

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 عمار تليجي بالاغواط

UNIVERSITE AMAR TELIDJI, LAGHOUAT



كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم علوم المادة

Département des Science de la Matière

Mémoire de MASTER

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

Présenté par

DJANI Yamina

Thème

Valorisation des extraits des galles du *P.atlantica* par l'étude de leurs activités antioxydante

Soutenu Publiquement devant la commission d'examen composée de:

| | | |
|--------------------------------------|-------------|-----------|
| Mr. GHERIB Abdel Aziz | Grade M.C.A | Président |
| M ^{me} . HAMDI Fatima Zohra | Grade M.A.A | Examineur |
| M ^{me} . BOUZIYANE Amel | Grade M.A.A | Examineur |
| Mr. BENAHMED Ziyad | Grade M.A.A | Encadreur |

Promotion 2015/2016

ملخص

Pistacia atlantica Desf. (Anacardiaceae) هي شجرة منتشرة على نطاق واسع في جنوب غرب آسيا وشمال شرق إفريقيا ، تستعمل في عدة مجالات خاصة في الطب التقليدي، لذلك كان الهدف من هذه الدراسة هو تحديد كمية البوليفينول (TPC) والفلافونويد (FC) المستخلصة من galls de *P. atlantica* لعينات ذكرية وأنثوية من منطقة الأغواط. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة بطريقتين DPPH وFC في العينة المقترحة وتم مناقشتها لأجل التزود بمبادئ علمية في حالة الإستعمال الأمثل galls de *Pistacia atlantica* كما أن كمية البوليفينول (TPC) والفلافونويد (FC) قيست بواسطة جهاز المطيافية ، وأثبتت النتائج بأن الديكلوروميثان مصدر غني بالبوليفينول حيث تراوحت قيم TPC بين 24.55±2AGE / g de la matière sèche و 26±2.84 للديكلوروميثان و أسيتات الإيثيل على التوالي . أما FC فتغيرت بين 0.11 ±0.036 mgEQ/gMS و 0.154±0.002 بالنسبة لأسيتات الإيثيل و الديكلوروميثان على التوالي. النشاط المضاد للأكسدة المحسوبة بطريقة DPPH وإرجاع الحديد مكنت من تحديد قيمتي DPPH التي تتراوح بين 492 و 554 EAA/g de MS أما إرجاع الحديد الثلاثي المحسوب بطريقة PFC فكانت بين 79 و 113 EAA/g de MS.

الكلمات المفتاحية : *Pistacia atlantica* ، مركبات البوليفينول ، مركبات الفلافونويد ، النشاط المضاد للأكسدة .

Résumé

Pistacia atlantica Desf. (Anacardiaceae), un arbre qui est largement distribué dans le sud-ouest de l'Asie et du nord-ouest de l'Afrique, a été traditionnellement utilisé à des fins culinaires et médicinales. Par conséquent, le but de cette étude était de quantifier phénolique total (PTC) et flavonoïde (FC) dans des extraits de galls de *P. atlantica*. Des échantillons ont été prélevés à partir de plantes mâles et femelles de la région de Laghouat. Activité antioxydante a été évaluée par le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) et le ferricyanure de potassium (PFC). Les relations entre les activités et le contenu du TPC, FC mesurées dans les échantillons de galls antioxydants, sont discutés dans le but de fournir une base scientifique pour une utilisation optimale de galls du *P. atlantica*. Contenu de composés phénoliques totaux (PTC) et les flavonoïdes (FC) ont été déterminés par spectrophotométrie. Les galls *P. atlantica* de dichlorométhane a montré à être une source riche en composés phénoliques, comme PTC allait de 26,23 ± 2,84 et 24,55 ± 2 GAE / g de matière sèches pour le dichlorométhane et de l'acétate éthyle, respectivement. FC varie entre 0,154 ± 0,022 et 0,11±0,036 mg QE/ g de matière sèches, l'acétate d'éthyle et du dichlorométhane, respectivement. L'activité antioxydante a été mesurée en utilisant la méthode DPPH (2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyle), et la méthode de réduction du ferricyanure de potassium (PFC). L'activité de piégeage des radicaux DPPH (RSA) a varié de 492 à 554 mg AAE/g de matière sèche. La capacité de réduction, évaluée par la méthode de PFC, variait de 79 à 113 mg AAE / g de matière sèche de galls.

