

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Ecole Normale Supérieure Taleb
Abderrahmane de Laghouat
Département : Sciences



المدرسة العليا للأساتذة
طالب عبد الرحمان بالأغواط
قسم: العلوم

N° d'ordre : Doc/ /2018

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

Magister

Spécialité : Biologie

Option : Valorisation des bio-ressources végétales

Présenté par :

Ahmed BOUFISSIOU

Thème

Étude phytochimique et activité antioxydante des lipides et des composés phénoliques des fruits de *Phillyrea angustifolia* L.

Devant le jury composé de :

OUINTEN Mohamed	Université Amar Telidji de Laghouat	Professeur	Président
DJERIDANE Amar	Université Amar Telidji de Laghouat	Professeur	Examineur
GOURINE Nadhir	Université Amar Telidji de Laghouat	MCA	Examineur
YOUSFI Mohamed	Université Amar Telidji de Laghouat	Professeur	Encadreur
HAMIA Chahrazed	Université Amar Telidji de Laghouat	MCB	Co- Encadreur

-Avril 2018-

Dédicaces

أولاً وقبل كل شيء، الحمد لله رب العالمين...

حمداً لشكره أداءً ولحقه قضاءً، ولحبه رجاءً ولفضله نماءً ولثوابه عطاءً.

Je dédie ce mémoire :

A la mémoire de mon cher père.

A ma chère mère que Dieu la garde.

A ma chère épouse, c'est mon bonheur et ma charmante muse.

A mes chers enfants Alaae et Isserae.

A mes chères frères et sœurs.

A toute ma famille, pour leur aide, même de loin.

A tous mes amis qui ont répondu présent à chaque fois que j'avais besoin d'eux.

BOUFISSIOU Ahmed

Ce travail de recherche a été réalisé au sein du laboratoire des sciences fondamentales (LSF) à la faculté des Sciences de l'Université Amar TELIDI-Laghouat.

Je tiens à exprimer mes plus chers et vifs remerciements à Monsieur le Professeur YOUSFI Mohamed de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire (LSF). Son encadrement, en tant que directeur de mémoire, durant ces deux années a été des plus enrichissants. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour sa disponibilité et ses grandes qualités humaines d'écoute et d'attention, ainsi que pour ses nombreux conseils malgré sa charge croissante de responsabilités.

Je saisis l'occasion pour adresser toute ma gratitude et ma haute appréciation à Madame HAMIA Chahrazed Maître de conférences à l'université de Laghouat Amar Telidji, qui a co-dirigé ce travail avec beaucoup de patience et de tolérance, elle ne sera jamais assez pour lui exprimer toute ma reconnaissance pour la confiance.

Ma gratitude va également à Monsieur OUINTEN Mohamed, Professeur à l'Université de Laghouat, pour avoir accepté de juger mon mémoire et de présider le jury. J'aimerais le remercier.

Mes remerciements vont également à Monsieur DJERIDANE Amar, Professeur à l'Université de Laghouat Amar Telidji, pour avoir accepté d'être examinateur et de faire partie de mon jury de soutenance. Qu'il trouve ici le témoignage de ma gratitude.

Je souhaite remercier chaleureusement Monsieur GOURINE Nadhir, Maître de conférences à l'université de Laghouat Amar Telidji, d'avoir accepté d'évaluer ce manuscrit du mémoire ainsi que d'avoir bien voulu être membre de mon jury de soutenance.

Un merci très sincère et affectueux à Monsieur BENALIA Mohamed, Maître de conférences à l'université de Laghouat Amar Telidji, pour votre soutien, vos encouragements et votre disponibilité.

Je ne saurais oublier les enseignants chercheurs du laboratoire de recherche LSF et mes collègues, que j'ai eu la chance de rencontrer durant ces deux années et demi. Merci pour ces échanges, ces discussions animées. Les moments partagés avec vous font partis des meilleurs souvenirs.

Enfin, je tiens à remercier ceux que j'aurais malheureusement oubliés de citer.

الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تحديد التركيب الحمضي الدهني والجليسيريدي لزيت ثمار نبتة القتم *Phillyrea angustifolia* من فصيلة الزيتونيات (*Oleaceae*) وتقدير كمية التوكوفيرولات والستيرولات الكلية وكذا تحديد كمية الفينولات الكلية في كُسب (تُقل أو جفت) الثمار وتقييم نشاطها المضاد للأكسدة.

دلت النتائج أن ثلاثي الجليسريد الموجود في ثمار القتم يحتوي على الأحماض الدهنية الشائعة بكثرة في الثمار أو البذور الزيتية بصفة عامة، كما أظهر هذا الزيت أيضا غناه بالأحماض الدهنية غير المشبعة الأحادية بنسبة إجمالية تساوي أو تفوق 83% تتمثل أساسا في كل من حمض الأوليك واللينوليك، وبالموازاة تم رصد كمية معتبرة فيها من الأحماض الدهنية المشبعة: اللوريك وميريستيك والبالمتيك والمارجريك والأراشيدونيك.

تم تحديد أنواع المتماكبات الجزئية لثلاثي الجليسريد الموجودة في زيت الثمار المستخلص بواسطة الهكسان؛ اعتمادا على تقنية الهضم الإنزيمي والكروماتوغرافيا الغازية، وكان الموضع sn-2 في غليسروول ثلاثي الجليسريد مشغول إلى حد كبير فقط بالأحماض الدهنية غير المشبعة (C18) خصوصا كل من الأوليك واللينوليك، وكانت هذه المتماكبات على التوالي: OLS، OLL، POL، OSO، OOP، OOL، OOO.

POP، OOLn، OOLa، POS

كشف التقدير الكمي اللوني على أن زيت ثمار القتم هو زيت غني أيضا بالستيرولات والتوكوفيرولات، بالموازاة أكد تحديد المحتوى الكلي للفينولات أن الثمار غنية بالمركبات الفينولية.

أظهرت الدهون والمركبات الفينولية لثمرة القتم نشاط كبير كمضادات للأكسدة بعد تقييم نشاطها بواسطة طريقة تثبيط الجذور الحرة DPPH، وقد تفاوتت قيم تقدير النشاط المضاد للأكسدة بين أصناف الدهون والمركبات الفينولية، وعليه يمكن اعتبار ثمار القتم مصدر مكمل فيما يتعلق بمضادات الأكسدة والعناصر الغذائية المتمثلة أساسا في الأحماض الدهنية غير المشبعة.

الكلمات المفتاحية:

Phillyrea angustifolia، ثلاثي الجليسريد، الهضم الإنزيمي، المركبات الفينولية، النشاط المضاد للأكسدة،

الجذور الحرة DPPH.

Résumé

L'objectif de cette étude est de déterminer la composition des acides gras et des triacylglycérols de l'huile de fruits de *Phillyrea angustifolia L* et le dosage des tocophérols et phytostérols totaux. Ainsi, la quantification des composés phénoliques des tourteaux et l'évaluation de leurs activités antioxydantes.

D'après les résultats des analyses, nous avons constaté que la fraction glycéridique de ces fruits renferme des acides gras habituellement rencontrés dans les fruits ou les graines oléagineuses. L'huile de la fraction hexanique de ces fruits s'est avérée riche en acides gras mono insaturés (AGMI) avec un pourcentage total supérieur à 83% et qui sont représentés essentiellement par les acides oléique et linoléique et une quantité importante d'acides gras saturés : laurique, myristique, palmitique, margarique, stéarique et arachidique.

Les espèces moléculaires des TAG ont été identifiées et quantifiées par la combinaison de la digestion enzymatique et par CPG. La position sn-2 est principalement occupée par les acides gras insaturés C18 (oléique et linoléique) ; les isomères des TAGs retrouvés dans l'huile sont les isomères qui résultent de la combinaison des acides palmitique, stéarique, laurique, oléique, linoléique et linoléique : OOO, OOL, POO, OSO, POL, OLL, OLS, POS, OOLa, OOLn, et POP.

Le dosage colorimétrique révèle que l'huile de notre fruit est une huile riche en stérols et en tocophérols.

La teneur en phénols totaux nous a permis de confirmer que les fruits de *Phillyrea angustifolia* sont des sources très prometteuses en composés phénoliques.

Les lipides et les composés phénoliques des fruits de *Phillyrea angustifolia L* présentent une bonne activité antioxydante. Cette dernière a été évaluée par la méthode du piégeage du radical libre DPPH et les valeurs obtenues sont variables vis-à-vis des composés phénoliques et des lipides.

En conséquence, nous pouvons considérer ces fruits comme un apport potentiel en antioxydants et un complément nutritionnel représenté essentiellement par les acides gras insaturés.

Mots clés :

Phillyrea angustifolia, triglycérides, phytostérols, composés phénoliques, activité antioxydante, radical libre DPPH.

Abstract

The purpose of this study is to determine the fatty acid and triglyceride composition of the *Phillyrea angustifolia L* fruit oil and the dosage of total tocopherols and phytosterols. Thus, the quantification of the phenolic compounds of the oil cake and the evaluation of their antioxidant activities.

According to the results of the analysis, we found that the glyceride fraction of these fruits contains fatty acids usually found in oil fruits or seeds. The oil of the hexanic fraction of these fruits has been found to be rich in mono-unsaturated fatty acids (MUFA) with a total percentage greater than 83% which are mainly represented by oleic and linoleic acids and a significant amount of saturated fatty acids: lauric, myristic, palmitic, margaric, stearic and arachidic acids.

The molecular species of TAGs were identified and quantified by the combination of enzymatic digestion and Gas chromatography. The position sn-2 is mostly occupied by the unsaturated fatty acids C18 (oleic and linoleic); the isomers of the TAGs found in the oil are the isomers that result from the combination of palmitic, stearic, lauric, oleic, linoleic and linolenic acids: OOO, OOL, OOP, OSO, POL, OLL, OLS, POS, OOLa, OOLn, and POP.

The colorimetric assay revealed that our fruit oil is rich in phytosterols and in tocopherols. Total phenol content has confirmed that *Phillyrea angustifolia* fruit is a very promising source of phenolic compounds.

The lipids and phenolic compounds of *Phillyrea angustifolia L* fruits show good antioxidant activity. This latter was evaluated by the DPPH free radical scavenging method and the values obtained are variable with respect to phenolic compounds and lipids. As a result, we can consider these fruits as a potential antioxidants supply and nutritional supplement represented essentially by the unsaturated fatty acids.

Keywords:

Phillyrea angustifolia, triglycerides, phytosterols, phenolic compound, antioxidant activity, DPPH free radical.

Table de matière

Liste des notations	viii
Liste des figures	ix
Liste des tableaux	x
Introduction générale	- 1 -
Partie I : Aperçu bibliographique	- 4 -
<i>Chapitre I : L'espèce <i>Phillyrea angustifolia</i> L, l'olivier sauvage.</i>	- 5 -
I.1. Position systématique de <i>Phillyrea angustifolia</i> L au sein des <i>Oléacées</i>	- 6 -
I.2. Le genre <i>Phillyrea angustifolia</i> L	- 7 -
I.3. Distribution géographique :	- 8 -
I.4. Usage et propriétés :.....	- 8 -
<i>Chapitre II : Généralités sur les corps gras.</i>	- 9 -
II.1. Définition	- 13 -
II.2. Principaux constituants des lipides	- 13 -
II.2.1. Acides gras	- 13 -
II.2.1.1. Analyse des acides gras	- 14 -
II.2.2.1. Etude des structures des triacylglycérols.....	- 16 -
II.2.2.2. Complexité des triglycérides	- 16 -
II.2.2.3. Analyse stéréospécifique	- 18 -
II.2.2.3.A. Méthode sn-1,2 (2,3) -diglycéride du Brockerhoff	- 18 -
II.2.2.3.B. Méthode sn-1, 3-diglycéride du Brockerhoff	- 19 -
II.2.3. Cérides	- 21 -
II.2.4. Stérides	- 21 -
II.2.5. Glycérophospholipides (phosphatides)	- 21 -
II.2.6. Phytostérols	- 21 -
II.2.7. Tocophérols	- 22 -
<i>Chapitre III : Généralités sur les composés phénoliques</i>	- 25 -
III.1. Généralités	- 26 -
III.2. Classification	- 26 -
III.2.1. Composés non-flavonoïdes	- 28 -
III.2.1.1. Phénols simples	- 28 -
III.2.1.2. Acides phénoliques.....	- 28 -
III.2.1.3. Stilbènes	- 29 -
III.2.1.4. Tanins	- 30 -
III.2.2. Flavonoïdes	- 32 -
III.4. Intérêts des composés phénoliques	- 35 -

Table de matière

III.4.1. Importance dans la vie de la plante	35 -
III.4.2. Importance pour l'homme	35 -
Chapitre VI : Généralités sur l'activité antioxydante.	36 -
VI.1. Espèces oxygénées activées (EOA)	36 -
VI.2. Stress oxydant	37 -
VI.3. Mécanismes naturels de défense contre les EAO	38 -
VI.3.1. L'antioxydant	38 -
VI.3.1.1. Vitamine C (acide ascorbique).....	39 -
VI.3.1.2. Vitamine E	40 -
VI.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante	41 -
Partie II : Expérimentale	42 -
Chapitre I : Matériel et méthodes.	43 -
I.1. Matière végétale	44 -
I.2. Produits et solvants utilisés	44 -
I.3. Traitements et extractions	44 -
I.3.1. Préparation des échantillons.....	44 -
I.3.2. Extraction et fractionnement des lipides	44 -
-Première méthode : extraction par méthode de Folch.....	44 -
-Deuxième méthode : extraction par l'hexane.....	45 -
-Fractionnement des lipides totaux	45 -
I.3.3. Méthylation au trifluorure de bore (BF ₃)	46 -
I.3.4. Etude des structures des triacylglycérols	47 -
I.3.4.1. Préparation de TAG	47 -
I.3.4.2. Hydrolyse enzymatique.....	47 -
I.3.4.3. Séparation des monoglycérides en position sn-2 :	48 -
I.3.5. Dosage spectrophotométrique des tocophérols des huiles et des LN :	48 -
I.3.6. Dosage spectrophotométrique des phytostérols des huiles et des LN	48 -
I.3.7. Extraction et quantification des composés phénoliques	49 -
I.3.7.1. Extraction des composés phénoliques.....	49 -
I.3.7.1. Analyse quantitative des composés phénoliques	49 -
I.3.7.1.1. Dosage des phénols totaux	49 -
I.3.7.1.2. Dosage des flavonoïdes	50 -
I.3.8. Evaluation de l'activité antioxydante	50 -
I.3.8.1. Test du DPPH•	50 -
Chapitre II : Résultats et discussion.	52 -
II.1. Traitement et extraction	53 -
II.1.1. Rendements en lipides	53 -

Table de matière

II.1.2. Analyse des acides gras	- 54 -
II.3.3. Etude des structures des triacylglycérols	- 56 -
II.3.3.1.1. Préparation de TAG	- 56 -
II.3.3.1.2. Hydrolyse enzymatique	- 57 -
II.3.4. Détermination des TAG à partir des acides gras en position sn-2	- 58 -
II.3.5. Dosage spectrophotométrique des phytostérols des huiles et LN	- 62 -
II.3.6. Extraction et analyse quantitative des composés phénoliques	- 63 -
II.3.6.1. Quantification des composés phénoliques	- 63 -
II.3.6.1.1. Quantification des phénols totaux	- 63 -
III.5.1.2. Quantification des flavonoïdes	- 65 -
I.3.7. Évaluation de l'activité antioxydante	- 66 -
I.3.7.1. Test du DPPH•	- 66 -
- Extraits lipidiques	- 66 -
- Extraits phénoliques	- 68 -
Conclusion générale et perspectives	- 70 -
Références bibliographiques	- 73 -
Annexes	- 85 -

Liste des notations

AFNOR	Association Française de Normalisation
AG	Acide gras
AGI	Acide gras insaturé
AGL	Acide gras libre
AGPI	Acide gras polyinsaturé
AGS	Acide gras saturé
CCM	Chromatographie sur couche mince
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
DAG	Diacylglycérol (Diglycéride)
DPPH	Diphényl-2, 2 picryl-1 hydrazines
EC50	Efficiency Concentration, Concentration efficace pour réduire 50% des radicaux libres
EMAG	Ester méthylique d'acide gras
EOR	Espèces oxygénées réactives
FID	Détecteur à ionisation de flamme
ISF	Indice de Surface Foliaire
TAG	Triacylglycérol
TG	Triglycéride
AGTI	Acides Gras Totaux Insaturés
AGTS	Acides Gras Totaux Saturés
BHA	Hydroxyanisole butylé
BHT	Hydroxytoluène butylé
EAG	Équivalent en acide gallique
EQE	Équivalent en quercétine

Liste des figures

Partie I : Un aperçu bibliographique

Figure .I.1 : Photo du rameau du <i>Phillyrea angustifolia</i> L.	07
Figure .II.1 : Les briques élémentaires des lipides.	13
Figure .II.2 : La structure générale des triacylglycérols (TAG).	16
Figure .II.3 : Analyse stéréospécifique des triglycérides.	20
Figure .II.4 : Les structures chimiques du cholestérol et certains phytostérols.	22
Figure .II.5 : La structure générale du cholestérol et phytostérol.	23
Figure .III.1 : Les phénols simples.	27
Figure .III.2 : Les dérivés de l'acide Hydroxybenzoïque.	28
Figure .III.3 : Les dérivés de l'acide Hydroxycinnamique	28
Figure .III.4 : Les stilbènes.	29
Figure .III.5 : La structure chimique des tanins.	30
Figure .III.6 : La classification des tanins.	31
Figure .III.7 : La structure basique des flavonoïdes.	32
Figure .III.8 : Les structures des principaux flavonoïdes.	33
Figure .VI.1 : Les principales sources d'EAO et les systèmes antioxydants naturels.	37
Figure .VI.2 : La représentation chimique des molécules d'ascorbate réduite et oxydée.	40

Partie II : Expérimentale

Figure .I.1 : Mécanisme de réduction DPPH•.	51
Figure .II.1 : L'huile brute de F3, révélée avec l'iode.	57
Figure .II.2 : Les produits de l'hydrolyse enzymatique des TAG de F3.	57
Figure .II.3 : Les six isomères de TAG possibles.	58
Figure .II.4 : Les principaux triacylglycérols contenus dans l'huile des fruits étudiés.	59
Figure .II.5 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	63
Figure .II.6 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.	66

Liste des tableaux

Partie I : Un aperçu bibliographique

Tableau .II.1 : Compositions en acides gras de quelques huiles végétales.	15
Tableau .II.2 : Les formules pour calculer le nombre maximal de triglycérides possibles.	17
Tableau .II.3 : Les principaux phosphoglycérides.	21
Tableau .III.1 : Les principales classes des composés phénoliques.	26

Partie II : Expérimentale

Tableau .II.1 : Les teneurs et les rendements des huiles et des lipides totaux des échantillons F1, F2, F3 de <i>Phillyrea angustifolia</i> .	53
Tableau .II.2 : Composition relative en acides gras des LT et des LN des fruits étudiés.	54
Tableau .II.3 : Composition relative en acides gras des PL et des GL des fruits étudiés.	56
Tableau .II.4 : Taux des différents AG dans les positions sn-2 et sn-(1+3) de l'échantillon F3.	58
Tableau .II.5 : Composition triglycéridique de l'huile selon Coleman et Gunstone.	60
Tableau .II.6 : Les proportions relatives des quatre catégories des TAGs.	61
Tableau .II.7 : Les teneurs en tocophérols de l'huile et des LN des fruits étudiés.	62
Tableau .II.8 : les teneurs en phytostérols de l'huile et des LN des fruits étudiés.	63
Tableau .II.9 : Teneur en composés phénoliques dans les tourteaux hexanique (F1+2, F3).	64
Tableau .II.10 : Teneur en flavonoïdes des les tourteaux hexanique (F1+2, F3).	66
Tableau .II.11: Résultats du test DPPH (mg/ml) des extraits lipidiques.	67
Tableau .II.12: Résultats du test DPPH (µg/ml) des extraits phénoliques	68

Introduction générale

L'espèce *Phillyrea angustifolia* est un arbuste de la famille des Oleaceae, elle appartient au genre *Phillyrea* qui regroupe trois espèces, les autres étant *Phillyrea latifolia* et *Phillyrea media*, c'est un arbuste méditerranéen, assez proche de l'olivier et dont l'habitat naturel est de type garrigue. Cette espèce est présente dans les pays du bassin méditerranéen.

Phillyrea angustifolia, connu sous le nom local « el-ketem » pousse aussi en Algérie dans les régions du moyen atlas (région de Média, Tiaret, Mdejedel De M'sila). L'arbuste produit de petites drupes renferment un noyau qui devient noirs bleu en automne, elles ne sont pas comestibles. Mis à part les fruits, on trouve les feuilles qui sont utilisées en médecine traditionnelle.

Dans l'espoir de valoriser les plantes médicinales de la flore algérienne utilisées dans la médecine traditionnelle, nous avons eu recours à l'étude phytochimique de fruits du *Phillyrea angustifolia* (ou Filaire à feuilles étroites), cette valorisation consiste à étudier les principaux constituants chimiques des lipides de fruits, mais aussi d'évaluer l'activité antioxydante des lipides et des extraits phénoliques de leurs tourteaux, afin de mettre en évidence leurs importance sur le plan nutritionnel et pharmaceutique.

Ce travail a été entrepris pour plusieurs raisons :

- Cette plante est couramment rencontrée dans toutes les régions du nord du pays.
- C'est souvent employé en médecine traditionnelle pour des usages divers.
- Les fruits de cette plante contiennent une quantité en matière grasse.
- A notre connaissance aucun travail n'a été consacré à l'étude phytochimique des fruits de cette plante.

Pour ces raisons il nous a paru donc intéressant d'une part d'étudier les constituants de l'huile extraite des fruits, tels que les acides gras, les triglycérides, les tocophérols et les phytostérols, et d'autre part d'évaluer le contenu des tourteaux de fruits en phénols totaux et leurs activité antioxydante.

En effet, les travaux de recherche consacrés à l'étude phytochimique de cette plante locale à notre connaissance restent pour l'instant insuffisants. Parmi ces travaux, un groupe de chercheurs italiens (Romani *et al.*, 1996) a réalisé une extraction puis une identification des composés phénoliques des feuilles de *Phillyrea angustifolia* L. Un autre groupe de chercheurs tunisiens (Sana *et al.*, 2014) a déterminé les composants en acides gras et les polyphénols des feuilles de *Phillyrea angustifolia* L.

Dans le cadre de ce mémoire, notre travail sera donc présenté en deux parties, la première partie sera consacrée à l'étude de la composition chimique en acides gras des lipides de fruits car à notre connaissance aucune analyse chimique des deux fractions saponifiable et insaponifiable de l'huile de fruits n'a été conduite auparavant sur cette espèce.

Nous montrerons dans un premier temps comment, en combinant différentes méthodes chromatographiques de déterminer la composition en acides gras totaux, la nature des triglycérides et la distribution des acides gras sur les positions internes et externes de la chaîne du glycérol. Dans un second temps, nous doserons les quantités des tocophérols et des phytostérols dans les lipides des fruits.

Dans la deuxième partie, nous étudierons l'extraction des composés phénoliques ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante et celle des lipides.

À l'issue de cette étude, nous pouvons établir une carte d'identité phytochimique initiale pour les fruits de cette plante ce qui conduira à dégager les principaux caractères chimio-taxonomiques de *Phillyrea angustifolia* et définir les domaines de valorisation dans lesquels les lipides et des tourteaux des fruits de *Phillyrea angustifolia* pouvant offrir les meilleurs résultats.

Enfin, cette espèce étant un arbuste à vertus médicinales réputée dans notre pays et dans certains pays du monde, l'étude de l'activité antioxydante des lipides et des composés phénoliques pourrait justifier les propriétés thérapeutiques de *Phillyrea angustifolia*.

Partie I : Aperçu bibliographique

*Chapitre I : L'espèce Phillyrea angustifolia L,
l'olivier sauvage.*

Phillyrea angustifolia L. est une espèce du maquis côtier méditerranéen très adaptée aux conditions externes défavorables par rapport aux autres genres d'oléacées. Le genre *Phillyrea* présente un indice de surface foliaire (ISF) le plus élevé, ce qui lui permet de maintenir un bilan de carbone substantiellement positif, c'est-à-dire une grande croissance et encore une grande biomasse végétale dans les conditions anormales du sol et les stress atmosphériques.

Cette espèce s'adapte généralement au climat chaud ainsi aux sols rocaillieux sec et calcaire, cependant elle est bien implantée dans les sols limoneux à texture argileuse, et dans les régions à l'hiver rigoureux. Cette plante préfère encore les terrains siliceux. On la trouve souvent accompagnée ou près de l'espèce *Ligustrum vulgare*. (Weiss, 1998)

I.1. Position systématique de *Phillyrea angustifolia L* au sein des *Oléacées* :

La famille des Oléacées a été reconnue distincte en 1809 par Hoffmannsegg J.C, Von Graf et G.F. (Piechura *et al.*, 1983) Elle se compose des plantes dicotylédones ; contenant environ 600 espèces réparties en 25 à 30 genres selon la classification qui est adoptée ; évolue plutôt sous des climats tropicaux.(Bartolini *et al.*,2002) Les oléacées au sens large sont des plantes ligneuses, arbustes et des arbres et rarement des lianes, ses feuilles habituellement opposées, simples ou composées (pennés, 3 foliotées), sans stipules.

Le nom de l'*Oleaceae* provenant d'*Olea*, nom latin de l'olivier. Sa distribution géographique est très étendue, ce qui a été montrée déjà en couleur rouge sur la carte : l'Amérique, l'Eurasie principalement, l'Afrique sauf les zones incolores au centre et l'Australie, son existence est documentée depuis le Miocène supérieur. (Sachse, 2001).

La majorité des genres cités auparavant sont hermaphrodites et l'hybridation entre-eux est abondante, mais il y a une grande variété de systèmes particuliers de reproduction.

Les espèces de cette famille, et notamment l'espèce *Olea europaea L.*, sont caractérisées par la présence de grandes quantités de composés phénoliques. Les composés de cette classe, comme les flavonoïdes et les flavonoïdes glycosides ; interviennent dans les différentes réponses d'adaptation chez les plantes exposées aux conditions externes défavorables. Plusieurs glycophytes, tels que l'olive, ont développé des mécanismes pour résister ou s'adapter aux conditions de stress hydrique et salin...

Ces espèces accumulent généralement des osmolites compatibles, tels que des alcools de sucre. (Romani *et al.*, 1996)

I.2. Le genre *Phillyrea angustifolia* L :

Filaire ou Filaria à feuilles étroites, Alavert, Aouret, Taradéou. **Figure I.1** (Rameau, Mansion, et Dumé, 2008)



Figure .I.1 : Photo du rameau du *Phillyrea angustifolia* L.

- Embranchement : *phanérogame*
- Sous embranchement : *Angiosperme*
- Classe : dicotylédone
- Sous classe : *gamopétale*
- Sous série : Diplostèmone ou pentacyclique
- Ordre : Gentianale
- Familles : Oléacées ou oléinées
- Genre : *Phillyrea*
- Espèces : *angustifolia*.

*[*Phyllirea*] nom donné par Tournefort en 1719. Son nom vient du grec « phullon » : feuille (arbrisseaux à feuilles persistantes et nombreuses).

*[*angustifolia*] dérive du latin « angustus », qui signifie « étroit » et « defolia » qui signifie feuille.(Sébastien, 1956)

I.3. Distribution géographique :

- Typique de la flore méditerranéenne, et surtout à l'ouest du bassin méditerranéen et, du Portugal jusqu'à l'ex-Yougoslavie qui regroupait les actuels pays de Slovénie, Croatie, Bosnie-Herzégovine, Monténégro, Serbie, Macédoine, ainsi que le Kosovo.
- Très rare : elle est présente de façon sporadique dans la plaine littorale ;
- Elle se trouve dans la zone des garrigues, où elle est commune mais rarement dominante ;
- Son extension due principalement au changement de mode d'utilisation de la terre, et à la dispersion de ses graines par les oiseaux.
- Au niveau de l'Algérie, elle est localisée sur la région tellienne, étendue vers l'intérieur jusqu'à l'Atlas saharien (Aurès, particulièrement), dans les maquis et les forêts claires.(Traveset, 1994)

I.4. Usage et propriétés :

D'après Dioscorides 1er siècle av. J.-C. a décrit l'utilisation médicinale des feuilles, qui ont été mâchées contre les inflammations oropharyngées, tandis qu'une décoction des parties aériennes a été revendiquée pour être active contre les brûlures et les maux de tête (Blondel et Aronson, 1999) .

Le feuillage était couramment utilisé chez les gens locaux pour leurs propriétés antiulcéreuses, analgésiques. On bout l'écorce des rameaux dans l'eau pendant 15 minutes, ensuite on ajoute le miel et on boit un verre deux fois par jour pendant deux semaines contre les ulcères gastriques et contre les douleurs intestinales.

Chapitre II : Généralités sur les corps gras.

II.1 Définition :

Les corps gras ou bien les lipides sont des substances d'origine biologique très diversifiées relativement insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques non polaires (Hexane, chloroforme, cyclohexane, éther éthylique ...). Les termes d'huiles, beurres, graisses, cires ne désignent que leur état physique liquide ou solide à la température ambiante. On peut citer que les lipides se trouvent soit complètement apolaire (lipide neutre) soit bipolaire c'est-à-dire une molécule amphiphile (ou amphipathique) avec une tête polaire liée à une chaîne fortement apolaire (queue).

Les lipides proviennent essentiellement de deux types de partie de sous-unités biochimiques ou de briques élémentaires : les groupes *cétoacyle* d'une part et les unités *isoprène* d'autre part **Figure**

.II.1 . (Fahy, Cotter, Sud, et Subramaniam, 2011)

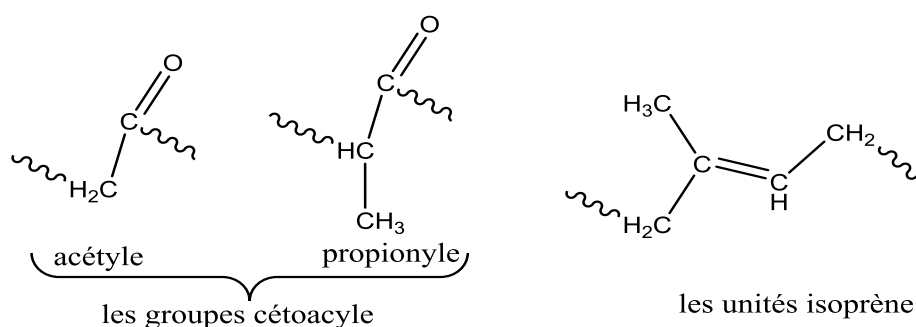


Figure .II.1 : Les briques élémentaires des lipides

II.2. les principaux constituants des lipides :

II.2.1. Les acides gras :

Ce sont des acides monocarboxyliques à chaîne aliphatique, ternaires de type hydrocarbure (C, H, O), généralement linéaires sous forme des chaînes de nombre d'atome de carbone variable de 4 à 32 qui donne à la molécule son caractère hydrophobe (gras). Dans leur grande majorité les acides gras ont un nombre pair d'atome de carbone. La définition la plus large inclut toutes les longueurs de chaîne : les acides gras volatils, avec 2, 3 ou 4 atomes de carbone, les acides gras à chaîne courte (plus de 10 atomes de carbone), les acides gras à chaîne moyenne (12 atomes de carbone et 16 atomes de carbone). Les acides gras à chaîne longue (plus de 16 atomes de carbone), ils peuvent être saturés ou insaturés et le plus souvent non ramifiés, ils sont notés C_n : m, où n représente le nombre d'atomes de carbone et m est le nombre de doubles liaisons. La différence entre les acides gras saturés et insaturés c'est le dernier contient au moins une double liaison éthylénique dans leur structure. La présence et la position de cette double liaison éthylénique dans les acides gras insaturés provoque l'existence de deux isomères de configuration *Cis* et *Trans* et la forme *Cis* est le plus commun dans le règne végétal

Les acides gras d'origine végétale sont de types polyinsaturés, mono ou saturés, ce type détermine la qualité des lipides dans l'industrie agro-alimentaire. Généralement, les acides gras sont inertes sauf en présence du groupe OH ou un double liaison, les acides gras insaturés peuvent fixer l'hydrogène en

donnant des acides gras saturés et aussi des halogènes comme le brome et l'iode. Les végétaux sont capables de synthétiser l'acide linoléique (C18 :3 n-6) et l'acide α -linoléique (C18 :3 n-3). Par contre l'homme et les mammifères sont incapables de transformer un acide gras de la série n-6 en n-3 et vice versa. (Colette et Monnier, 2011) Encore, le degré d'insaturation acide gras augmente la fluidité des lipides membranaires.

