

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة عمّار تليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT



كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم علوم المادة
Département Des Sciences De La Matière

Mémoire de MASTER

Domaine : Sciences de la matière
Filière : Chimie
Option : Chimie organique appliquée

Par :

GUERMAZ Zineb

THEME

**Antioxydants naturels et leurs applications à la
conservation de matériaux d'origine naturelle**

Soutenu publiquement le devant le jury composé de:

Mr. YOUSFI Mohamed	Professeur	Président
Mr. BENALIA Mohamed	M.A.A	Examineur
Mr. DJERIDANE Amar	M.C.A	Rapporteur
Mr. DJOKHDEM Khaled	M.A.B	Co-Rapporteur

Année Universitaire 2013/2014



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail


*À mes **parents**, sources constantes d'encouragement,*

de soutien, de confiance et d'affection.

*À mes chers **sœurs** et **frères** ainsi que leurs petites familles*

À mes amies

ZIZI





Remerciements

Je tiens tous d'abord à remercier mon Dieu qui m'a donné le courage pour terminer ce modeste travail.


Mon mémoire a été réalisée au sein du laboratoire des sciences fondamentales à l'université Amar Telidji de Laghouat sous la direction du professeur YOUSFI Mohamed, que je tiens à le remercier pour la disponibilité, les conseils et notamment le respect pendant les années d'université.

Je tiens à remercier mon directeur de mémoire, le docteur DJERIDANE Amar, d'une part pour m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail et d'autre part pour le droit et la confiance qu'il a possédé à mon égard pendant ce projet. Je le remercie également, pour l'aide, la disponibilité et les conseils qu'il a su me prodiguer au cours de ce mémoire.

Je tiens à remercier mon Co-Rapporteur, Mr. DJOKHDEM Khaled, pour l'aide et les conseils qu'il a su me prodiguer au cours de ce mémoire.

Mes remerciements vont également aux membres de jury pour avoir accepté d'examiner ce travail.


Je tiens également à remercier tous mes enseignants, qu'ils ont travaillé avec nous pendant les années du cursus universitaire.





Liste Des Notations

AAPH	:	[2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride] générateur des radicaux
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
A_{ech}	:	Absorbance de l'échantillon
A_t	:	Absorbance de témoin
BHA	:	Butylhydroxyanisole
BHT	:	Butylhydroxytoluene
CCM	:	Chromatographie sur couche mince
CLHP	:	Chromatographie liquide à haute performance
DMSO	:	Diméthylsulfoxyde
ERO	:	Espèces réactives de l'oxygène
g/l	:	Gramme/litre
GAE	:	Equivalente en acide gallique
IP	:	l'indice de peroxyde
LDL	:	Lipoprotéine à basse densité (Low-density lipoproteine)
M	:	Molaire
pH	:	Potentiel d'hydrogène
TBA	:	Test à l'acide thiobarbiturique
UV-Vis	:	Ultra-violet-Visible






Liste Des Figures

Figure 1	: Schéma du mécanisme réactionnel de décomposition d'AAPH	8
Figure 2	: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	10
Figure 3	: Photo de la plaque CCM analytique des extraits de la plante	13
Figure 4	: Photo de la plaque CCM analytique des extraits sous lampe UV (366nm) après pulvérisation avec AlCl ₃ (1%)	15
Figure 5	: Photo de la plaque CCM analytique des extraits sous lampe UV (366nm) après pulvérisation avec NH ₃	16
Figure 6	: Variation de la densité optique de (I ₃ ⁻) en fonction de temps	18

Liste Des Tableaux

Tableau 1	: Les plantes investiguées et leur utilisation traditionnelle	4
Tableau 2	: Réactifs chimiques utilisés	5
Tableau 3	: Rendement d'extraction et teneur en polyphénols	9
Tableau 4	: Relation entre la fluorescence sous UV et la structure des flavonoïdes	14
Tableau 5	: Pourcentage d'inhibition de lipoperoxydation à des concentrations égales à 0.045 g/l en extraits et standards.	19



ملخص

يميل المستهلك اليوم الى تجنب إستعمال المضافات الغذائية الإصطناعية التي تسبب أعراض جانبية كالحساسية والأمراض السرطانية...إلخ. لذا لجأ الباحثون الى إستعمال وتطوير مضادات الأكسدة الطبيعية وخاصة منها مضادات الأكسدة الفينولية.

يهدف هذا العمل الى دراسة اثر المستخلصات الفينولية لبعض النباتات المحلية مثل:

(*Hammada elegans Anabasis articulata, Cistus villosus, Globularia alypum*) , في الحفاظ على زيت عباد الشمس من الأكسدة, تبين من التحليل الكمي لهذه المستخلصات الفينولية أنها تحتوي على قيم تتراوح ما بين :0.05-50,60 ميليغرام مكافئ من حمض الغاليك/غرام من المادة الجافة, كما تمت مقارنة النشاط المضاد للأكسدة لهذه المستخلصات الفينولية مع بعض مضادات الأكسدة الطبيعية مثل: فيتامين (E) , فيتامين (C) والاصطناعية مثل: BHA , أضيفت هذه المستخلصات وكذا المركبات المرجعية بشكل منفصل الى محاليل من زيت عباد الشمس, تم تتبع التغير في حالة أكسدة زيت عباد الشمس بقياس درجة البيروكسيد وذلك بإستعمال طريقة يوديد بوتاسيوم. أظهرت النتائج بأن الزيت المضاف إليه مستخلصات نباتية يكون أقل أكسدة من الزيت الذي لم تضاف إليه مستخلصات نباتية.

من خلال دراستنا هذه بدأ بوضوح أن المستخلصات الفينولية هي مضادات أكسدة طبيعية قوية وفعالة مقارنة بمضادات الأكسدة الإصطناعية وبالتالي يمكن إستبدال مضادات الأكسدة الإصطناعية بمضادات أكسدة طبيعية والتي لا تنطوي على مخاطر صحية للإنسان وبأقل تكلفة.

الكلمات المفاتيح: نباتات، القدرة المضادة للأكسدة، بيروكسيد، المركبات الفينولية.



RÉSUMÉ

De nos jours, le consommateur tend à éviter les additifs alimentaires synthétiques qui sont suspectés d'effets toxiques, sensibilisants, allergisants et cancérigènes. De ce fait, l'industrie agroalimentaire développe l'utilisation des antioxydants naturels. A l'heure actuelle, les polyphénols capturent l'intérêt des chercheurs afin de trouver de nouvelles matières premières abondamment disponibles. Le présent travail a pour objectif de vérifier la stabilité de l'huile de tournesol par la valorisation des extraits phénoliques de quelques plantes locales à savoir, *Anabasis articulata*, *Cistus villosus*, *Globularia alypum* et *Hammada elegans*.

L'analyse quantitative de ces extraits en composés phénoliques, a donné des teneurs allant de 0,05 à 50,60 mg équivalents en acide gallique par 1 g de la matière sèche. Leur activité antioxydante a été comparée à celle des antioxydants naturels (vitamine E, vitamine C) et synthétiques (BHA). Les extraits phénoliques et les standards ont été additionnés séparément à des solutions d'huile de tournesol. La stabilité de l'huile a été mesurée par oxydation accélérée (50°C, générateur des radicaux AAPH). L'évolution de l'état d'oxydation a été mesurée par l'indice de peroxyde (IP), en utilisant le test à l'iodure de potassium. Les résultats obtenus ont montré que les huiles traitées avec les antioxydants des extraits de plantes ont subi une détérioration oxydative moins accentuée que celle du témoin (sans additifs).

D'après notre étude, il paraît clairement que les extraits phénoliques sont des antioxydants efficaces qui sont caractérisés par une haute capacité antioxydante comparable au BHA qui lui, est synthétique ; et peuvent le remplacer en agroalimentaire selon une utilisation rationnelle qui n'implique pas de risques sur la santé humaine et de plus est de moindre frais.

Mots clés: Plantes, extraits phénoliques, peroxydation, capacité antiradicalaire.







Table des matières

Liste des notations

Liste des tableaux

Liste des figures

I. Introduction générale	1
II. Matériel et méthodes	4
II.1. Matériel	4
II.1.1. Matériel végétal	4
II.1.2. Réactifs chimiques	5
II.2. Méthodes	6
II.2.1. Extraction des composés phénoliques	6
II.2.2. Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince (CCM)	6
II.2.3. Dosage des phénols totaux	7
II.2.4. Evaluation de l'activité antioxydante des composées phénoliques	7
III. Résultats et discussion	9
III.1. Quantification des composées phénoliques	9
III.2. Evaluation de l'activité antioxydante	17
IV. Conclusion générale	22
V. Références Bibliographiques	24



I. Introduction générale

Les plantes sont capables de produire de nombreux métabolites secondaires parmi lesquels on distingue les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques. Avec leur diversité structurale remarquable, ces derniers, également appelés polyphénols, constituent une richesse déjà largement exploitée par les industries agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique (*Zhiri A. et Baudoux D., 2005*). Les polyphénols principalement, (flavonoïdes, acides phénoliques, tannins) ont d'ailleurs montré qu'ils avaient des propriétés biologiques très importantes et très vastes, notamment de grands antioxydants. De même l'activité antioxydante a été attribuée à la majorité des flavonoïdes découverts. Ces derniers avaient la capacité de neutraliser différents types de radicaux libres : les peroxydes (ROO^{\bullet}), les alcoxyles (RO^{\bullet}), les superoxydes ($\text{O}_2^{\bullet-}$) et les hydroxyles (HO^{\bullet}) ; empêchant de ce fait l'oxydation des lipides, des protéines, des enzymes et de l'ADN (*Gee J.M. et Johnson I.T., 2001 ; Middleton E. et coll., 2000*). Ils permettent également, de ralentir le phénomène d'oxydation et apparaissent ainsi comme essentiels pour maintenir la qualité des aliments riches en lipides et les protéger des oxydations (*AniV et Varadaraj M., 2006 ; Laguerre M. et coll., 2007*).