Mots-clés: *Pistacia atlantica*, composés phénoliques, composés flavonoïde, l'activité antioxydante.

Abstract

Pistacia atlantica Desf. (Anacardiaceae), a tree that is widely distributed in south-west Asia and north-west Africa, has been traditionally used for culinary and medicinal purposes. Hence, the aim of this study was to quantify total phenolic (TPC) and flavonoid (FC) in extracts from galls of *P. atlantica*. Samples were collected from male and female plants from Laghouat region. Antioxidant activity was evaluated by the DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and potassium ferricyanide (PFC) methods. The relationships between antioxidant activities and contents of TPC, FC measured in the galls samples, are discussed in order to provide a scientific basis for an optimal usage of *P. atlantica* leaves. Contents of total phenolics (TPC) and flavonoids (FC) were determined spectrophotometrically. *P. atlantica* galls of dichloromethane showed to be a rich source in phenolic components, as TPC ranged from 26.23 ± 2.84 and 24.55 ± 2 gallic acid equivalents/g of dry leaf for dichloromethane and ethyle acetate, respectively. FC ranged between 0.154 ± 0.022 and 0.11 ± 0.036 mg quercetin equivalents/g of dry leaf, for ethyle acetate and dichloromethane, respectively. Antioxidant activity was measured using the 2, 2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method and the potassium ferricyanide (PFC) reduction method. The DPPH radical scavenging activity (RSA) varied from 492 to 554 mg ascorbic acid equivalents/g of dry leaf. The reduction capacity, assessed by PFC method, varied from 79 to 113 mg ascorbic acid equivalents/g dry leaf weight.

Keywords: *Pistacia atlantica*, phenolic compounds, flavonoid content, antioxidant activity.

*R*emerciements

Avant tout chose, nous remercions Dieu, le tout puissant, pour nous avoir donné la force ; la puissance et la volonté de terminer ce travail après une longue patience et d'effort

Il va de soi que nous remercions nos parents pour leurs patience ; écoute ; et encouragements

*Tous les sentiments de respect et de gratitude à Mr. **BENAHMED Ziyad** maitre assistant à l'université Amar Telidji Laghouat, pour son encadrement de qualité et pour nous avoir accordé sa confiance. Nous avons apprécié en vous vos critiques ; vos suggestions ont été d'un grand apport pour la réalisation de notre travail.*

*Nous adressons nos vifs remerciements à Mr **YOUSFI Mohamed** professeur à l'université Amar Telidji Laghouat.*

*Nos remerciements les membres de jury Mr. **GHERIB Abdel Aziz** et M^{me}. **HAMDI Fatima Zohra** et M^{me}. **BOUZIYANE Amel** d'avoir bien voulu accepter, de juger à ce travail.*

Nos remerciements tous les responsables de laboratoire de chimie pour l'aide précieuse et chaleureuse au sein du laboratoire ; pour les nombreux services qu'ils nous ont rendus durant la réalisation de ce travail.

Enfin, nos remerciements toutes les personnes qui, de près ou de loin, nos enseignants de notre département qui participe et/ou veille à formation

Merci

Nous aurons le destin que nous aurons mérité

Dédicace

Au tout puissant Allah

A ma précieuse mère : affable, honorable, aimable : tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cassé de m'encourager et de prier pour moi et qui a su me remontée le morale à chaque fois que j'en avais besoins et qui m'a toujours fait confiance et qui m'a appris ce diction qui m'accompagne dans tous les moments de ma vie (noire vrai gloire n'est pas jamais tomber mais de se relever à chaque fois qu'on tombe).

A mon père tous n'as jamais cessé de me prodiguer des conseils pour le droit chemin ; que ta disponibilité et tons respect pour les autres me servent d'exemple ; que Dieu le tout puissant t'accord longue vie, bonne santé et bonheur.