Les doubles liaisons sont des zones fragiles, dans ces conditions, les agents oxydants peuvent les oxygéner en formant des époxydes et des peroxydes. La formation des peroxydes se conduit de l'apparition de produits chimiques secondaires (aldéhydes, cétones, acides et peroxydes) responsables du rancissement.

II.2.1.1. Analyse des acides gras :

L'analyse des acides gras qui interviennent dans la structure du corps gras ou lipides d'origine végétale comme les triglycérides ou les phospholipides revêt une extrême importance pour connaître la composition des lipides. En fait, on peut classer les corps gras d'origine végétale selon leur composition en acides gras en quatre familles principales **Tableau II.1** :

- famille oléique ou cet acide gras, principal représentant des acides gras monoinsaturés (AGMI), est majoritaire : huiles d'olive, d'arachide, de noisette, les variétés de tournesol et de colza riches en acide oléique et l'huile de colza elle-même ;
- famille linoléique ou cet acide gras (C18:2 ω -6), acide gras polyinsaturée (AGPI), est majoritaire : huiles de soja, de tournesol, de germe de maïs et de pépins de raisin ;
- famille α -linoléique ou cet acide gras (C18 :3 ω -3/AGPI) est présent en quantité significative : huiles de colza, de soja, de noix et de lin ou cet acide gras est majoritaire ;
- famille des corps gras riches en acides gras saturés (AGS) avec leurs principaux représentants (C12 :0, C16 :0, C18 :0) présents en quantité moyenne à forte : les huiles de palme, les huiles de palmiste et de coprah riches en acide Laurique (C12 :0), le beurre de cacao et pour comparaison la matière grasse de beurre. (Liu, 1994)

La technique la plus utilisée pour l'analyse des lipides est la chromatographie en phase gazeuse CPG, Afin d'analyser les acides gras des lipides par CPG il est nécessaire de préparer des dérivés non polaires volatiles de différents types, mais habituellement les esters méthyliques. Les esters méthyliques sont couramment préparés par transestérification directe des triglycérides ou des phospholipides en présence d'un catalyseur qui est soit acide (HCl, H₂SO₄, BF₃ dans le méthanol) soit basique (méthanolate de sodium ou de potassium). En plus, Le diazométhane est un autre réactif de méthylation. En comparaison aux catalyseurs acides, il estérifie les acides gras plus rapidement, mais

il n'a pas la capacité de catalyser la transestérification des lipides. En conséquence, avant le diazométhane est utilisé pour la préparation de EMAG's à partir de lipides, il est nécessaire souvent hydrolyse alcaline et un traitement thermique qui peut durer de quelques minutes à plusieurs heures. Ces méthodes ont été largement décrites par plusieurs auteurs.

La possibilité d'identifier les acides gras est uniquement par les temps de rétention CPG, mais récemment la CPG couplée avec la spectrométrie de masse (CPG/SM), peut former un moyen extrêmement puissant de caractérisation et identification des acides gras.

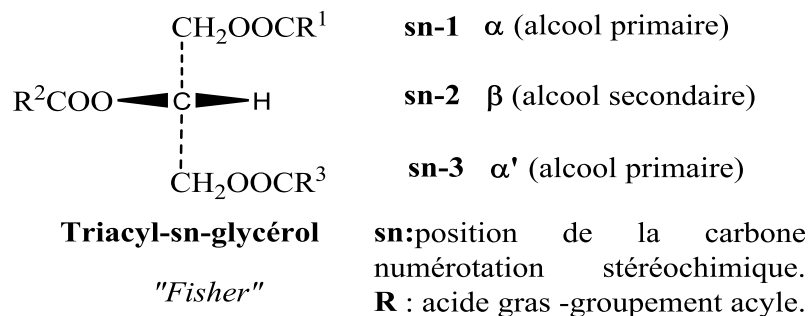
Tableau .II.1 : compositions en acides gras de quelques huiles végétales s'inspiré d'après ("ITERG,"; Morin *et al.*, 2012).

Répartition en acides gras (%)	Huile de						
	Arachide	Colza	Mais	Noix	Olive	Soja	Tournesol
C16 :0	8-13	1-5	8-13	6-8	8-14	8-13	5-7
C17 :0	< 0,1	-	-	< 0,1	< 0,2	-	< 0,1
C18 :0	3-4	1-2	1-4	1-3	3-6	2-5	4-6
C20 :0	1-2	< 1	< 1	< 0,3	< 0,5	< 1,2	< 1
C22 :0	2-4	< 0,5	< 0,5	< 0,2	< 0,9	< 0,5	< 1
C24 :0	1-2	-	-	-	-	-	-
Saturés totaux	15-25	2-8	10-18	7-11	13-22	12-20	11-15
C16 :1	< 0,3	< 1	< 1	< 0,2	1	< 0,2	< 0,4
C18 :1	48-66	55-62	24-32	14-21	61-80	17-26	15-25
C20 :1	1-2	1-2	< 0,5	< 0,3	< 0,4	< 0,4	< 0,5
C22 :1	-	< 1	-	-	-	-	-
Monoinsaturés totaux	49-68	56-65	25-33	14-21	62-81	18-27	16-26
C18 :2	14-28	18-22	55-62	54-65	3-14	50-62	62-70
C18 :3	< 0,3	8-10	< 2	9-15	< 1	4-10	< 0,2
Polyinsaturés totaux	14-28	26-32	57-64	63-80	4-15	54-72	62-70

II.2.2. Les acylglycérols ou glycérides :

Les triacylglycérols (TAG), appelés aussi « graisses neutres » sont des constituants les plus abondants d'une huile végétale constitués d'un squelette glycérol estérifié par trois acides gras **Figure II.2**. Les TAG se classent en deux catégories selon la nature et la position des trois acides gras sur le squelette glycérol : les TAG homogènes, estérifiés par trois acides gras identiques et les TAG hétérogènes qui contiennent au moins deux chaînes d'acides gras différentes. Les TAG hétérogènes peuvent être symétriques ou dissymétriques.

On remarquera cependant que les acides gras saturés estérifient préférentiellement les fonctions alcool primaire (positions 1 et 3) du glycérol et que les acides gras insaturés estérifient principalement sa fonction alcool secondaire (position 2).



Nomenclature : 1-R1, 2-R2, 3-R3, sn-glycérol

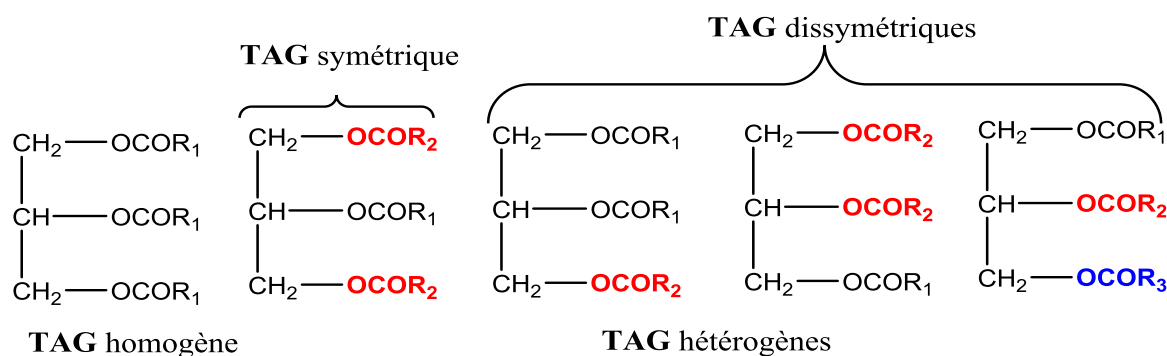


Figure .II.2 : La structure générale des triacylglycérols (TAG).

II.2.2.1. Etude des structures des triacylglycérols :

L'étude des structures des triacylglycérols comprend à connaître comment les trois acides gras se distribuent entre les fonctions alcools du glycérol. Cette distribution est aussi importante à connaître que la composition en acides gras ; y compris le nombre de combinaisons possibles des acides gras et du glycérol. C'est ce que l'on fait en déterminant une structure simplifiée à l'aide des méthodes chromatographiques :

- répartition des triacylglycérols par masse moléculaire (CPG) ;
- séparation et identification des triacylglycérols par chromatographie liquide sur phase inverse. La séparation des triacylglycérols par groupes en fonction de leur insaturation globale est intéressante pour découvrir des adultérations d'une huile par une autre ;
- hydrolyse sélective et analyse des 2-monoglycerides. (Jean, 2009)

II.2.2.2. La complexité des triglycérides :

Lorsqu'un mélange de n acides gras différents est estérifié avec du glycérol, le nombre de triglycérides possibles qui peuvent être formés par la combinaison ternaire des divers acides gras peut être calculé en utilisant les formules du **tableau II.2**, il est évident que le nombre de triglycérides possibles peut être inférieur à la moyenne indépendamment de leur forme isomères.

Tableau .II.2 : les formules pour calculer le nombre maximal de triglycérides possibles qui peuvent être formés à partir de différents acides gras.

Isomères distingués	formules	exemple (n = 2)
Tous les isomères distingués	n^3	SSS, sn-SSU, sn-SUS, sn-USS, sn-SUU, sn-USU, sn-UUS, UUU.
Les isomères optiques ne sont pas distingués	$\frac{n^3 + n^2}{2}$	SSS, β -SSU, β -SUS, β -SUU, β -USU, UUU.
Aucun isomère distingué	$\frac{n^3 + 3n^2 + 2n}{6}$	SSS, SSU, SUU, UUU.

*S : saturé, *U : insaturé

Le développement de méthodes analytiques pour déterminer la composition en acides gras des triglycérides a commencé, lorsque le chimiste Chevreul a identifié les graisses comme des esters du glycérol avec des acides gras. Dans ses expériences qui conduisirent à cette découverte, Chevreul, en 1815, cristallisa du saindoux dans l'éthanol bouillant, Dans la même année de 1815, Henri Braconnot publie une technique analytique entièrement différente pour séparer les parties solides et liquides des graisses naturelles. L'existence de triglycérides hétérogènes dans les lipides d'origine végétale est devenue tout à fait claire en 1896 où Heise a constaté oléo-di-stéarine a été le triglycéride majeur dans l'huile de M'kani *Allanblackia stuhlmannii* et le beurre de graine du kokum *Garcinia indica*.

Entre 1956 et 1965, une série de nouvelles techniques chromatographiques et enzymatiques ont révolutionné le domaine, permettant d'effectuer des analyses de triglycérides très détaillées.

II.2.2.3. L'analyse stéréospécifique :

Il est nécessaire de faire la distinction entre les positions sn-1 et sn-3, qui sont stéréochimiquement différentes. En effet «l'analyse stéréospécifique» la plus utilisée a été introduite pour la première fois en 1965 par Brockerhoff. L'analyse stéréospécifique des triglycérides doit impliquer trois réactions fondamentales :

- (a) Dégradation des triglycérides en diglycérides représentatifs.
- (b) Phosphorylation des diglycérides pour produire des phospholipides.
- (c) Hydrolyse des phospholipides par la phospholipase A.

Les produits de chaque réaction, sont séparés par CCM, plusieurs modifications et combinaisons de réactions (a), (b) et (c) sont possibles.

L'année suivante 1966, Lands avec leurs collègues ont présenté une méthode alternative pour distinguer les acides gras sn-1- et sn-3 en utilisant la phosphorylation stéréospécifique des diglycérides dérivés par la diglycéride kinase.

Les techniques d'analyse stéréospécifique ont ensuite été améliorées et appliquées à une grande variété d'échantillons, et contribuant grandement à notre compréhension de la composition en triglycérides des graisses naturelles.

II.2.2.3.A. Méthode sn-1,2 (2,3) -diglycéride du Brockerhoff :

La méthode sn-1,2 (2,3) -diglycéride du Brockerhoff est décrite sur **la figure.II.3**. L'étape initiale est l'incubation des triglycérides avec de la lipase pancréatique pour obtenir des sn-2-monoglycérides, simultanément ou par la suite, les triglycérides sont désacylés aux sn-1 (2,3) -diglycérides partiels «représentatifs», avec de la lipase pancréatique ou un réactif de Grignard

Après l'isolement des sn-1, 2 (2,3) -diglycérides par CCM préparative, on les fait réagir avec le phényle dichlorophosphate pour produire un mélange de sn-1,2-diacyl-3 phosphatidylphénol et de sn-2,3-diacyle -1-phosphatidylphénol. L'incubation de ces composés avec la phospholipase A libère les acides gras de la position sn-2 lorsque la position sn-3- occupée par phosphatide mais laisse le sn-1-phosphatide non hydrolyse. La séparation et l'analyse des acides gras des divers produits de réaction permettent de déterminer la composition des acides gras en positions sn-1, sn-2 et sn-3 dans le triglycéride d'origine comme suit :

- sn-1 = à partir de lysophosphatide provenant de l'hydrolyse de la phospholipase A.
- sn-2 = à partir de monoglycéride provenant de l'hydrolyse de la lipase pancréatique.
- sn-2 = à partir de acides gras libres provenant de l'hydrolyse de la phospholipase A.
- sn-3 = à partir de 3 (triglycéride d'origine) - (lysophosphatide) - (monoglycéride).
- sn-3 = à partir de 2 (phosphatide non hydrolysé) - (monoglycéride).

Cette méthode permet la détermination directement les acides gras en positions du sn-1 et sn-2, l'acide gras en position sn-3 est déterminé par l'utilisation de deux calculs de différence,

II.2.2.3.B. Méthode sn-1, 3-diglycéride du Brockerhoff :

La méthode du Brockerhoff sn-1, 3-diglycéride est également décrite sur **la figure.II.3**, comme la méthode sn-1, 2 (2,3)-diglycéride. La position sn-2 est à nouveau caractérisée par l'analyse du 2-monoglycéride issu de l'hydrolyse pancréatique. Ensuite, les produits sn-1, 3-diglycérides de l'hydrolyse par le réactif grignard sont isolés et transformés en 1-3-diacyl-2-phosphatidylphénol en utilisant le phényle dichlorophosphate. Le traitement avec la phospholipase A libère seulement l'acide gras en position sn-1 et laissant un lysophosphatide contenant la chaîne sn-3-acyle.

La séparation et l'analyse des acides gras des différents produits de réaction permettent la détermination directe des acides gras dans les trois positions du triglycéride d'origine :

- sn-1 = à partir des acides gras libres par la hydrolyse de phospholipase A.
- sn-2 = à partir de monoglycéride résultant de l'hydrolyse par la lipase pancréatique.
- sn-3 = à partir de lysophosphatide résultant de l'hydrolyse par la phospholipase A.

Les problèmes concernant l'isomérisation des sn-1,3-diglycérides lorsque l'hydrolyse s'effectue par le réactif Grignard indiquent que cette technique moins précise par comparaison avec la méthode sn-1, 2 (2,3) -diglycéride de Brockerhoff, mais cette erreur est équilibrée par le fait que la position sn-3 peut être déterminée directement plutôt que par la différence.

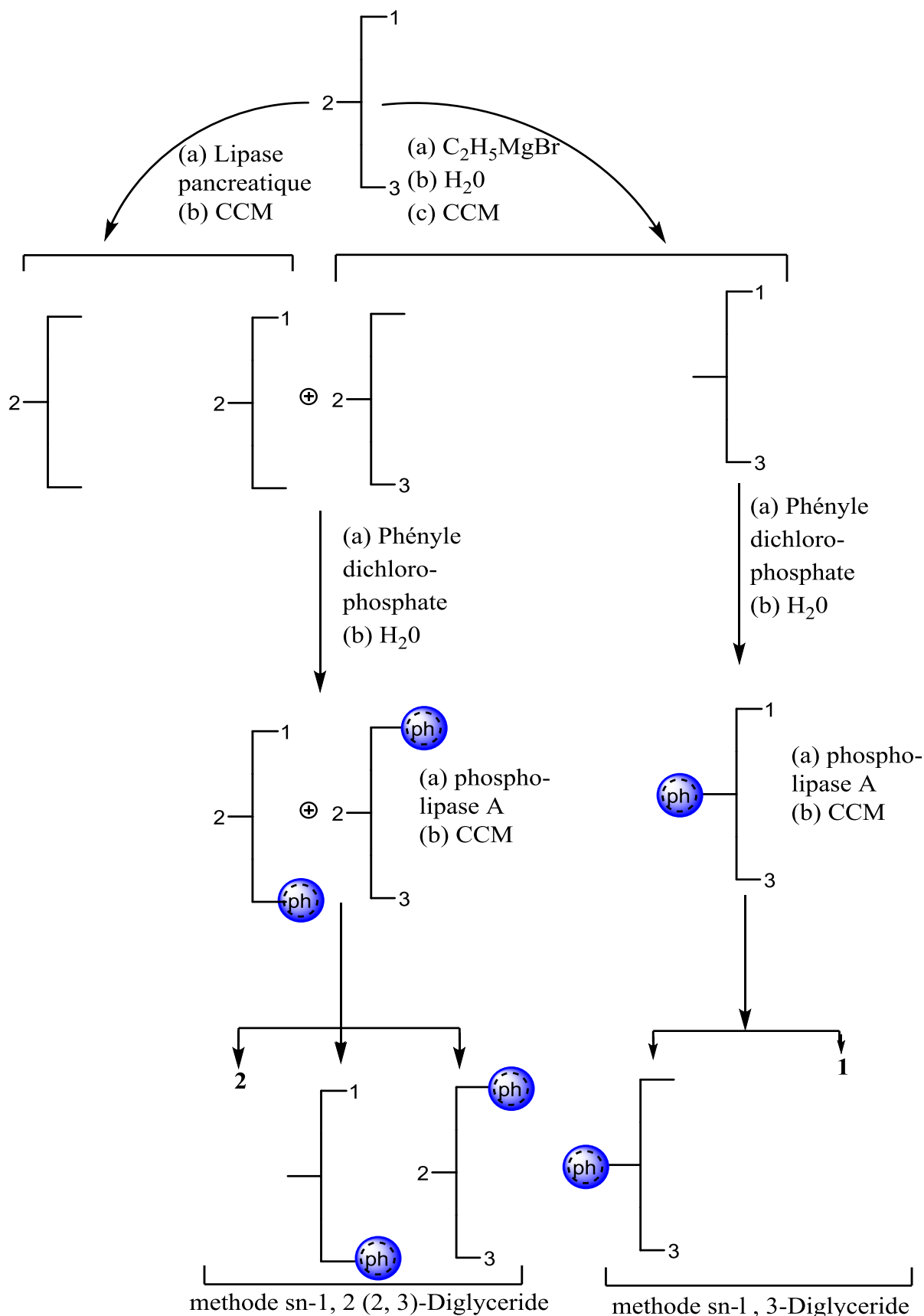


Figure.II.3 : Analyse stéréospécifique des triglycérides par les deux méthodes de Brockerhoff, (ph) groupe phosphate de phényle ; 1, 2 et 3 se réfèrent aux acides gras aux positions sn1-, sn-2 et sn-3 dans le triglycéride.

II.2.3. Les cérides :

Ce sont des esters d'alcools à longue chaîne (alcool gras principalement : alcools primaires, saturés et non ramifiés).

II.2.4. les stérides :

Ce sont des esters de stérols (alcool polycyclique : cholestérol, phytostérols) contiennent également la même structure fusionnée à quatre cycles, possédant des rôles biologiques différents comme des hormones et molécules de signalisation.

II.2.5. Les glycérophospholipides (phosphatides) :

Ils sont des composants clés de la bicouche lipidique des cellules , leurs structures sont basées sur l'acide phosphatidique (acide 3-sn-phosphatidique). Le résidu **X** attaché au phosphate comprend des bases azotées (aminoalcools) ou des polyols, les principaux phosphoglycérides sont énumérés **dans le tableau II.3.** (Scrimgeour et Harwood, 2007)

Tableau .II.3 : les principaux phosphoglycérides.

H	Acide phosphatidique ;	
Sérine : $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$	Phosphatidylsérine ;	
Ethanolamine : $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$	Phosphatidyléthanolamine ;	<p style="text-align: center;">inositol</p>
Choline : $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)$	Phosphatidylcholine ;	
Glycérol : $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2(\text{OH})$	Phosphatidylglycérol ;	
Inositol	Phosphatidylinositol ;	
Phosphatidylglycérol	Diphosphatidylglycérol ;	

II.2.6. Les phytostérols :

Les phytostérols sont des stérols végétaux qui sont structurellement et fonctionnellement similaires au cholestérol, les différences entre-deux se situent dans la chaîne latérale. La plupart des chaînes latérales de phytostérol contiennent 9 ou 10 atomes de carbone. Alors que la chaîne latérale du cholestérol est constituée de 8 atomes de carbone, les stérols végétaux comprennent une grande variété de molécule, ils sont des stérols (C-28) ou (C-29) qui diffèrent du cholestérol (C-27) par la présence d'un groupe supplémentaire de méthyle (campestérol) ou éthyle (sitostérol) sur la chaîne latérale du cholestérol. Bean en 1973 a décrit plus de 44 stérols végétaux provenant de sept classes végétales

différentes ont été identifiés, Moreau ont décrit les caractéristiques chimiques et physiques des phytostérols les plus courants. Les principaux stérols végétaux sont le campestérol (C-28), le stigmasterol (C-29) et surtout le β -sitostérol (C-29). Les termes «stérol et phytostérols végétaux» sont parfois utilisés comme termes génériques pour inclure à la fois des stérols insaturés et des stanols saturés. Le sitostanol et le campestanol sont des stanols, qui se trouvent dans la nature en des quantités beaucoup plus petites que les stérols végétaux. Les structures du sitostérol, du sitostanol, du campestérol et du campestanol sont présentées à la **figure II.4**. La structure du cholestérol, respectivement, est présentée pour comparaison. (Geçgel et Demirci, 2006; Kritchevsky et Chen, 2005)

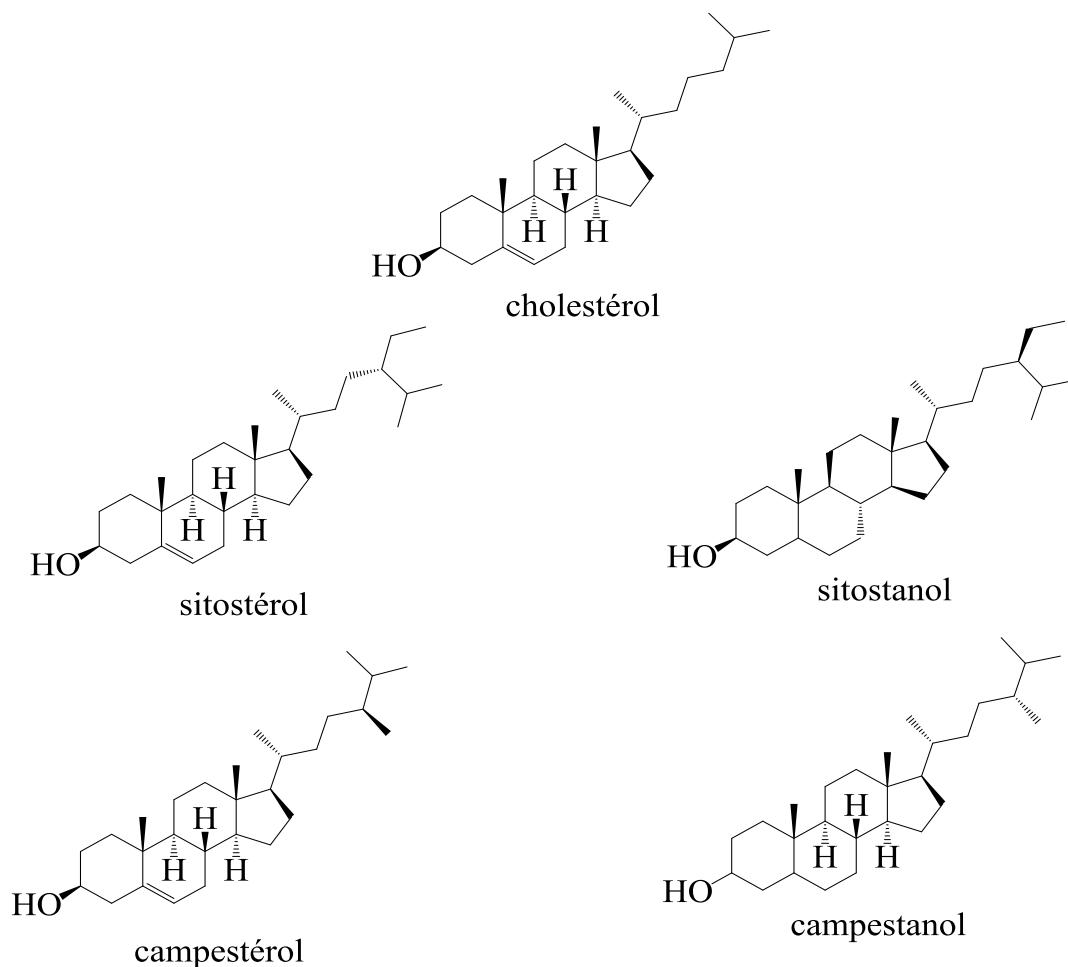
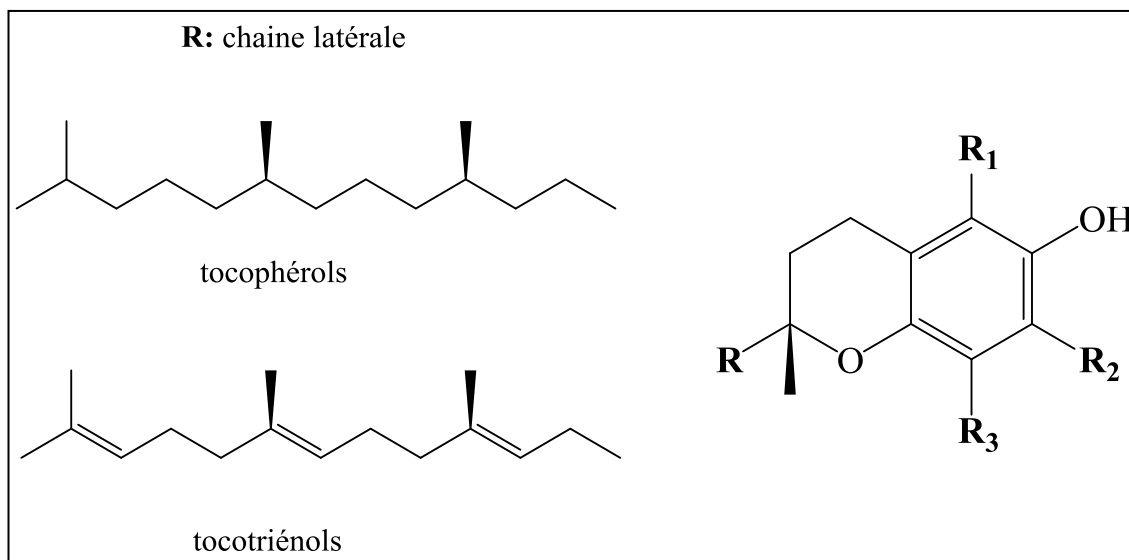


Figure II.4 : Les structures chimiques du cholestérol et certains phytostérols.

II.2.7. Les tocophérols :

La vitamine E est un dérivé phénolique soluble dans les lipides appartient à la famille des tocophérols, le nom tocophérol provient du grec « tokos » pour progéniture et « pherein » pour porter. Ce nom est proposé pour la première fois et déterminé son présence dans l'huile de germe de blé par l'embryologiste Herbert McLean et collaborateurs en 1936. La famille des tocophérols comprend les substances suivantes : l' α -tocophérol (la vitamine E), le β -tocophérol, le γ -tocophérol et le δ -tocophérol

Figure II.5.



R ₁	R ₂	R ₃	tocophérols	tocotriénols
CH ₃	CH ₃	CH ₃	α-tocophérol	α-tocotriérol
CH ₃	H	CH ₃	β-tocophérol	β-tocotriérol
H	CH ₃	CH ₃	γ-tocophérol	γ-tocotriérol
H	H	CH ₃	δ-tocophérol	δ-tocotriérol

Figure II.5 : La structure générale du cholestérol et phytostérol.

Cette famille est constituée généralement d'un noyau chromanol avec une chaîne latérale saturée à 16 atomes de carbone. Les tocotriénols diffèrent des tocophérols par la présence de trois doubles liaisons sur cette chaîne latérale. (C Cuvelier, Dotrepe, et Istasse, 2003)

***Chapitre III : Généralités sur les composés
phénoliques.***

III.1. Généralités :

Le terme polyphénol a été introduit pour la première fois en 1980, en remplacement le terme ancien : tanin végétal (Chira, Suh, Saucier, et Teissèdre, 2008). Les polyphénols nommés aussi composés phénoliques, ils sont parmi les métabolites secondaires largement répandues dans les végétaux supérieurs. Ils sont caractérisés par la présence d'un ou plusieurs noyaux phénoliques à 6 atomes de carbones dans leur structure fondamentale, auquel est lié au moins un groupe Hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside, généralement de haut poids moléculaire.

Les plantes synthétisent les polyphénols au cours de leur développement comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits mais aussi comme un moyen de protection contre les stress biotiques (agents pathogènes, blessures, symbiose, herbivores) ou abiotiques (lumière, rayonnements UV, faible température, carences), (Hans-Walter Heldt et Fiona, 2005; Dai et Mumper, 2010). Ils se retrouvent dans différentes parties des plantes (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) selon l'espèce végétale et le groupe polyphénolique considéré.

III.2. Classification :

Le terme «phénolique» couvre un groupe très large diversifié de composés chimiques qui peuvent être classés de plusieurs façons.

Swain et Bate-Smith (1962) ont proposé le regroupement des phénols dans des catégories «communes» et «moins communes», tandis que Ribéreau-Gayon (1972) a regroupé les phénols en trois grandes familles comme suit (Vermerris et Nicholson, 2008):

- Phénols largement distribués - omniprésents dans toutes les plantes, ou d'importance dans une plante spécifique.
- Phénols moins distribués - Nombre limité de composés connus.
- Constituants phénoliques présents sous forme de polymères.

Harborne et Simmonds (1964) classent les composés phénoliques selon la structure (allant d'un simple C₆ à des formes très condensées, degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...), le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. (Harborne, 1989)

Les principales classes des composés phénoliques sont regroupées dans **le tableau III.1.**

Tableau .III.1 : Les principales classes des composés phénoliques

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine
C ₆	Phénols simples	Hydroquinone, Catéchol.	
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	Épices, fraises
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques	Acide caféique	Pomme de terre
		Acide férulique	pomme
	Coumarines	Scopolétine, esculétine	citron
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbénoides	resvératrol	Raisin
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes		
	1. Flavonols	Kamphérol, quercétine	Fruits, légumes, fleurs
	2. Anthocyanes	Cyanidine, pélargonidine	Fleurs, fruits rouges
	3. Flavanols	Catéchine, épicatechine	Pomme, raisin
	4. Flavanones	Naringénine	Citrus
	5. Isoflavonols	Daidzéine	Graines de soja
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Pinorésinol Matairésinol	Pin lin
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines	l'unité G* les deux unités G* et S*	Bois, fruits à noyaux Les gymnospermes Les angiospermes
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanins condensés	procyanidine	Raisins, kaki

* l'alcool coniférylique, appelé unité G (guaïacyle), à un groupe méthoxy.