L'oxydation des lipides implique toute une chaîne de réaction qui commence sous l'action de différents facteurs (lumière, chaleur, ion métallique, espèce toxique de l'oxygène...) avec production de radicaux libres de nature lipidique, s'amplifiant en suite par autoformation de nouveaux radicaux libres puis se termine avec la formation de produits non radicalaire. Le caractère antioxydant des composés phénoliques se manifeste à différents niveaux de cette chaîne par leur action réductrice, leur capacité à piéger et neutraliser les formes toxiques de l'oxygène et les formes radicalaires des lipides et par la chélation possible des ions métalliques (*Cillard J. et Cillard P., 2006*).

Alors, l'efficacité réelle de ces molécules demande une multitude de tests, aucun d'entre eux ne présentant malheureusement un caractère universel (*Laguerre M. et coll., 2007*). Concrètement, l'évaluation de la capacité antioxydante d'une molécule vis-à-vis d'un substrat lipidique peut se fonder sur trois stratégies de mesure différentes : la déplétion en oxygène, la disparition du substrat et l'apparition de produits d'oxydation primaires et/ou secondaires (*Laguerre M. et coll., 2007*). Premièrement, l'étude cinétique de la consommation en oxygène permet de mesurer la durée de la phase d'initiation et son allongement en présence d'agents antioxydants. Les méthodes de mesure peuvent être manométriques ou gravimétriques par mesure de l'augmentation du poids consécutive à la fixation d'oxygène sur les acides gras (*Roginsky V. et Barsukova T., 2001 ; Wang J. et coll., 1991*). Deuxièmement, la disparition du substrat est fréquemment employée pour l'établissement du degré d'oxydation en système modèle simple (*i.e.* substrat unique et parfaitement caractérisé) ou en système complexe marqué (particules biologiques ou cellules vivantes marquées par un fluorophore). Mis à part quelques méthodes chromatographiques destinées à doser les substrats non oxydés résiduels, les méthodes adoptant cette stratégie implique généralement une mesure spectrale. Parmi les techniques de cette stratégie on peut citer ; la co-oxydation du β -carotène et de l'acide linoléique (*Frankel E.N., 1998*) et la chute de fluorescence de l'acide cis-parinarique (*Kuypers F.A. et coll., 1987*). Finalement, l'apparition des produits d'oxydation (primaires ou secondaires) détectables par des méthodes physicochimiques, semble adaptée à l'étude de tous types de systèmes lipidiques. Parmi les méthodes normalisées pour quantifier les produits d'oxydations lipidique est la mesure des hydroperoxydes totaux, la détermination ultraviolette des diènes conjugués (*Pryor W.A. et coll., 1993*), le test à l'acide thiobarbiturique (TBA) (*Dahle L.K. et coll., 1962*) et la mesure des volatils par chromatographie (*Frankel E.N. et coll., 1989*). Conséquemment, la mesure des hydroperoxydes est probablement l'approche ayant suscité le plus grand nombre de développements (*Laguerre M. et coll., 2007*).

A côté des antioxydants phénoliques naturellement présents dans les produits d'origines végétales, certains peuvent être rajoutés lors de la transformation ou de la conservation industrielle de certains aliments. Ainsi, en raison de leur stabilité, de leurs moindre cout et de leurs relatives liposolubilité, deux composés phénoliques de synthèse, le BHA (butylhydroxyanisole, E 320) et le BTH (butylhydroxytoluène, E321) sont des antioxydants très utilisés dans l'industrie agroalimentaire pour la protection des corps gras d'origine animale ou végétale. Il en existe bien d'autres, toujours de nature phénolique (par exemple les gallates de propyle ou d'octyle), mais l'utilisation de ce type de molécules de synthèse est ce pendant en diminution en raison de la suspicion d'être d'origine de composés carcinogènes et des rejets général d'additifs alimentaires de synthèse par le consommateur (*Peng C. et coll., 2000*). L'ampleur de ce problème a fait que des antioxydants naturels deviennent de plus en plus recommandés pour remplacer les antioxydants synthétiques. Dans cette démarche, la stabilisation des huiles végétales, (*Gertz, 2000*), dont l'oxydation mène à la réduction de la qualité des huiles et des aliments frits, a fait l'objet de nombreuses recherches ayant opté pour l'utilisation des antioxydants naturels à pouvoir antioxydant remarquable (*Warner, 2002*).

Dans ce contexte, l'objectif du présent travail est concentré sur l'étude de l'effet antiperoxydatif des extraits de quatre plantes locales à savoir ; *Anabasis articulata*, *Cistus villosus*, *Globularia arabica* et *Hammada elegans*, La première partie de ce travail sera consacrée à l'extraction puis au dosage des phénols totaux des substances végétales actives à partir des plantes choisir. L'étude de l'effet antioxydant *in vitro* des extraits ainsi préparés sous des conditions défavorables de température et d'agent oxydatif, sera traité dans la deuxième partie. Après l'évaluation cinétique de l'effet antioxydant, principalement à partir du taux formé des hydroperoxydes l'acide, cette étude permettrait d'affirmer l'importance de l'utilisation bénéfique de ces substances naturelles, d'apporter des comparaisons entre les diverses substances utilisées et de justifier la différence entre leurs effets avec les antioxydants de référence tel que la vitamine E, la vitamine C et le BHA.

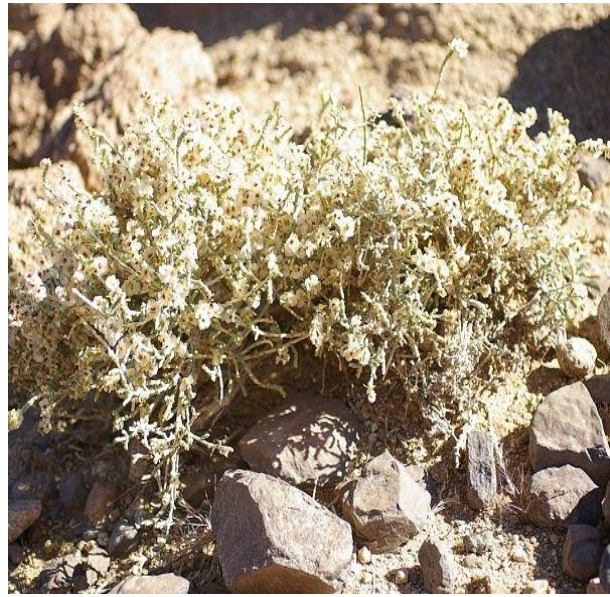

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériels

II.1.1. Matériel végétal

Les plantes ont été récoltées de trois régions (Sidi Makhoulouf, El Hadjeb et Madna environ 40 km, 30 km et 100 km successivement du centre ville de la willaya de Laghouat) au mois d'avril 2012 (Tableau 1). Les plantes investiguées sont séchées à l'abri de la lumière pendant 2 mois.

Tableau 1: Les plantes investiguées et leur utilisation en médecine traditionnelle

Plante	Photo
<p>Famille: <i>Chenopodiaceae</i></p> <p>Nom latin: <i>Anabasis articulata</i></p> <p>Nom vernaculaire: Baguel</p> <p>Description: Buisson bas à souche épaisse et tortueuse, de couleur vert bleuté très clair. Les rameaux articulés et presque sans feuille. Fleurs isolées à l'aisselle de chaque feuille. Les fleurs blanc rosé ont cinq sépales, le fruit est entouré par trois ailes dues à la dilatation de trois de ces sépales. Les feuilles opposées, ont une partie libre très courte, obtuse ou terminée par une pointe blanchâtre.</p> <p>Utilisation traditionnelle : Elle utilisé en emplâtre pour soigner les dermatoses du chameau.</p>	
<p>Famille : <i>Cistaceae</i></p> <p>Nom latin : <i>Cistus villosus</i>, <i>Cytisus monspessulassus</i>, <i>Cistus creticus</i>, <i>Cistus incanus</i>, <i>Cistus polymorphus</i></p> <p>Nom vernaculaire : Gassa</p> <p>Description: Arbrisseau aux fleurs roses chiffonnée, haut de 0,5 à 1,5 m. Les feuilles opposées ont des pétioles plus ou moins soudés entre eux. Le limbe réticulé-rugueux est hérissé de poils étoilés. Les fleurs sont rassemblées dans des cymes ombelliformes de 1 à 8 fleurs. Le fruit est une capsule velue, à 5 loges.</p> <p>Utilisation traditionnelle : Elle est utilisée en interne dans le traitement de la diarrhée et les maladies rénales.</p>	

Famille : *Globulariaceae*

Nom latin : *Globularia arabica*, *Globularia alypum*,
Globularia eriocephala Pomel

Nom vernaculaire : Tesslga

Description : Sous-arbrisseau très rameux, les tiges sont rougeâtres. Petites feuilles alternes, coriaces, obovales lancéolées mucronées à pétioles très court. Les fleurs bleu nuit sont réunies en un capitule globuleux entouré de bractées velues situé à l'extrémité des rameaux.