A mes sœurs et chez frères (Khadija, Khaoula, Lamine, Ibrahim)

A mes très chère amies Aicha et Mimouna

A la mémoire de ma grand-mère et mes grand-pères

A ma grand-mère et mes tantes (Fatima, Mbareka, Rabia, Zelika, Zohra, Mariam, Mabroka)

A mes oncles et mes cousines (Fadila, Mariam, Zineb, Habiba, Zohra, Helima, Omelkair)

A les petit (Sajida, Yenessé, Isra, Islam, Ibtihal, Anfal, Acherafe, Refida, Ahemed, Fatoma, Ferialé, salsabile, Nesserine, walide, Roia, Saleh, Faredousse)

Ames très amies : (Zineb, Soumia, Nafissa, Omo, Zelika, Djadela, Rahma, sara, Siham, Asma, Rachida)

Soyez toujours guidés par des actions lucides ; courage dans la vie et bonne chance

YAMINA

Sommaire

| | |
|--|-----|
| Liste des abréviations | I |
| Liste des tableaux | II |
| Liste des figures | III |
| Introduction | 1 |
| Chapitre I : Synthèse Bibliographique | |
| I.Etude des plantes médicinales | 3 |
| I.1. Historique | 3 |
| I.2. plante médicinale | 3 |
| I.3. Notion sur la plante étudiée | 4 |
| I.3.1. Présentation de <i>Pistacia atlantica</i> | 4 |
| 1.3.2. Position systématique | 4 |
| I.3.3. Propriétés de l'arbre | 5 |
| I.3.4. Propriétés et usages thérapeutiques... .. | 6 |
| I.3.5. Travaux antérieurs | 6 |
| II. Les composés phénolique..... | 6 |
| II.1. Généralités | 6 |
| II.1.1. Les différentes classes de composés phénoliques | 8 |
| II.1.2. Classification des polyphénols | 8 |
| II.1.2.1. Les non flavonoïdes..... | 8 |
| II.1.2.1.1. Acides phénoliques | 8 |
| II.1.2.1.1.1 Acides hydroxybenzoïques C ₆ -C ₁ | 9 |
| II.1.2.1.1.2. Acides hydroxycinnamiques C ₆ -C ₃ | 10 |
| II.1.2.1.1.2. Stilbènes C ₆ -C ₂ -C ₆ | 11 |
| II.1.2.1.1.3. Coumarines C ₆ -C ₃ | 11 |
| II.1.2.2. Les flavonoïdes | 12 |
| II.1.2.2.1. Définition..... | 12 |
| II.1.2.2.2. Structure | 13 |
| II.1.2.2.3. Distribution et classification | 13 |
| II.1.2.2.4. Propriétés biologiques et pharmacologiques des flavonoïdes. | 15 |

Sommaire

| | |
|---|----|
| II.1.2.3.Tannins | 15 |
| II.1.2.3.1.Tannins hydrolysable | 15 |
| II.1.2.3.1.Tannins condensés ou tannins catechiques ou proanthocyanidols..... | 15 |
| III. Les antioxydants..... | 16 |
| III.1. Radicaux libres | 16 |
| III.2.Origine des radicaux libres | 16 |
| III.3. Principaux radicaux libres..... | 17 |
| III.4. Production des radicaux libres | 18 |
| III.4.1. Production endogène | 18 |
| III.4.2. Production exogène | 19 |
| III.5.Définition du stress oxydant | 20 |
| III.6.Antioxydants et systèmes de défense | 20 |
| III.6.1. Antioxydants enzymatiques | 21 |
| III.6.2.Antioxydants non enzymatiques..... | 22 |
| III.6.3.Antioxydants synthétiser..... | 24 |

Référence bibliographique

Chapitre II : Matériels et Méthodes

| | |
|--|----|
| I. Matériel..... | 25 |
| I.1.Appareils et Produits | 25 |
| I.2. Matériel végétal..... | 27 |
| I.2.1.Récolte de l'échantillon | 27 |
| I.2.2.Séchage et conservation. . . | 27 |
| II. Méthode d'extraction | 27 |
| II.1.Extraction des composés phénoliques | 27 |
| II.2.Analyses quantitative des composés phénoliques..... | 28 |
| II.2.1.Dosage des phénols totaux..... | 28 |
| II.2.2 .Dosage des flavonoïdes | 29 |
| II.3.Analyse des extraits par Chromatographie en Phase Liquide Ultra haute Performance (UPLC) | 30 |
| II.4.Evaluation de pouvoir antioxydant | 31 |
| II.4.1.Méthode de radical DPPH..... | 31 |
| II.4.2.Le pouvoir réducteur des composés phénoliques (Reducing Power Assay) | 32 |