*l'alcool sinapylique, appelé unité S (syringyle), à deux groupes méthoxy.

Les composés phénoliques peuvent être répartis en deux grands groupes : les flavonoïdes et les non-flavonoïdes.

Une autre classification a été proposée par Swain et Bate-Smith (1962). Ils ont regroupé les phénols dans des catégories «communes» et «moins communes».

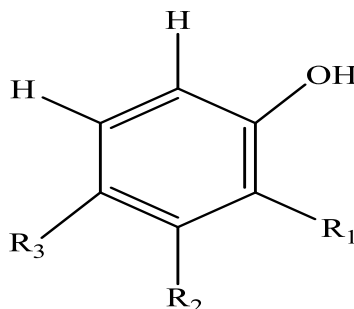
Ribéreau-Gayon (1972) a regroupé aussi les phénols en trois grandes familles comme suit :

1. phénols largement distribués - omniprésents dans toutes les plantes, ou d'importance dans une plante spécifique.
2. Phénols moins distribués - Nombre limité de composés connus.
3. Constituants phénoliques présents sous forme de polymères.(Vermerris et Nicholson 2008)

III.2.1. Les composés non-flavonoïdes :

III.2.1.1. Les phénols simples :

Le plus simple de cette classe est le phénol (C_6H_5OH), Ils sont très rares dans la nature et présentent des structures chimiques allant du simple phénol en C6 aux flavonoïdes en C15 et à des molécules proches. Certains phénols sont germicides et sont utilisés dans la formulation de désinfectants. D'autres possèdent une activité perturbatrice des œstrogènes ou des endocrines **Figure III.1**.



Nom	R_1	R_2	R_3
Catéchol	OH	H	H
Hydroquinone	H	H	OH
Résorcinol	H	OH	H

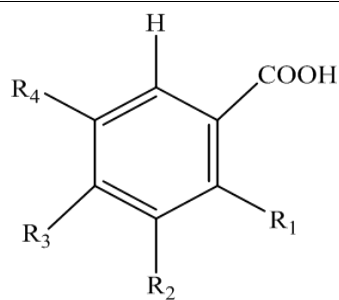
Figure .III.1 : Les phénols simples.

III.2.1.2. Les acides phénoliques :

Le terme acide phénolique, en général, désigne des phénols qui possèdent une fonction acide carboxylique. Les acides phénoliques des plantes peuvent être divisés en plusieurs sous-groupes en fonction du nombre et de position des groupes hydroxyles dans le noyau benzénique, ils peuvent être divisés en dérivés de phénols mono-, di- et tri-hydriques. En outre, la majorité des acides phénoliques des plantes sont souvent considérés comme des dérivés des acides benzoïques en C6-C1 et cinnamiques en C6-C3 **Figure III.2**.

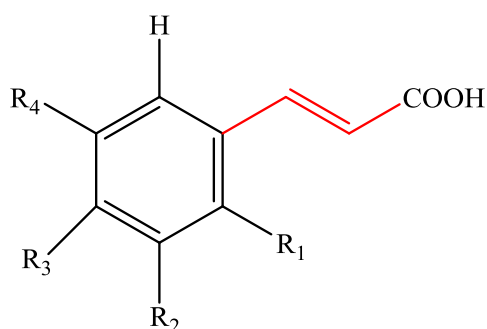
Les acides benzoïques sont formés à partir de l'acide cinnamique, les acides hydroxy-benzoïque sont présents principalement sous forme de glucosides.

Les acides hydroxycinnamiques dérivent de l'acide p-coumarique, lui-même formé à partir de l'acide cinnamique par la cinnamate-4-hydroxylase. On peut trouver les acides hydroxycinnamique sous forme des esters simples avec des acides hydroxycarboxyliques ou du glucose **Figure III.3**. (Chira *et al.*, 2008; Lublin *et al.*, 2011; Vermerris *et al.*, 2004).



Nom	R_1	R_2	R_3	R_4
acide benzoïque	H	H	H	H
acide gallique	H	OH	OH	OH
acide gentisique	OH	H	H	OH
acide <i>p</i> -Hydroxybenzoïque	H	H	OH	H
acide protocatéchique	H	OH	OH	H
acide salicylique	OH	H	H	H
acide syringique	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
acide vanillique	H	OCH ₃	OH	H
acide vératrique	H	OCH ₃	OCH ₃	H

Figure .III.2 : Les dérivés de l'acide Hydroxybenzoïque. (Lublin *et al.*, 2011)



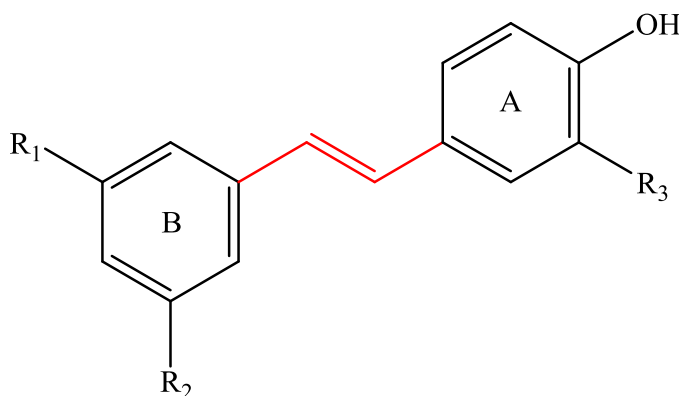
Nom	R_1	R_2	R_3	R_4
acide caféique	H	OH	OH	H
acide cinnamique	H	H	H	H
acide <i>o</i> -Coumarique	OH	H	H	H
acide <i>m</i> -Coumarique	H	OH	H	H
acide <i>p</i> -Coumarique	H	H	OH	H
acide férulique	H	OCH ₃	OH	H
acide sinapique	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

Figure .III.3 : Les dérivés de l'acide Hydroxycinnamique (Lublin *et al.*, 2011).

III.2.1.3. Les stilbènes :

Les stilbénoides ont été isolés des plantes en 1899 et nommés par Gorham en 1980 (Xiao *et al.*, 2008), le nom du stilbène (1,2-diphényléthylène) dérive du mot grec *Stilbos* qui signifie brillant, (Likhtenshtein, 2010) ils ont une structure en C6-C2-C6 peuvent être libres ou hétérosidiques, parfois polymériques, contenant au minimum deux cycles benzéniques un cycle (A) portant deux fonctions hydroxyles en position méta et un cycle (B) portant des fonctions hydroxyles ou méthoxyles. Les deux cycles A et B sont séparés par un pont éthane ou éthène **Figure III.4**, La nature du pont liant les noyaux

aromatiques permet de distinguer 03 classes : les bibenzyls et les stilbènes, ainsi que les phénanthrènes (mono et di et tri) dérivés du stilbène par couplage oxydatif des noyaux aromatiques.



Nom	R ₁	R ₂	R ₃
trans-resvératrol	OH	OH	H
trans-picéatanol	OH	OH	OH
trans-picéide	O-glucoside	OH	H
trans-ptérostilbène	OCH ₃	OCH ₃	

Figure .III.4 : Les stilbènes.

Les stilbènes appartient à la famille des stilbénoides, et sont présents dans de nombreuses familles de plantes supérieures, l'enzyme clé de leur biosynthèse est la stilbène synthase qui catalyse la formation du resvératrol. Le resvératrol se trouve sous forme *cis* et *trans*, l'isomère *trans* étant plus stable (Aggarwal et Shishodia, 2006), et il est présent souvent sous forme de trans-resveratrol-3-*o*-glucosides. Les autres stilbènes sont formés à partir du resvératrol par isomérisation comme (E)-stilbène (trans-stilbène) et (Z)-stilbène (Cis-stilbène) ; par glycosylation, comme le picéide ; par méthylation, comme le ptérostilbène et par oligomérisation comme l' ϵ -viniférine. (Jean, 2009).

III.2.1.4. Les tanins :

Le terme «tanin» **Figure III.5** a été appliqué pour la premier fois par Seguin en 1796 pour désigner les substances présentes dans les extraits de plantes qui ont pu se combiner avec des protéines de peaux d'animaux, empêcher leur putréfaction et les convertir en cuir (Evans, 2009). Les tanins sont des composés de poids moléculaire relativement élevé, et ils peuvent être subdivisés en selon les structures et l'origine biogénétique : tanins hydrolysables et condensés **Figure III.6**.

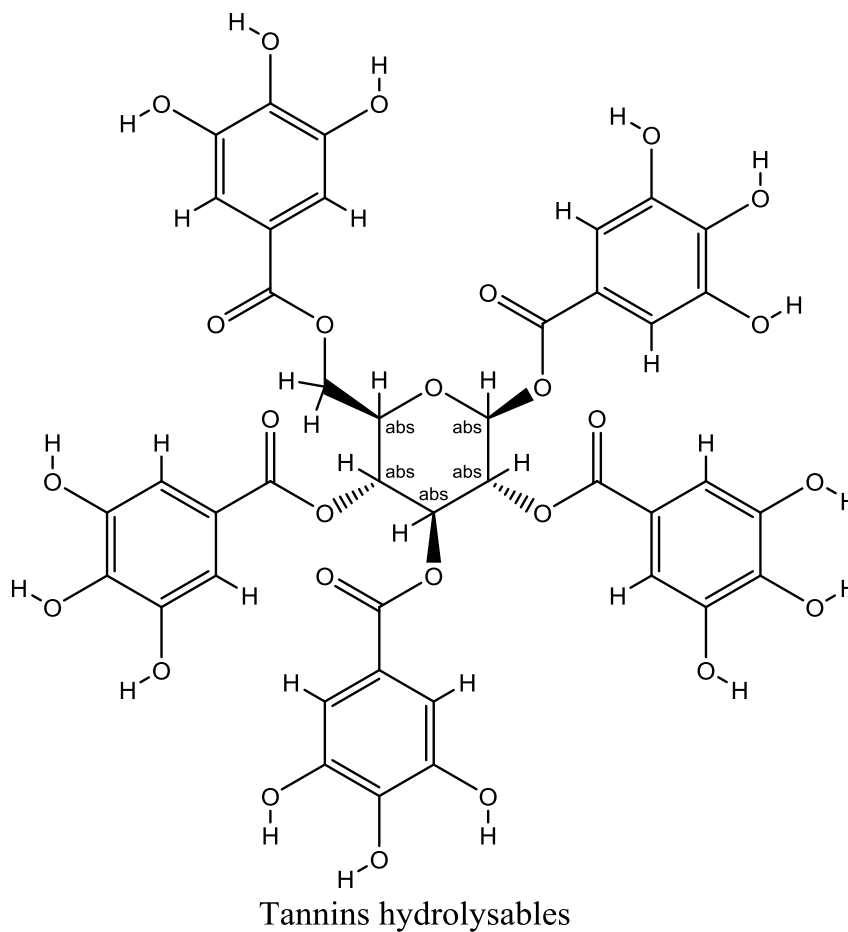
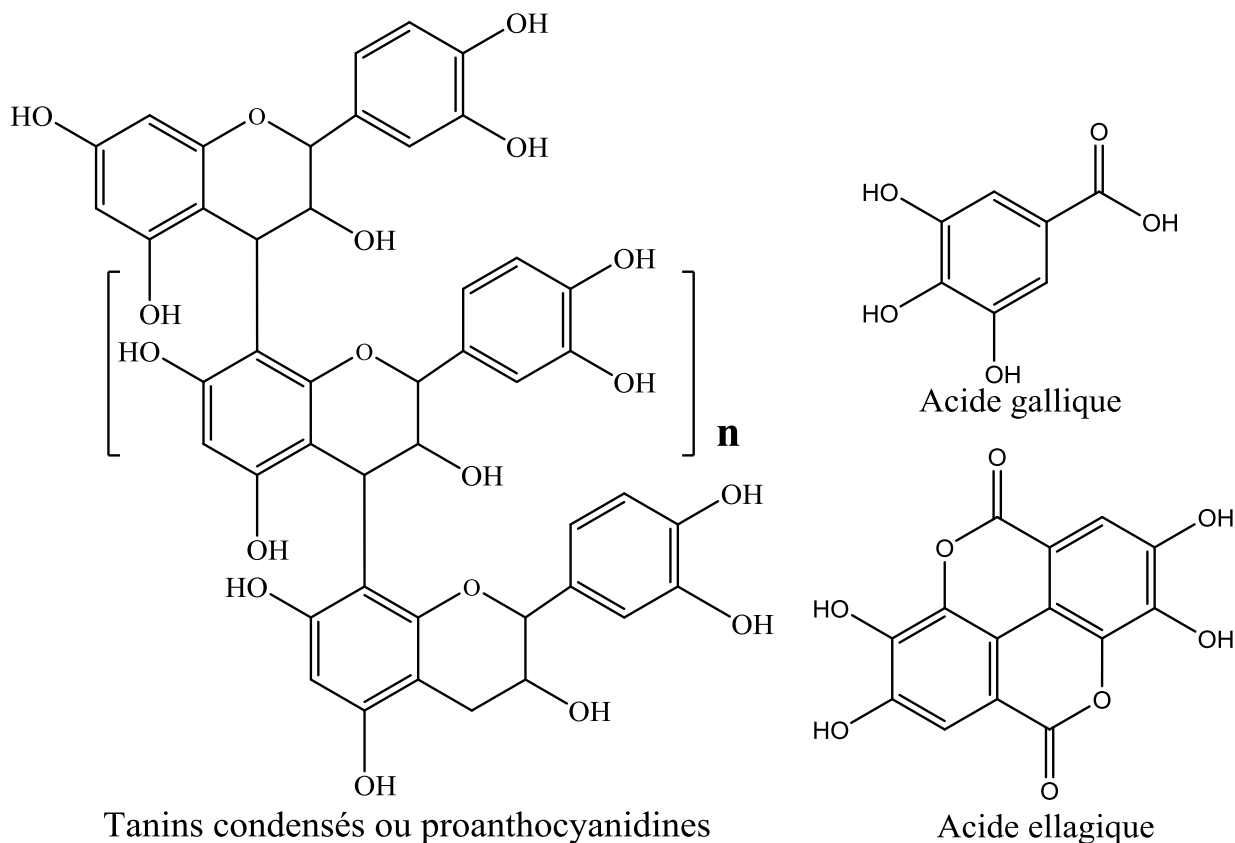


Figure III.5 : La structure chimique des tanins.

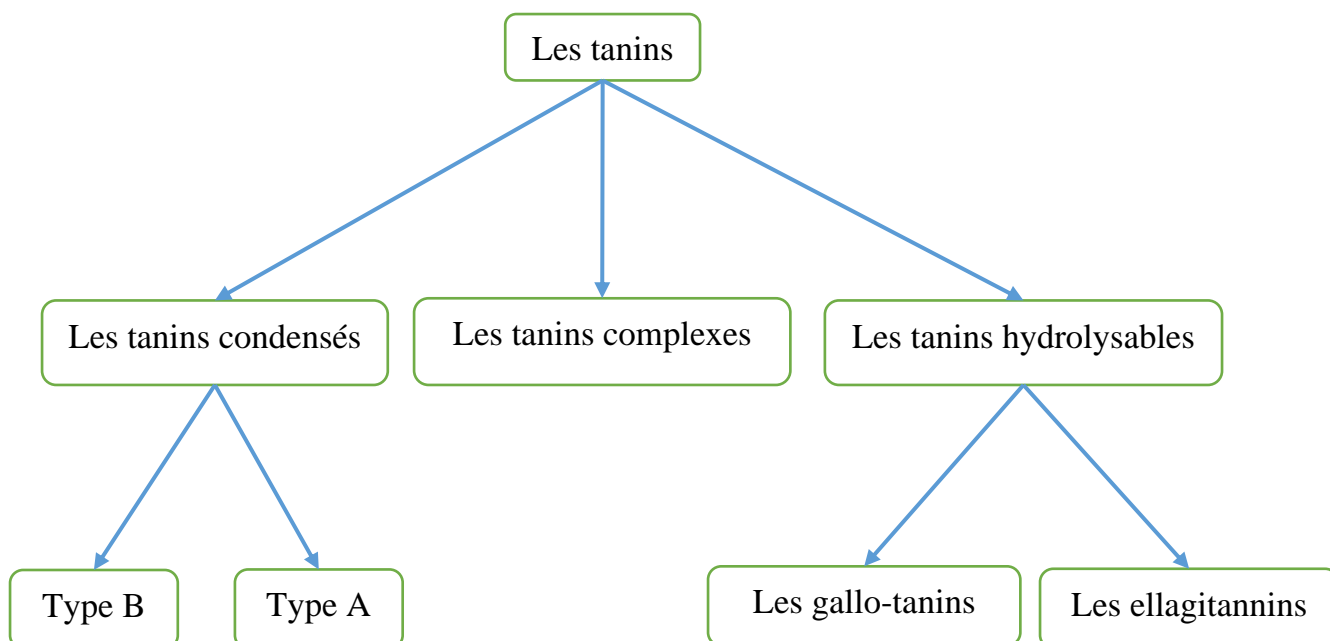


Figure III.6 : La classification des tanins.

Les tanins hydrolysables sont des esters d'acide gallique (gallo- et ellagi-tannins) Ils ont un poids moléculaire plus faible et précipitent beaucoup moins les protéines que les tanins condensés. Tandis que les tanins condensés (également connus sous le nom de proanthocyanidines ou procyanidines) sont des polyphénols de masse molaire élevée, résultant de la polymérisation auto-oxydative ou enzymatique des de monomères polyhydroxyflavan-3-ol liées majoritairement par les liaisons C4-C8 (parfois C4-C6= type B ou C2-C7= type A) des unités adjacentes.

Une troisième subdivision, Les tanins complexes Ce terme a été appliqué par Okuda à un groupe nouvellement découvert de tanins qui sont biosynthétisés à partir d'un tanin hydrolysable (principalement un C-glucoside ellagitannine) et d'un tanin condensé. L'union se produit par une liaison C-C entre le C-1 de l'unité de glucose de l'ellagitannine et le C-8 ou C-6 du dérivé flavan-3-ol. Les monomères sont également impliqués dans la formation d'oligomère (Evans, 2009; Vermerris wilfred et Ralph nicholson, 2004).

III.2.2. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes **Figure III.7** ont été découverts par le Hongrois Albert Szent-Györgyi en 1936, ce qui lui a valu un Prix Nobel (Pillon *et al.*, 2013). Le terme flavoïdes provient du mot latin « *flāvus* » qui est signifié le couleur jaune ("Flavonoïde - Acadpharm," n.d.), ils forment une grande famille plus 6000 de composés phénoliques qui partageant tous un même squelette de base constituée par 15 atomes de carbone organisés en (C6-C3-C6).

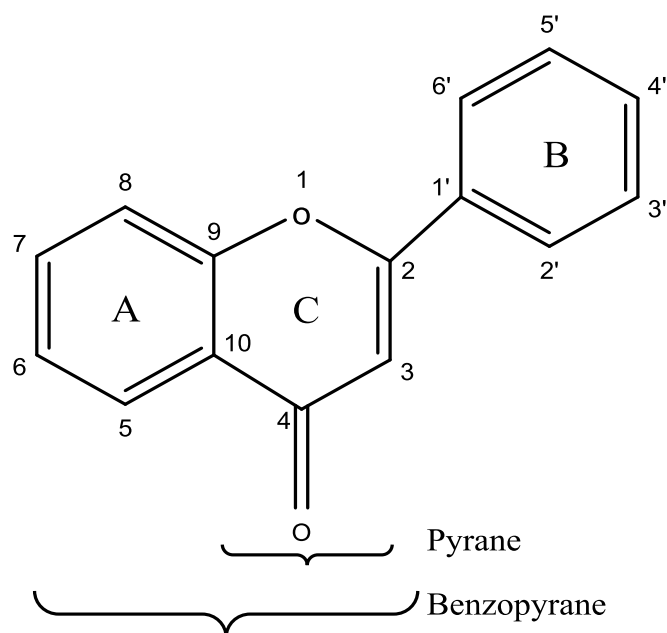


Figure .III.7 : La structure basique des flavonoïdes.

Les deux cycles aromatiques (C6) A et B reliés par un pont à 3 carbones qui forme généralement un troisième cycle pyrane ou pyrone. Le cycle C6 (A) provient de la condensation de trois molécules de malonyl-CoA et le cycle C6 (B) provient de p-coumaroyl-CoA de la voie des phénylpropanoïdes. Ces origines expliquent pourquoi le cycle A de la plupart des flavonoïdes est soit méta-dihydroxylé, soit métra trihydroxylé. (Ghedira, 2005)

Cette famille est très différentes et divisée en plusieurs groupes en fonction du degré d'insaturation de leur cycle benzoïque C : les flavones, les flavanones, les flavonols, les isoflavones et les anthocyanidines. Elles sont formées par la condensation d'un composé de phénylpropane (C6-C3) bien sûr avec la participation de trois molécules de malonyl CoA, ce qui conduit à la formation de chalcones qui se cyclent ensuite dans des conditions acidifiées. Ainsi, les flavonoïdes ont le squelette de base des diphenylpropanes (C6-C3-C6) **Figure III.8** avec un niveau d'oxydation différent du cycle pyrane central, dans certains cas spécifiques, le cycle hétérocyclique pyrones chez les flavones, les flavanones, les flavonols, les isoflavones est remplacé par un cycle hétérocyclique ou existe sous forme isomère la 2- et 4-pyrone à chaîne ouverte (chalcones). Tous ces groupes partagent généralement un précurseur de chalcone commun, les flavonoïdes peuvent être modifiés par hydroxylation, méthyoxylation ou o-glycosylation de groupes hydroxyle ainsi que par glycosylation directement dans l'atome de carbone du squelette des flavonoïdes. La plupart des flavonoïdes existent sous forme de glycosides, la nature du sucre variant fortement selon les espèces. (Chira *et al.*, 2008; Vermerris wilfred et Ralph nicholson, 2004; Salaritabar *et al.*, 2017)

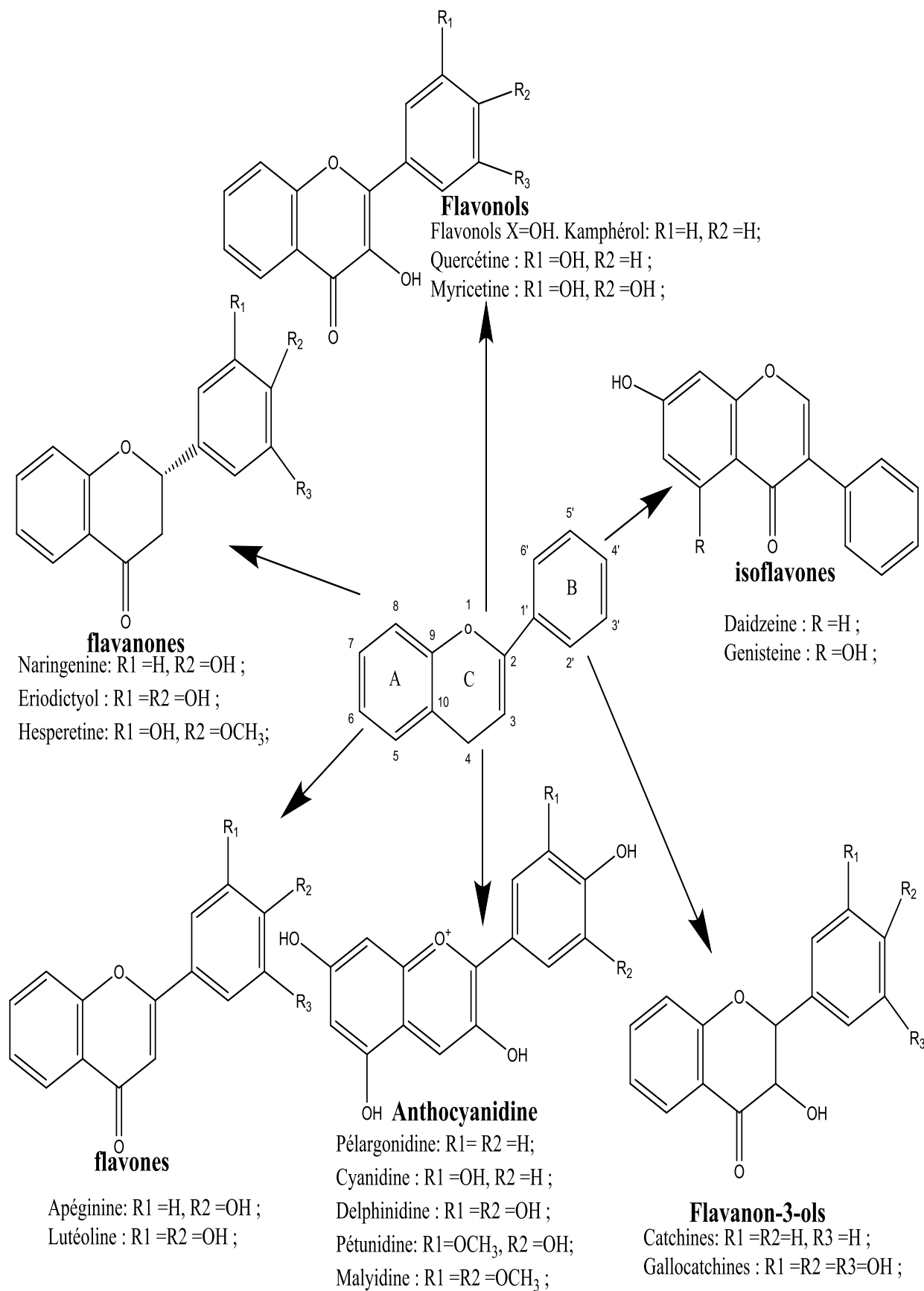


Figure III.8 : Les structures des principaux flavonoïdes.(Kumar et Pandey, 2013)

III.4. Intérêts des composés phénoliques :

Les intérêts des composés phénoliques sont maintenant reconnus dans différents aspects.

III.4.1. Importance dans la vie de la plante :

- Ils interviennent dans la physiologie de la plante (régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites ...)
- l'un de ces composés les flavonoïdes jouent un rôle comme des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles.
- Ils jouent un rôle des interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique comme une barrière biologique (lignification) de protection contre les agents pathogènes (bactéries, les champignons, les insectes), les agents physiques (la température, les blessures, UV), soit directement dans la nature soit lors de la conservation après récolte de certains végétaux.

III.4.2. Importance pour l'homme :

- Sources importantes en antioxydants.
- Ils jouent aussi un grand rôle économique dans la qualité nutritive et hygiénique des aliments (les fruits et les légumes riche en composés phénoliques) qui orientent les choix des gens dans la consommation.
- Ils jouent un rôle pharmaceutique comme sources importantes des médicaments pour la protection de l'homme contre de certaines maladies presque 80% des maladies cardiovasculaires, 90% du diabète de type II (inhibition de certain enzymes comme le carboxylesterase) (Djeridane *et al.*, 2006) et un tiers des cancers qui peuvent être évités également en modifiant le mode de vie, y compris le régime (Fraga, 2009).

***Chapitre VI : Généralités sur l'activité
antioxydante.***

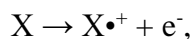
VI.1. Les espèces oxygénées activées (EOA) :

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, mais parfois elle devient susceptible d'entraîner des dommages dans l'organisme via la formation d'espèces oxygénées activées (EOA). La toxicité de l'oxygène n'était pas expliquée jusqu'en 1954, date à laquelle Gerschman et Hartman sont indiqués la toxicité de l'oxygène pour expliquer le processus de vieillissement.

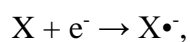
La chaîne respiratoire mitochondriale, dans laquelle les êtres aérobies, fournit à la cellule une source d'énergie importante. En effet, lors du métabolisme normal, la réduction tétravalente d'oxygène se fait de plusieurs manière pour générer l'ATP et pendant cette réaction environ 0,4 à 4 % d'électrons s'échappent et réagissent directement avec l'oxygène dissous dans le cytoplasme et donnent naissance à des EOA. Celles-ci sont soit des radicaux libres l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), ou le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), soit des molécules comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'oxygène singulet (1O_2).

Une espèce oxygénée activée (EOA), il s'agit d'un atome ou d'une molécule capable se trouve indépendante, neutre ou chargée, qui possède la particularité de porter un (ou plusieurs) électron(s) célibataire(s) non apparié(s) sur sa couche externe, ce qui le rend instable et capable de réagir plus ou moins rapidement avec d'autres molécules chimiques environnantes. La toxicité des EOR dépend à leur nature instable, elles interagissent avec tous contenus cellulaires et causés des dommages (dénaturations des protéines, oxydation du glucose, peroxydation des lipides) et génération de nouveaux radicaux libres, ces dommages faisant des ruptures au niveau de l'ADN avec possibilité de mutation et d'altération des membranes cellulaires, ils peuvent apparaître avec des conséquences irréversibles pour la cellule. (Haleng, Pincemail, Defraigne, Charlier, et Chapelle, 2007; Migdal et Serres, 2011; Mongens, 2013)

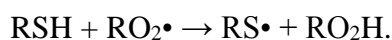
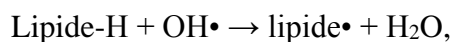
La plupart des molécules biologiques ne sont pas des radicaux, contenant seulement des électrons appariés. Un radical libre peut être fait par la perte d'un électron d'une espèce non radicalaire (X),



Par un gain d'un électron,



Ou par abstraction d'un atome d'hydrogène. Puisque H^{\bullet} possède un électron, son élimination doit laisser derrière lui un électron non apparié sur l'atome auquel le H^{\bullet} a été lié de manière covalente. Voilà quelques exemples pour mieux comprendre,



Les espèces oxygénées activées (EAO) sont souvent présentes dans la cellule à des doses raisonnables grâce à la présence des systèmes antioxydants efficaces. Ces derniers supposent un équilibre physiologique parfait subtil entre la production et l'élimination des EAO. (Halliwell, 2001)

VI.2. Le stress oxydant :

Un stress oxydant, est un déséquilibre entre la production d'ERO et les capacités cellulaires antioxydantes. **Figure.VI.1**

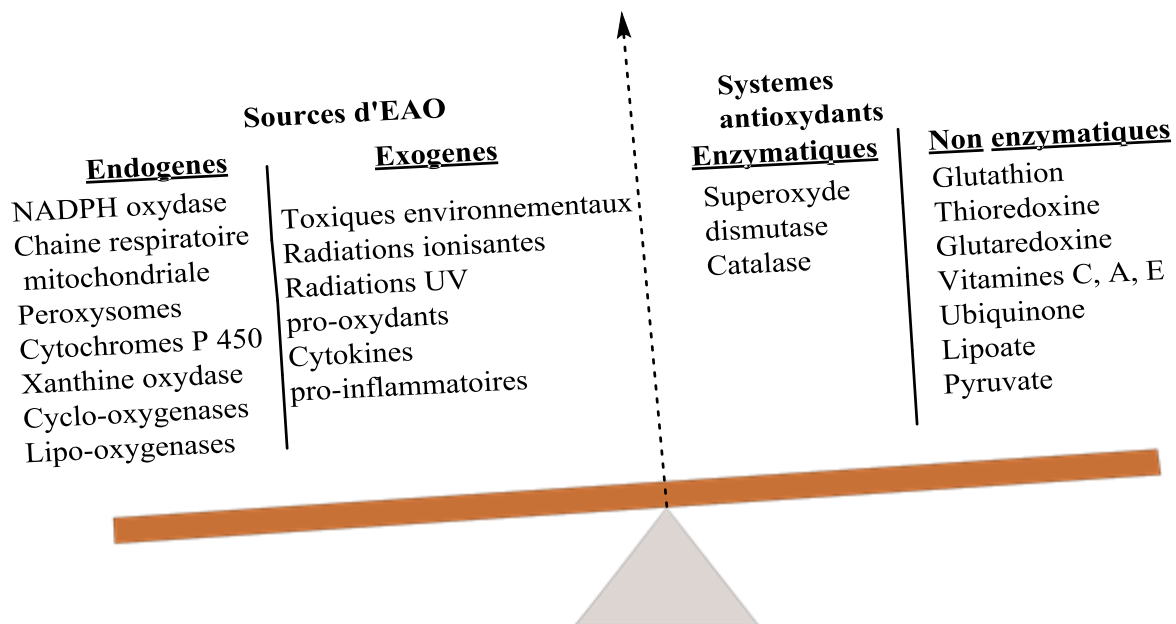


Figure.VI.1 : Les principales sources d'EAO (endogènes et exogènes) et les systèmes antioxydants naturels.