Utilisation traditionnelle : Cette plante possède des propriétés médicinales, elle contient de la choline, des hétérosides, stérols, tanins et mucilage. Elle est utilisée notamment comme purgatif.



Famille: *Chenopodiaceae*

Nom latin: *Hammada elegans*

Nom vernaculaire: Ajrame

Description: Plante aux rameaux grêles et charnus, articulés, dressés, très nombreux. Les rameaux foncent et noircissent en séchant. Les rameaux âgés sont gris-brun et les rameaux nouveaux sont d'un vert légèrement blanchâtre. Feuilles opposées très petites en triangle des principales caractéristiques de *Hammada elegans* est sa très grande résistance à la sécheresse.

Utilisation traditionnelle : Elle est utilisée par les habitants de la région pour soigné les maladies abdominales.



II.1.2. Réactifs chimiques

Tous les produits utilisés dans ce travail sont d'un grade analytique élevé (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Réactifs chimiques utilisés

Produit	Marque
BHA (Butylhydroxyanisole), trizma Base ; CCM analytique ; vitamine E (α -tocophérol)	Fluka
CCM préparatoire 20x20cm gel de silice 60	Merck
Acide gallique ; réactif de Folin-ciocalteu ; AAPH : [2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride], Acide acétique glacial. Na_2CO_3	Sigma
Ethanol ; Cyclohexane ; Hexane, Sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4), Méthanol	Biochem
Di-éthylether ; HCl (acide chlorhydrique 37%) ; Dichlorométhane, KI	Riedel-de Haën
Papier filtre qualitative Ø15cm ; Huile de tournesol préparé ou laboratoire avec des grains commerciaux.	

II.2. Méthodes

II.2.1. Extraction des composés phénoliques

Il existe deux méthodes utilisées fréquemment dans l'extraction des composés phénoliques ; extraction à froid « macération » et extraction à chaud « infusion et décoction ». Dans notre travail nous avons choisi l'extraction à chaud « Soxhlet » qui est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première. Après avoir broyée finement la partie aérienne de la plante une masse d'environ 20g a été extraite successivement par 3 systèmes de solvants de polarité croissante : l'hexane (0,0), le dichlorométhane (3,1) et le méthanol (5.1).

Après chaque extraction le solvant utilisé est évaporé sous vide à l'aide d'un Rota vapeur. Ensuite, le résidu obtenu est pesé puis solubilisé dans des volumes différents du méthanol. Les extraits ainsi obtenus sont conservés à 4°C jusqu'à leur analyse. Nous avons obtenu alors, 8 extraits dichlorométhaniques et 8 extraits méthanoliques. La conservation des extraits méthanoliques à froid, fait apparaître des précipités d'aspects physiques différents. Après, filtration les résidus obtenus sont dissous dans le DMSO. Donc, nous avons obtenus deux fractions méthanoliques.

II.2.2. Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince (CCM)

Après l'extraction, une CCM analytique a été réalisée pour avoir une idée sur les différents composés existants dans les différents extraits bruts. La séparation a été effectuée en utilisant une plaque CCM de dimension 10x10cm en gel de silice avec un système de solvant composé de : (di-éthylether/ cyclohexane/ acide acétique (7/3/0,1) (v : v : v). Après migration la plaque est séchée à l'air libre et révélée par une lampe UV à une longueur d'onde $\lambda = 366$ nm.

II.2.3. Dosage des phénols totaux

Le dosage des phénols totaux a été effectué par une méthode adaptée de Singleton et Ross avec le réactif de Folin-Ciocalteu (*Giner-Chavez B.I., 1996*). 100 µl de chaque extrait ont été introduits à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 500 µl du réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué). Après incubation pendant 2 minutes, 2 ml de carbonates de sodium Na₂CO₃ à 5% ont été ajoutées, puis les solutions ont été secouées immédiatement et sont maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 717 nm contre un blanc sur un spectrophotomètre UV-Visible de type UV-1601. La teneur en composés phénoliques de chaque extrait a été calculée à partir une courbe d'étalonnage de l'acide gallique et exprimée en milligrammes par gramme de la matière sèche équivalent en acide gallique (mg/g EAG).

II.2.4. Evaluation de l'activité antioxydante des composées phénoliques

L'indice de peroxyde est un indicateur de la présence de produits primaires de l'oxydation (hydroperoxydes). Ils peuvent être mesurés par des techniques basées sur leur capacité à libérer l'iode de l'iodure de potassium (*Shahidi F. et coll., 2002*) ou d'oxyder des ions ferreux, ou ions ferriques. Alors, l'activité antioxydante a été évaluée par l'inhibition de la peroxydation lipidique à l'aide de la méthode au thiocyanate ferrique (FTC) (*Dobarganes M.C. et Velasco J., 2002*).

Dans ce test, l'utilisation du 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochlorure (AAPH), qui a l'avantage de se décomposer unimoléculairement à vitesse constante en fonction de la température appliquée, permet de mesurer le pouvoir antiradicalaire des antioxydants en milieu émulsionné. L'AAPH[•] est un initiateur chimique de l'oxydation lipidique qui, porté à 37 °C, produit un radical AAP[•]. En solution et en présence d'oxygène, ce radical AAP[•] forme un radical AAPOO[•] qui réagit par la suite avec les acides gras (RH) donneurs d'hydrogène (**Figure 1**). Il apparaît alors un radical lipidique R[•] qui se combinent très rapidement avec O₂ pour former les radicaux peroxydes ROO[•] (*Frei. B et al ,1990*). La quantification des radicaux

peroxydes par la méthode à l'iodure de potassium renseigne sur le pouvoir inhibiteur de la peroxydation lipidique des antioxydants étudiés.

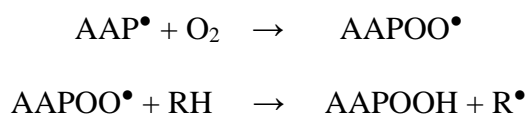


Figure 1 : Schéma du mécanisme réactionnel de l'oxydation lipidique par l'AAPH.

En présence de peroxydes organiques, l'iodure (I^-) se transforme par oxydation en iode moléculaire (I_2). Les peroxydes organiques sont alors réduits. L'iode moléculaire réagit avec un excès de (I^-) menant à la formation d'un complexe jaunâtre, le (I_3^-), ce qui colore la solution. La concentration de peroxydes organiques est donc déterminée qualitativement par la coloration de la solution en mesurant son absorbance à 360 nm.

Pour réaliser ce test, 1 ml de tampon Tris-HCl 0,05 M (pH 7,4) contenant 0.3% tween-20 a été mélangé avec 1 ml d'huile de tournesol (5g/l) préparés dans l'éthanol et 100 μl des extraits ou solutions stock des antioxydants de références. Le mélange a été ensuite agité et incubé à l'obscurité et à température de 50°C pendant 10 minutes. La peroxydation a été initiée par l'ajout de 100 μl de la solution AAPH (20g/l dans le tampon) et la réaction a été effectuée à 50° C dans l'obscurité pendant 50 minutes. Ensuite, et après chaque intervalle de temps, on plonge les solutions réactionnelles dans un bain de glace. Après 2 minutes, 1 ml d'iodure potassium à 1% contenant 3% d'acide acétique glaciale, a été ajoutée et l'absorbance de la solution a été mesurée à 360 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible de type UV-1601. Tous les tests ont été effectués en quintuplicate. Les mesures de densités optiques en présence de chaque solution d'extrait à des concentrations égales 0.045g/l nous ont permis d'exprimer l'activité antilipoperoxydante par le pourcentage d'inhibition. Nous avons également, testé la vitamine E, le BHA et la vitamine C pris comme antioxydants de références commerciaux.

III. Résultats et discussion

III.1. Quantification des composés phénoliques

Le rendement de l'extraction varie en fonction de l'espèce végétale, l'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de séchage, le contenu de chaque espèce en métabolites et de la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou fractionnement et de sa polarité.

Tableau 3 : Rendement d'extraction et teneur en polyphénols

Echantillon		Rendement (%)	Phénols totaux (mg/g EAG)	
Dichlorométhane	<i>Anabasis articulata</i>	Fleurs	0,80	0,247±0.033
		Tiges	0,48	0,254±0.002
	<i>Cistus villosus</i>	Feuilles	0,70	0,380±0.003
		Tiges	0,38	0,050±0.029
	<i>Globularia Arabica</i>	Feuilles	1,71	0,276±0.012
		Tiges	1,28	0,122±0.005
Méthanol (fraction 1)	<i>Hammada elegans</i>	Fleurs	1,90	0,271±0.004
		Tiges	1,05	0,313±0.012
	<i>Anabasis articulata</i>	Fleurs	17,56	2,528±0.016
		Tiges	15,81	1,930±0.059
	<i>Cistus villosus</i>	Feuilles	23,08	50,601±1.321
		Tiges	12,35	23,806±0.855
Méthanol (fraction 2)	<i>Globularia Arabica</i>	Feuilles	43,08	32,871±1.468
		Tiges	17,09	18,440±0.547
	<i>Hammada elegans</i>	Fleurs	22,92	3,046±0.007
		Tiges	11,39	2,544±0.038
	<i>Anabasis articulata</i>	Fleurs	1,85	0,543±0.034
		Tiges	0,44	0,204±0.030
Méthanol (fraction 2)	<i>Cistus villosus</i>	Feuilles	0,42	1,262±0.077
		Tiges	0,18	0,608±0.041
	<i>Globularia Arabica</i>	Feuilles	3,69	4,002±0.137
		Tiges	0,05	0,195±0.009
	<i>Hammada elegans</i>	Fleurs	1,26	0,479±0.001
		Tiges	0,37	0,181±0.010

Les extraits phénoliques ainsi obtenus présentent un aspect visqueux de couleurs différentes avec des rendements qui varient entre 0,05 et 43,08 % (**Tableau 3**). Il est constatable que la plus importante quantité du résidu sec a été trouvée dans les extraits méthanoliques comparativement aux extraits dichlorométhaniques. De ce fait, on peut déduire que les plantes étudiées renferment un matériel riche en composés à caractère polaire.