Référence bibliographique

Sommaire

Chapitre III : Résultat et Discussion

| | |
|--|----|
| I. Extraction des composés phénoliques | 33 |
| I.1. Dosage des composés phénoliques totaux..... | 33 |
| I.2. Teneur en composés phénoliques totaux | 33 |
| I.3. Dosage des flavonoïdes... .. | 35 |
| I.3.1. Principe..... | 35 |
| I.3.2. Teneur en composés flavonoidique totaux | 35 |
| II. Analyse par Chromatographie Liquide Ultra Performance (UPLC)... | 38 |
| III. Résultats de l'étude du pouvoir antioxydant | 42 |
| Activité anti-oxydante..... | 42 |
| III.1. Piégeage du radical libre DPPH. (2,2-diphenyl 1-picrylhydrazyl) | 42 |
| III.2. Hexacyanoferrate(III) | 44 |
| Conclusion et perspective..... | 48 |
| Référence bibliographique | |

Liste des abréviations

A : Absorption.

ADN : Acide ribonucléique

AAEAC : Ascorbic Acid Equivalent Antioxydant Capacity

DAD : Barrette de diodes

DO : Densité optique

DPPH : 1,1-diphényle-2-picrylhydrazyl.

g: gramme.

EAG/g.MS : Equivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche

ERO : Espèces réactives de l'oxygène ou oxygénées

GAE : Gallic acid equivalent

mg/ml : milligramme par millilitre.

ml: millilitre.

min : minute.

Mm : millimolaire

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit

nm : nanomètre.

NO[•] : monoxyde d'azote

O₂^{•-} : anion superoxyde

[•]O₂ : oxygène singulet

OH : groupe hydroxyle

[•]OH : radical hydroxyle

ONOOH : nitroperoxyde

ROO[•] : radical peroxyde

ROOH : peroxydes organiques

SOD : Superoxyde Dismutases

TCA : Acide trichlorure acétique.

Tr : temps de rétention

µl: microlitre.

UV: Ultra-violet.

UPLC : Chromatographie en Phase Liquide Ultra haute Performance

AAEAC : Ascorbic acid Equivalent Antioxydant Capacity

v/v : volume par volume

°C : degré.

Liste des abréviations

% : pourcentage.

λ **max** : longueur d'onde.

Liste des tableaux

| Tableau | Titre de tableau | page |
|----------------|--|-------------|
| I.1 | Distribution alimentaire des principales classes des flavonoïdes | 14 |
| I.2 | Liste des principaux radicaux libres | 18 |
| I.3 | Principaux antioxydants non enzymatique et sources alimentaires associées. | 19 |
| II.4 | Les produits chimiques et les réactifs | 25 |
| II.5 | Appareils et instruments | 26 |
| II.6 | Conditions du gradient d'analyse UPLC | 30 |
| II.7 | Caractéristique organoleptique des galles de <i>Pistacia atlantica</i> | 33 |
| III.8 | La teneur et le taux des flavonoïdes des galles de <i>Pistacia atlantica</i> dans les deux fractions | 36 |
| III.9 | Les composés de l'acétate d'éthyle identifié par UPLC | 40 |
| III.10 | Les composés de dichlorométhane identifié par UPLC | 41 |
| III.11 | Les valeurs de AAEAC des extraits qui déterminées par le test de DPPH | 43 |
| III.12 | Les valeurs de AAEAC des extraits qui déterminée par la méthode de hexacyanoferrate | 45 |