Les situations lors desquelles l'organisme est soumis à un stress oxydant lorsqu'au moins une des trois phénomènes suivantes est présente :

- Production exagérée des espèces réactives.
- Capacités cellulaires antioxydantes insuffisantes (endogènes et exogènes).
- Mécanismes de réparation des dommages insuffisants (l'association de ces deux phénomènes précédents). (Gardes-Albert, c, 2003)

L'idée que les EAO jouent seulement un rôle négatif dans l'organisme est changée, plusieurs études récentes démontrent que les EAO présentent un paradoxe, elles jouent un rôle crucial dans les processus physiologiques normaux, y compris la réponse aux facteurs de croissance, la réponse immunitaire et l'élimination apoptotique des cellules endommagées. Malgré ces fonctions bénéfiques, les EAO contribuent au développement de certaines maladies répandues,

y compris le cancer et les maladies cardiovasculaires. (H.-U. Simon A. Haj-Yehia F. Levi-Schaffer, 2007)

VI.3. Les mécanismes naturels de défense contre les EAO :

VI.3.1. L'antioxydant :

L'intérêt des antioxydants naturels a augmenté. De nouvelles recherches sont donc menées afin de découvrir de nouveaux antioxydants d'origine naturelle. En effet, l'utilisation des antioxydants naturels n'est pas la seule, il y a aussi des antioxydants de synthèse comme le BHA et le BHT et des esters de l'acide gallique tel que gallate propylée (E310) sont utilisés largement comme additifs dans l'industrie agroalimentaire et cosmétique, en raison leurs efficacités et peu onéreux que les antioxydants naturels. Cependant, les dernières études ont montré que les produits résultant de dégradation des antioxydants de synthèse (le BHT et le BHA) peuvent être toxiques et/ou cancérogènes. (Amarti *et al.*, 2011)

Selon Halliwell et Gutteridge (1989) pour qu'une molécule soit définie comme un antioxydant, il doit satisfaire deux conditions basiques : d'abord, lorsqu'elle est présente en faible concentration par rapport au substrat lequel devient oxydé, il peut retarder, ralentir ou empêcher les processus d'oxydation des biomolécules par les EAO. Dans le même sens, les antioxydants sont des molécules apte est d'inhiber la production, de limiter la propagation ou de détruire les EAO (Halliwell, 2001) ; seconde, le radical formé résultant après le piégeage (*scavenger*) doit être stable ou persiste pendant un certain temps. Cette définition comprend les antioxydants de nature non enzymatique apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque; l'autre est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes. (Haleng *et al.*, 2007; Sies, 1997)

Habituellement, on dit qu'un bon antioxydant est un bon « capteur » de radicaux libres. (Gardes-Albert *et al.*, 2003)

Les réactions d'auto-oxydation des biomolécules comme les acides gras polyinsaturés (AGPI) peuvent généralement être divisées en trois réactions majeures : initiation, propagation (qui comprend le transfert d'un atome d'hydrogène d'une molécule d'acide gras voisine pour former un hydroperoxyde) et la terminaison. (Kamal-Eldin et Appelqvist, 1996)

Selon Buettner les antioxydants (anti-lipopéroxydants) susceptibles de protéger les lipides contre l'oxydation peuvent être répartis en deux types : les antioxydants préventifs, les antioxydants « chaîne rompue ». Ces derniers peuvent agir selon deux mécanismes :

– **les donneurs d'hydrogène :**

C'est le cas le plus fréquent, comprenant principalement le β -carotène et les vitamines E, C (provitamine A) ainsi que les composés phénoliques. Ils ont la capacité de céder un hydrogène au radical alcoxyle et au radical peroxyde qui sont transformés aux produits d'oxydation stables, ce qui conduit à la consommation de l'antioxydant lui-même.

– **Les antioxydants « sacrifiés » :**

Le qualificatif de « chain breaking antioxidant sacrificial » employé par Buettner concerne des molécules, elles-mêmes radicalaires, qui réagissent avec les radicaux peroxydes ou alcoxydes pour donner des produits non radicalaires interrompant ainsi la propagation de la peroxydation.

Parmi les antioxydants non-enzymatiques on a distingué :

VI.3.1.1. La vitamine C (acide ascorbique) :

La vitamine C ou l'acide ascorbique est probablement la vitamine la plus connue dans le monde, son nom est basé sur deux événements : son rôle exceptionnellement important dans le traitement du scorbut et la proposition de Linus Pauling d'utiliser les doses énormes d'acide ascorbique pour la prévention du rhume ou des états grippaux. Cette dernière proposition, basée évidemment sur les propriétés antioxydantes de l'acide ascorbique.

L'acide ascorbique (qui est principalement présent dans les systèmes biologiques comme anion ascorbate) possède un groupe hydroxyle très actif **Figure.VI.2** et par conséquent, est un éliminateur de radicaux libres très efficace. D'autre part, l'acide ascorbique est un réducteur très réactif qui réduit facilement le ferrique en ions ferreux, Il est intéressant de noter que, l'acide ascorbique comme l' α -tocophérol réagit très lentement avec le superoxyde et seulement par déprotonation mais relativement rapidement avec un radical peroxyde. Ainsi, l'acide ascorbique peut être un antioxydant ou un prooxydant selon les conditions.

Il faut souligner que l'efficacité de l'acide ascorbique dans le traitement du scorbut est due à ses propriétés « prooxydantes » car l'acide ascorbique est nécessaire pour réduire les ions métalliques actifs des hydroxylases et des oxygénases impliquées dans la biosynthèse du procollagène, de la carnitine et neurotransmetteurs. Donc l'appauvrissement l'acide ascorbique dans les aliments consommables diminue les activités de ces enzymes et provoque le développement du scorbut. Les propriétés antioxydantes et prooxydantes in vitro de l'acide

ascorbique ont été clairement démontrées. Il est compréhensible que la concurrence entre antioxydants et prooxydants les activités de l'acide ascorbique dépend aux taux de réactions ci-dessus. (Pincemail, Bonjean, Cayeux, et Defraigne, 2002)

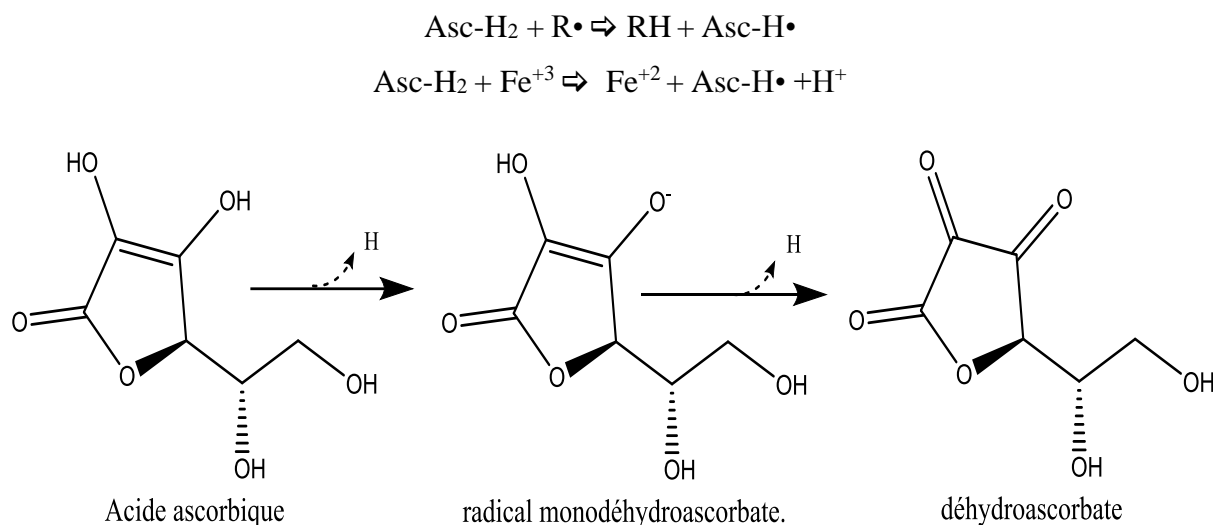
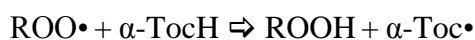


Figure.VI.2 : La représentation chimique des molécules d'ascorbate réduite et oxydée. (déhydroascorbate) ainsi que du radical monodéhydroascorbate.

VI.3.1.2. la vitamine E :

En 1968, le Food and Nutrition Board aux États-Unis reconnaissait la vitamine E comme étant une molécule essentielle en vertu de ses propriétés antioxydantes. (Pincemail *et al.*, 2002) L'activité antioxydante de la vitamine E (α -tocophérol) vis-à-vis des radicaux libres oxygénés donne naissance à un produit d'oxydation, le radical tocophéroxyde assez peu actif et il réagira avec les lipides peroxydés en donnant un produit instable, l'hydroxytocophérone. Ce dernier se transformera en tocophérylquinone ou un composé de dimérisation ou de polymérisation supérieure. (Cillard et Cillard, 2006; Leray, 2010) En effet, le radical tocophéroxyde est à nouveau réduit en tocophérol recyclage sous l'action de la vitamine C. le radical monodéshydroxyascorbate ainsi formé subit alors une réaction enzymatique ou non enzymatique, pour produire de l'ascorbate et du déshydroxyascorbate, dont aucun n'est pas radical voir fig1.1. (Botham, *et al.*, 2008)



La diversité structurelle et chimique des antioxydants rend difficile la séparation et la quantification des antioxydants individuels de la matrice végétale. Par conséquent, il est souhaitable d'établir une méthode capable de mesurer le niveau d'activité antioxydante totale directement à partir d'extraits végétaux.

VI.4. les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante :

Plusieurs méthodes *in vitro* ou *in vivo* ont été développées pour mesurer " l'activité antioxydante totale ", " capacité antioxydante totale ", ou " potentiels antioxydants totaux ". Parmi eux, la capacité antioxydante équivalente de Trolox (TEAC Trolox equivalent antioxidant capacity), les potentiels d'absorption radicalaire totale (TRAP Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter), la capacité de réduction de l'oxygène /antioxydant (FRAP Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) ou les radicaux ABTS• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) et la capacité d'absorption des radicaux oxygène (ORAC Oxygen Radical Absorbance Capacity) ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH• (diphényl-picrylhydrazyle). Ces méthodes sont basées ; soit sur une réaction de transfert d'électrons simple (SET) ainsi formés généralement des entités stables ; soit sur une réaction de transfert d'atomes d'hydrogène du groupement hydroxyle (HAT) entre un oxydant et un radical libre. Bien que cette réaction donne à naissance un autre radical libre, celui-ci est moins réactif. Pour les méthodes basées sur SET, comme les FRAP et TEAC, les antioxydants sont oxydés par des oxydants tels que Fe^{+3} ou $ABTS^{\bullet+}$. De ce fait, un seul électron est transféré de la molécule antioxydante à l'oxydant. Le changement d'absorbance de l'antioxydant ou de l'oxydant est mesuré par une spectroscopie UV-visible et la valeur d'absorbance est utilisée comme quantification pour la capacité de réduction de l'antioxydant. Autrement, il y a aussi la chélation des métaux de transition (mécanisme indirect), il comprend la chélation des métaux de transition tels que le fer ou le cuivre. Cette chélation sert à empêcher la réaction de Fenton dans les milieux biologiques (Ou, Huang, Hampsch-Woodill, Flanagan, et Deemer, 2002; Popovici, Saykova, et Tylkowski, 2010; Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, et Byrne, 2006)

Généralement, le test DPPH• est recommandé pour évaluer l'activité antioxydante des composés contenant au moins l'un des groupes (SH-, NH- et OH-). De plus, il s'effectue à température ambiante, ceci permettant d'éviter tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles. (Popovici *et al.*, 2010)

Partie II : Expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes.

I.1. Matière végétale :

Les fruits de la plante étudiée *Phillyrea angustifolia L.* ont été récoltés dans la région de Berrouaghia (Coordonnées : 36°10'39.4 Nord, 2°53'18.3 Est, Altitude : Min. 1 132 m, Max. 1 235 m) dans la wilaya de Médéa en Algérie. Située à 96 km au sud-ouest de la capitale Alger). Pour éviter toute ambiguïté, nous avons attribué les symboles suivants : F pour les fruits, la numérotation indique les échantillons.

Les deux échantillons (F1 et F2) sont récoltés au mois de février 2016 et le troisième F3 a été récolté au mois de décembre de la même année.

I.2. Produits et solvants utilisées :

- Les produits chimiques utilisés dans ce travail sont : le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH), l'acide ascorbique, vitamine E, le trifluorure de bore (10% dans du méthanol) et la lipase pancréatique sont de la marque de Sigma-Aldrich.
- Les solvants sont : l'hexane, diéthyle éther, le méthanol, l'éthanol, l'acide formique, l'acide chlorhydrique, le chlorure de calcium, l'acétone et tous les réactifs étaient de Fisher Scientific.

I.3. Traitements et extractions :

I.3.1. Préparation des échantillons :

Tout d'abord nous avons éliminé les fruits avariés par un triage à la main, les fruits sont divisés en trois échantillons F1, F2, F3 puis ils sont broyés à l'aide d'un mortier manuel afin d'augmenter la surface de contact aux solvants extracteurs, l'opération est faite à température ambiante sans échauffement.

I.3.2. Extraction et fractionnement des lipides :

Nous avons utilisé l'extraction par ultrason, l'objectif de cette extraction est de déterminer les teneurs totaux en lipides dans les fruits de *Phillyrea angustifolia*. En général, le rendement d'extraction des lipides dépend de la polarité du solvant organique ou du mélange de solvants utilisés pour l'extraction et ainsi les conditions d'extraction. Pour cela, dans le premier temps nous avons adopté la méthode de Folch (Folch, *et al*, 1957), en utilisant le système de solvants chloroforme : Méthanol (2/1 : V/V) qui permet d'extraire les lipides totaux par un solvant polaire puis dans un second, on a utilisé l'hexane.

- Première méthode : extraction par méthode de Folch.

On prend 100g de chaque échantillon de fruits de *Phillyrea angustifolia* broyés et mélangés avec un volume bien déterminé du système binaire des solvants chloroforme : Méthanol (2/1 : V/V). Le contenu est plongé dans un bain à ultrason de température $t^{\circ} = 36^{\circ}\text{C}$ pendant 60 minutes. Après filtration, Le filtrat est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite à température 45°C . On ajoute

150 ml de solution saline (solution aqueuse à 0.9 % de NaCl), puis le mélange est ensuite transféré dans une ampoule à décantation.

Les lipides totaux ont été extraits par le chloroforme puis ont été traités par quelques grammes de sulfate de sodium anhydre afin d'éliminer les traces d'eau. Après filtration le chloroforme a été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite. Les extraits obtenus présentent des aspects liquides visqueux ou semi-solide. Chaque extrait est pesé et la teneur en huile brut a été calculée par la relation suivante :

$$\text{Teneur en lipides totaux (\%)} = \frac{\text{masse de l'extrait (g)}}{\text{masse de la prise d'essai (matière végétale) (g)}} \times 100$$

- **Deuxième méthode : extraction par l'hexane.**

Dans cette méthode, nous avons utilisé de l'hexane car c'est le solvant le plus utilisé en industrie agroalimentaire pour l'extraction des huiles végétales. Vu la quantité insuffisantes des échantillons F1 et F2, nous avons regroupé ces fruits en les considérant comme un seul échantillon et on les considère comme un seul échantillon. Des quantités de 100 g des de chaque échantillons sont introduits dans des flacons et mélangés avec 500 ml d'hexane. Ils sont ensuite plongés dans un bain à ultrason de température $t^\circ = 36^\circ\text{C}$ pendant 60 minutes, après séchage par sulfate de sodium anhydre, l'hexane est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite à température 45°C . Les extraits hexanique F1+F2 et F3 obtenus présentent un aspect huileux du couleur marron clair. Les rendements en huiles ont été calculés par la même relation précédente.

- **Fractionnement des lipides totaux :**

Les extraits lipidiques totaux sont fractionnés de façon à séparer les lipides neutres LN, les glycolipides GL et les phospholipides PL. cette séparation est effectuée par chromatographie sur colonne ouverte. La préparation de la colonne a été réalisée par dissolution de 5g de gel de silice dans 50 ml de Chloroforme. Une quantité de 5g de lipides totaux sont solubilisés dans un petit volume de chloroforme. L'élution des différentes classes des lipides a été réalisée par des solvants à polarité croissante à savoir : le Chloroforme qui permet d'éluer les lipides neutres, puis l'acétone avec lequel on recueille les glycolipides, enfin le méthanol pour récupérer les phospholipides. Après séchage des solvants sur sulfate de sodium anhydre et filtration, les solvants sont évaporés sous pression réduite à 45°C .

I.3.3. Analyse des acides gras :**I.3.3.1. Méthylation au trifluorure de bore (BF₃) :**

La transestérification par le méthanol permet d'obtenir ces dérivés méthyliques après saponification des glycérides du corps gras, puis estérification des acides gras libérés, par le méthanol en présence de trifluorure de bore. En effet, il est nécessaire d'effectuer une saponification préalable par un hydroxyde alcalin (hydroxyde de potassium en milieu hydroalcoolique). Le protocole de cette technique opérée selon la norme AFNOR, elle est applicable à la plupart des corps gras sauf les grasses laitières et des graisses contenant des acides gras de types spécifiques. (Berdeaux, *et al*, 1998; Christie *et al.*, 2010)

• Réaction de saponification :

Dans un ballon, 10 ml d'une solution méthanolique de soude (2%) est ajouté 0.2g de l'huile, celui-ci est adapté au réfrigérant, et porté à l'ébullition à reflux pendant 15 à 20 minutes.

Les étapes de transestérification sont :

• l'estérification :

L'estérification est effectuée en ajoutant par le haut de réfrigérant 2 ml d'une solution méthanolique de BF₃ (20%). Le mélange est maintenu encore chauffé à reflux pendant 10 min. Après refroidissement, on ajoute l'eau distillée. Les esters méthyliques sont récupérés par une extraction liquide-liquide en utilisant 3 fois 20 ml l'hexane. La fraction hexanique a été lavée plusieurs fois par l'eau jusqu'à la neutralisation. Après séchage sur sulfate de sodium anhydre, le solvant est filtré puis évaporé sous pression réduite. Les EMAG ainsi obtenus sont repris dans l'hexane et conservés au réfrigérateur jusqu'à leur analyse.

• Analyse par CPG :

Les acides gras ont été analysés sur leurs formes esters méthyliques, l'identification des acides gras a été faite par la comparaison des temps de rétention par rapport un chromatogramme de référence.

Le chromatographe est de la marque Chrompack avec une colonne capillaire Cp Sil 88 CB (5% phenyl+95% dimethylpolysiloxane), dont les caractéristiques suivantes :

- Longueur 30 m.
- Diamètre intérieur 0,32 mm.
- Epaisseur de la phase 0,25µm.

Les conditions expérimentales sont :

- Détecteur à ionisation de flamme FID 250°C.
- Température de l'injecteur à 250°C.
- Température de détecteur à 280°C.

- Gaz vecteur : azote.
- Four : 190°C.
- Quantité injectée : 0.8µl.
- Vitesse de papier : 0.5 cm/mn.

I.3.4. Etude des structures des triacylgcérols :

I.3.4.1. Préparation de TAG :

Pour l'étude de la composition triglycéridique, le choix a été fait sur l'extrait de l'échantillon F3 obtenu par l'hexane, car c'est le seul qui présente une quantité suffisante pour réaliser toutes les manipulations possibles. Tout d'abord il est nécessaire de purifier les triglycérides de l'extrait hexanique brut. Cette purification a été réalisée par colonne ouverte. Une quantité de 15 g de gel de silices est mis en suspension dans l'hexane puis introduit dans une colonne. Environ 3g d'huile sont dissoutes dans le même solvant et déposée en tête de la colonne. L'élution est réalisée par 150 ml de hexane. Les TAGs purifiés sont obtenus après avoir évaporé le solvant sous pression réduite, la pureté est contrôlée par chromatographie analytique sur couche mince (CCM), l'élution est réalisée par un système de solvant : hexane/diéthyl éther (7/3 : V/V). Les esters méthyliques des triglycérides purifiés sont préparés avec la même méthode décrite précédemment.

I.3.4.2. Hydrolyse enzymatique :

Les lipases forment une famille hétérogène d'enzymes capables d'hydrolyser les TAGs. Elles ont été mises en évidence, dès 1901. Cependant, ce n'est qu'à partir de la fin des années 1950 que l'étude des lipases a réellement pris son essor ; notamment après la découverte par Bengt Borgström (Lund, Suède) et F.H. Mattson (USA) de la spécificité de position de la lipase pancréatique pour les fonctions esters externes du glycérol. Pierre Desnuelle et ses collaborateurs, Pierre Savary et Bernard Entressangles, seront les premiers avec F.H. Mattson à utiliser cette spécificité de la lipase pancréatique du porc pour étudier la structure des triglycérides naturels. Ils montreront particulièrement que, dans les corps gras d'origine végétale, les acides gras insaturés sont majoritaires en position interne sn-2 alors que les acides gras saturés sont majoritairement retrouvés sur les positions externes sn-1 et sn-3. (Carrière, 2008; Ndour, *et al*, 2017)

Une quantité de 1g de TAG déjà purifié est introduite dans un bécher, on lui ajoute 10 ml de solution tampon 1,2 M de chlorure d'ammonium (NH₄Cl), 2 ml de solution aqueuse de chlorure de calcium à 22%, 0.1 ml d'une solution aqueuse de sels biliaires à 22%, et 100 mg d'enzyme. Le tout est mis dans un bain thermostat régulé à 40°C pendant 45 minutes ; l'action enzymatique est ensuite arrêtée par l'introduction de 1 ml d'HCl. On transvase dans une ampoule à décantation et on procède à l'extraction par 10 ml de le diéthyl éther trois fois. La phase organique est lavée plusieurs fois avec de l'eau afin

d'éliminer toutes traces d'acide, puis traitée par du sulfate de sodium anhydre. Après filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite à 40 °C. (Luddy, *et al*, 1964)

I.3.4.3. Séparation des monoglycérides en position sn-2 :

Le mélange issu de l'hydrolyse enzymatique est solubilisé dans 2 ml de chloroforme, puis fractionnés par chromatographie préparative sur couche mince de CCM. L'élution est réalisée par un système de solvant constitué par : hexane : diéthyl éther : acide formique : (7/3/0,1 V/V/V.) Deux migrations successives sont nécessaires. Les monoglycérides en position sn-2 sont visualisés par une lampe UV à 254 nm.

Après le grattage de la bande de gel de silice correspondant aux monoglycérides en position sn-2, les monoglycérides sont récupérés par le chloroforme sous agitation pendant deux heures. Le solvant est filtré et évaporé sous pression réduite. Les EMAG des mono glycérides sont préparés de la même manière que ceux des EMAG des triglycérides. (Voir Figure.II.2, page 57)

La proportion des acides gras des positions sn-1 et sn-3 du glycérol est calculée par la relation :

$$[sn - 1, 3]\% = (3[TAG]\% - [sn - 2] \%) / 2$$

I.3.5. Dosage spectrophotométrique des tocophérols des huiles et des LN :

On a adopté la méthode d'Emmerie et Engel (Emmerie et Engel, 1938). Une droite d'étalonnage tracée à partir d' α -tocophérol commercial, permet de relier la densité optique et la concentration de tocophérol exprimée en g.l⁻¹. À partir d'une solution commerciale de la vitamine E, nous avons préparé dans l'hexane des solutions ayant des concentrations bien déterminées, 1ml de chaque solution est ajouté à 1ml de réactif d'Ortho-phenantroline et à 0.5ml d'une solution éthanolique de FeCl₃. Après 3min on mesure l'absorbance à 510 nm. Le dosage des tocophérols totaux des extraits lipidiques est effectué de la même manière. La teneur en tocophérols totaux est calculée à partir de la courbe d'étalonnage, et exprimée par rapport en mg équivalent de la vitamine E par 1 kg d'huile.

I.3.6. Dosage spectrophotométrique des phytostérols des LT et des LN :

Concernant le dosage des phytostérols on a choisi le test de Liebermann-Burchard (Barreto, 2005) basée sur une réaction colorée spécifique des 3 β -hydroxystéroïdes possédant une double liaison en position 5-6. Les phytostérols forment un complexe stable avec l'anhydride acétique en milieu acide qui absorbe dans le visible à une longueur d'onde de 550 nm. (Le réactif spectral de Liebermann est constitué par 60 ml d'anhydride acétique et 30 ml d'acide acétique et 10 ml d'acide sulfurique concentré).

Une droite d'étalonnage tracée à partir d'une solution chloroformique de cholestérol, permet de relier la densité optique et la concentration de cholestérol exprimée en g.L⁻¹. A l'aide d'une micropipette on

prend 1ml de chaque solution on lui ajoute ensuite 2 ml du réactif de Liebermann puis on laisse la coloration se développer jusqu'à stabilisation pendant 25 minutes à l'obscurité. La lecture a été réalisée par un spectrophotomètre UV/Visible à une longueur d'onde de 550 nm, la quantité des phytostérols dans les extraits lipidiques a été calculée par rapport à la courbe d'étalonnage et elle est exprimée en mg équivalent en cholestérol par 1 kg d'huile.

I.3.7. Extraction et quantification des composés phénoliques :

I.3.7.1. Extraction des composés phénoliques :

Les polyphénols sont généralement extraits par des solvants de polarité moyenne à forte. Pour cela, on a utilisé deux systèmes de solvants à savoir le MeOH : eau et l'acétone : eau.

L'extraction des composés phénoliques à partir des tourteaux est effectuée selon deux étapes :

- **Etape 01 : Sonication**

Après le séchage complet des tourteaux délipidés à l'abri de la lumière et à température ambiante. Ces tourteaux hexanique ont été finement broyés à l'aide d'un broyeur électrique puis tamisés. Une masse de 10 g de la poudre de tourteaux de chaque échantillon est introduite dans deux flacons et traité séparément par des systèmes de solvants de volume de 100 ml. Le premier contenant un mélange hydroacétonique (7/3, V/V) et le second un mélange hydrométhanolique (8/2, V/V). Les flacons ont été placés dans un bain d'eau d'ultrasons pendant 60 minutes sous la température ($t^{\circ} = 45^{\circ}\text{C}$).

- **Etape 02 : Extraction liquide-liquide**

Les phases aqueuses obtenues après l'évaporation du méthanol et de l'acétone ont été traitées avec des solvants à polarité croissante à savoir : hexane et acétate d'éthyle. Les fractions obtenues sont séchées par du sulfate de sodium anhydre, puis évaporées sous pression réduite à 40°C . Les résidus sec sont solubilisé chacun dans 10 ml de méthanol puis conservés à $+4^{\circ}\text{C}$ jusqu'à leurs analyses.

I.3.7.1. Analyse quantitative des composés phénoliques :

I.3.7.1.1. Dosage des phénols totaux :

- **Principe :**

Les phénols totaux ont été déterminés par spectrophotométrie à l'aide du réactif Folin-Ciocalteu. Ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphotungstique, il est réduit, lors de l'oxydation des polyphénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Singleton et Rossi, 1965). L'intensité de la coloration produite est proportionnelle à la quantité des phénols oxydés.

- **Protocole expérimental :**

100 μl de chaque extrait ont été introduits dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 500 μl du réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué). On ajoute ensuite 2 ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3).

Les échantillons sont agités immédiatement et incubés pendant 30 min à température ambiante. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 760 nm contre un blanc grâce à un spectrophotomètre UV/Visible de type Shimadzu 1601.

La teneur en phénols totaux de chaque extrait de fruits a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage de l'acide gallique et exprimée en milligrammes équivalent en acide gallique (AGE) par gramme de tourteaux (mg AGE/g). Les expériences sont répétées 3 fois.

I.3.7.1.2. Dosage des flavonoïdes :

- **Principe :**

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par Lamaison et Carnat (Lamaison et Carnat, 1991) en utilisant une solution méthanolique de trichlorure d'aluminium comme réactif. Lors de cette réaction les flavonoïdes réagissent avec ce réactif en formant un complexe jaune et qui absorbe dans le visible à une longueur d'onde de 430 nm.

- **Protocole expérimental :**

Dans des tubes à essai, on introduit une quantité de 1 ml de chaque extrait puis un même volume de trichlorure d'aluminium méthanolique ($AlCl_3$) est ajouté. Les échantillons sont secoués immédiatement et incubés à l'obscurité pendant 15 minutes à température ambiante, la lecture de l'absorbance à 430 nm contre un blanc s'effectue par un spectrophotomètre UV/Visible de type Shimadzu 1601.

Afin de quantifier Les teneurs en flavonoïdes des différents extraits des fruits de *Phillyrea angustifolia*, nous avons choisi la quercétine comme standard. Ces valeurs sont exprimées en milligrammes équivalent en quercétine (QE) par gramme de tourteaux (mg QE/g). Les expériences sont répétées 3 fois.

I.3.8. Evaluation de l'activité antioxydante :

Test du DPPH• :

- **Le Principe :**

Cette méthode est rapide et facile à réaliser, largement utilisée pour évaluer et comparer l'activité antioxydante de grand nombre des composés ou des extraits, ces derniers permettant à réagir avec un radical stable coloré (violet foncé), qui possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote centré. La solution de DPPH• avec le méthanol ou l'éthanol ou l'eau est caractérisée par une bande absorbante à environ (517 nm).

Lorsque la solution de DPPH• est mélangée à celle d'une substance ayant une activité antioxydante capable de donner un atome d'hydrogène, cela conduit à la formation de 2,2-diphényl-1-

picrylhydrazine jeune claire forme réduite (DPPH-H) et au radical (A•) (en prenant en compte, la présence toujours des résidus du groupe picryl de couleur jaune pâle) **Figure.I.1.**

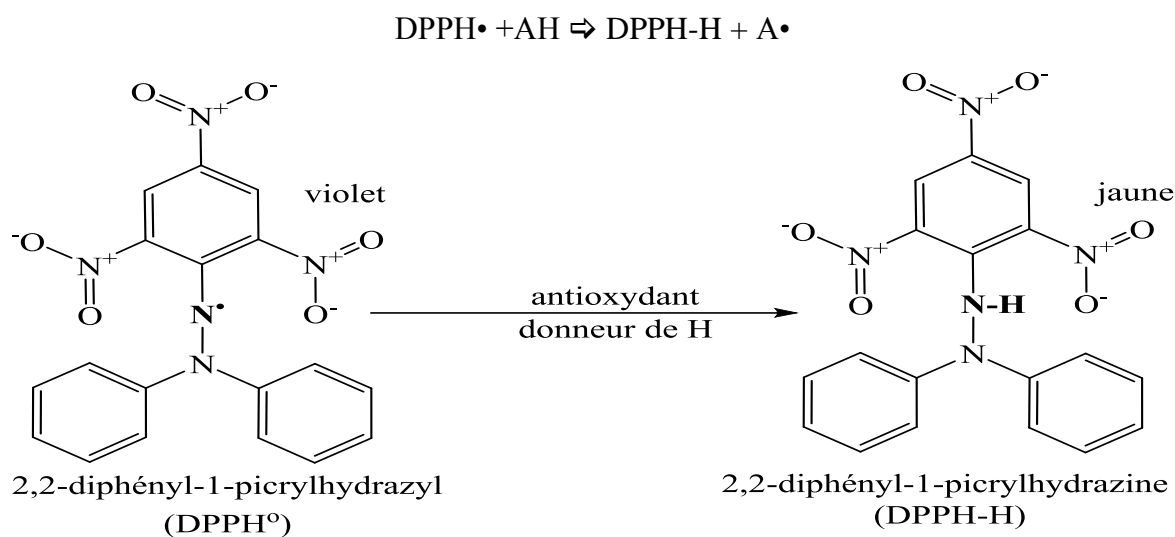


Figure.I.1 : Mécanisme de réduction DPPH•.

