdes respectivement. Et un pourcentage faible de 6% pour les tannins.

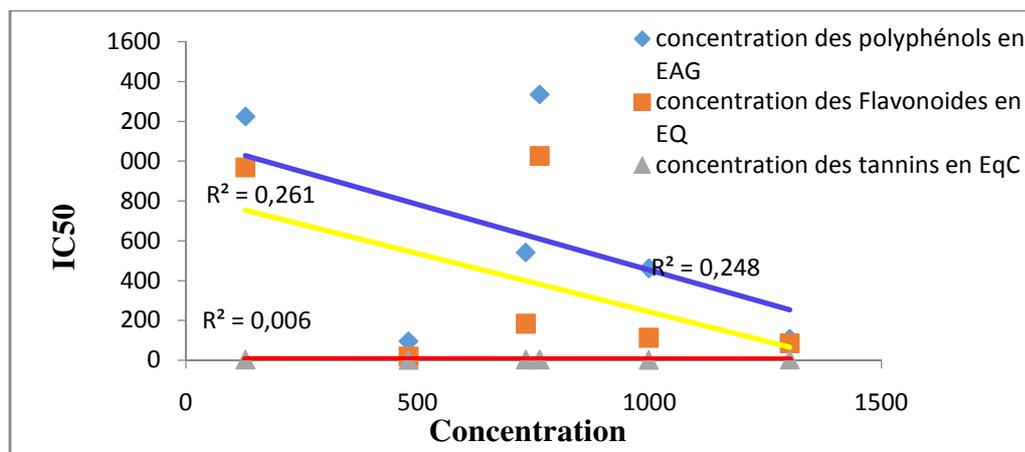


Figure 24 : Corrélations entre la réduction de fer exprimée en valeur IC_{50} et les teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tannins.

Il est très accepté que ce n'est pas nécessairement la forte teneur en phénols totaux qui exhibe une activité antioxydante puissante (Moure et *al.*, 2001).

La seule explication de l'absence de corrélation est due à la synergie des composés phénoliques dans les extraits (Rice-Evans et *al.*, 1995) et que l'activité antioxydante dépend non seulement de la concentration mais aussi de la structure de ces molécules.

III.5. Activité de la tyrosinase

III.5.1. Activité de la tyrosinase du champignon de Paris *Agaricus bisporus*

Pour déterminer l'activité tyrosinase des extraits éthanoliques de différentes parties de la plante étudiée, nous avons opté pour la tyrosinase du champignon de paris *Agaricus bisporus* puisqu'il présente une source importante de cette enzyme (Chiara et *al.*, 2012).

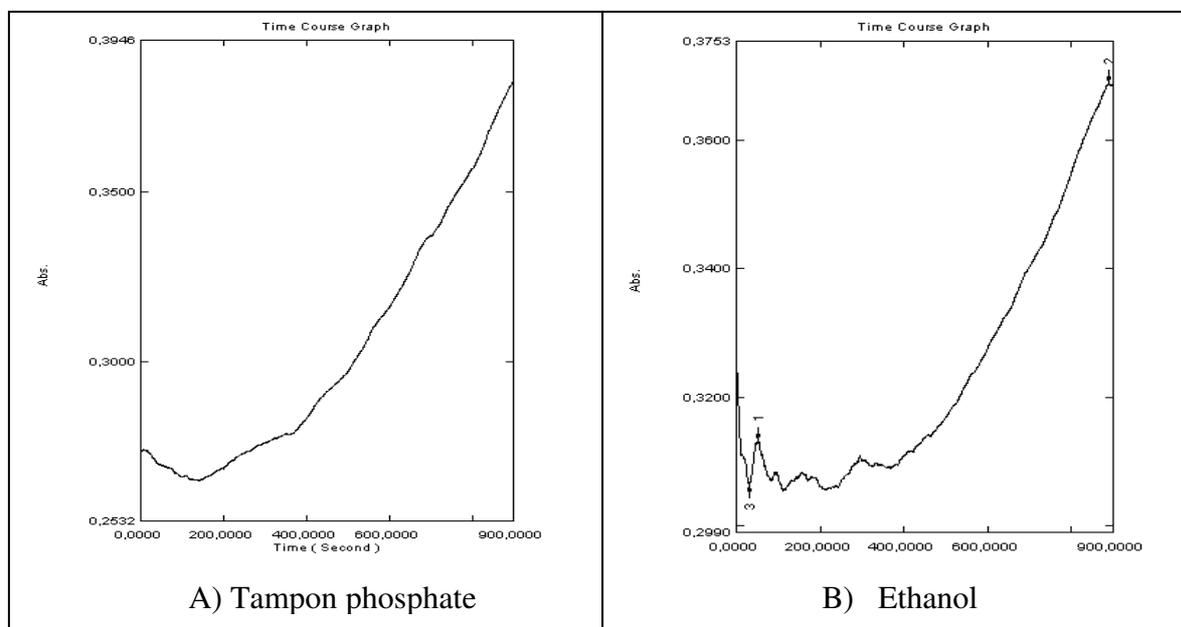


Figure 25 : Variation de l'absorbance à 475 nm en fonction du temps de l'activité tyrosinasique durant la réaction d'oxydation de L- tyrosine (3mM) par 100 μ l/ml d'extrait brut de champignon de Paris à pH 7 en présence de tampon phosphate 0.05mM (A) et de l'éthanol (B).

Les conditions optimales du milieu réactionnel pour mesurer l'activité de cette enzyme dans l'extrait brut du champignon ont été préalablement mises au point. D'autre part, pour avoir la gamme la plus large possible de concentrations d'extrait végétal à tester, l'activité enzymatique a été mesurée en présence d'éthanol puis du tampon phosphate car une faible solubilité aqueuse des extraits d'*O. tenthredinifera* a été révélée.

D'après les résultats obtenus (**Fig. 25**), la cinétique enzymatique en présence de l'éthanol montre un effet inhibiteur (**Fig.25 B**), tandis que la meilleure activité de l'extrait tyrosinase du champignon de Paris est observée dans des conditions de tampon phosphate 0.05mM, à pH 7 (**Fig. 25A**) en présence d'une concentration de tyrosine de 3mM. Dans ces conditions, l'activité tyrosinase est de 0.00017 Δ DO/min.ml. L'activité tyrosinase mesurée est de même ordre de grandeur que celle de Gouzi, (2011).

III.5.2. Effet des extraits d'*Ophrys tenthredinifera* sur l'activité de la tyrosinase

Pour évaluer l'effet des extraits d'*O. tenthredinifera* sur l'activité enzymatique de la tyrosinase de champignon de Paris *Agaricus bisporus* après une solubilisation des extraits dans le tampon phosphate (0.05 mM, pH 7) qui a été préalablement montré pour donner une meilleure activité. On a réalisé un test à une concentration élevée de l'ordre de 1mg/ml pour tous les extraits de plantes. Les vitesses initiales en présence et en absence d'extrait de la plante ont été déterminées à partir de la partie linéaire de la courbe d'absorbance en fonction du temps de la phase stationnaire (**Fig. 26**).

Tableau VI: Effet des extraits éthanoliques de la plante sur l'activité tyrosinasique du champignon de Paris.

Parties de la plante	Effet sur la tyrosinase	% d'inhibition ou d'activation 1mg/ml de l'extrait
Morte	Inhibition	41.18%
Vivante	Inhibition	5.88%
Racine	Activation	32%
Tige	Activation	26.08%
Feuille	Activation	57.5%
Fleur	Activation	37.04 %

Les résultats du Tableau VI montrent que le meilleur taux d'activation (57.5%) est obtenu par l'extrait de feuille suivie par l'extrait de la fleur avec un pourcentage de 37.04 %. Par contre les taux les plus faibles sont obtenus par les extraits de la racine et la tige avec des pourcentages de 32% et %26.08 respectivement en comparaison au taux de l'activité de l'enzyme.