Pour chaque espèce végétale et au sein de la même espèce, la nature des composants phytochimiques est à l'origine des activités biologiques de chaque extrait ou fraction. Ces activités sont aussi en dépendance de la teneur de la substance ou l'ensemble des substances biologiquement actives.

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait de plante a été alors calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Figure 2**) et exprimée en milligrammes équivalent en acide gallique (GAE) par gramme de la matière sèche. Les résultats obtenus sont présentés dans le (**Tableau 3**).

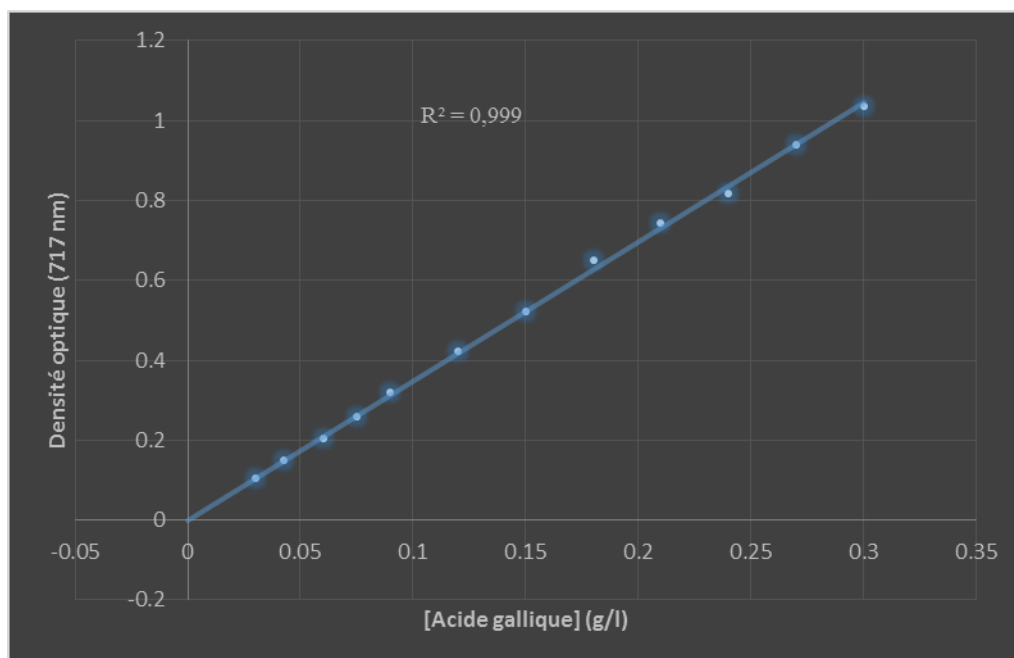


Figure 2 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

D'après la synthèse de l'ensemble de résultats obtenus lors de la quantification des phénols totaux, on peut constater que les teneurs de ces composés varient entre 0,05 et 50,60 mg GAE/g de la matière sèche. Les taux des composés phénoliques les plus élevés ont été détectés pour les extraits du méthanol. Tandis que, les teneurs les plus basses sont remarquées pour les extraits de dichlorométhane (**Tableau 3**). En outre, nous avons enregistré que les extraits méthanoliques qui ont donné un rendement le plus important en résidu sec ont offert aussi une teneur importante en phénols totaux. Ce résultat pourra être expliqué par le fait que la polarité des extraits influe sur le type de composés extraits ainsi que leur pouvoir réducteur.

Aussi, nous avons constaté que les feuilles contiennent des proportions plus élevées de polyphénols comparativement aux tiges de mêmes plantes. La répartition inégale des polyphénols dans les différents organes d'une plante a été rapportée par plusieurs auteurs (*Falleh H. et coll., 2005; Gehin A. et coll., 2006*). Egalement, on peut noter ici que les plantes intégrantes de la famille des *Chenopodiaceae* présentent les quantités en phénols totaux les plus faibles par rapport aux autres familles. Egalement, on peut confirmer que nos plantes investiguées sont une source prometteuse de polyphénols, comme certainement d'autres plantes ne présentent relativement qu'une faible teneur de ces composés (*Alain Hugues Olivier N'Guessan et coll., 2011, SreeLatha Devi R.K. et coll., 2013*).

L'inconvénient majeur de ce test que le réactif du Folin-Ciocalteu n'est pas spécifique aux composés phénoliques, il réagit avec tous autres composés qui contiennent un groupement OH comme les sucres, les protéines et les pigments par ce que une telle extraction ne donne pas que les composés phénoliques. Pour cela les valeurs obtenues des teneurs en composés phénoliques totaux ne reflètent pas les quantités réelles de ces substances dans la plante investiguée car il y a plusieurs facteurs qui influent sur le rendement d'extraction en l'occurrence, le type, l'acidité et le volume du solvant, la température et le temps du contact avec la matière première ainsi que le mode d'extraction (*Dopico-García M.S. et coll., 2007 ; Giorgia Spigno et coll., 2007*).

En fin, la connaissance du matériel polyphénolique de ces plantes n'est pas connue. Alors, la mise en évidence des principes actifs issus du métabolisme secondaire de cette plantes devra être approfondie afin de permettre d'isoler et de caractériser d'éventuels nouveaux polyphénols ou de trouver des polyphénols déjà connus qui pourront être utilisés pour des études chimio taxonomiques. A cet effet, le dosage des composés phénoliques par les méthodes spectrophotométrique reste insuffisant et l'analyse quantitative et qualitative de ces substances peut être effectuée par la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) avec un détecteur UV-Visible (*Howard M. Merken et Gary R., 2000*). En revanche, l'analyse des constituants phénoliques par la CLHP reste encore insuffisante. Il faut donc, passer à la purification des composés par les techniques chromatographiques puis leur identification par les méthodes spectroscopiques (RMN¹H et ¹³C, spectroscopie de masse). Actuellement, l'utilisation de la chromatographie liquide à haute performance liée à un détecteur de masse est devenue une technologie très rapide pour la purification et l'identification des composés phénoliques (*Romani Pinelli A. et coll., 1993*).

Pour un essai d'analyse qualitative du contenu phénolique de nos différents extraits on a eu recours à l'utilisation de la chromatographie sur couche mince (CCM) puisqu'elle est l'une des méthodes de séparation des différents constituants d'un extrait végétal et qui est plutôt simple à mettre en oeuvre. Dans notre étude, nous avons réalisé une chromatographie sur couche mince pour les fractions méthanoliques et dichlorométhaniques des deux parties de chaque plante étudiée sur une plaque de gel de silice en utilisant le système suivant : (di-éthylether/ cyclohexane/ acide acétique (7/3/0,1) (v : v : v).

Après observation des plaques dans une chambre noire d'une CCM et en s'appuyant sur les données de la bibliographie quant à la séparation des composés phénoliques par CCM et leur observation sous UV, on peut éventuellement prédire les composés ou les familles de composés les plus probables qui peuvent dans la composition des extraits de plantes. Par le biais de ce système, nous avons pu mettre en évidence plusieurs taches qui absorbent à une longueur d'onde

de 366 nm (**Figure 3**). Ces différents spots présentent des couleurs rouge, mauve, orange, bleu et marron ce qui confirme la présence des squelettes flavonoïdiques ou des composés oléfiniques (*Claudine Manach et coll., 2004 ; Elisa Tripoli et coll., 2007*).

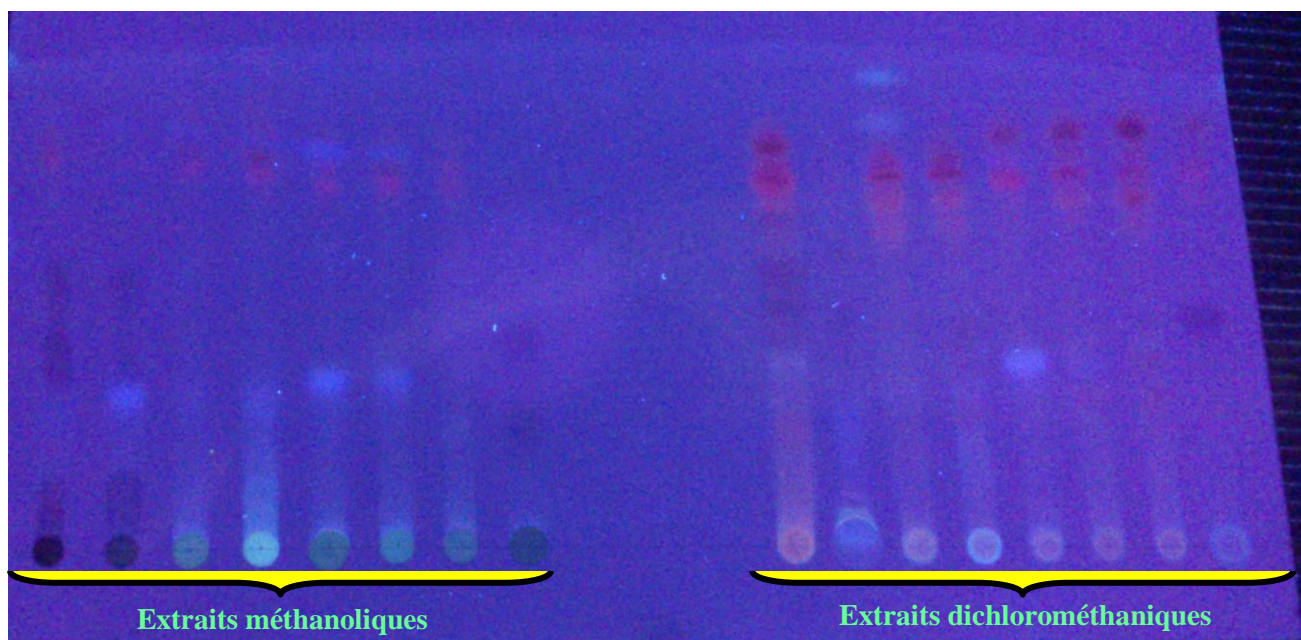


Figure 3 : Photo de la plaque CCM analytique des extraits sous lampe UV (366nm)