- **Protocole expérimental** :

La solution de DPPH• (100µM) est préparée dans l'éthanol pour les extraits lipidiques (huiles et lipides neutres) et dans le méthanol pour les extraits phénolique des fruits de *Phillyrea angustifolia*.

La substance à tester est ajouté à 1 ml de la solution de DPPH•. Chaque mélange réactionnel a été secoué immédiatement, Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 517 nm par un spectrophotomètre UV/Visible de type Shimadzu 1601.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de réduction du DPPH• :

$$PR = [(A_0 - A_i) / A_i] \times 100\%$$

A_0 est l'absorbance du radical DPPH• seul.

A_i est l'absorbance du radical DPPH• en présence de l'extrait antioxydant.

Les capacités antioxydantes de nos différents échantillons sont exprimées en EC50 (Efficient Concentration) qui est définie comme la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50% de DPPH•, la relation entre l'indice de EC50 et l'activité antioxydante est inversé, plus l'indice de EC50 est petite, plus l'antioxydant est puissant. Les expériences sont répétées 3 fois.

Les valeurs expérimentales de l'évaluation de l'activité antioxydante obtenues ont été exprimées par une moyenne et plus ou moins l'écart type. Le coefficient de corrélation des propriétés antioxydante a été déterminé en utilisant l'Excel 2013.

Chapitre II : Résultats et discussion.

II.1. Traitement et extraction :

II.1.1. Les rendements en lipides :

Les rendements en lipides totaux, lipides neutres, glycolipides et phospholipides ont été calculés. Les valeurs obtenues sont regroupées dans le **Tableau II.1**, elles sont exprimées en pourcentage massique (m/m).

Tableau .II.1 : Les teneurs et les rendements des huiles et des lipides totaux des échantillons F1, F2 et F3 de *Phillyrea angustifolia*.

Première méthode de Folch								
Echantillon F1			Echantillon F2			Echantillon F3		
Rendement			Rendement			Rendement		
LN	PL	GL	LN	PL	GL	LN	PL	GL
42,90 %	2,36 %	1,14 %	46,72 %	3,71 %	1,51 %	48,31 %	6,60 %	2,34 %
Deuxième méthode à l'hexane								
Huile F1+ F2 extrait par l'hexane						Huile F3 extrait par l'hexane		
3.22 %						5.23 %		

D'après les valeurs du **Tableau II.1**, nous remarquons que les rendements en LT dans les trois échantillons en utilisant la méthode de Folch, ils varient de 3,74 à 7,67 %. Le meilleur rendement a été enregistré pour l'échantillon F1 (7,67%), par contre l'échantillon F2 a dévoilé le rendement le plus faible (3,74%) presque la moitié de celui de l'échantillon F1. Les différentes classes des lipides sont dominées par les LN suivis par les PL et en fin les GL. Les rendements en lipides neutres s'échelonnent entre 42,90 % et 48,31 %. Les rendements en PL et en GL sont faibles et incomparables à ceux des LN. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés dans la littérature dont il a été constaté que la fraction des LN est toujours majoritaire dans les huiles végétales et que les autres classes ne représentent que des petits rendements (Napier, *et al.*, 2014). Les rendements en huiles des extraits hexanique des échantillons F1 + F2 et F3 sont 3,22 % et 5,23 % respectivement. Toutefois et quel que soit la méthode d'extraction utilisée les rendements en LT sont comparables aux sorgho et mil (Songre-Ouattara *et al.*, 2015), et faibles comparativement à ceux trouvés pour les graines et les fruits oléagineux tels que le tournesol (Ibrahim, 2012), l'olivier (Ranalli *et al.*, 2002), les fruits de Pistachier de l'atlas (Yousfi *et al.*, 2003) et l'arganier. (Yousfi *et al.*, 2009)

Ces faibles valeurs en rendement ne permettront pas de classer les fruits *Phillyrea angustifolia* dans la catégorie des graines et fruits oléagineux et les utiliser en industrie agroalimentaire et par conséquent en nutrition, et donc ils peuvent servir à des applications thérapeutiques ou cosmétiques après l'étude de leurs compositions chimiques en molécules bioactives.

II.1.2. Analyse des acides gras

La composition en acides gras de tous les extraits lipidiques a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse. Les acides gras ont été identifiés à l'aide d'un chromatogramme de références d'esters méthyliques d'acides gras par la comparaison des temps de rétention. Les résultats sont exprimés par le pourcentage relatif des aires des pics et ils sont regroupés dans le **Tableau II.2**.

Tableau .II.2 : Composition relative en acides gras des LT et des LN des fruits étudiés.

Acide gras	Dénomination	LT1	LT2	LT3	LN1	LN2	LN3
C12 :0	Acide Laurique	0.03	0.03	0.05	0.02	0.02	0.52
C14 :0	Acide Myristique	Trace	0.07	Trace	0.02	0.02	1.57
C16 :0	Acide palmitique	8.55	7.83	8.78	8.42	7.86	4.49
C16 :1 ω 9	Acide palmitoléique	0.52	0.68	0.51	0.5	0.64	2.79
C17 :0	Acide margarique	0.17	0.09	0.09	0.1	0.05	1.27
C17 :1 ω 8	Acide margaroléique	0.14	0.08	0.09	0	0	0
C18 :0	Acide stéarique	4.12	3.56	4.05	4.16	3.6	5.88
C18 :1ω9	Acide oléique	60.57	60.07	62.34	63.03	60.81	30.76
C18 :2ω6	Acide linoléique	22.8	22.09	19.39	1.27	21.72	13.73
C18 :3 ω 3	Acide linoléinique	0.67	1.07	0.89	0.69	0.99	1.98
C20 :0	Acide arachidique	0.5	0.66	0.69	0.56	0.66	7.47
C20 :1 ω 9	Acide gondoïque	0.44	0.52	0.61	0.43	0.5	2.56
Acide gras saturés		13.37	12.24	13.66	13.28	12.21	21.2
Acides gras monoinsaturés		61.67	61.35	63.55	63.96	61.95	36.11
Acides gras polyinsaturés		23.47	23.16	20.28	1.96	22.71	15.71
Totale		98.51	96.75	97.49	79.2	96.87	73.02
AGI/AGS		6.37	6.90	6.14	4.96	6.93	2.44

Tous les extraits lipidiques totaux et neutres contiennent les acides gras habituels rencontrés dans le règne végétal à savoir les acides : palmitique, stéarique, oléique et linoléique. Les acides gras insaturés oléique et linoléique sont majoritaires. L'acide oléique représente le taux le plus élevé, son pourcentage atteint environ 60% à l'exception de la fraction des lipides neutres de l'échantillon F3 (LN3) dont le pourcentage est de 30,76%, suivi par l'acide linoléique où son pourcentage est exprimé par 12,67% pour le LN3 et 22,80% pour LT1. Les acides gras saturés sont représentés par les deux acides ; palmitique et stéarique dont l'acide palmitique est le plus dominant. Leurs pourcentages varient entre 4,46 % et 8,55% pour l'acide palmitique et 3,56% et 5,88% pour l'acide stéarique. Les autres acides gras sont présents avec de faibles pourcentages ou à des l'état de traces.

À notre connaissance, c'est pour la première fois où la composition en acides gras des extraits lipidiques des fruits *Phillyrea angustifolia* est étudiée et par conséquent nous n'avons pas trouvé dans la littérature des travaux afin de comparer nos résultats avec ces travaux. Toutefois, le pourcentage élevé en acides gras insaturés nous permet de dire que les résultats obtenus sont comparables à d'autres études similaires menés sur les huiles du Pistachier de l'Atlas (Yousfi *et al.*, 2003), (Guenane *et al.*, 2015), les huiles du Pistachier lentisque et Quercus (Charef *et al.*, 2008), l'huile du fruit de l'Arganier (Yousfi *et al.*, 2009) et les huiles de sorgho et mil perlé (Hadbaoui *et al.*, 2010). Les proportions des acides gras constitutifs des extraits lipidiques des fruits de *Phillyrea angustifolia* confirment une similitude entre les lipides de ces fruits et les autres huiles alimentaires comme les huiles de tournesol, du soja, du maïs et en particulier l'huile d'olive qui est caractérisée par une proportion élevée de l'acide oléique (proche de 60%) (Karleskind, 1992).

Les rapports calculés entre les acides gras insaturés et les acides gras saturés (AGI/AGS) dans les LT montrent également une fluctuation légère en fonction des échantillons étudiés.

Ce rapport oscille entre 6.14 pour LT3 et 6.90 pour LT2. Ces rapports sont supérieurs à ceux enregistrés dans l'huile des fruits du Pistachier de l'Atlas algérien et d'Argan (*Argania spinosa*) et l'huile d'olive vierges (*Oleasters*) de Bejaia (Algérie). Alors, on peut dire que l'huile des fruits de *Phillyrea angustifolia* possède une grande stabilité à l'auto-oxydation et une valeur nutritionnelle importante. (Boucheffa *et al.*, 2014; Yousfi *et al.*, 2003; Yousfi *et al.*, 2009).

Le **Tableau II.3**, regroupe les résultats de la composition en acides gras des phospholipides et des glycolipides des fruits de *Phillyrea angustifolia*. D'après ces résultats, nous avons remarqué que la composition qualitative des glycolipides et des phospholipides des fruits en acides gras est similaire à celle des lipides totaux et des lipides neutres, car on trouve les mêmes acides gras mais avec des proportions différentes. Les fractions phospholipides et glycolipides sont caractérisées aussi par une forte dominance des acides gras insaturés représentés par les acides ; oléique, linoléique et linoléique.

Il est remarquable que les pourcentages des acides palmitique et linoléique soient supérieurs à ceux enregistrés dans les lipides neutres et les lipides totaux, leurs valeurs s'échelonnent de 12,03-19,15 % et 17,15 à 30,72 % pour l'acide palmitique et l'acide linoléique respectivement. Il est aussi clair de remarquer d'un côté, que les phospholipides et les glycolipides renferment des proportions moins importantes en acide oléique (35,08-52,27%) , que les lipides totaux et les lipides neutres (au voisinage de 60%) et des proportions plus importantes en acide gras essentiel ; l'acide linoléique avec des pourcentages qui varient de 2,20 à 6,86% d'un autre côté.

Tableau .II.3 : Composition relative en acides gras des PL et des GL des fruits étudiés.

Acide gras	Dénomination	PL1	PL2	PL3	GL1	GL2	GL3
C12 :0	Acide Laurique	traces	0.25	0.22	traces	0.21	1.85
C14 :0	Acide Myristique	0.15	0.21	0.06	0.72	0.1	0.23
C16 :0	Acide palmitique	17.26	15.42	19.15	15.6	12.03	15.94
C16 :1 ω 9	Acide palmitoléique	1.56	0.29	0.21	0.75	0.13	1.54
C17 :0	Acide margarique	0.73	0.22	0.22	4.15	0.15	0.43
C17 :1 ω 8	Acide margaroléique	0	0	0	0	0	0
C18 :0	Acide stéarique	5.74	4.24	4.85	6.41	4.32	6.29
C18 :1ω9	Acide oléique	35.08	39.86	40.66	38.85	52.27	35.28
C18 :2ω6	Acide linoléique	30.72	26.05	22.66	23.29	23.34	17.15
C18 :3 ω 3	Acide linoléique	5.35	4.43	5.89	6.37	2.2	6.86
C20 :0	Acide arachidique	0.82	1.8	1.02	1.26	0.96	0.63
C20 :1 ω 9	Acide gondoïque	0.3	0.25	0.26	trace	1.66	2.06
Acide gras saturés		24.7	22.39	25.74	28.14	17.98	25.37
Acides gras monoinsaturés		36.94	40.4	41.13	39.6	54.06	38.88
Acides gras polyinsaturés		36.07	30.48	28.55	29.66	25.54	24.01
Totale		97.71	93.27	95.42	97.4	97.58	88.26
AGI/AGS		2.96	3.17	2.71	2.46	4.43	2.48

L'existence de l'acide gras polyinsaturé : acide linoléique avec un pourcentage très proche à l'acide oléique dans les glycolipides et les phospholipides comparativement aux autres acides gras insaturés peut être expliquée par l'action d'une enzyme, l'oléate desaturase qui transforme l'acide oléique en acide linoléique au cours de la maturation des fruits de *Phillyrea angustifolia*. (Cherif *et al.*, 1975)

Les rapports (AGI/AGS) des fractions des LN, des GL et des PL dans l'échantillon F2 ont également été supérieures à celles retrouvés dans les échantillons F1 et F3.

II.3.3. Etude des structures des triacylglycérols

II.3.3.1. Préparation de TAG :

La **Figure.II.1** représente la purification de l'huile de fruits de *Phillyrea angustifolia* (F3), elle montre que la majorité des espèces moléculaires lipidiques sont des TAGs (spot important). Les TAGs ont été ensuite estérifiés et analysés par CPG (Tableau II.7). Les traces des AG libres et des glycérols qui apparaissent sur le côté gauche proviennent probablement de l'hydrolyse des glycérides. (Berrada, 1972)

II.3.3.2. Hydrolyse enzymatique :

La **Figure.II.2** de l'hydrolyse des TAGs purifiés de F3 montre que le spot des monoglycérides en position -2 qui apparaissent sur le côté droit provient de l'hydrolyse des TAG par la lipase pancréatique de porc.

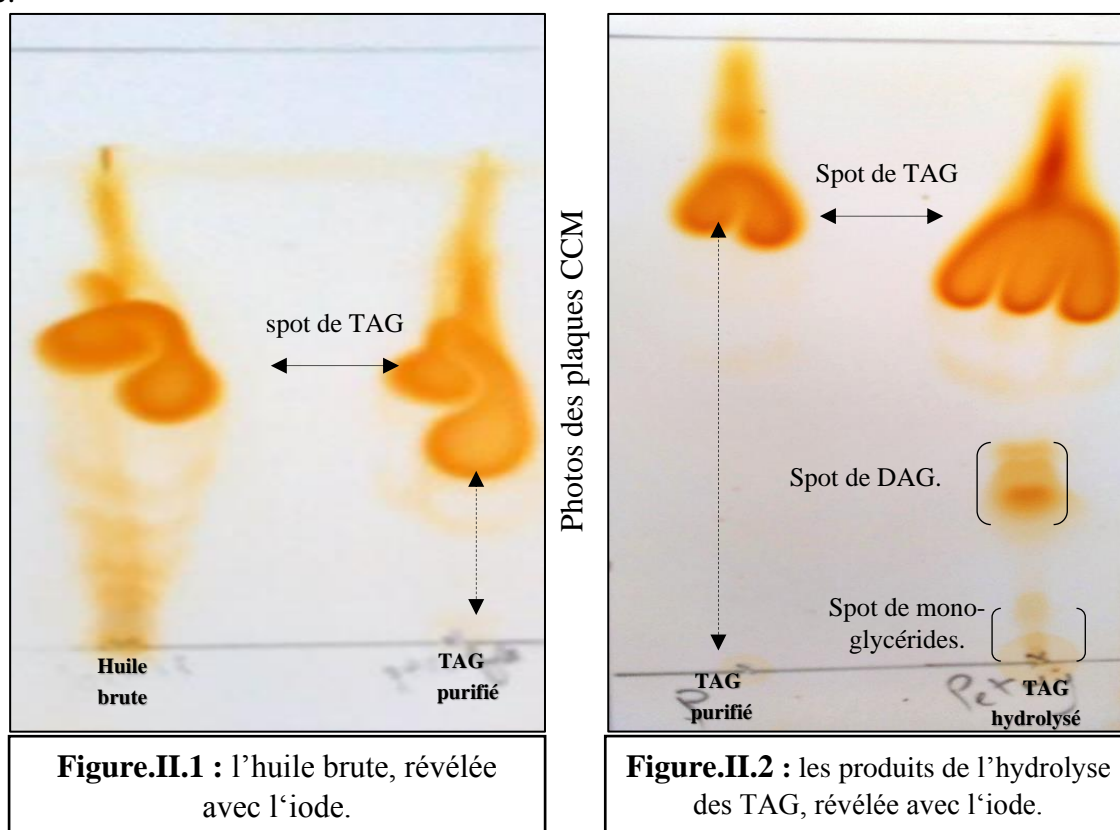


Figure.II.1 : l'huile brute, révélée avec l'iode.

Figure.II.2 : les produits de l'hydrolyse des TAG, révélée avec l'iode.

L'hydrolyse enzymatique des TAGs de l'huile de d'échantillon F3 par la lipase pancréatique du porc **Tableau II.4** nous montre que les acides oléique, palmitique, stéarique et linoléique représentent les proportions 71.66%, 16.55%, 4.12% et 1.11% respectivement des acides gras en position interne avec l'acide oléique comme composant insaturé majeur suivie par l'acide palmitique. Par contre, l'acide laurique et linoléique sont absents. On remarque également que les acides oléique, linoléique, stéarique, palmitique, laurique et linoléique sont aussi répartis sur les positions externes (sn-1 et sn-3) avec les teneurs 63.80%, 20.64%, 5.49%, 4.78%, 1.83% et 1.71% respectivement. Alors que, la position sn-2 est très largement occupée par les acides gras insaturés C18 (oléique et linoléique) avec un taux de 80.57% des acides gras du TAG de l'huile. Ce résultat est en accord avec les travaux de (Yousfi *et al.*, 2003, 2009) et les travaux de (Charef *et al.*, 2008) et confirmé par les théories de distribution et de position décrites par Vander Wal, Coleman, Fulton et Gunstone qui montrent que les monoglycérides produits par l'hydrolyse pancréatique des TAGs des huiles végétale sont principalement occupés par les acides oléique et linoléique. Le reste des acides gras est distribué aléatoirement dans les deux autres positions 1 et 3 dans la molécule du triglycéride. (Paoletti et Kritchevsky, 1963).

Tableau .II.4 : Taux des différents AG dans les positions sn-2 et sn-1+3 de l'échantillon F3.

		P	S	O	L	La	Ln
TAG Purifiée F3	x	8,70	5,03	66,42	14,13	1,22	1,14
Mono-AG sn-2	y	16,55	4,12	71,66	1,11	0,00	0,00
DAG sn-1,3	(3x-y)/2	4,78	5,49	63,80	20,64	1,83	1,71

P : palmitique ; S : stéarique ; O : oléique ; L : linoléique ; La : Laurique ; Ln : linoléique.

II.3.3.4. Détermination des TAG à partir des acides gras en position sn-2 :

La combinaison de digestion des TAGs par la lipase pancréatique et les méthodes chromatographiques (CCM et CPG), nous permet de calculer les pourcentages des acides gras en sn-2 et en sn-1,3. Admettant que les positions sn-1 et sn-3 ne sont pas distinguées. Donc, seuls trois types de TAGs peuvent être calculés. Si on suppose qu'un TAG estérifié par trois acides gras A, B et C et la position sn-2 est occupée par un acide gras connu **Figure.II.3**, les isomères possibles à partir des deux positions sn-1,3 sont :

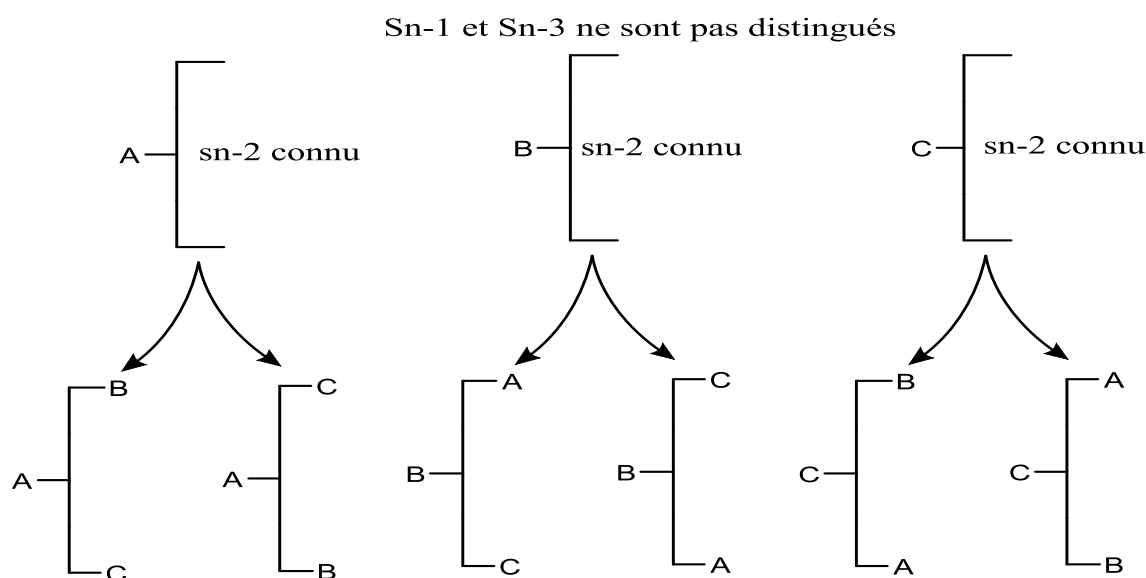


Figure.II.3 : les six isomères de TAG possibles.

Nous avons adopté les méthodes de Coleman et Gunstone pour la détermination de la composition des TAGs et qui est basée principalement sur la composition des huiles en acides gras en position-2 après hydrolyse par la lipase pancréatique de porc. Si x est le pourcentage d'un acide gras dans le triacylglycérides et y le pourcentage de cet acide gras en position-2 dans le triacylglycérol, alors le quotient représente le pourcentage de l'acide gras en position [1+3] par l'équation suivante :

$$[sn - 1, 3]\% = (3x - y)/2.$$

De la même manière, on peut calculer le pourcentage de tous les acides gras des huiles des fruits *Phillyrea angustifolia* les trois positions sn-2 et sn-1,3.(Paoletti et Kritchevsky, 1963)

Le calcul des pourcentages relatifs des triacylglycérides par la méthode de Coleman et Gunstone sont détaillées dans l'annexe.

La théorie de Gunstone ne prend pas en considération la position des acides gras surtout en position sn-2 par contre la théorie de Coleman précise la position de chaque acides gras dans les TAGs en position sn-2 et sn-1,3.

On peut donc dire qu'il n'y a qu'une nuance entre les proportions de la théorie Gunstone et Coleman des TAGs qui contiennent l'acide gras laurique ou linoléique à cause de leurs proportions en position sn-2 égal zéro dans le sn-2-monoglycéride résultant de l'hydrolyse enzymatique (**Tableau II.4**).

D'après les résultats regroupés dans le **Tableau II.5** et la **Figure.II.4** de l'huile des fruits étudiés, onze TAGs ont été identifiés : OOO, OOL, POO, OSO, POL, OLL, OLS, POS, OOLa, OOLn, et POP, ils représentent plus de 80% du total des TAGs, avec une domination de OOO de (29.16%), suivi par OOL, POO, SOO et OPL avec les proportions 19.32%, 11.10%, 6.69% et 5.83% respectivement, Les autres TAGs sont minoritaires (moins de 4%). On remarque que notre huile est riche en triglycérides formés par la combinaison des acides gras oléique, linoléique et palmitique, la proportion élevée d'acide oléique (66.42%) justifie la prédominance du trioléin OOO, on constate que le pourcentage du OOL est supérieure aux POO et SOO car le pourcentage de l'acide linoléique dans l'huile est supérieure aussi aux celles de l'acide palmitique et stéarique.

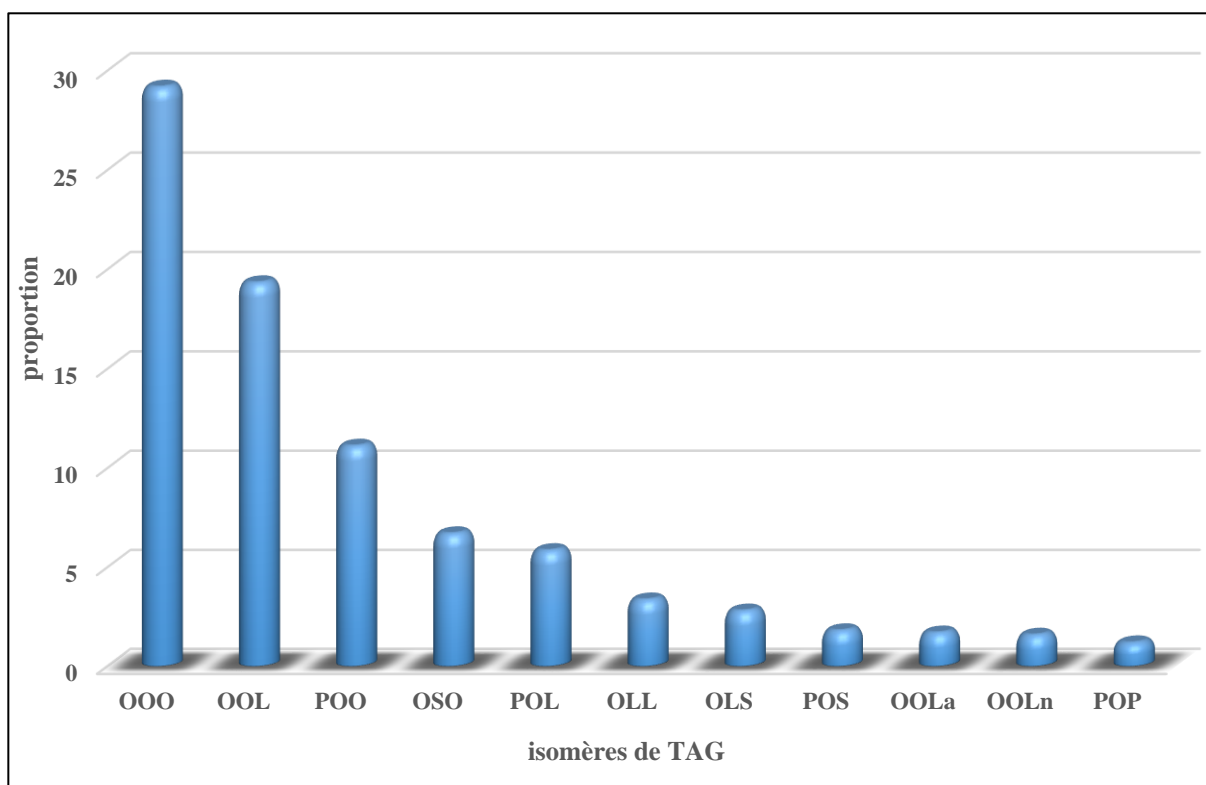


Figure.II.4 : Les principaux triacylglycérols contenus dans l'huile des fruits étudiés.

Tableau .II.5 : Composition triglycéridique de l'huile de la fraction hexanique F3 selon Coleman et Gunstone.

Coleman													Gunstone		G-	
TAG	%	TAG	%	TAG	%	TAG	%	TAG	%	TAG	%	Somme	TAG	%		
PPS	0,0434	SPP	0,0094	PSP	0,04							0,0961	n.d	0	SSS	
PSS	0,0498	SSP	0,0108	SPS	0,01							0,0714	n.d	0		
PSLa	0,0166	SLaP	0,0036	PLaS	0,02	SPLa	0,004					0,0404	n.d	0		
PPP	0,0377											0,0377	n.d	0		
PPLa	0,0145	PLaP	0,0145									0,0289	n.d	0		
SSS	0,0124											0,0124	n.d	0		
SLaS	0,0041	SSLa	0,0041									0,0083	n.d	0		
PLaLa	0,0055											0,0055	n.d	0		
SLaLa	0,0014											0,0014	n.d	0		
POS	0,5793	SPO	0,1254	OSP	0,19	PSO	0,579	OPS	0,19	SOP	0,125	1,7850	S,O,P	1,60	SSU S,U,S	
LLaP	0,0010	PLLa	0,0625	PLaL	0,06	LPLa	0,001					0,1270	P,L,La	0,082		
POP	0,5042	PPO	0,5042	OPP	0,16							1,1718	P,O,P	1,384		
OLaP	0,0626	POLa	0,1932	PLaO	0,19	OPLa	0,063					0,5117	P,O,La	0,388		
OSS	0,2157	SSO	0,1441	SOS	0,14							0,5039	S,O,S	0,462		
PLS	0,1874	SLP	0,0406	PSL	0,19	LPS	0,003	SPL	0,04	LSP	0,003	0,4618	P,L,S	0,027		
PPL	0,1631	LPP	0,0025	PLP	0,16							0,3287	P,L,P	0,023		
OLaS	0,0720	SOLa	0,0481	OSLa	0,07	SLaO	0,048					0,2400	S,O,La	0,224		
LSS	0,0034	SSL	0,0466	SLS	0,05							0,0966	S,L,S	0,098		
SLnP	0,0034	SPLn	0,0034	PLnS	0,02	PSLn	0,016					0,0378	P,Ln,S	0,027		
LLaS	0,0011	LSLa	0,0011	SLaL	0,02	SLLa	0,016					0,0333	S,L,La	0,047		
PPLn	0,0135	PLnP	0,0135									0,0270	P,Ln,P	0,023		
OLaLa	0,0240											0,0240	La,O,La	0,027		
PLaLn	0,0048	PLnLa	0,0052									0,0100	P,Ln,La	0,007		
SLnS	0,0039	SSLn	0,0039									0,0077	S,Ln,S	0,008		
SLaLn	0,0013	SLnLa	0,0013									0,0026	S,Ln,La	0,003		
LLaLa	0,0004											0,0004	La,L,La	0,005		
POO	6,7366	OPO	2,1831	OOP	2,18							11,10	P,O,O	12,51		UUS S,U,U
SLnLn	0,0012											0,0012	S,Ln,Ln	0,002		
LLnLa	0,0003	LLaLn	0,0003									0,0007	La,L,Ln	0,012		
OSO	2,5084	SOO	1,6757	OOS	2,51							6,6926	S,O,O	7,235		
POL	2,1792	LPO	0,0339	PLO	2,18	OPL	0,706	OLP	0,71	LOP	0,03	5,8386	P,O,L	5,325		
OLS	0,8114	OSL	0,8114	SOL	0,54	LSO	0,039	SLO	0,54	LOS	0,04	2,7849	S,O,L	3,078		
OOLa	0,8367	OLaO	0,8367									1,6733	La,O,O	1,755		
PLL	0,7049	LPL	0,0110	LLP	0,01							0,7269	P,L,L	0,566		
OLLa	0,2706	OLaL	0,2706	LOLa	0,01	LLaO	0,013					0,5673	La,O,L	0,746		
OLnP	0,0585	POLn	0,0584	OPLn	0,06	PLnO	0,181					0,3560	P,O,Ln	0,429		
OLnS	0,0672	OSLn	0,0672	SLnO	0,04	SOLn	0,045					0,2243	S,O,Ln	0,248		
LLS	0,0126	SLL	0,1753	LSL	0,01							0,2006	S,L,L	0,327		
LLnP	0,0009	LPLn	0,0009	PLLn	0,01	PLnL	0,058					0,0654	P,L,Ln	0,091		
LLnS	0,0010	SLLn	0,0145	SLnL	0,01	LSLn	0,001					0,0311	S,L,Ln	0,052		
OLaLn	0,0224	OLnLa	0,0224									0,0448	La,O,Ln	0,060		
LLLa	0,0042	LLaL	0,0042									0,0084	La,L,L	0,079		
PLnLn	0,0048											0,0048	P,Ln,Ln	0,004		
LLnLn	0,0003											0,0003	L,Ln,Ln	0,011		
OOO	29,1688											29,1688	O,O,O	31,84	UUU U,U,U	
OOL	9,4356	OLO	9,4356	LOO	0,45							19,3244	L,O,O	20,32		
OLL	3,0523	LOL	0,1466	LLO	0,15							3,3455	O,L,L	4,324		
OOLn	0,7818	OLnO	0,7818									1,5636	Ln,O,O	1,639		
OLLn	0,2529	OLnL	0,2529	LOLn	0,01	LLnO	0,012					0,5301	O,L,Ln	0,697		
LLL	0,0474											0,0474	L,L,L	0,306		
OLnLn	0,0210											0,0210	O,Ln,Ln	0,028		
LLLn	0,0039	LLnL	0,0039									0,0079	Ln,L,L	0,074		

Les pourcentages des quatre catégories des triacylglycérols GS₃, GS₂U, GSU₂ et GU₃ sont déterminés dans l'huile de la fraction hexanique F3 **Tableau II.6**. On remarque que le pourcentage de GS₃ est très faible et ne dépasse pas 0.30%. Les triacylglycérols disaturés GS₂U atteint une teneur de 5.36%. Cette valeur considérable est due généralement à la présence de 8.7% d'acide palmitique. Autrement Les triacylglycérols de type GSU₂ qui contiennent de l'acide oléique et palmitique constituent une proportion considérable environ 33%. Les triacylglycérols polyinsaturés GU₃ représentent la majorité des triacylglycérols dans l'huile de *Phillyrea angustifolia* avec les proportions de 54% et 59% selon la méthode de calcul utilisée. Ce résultat est justifié par la présence d'une proportion élevée de trioléin OOO (29.16%), suivi par le dioléolinoléin OOL et palmito-oléolinoléin POL avec des proportions 19.32% et 11.10% respectivement. Ce résultat est attendu, car les triacylglycérols contiennent des proportions importantes en acides gras oléique, linoléique et palmitique.