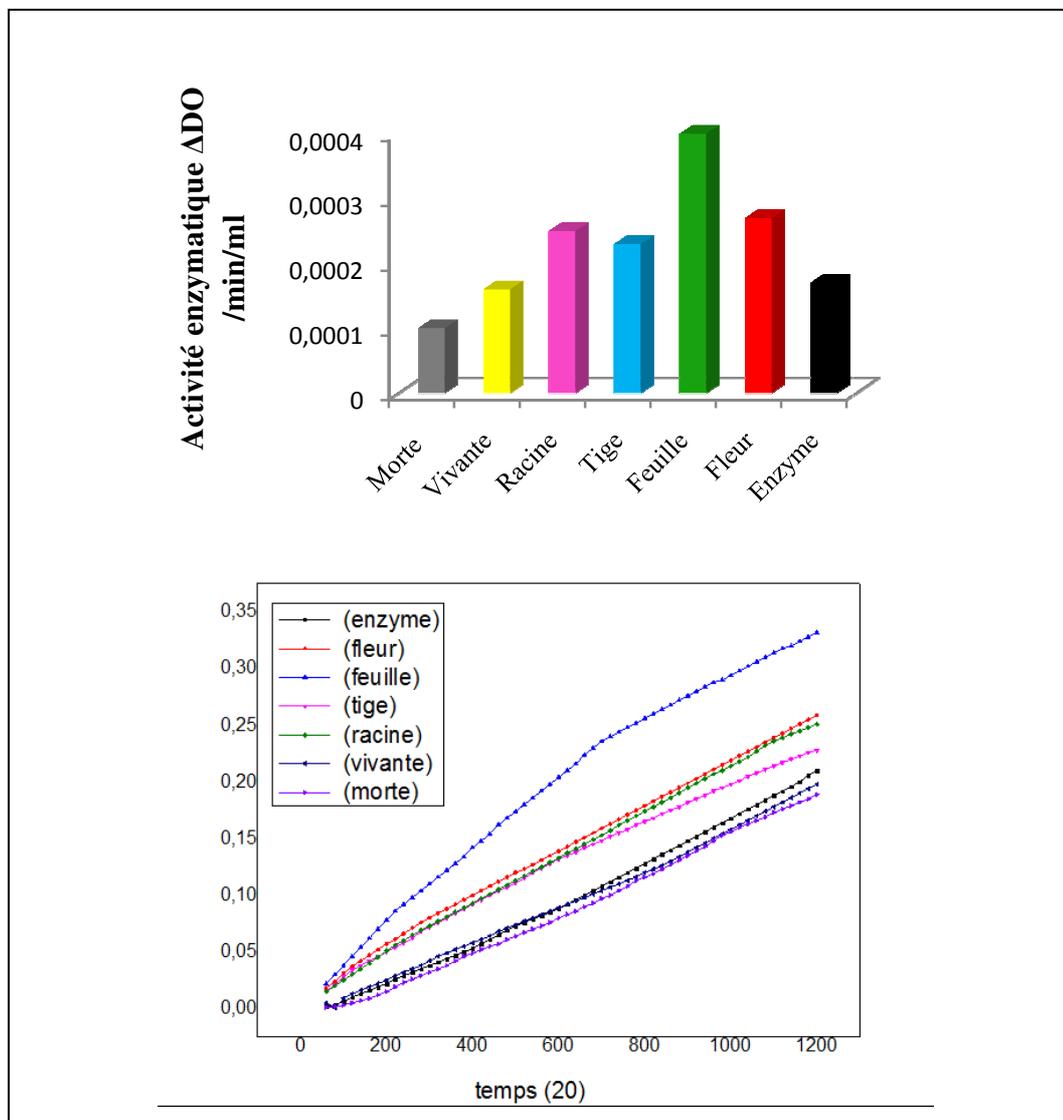


Figure 26 : Représentation graphique de l'activité enzymatique de la tyrosinase du champignon de paris en présence et en absence des différents extraits éthanolique d'*Ophrys tenthredinifera*.

D'après le graphe, on constate que tous les extraits de la plante exercent un effet envers la tyrosinase d'*Agaricus bisporus*.

À une concentration de 1mg/ml des extraits éthanolique d'*O. tenthredinefera*, les quatre extraits : racine, tige, feuille et fleur présentent un effet activateur de la tyrosinase du

champignon de paris. Alors qu'un effet inhibiteur sur la cinétique enzymatique de la tyrosinase a été constaté dans les tubercules (morte et la vivante).

L'effet inhibiteur de la morte peut être lié à la richesse en molécules bioactives chélatrices de métaux tels que les polyphénols et en particulier les flavonols (Quercétine et kaempferol) qui sont considérés parmi les inhibiteurs les plus actifs de la tyrosinase. Cela est dû à la présence d'un motif α -hydroxycétone qui est capable de chélater les centres à cuivre du site actif de l'enzyme cuivre (Kim et Uyama, 2005).

En 2013, Haudecoeur suggère la présence d'une classe des aurones polyhydroxylées de type activateurs qui au lieu de se fixer sur le site actif de la tyrosinase, ils se fixent sur le site alternatif d'où le changement de géométrie au sein du site actif ce qui conduit donc à une augmentation de l'activité de la tyrosinase pour le substrat naturel. Ces composés donc possèdent une affinité faible pour le site actif, due à l'absence de groupements phénols ou catéchols orientés vers les atomes de cuivre. Ces activateurs se fixent probablement sur au moins un site allostérique de la tyrosinase.

La classe des substrats pouvant être oxydée par l'enzyme, revêt un caractère coopératif qui peut être interprété comme une activation de la tyrosinase par un substrat se fixant sur le site allostérique, qui favorise l'oxydation d'un deuxième substrat au niveau du site actif.

III.5.3. Efficacité inhibitrice de la tyrosinase par les extraits tubercules de la plante

Vu que les deux tubercules (morte et vivante) exercent un effet inhibiteur sur la tyrosinase de champignon de paris, on a réalisé une gamme de concentration pour ces deux extrais afin de déterminer les concentrations inhibitrices à 50% (IC_{50}) et pour se renseigner sur la puissance d'inhibition des extraits de la plante étudiée sur l'activité de la tyrosinase de champignon *Agaricus bisporus*

La figure 27 montre que les concentrations inhibitrices des deux extraits la morte et la vivante sont plus faibles que l'acide ascorbique ($IC_{50} = 0.368$ mg/ml) ; un métabolite connu pour être un puissant inhibiteur des tyrosinases (Jo et al., 2012). D'autre part, il est à noter que l'extrait inhibiteur le moins efficace est celui de la vivante, dont l' IC_{50} est égale à 4.57mg/ml. Par contre, l'extrait le plus efficace est celui de la morte ($IC_{50}=1.725$ mg/ml).

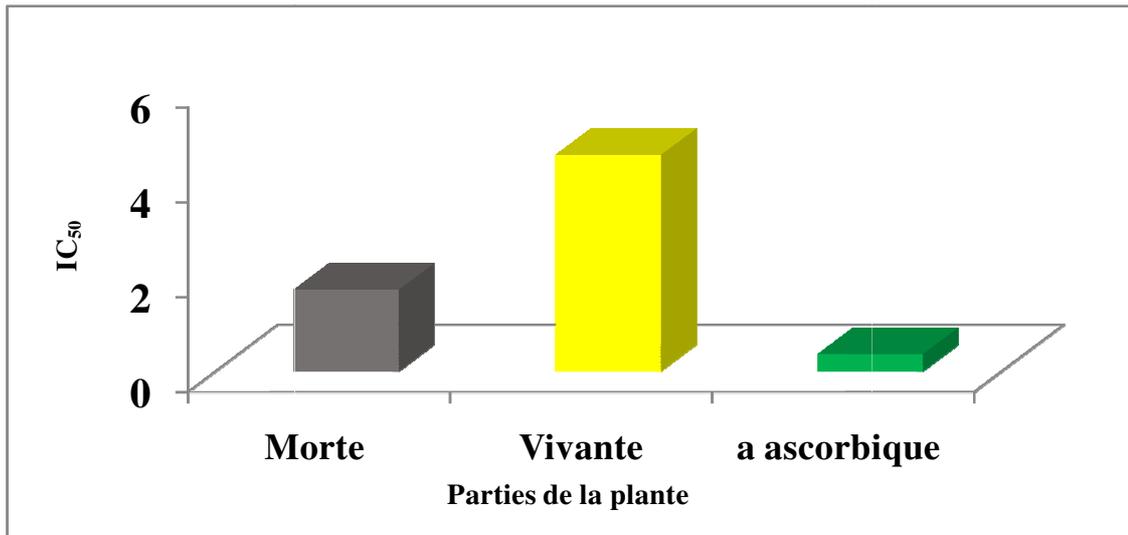


Figure 27: Représentation des IC₅₀ de l'activité inhibitrice de la tyrosinase par les deux tubercules (morte et vivante) de la plante étudiée.

Ces résultats sont comparables à ceux trouvés par Chang et ces collaborateurs, 2009 sur *Cinnamomun cassia* (IC₅₀=4.04mg/ml) et supérieurs à *Lavendula angustifolia*(IC₅₀=0.03mg/ml).

*Conclusion et
perspectives*

La connaissance et l'usage des plantes médicinales constituent un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique est très accentuée durant ces dernières années grâce aux effets thérapeutiques qu'elles procurent. Cette diversité en propriétés biologiques est liée certainement aux vertus thérapeutiques attribuées à une gamme extraordinaire de molécules bioactives synthétisées par la plante.

La présente étude avait pour objectif le dosage des différents antioxydants (polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins) d'*Ophrys tenthredinifera* et l'évaluation de leur activité antioxydante (pouvoir réducteur, la capacité de neutralisation du radical DPPH) ainsi que leur activité sur la tyrosinase.

Les résultats obtenus ont permis de tirer les conclusions suivantes :

Les rendements d'extraction diffèrent en fonction des parties de la plante étudiée, alors que la teneur en composés phénoliques, flavonoïdes et tannins était conséquente.

Ophrys tenthredinifera représente une source importante et exploitable de composés naturels bioactifs tels que les polyphénols, les flavonoïdes avec des teneurs de 1336,01 mg EAG/ g MS et 1025,26mg EQ/ g MS respectivement.

L'efficacité antioxydante des extraits bruts d'*ophrys tenthredinifera* varie selon les parties de la plante. Ainsi, les IC₅₀ enregistrées oscillent de 25.56µg/ml à 300.1µg/ml pour le radical DPPH, et de 145.79µg/ml à 642.25µg/ml pour le pouvoir réducteur.