Egalement, nous avons enregistré que tous les extraits méthanoliques présentent presque les mêmes chromatogrammes. Même observation a été notée pour les extraits dichlorométhaniques. De plus, ces derniers renferment un grand nombre de molécules comparativement aux extraits méthanoliques. Après une simple comparaison entre les extraits méthanoliques et dichlorométhaniques, il apparaît clair et évident que les taches rouges, qui sont communes. En revanche, d'après l'analyse quantitative et l'étude de l'activité antioxydante de ces extraits qui ont montré des différences significatives, on peut constater l'existence des produits actifs qui n'ont pas été détectés sur le chromatogramme. En effet, il existe une relation étroite entre la fluorescence du composé, sa nature et son mode de substitution. Le tableau suivant, résume la relation entre les couleurs et les spots des flavonoïdes et leurs structures. D'après ce tableau, on peut constater que nos extraits renferment des squelettes flavonoïdiques.

Tableau 4: Relation entre la fluorescence sous UV et la structure des flavonoïdes (Lahouel, 2005).

Spot coloré	Type de flavonoïdes
Noir, Marron	Flavonols 5, 6, 7 tris-OH libres Flavonols 5, 7, 8 tris-OH libres
Brun-noir	3-OH absent ou 3-OH substitué
Violet	Flavones 5-OH et 4' -OH Flavones 3-OR et 5-OH, 4'-OH Flavones ou Flavonols 5 -OH avec 4' - OH absent ou substitué en 3 Flavones 6- ou 8 -OH Chacones, isoflavones, dihydroflavonols, flavanones
Bleu- clair (fluorescent)	Flavones sans 5-OH libres Flavones 5-OH Libres avec 3-OH substitué
Jaune terne, jaune, Fluorescence orangé	Flavonols 3-OH libres avec ou sans 5-OH substitué
Jaune vert brillant	5-OH libres ou 5-OH substitué
Jaune fluorescent	Flavonols avec 3-OH libre
Jaune pale	Dihydroflavonols

En effet, Les flavonoïdes présentent des taches de colorations variables sous UV/366 nm. La présence des couleurs marron et rouge pouvant indiquer respectivement la présence des pigments et des anthocyanidines 3,5-diglucosides. De plus, l'apparition des taches bleu fluorescent, marron et orange foncé, pouvant indiquer respectivement la présence des flavonols et/ou des flavonones et/ou des isoflavonones et/ou des flavones, des pigments et des anthocyanidine-3-glucoside. Certains tels que la quercétine, les flavonols et aurones sont jaunes. Les xanthonnes se révèlent en orange. Les flavones méthylées et hydroxyflavonols sont bleus et pourpres. C'est le cas des spots de $R_f=0,33$ détectés dans *A. articulata* et *H. elegans*.

Après l'analyse des résultats obtenus, la CCM confirme la présence et la richesse de la plante en polyphénols. La bonne séparation apparaît dans les systèmes polaires prouve que les polyphénols, les tanins et les flavonoïdes existants sont de nature beaucoup plus polaire. La présence des flavonoïdes a été confirmée par les réactifs d' AlCl_3 , NH_3 , et FeCl_3 . AlCl_3 les révèle dans le visible en jaune et sous UV/366 nm en des colorations allant du bleu au brun. Quant au réactif de FeCl_3 , il les colore en noire, dans le visible et en diverses colorations sous UV/366 nm.

Concernant NH_3 , il les révèle sous forme de spots fluorescents jaune, vert et bleu sous UV/366 nm (Øyvind M. Andersen et Kenneth R. Markham, 2006).

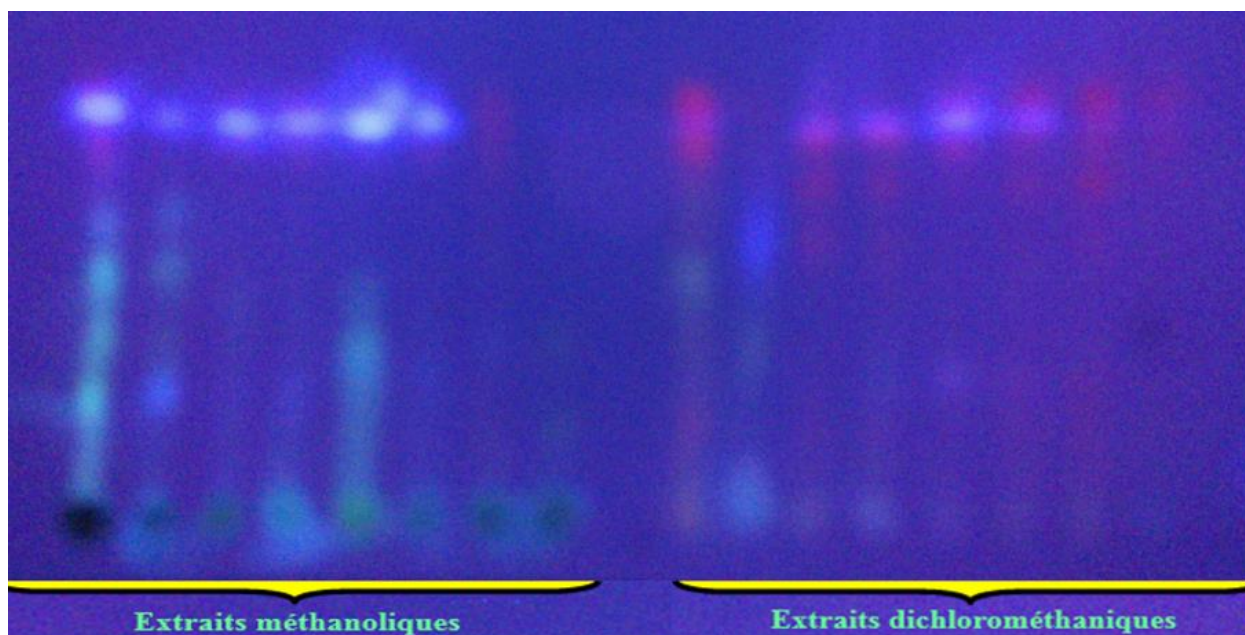


Figure 4 : Photo de la plaque CCM analytique des extraits sous lampe UV (366nm) après pulvérisation avec AlCl_3 (1%)

D'après la coloration noire obtenue avec FeCl_3 , on constate que l'extrait de *Cistus villosus* pourra contenir des tanins galliques et catéchiques. L'analyse de la plaque CCM après pulvérisation de AlCl_3 révèle une diminution de certains composés dont les pigments chlorophylliens (plaque avant pulvérisation et à 254 nm), une diminution probablement des xanthophylles et ou caroténoïdes (plaque à 366nm) ainsi qu'une augmentation de composés fluorescents (Figure 4). La révélation à la AlCl_3 montre l'apparition des taches jaunes et bleus fluorescents dans certains extraits notamment les extraits méthanoliques et dichlorométhaniques de *Anabasis articulata*, *Cistus villosus* et *Hammada elegans* qui peuvent être des acides phénoliques, des flavonols, des flavonones, des flavones ou des isoflavonones.

Le NH_3 est un révélateur aux coumarines et aux flavonoïdes. Toutefois, ils se distinguent par des colorations caractéristiques (Figure 5). En effet, NH_3 permet non seulement d'identifier les coumarines en les colorant en bleu, vert, jaune, pourpre ou rose, mais également de les

caractériser. Après exposition aux vapeurs de NH_3 et visualisation sous UV, les fluorescences jaunâtres observées, indique l'existence de coumarines. Ainsi, les spots bleus sous UV/366 nm dont la coloration ne varie pas après traitement par NH_3 correspondraient aux 7-hydroxycoumarines ou 7-hydroxy-6-alkoxycoumarines. Il s'agit des spots de $R_f=0,33$ détecté dans les extraits de *S. villosus* et *H. elegans*.