Tableau .II.6 : Les proportions relatives des quatre catégories des TAGs.

Catégorie	Coleman	Gunstone	Théorique (figurer en annexe)
SSS	0,30	/	/
SSU	5.36	4.43	5.06
UUS	30.32	32.51	33.94
UUU	54	59.23	64

Nos résultats sont comparables avec les huiles végétales alimentaires qui contiennent des proportions importantes de l'ordre de 44% de triacylglycérols tri-insaturés GU₃ (manuel des corps gras) et les travaux réalisés au sein de laboratoire des sciences fondamentales relatives sur des graines et des fruits locaux (Yousfi *et al.*, 2003, 2009), (Benalia *et al.*, 2015) et (Charef *et al.*, 2008).

II.3.4. Dosage spectrophotométrique des tocophérols des huiles et des LN :

À partir de la courbe d'étalonnage de la vitamine E, nous avons calculé les quantités des tocophérols totaux des lipides neutres des trois échantillons des fruits et les échantillons F1+F2 et F3 issus de l'extraction par l'hexane. Les valeurs illustrent la moyenne de trois répétitions, les résultats sont consignés dans le **Tableau II.7**.

D'après ces résultats, on remarque que les quantités des tocophérols varient de 110,17 à 529,02 mg de tocophérols totaux en équivalent de la vitamine E par 100 g d'extrait. Les lipides neutres de l'échantillon 3 ont enregistré la plus grande quantité (529,02 mg/100g), suivi par les

lipides neutres de l'échantillon 1 (439,84 mg/100g) et en fin l'échantillon 2 avec une quantité de 110,17 mg/100g. Pour les extraits hexanique le mélange des deux échantillons F1+F2 a dévoilé la quantité la plus importante en tocophérols (247,87 mg/100g) par rapport à l'échantillon F3 dont la quantité en tocophérols a été 108,13 mg/100g. Ces importantes différences dans les quantités des tocophérols totaux sont dues probablement aux différentes méthodes d'extraction et les solvants utilisés ainsi à la période de la cueillette des échantillons.

Tableau .II.7 : Les teneurs en tocophérols de l'huile et les LN des fruits étudiés.

		Teneurs en tocophérols
		Teneur (mg / 100g)
Lipides Neutres	LN1	439,84 ±24,31
	LN2	110,17± 2,95
	LN3	529,02± 22,58
Huile F1+2		247,87± 8,93
Huile F3		108,13± 1,41

Les quantités en tocophérols totaux dans nos échantillons sont comparables à celles trouvées pour d'autres huiles végétales telles que le coton (38-120mg/100g) et le maïs (33-372 mg/100g). Ces quantités sont supérieures à celle de l'huile d'olive (12 mg/100g), de babassu (6-13 mg/100g) et de noix de coco (5mg/100g) (Kamal-Eldin *et al.*, 1997; van Niekerk et Burger, 1985; Yoshida *et al.*, 1990). Ces comparaisons, nous permet de dire que les échantillons d'extraits lipidiques des fruits de la plante étudiée sont relativement riches en composés tocophérolique. Par conséquent, nous pouvons dire que ces huiles peuvent être utilisées pour des usages thérapeutiques ou cosmétiques.

II.3.5. Dosage spectrophotométrique des phytostérols des huiles et LN :

À partir de la courbe d'étalonnage du cholestérol, nous avons déterminé les teneurs en phytostérols dans nos extraits lipidiques. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le **Tableau II.8**. Les valeurs illustrent la moyenne de trois répétitions ± écart type. L'analyse de l'ensemble des résultats montre clairement que les quantités des phytostérols totaux sont importantes dans tous les extraits. Les teneurs les plus importantes ont été enregistrées dans les échantillons des lipides neutres des échantillons F1 et F3, les valeurs sont 74,27 mg/g et 76,69 mg/g respectivement. Si on compare nos résultats à ceux trouvés pour l'huile d'Argan (5,05 à 8,45 mg/g) (Hamia, 2007), et les huiles de citrouille (2,13à 11,6 mg/g) (Benalia, 2016), on peut dire que les extraits lipidiques des fruits de *Phillyrea angustifolia* sont riches en composés stéroliques. Nous avons remarqué qu'il y a une bonne corrélation positive entre les teneurs en

phytostérols et tocophérols des extraits lipidiques neutres et hexaniques avec un coefficient de corrélation ($r = 0,63$). Ce qui montre qu'il a une tendance entre ce type de composés.

Tableau II.8 : Les teneurs en phytostérols de l'huile et les LN des fruits étudiés.

		Teneurs en phytostérols
		Teneur (mg /g)
Lipides Neutres	LN1	74,27 ±4,46
	LN2	22,85 ±2,50
	LN3	76,69 ±3,90
Huile F1+F2		5,56 ±4,08
Huile F3		57,82 ±6,81

II.3.6. Extraction et analyse quantitative des composés phénoliques :

Il est constatable que les fruits de la cueillette du mois de février (stade2) dévoile les rendements des fractions d'acétate d'éthyle sont les plus faibles avec 0,92% et 1,12% et que les fruits cueillis en décembre (stade1) présentent les rendements les plus forts avec 0,99% et 1,42% et ceci dans les deux systèmes de solvant acétone/eau et méthanol/eau respectivement.

Les fractions hexaniques présentent des rendements très faibles dans tous les fruits, quel que soit la date de cueillette le rendement ne dépasse pas 0.55% **Tableau II.9**.

Ces résultats montrent l'influence de la date de la cueillette sous le rendement de l'extraction.

II.3.6.1. Quantification des composés phénoliques :

II.3.6.1.1. Quantification des phénols totaux :

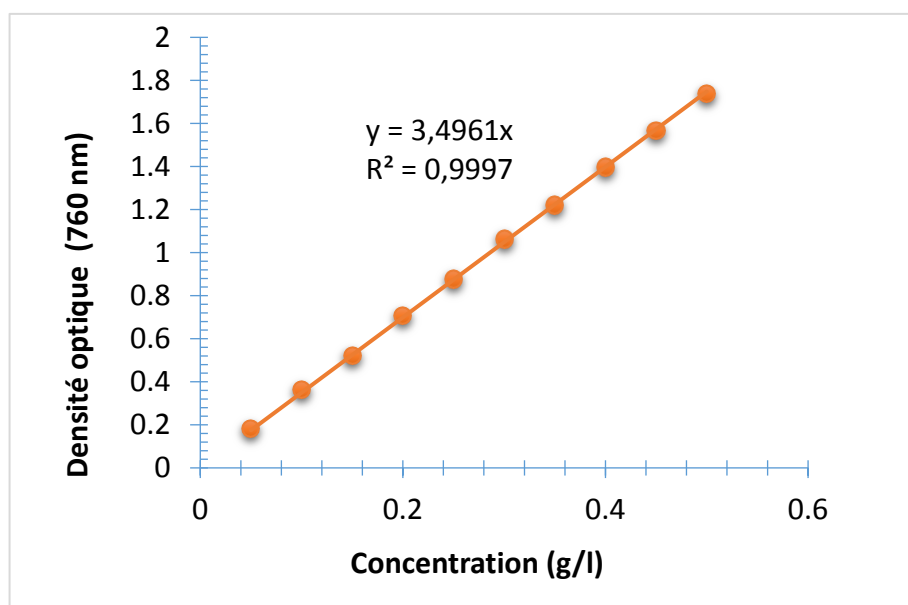


Figure II.5 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Les teneurs en phénols totaux des différents extraits ont été calculées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Figure II.5**).

Les valeurs illustrent la moyenne de trois répétitions, les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau II.9**.

Selon les valeurs mentionnées dans le **Tableau II.9**, nous remarquons que les quantités les plus élevées en phénols totaux ont été détectées dans les extraits d'acétate d'éthyle issus du système de solvant hydroalcoolique méthanol/eau avec 4,4 mg EAG/g de tourteaux pour l'échantillon **F1+F2** et 5,36 mg EAG/g de tourteaux pour **F3**. Tandis que, les fractions de l'acétate d'éthyle issues du système de solvant hydroacétonique ont dévoilé des teneurs en phénols totaux moins élevées. Les fractions hexanique ont renfermé des quantités très faibles comparativement aux fractions d'acétate d'éthyle cela est dû probablement à la différence de polarité des deux solvants.

Tableau II.9 : Teneur en composés phénoliques dans les tourteaux (**F1+2**, **F3**) exprimées en milligrammes équivalent en acide gallique (AG) par un gramme de tourteaux (mg EAG/g).

			Rendement	PT (mg/g)
Acétone/H ₂ O 7/3 v/v	Hexane	F1+F2	0.21%	0,76 ±0.16
		F3	0.20%	0,52 ±0.10
	Acétate d'éthyle	F1+F2	0.92%	3,26 ±0.33
		F3	0.99%	4,46 ±0.20
MéOH/H ₂ O 8/2 v/v	Hexane	F1+F2	0.55%	0,40 ±0.10
		F3	0.27%	0,05 ±0.12
	Acétate d'éthyle	F1+F2	1.12%	4,41 ±0.65
		F3	1.42%	5,36 ±0.61

Il faut noter aussi que les fruits de *Phillyrea angustifolia* du mois de décembre (F3) représentent les teneurs les plus élevées en phénols totaux comparées à celles de février (F1+F2). En effet d'après nos résultats les teneurs en phénols totaux de fruits *Phillyrea angustifolia* durant la maturation ont tendance à diminuer (Henane, Tlili, Him, Ali, et Jebari, 2015). Cette diminution est probablement corrélée à l'augmentation de l'activité des enzymes hydrolytiques au cours de la maturation des fruits. Cependant, l'implication des composés phénoliques dans des fonctions biologiques importantes pourrait soutenir l'hypothèse des besoins défensifs croissants de la maturation des fruits (Brahmi *et al.*, 2013).

En outre, nous avons enregistré que les rendements en résidu sec des différents extraits obtenues par les deux méthodes d'extraction (acétone/eau) et (méthanol/eau), et les teneurs en

composés phénoliques totaux varient dans le même sens. Néanmoins, ces teneurs restent faibles par rapport aux rendements ce qui peut être expliqué par la présence de composés non phénoliques extractibles avec les solvants utilisés. D'autre part, la méthode que nous avons utilisée pour le dosage des phénols totaux (test de Folin-Ciocalteu) ; est un test avec un réactif extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques. Parmi ces substances interférentes réducteurs, acides aminés, l'acide déhydroascorbique (DHA) et les sucres réducteurs (c'est-à-dire le glucose et le fructose). (Sánchez-Rangel *et al.*, 2013;Everette *et al.*, 2010)

Comme mentionné précédemment, le dosage par ce réactif donne une évaluation de tous les composés qui contiennent des groupes hydroxyles d'un extrait brut, ces composés sont appelés par des substances interférentes. En conséquence, le réactif donne un mauvais taux phénolique en prenant en considération les interactions chimiques des réducteurs présents presque dans tous les extraits des plantes, tels que les thiols, les acides aminés, les protéines, certaines vitamines et les ions inorganiques. En plus les solvants utilisés pour l'extraction éluent des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique. (Djeridane *et al.*, 2006)

La teneur en composés phénoliques de chaque fraction, varie selon leurs natures chimiques, leurs solubilités et leurs degrés de liaison avec d'autres constituants végétaux. (Macheix, j.-j., Fleuriet, a., et Jay-allemand, 2005). Ainsi, les solvants organiques sont capables d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires en facilitant l'extraction d'un plus grand nombre de molécules polaires, de moyenne et de faible polarité.(Nazemiyeh *et al.*, 2006)

II.3.6.1.2. Quantification des flavonoïdes :

Les teneurs en flavonoïdes des différents extraits ont été calculées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de la quercétine (**Figure II.7**), les résultats obtenus sont exprimées en milligrammes équivalent en quercétine (QE) par gramme de tourteaux (mg EQE/g). Ces valeurs illustrent la moyenne de trois répétitions \pm écart type. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau II.10**.

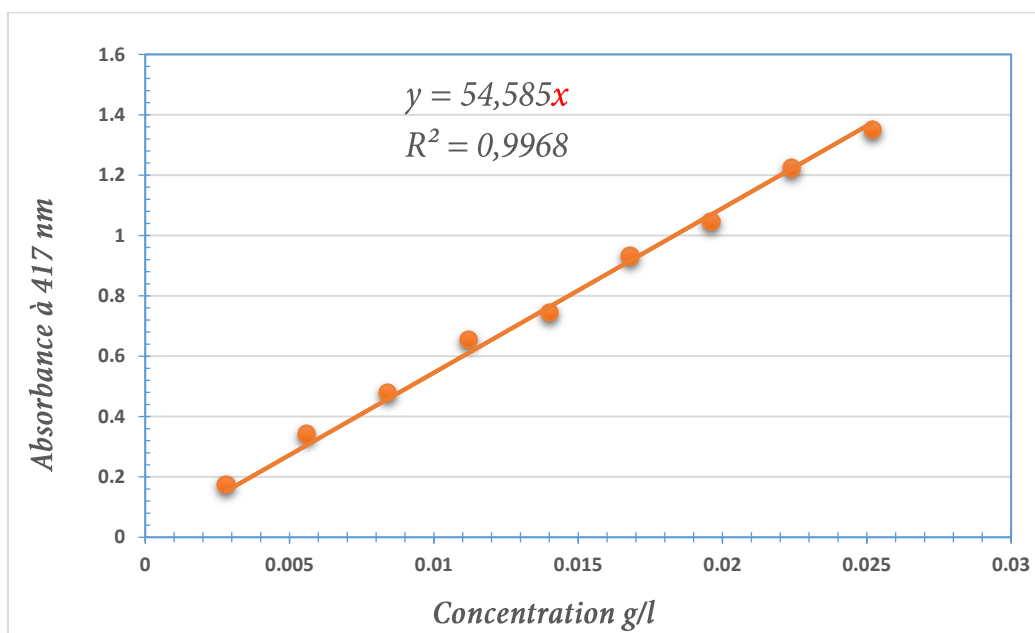


Figure II.7 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

À la lumière des résultats consignés dans le **Tableau II.10**, on observe que les quantités des flavonoïdes dans les différents extraits sont assez proches pour les deux méthodes d'extraction utilisées. Les valeurs les plus élevées ont été enregistrées pour l'échantillon du mois de décembre F3 issu de l'extraction Acétone/eau avec 0,26 mg QE/g et l'échantillon F1+F2 de la cueillette du mois de février qui résulte de l'extraction méthanol/eau avec 0,25 mg QE/g.

Tableau II.10 : Teneur en flavonoïdes des tourteaux hexaniques (F1+F2, F3) des fruits de *Phillyrea angustifolia* (mg EQE/ g).

			<i>Teneurs</i>
Acétone/H ₂ O	Acétate d'éthyle	F1+2	0,15±0,04
		F3	0,26±0,03
MeOH/H ₂ O	Acétate d'éthyle	F1+2	0,25±0,06
		F3	0,21±0,01

I.3.7. L'évaluation de l'activité antioxydante :

I.3.7.1. Test du DPPH• :

- Les extraits lipidiques :

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits lipidiques a été réalisée par un seul test qui est le test du radical stable DPPH. Pour cela nous avons tracé des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration des extraits. A partir de cette courbe

nous pouvons déterminer le facteur EC50 qui est la concentration en mg/ml de l'extrait inhibant 50 % des radicaux DPPH. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le **Tableau .II.11**. Les résultats indiquent que les extraits des LN issus de l'extraction par la méthode de Folch dévoilent des valeurs d'EC50 (mg/ml) voisines (3 mg/ml), et par conséquent ils possèdent des pouvoirs antioxydants similaires. Les extraits hexanique ont aussi démontré des valeurs similaires de l'EC50 (4 mg/ml), ce qui indique que ces derniers sont aussi doués par des pouvoirs antioxydants semblables.

Tableau .II.11: Résultats du test DPPH (mg/ml) des extraits lipidiques

Extraits lipidiques	EC50 (mg /ml)
LN1	3.04 ± 0.07
LN2	3.01 ± 0.10
LN3	3.23 ± 0.03
Huile F1+F2	4.05 ± 0.06
Huile F3	4.14 ± 0.04
α-tocophérol	2 µg/ml

Il est bien clair que les fractions des lipides neutres des fruits de *Phillyrea angustifolia* extraite par la méthode de Folch présentent des activités du piégeage du radical DPPH• élevées environ EC50 (3.01 - 3.24) mg/ml comparativement à celle des extraits hexanique de huile brut du même fruit EC50 (4.05 - 4.14) mg/ml. Ces valeurs de l'EC50 restent très loin à celle de l'α-tocophérol commercial standard qui a enregistré une valeur d'EC50 de l'ordre de 2 µg/ml et par conséquent on déduit que notre extrait lipidique présente une activité antioxydante très faible.

De faibles corrélations négatives sont trouvées entre les teneurs en tocophérols totaux et l'activité antioxydantes des extraits des LN et les extraits hexaniques avec un coefficient de corrélation ($r = -0.43$) et de même une plus faible corrélation négative est enregistrée entre les teneurs en phytostérols totaux et l'activité antioxydante ($r = -0.34$), ce qui indique qu'il y a une faible tendance entre ce type de composés et l'activité antioxydante. Une amélioration peut être effectuée sur les valeurs des coefficients de corrélation en réalisant une analyse des tocophérols et des phytostérols individuels. Ces valeurs s'expriment presque par la moitié pour ceux trouvé par (Guenane, 2017) ($r = -0.68$ à -0.72).

- Les extraits phénoliques :

Le **Tableau .II.12** regroupe les valeurs de l'EC50 ($\mu\text{g/ml}$) des différents extraits phénoliques. Il est clair que les fractions d'acétate d'éthyle montrent des activités antioxydantes importantes par rapports aux fractions hexaniques et cela quel que soit le système des solvants utilisés pour l'extraction. Les valeurs de l'EC50 enregistrées pour les fractions d'acétate d'éthyle sont très proches, elles sont de l'ordre de 30 $\mu\text{g/ml}$ pour les échantillons F1+F2 et 22 $\mu\text{g/ml}$ pour l'échantillon F3 respectivement. Par contre, les valeurs d'EC50 des fractions hexaniques sont très variables, elles s'échelonnent entre 84.98 et 406.97 $\mu\text{g/ml}$.

Nous avons étudié la corrélation entre la teneur en phénols totaux et les valeurs d'EC50 des fractions d'acétate d'éthyle, le coefficient de corrélation est ($r = -0.72$). Cette bonne valeur négative prouve que les composés phénoliques contenus dans la fraction d'acétate d'éthyle contribuent par 72% de l'activité antioxydante. Et une plus faible corrélation négative a été enregistrée ($r = -0.22$) entre les teneurs en phénols totaux et l'activité antioxydante dans les fractions hexaniques. Ce résultat est attendu car les antioxydants sont extractibles par l'acétate d'éthyle qui est plus polaire que l'hexane. Ces valeurs de corrélations sont en accord avec les travaux de (Guenane, 2017) où ils trouvent le coefficient de corrélation de ($r = -0.69$ à -0.88), ce qui conforte nos résultats obtenus.

Tableau .II.12: Résultats du test DPPH ($\mu\text{g/ml}$) des extraits phénoliques

Extraits phénoliques			EC50 ($\mu\text{g/ml}$)
Système MeOH/ H₂O (8/2)	Acétate d'éthyle	F1+F2	30.24 \pm 0.62
		F3	24.32 \pm 0.31
	Hexane	F1+F2	84.98 \pm 3.41
		F3	406,97 \pm 1.72
Système Acétone/ H₂O (7/3)	Acétate d'éthyle	F1+F2	31.49 \pm 0.74
		F3	21.78 \pm 1.72
	Hexane	F1+F2	135.05 \pm 2.33
		F3	228.99 \pm 19.56

La forte corrélation négative existant entre l'activité antioxydante des extraits phénoliques et leurs teneurs en phénols et en flavonoïdes laisse supposer que l'activité antioxydante peut être

attribuée à des composés autres que les phénols, tels que les thiols, les acides aminés et certaines vitamines. Ainsi, elle est liée probablement à la variation génétique et climatique de l'échantillonnage des fruits.

Conclusion générale et perspectives

Le présent travail, nous a permis d'approfondir la connaissance des constituants chimiques du fruit de *Phillyrea angustifolia* de la famille Oleaceae, par l'étude des principaux composés de la fraction glycéridique du fruit, comme il nous a permis d'évaluer l'activité antioxydante des lipides et des tourteaux du fruit.

L'huile de la fraction hexanique renferme des acides gras habituellement rencontrés dans le règne végétal, elle est riche en acides gras insaturés (AGI) avec un pourcentage total plus de 83% qui sont représentés essentiellement par les acides oléique et linoléique avec les proportions 60,57%, 22,80% respectivement, elle renferme également une quantité importante d'acides gras saturés: laurique, myristique, palmitique, margarique, stéarique et arachidique, ils représentent une proportion totale de 13.09 %. L'analyse qualitative et quantitative des acides gras des lipides totaux, des lipides neutres, des glycolipides et des phospholipides a été aussi réalisée, la composition en acides gras des phospholipides et glycolipides est presque analogue à celles observées aux lipides totaux et neutres mais avec des proportions variables en acides gras et notamment en acide linoléique.

La digestion enzymatique des TAGs par la lipase pancréatique de porc et les méthodes chromatographiques nous ont permis d'établir la structure glycéridique de l'huile de fruit de *Phillyrea angustifolia*, La position sn-2 est très largement occupée par l'acides C18 oléique (plus 60%).

Les isomères des TAGs retrouvés dans l'huile sont les isomères qui résultent de la combinaison des acides palmitique, stéarique, laurique, oléique, linoléique et linoléique : OOO, OOL, POO, OSO, POL, OLL, OLS, POS, OOLa, OOLn, et POP, on remarque que notre huile est riche en TAGs formés par la combinaison des acides gras oléique, linoléique et palmitique, la proportion élevée d'acide oléique justifie la prédominance du trioléin OOO. Le pourcentage du OOL est supérieure aux POO et SOO car la quantité de l'acide linoléique dans l'huile est supérieure aussi aux celles de l'acide palmitique et stéarique, les acides gras saturés estérifient majoritairement les positions extrêmes sn-1et sn-3.

Les catégories des TAGs : GS₃, GS₂U, GSU₂ et GU₃ sont détectées dans l'huile de *Phillyrea angustifolia*, la catégorie GS₃ est la plus faible proportion et ne dépasse pas 0.30%. Les triacylglycérols disaturés GS₂U atteint une teneur de 5.36%. Cette valeur considérable est due généralement à la présence de 8.7% d'acide palmitique. Autrement les TAGs de type GSU₂ qui contient de l'acide oléique et palmitique constituent une proportion considérable environ 54% qui représente la majorité des triglycérides total dans l'huile de *Phillyrea angustifolia*, suivi par les triglycérides polyinsaturés GU₃ avec une proportion de 30.32%. Ce résultat est justifié par la présence d'une proportion élevée de trioléin OOO avec une proportion de 29.16%, qui est le

seul composé représentant les TAGs de type GU₃ suivi par le dioléolinoléin OOL et palmitoléolinoléin POL de type GSU₂ avec une proportion de 19.32% et 11.10% respectivement.

Le dosage des phytostérols totaux et des tocophérols totaux dans la fraction hexanique révèle que l'huile du fruit de *Phillyrea angustifolia* est une huile riche en phytostérols et en tocophérols avec des quantités (57,82 mg/g) et (108.13 mg/100g) respectivement.

Les extraits des lipides neutres et hexanique ont révélé des faibles activités antioxydantes par rapport à la vitamine E. une bonne corrélation a été enregistrée entre les tocophérols et les phytostérols par contre une faible corrélation a été remarquée entre les tocophérols et l'activité antioxydante.

La détermination de la teneur en phénols totaux des extraits de tourteaux, nous a permis de confirmer que les fruits sont des sources prometteuses en composés phénoliques.

Les meilleures quantités en phénols totaux ont été enregistrées dans la fraction d'acétate d'éthyle plus de 3.26 mg/g EAG.

L'évaluation de l'activité antioxydante a prouvé que les fractions d'acétate d'éthyle sont doués par des pouvoirs antioxydants remarquables et que leurs activités antioxydantes sont 15 fois moins que l'acide ascorbique 2 µg/ml.

L'ensemble des résultats obtenus forme une carte d'identité phytochimiques initiale sur les constituants majeurs des fruits de *Phillyrea angustifolia* à savoir les lipides, les composés phénolique et leur activité antioxydante. Ces résultats nécessitant des études approfondies qui sont résumés dans les perspectives.

Les perspectives peuvent être envisagées sont :

- Analyse quantitative des phytostérols et des tocophérols individuels
- Analyse qualitative et quantitative des composés phénoliques
- Elargir l'étude des fractions lipidique et phénoliques à plusieurs échantillons
- Étude phytochimique des feuilles et des fruits pour d'autres espèces appartenant au même genre *Phyllirea*.
- Évaluer des activités biologiques des différents extraits.

Références bibliographiques

- A -

Aggarwal, B. B., et Shishodia, S. (2006). *Resveratrol in health and disease*. Boca Raton London New York: CRC Press.

Amarti, F., Satrani, B., Ghanmi, M., Aafi, A., Farah, A., Aarab, L., et Chaouch, A. (2011). Activité antioxydante et composition chimique des huiles essentielles de quatre espèces de thym du Maroc. *Acta Botanica Gallica*, 158(4), 513–523.

- B -

Barreto, M. C. (2005). Lipid extraction and cholesterol quantification: A simple protocol. *J. Chem. Educ*, 82(1), 103.

Bartolini, G., et Petruccelli, R. (2002). *Classification, origin, diffusion and history of the olive*. Food et Agriculture Org.

Benalia, M. (2016). *Contribution à l'étude de la fraction lipidique de quelques graines de citrouille locale*. (Thèse de doctorat inédite). Université Kasdi Merbah de Ouargla, Algérie.

Benalia, M., Djeridane, A., Gourine, N., Nia, S., Ajandouz, E., et Yousfi, M. (2015). Fatty acid profile, tocopherols content and antioxidant activity of algerian pumpkin seeds oil (*Cucurbita pepo* L). *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 8(1), 9–25.

Berdeaux, O., Juanéda, P., et Sébédio, J. L. (1998). Analyse des acides gras conjugués et trans après dérivation. *EDP Sciences*, 1000, 46.

Berrada, M. (1972). Etude de la composition de l'huile d'argan. *Al Awamia*, 42, 1–14.

Blondel, J., et Aronson, J. (1999). *Biology and wildlife of the Mediterranean region*. Oxford University Press, USA.

Botham, K. M., Weil, A., Rodwell, V. W., Kennelly, P. J., et Bender, D. A. (2008). *Biochimie de Harper* (6th ed.). De Boeck Supérieur.

Boucheffa, S., Tamendjari, A., Rovellini, P., et Venturini, S. (2014). Composition and antioxidant activity of some algerian wild extra virgin olive oils. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 91(3), 177–185.

Brahmi, F., Mechri, B., Dhibi, M., et Hammami, M. (2013). Variations in phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Olea europaea* leaves and fruits extracts collected in two different seasons. *Industrial Crops and Products*, 49, 256–264.

- C -

Carrière, F. (2008). Soixante ans de recherche sur la lipolyse enzymatique des corps gras à Marseille. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 15(3), 196–207.

Charef, M., Yousfi, M., Saidi, M., et Stocker, P. (2008). Determination of the fatty acid composition of acorn (*Quercus*), *Pistacia lentiscus* seeds growing in Algeria. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(10), 921–924.

Cherif, A., Dubacq, J., Mache, R., Oursel, A., et Tremolieres, A. (1975). Biosynthesis of α -linolenic acid by desaturation of oleic and linoleic acids in several organs of higher and lower plants and in algae. *Phytochemistry*, 14(3), 703–706.

Chira, K., Suh, J.-H., Saucier, C., et Teissède, P.-L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6(2), 75–82.

Christie, W. W., et Han, X. (2010). *Lipid Analysis-Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis*, 446 pages. Oily Press, Bridgwater, UK.

Cillard, J., et Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oleagineux, Corps Gras, Lipides*, 13(1), 24–29.

Colette, C., et Monnier, L. (2011). Acides gras : classification, fonction et équilibre entre les différentes familles. *Médecine Des Maladies*

Métaboliques, 5(3), 237–245.

Cuvelier, C., Dotreppe, O., et Istasse, L. (2003). Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. *Ann. Méd. Vét*, 147, 315–324.

- D -

Dai, J., et Mumper, R. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. In *Molecules*.

Dictionnaire de l'Académie nationale de Pharmacie. (2017). Flavonoïde. Repéré à <http://dictionnaire.acadpharm.org/w/Flavonoïde>

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., et Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97(4), 654–660.

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Maamri, S., Djireb, F., et Stocker, P. (2006). Phenolic extracts from various Algerian plants as strong inhibitors of porcine liver carboxylesterase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 21(6), 719–726.

- E -

Emmerie, A., et Engel, C. (1938). Colorimetric determination of α -tocopherol (vitamin E). *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas*, 57(12), 1351–1355.

Evans, W. C. (2009). *Trease and Evans' Pharmacognosy E-Book* (Sixteenth). Edinburgh London New York Philadelphia St Louis Sydney Toronto 2009: Elsevier Health Sciences.

Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., et Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin– Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8139–8144.

- F -

- Fahy, E., Cotter, D., Sud, M., et Subramaniam, S. (2011). Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1811(11), 637–47.
- Folch, J., Lees, M., et Sloane-Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 226(1), 497–509.
- Fraga, C. G. (2009). *Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition and pharmacology* (Vol. 1). John Wiley et Sons.

- G -

- Gardes-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., et Jore, D. (2003). Reactive oxygen species. How oxygen may become toxic? *Actualite Chimique*, (11–12), 91–96.
- Geçgel, M. T. B. B. Ü., et Demirci, A. Ş. (2006). Phytosterols as functional food ingredients. *JOTAF/Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 3(2), 153–159.
- Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie*, 3(4), 162–169.
- Guenane, H., Bombarda, I., OuldElhadj, M. D., et Yousfi, M. (2015). Effect of Maturation Degree on Composition of Fatty Acids and Tocopherols of Fruit Oil from *Pistacia atlantica* Growing Wild in Algeria. *Natural Product Communications*, 10(10), 1723–1728.
- Guenane, H.. (2017). *Activités biologiques des extraits lipidiques des fruits du Pistachier de l'Atlas (Pistacia atlantica Desf.)*. (Thèse de doctorat inédite) Université Kasdi Merbah de Ouargla, Algérie.

- H -

- H.-U. SimonA. Haj-Yehia F. Levi-Schaffer. (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(9), 567–579.