Le test de l'activité tyrosinasique de la plante étudiée indique que les extraits racine, tige, feuille et fleur exercent un effet activateur sur la tyrosinase de champignon de paris *Agaricus bisporus*, alors que l'effet inhibiteur est exercé par les tubercules (vivante et morte dont les IC₅₀ sont 5.2 mg/ml, 2.4mg/ml respectivement).

L'évaluation de ces activités va permettre alors de sélectionner les familles des composés phénoliques d'intérêt biologique afin de mieux connaître, de valoriser et d'utiliser ces ressources dans le domaine thérapeutique.

Néanmoins, il serait intéressant dans les travaux à venir d'élargir le panel des activités antioxydantes *in vitro* et *in vivo* et d'effectuer d'autres tests biologiques voire le test anti-tumorale, anticancéreux et anti-inflammatoire. Il est également captivant de caractériser et isoler les principes actifs responsables de ces propriétés pharmacologiques.

*Références
bibliographiques*

- Achat S. (2013).** Polyphenols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. *Thèse de doctorat*. Université d'Avignon, 211p.
- Ait Youcef M. (2006).** Plantes médicinales de Kabylie. Eds Ibess Press. Paris, p350.
- Anderson J.V., Morris C.F. (2001).** An improved Whole-Seed Assay for Screening Wheat Germplasm for Polyphenol oxidase activity. *Crop Science*, 41: 1697-1705.
- Arditti J. (1980).** Aspects of the physiology of orchids. *Thèse de doctorat*. University of California, 655p.
- Arsian O., Dogan S. (2005).** Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 1499-1504.
- Atmani D., Chaher N., Berboucha M., Ayouni K., Lounis H., Boudaoud H., Debbache N., Atmani D. (2009).** Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chem*, 112: 303–309
- Audition V.J., Jiménez M. (1987).** The tyrosinase of the mammals—the lawful check-point critical in the pigmentation of the melanocytes. *International journal of Biochemistry*, 19(12): 1141-1147.
- Ba K., Tine E., Destain J., Cisse N. (2010).** Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnol. Agro. Soc. Environ.*(14): 131-139.
- Baurin N., Arnoult E., Scior T., Do Q.T., Bernard P. (2002).** Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 82: 155-8.
- Benhammou N., AtikBekkara F., Panovska K.T. (2008).** Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2: 022-028.
- Bhattacharya P., Kumaria S., Diengdoh R., Tandon P. (2014).** Genetic stability and phytochemical analysis of the *Dendrobium nobile* Lindl., an endangered medicinal orchid. *Meta Gene*, 2: 489-504.
- Boizot N., Charpentier J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre fougère. *Le cahier des techniques de l'Inra*, 79-82.
- Bossokpi I.P.L. (2002).** Etude des activités biologiques de *Fagara xanthoxyloides* LAM (Rutaceae). *Thèse de Pharmacie, Bamako*, 133p.
- Bouchard B. (1993).** Les protéines de régulation de la mélanogenèse Génétique moléculaire des albinismes cutanés. *médecine/sciences*, 9 : 425-30
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel–Wissenschaft und Technologie*, 28: 25-30.
- Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – 3ème Ed Techniques et documentations. Paris. pp: 227-310-312-313-314.494.

- Burton S.G. (1994).** Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. *CatalysisToday*, 21 : 543-594.
- Carrière A., Galinier A., Fernandez Y., Carmona M.C., Pénicaud L., Casteilla L. (2006).** Les espèces actives de l'oxygène : le *yin* et le *yang* de la mitochondrie. 22(1): 47-53.
- Chang T.S. (2009).** An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *International Journal of Molecular Science*, 10: 2440-2475.
- Chiara G., (2012).**Biochemical and structural characterisation of the copper containing oxidoreductases catechol oxidase, tyrosinase, and lacase from ascomycete fungi. *VTT Science16*, 124p.
- Cichorek M., Wachulska M., Stasiewicz A., Tyminska A. (2013).** Skin melanocytes: biology and development. *Postepy Dermatol Alergol*, 30(1): 30-41.
- Claus H., Decker H. (2006).**Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 13-14.
- Dalar A., Guo Y., Esin N., Bengu AS., Konczak I. (2015).**Health attributes of an endemic orchid from Eastern Anatolia, *Dactylorhiza chuhensis* RenzandTaub in vitro investigations. *Journal of Herbal Medecine*, 1-30.
- De Belair G., De Vêla E., Boussouak R. (2005).** Inventaire des orchidées de Numidie (N-E Algérie) sur vingt années. *J. Europ.Orchid*, 37: 291-401.
- Delforge P. (2001).**Guide des orchidées d'Europe, d'Afrique du nord et du proche orient. Ed. de la chaux et nestlé. Paris.592p.
- Deysson G. (1979).** Organisation et classification des plantes vasculaires. Ed. SEDES et CDU. Paris. 537p.
- Ebanks J.P., Wichett R.R., Boissy R.E. (2009).** Mechanisms of regulation of pigmentation of the skin: the coloring of the rise and the fall of the dyeing. *Int J Mol Sci*, 10(9): 4066-4087.
- Ebrahimi N.S., Hadian J., Mirjalili M.H., Sonboli A., Yousefzadi M. (2008).**Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phonologicals stages. *Food chemistry*, 110 : 927- 931. Ed C.N.R.S. Paris, 662 PP.
- Espin J.C., Morales M., Varon R., Tudela J., Garcia C.F. (1995).** A cantinous Spectrophotometric Method for Determining the Monphenolase and Diphenolase Activities of Apple polyphenol Oxidase. *Analytical Biochemistry*, 231: 237-246.
- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdely C. (2008).** Phenolic composition of *Cynaracardunculus*L. Organs, and theirbiological activities. *C.R. Biologies*, 331: 372-379.
- Fan Y., Flurkey W.H. (2004).** Purification and characterization of tyrosinase from guI tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry*, 65: 671-8.

- Favier A. (1997).** Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes marqués par le choix d'un marqueur. *In Annales de biologie clinique*, 55(1) : 9-16.
- Favier A. (2003).** Le Stress Oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité Chimique*, 115.
- Gandia-Herrero F., Jiménez-Atiénzar M., Cabanes J., Garcia-Carmona F., Escribano J. (2005).** Evidence for a common regulation in the activation of a polyphenol oxidase by trypsin and sodium dodecyl sulfate. *Biol Chem*, 386: 601-607.
- Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène, Comment l'oxygène peut-il devenir toxique?. *L'actualité chimique*, 91-96.
- Gasowska B., Wojtasek H., Hurek J., Drag M., Nowak K., Kafarski P. (2002).** Redox reaction between amino-(3,4-dihydroxyphenyl)methyl phosphonic acid and dopaquinone is responsible for the apparent inhibitory effect on tyrosinase. *Eur. J. Biochem*, 269: 4098-4104.
- Goudable J., Favier A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Métabol*, 11: 115-20.
- Gouzi M.H. (2011).** Etude des propriétés du polyphénol oxydase (EC 1. 14. 18. 1) du champignon de Paris (*Agaricus bisporus* J.E Lange Imbach). *Thèse de doctorat*. Université Abou BekrBelkaïd-Tlemcen, 147p.
- Gülçin M., Oktay E., Kireççi Ö.İ., Küfrevioğlu. (2003).** Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L) seed extracts. *Food Chemistry*, 83: 371.
- Gutteridge J.M., Halliwell B. (2000).** Free radicals and antioxidants in the year. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci*, 899:136-147.
- Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., ChaPelle J.P. (2007).** Le stress oxydant. *Rev Med Liège*, 62: 628-663.
- Halliwell B., Cross C.E. (1994).** Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect 102 Suppl*. 10: 5-12.
- Haudecoeur R. (2013).** Pharmacochimie des aures pour la modulation d'enzymes. *thèse de doctorat. université Grenoble*, 293p.
- Hemalatha S., Wahi A.K., Singh P.N., Chansouria J.P.N. (2010).** Evaluation of anti-hyperglycemic and free radical scavenging activity of *Melotheria maderaspatana* Linn. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, 4: 817-822.
- Herrera E., Barbas C. (2001).** Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 57: 43.
- Ismaya W.T., Rozeboom H.J., Weijn A., Mes J.J., Fusetti F., Wicher H.J., Dijkstra B.W. (2011).** Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: Identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. *Biochemistry*, 50: 5477-5486.