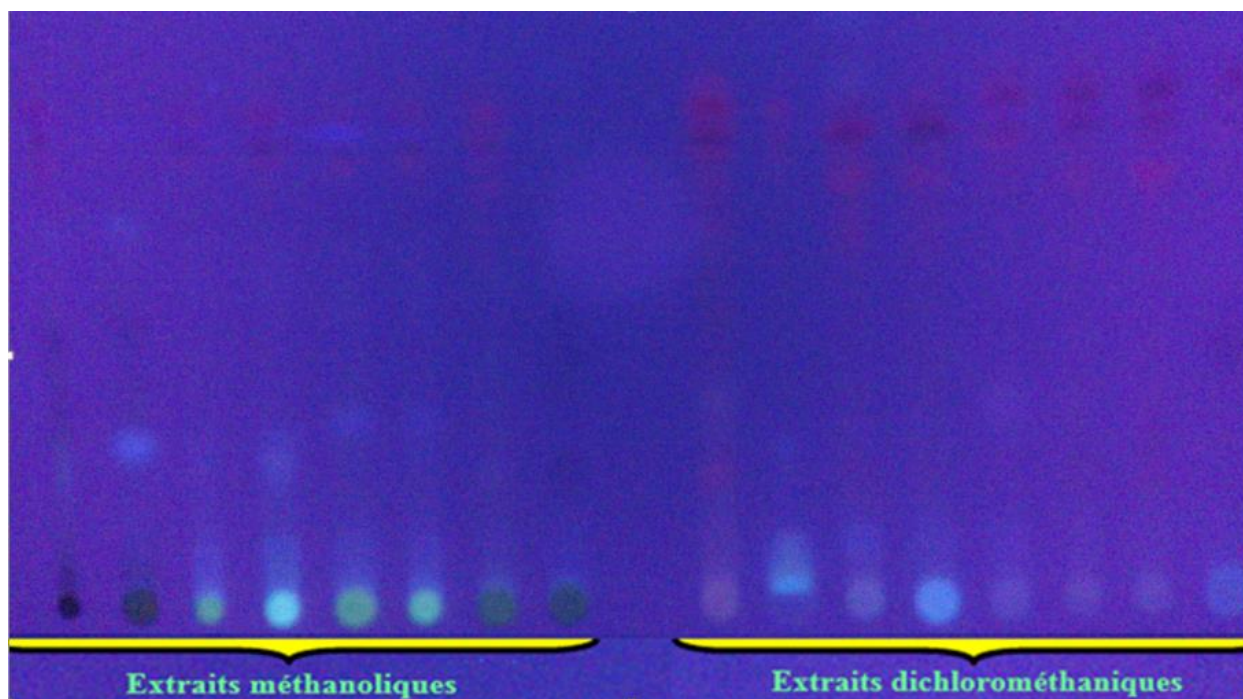


Figure 5 : Photo de la plaque CCM analytique des extraits sous lampe UV (366nm) après pulvérisation avec NH_3

En fin et d'après la synthèse bibliographique, la connaissance du matériel polyphénolique de ces plantes est encore mal connue à l'exception de la plante *Anabasis articulata* (Nadia S Metwally et coll., 2012). Alors, la mise en évidence des principes actifs issus du métabolisme secondaire de ces plantes devra être approfondie afin de permettre d'isoler et de caractériser ces principes actifs qui pourront être utilisés dans le domaine étudié.

III.2. Evaluation de l'activité antioxydante

L'un des principaux problèmes de l'industrie agro-alimentaire est d'assurer la conservation des aliments. Les phénomènes d'oxydation sont notamment redoutés. En effet, au niveau des lipides, les dégradations oxydantes conduisent à une perte en vitamines, une diminution de la valeur nutritionnelle (acides gras essentiels), une détérioration du goût (composés volatils à flaveur caractéristique, rancissement) et même parfois à l'apparition de substances toxiques (*Michael Antolovich et coll., 2001*).

La dégradation des composés organiques sous l'action de l'oxygène de l'air est un processus d'oxydation important. Dans le cas des huiles et graisses, l'oxydation se déclenche au niveau des doubles liaisons des composés lipidiques (*Michael Antolovich et coll., 2001*).

La première étude sur l'oxydation des oléfines a été abordée vers 1949 par Bolland, puis par Bateman vers 1954 (*Juitta Bogdan Z. et coll., 2012*). Deux mécanismes sont possibles pour définir les réactions non enzymatiques entre l'oxygène et les acides gras insaturés. Il s'agit de l'auto-oxydation et de l'oxydation photosensibilisée qui nécessite l'intervention d'un photo-initiateur qui est souvent une molécule biologique (*Michael Antolovich et coll., 2001*).

Pour la commercialisation d'une huile végétale, sa durée de vie est essentielle pour déterminer un écart de temps séparant la production et la consommation. Pour protéger le consommateur, la législation exige, plusieurs paramètres pouvant décrire l'état d'oxydation d'une huile. En effet, l'indice de peroxyde est l'un de ces paramètres, cet indice augmente progressivement avec l'oxydation primaire de l'huile jusqu'à ce que le taux de dégradation des hydroperoxydes formés dépasse la formation de nouveaux hydroperoxydes (*Juitta Bogdan Z. et coll., 2012*).

Dans notre étude, nous avons choisi la méthode à l'iodure de potassium en utilisant le 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochlorure (AAPH) comme initiateur de l'oxydation du substrat lipidique. Cette méthode est très utilisée pour suivre la peroxydation lipidique. Elle se base sur la détermination du taux de peroxyde formé par une réaction d'oxydoréduction entre les

peroxydes formés et les ions iodures en milieu acide. Les substrats de l'oxydation utilisés dans notre travail est l'huile de tournesol. Ce choix est fixé sur le degré d'insaturation important dans l'acide linoléique qui est le composé majoritaire de l'huile de tournesol (62%) (*Aruna Prakash et coll., 2001*). Egalement et à titre de comparaison, nous avons testé 4 antioxydants de référence à savoir, la vitamine E et la vitamine C et des polyphénols de synthèse le BHT (Butylhydroxytoluène) et le BHA (Butylhydroxyanisole). Nous avons tout d'abord étudié la cinétique d'oxydation afin de déterminer le temps optimal de la réaction. Ainsi, les mesures des densités optiques des hydroperoxydes formés à partir de l'huile de tournesol en fonction du temps nous ont permis de tracer la courbe suivante (**Figure 6**) :

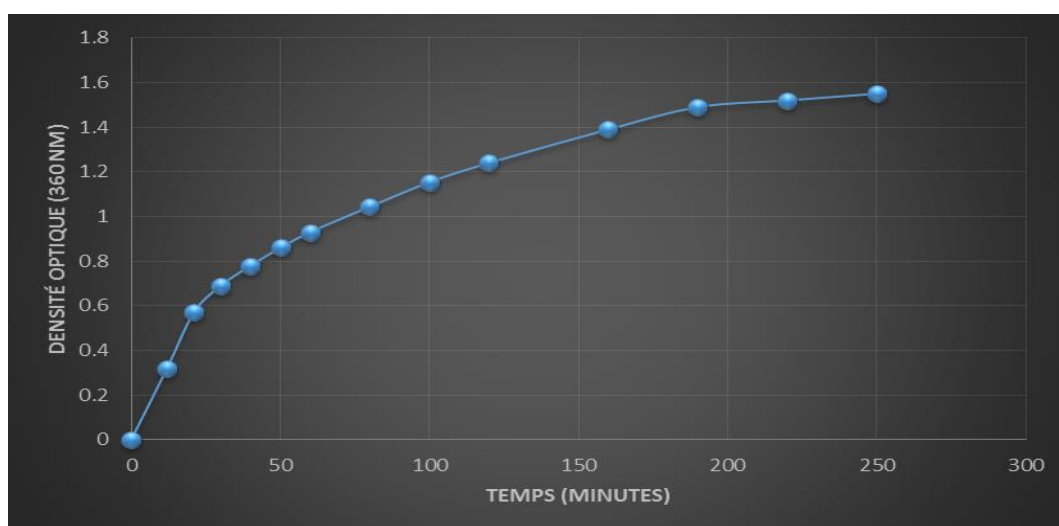


Figure 6 : Variation de la densité optique de (I_3^-) en fonction de temps

D'après une étude réalisée précédemment (*Renane Nour El Houda, 2012*), on a constaté que la cinétique de l'oxydation de l'acide linoléique est différente à celle de l'huile de tournesol. Ainsi, le temps nécessaire pour parvenir à l'oxydation totale de l'acide linoléique est très court par rapport à celui de l'oxydation de l'huile de tournesol. Cette différence, pourra être due à la présence des antioxydants dans l'huile de tournesol (*Aruna Prakash et coll., 2001*). De ce fait et après plusieurs tentatives, nous avons choisi 50 minutes pour la réaction d'oxydation de l'huile de tournesol.

Après la détermination des conditions réactionnelles notamment le temps de la peroxydation, nous avons tenté ensuite à l'étude du pourcentage d'antioxydants de nos extraits et des standards choisis. On a proposé le taux de réaction comme un paramètre pour caractériser l'activité antioxydante. Alors, l'approche la plus simple dans l'interprétation des données, est de calculer le pourcentage d'inhibition pour des concentrations égales de 0,045 g/l des extraits et des standards. Le pouvoir d'inhibition est exprimé en %, et déterminé en appliquant la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = ((A_{\text{Témoin}} - A_{\text{Echantillon}}) / A_{\text{Témoin}}) * 100$$

Où, $A_{\text{Témoin}}$ désigne l'absorbance du milieu réactionnel sans antioxydant

$A_{\text{Echantillon}}$ désigne l'absorbance du milieu réactionnel avec antioxydant

Le tableau suivant résume les valeurs de la capacité antilipoperoxydante obtenus pour nos extraits et antioxydants de référence.