- Hadbaoui, Z., Djeridane, A., Yousfi, M., Saidi, M., et Nadjemi, B. (2010). Fatty acid, tocopherol composition and the antioxidant activity of the lipid extract from the sorghum grains growing in Algeria. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3(3), 215–220.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., Charlier, C., et Chapelle, J.-P. (2007). Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*, 62(10), 628–638.
- Halliwell, B. (2001). Free radical reactions in human disease. *Oxidative Stress and Disease*, 7, 1–16.
- Hamia, C. (2007). *Contribution à la composition et à l'étude chimique de l'huile du fruit de l'Arganier" Argania spinosa"*. (Mémoire de magister inédit). Université Kasdi Merbah de Ouargla, Algérie.
- Hans-Walter Heldt, et Fiona, in cooperation with. (2005). *Plant biochemistry An update and translation of the German third edition*. (D. Cella, Ed.). Elsevier Academic Press.
- Harborne, J. B. (1989). *Methods in plant biochemistry. Volume 1. Plant Phenolics*.
- Henane, I., Tlili, I., Him, T. R., Ali, A. B. E. N., et Jebari, H. (2015). Effet du stade de maturité sur les composés phénoliques et l'activité antioxydante hydrophilique chez des variétés locales de melon (*Cucumis melo* L .) cultivées en Tunisie, 22(2), 1002–1006.

- I -

- Ibrahim, H. M. (2012). Response of some sunflower hybrids to different levels of plant density. *APCBEE Procedia*, 4, 175–182.
- Institut des Corps Gras. (2017). Composition en acides gras des principales huiles végétales. Repéré à <http://iterg.com/-competences-et-prestations-26-39>.

- J -

Jean, B. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)*. Lavoisier.

- K -

Kamal-Eldin, A., et Andersson, R. (1997). A multivariate study of the correlation between tocopherol content and fatty acid composition in vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(4), 375–380.

Kamal-Eldin, A., et Appelqvist, L.-Å. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31(7), 671–701.

Karleskind, A. (1992). *Manuel des corps gras (Volume 1)*. France: Technique et Documentation – Lavoisier.

Kritchevsky, D., et Chen, S. C. (2005). Phytosterols—health benefits and potential concerns: a review. *Nutrition Research*, 25(5), 413–428.

Kumar, S., et Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *TheScientificWorldJournal*, 2013, 162750.

- L -

Lamaison, J. L., et Carnat, A. (1991). Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs et des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq. et de *Crataegus laevigata* (Poiret) DC. en fonction de la période de végétation. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 25(1), 12–16.

Leray, C. (2010). *Les lipides dans le monde vivant: introduction à la lipidomique*. Tec et Doc.

Likhtenshtein, G. I. (2010). *Stilbenes: applications in chemistry, life sciences and materials science*. Wiley Online Library.

Liu, K.-S. (1994). Preparation of fatty acid methyl esters for gas-

chromatographic analysis of lipids in biological materials. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71(11), 1179–1187.

Lublin, M. W.-H. M. U. of, Lublin, P., College, J. S. L., et Easton, Pennsylvania, U. S. A. (Eds.). (2011). *High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis* (volume 102). CRC Press Taylor et Francis Group 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL 33487-2742.

Luddy, F. E., Barford, R. A., Herb, S. F., Magidman, P., et Riemenschneider, R. W. (1964). Pancreatic lipase hydrolysis of triglycerides by a semimicro technique. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 41(10), 693–696.

- M -

Macheix, J.-J., Fleuriet, A., et Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. CH-1015 Lausanne: Presses Polytechniques et Universitaires Romandes.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., et Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–47.

Migdal, C., et Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Médecine/Sciences*, 27(4), 405–412.

Mongens, M. (2013). Origine et conséquences du stress oxydant.

Morin, O., et Pagès-Xatart-Parès, X. (2012). Huiles et corps gras végétaux: ressources fonctionnelles et intérêt nutritionnel. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 19(2), 63–75.

- N -

Napier, J. A., Haslam, R. P., Beaudoin, F., et Cahoon, E. B. (2014).

Understanding and manipulating plant lipid composition: metabolic engineering leads the way. *Current Opinion in Plant Biology*, 19, 68–75.

Nazemiyeh, H., Shoeb, M., Movahhedineh, N., Kumarasamy, Y., Talebpour, A. H., Delazar, A., ... Sarker, S. D. (2006). Phenolic compounds and their glycosides from *Stachys schtschegleevii* (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*.

Ndour, A., Loison, R., Gurlot, J.-P., Ba, K. S., et Clouvel, P. (2017). Biotechnologie, agronomie, société et environnement = Biotechnology, agronomy, society and environment: BASE. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2017, 21(1), 22–35.

- O -

Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., et Deemer, E. K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3122–3128.

- P -

Paoletti, R., et Kritchevsky, D. (1963). *Advances in lipid research. Volume 1*. Academic Press.

Piechura, J. E., et Fairbrothers, D. E. (1983). The use of protein-serological characters in the systematics of the family Oleaceae. *American Journal of Botany*, 70, 780–789.

Pillon, F., et Allaert, F.-A. (2013). Prise en charge alternative de la maladie veineuse. *Actualités Pharmaceutiques*, 52(525), 44–45.

Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., et Defraigne, J.-O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16(4), 233–239.

Popovici, C., Saykova, I., et Tylkowski, B. (2010). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH.

- R -

Rameau, J.-C., Mansion, D., et Dumé, G. (2008). *Flore forestière française: région méditerranéenne* (Vol. 3). Forêt privée française.

Ranalli, A., Pollastri, L., Contento, S., Di Loreto, G., Iannucci, E., Lucera, L., et Russi, F. (2002). Acylglycerol and fatty acid components of pulp, seed, and whole olive fruit oils. Their use to characterize fruit variety by chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3775–3779.

Romani, A., Baldi, A., Mulinacci, N., Vincieri, F. F., et Tattini, M. (1996). Extraction and identification procedures of polyphenolic compounds and carbohydrates in *phillyrea* (*Phillyrea angustifolia* L.) leaves. *Chromatographia*, 42(9–10), 571–577.

- S -

Sachse, M. (2001). Oleaceous laurophyllous leaf fossils and pollen from the European Tertiary. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 115(3), 213–234.

Salaritabar, A., Darvishi, B., Hadjiakhoondi, F., Manayi, A., Sureda, A., Nabavi, S. F., et Bishayee, A. (2017). Therapeutic potential of flavonoids in inflammatory bowel disease: A comprehensive review. *World Journal of Gastroenterology*, 23(28), 5097–5114.

Sana, D., Ouerghemmi, S., Marichali, A., Benzarti, S., Hadj, B., Hela, L., et Houcine, S. (2014). Fatty Acid Composition and Polyphenols Content of *Phillyrea angustifolia* L. Leaves in the National Park of Djebel Zaghouan (Tunisia), 1(5), 325–333.

- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., et Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990–5999.
- Scrimgeour, C. M., et Harwood, J. L. (2007). Fatty acid and lipid structure. *The Lipid Handbook, 3rd Edn. CRC Press, Boca Raton*, 1–36.
- Sébastien, C. (1956). Etude du genre *Phillyrea* Tournefort. Trav. Inst. Sci. cherif., ser. Bot. Anatomy, including petiole, 104.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291–295.
- Singleton, V. L., et Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158.
- Songre-Ouattara, L. T., Bationo, F., Parkouda, C., Dao, A., Bassole, I. H. N., et Diawara, B. (2015). Qualité des grains et aptitude à la transformation: cas des variétés de *Sorghum bicolor*, *Pennisetum laucum* et *Zea mays* en usage en Afrique de l’Ouest. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9(6), 2819–2832.

- T -

- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., et Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6), 669–675.
- Traveset, A. (1994). Reproductive biology of *Phillyrea angustifolia* L. (*Oleaceae*) and effect of galling-insects on its reproductive output. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 114(2), 153–166.

- V -

Van Niekerk, P. J., et Burger, A. E. C. (1985). The estimation of the composition of edible oil mixtures. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 62(3), 531–538.

Vermerris, W., et Nicholson, R. (2008). *Phenolic Compounds and their Effects on Human Health. Phenolic Compound Biochemistry*. Dordrecht: Springer Netherlands.

Vermerris WILFRED et Ralph NICHOLSON. (2004). *Phenolic Compound Biochemistry. Basic Skills in Interpreting Laboratory Data*. P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands.: Springer Netherlands.

- X -

Xiao, K., Zhang, H.-J., Xuan, L.-J., Zhang, J., Xu, Y.-M., et Bai, D.-L. (2008). Stilbenoids: chemistry and bioactivities. *Studies in Natural Products Chemistry*, 34, 453–646.

- Y -

Yoshida, H., Hirooka, N., et Kajimoto, G. (1990). Microwave energy effects on quality of some seed oils. *Journal of Food Science*, 55(5), 1412–1416.

Yousfi, M., Bombarda, I., Hamia, C., Djeridane, A., Stocker, P., et Gaydou, E. (2009). Fatty acid, triglyceride and tocopherol composition of Algerian Argan (*Argania spinosa*) fruit seed lipids. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 2(3), 197–203.

Yousfi, M., Nadjemi, B., Belal, R., et Bertal, D. Ben. (2003). Étude des acides gras de huile de fruit de pistachier de l'Atlas algérien. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 10(5–6), 425–427.

Annexes

Tableau1 : Méthode de Coleman pour le calcul des TAG. (Coleman 1961)

(Exemple : l'acide palmitique en position 2)

		P	S	O	L	La	Ln
TAG Purifiée F3	x	8,70	5,03	66,42	14,13	1,22	1,14
Mono-AG sn-2	y	16,55	4,12	71,66	1,11	0,00	0,00
DAG sn-1,3	(3x-y)/2	4,78	5,49	63,80	20,64	1,83	1,71

Monoglycéride		Diglycéride		triglycéride				
P	P	PP	= 0,79	P	PPP	=0.79×4.78/100		
16,55	×4,78/100			S	PPS	=0.79×5,49/100	0,043	SSS
				O	PPO	=0.79×63,80/100	0,504	SSU
				L	PPL	=0.79×20,64/100	0,163	SSU
				La	PPLa	=0.79×1,83/100	0,014	SSS
				Ln	PPLn	=0.79×1,71/100	0,014	SSU
				S	PS	= 0,91		
	×5,49/100			P	PSP	0,04336		SSS
				S	PSS	0,04982		SSS
				O	PSO	0,57933		SSU
				L	PSL	0,1874		SSU
				La	PSLa	0,01662		SSS
				Ln	PSLn	0,01553		SSU
				O	PO	= 10,56		
	×63,80/100			P	POP	0,50419		SUS
				S	POS	0,57933		SUS
				O	POO	6,73662		SUU
				L	POL	2,17918		SUU
				La	POLa	0,19323		SUS
				Ln	POLn	0,05841		SUU
				L	PL	= 3,42		
	20,64			P	PLP	0,1631		SUS
				S	PLS	0,1874		SUS
				O	PLO	2,17918		SUU
				L	PLL	0,70493		SUU
				La	PLLa	0,06251		SUS
				Ln	PLLn	0,00518		SUU
				La	PLa	= 0,30		
	1,83			P	PLaP	0,01446		SSS
				S	PLaS	0,01662		SSS
				O	PLaO	0,19323		SSU
				L	PLaL	0,06251		SSU
				La	PLaLa	0,00554		SSS
				Ln	PLaLn	0,00484		SSU
				Ln	PLn	= 0,28		
	1,71			P	PLnP	0,01351		SSS
				S	PLnS	0,01553		SSS
				O	PLnO	0,18056		SSU
				L	PLnL	0,05841		SSU
				La	PLnLa	0,00518		SSS
				Ln	PLnLn	0,00484		SSU

Les équations de Gunstone:

GS₂U

$$S^2U^2S^2 = 2S^2U^2X/S^2U$$

$$S^2U^2S^2 = S^2U^2X/S^2U$$

GSU₂

$$S^2U^2U^2 = 6S^2U^2U^2(3U-100)/200U^2$$

$$S^2U^2U^2 = 3S^2U^2(3U-100)/200U^2$$

GU₃

$$U^2U^2U^2 = 6U^2U^2U^2(3U-100)/200U^2$$

$$U^2U^2U^2 = 3U^2U^2(3U-100)/200U^2$$

$$U^2U^2U^2 = U^3(3U-100)/200U^2$$

Où

GS₂U : Triglycéride di saturé

GSU₂ : Triglycéride mono saturé

GU₃ : Triglycéride tri insaturé

X : la valeur trouvée par la formule suivante :

$$X = (3S/20)^2 \text{ si } S < 66.66\%$$

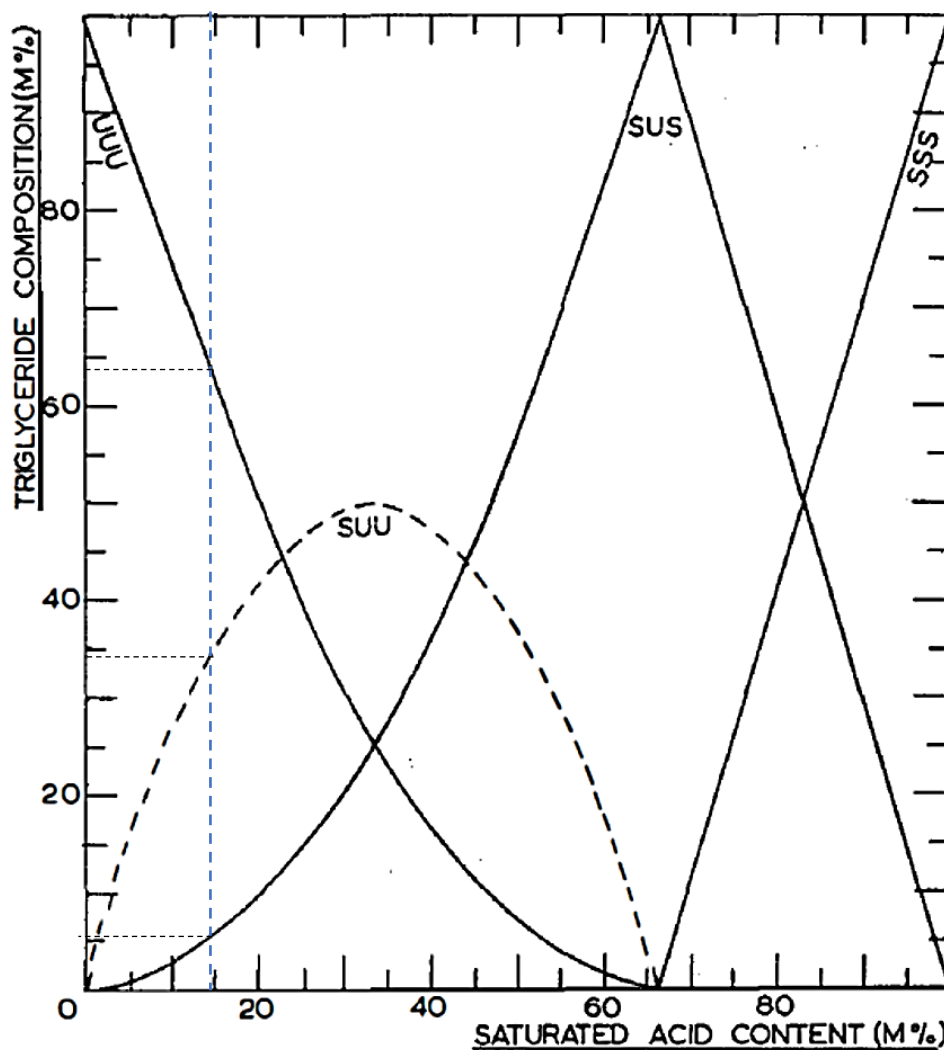


Figure. 1 : Composition glycéridique pour la distribution positionnelle GUNSTONE.

(Paoletti et Kritchevsky, 1963).

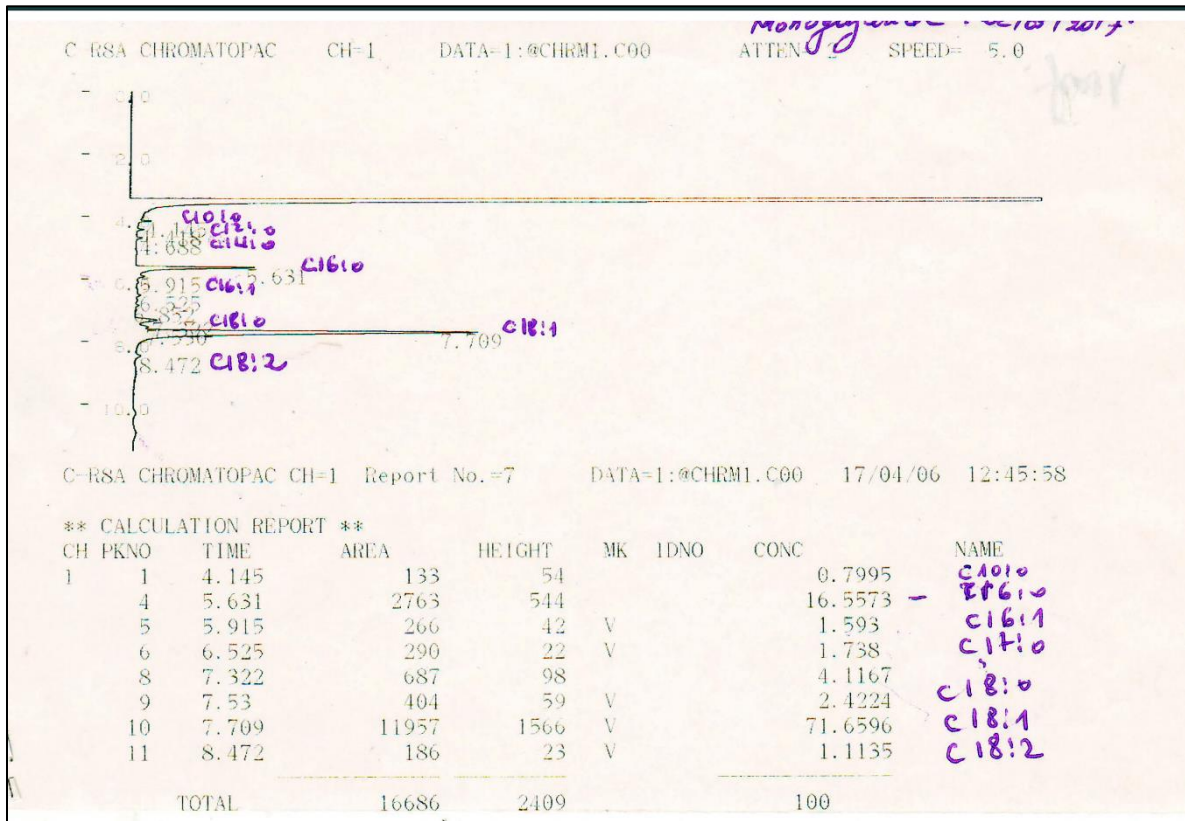


Figure. 2 : chromatogramme de mono-glycérine.

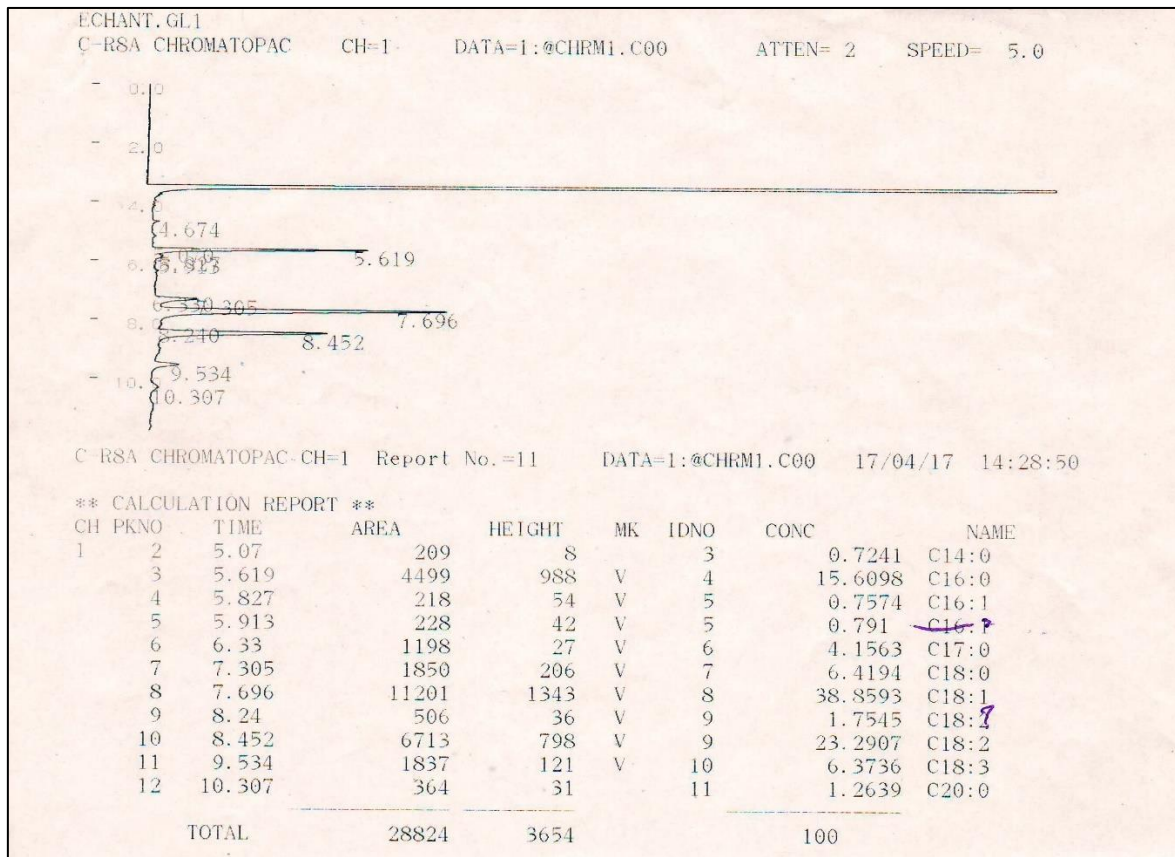


Figure. 3 : chromatogramme de GL1.

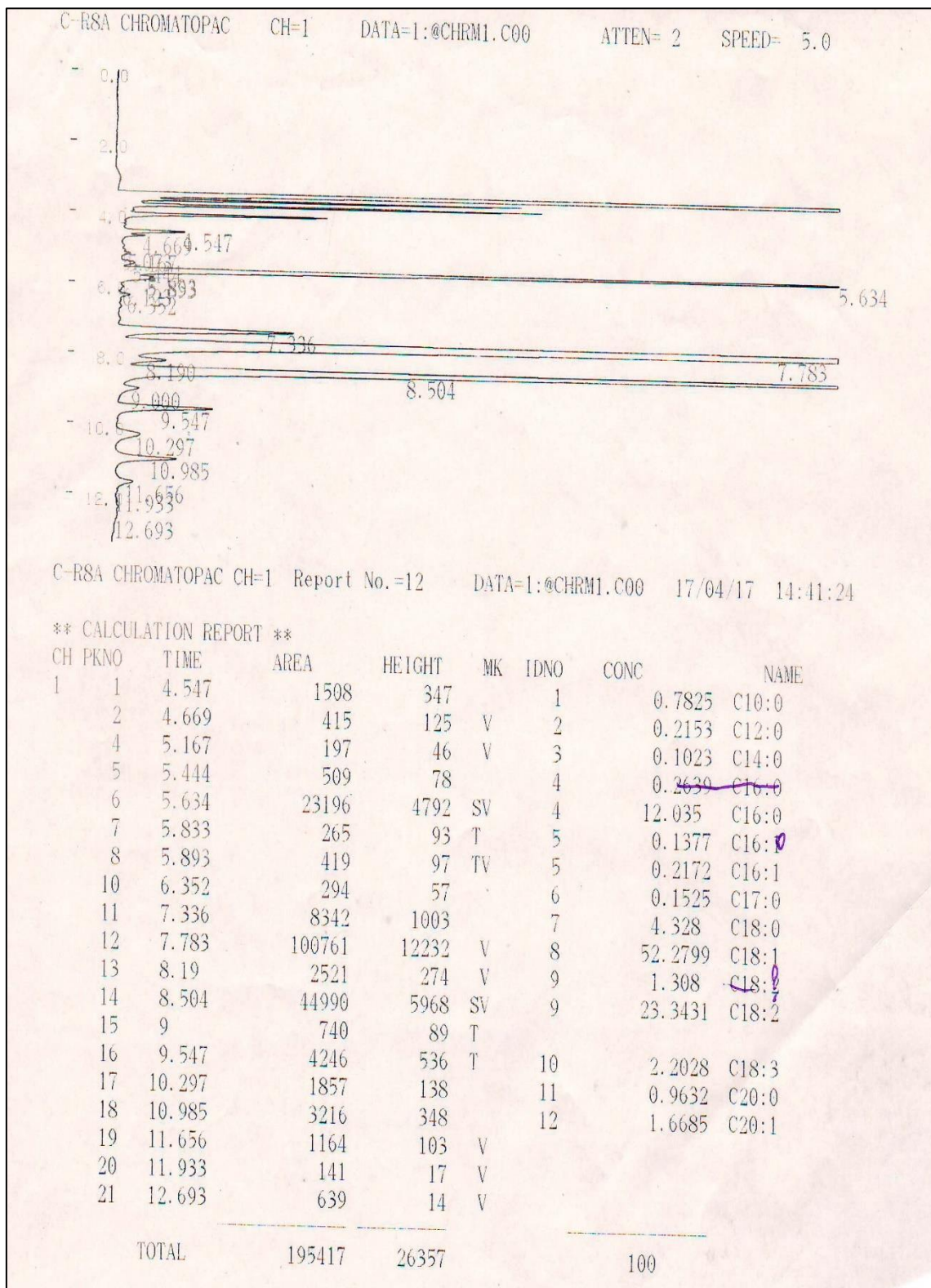


Figure. 4 : chromatogramme de GL2.

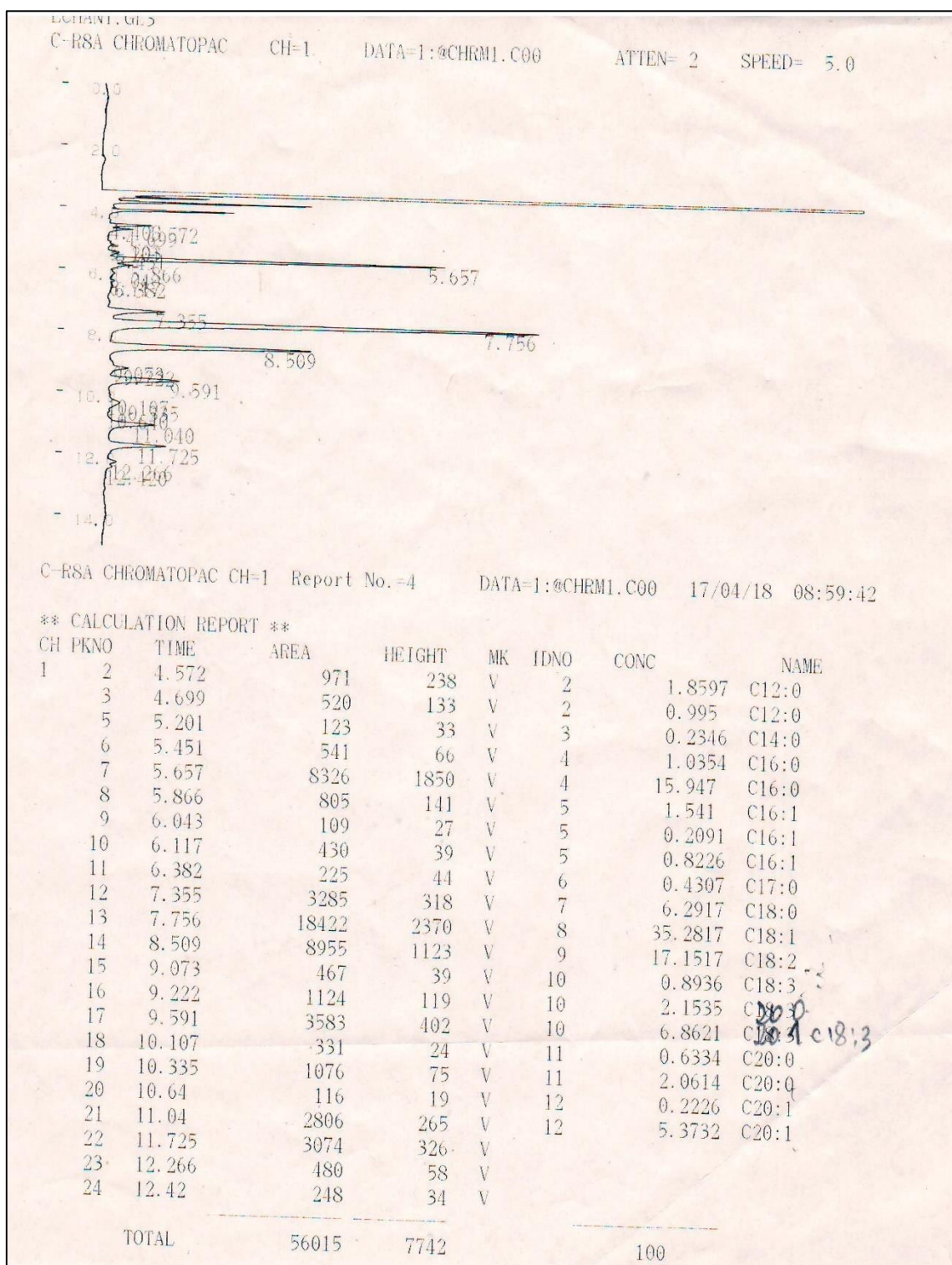


Figure. 6 : chromatogramme de GL3.

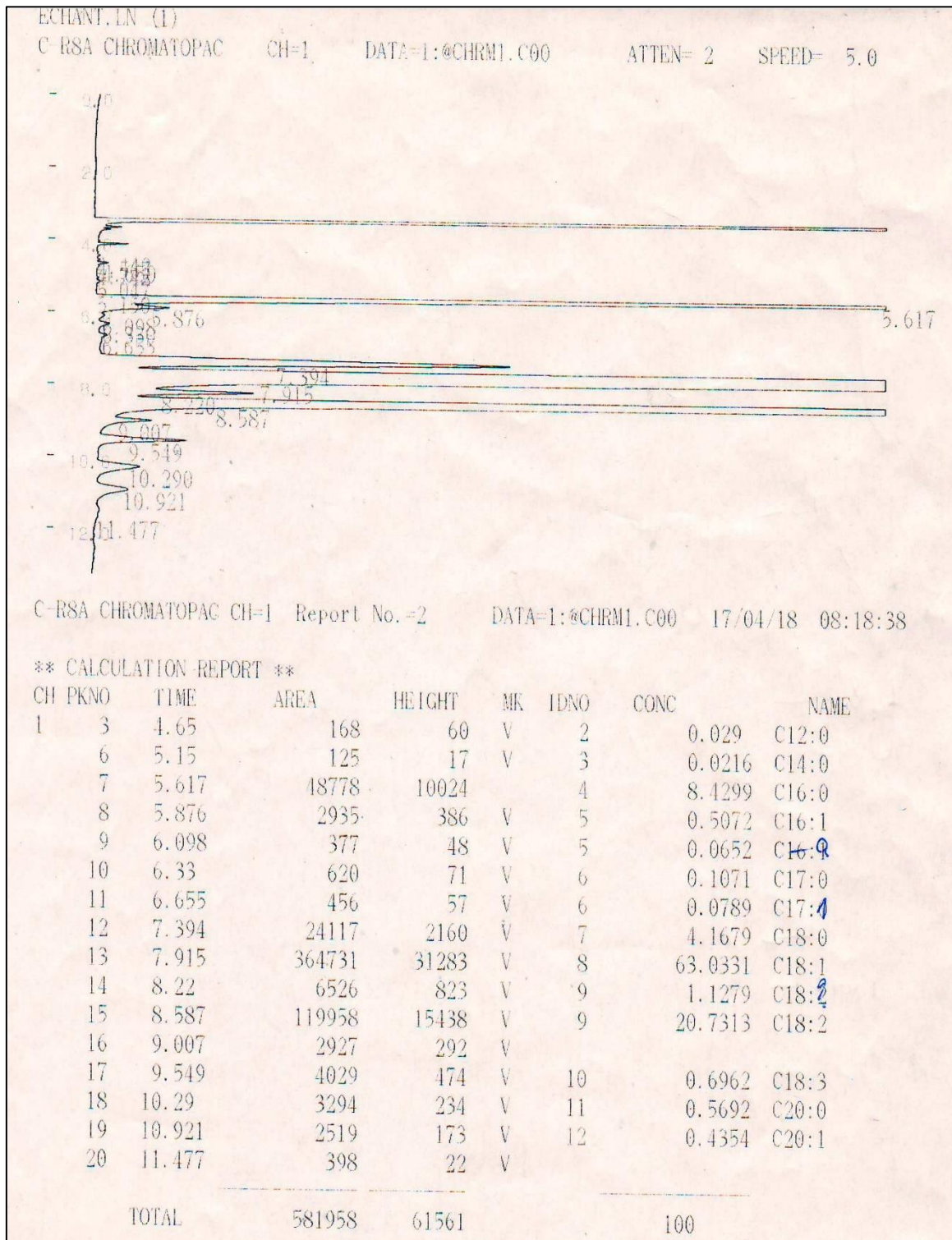


Figure. 7 : chromatogramme de LN1.