- Jain S., Patil U.K. (2010).** Phytochemical and pharmacological profile of *Cassia tora* Linn. - An Overview. *Indian J. Nat. Prod. Resour*,1: 430-437.
- Janovitz-Klapp A.H., Richard F.C., Nicolas J. (1989).** Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. *Phytochemistry*, 28: 2903-2907.
- Jo Y.H, Seo G.S., Yuk H.G., Lee S. (2012),** Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of methanol extracts from *Magnolia denudata* and *Magnolia denudata* var. *purpurascens* flowers, *Food Research International*, 47: 197–200.
- Jolivet S., Arpin N., Wichers H.J., Pellon G. (1998).** *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol Res*, 102: 1459-83.
- Judde A. (2004).** prévention de l'oxydation des acides gras dans un système cosmétique : mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications ?. *OCL*, 11(6): 414-418.
- Kähköen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M. (1999).** Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J of Agricultural Food Chemistry*, 47: 3954-3962.
- Kiabuned T., Eicken C., Sacchettini J.C., Krebs B., (1998).** Crystal structure of a plant catecholoxidase containing a dicopper center. *Nat Struc Biol*. 5, 1084-1090.
- Kim Y.J., Uyama H. (2005).** Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell. Mol. Life Sci*, 62: 1707-1723.
- Kim M., Shin S., Lee J.A., Jung E. (2015).** Inhibition de la mélanogénèse par *Gaillardia aristata* extrait de fleur. *BMC Médecine complémentaire et alternative*, 15 : 499.
- Kinsky SC., Loader JE., Benedict SH. (1989).** Phorbol ester activation of phospholipase D in human monocytes but not peripheral blood lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 162: 788.
- Kirschvink N., De Moffarts B., Lekeux P. (2008).** The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veterinary Journal*, 177:178–191.
- Kolcuoglu Y., Colak A., Sesli E., Yildirim M., Saglam N. (2006).** Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*). *Food Chemistry*, 101: 778-785.
- Kolesnikov MP., Gins VK. (2001).** Phenolic substances in medicinal plants. *Appl. Biochem. Micro*, 37 (4): 392-399.
- Lamaison J.L.C., Carnet A. (1990).** Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret D. C) en fonction de la végétation. *Pharm. Acta. Helv*, 65: 315-320.
- Lee J., Ko N., Min D.B. (2004).** Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3 (1):21-33.

- Lerch K. (1982).** Primary structure cftyrosinase from Neurosporacrassa. II. Complete amino acid sequence and chemical structure cfa tripeptide containing an unusual thioether. *J. Biol. Chem.* 257, 6414-6419.
- Levine R.L. (2002).** Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease, Free Radical. *Biol Med*, 32: 790-796.
- Li H., Wang X., Li Y., Li P., Wang H. (2009).** Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. *Food Chemistry*, 112: 454–460.
- Johnson M., Janakiraman N.(2013).** Phytochemical and TLC studies on stem and leaves of the orchid *Dendrobium panduratum* subsp. *villosum* Gopalan & AN Henry Indian *J. Nat. Prod. Resour*, 4: 250–254
- Marino S.M., Fogal S., Bisaglia M., Moro S., Scartabelli G., De Gioia L., Spada A., Monzani E., CasellaL., Mammi S., Bubacco L. (2011).** Investigation of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase reactivity toward chlorophenols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 505: 67-74.
- Martinez M.V., Whitaker J.R. (1995).** The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*, 6: 195-200.
- Mary Suja R., Christudhas Williams B. (2016).** Micropropagation, Phytochemical Screening And Antioxidant Potential of a Wild Epiphytic Orchid *Acampe Praemorsa (ROXB)* OF Kanyakumari District, INDIA. *ejpmr*, 3(5): 572-576
- Masella R., Di Benedetto R., Vari R., Filesi C., Giovannini C. (2005).** Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*, 16(10): 577-586.
- Maurice N. (1997).** L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIe siècle. Ed *Lavoisier*, Paris, p.12-14.
- Mayer A.M. (1987).** Polyphenoloxidases in plants-recent progress. *Phytochemistry*, 26: 11-20.
- Mayer A.M., Harel E. (1991).** Phenoloxidases and their significances in fruit and vegetables. *Chap.9, In: Fox, P.F. (Ed.) Food Enzymology. London: Elsevier Applied Science*, 373-398.
- Mayer A.M., Harel E. (1979).** Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry*, 18: 193-215.
- Milane H. (2004).** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. *Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur*, pp. 13-36.
- Moure A., Cruz J.M., Franco D., et al. (2011).** Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem*, 72: 45–171.
- Mueller-Harvey I. (2001).** Analysis of hydrolysable tannins. *Anim. Feed Sci. Technol*, 91: 13-20.

- Nerya O., Vaya J., Musa R., Izrael S., Ben-Arie R., Tamir S. (2003).** Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots. *J. Agric. Food Chem*, 51: 1201-1207.
- Okombi S. (2005).** Recherche et étude de molécules à activité antityrosinase et leur utilisation comme agents dépigmentants en dermocosmétique. *Thèse de Doctorat*, Université Joseph Fourier, Grenoble, 183p.
- Oyaizu M. (1986).** Studies on products of browning Reaction-Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from Glucosamine. *Japanese J. of Nutrition*, 44 : 307-315.
- Papa. G, Pessione. E, Leone. V, Giunta.C. (1994).** *Agaricus bisporus* tyrosinase-I. Progress made in preparative methods. *Int. J. Biochem*, 26: 215-221.
- Parvez S., Kang M., Chung H.S., Bae H. (2007).** Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *Phytother Res*, 21: 805-816.
- Pérez-Gilabert M., Morte A., G-Carmona F. (2004).** Histochemical and biochemical evidences of the reversibility of tyrosinase activation by SDS. *Plant Science*, 166: 365-370.
- Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne JO. (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense anti-oxydante Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16: 233-239.
- Price M.L., Van Scoyoc S., Butler L.G. (1978).** A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.*, 26: 1214-1218.
- Qiu L., Chen Q.H., Zhuang J.X. (2009).** Inhibitory effects of α -cyano-4 hydroxycinnamic acid on the activity of mushroom tyrosinase. *Food Chem*, 112: 609-13.
- Quezel P., Santa S. (1962).** La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. CNRS. Paris. 2 volumes.
- Ramadan M.F. (2010).** Rapid antiradical method for screening deep fried oils. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 5: 47-50.
- Ranalli A., Contento S., Lucera L., Di Febo M., Marchegiani D., Di Fonzo V. (2006).** Factors Affecting the Contents of Iridoid Oleuropein in Olive Leaves (*Olea europaea L.*). *J. Agric. Food Chem*, 54: 434-440.
- Rescigno A., Sollai F., Pisu B., Rinaldi A., Sanjust E., (2002).** Tyrosinase Inhibition: General and Applied Aspects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 17: 207-218.
- Ribéreau-Gayon J., Peynaud M., Ribéreau-Gayon P., Sudraud P. (1972).** Sciences et techniques du vin. Tome 1, analyse et contrôle des vins. Eds. Dunod, Paris, p.671.

- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B. (1995).** The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22:375-383.
- Robb D.A. (1984).** Tyrosinase. In copper Proteins and Copper Enzymes, ed. R. Lontie. *CRC Press, Boca Raton, Florida*, 207-241.
- Salvayre A.N., Salvayre R. (2005).** Effet protecteur des acides gras contre le stress oxydatif : implication en physiopathologie vasculaire. *OCL*, 12(5) : 433-8.
- Scholz R.W., Minicucci L.A., Reddy C.C. (1997).** Effects of vitamin E and selenium on antioxidant defense in rat heart. *Biochem Mol Biol Int.* (42):997-1006.
- Seo S.Y., Sharma V.K., Sharma N. (2003).** Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chemistry*, 51: 2837-2853.
- Teixeira da Silva J.A. (2004).** Mining the essential oils of the *Anthemideae*. *Afr. J. Biotechnol.*, 3: 706-720.
- Tomita Y., Miyamura Y. (1998).** Oculocutaneous albinism and analysis of tyrosinase gene in Japanese patients. *Nagoya J. Med. Sci.*, 61 : 97-102.
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biol Inter.* 160: 1–40.
- Van Gelder C.W.G., Flurkey W.H., Whichers H.J. (1997).** Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinase. *Phytochemistry*, 45:1309-1323.
- Van Leeuwen J., Wichers H.J. (1999).** Tyrosinase activity and isoform composition in separate tissues during development of *Agaricus bisporus* fruit bodies. *Mycol Res*, 103: 413- 418.
- Vanni A., Gastaldi D., Giunata, G. (1990).** Kinetic investigations on the double enzymatic activity of the tyrosinase mushroom. *Annali di Chimica*, 80: 35–60.
- Varoquaux P. (1978).** Contribution à l'étude des propriétés l'o-diphénoloxydase du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). *Thèse doctorat*, Faculté des sciences de la vie et de l'environnement de l'Université de Dijon, 131p.
- Vémos-Vigyâzô L. (1981).** Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci Nutr*, 15: 49-127.
- Villano D., Fernandez-Pachon M.S., Moy M.L., Troncoso A.M., Garcia-Parrilla M.C. (2007).** Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71: 230-235.
- Vuillemin F., Udriet M., Clot B. (1999).** Analyse aéropalynologique à Neuchâtel et à La Chaux-de-Fonds en 1998. *Bull. Soc. neuchâtel. Sci. nat.*, 122:169-172.
- Whitaker J., Lee C.Y., (1995).** Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In Enzymatic browning and its prevention. *Washington. American Chemical Society*, 2-7.
- Whitaker J.R. (1995).** Polyphenoloxidase. In Food Enzyme Structure and Mechanism, (D.W.S. Wong, ed.), *Chapman and Hall*, New York, 271-307.