Tableau 4 : Pourcentage d'inhibition de lipoperoxydation à des concentrations égales à 0.045 g/l en extraits et standards.

	Pourcentage d'inhibition (%)							
	<i>Anabasis articulata</i>		<i>Cistus villosus</i>		<i>Globularia arabica</i>		<i>Hammada elegans</i>	
	Fleurs	Tiges	Tiges	Feuilles	Tiges	Feuilles	Fleurs	Tiges
Dichlorométhane	24,44 ±1.48	24,11 ±0.25	17,60 ±2.05	9,74 ±1.68	8,24 ±1.03	4,12 ±1.10	17,31 ±2,08	0,52 ±1.68
Méthanol (fraction 1)	12,55 ±1.411	0	6,71 ±1.15	15,25 ±1.11	8,61 ±1.76	8,56 ±0.26	26,84 ±0.89	7,19 ±1.17
Méthanol (fraction 2)	13,92 ±1.67	1,42 ±0,39	21,55 ±0.78	7,86 ±0.87	6,85 ±1.07	13,27 ±1.76	12,28 ±2.08	3,61 ±0.91
	Vitamine E		Vitamine C		BHA			
	35,09±2,04		20,06±2,03		17,44±0,69			

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence. A cet effet, nous avons utilisé la vitamine E (α -tocophérol), la vitamine C et le BHA comme contrôles positifs doués des activités

antioxydantes très importantes. Ces antioxydants sont utilisés comme des agents conservateurs dans les industries agroalimentaires.

D'après les résultats obtenus, on aperçoit que les antioxydants testés découvrent des activités antioxydantes remarquables la vitamine E et la vitamine C avec des pourcentages antiliperoxydation supérieurs à 20 %. En revanche, le BHA a exposé une activité antioxydante relativement faible aux autres standards.

Dans un souci de simplicité, l'histogramme ci-après (Figure 5) montre que l'extrait méthanolique des fleurs de *Hammada elegans* a donné le taux d'inhibition le plus élevé ($26,84 \pm 0,89$ %) par rapport aux autres extraits. Egalement, on n'observe que les extraits dichlorométhanoliques d'*Anabasis articulata* et l'extrait méthanolique de *Cistus villosus* ont révélé des pourcentages d'inhibition aussi supérieurs à 20%. Cependant, les autres extraits ont donné des faibles pouvoirs antiperoxydatif (<20%). En revanche, il est clair que nos extraits ont un statut antiradicalaire comparable aux antioxydants de référence.

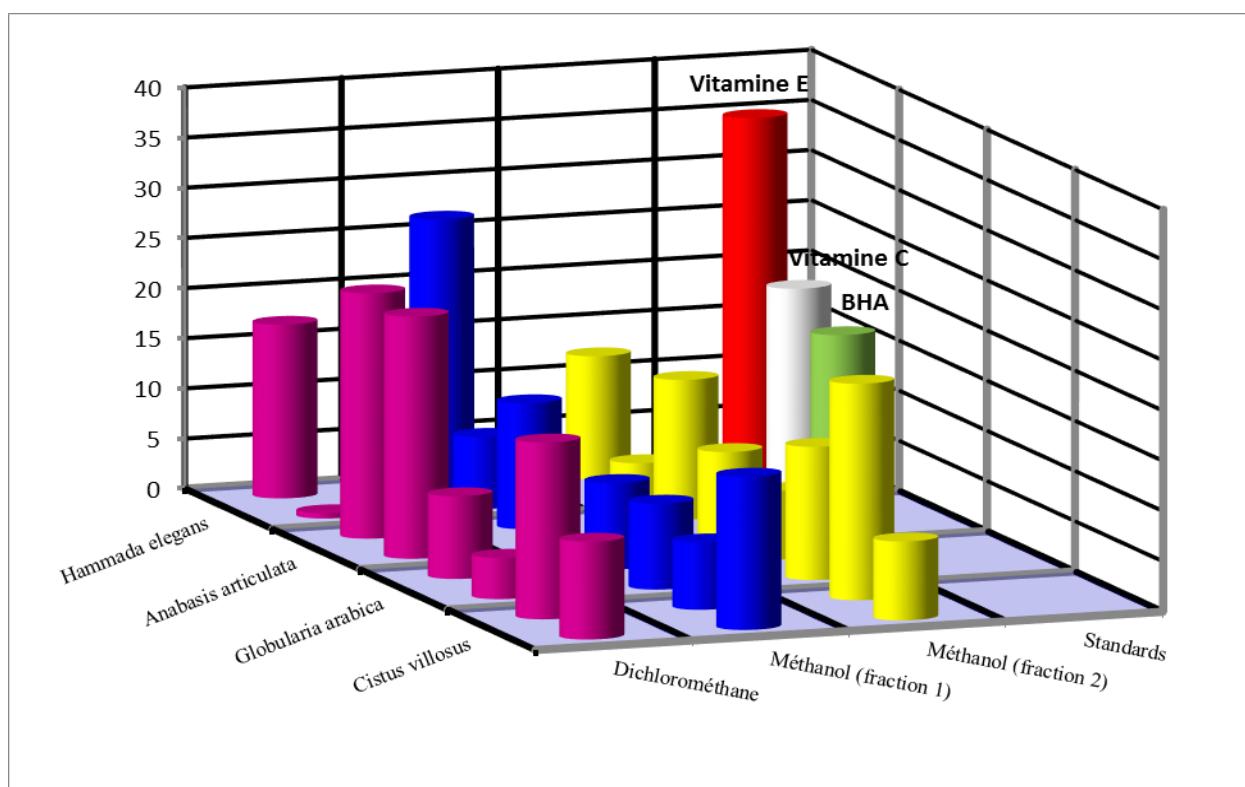


Figure 5 : Pourcentage d'inhibition de liperoxydation à des concentrations égales à 0.045 g/l en extraits et standards.

On peut remarquer aussi, que les extraits de *Hammada elegans*, d'*Anabasis articulata* et de *Cistus villosus* ont donné des capacités antilipoperoxydatives supérieures à la vitamine C et le BHA. Ainsi, leurs activités sont 1,5 fois plus grandes que le BHA.

Ainsi, nous avons constaté que les extraits qui renferment des taches de couleur bleu clair dans le milieu du chromatogramme possèdent les capacités antioxydantes les plus importantes. On pense alors, que l'activité de ces extraits pourra être due à ce composé.

La différence d'activité antioxydante observée entre nos extraits et les standards utilisés, pourra être expliquée par le fait que les antioxydants de référence ce sont des agents purs qui peuvent agir directement et avec leur concentration totale sur la réaction radicalaire. Par contre, les extraits testés ce sont des mélanges qui renferment plusieurs molécules dont certaines sont inactives et leurs pourcentages d'inhibitions ont été calculés par rapport à la concentration totale du mélange qui prend en considération toutes les substances actives et non actives.

En effet, l'huile de tournesol sans additifs (témoin) présente le plus haut indice de peroxyde. L'évolution de cet indice de l'huile contenant des antioxydants suit relativement un rythme moins accentué que celle du témoin. Ceci démontre que l'enrichissement de l'huile végétale par les polyphénols semble améliorer la stabilité oxydative de l'huile comme le prouve le test. Cette même explication a été avancée par d'autres études confirmant que les polyphénols augmentent la stabilité des huiles (*Maurizio Servili et coll., 2002*).

D'après notre étude, il paraît clairement que les polyphénols extraits de ces quatre plantes sont des antioxydants efficaces qui présentent deux avantages importants. D'une part, ces polyphénols d'origine naturelle qui sont caractérisés par une haute capacité antioxydante comparable aux antioxydants synthétiques ; et peuvent le remplacer en agroalimentaire selon une utilisation rationnelle qui n'implique pas de risques sur la santé humaine et de plus est de moindre frais. D'autre part, l'impact environnemental de ces plantes est important, ce qui mènerait à profiter de cette matière première à l'échelle industrielle en tant que source

économiquement non chère, mais riche en polyphénols. En effet, au cours de l'oxydation lipidique à 50 °C, l'huile de tournesol a acquis une meilleure résistance à l'oxydation suite à un ajout des extraits phénoliques naturels. Pour la suite de l'étude, il serait intéressant de reconduire ces essais sur d'autres huiles végétales ou animales et d'évaluer l'effet antioxydant de ces extraits phénoliques dans des conditions de stockage normales de commercialisation des huiles; ensuite les comparant à d'autres antioxydants et d'étudier leur effet synergique au cours de l'oxydation.

IV. Conclusion générale

Actuellement, plusieurs questions sont soulevées concernant la sécurité des produits chimiques synthétiques utilisés en médecine ou dans l'industrie alimentaire. En effet, les antioxydants de synthèse utilisés pour retarder l'oxydation des lipides se sont avérés responsables d'effets indésirables. Face aux limites des produits chimiques synthétiques, le développement de la recherche sur les plantes médicinales a été orienté vers l'obtention de phytomédicaments.

Notre pays est doté d'une biodiversité végétale immense, qui reste à découvrir et une grande partie de cette flore est constitué par des espèces médicinales. L'étude bibliographique réalisée sur quatre plantes appartenant à des biotopes et familles botaniques différentes, a montré que l'on ne disposait que de peu d'informations sur leurs activités antioxydantes et leurs compositions en substances phénoliques. Alors et pour pallier ce manque d'informations, ce travail a porté dans un premier temps à l'analyse quantitative d'un groupe phytochimique (polyphénols), et en second lieu la recherche d'activité antioxydante que peuvent avoir ces extraits *in vitro*.