Liste des figures

| Figure | Titre de figure | Page |
|---------------|--|-------------|
| I.1 | Quelques exemples des acides hydroxybenzoïques. | 9 |
| I.2 | Quelques exemples des acides hydroxycinnamiques | 10 |
| I.3 | Quelques exemples des structures chimiques des stilbènes. | 11 |
| I.4 | Quelques exemples des structures chimiques des coumarines. | 12 |
| I.5 | Squelette de base des flavonoïdes | 13 |
| I.6 | Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B) | 15 |
| I.7 | Structure chimique des tanins condensés | 16 |
| I.8 | Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie | 17 |
| I.9 | Action des antioxydants au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène | 21 |
| I.10 | La structure de l'acide ascorbique | 23 |
| I.11 | Structure des tocophérols | 23 |
| II.12 | Structure de l'acide gallique | 28 |
| II.13 | Structure du quercétine | 29 |
| II.14 | Réduction du radical libre DPPH [*] | 31 |
| III.15 | Courbe d'étalonnage de l'acide gallique | 33 |
| III.16 | Quantité des phénols totaux dans les deux fractions | 34 |
| III.17 | Courbe d'étalonnage de quercétine | 36 |
| III.18 | Comparaison du contenu en composés phénoliques et en flavonoïdes des fractions | 37 |
| III.19 | Chromatogramme d'UPLC de l'extrait de l'acétate d'éthyle enregistré à 254 nm | 38 |
| III.20 | Chromatogramme d'UPLC de l'extrait de dichlorométhane enregistré à 254 nm | 39 |
| III.21 | Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour le DPPH | 43 |
| III.22 | Les valeurs obtenues d'AAEAC dans les deux fractions | 43 |
| III.23 | Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique | 45 |
| III.24 | Principaux éléments de l'activité antioxydant des flavonoïdes | 46 |

Introduction

Introduction

Depuis la nuit des temps, les hommes se sont soignés avec les plantes qu'ils avaient à leur disposition contre les maladies bénignes, rhume ou toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria. Ni le hasard, ni la religion et ni la superstition qui a guidé la médecine traditionnelle à employer une plante plutôt qu'une autre. Certainement, c'est l'expérience où les gens apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes (Iserin) [1].

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes (Iserin) [1]. Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours aux propriétés curatives des plantes et que les traitements à base de ces dernières reviennent au premier lieu car l'efficacité des médicaments décroît vue leurs effets secondaires sur la santé publique.

Actuellement, la société scientifique, biologiste et chimiste, met en évidence le rôle tragique du processus oxydatif incontrôlable induit par les espèces réactives oxygénées. Ces oxydants sont à l'origine directe de différents états pathologiques tels que le vieillissement et le cancer et indirecte sur la peroxydation des lipides des denrées alimentaires. Quel que soit le cas, le risque est aggravé avec l'accumulation de ces molécules dans l'organisme en aboutissant à une chaîne réactionnelle radicalaire qui dégrade les molécules vitales biologiques à savoir l'ADN, les lipides, les protéines et les glucides. En appuyant sur cette vision, un renouveau de la phytothérapie vers cette vague verte qui produit une foule des antioxydants à fin de contrer et piéger ces oxydants. [2]

L'Algérie dispose d'un ensemble d'espèces végétales naturelles et cultivées à gamme importante et variée. Cette richesse naturelle reste insuffisamment connue. Une bonne partie des ressources végétales à intérêt économique, social et sanitaire n'est pas connu du grand public.

Le Pistachier de l'Atlas est l'une des plantes médicinales les plus utilisées au niveau locale. Les extraits des galles de cette plante sont largement utilisés dans la médecine traditionnelle pour ses vertus thérapeutique. Les galles sont des excroissances apparaissant sur diverses parties d'une plante (les tiges, les feuilles, les fleurs, les fruits), généralement provoquée par un insecte ou parfois par un parasite végétal. Chaque fleur ainsi habitée par une larve donne une petite galle arrondie.

Introduction

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous avons commencé par une étude bibliographique sur la description (les caractères botaniques et la systématique) des galles de *P.atlantica*, et quelques travaux antérieurs réalisés sur la plante et une étude sur les composés phénoliques, et flavonoidique et l'activité antioxydante.

Dans le deuxième chapitre, nous avons envisagé la partie expérimentale à savoir les matériels et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail : l'extraction et la quantification des composés phénoliques et flavonoidique, l'analyse quantitative et qualitative par UPLC puis l'évaluation de pouvoir antioxydant de ces galles par deux méthodes : DPPH, la réduction de fer.

Enfin, dans le troisième chapitre, nous avons rapporté les résultats obtenus: les teneurs des composés phénoliques et flavonoïde ensuit les résultats d'analyse par chromatographie liquide à haut performance et l'étude de l'activité antioxydante.