- Williams C.A. (1979).** The leaf flavonoids of the Orchidaceae. *Phytochemistry* 18: 803–813.
- Zawistowski J., Biliaderis C.G., Eskin N.A.M. (1991).** Polyphenol oxidase. In: Oxidative enzyme in foods, Robinson D.S.R. and ESKIN, N.A.M. *Eds, Elsevier Appl. Sci.*, London, Chap.6, 217-273.
- Zawistowski J., Biliaderis C.G., Eskin N.A.M. (1991).** Polyphenoloxidase. In Oxidase enzyme in food, Robinson, D.S.R. and ESKIN, N.A.M., *Eds, Elsevier Appl. Sci.*, London, Chap.6, 217-273.
- Zelko IN., Marian TJ., Folz RJ. (2002).** superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free radical biology & medicine.* (33): 337-349.
- Zong Z.P., Cheng K.W., Chao J., Wu J., Wang M. (2008).** Tyrosinase inhibitors from paper mulberry (*Broussonetiapapyrifera*). *Food Chemistry*, 106 : 529–535.

Annexes

Glossaire

Annexes

Annexe I : les différentes espèces du genre *Ophrys* existantes en Algérie (Quezel et Santa, 1962)

Espèce	Description botanique	Répartition géographique
O. speculum.L	Labelle trilobé. Plante de 5-35 cm. Fleurs en épi lâche; assez petites, à sépales verts	Broussailles, Pâturages, forêts. AC: dans le Tell. Circumméd.
O. sphegodes	Labelle soit entier soit obscurément trilobé Plante de 15-45 cm. Fleurs en épi lâche, assez petites, à sépales verts	Broussailles, pâturages, forêts. AC : les Aurès
O. apifera	Labelle plus court que les divisions extérieures du périanthe, Plante puissante atteignant 60 cm, Fleurs grandes, disposées en épi lâche 3-10, flore atteignant 15 cm de long.	AC : dans le Tell. Prairies marécageuses, lieux humides
O. Scopolax	Labelle profondément trilobé, Plante de 15-45 cm. Fleurs assez grandes, en épi lâche 3-12 flores	Broussailles, pâturages, forêts AC : Tell.
O. bombyliflora	Labelle globuleux, Plante de 10-30 cm. Fleurs petites, en épi lâche et 1-5 flores	Broussailles, pâturages, forêts C: Tell Méd.
O. lutea	Labelle avec une large marge jaune et présentant une tache médiane bilobée et bleuâtre, glabre. Plante de hauteur variable (5-50 cm). Fleurs en épi lâche et généralement pauciflore	Forêts, Broussailles, pâturages.
O. subfusca	Labelle à bordure jaune étroite (1-2 mm)	Broussailles, pâturages
O. pallida	Labelle présentant deux bosses à la base, fleurs à gorge presque fermée, disposées en épi lâche et 2-5 fleurs. Plante de 15-25 cm	Broussailles, pâturages.
O. fusca	Labelle peu rétréci à la base, Plante de 10-40 cm, à fleurs en épi lâche	Broussailles, pâturages, forêts
O. atlantica	Labelle très grand (15-20 mm), Plante de 15-30 cm, à fleurs en épi lâche et au max 4 flores.	Broussailles, pâturages, forêts

AC : assez commun

C : commun

Annexes

Annexe II : Mteriel

Balance de précision :Sartorius

Broyeur :RAD WAGR

Centrifugeuse de paillasse : MICRO 120.

Centrifugeuse : SIGMA.

Cuve en verre.

Etuve : MEMMERT

Etuve : ECOCELL.

PH mètre : WTWPH 422

Spectrophotomètre : spéctro scan 50 UV-VIS spectrophotometer

Tamiseur : Retsh AS 200

Vortex : VELP scientifica

Annexes

Annexe III : préparation des solutions et réactifs

Dosage des polyphénols totaux

Folin-ciocalteu à 10% : 10ml du réactif de Folin-ciocalteu dans une fiole graduée de 100ml et compléter au trait de jauge avec l'eau distillée.

Na_2CO_3 à 7.5% : 7.5g dans 100ml d'eau distillée

Solution d'extraits à 1mg/ml : 10mg dans 10ml de l'éthanol.

Dosage des flavonoïdes

Trichlorure d'aluminium à 2% : 2g d' AlCl_3 dans 100ml d'eau distillée.

Dosage des Tannins totaux

Le réactif de vanilline a été préparé en mélangeant à volume égal : HCl à 8 % (v/v), le méthanol à 37 % (v/v) et 4 % de vanilline dans du méthanol (m/v). Le mélange a été maintenu à 30 °C avant le dosage.

Le radical DPPH

La solution de DPPH à 0.1mM : dissoudre 3.49 mg de DPPH dans 100 ml du méthanol.

Pouvoir réducteur

Ferricyanure de potassium (1%) : 1g dans 100 ml de l'eau distillée.

Acide trichloracétique (10%) : 10 ml d'acide trichloracétique + 90 ml d'eau distillée.

Chlorure ferrique (0,1%) : 0.1g dans 100 ml de l'eau distillée.

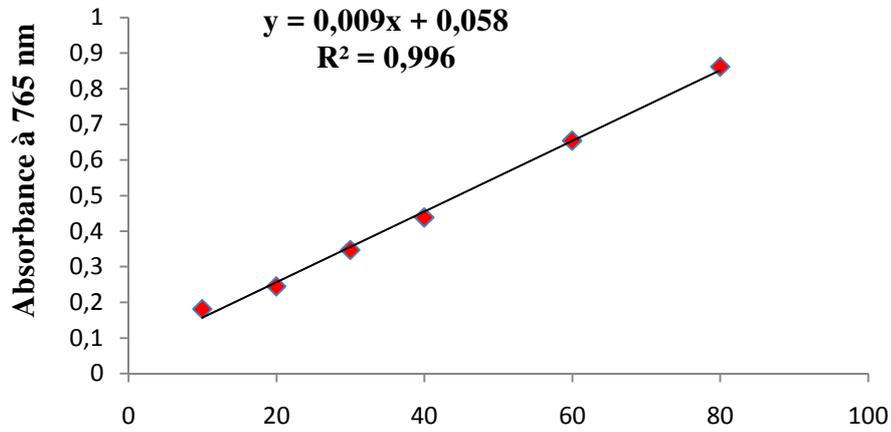
Tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) : à partir d'une solution de Na_2HPO_4 (14.2 g dans 1000ml) et NaH_2PO_4 (12 g dans 1000ml).

Activité tyrosinase

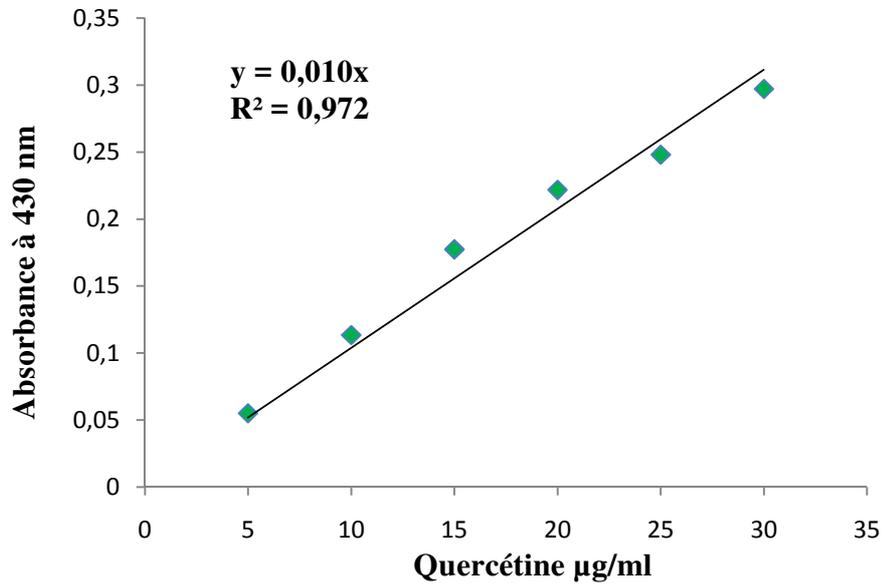
L-tyrosine (3mM) : 0.055g dans 100 ml de tampon phosphate (0.05 M, pH 7).

Tampon phosphate (0.05 M, pH 7) : à partir de Na_2HPO_4 (3.55g dans 500ml) et NaH_2PO_4 (3g dans 500ml).