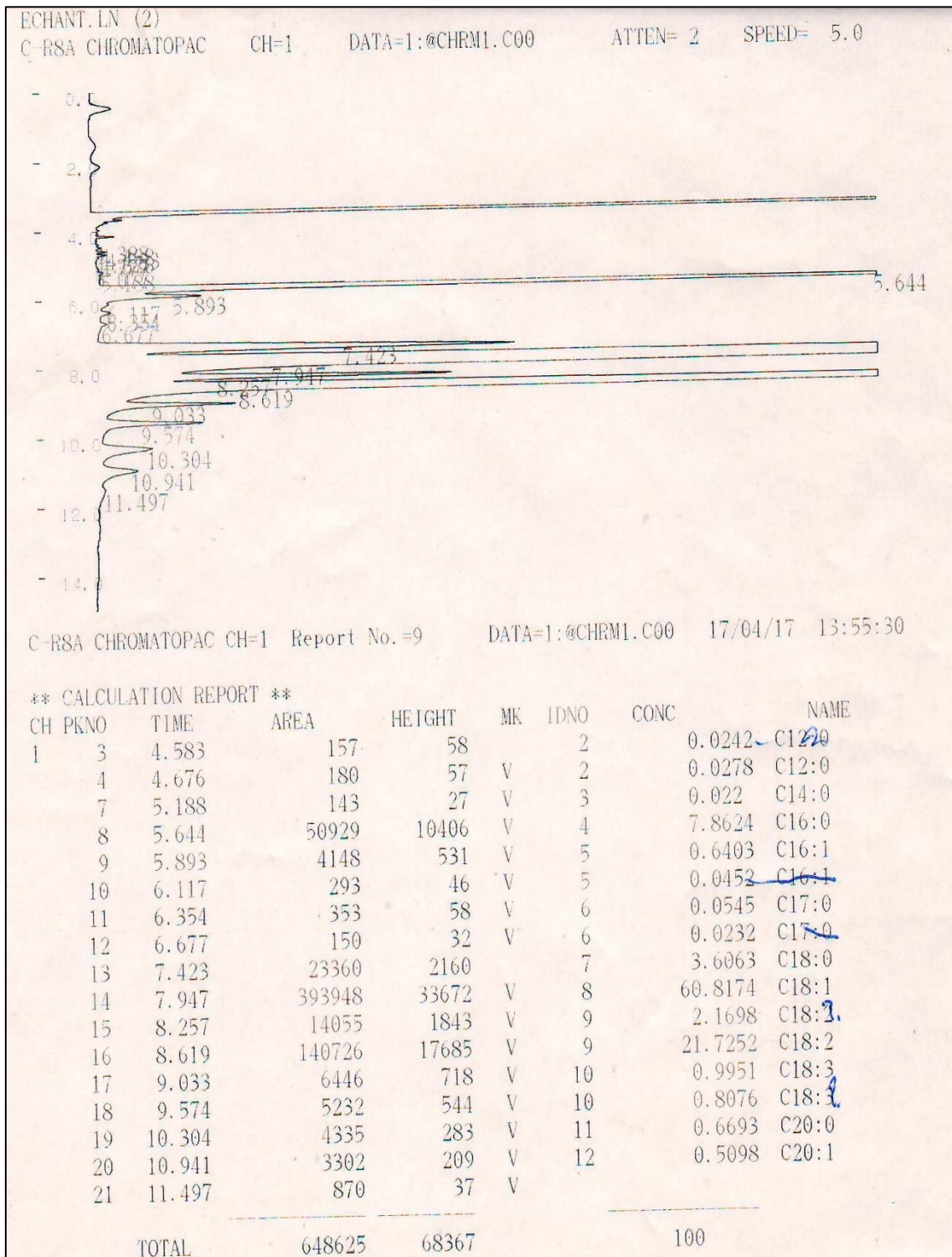


Figure. 8 : chromatogramme de LN2.

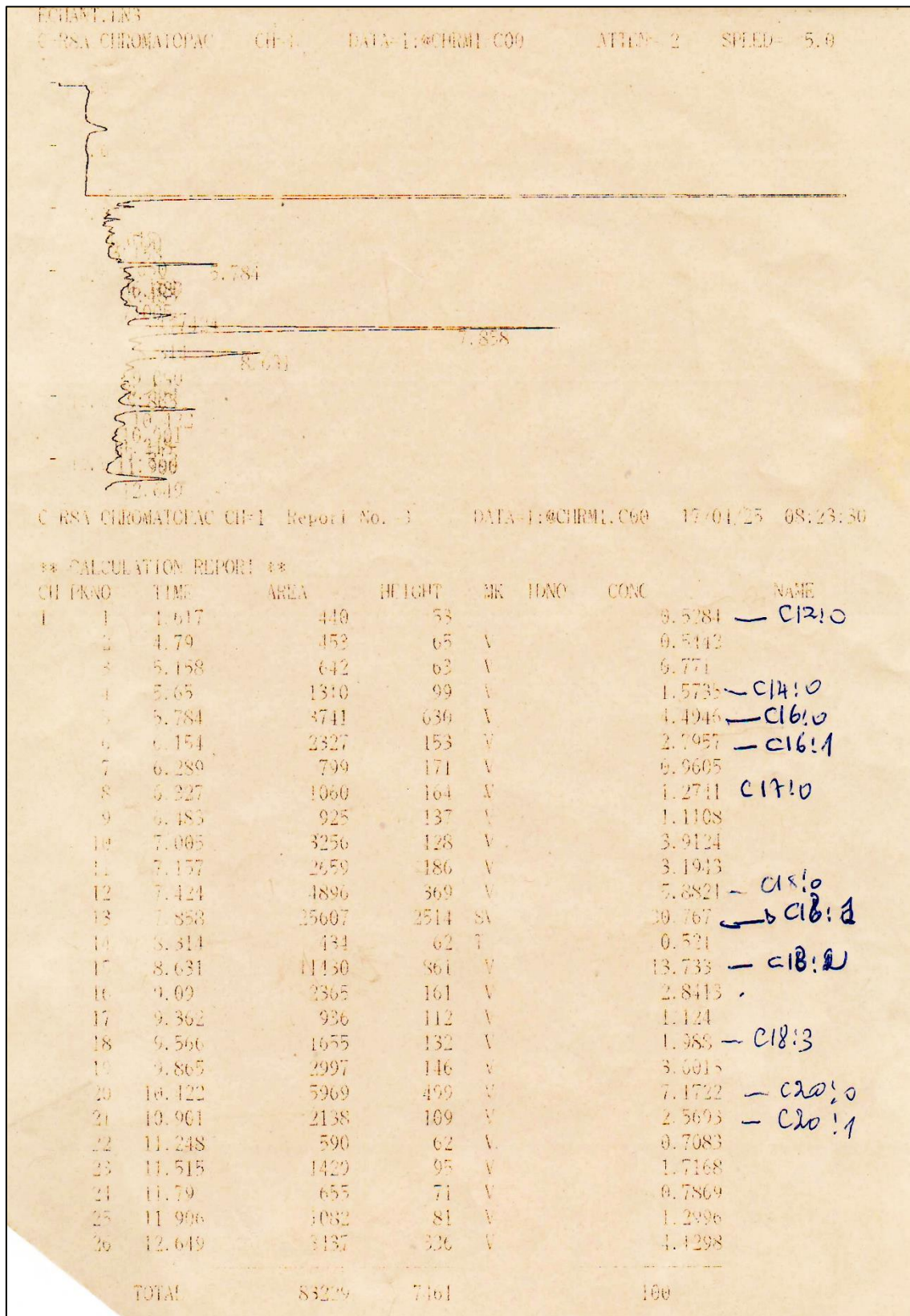


Figure. 9 : chromatogramme de LN3.

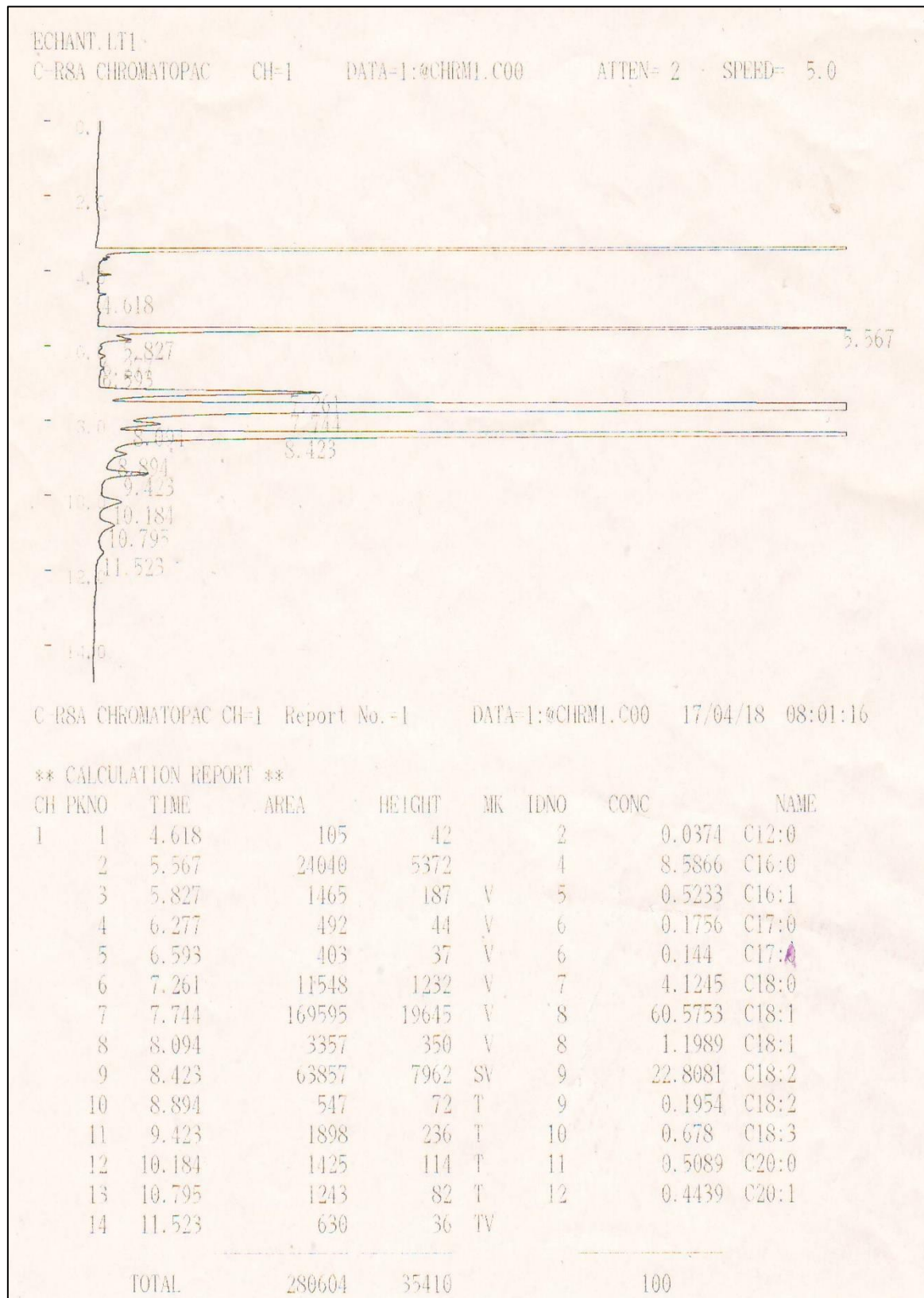


Figure. 10 : chromatogramme de LT1.

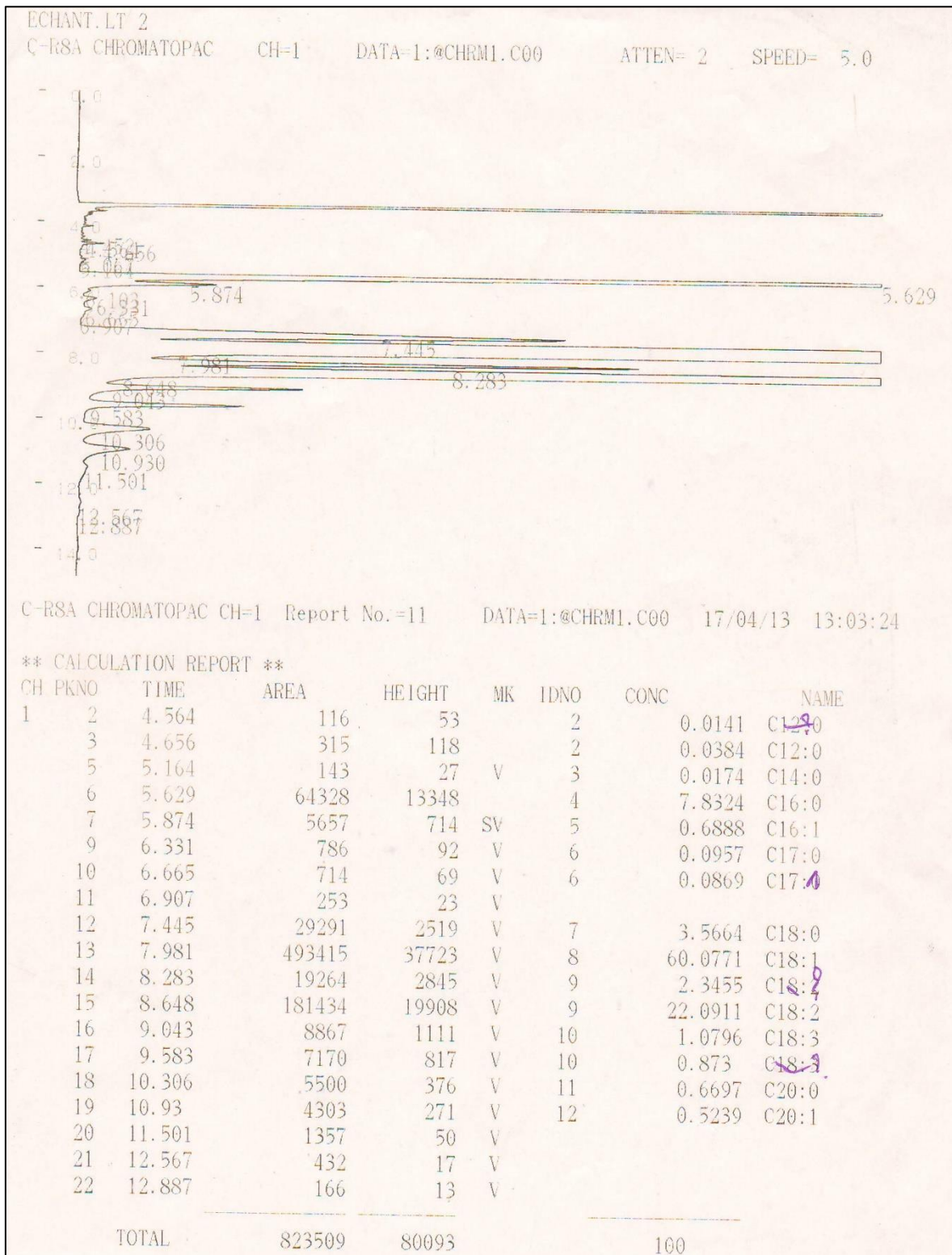


Figure. 11 : chromatogramme de LT2.

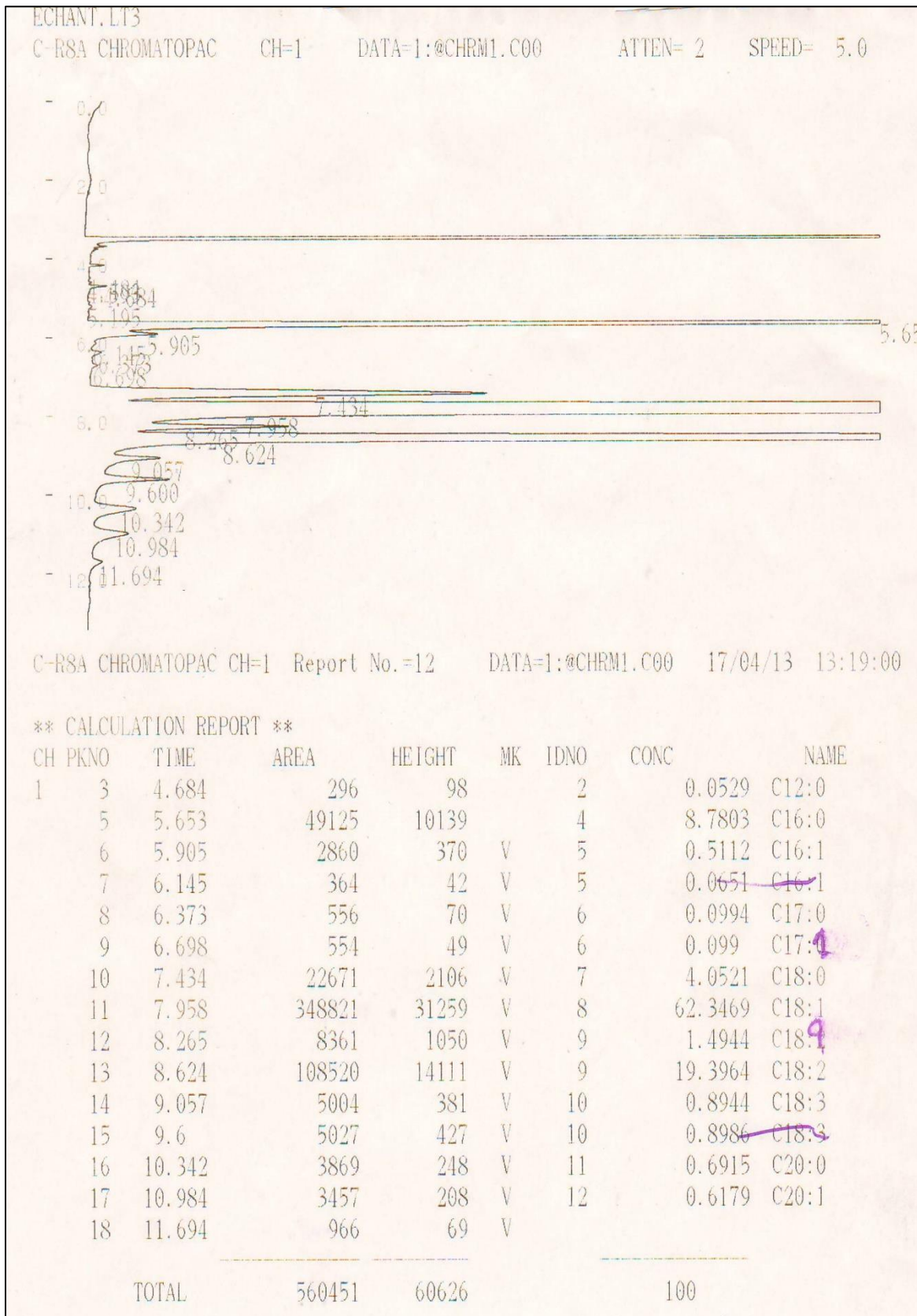


Figure. 12 : chromatogramme de LT3.

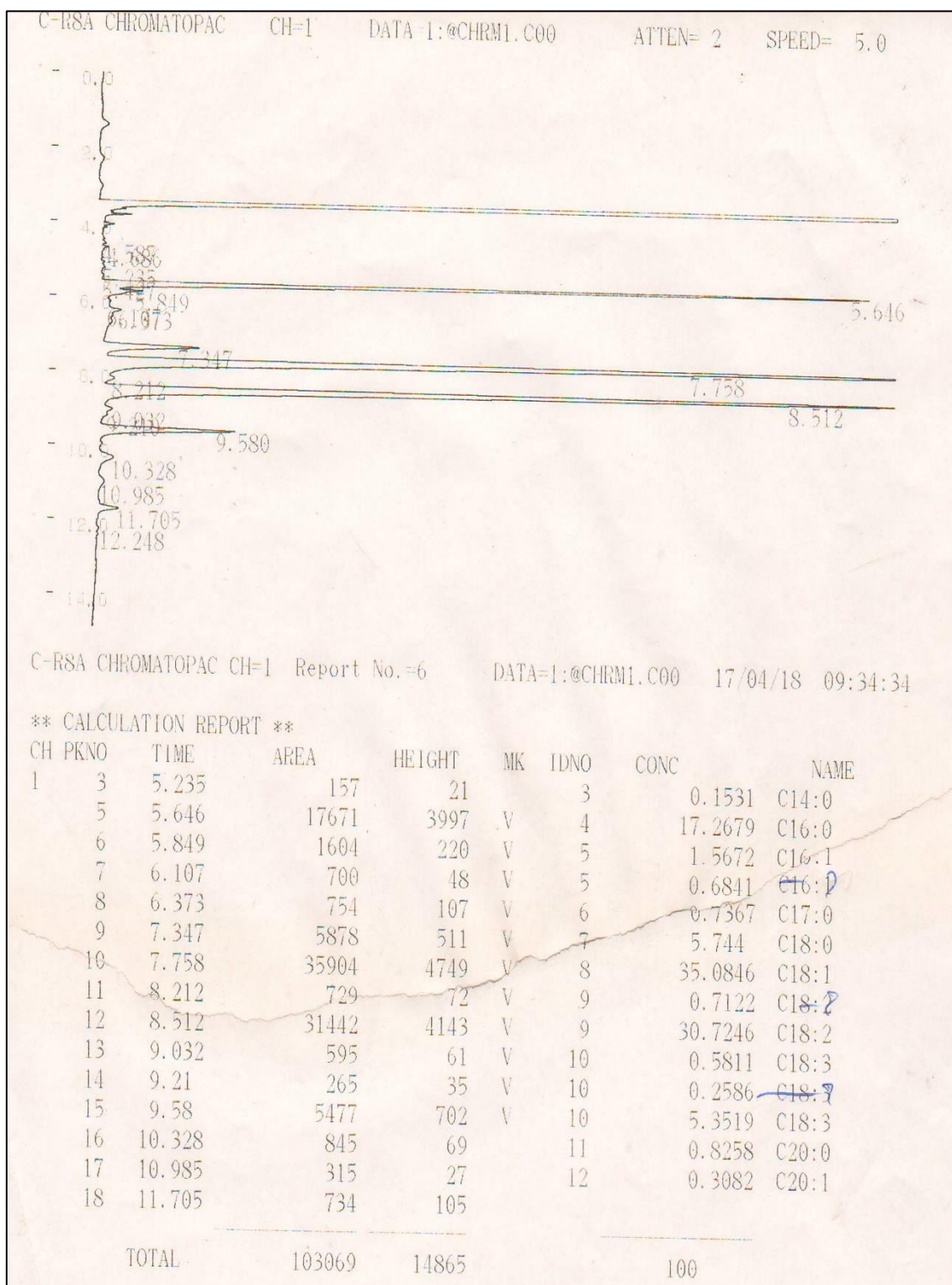


Figure. 13 : chromatogramme de PL1.

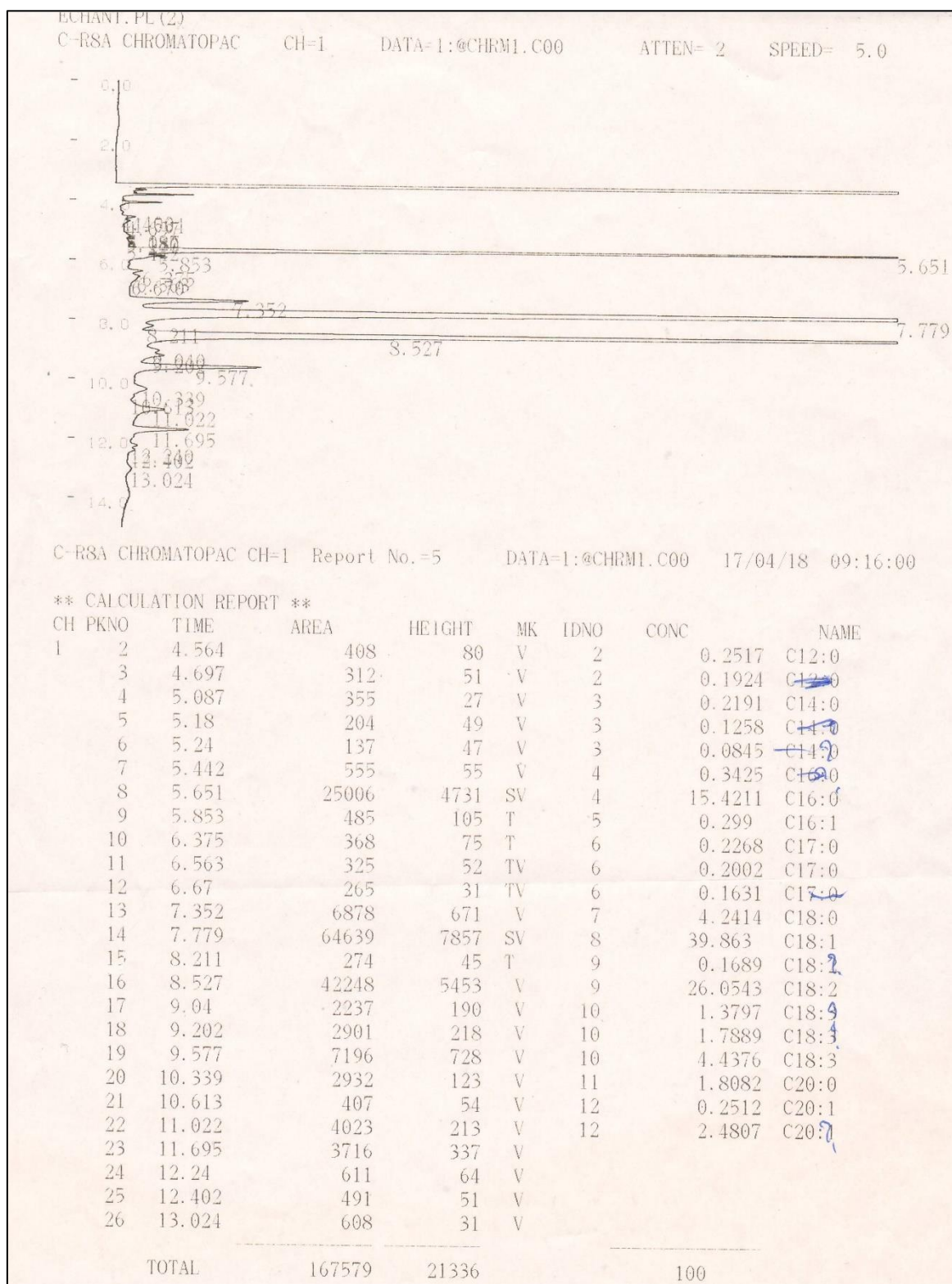


Figure. 13 : chromatogramme de PL2.

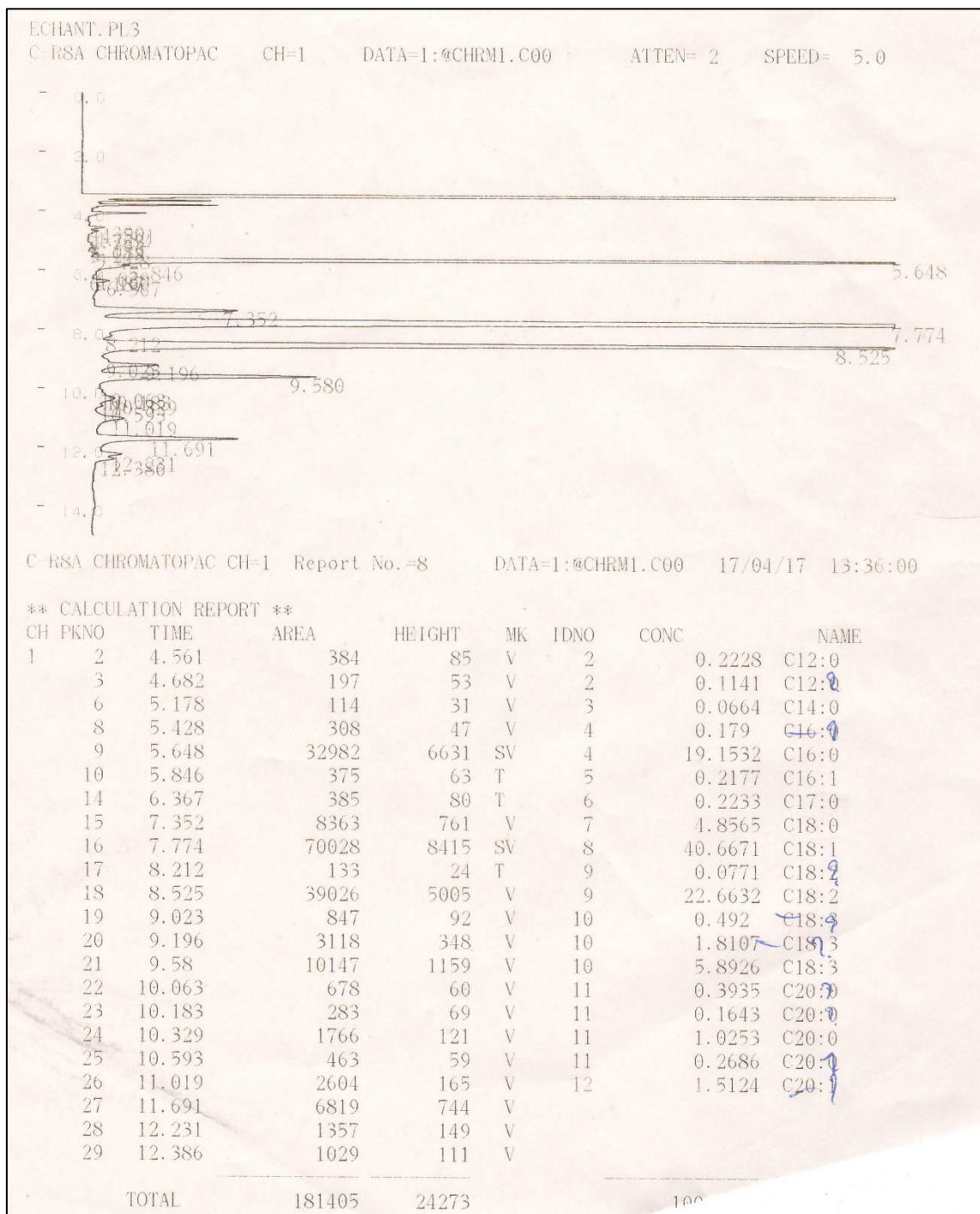


Figure. 14 : chromatogramme de PL3.