Chapitre I :
synthèse
bibliographique

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Etude des plantes médicinales

Au cours des dernières décennies, les recherches scientifiques les plus modernes n'ont fait que confirmer le bien fondé des vertus thérapeutiques de la plupart des plantes médicinales utilisées de façon empirique depuis des millénaires [2]. Ce savoir traditionnel ancestral transmis de génération en génération est devenu aujourd'hui une mine d'informations extrêmement précieuse pour toutes les recherches de l'industrie pharmaceutique [3].

Les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques décroît. Les bactéries et les virus se sont peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus. C'est pourquoi on utilise à nouveau l'Artemisia chinoise (*Artemisia Annua*) et surtout son principe actif pour soigner la malaria lorsque les protozoaires responsables de la maladie résistent aux médicaments [1].

I.1. Historique

Depuis les temps les plus reculés, la préoccupation de l'homme a été la satisfaction de ces besoins alimentaires, il a développé ainsi une intimité avec le milieu qui l'entourait. Pour se soigner, il apprit à ses dépens à discerner les ressources végétales, animales nécessaires à sa survie. Les animaux sont les premiers utilisateurs des plantes thérapeutiques [4]. C'est seulement à partir de 4000 ans avant Jésus Christ que l'on retrouve des documents écrits ou mentionnés des drogues comme l'opium, la jusquiame, etc. Tandis que les civilisations babyloniennes, sumériennes et égyptiennes accumulent les connaissances empiriques concernant les plantes médicinales, les arbres diffusent ce savoir autour du bassin méditerranéen [5].

Au cours des dernières années, plusieurs raisons ont mené au rétablissement de l'usage des plantes médicinales en Amérique du Nord. Elles sont d'abord d'un coût inférieur aux médicaments de synthèse, puis elles arrivent à un moment où le public est désillusionné devant la médecine moderne [4].

I.2. Plante médicinale

On appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies. Certaines plantes contenant toute une gamme de matières efficaces, peuvent avoir des actions très différentes suivant leur mode de préparation [6].

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Depuis toujours les plantes ont constitué la source majeure de médicaments grâce à la richesse de ce qu'on appelle le métabolisme secondaire. Entre 20 000 et 25 000 plantes sont utilisées dans la pharmacopée humaine. 75% des médicaments ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins une plante ou une molécule active d'origine végétale [7].

Cependant, l'homme n'a découvert les vertus bénéfiques des plantes que par une approche progressive, facilitée par l'organisation des rapports sociaux, en particulier à partir du néolithique [8]. Certaines plantes sont inoffensives, mais d'autres, dite nombreuses (digitale, belladone, colchique, etc.), sont toxiques et ne sont utilisées que sous des formes bien contrôlées, exclusivement commercialisées en pharmacie. L'emploi inconsidéré de plantes cueillies dans la nature peut aboutir à des intoxications graves, voir mortelles [5].

I.3. Notion sur la plante étudiée

I.3.1. Présentation de *Pistacia atlantica*

Le Pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica Desf*), en arbre local ; elbetoum, botma, detouma ou btouma et en berbère Igth [9].

Le nom commun de cette espèce se rapport aux montagnes d'atlas ou cette espèce se développe. Cet arbre est également connu comme le pistachier sauvage, faux Pistachier. Les fruits sont appelés Elkhodiri par les populations locales [10].

Le genre *Pistacia* est représenté en Algérie par quatre espèces, en l'occurrence *Pistacia Lentiscus*, *Pistacia Terebinthus*, *Pistacia Vera* et *Pistacia atlantica*.

Le Pistachier vrai (*Pistacia Vera*) et le pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica*) ou *bétoum* sont caractérisés du point de vue écologique par une grande tolérance aux variations climatiques, ils peuvent croître sous des tranches pluviométriques assez faibles et s'accommodent de tous les sols.

1.3.2. Position systématique

Embranchement : Phanérogames ou Spermaphytes.

Sous embranchement : Angiospermes.

Classe : Endicots.

Sous classe : Rosidées.

Catégorie : Arbre dioïque.

Ordre : Sapindales (Rutales).

Famille : Anacardiacees- Térébinthacées.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Genre Espèce : *Pistacia atlantica* Desf.

Nom commun : Pistachier

Nom latin : *Pistacia atlantica* Desf. Proche *Pistacia Vera*, *Pistacia Chinensis*.

Noms vernaculaires : betoum en arabe local et Igth en berbère

Port : arrondie à ramification étalée, jaune le rameau est rougeâtre.