Annexe IV: les différentes courbes d'étalonnage

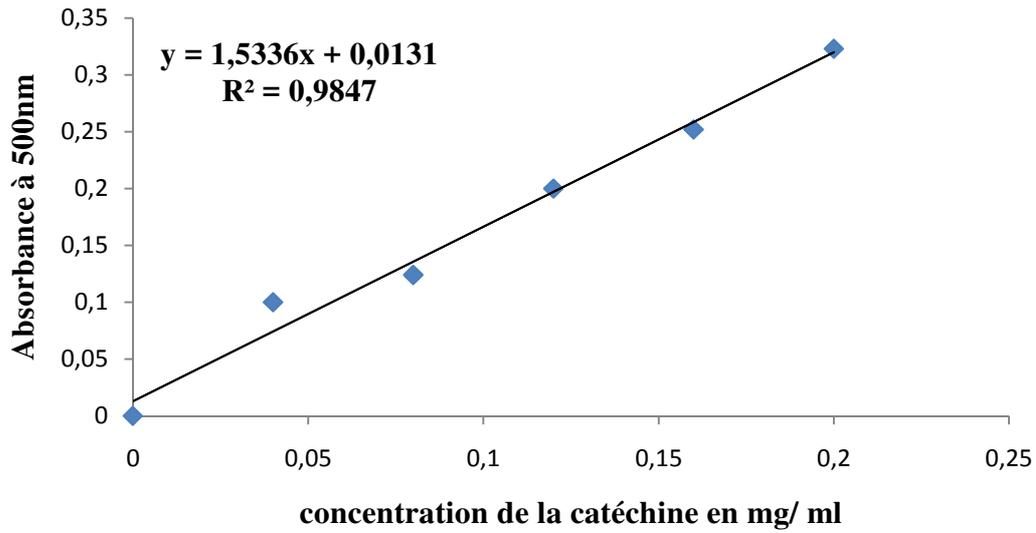


Courbe étalonnage des polyphénols en équivalent d'acide gallique

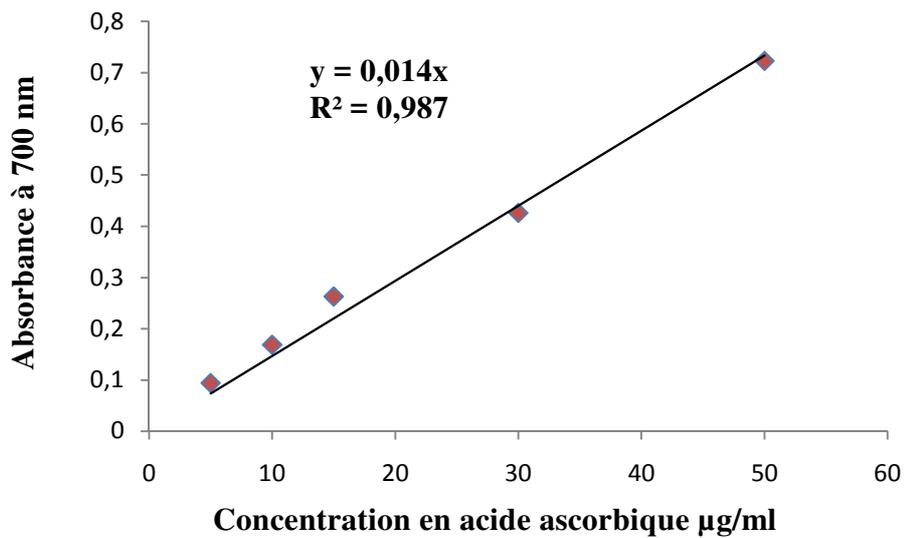


Courbe étalonnage des flavonoïdes en équivalent de la quercétine

Annexes



Courbe étalonnage des tannins en équivalent de la catéchine



Courbe étalonnage d'acide ascorbique µg/ml

Albinisme : c'est une particularité génétique héréditaire qui affecte la pigmentation et se caractérise par un déficit de production de mélanine.

Appendice : désigne de façon générale un élément rajouté à une partie plus importante. En botanique, écaille qui entoure parfois l'ovaire ; prolongement de la fleur, de la feuille ou d'autres organes, tels que vrilles, stipules, épines, etc.

Basilaire : Qui sert de base ou qui appartient à la base d'un organe.

Binucléaire : Qui possède deux noyaux. Synonyme : binucléé.

Brunissement enzymatique : processus naturel rendant brun certains organismes, en particulier la nourriture.

Catécholase : l'oxydation, en présence de dioxygène, de ce catéchol en o-quinone ou benzoquinone : on parle alors d'une activité catécholase.

Caulinaire : est un terme botanique utilisé caractériser ce qui se développe sur la tige d'une plante, ou se dit essentiellement des feuilles portées par la tige.

Circumméditerranéenne : autour de la Méditerranée, qui entoure la Méditerranée.

Crésolase : l'oxydation, en présence de dioxygène, d'un monophénol en catéchol : on parle alors d'une activité crésolase.

Endémique : En biologie, une espèce est dite endémique d'une région déterminée si elle n'existe que là.

Epiphyte : Se dit d'un organisme, généralement végétal, vivant sur des plantes qui ne sont pour lui qu'un support indifférent.

Flavone : c'est un composé organique dérivé de la 1-benzopyran-4-one (ou chromén-4-one). C'est la molécule de base des flavonoïdes, et particulièrement de son sous-groupe, les flavones. Certains de ses dérivés, flavones, flavonols et flavanones sont des colorants jaunes.

Fongique : Relatif aux champignons, en particulier aux champignons microscopiques.

Humus : Matière colloïdale du sol issue de la décomposition et de la transformation chimique et biologique des débris végétaux. Ensemble des matières organiques se trouvant dans la couche superficielle d'un sol.

Kurarinone :

Labelle : pétale supérieur des orchidées de couleurs et de formes variées, tournée vers le bas et prenant parfois la forme d'un insecte.

Lancéolé : (Botanique) Se dit d'une feuille en forme de fer de lance. (Zoologie) Synonyme d'amphioxus, animal en forme de fer de lance.

Lutéoléine : ou lutéolol est un composé chimique de la famille des flavonoïdes, et plus spécifiquement l'une des flavones les plus communes.

Médiateur : Substance synthétisée et libérée par une cellule (neuromédiateur, cytokine, prostaglandine, etc.), intervenant dans un processus de l'organisme (conduction nerveuse, inflammation, etc.).

Mélanocyte : Cellule localisée dans l'épiderme ou le derme, responsable de la pigmentation de la peau par la sécrétion de mélanine.

Mélanogenèse : C'est la synthèse de la mélanine par les mélanocytes. Ces derniers vont, par une succession de réactions chimiques très complexes, élaborer la mélanine (substance responsable de la coloration de la peau et des cheveux).

Mélanosome : un organelle intracellulaire, parent des lysosomes et des granules des plaquettes sanguines, à l'intérieur duquel sont fabriquées les mélanines.

Métalloprotéine : En biochimie, le terme métalloprotéine désigne une protéine qui comporte un ou plusieurs cofacteurs métalliques. Ces derniers sont des ions qui sont directement liés aux chaînes latérales des acides aminés de la protéine ou bien coordonnés à un ligand non protéinique.

Modulateur : inhibiteur ou activateur de l'activité enzymatique. La modulation mode de régulation primordial des voies métaboliques dans la cellule.

Monocotylédones : comprennent des végétaux dont la plantule typique ne présente qu'un seul cotylédon sur l'embryon, qui évolue en donnant une pré-feuille (ou épiphyllé).

Morine : composé organique de la famille des flavonols. C'est un composé jaune-orangé.

Mucilage : substance végétale, constituée de polysaccharides, qui gonflent au contact de l'eau en prenant une consistance visqueuse, parfois collante, semblable à la gélatine.

Mycètes : Organismes eucaryotes, dont les cellules sont pourvues de paroi, dépourvus de chloroplastes (donc chimiotrophes), dont l'appareil végétatif est constitué d'un thalle, porteurs de spores, capables de reproduction sexuée et asexuée.

Pauciflore : Qualifie une plante qui a peu de fleurs ou d'inflorescences.

Périanthe : correspond à l'ensemble des structures protégeant les organes reproducteurs de la fleur, il s'agit donc d'une partie stérile. Il comprend le calice, composé des sépales, et la corolle formée par les pétales.

Pétale : C'est une pièce florale qui entoure le système reproducteur des fleurs

Plastide : Organite caractéristique des cellules des végétaux supérieurs capable de fixer diverses substances et dans lequel peuvent s'accumuler des pigments, dont le plus important est la chlorophylle.

Sépale : c'est l'un des éléments foliacés, généralement verts, dont la réunion compose le calice et supporte la corolle de la fleur.

Tocophérol : une forme de vitamine E qui est préférentiellement absorbée et accumulée par les humains.

Tubercule : Renflement des axes végétaux, surtout souterrains (racine, rhizome), riches en substances de réserve.

Xénobiotique : molécule chimique de synthèse étrangère à l'organisme et résistante à la biodégradation. En toxicologie, c'est toute substance étrangère au consommateur qui peut causer des troubles plus ou moins importants.

Annexes

Glossaire

Albinisme : c'est une particularité génétique héréditaire qui affecte la pigmentation et se caractérise par un déficit de production de mélanine.

Appendice : désigne de façon générale un élément rajouté à une partie plus importante. En botanique, écaille qui entoure parfois l'ovaire ; prolongement de la fleur, de la feuille ou d'autres organes, tels que vrilles, stipules, épines, etc.

Basilaire : Qui sert de base ou qui appartient à la base d'un organe.

Binucléaire : Qui possède deux noyaux. Synonyme : binucléé.

Brunissement enzymatique : processus naturel rendant brun certains organismes, en particulier la nourriture.

Catécholase : l'oxydation, en présence de dioxygène, de ce catéchol en o-quinone ou benzoquinone : on parle alors d'une activité catécholase.

Caulinaire : est un terme botanique utilisé caractériser ce qui se développe sur la tige d'une plante, ou se dit essentiellement des feuilles portées par la tige.

Circumméditerranéenne : autour de la Méditerranée, qui entoure la Méditerranée.

Crésolase : l'oxydation, en présence de dioxygène, d'un monophénol en catéchol : on parle alors d'une activité crésolase.

Endémique : En biologie, une espèce est dite endémique d'une région déterminée si elle n'existe que là.