Sur le plan phytochimique, la détermination du rendement d'extraction a montré la richesse des extraits bruts secs de toutes les espèces (12-47%) issus de l'extraction méthanolique. Tandis que, l'extraction par le dichlorométhane a permis d'obtenir des rendements faibles en extraits bruts secs (< 2%). Les résultats de l'analyse quantitative des phénols totaux montrent que tous les

espèces étudiées contiennent des teneurs variables en polyphénols allant de 0,5 à 51 mg EAG/ g de la matière sèche. Cependant, les quantités des composés phénoliques les plus importantes ont été trouvées dans les extraits méthanolique notamment, dans les espèces de *G. arabica* et *C. monspessulassus*.

L'évaluation des propriétés antioxydantes par le test chimique au Thiocyanate ferrique induit par le AAPH, révèle que l'extrait méthanolique présente une importante activité contre la peroxydation de l'huile de tournesol comparativement aux antioxydants de référence. De plus, les capacités antioxydantes révélées *in vitro* sont en relation directe avec le contenu en métabolites secondaires de chaque extrait et fraction et dépendent de l'ensemble des substances antioxydantes, de leur nature, leur quantité, leur structure et de toutes les interactions moléculaires qui peuvent agir de façon synergique pour faire hausser cette activité. Cette étude suggère que non seulement les composés phénoliques sont les substances antioxydantes par excellence mais d'autres substances non phénoliques pouvant être des antioxydants plus efficaces et plus puissants et que les espèces les plus riches en polyphénols ne sont pas pour autant de bons antioxydants.

Enfin, cette étude valide scientifiquement l'usage traditionnel de ces plantes et révèle leurs intérêts dans le cadre de l'exploitation de la flore végétale locale. Alors, les extraits naturels des espèces végétales locales étudiées peuvent être très utiles pour renforcer les systèmes technologiques industriels afin de les exploiter comme une précieuse matière première très riche en polyphénols employée à la place des antioxydants synthétiques dangereux. Par ailleurs, Il serait nécessaire d'isoler et de caractériser la ou les molécules potentiellement antioxydantes des fractions les plus actives, puis de déterminer leur toxicité sur des modèles animaux.

Références bibliographiques

Alain Hugues Olivier N'Guessan, Camille Evelyne Dago Déliko, Janat Akhanovna Mamyrbékova-Békro, Yves-Alain Békro. Teneurs en composés phénoliques de 10 plantes médicinales employées dans la tradithérapie de l'hypertension artérielle, une pathologie émergente en Côte d'Ivoire *Revue de génie industriel*. 2011, 6, 55-61.

Ani V., Varadaraj M.C., Naidu, K.A. Antioxydants and antibactérien activities of polyphenolic compounds from bitter cumin (*Cuminum nigrum* L.). *European Food Research and Technologies*. 2006, 224, 109-115.

Aruna Prakash, Fred Rigel hof and Eugene Miller, Antioxidant Activity, Medallion Labs Jonathan Devries, 2001 Chemistry, Nutrition and Biotechnology, Marcel Dekker, Inc., New York. 2002, 465-487.

Cillard J., Cillard P. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *OCL*. 2006, 13, 24-9.

Claudine Manach, Augustin Scalbert, Christine Morand, Christian Rémésy, and Liliana Jiménez. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004, 79, 727-47.

Dahle L.K., Hill E.G., Holman R.T. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters, *Arch Biochem Biophys*. 1962, 98, 253-61.

Dobarganes M.C. ET Velasco J. Interactions between fat and food during deep-frying. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 2002, 104, 420-428.

Dopico-García M.S., Valentão P., Guerra L., Andrade P.B. and Seabra R.M., Expérimental design for extraction and quantification of phenolic compounds and organic acids in white "Vinho Verde" grapes. *Analytica Chimica Acta*. 2007, 583, 15-22.

Edeas M. Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie*. 2007, 5, 264-270.

Elisa Tripoli, Maurizio La Guardia, Santo Giammanco, Danila Di Majo, Marco Giammanco. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*. 2007, 104, 466-479.

Falleh H., Ksouri R., Abdelly C. Activité antioxydante et contenu en polyphénols dans les différents organes de l'artichaut sauvage *Cynara cardunculus*. *Revue des Régions Arides*. 2006, 341-344.

Frankel E.N. Lipid oxidation, Dundee, UK: The Oily Press. 1998.

Frankel E.N., Hu M. L., Tappel AL, Rapid headspace gas chromatography of hexanal as a measure of lipid peroxidation in biological samples, *Lipids*. 1989, 24, 976-81.

- Gee J.M., Johnson IT. Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. *Curr Med Chem*. 2001, 8, 1245-1255.
- Gehin A., Guyon C., Nicod L. Glyphosate-induced antioxidant imbalance in Hacat: The protective effect of Vitamins C and E. *Environ, Toxicol, Pharmacol*. 2006, 22, 27-34.
- Gertz C., Klostermann S., & Kochhar S.P. Testing and comparing oxidative stability of vegetable oil and fats at frying temperature. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2000, 102, 543-551.
- Giorgia Spigno, Lorenza Tramelli and Dante Marco De Faveri. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*. 2007, 81, 200-208.
- Howard M., Merken and Gary R., Beecher. Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *J. Agric. Food Chem*. 2000, 48, 577-599.
- Jean-Jacques M., Anne F. et Christian J.A. Les composés phénoliques des végétaux un exemple de métabolite secondaire d'importance économique. Edition presses polytechniques et universitaire romandes. 2005.
- Juita, Bogdan Z Dlugogorski, Eric M Kennedy and John C Mackie. Low temperature oxidation of linseed oil: a review. Juita et al. *Fire Science Reviews*. 2012, 1,3. Encyclopédie agricole, le tournesol, Semences Cargill, édition de la nouvelle librairie département spécialisée du groupe Larousse Nathan .1987.
- Kuypers F.A., Van Den Berg Jjm, Schalkwijk C., Roelofsen B., op den Kamp Jaf, Parinaric acid as a sensitive fluorescent probe for the determination of lipid peroxidation, *Biochim Biophys Acta*. 1987, 921, 266-74.
- Lahouel M. Interaction flavonoïdes-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux, Thèse de doctorat de l'université Mentouri de Constantine. 2005.
- Maurizio Servili, Gianfrancesco Montedoro *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 2002, 104, 602–613.
- Michael Antolovich, Paul D. Prenzler, Emilios Patsalides, Suzanne McDonald and Kevin Robards, Methods for testing antioxidant activity, School of Science and Technology, Charles Sturt University, Locked Bag 588, Wagga Wagga 2678, Australia. 23 November 2001.
- Mickaël Laguerre, Luis Javier Lopez-Giraldo, Jérôme Lecomte, Michel Pina, Pierre Villeneuve, Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante, *ocl*. Septembre. octobre 2007, 14 (5).
- Middleton E., et al, The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*. 2000, 52(4), 673-751.

Nadia S., Metwally, Azza M Mohamed and Fatma S., ELSharabasy. Chemical constituents of the Egyptian Plant *Anabasis articulata* (Forssk) Moq and its antidiabetic effects on rats with streptozotocin-induced diabetic hepatopathy. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2012,02 (04), 54-65.

Paul Schauenburg. *Guide des plantes médicinales analyse, description et utilisation de 400 plantes*, Ferdinand paris, édition de la chaix et miestlé. 2007.

Peng C., Chen S., Lin F., & Lin Z., Detection of antioxidative capacity in plants by scavenging organic free radical DPPH, *Progress in Biochemistry and Biophysics*. 2000, 27(6), 57-61.

Pryor W. A., Cornicelli J. A., Devall L. J., et AL. a rapid screening test to determine the antioxidant potencies of natural and synthetic antioxidants *J Org Chem*. 1993, 58, 3521-32.

Renane Nour El Houada. Effet des extraits naturels de *Hammada elegans* sur la peroxydation lipidique. Mémoire de Master. Université de Laghouat. 2012.

Roginsky V., Barsukova T. Chain-breaking antioxidant capability of some beverages as determined by the Clark electrode technique, *J Med Food*. 2001, 4, 219-29.

Romani, Pinelli A. Mulinacci P. Vincieri N. F.F et Tattini M, Identification and quantification of polyphenols in Leaves of *Myrtus communis* L., *Chromatographia*. 1993, 49(1-2), 17-20.

Shahidi F. ET U.N. Wanasundara, in C.C. Akoh and D. B. Min, eds, *Food Lipids*:

Silva E.M., Rogez H. and Larondelle Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology *Separation and Purification Technology*. 2007, 55 (3-1), 381- 387.

SreeLatha R.K., Devi P. Sreenivasulu and SKM Basha. Antioxidant activity and total polyphenols content of certain high valued medicinal plants of Tirumala hills, Andhra Pradesh. *Indian Journal of Plant Sciences*. 2013, 2 (1), 93-98.

Wang J., Miyazawa T., Fujimoto K. Inhibition of methyl linoleate peroxidation by maize zein in powder model system at high water activity. *Agric Biol Chem*. 1991, 55, 1531-6.

Warner K. Chemistry of frying fats. In: Akoh C. and Min D.B. (Eds), *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. New York: Marcel Dekker. 2002, 167-180.

Zhiri A., Baudoux D. Huiles essentielles chémotypes et leurs synergies. Edition Inspir développement S.A. 2005.

Øyvind M. Andersen and Kenneth R. Markham. *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. CRC Press Taylor & Francis Group. 2006.