Epiphyte : Se dit d'un organisme, généralement végétal, vivant sur des plantes qui ne sont pour lui qu'un support indifférent.

Flavone : c'est un composé organique dérivé de la 1-benzopyran-4-one (ou chromén-4-one). C'est la molécule de base des flavonoïdes, et particulièrement de son sous-groupe, les flavones. Certains de ses dérivés, flavones, flavonols et flavanones sont des colorants jaunes.

Fongique : Relatif aux champignons, en particulier aux champignons microscopiques.

Humus : Matière colloïdale du sol issue de la décomposition et de la transformation chimique et biologique des débris végétaux. Ensemble des matières organiques se trouvant dans la couche superficielle d'un sol.

Kurarinone :

Labelle : pétale supérieur des orchidées de couleurs et de formes variées, tournée vers le bas et prenant parfois la forme d'un insecte.

Lancéolé : (Botanique) Se dit d'une feuille en forme de fer de lance. (Zoologie) Synonyme d'amphioxus, animal en forme de fer de lance.

Lutéoléine : ou lutéolol est un composé chimique de la famille des flavonoïdes, et plus spécifiquement l'une des flavones les plus communes.

Médiateur : Substance synthétisée et libérée par une cellule (neuromédiateur, cytokine, prostaglandine, etc.), intervenant dans un processus de l'organisme (conduction nerveuse, inflammation, etc.).

Mélanocyte : Cellule localisée dans l'épiderme ou le derme, responsable de la pigmentation de la peau par la sécrétion de mélanine.

Mélanogenèse : C'est la synthèse de la mélanine par les mélanocytes. Ces derniers vont, par une succession de réactions chimiques très complexes, élaborer la mélanine (substance responsable de la coloration de la peau et des cheveux).

Mélanosome : un organelle intracellulaire, parent des lysosomes et des granules des plaquettes sanguines, à l'intérieur duquel sont fabriquées les mélanines.

Métalloprotéine : En biochimie, le terme métalloprotéine désigne une protéine qui comporte un ou plusieurs cofacteurs métalliques. Ces derniers sont des ions qui sont directement liés aux chaînes latérales des acides aminés de la protéine ou bien coordonnés à un ligand non protéinique.

Modulateur : inhibiteur ou activateur de l'activité enzymatique. La modulation mode de régulation primordial des voies métaboliques dans la cellule.

Monocotylédones : comprennent des végétaux dont la plantule typique ne présente qu'un seul cotylédon sur l'embryon, qui évolue en donnant une pré-feuille (ou épiphyllé).

Morine : composé organique de la famille des flavonols. C'est un composé jaune-orangé.

Mucilage : substance végétale, constituée de polysaccharides, qui gonflent au contact de l'eau en prenant une consistance visqueuse, parfois collante, semblable à la gélatine.

Mycètes : Organismes eucaryotes, dont les cellules sont pourvues de paroi, dépourvus de chloroplastes (donc chimiotrophes), dont l'appareil végétatif est constitué d'un thalle, porteurs de spores, capables de reproduction sexuée et asexuée.

Pauciflore : Qualifie une plante qui a peu de fleurs ou d'inflorescences.

Périanthe : correspond à l'ensemble des structures protégeant les organes reproducteurs de la fleur, il s'agit donc d'une partie stérile. Il comprend le calice, composé des sépales, et la corolle formée par les pétales.

Pétale : C'est une pièce florale qui entoure le système reproducteur des fleurs

Plastide : Organite caractéristique des cellules des végétaux supérieurs capable de fixer diverses substances et dans lequel peuvent s'accumuler des pigments, dont le plus important est la chlorophylle.

Sépale : c'est l'un des éléments foliacés, généralement verts, dont la réunion compose le calice et supporte la corolle de la fleur.

Tocophérol : une forme de vitamine E qui est préférentiellement absorbée et accumulée par les humains.

Tubercule : Renflement des axes végétaux, surtout souterrains (racine, rhizome), riches en substances de réserve.

Xénobiotique : molécule chimique de synthèse étrangère à l'organisme et résistante à la biodégradation. En toxicologie, c'est toute substance étrangère au consommateur qui peut causer des troubles plus ou moins importants.

Annexe 1 : les différentes espèces du genre *Ophrys* existantes en Algérie (Quezel et Santa, 1962)

Espèce	Description botanique	Répartition géographique
O. speculum.L	Labelle trilobé. Plante de 5-35 cm. Fleurs en épi lâche; assez petites, à sépales verts	Broussailles, Pâturages, forêts. AC: dans le Tell. Circumméd.
O. sphegodes	Labelle soit entier soit obscurément trilobé Plante de 15-45 cm. Fleurs en épi lâche, assez petites, à sépales verts	Broussailles, pâturages, forêts. AC : les Aurès
O. apifera	Labelle plus court que les divisions extérieures du périanthe, Plante puissante atteignant 60 cm, Fleurs grandes, disposées en épi lâche 3-10, flore atteignant 15 cm de long.	AC : dans le Tell. Prairies marécageuses, lieux humides
O. Scopolax	Labelle profondément trilobé, Plante de 15-45 cm. Fleurs assez grandes, en épi lâche 3-12 flores	Broussailles, pâturages, forêts AC : Tell.
O. bombyliflora	Labelle globuleux, Plante de 10-30 cm. Fleurs petites, en épi lâche et 1-5 flores	Broussailles, pâturages, forêts C: Tell <i>Méd.</i>
O. lutea	Labelle avec une large marge jaune et présentant une tache médiane bilobée et bleuâtre, glabre. Plante de hauteur variable (5-50 cm). Fleurs en épi lâche et généralement pauciflore	Forêts, Broussailles, pâturages.
O. subfusca	Labelle à bordure jaune étroite (1-2 mm)	Broussailles, pâturages
O. pallida	Labelle présentant deux bosses à la base, fleurs à gorge presque fermée, disposées en épi lâche et 2-5 fleurs. Plante de 15-25 cm	Broussailles, pâturages.
O. fusca	Labelle peu rétréci à la base, Plante de 10-40 cm, à fleurs en épi lâche	Broussailles, pâturages, forêts
O. atlantica	Labelle très grand (15-20 mm), Plante de 15-30 cm, à fleurs en épi lâche et au max 4 flores.	Broussailles, pâturages, forêts

AC : assez commun

C : commun

Annexe 2 : Mteriel

Balance de précision :Sartorius

Broyeur :RAD WAGR

Centrifugeuse de paillasse : MICRO 120.

Centrifugeuse : SIGMA.

Cuve en verre.

Etuve : MEMMERT

Etuve : ECOCELL.

pH mètre : WTWPH 422

Spectrophotomètre : spéctro scan 50 UV-VIS spectrophotomètre

Tamiseur : Retsh AS 200

Vortex : VELP scientifica

Annexe 3 : préparation des solutions et réactifs

Dosage des polyphénols totaux

Folin-ciocalteu à 10% : 10ml du réactif de Folin-ciocalteu dans une fiole graduée de 100ml et compléter au trait de jauge avec l'eau distillée.

Na_2CO_3 à 7.5% : 7.5g dans 100ml d'eau distillée

Solution d'extraits à 1mg/ml : 10mg dans 10ml de l'éthanol.

Dosage des flavonoïdes

Trichlorure d'aluminium à 2% : 2g d' AlCl_3 dans 100ml d'eau distillée.

Dosage des Tannins totaux

Le réactif de vanilline a été préparé en mélangeant à volume égal : HCl à 8 % (v/v), le méthanol à 37 % (v/v) et 4 % de vanilline dans du méthanol (m/v). Le mélange a été maintenu à 30 °C avant le dosage.

Le radical DPPH

La solution de DPPH à 0.1mM : dissoudre 3.49 mg de DPPH dans 100 ml du méthanol.

Pouvoir réducteur

Ferricyanure de potassium (1%) : 1g dans 100 ml de l'eau distillée.

Acide trichloracétique (10%) : 10 ml d'acide trichloracétique + 90 ml d'eau distillée.

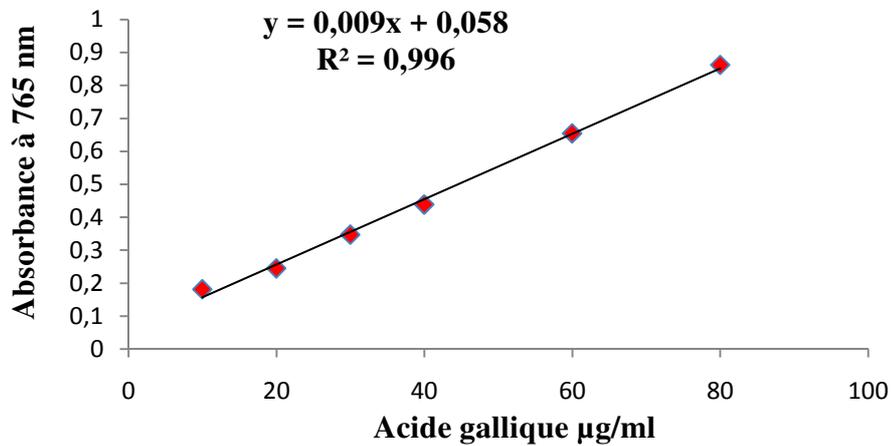
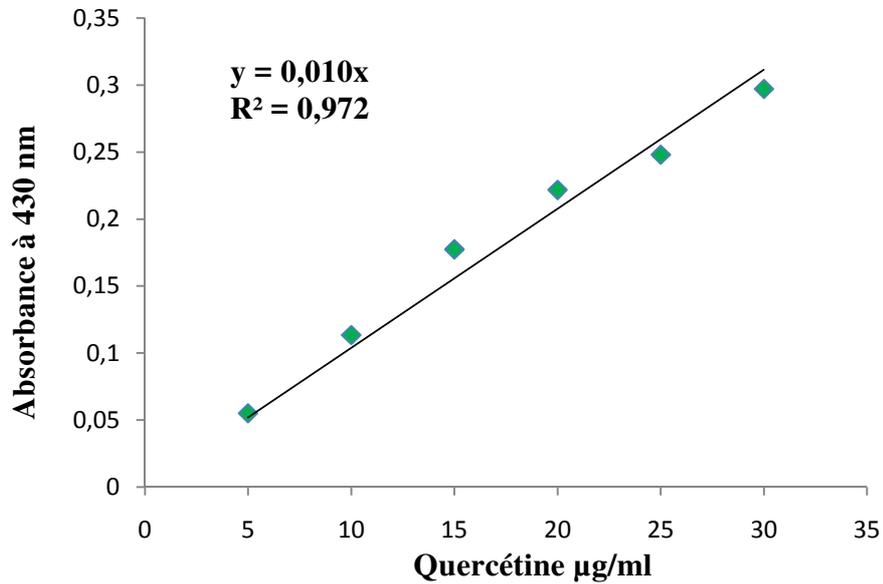
Chlorure ferrique (0,1%) : 0.1g dans 100 ml de l'eau distillée.

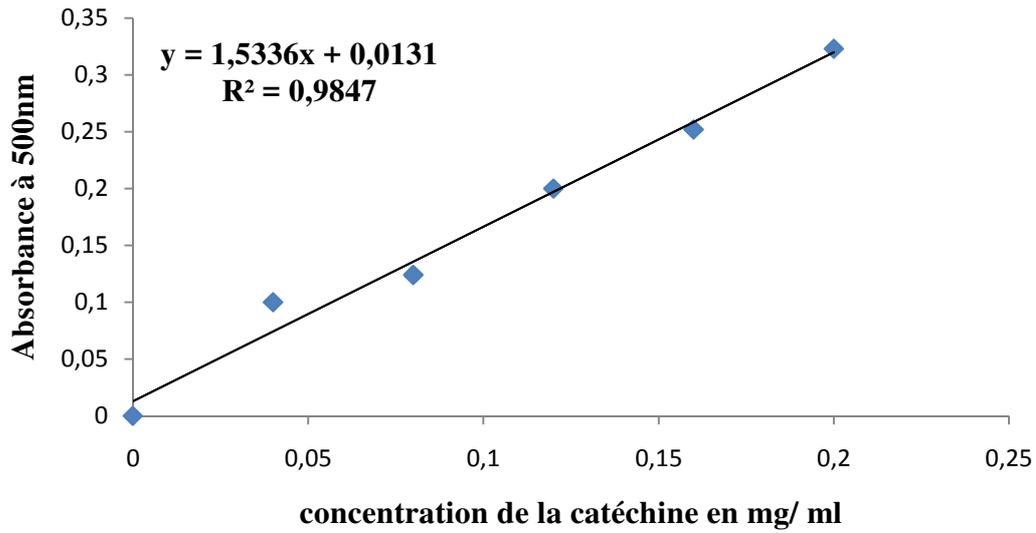
Tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) : à partir d'une solution de Na_2HPO_4 (14.2 g dans 1000ml) et NaH_2PO_4 (12 g dans 1000ml).

Activité tyrosinase

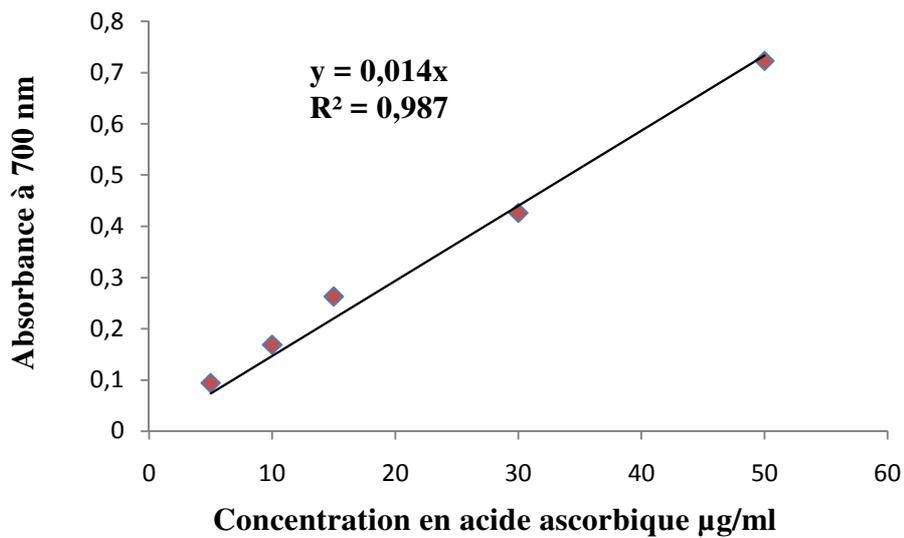
L-tyrosine (3mM) : 0.055g dans 100 ml de tampon phosphate (0.05 M, pH 7).

Tampon phosphate (0.05 M, pH7) : à partir de Na_2HPO_4 (3.55g dans 500ml) et NaH_2PO_4 (3g dans 500ml).

Annexe 4: Les différentes courbes d'étalonnage**Courbe étalonnage des polyphénols en équivalent d'acide gallique****Courbe étalonnage des flavonoïdes en équivalent de la quercétine**



Courbe étalonnage des tannins en équivalent de la catéchine



Courbe étalonnage d'acide ascorbique µg/ml

Résumé

La présente étude avait pour objectif principal l'évaluation de l'activité antioxydante et tyrosinase des extraits éthanoliques d'*Ophrys tenthredinifera*, ainsi que la détermination de leurs teneurs en molécules bioactives. Les différents extraits de la plante étudiée contiennent des taux en polyphénols et en flavonoïdes de l'ordre de 1336,01 mg EAG/ g MS et 1025,26 mg EQ/ g MS respectivement. Tous les extraits ont présenté des activités anti-radicalaire évaluée par le test au DPPH, dont les meilleurs teneurs sont enregistrés dans la fleur et la feuille avec des IC_{50} de 25.56 μ g/ml et 32.78 μ g/ml respectivement et activité antioxydante évaluée par le test de réduction du fer. D'autres parts, tous les extraits ont montré une activité modulatrice de la tyrosinase du champignon *Agaricusbisporus* dont les deux tubercules présentent un effet inhibiteur, alors que les autres parties de la plante présentent un effet activateur.

Mots clés : *Ophrys tenthredinifera*, polyphenols , activité antioxydante, tyrosinase, *Agaricusbisporus*

Abstract

The main objective of this study was to evaluate the antioxidant and tyrosinase activity of ethanol extracts of *Ophrystenthredinifera*, as well as to determine their content of bioactive molecules. The different extracts of the studied plant contain levels of polyphenols and flavonoids of the order of 1336.01 mg EAG / g MS and 1025.26 mg EQ / g MS respectively. All the extracts showed anti-radical activities evaluated by the DPPH test, the best levels of which were recorded in the flower and the leaf with IC_{50} of 25.56 μ g / ml and 32.78 μ g / ml respectively and antioxidant evaluated by the test of Reduction of iron. On the other hand, all the extracts showed a tyrosinase activity of which both tubers exhibit an inhibitory effect, while the other parts of the plant have an activating effect.

Keywords: *Ophrys tenthredinifera*, polyphenols, antioxidant activity, tyrosinase, *Agaricusbisporus*

ملخص

الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو تقييم المواد المضادة للأكسدة ودراسة النشاط المضاد للإنزيم التيروسيناز للمستخلصات الإيثانولية من *Ophrys tenthredinifera*، وتحديد محتواها من الجزيئات النشطة بيولوجيا. المستخلصات النباتية المختلفة تحتوي على مستويات من مادة البوليفينول والفلافونويد بنسب 1336,01 mg EAG/ g MS و 1025,26 mg EQ/ g MS على التوالي. كلاً من المستخلصات النباتية عرضت لاختبارات النشاط المضاد للأكسدة باختبار DPPH حيث تم تسجيل أفضل تركيز في الزهرة والورقة بنسب IC_{50} 25.56 μ g / ml و 32.78 μ g / ml على التوالي. تقيمها كذلك باختبار الحد من الحديد. كما أظهرت المستخلصات الإيثانولية، أن جميع العينات لها تأثير على نشاط تيروزيناز لفطر *Agaricusbisporus* التي تظهر تأثير كابح من طرف الدرنات، في حين أن أجزاء أخرى من النبات لها تأثير تفعيل. مفتاح الكلمات: *Agaricusbisporus* النشاط المضاد للأكسدة، التيروسيناز، *Ophrys tenthredinifera*، البوليفينول