Hauteur : 10 à 12 m.

Plantation : à l'automne ou au printemps.

Multipliation : par bouture.

Sol : tous mais bien drainé.

Emplacement : au soleil.

Feuillage : caduc, composé, imparipenné ; 3 à 5 folioles ovales-acuminées, tomenteux puis coriace à l'âge adulte.

Floraison : en été en panicule de petites fleurs apétales (1 à 3) et 1 à 5 sépales.

Pollinisation effectuée par le vent. Fruits récoltés en septembre-octobre.

Couleur : vert brunâtre.

Croissance : lente et ne produit qu'à partir de 5-7 ans.

Plantation : à l'automne ou au printemps.

Pays d'origine : Méditerranée orientale (Crimée, Grèce et Turquie) [11].

1.3.3. Propriétés de l'arbre

Le bétoum est un bel arbre, qui existe à l'état disséminé dans la région de Djelfa (Senalba, Ain Oussera, Messaad), Laghouat (partie sud) et Ghardaïa (dans l'oued m'zab) [9]. Il présente un intérêt particulier, parce qu'avec arganier, c'est le seul arbre qui s'accommode de l'étage climatique aride et peut vivre dans les conditions écologiques les plus sévères. En raison de sa rusticité, de la caducité qui produisent de bons sols forestiers, de sa résistance à la sécheresse et de ses faibles exigences pluviométriques. Il est très utile pour recevoir la greffe de *Pistacia vera*. Les arbres greffés sont d'une grande vigueur, très rustiques et d'une longévité remarquable [12]. Il peut y être cultivé et supporter les vents forts et les longues périodes de sécheresse. Les principaux facteurs qui contribuent à dégradation sont l'exploitation forestière.

Les incendies de forêt et l'action des animaux. En Algérie, *Pistacia atlantica* est trouvée en association avec *Zizphum lotus* qui protège ces nouvelles plantes contre les animaux et les vents violents. L'utilisation de la culture reste faible malgré son potentiel d'adaptation aux conditions arides du milieu. Les conditions climatiques de

Chapitre I : Synthèse bibliographique

plupart des régions agricoles montagneuses et semi-arides de notre pays sont favorables à son extension [13].

I.3.4. Propriétés et usages thérapeutiques

Les espèces du genre *Pistacia* occupent une place appréciable dans la médecine traditionnelle et pharmaceutique depuis l'antiquité. Elles attirent l'attention des chercheurs grâce à ces potentiels antioxydants et ces activités antimicrobienne, anti-inflammatoire, antipyrétique, antidiabétique, antiradicalaire et cytotoxique. Elles sont employées dans le traitement d'eczéma, les infections de la gorge, la lithiase rénale, l'asthme, l'estomac et comme un stimulant.

P. atlantica constitue avec *P. lentiscus* des espèces principales de la production d'oléorésine. Cette résine qui est produit par l'écorce et exsudé naturellement de façon abondante par temps chaud est utilisée comme antiseptique du système respiratoire et aussi pour d'autres usages médicaux.

I.3.5. Travaux antérieurs

L'analyse phytochimique des différentes parties de l'arbre de Pistachier de l'Atlas a été l'objet de quelques études via la composition du fruit en acides gras, en acides aminés, en éléments minéraux et le dosage quantitatif des protéines, des fibres et de l'amidon [14,15].

En outre une étude plus récente sur les extraits phénoliques de cinq différentes partie de l'arbre de *P.atlantica* à savoir les feuilles, les écorces, les gales, les fruits et la partie dégradée de l'arbre (champignon). Les résultats ont montré que les différents extraits sont riches en composés phénoliques et l'application des extraits des écorces. L'analyse de l'activité antioxydante de ces derniers et l'application des techniques spectrale ont permis de mettre en évidence de deux produits à structure phénolique responsable de cette activité [16].

II. Les composés phénoliques

II.1. Généralités

Les polyphénols ou composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement. A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolés et identifiés [17]. Selon leurs caractéristiques structurales, ils se répartissent en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle

Chapitre I : Synthèse bibliographique

aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) [18]. Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000.

Ils sont divisés en plusieurs catégories : anthocyanes, coumarines, lignanes, flavonoïdes, tannins, quinones, acides phénols, xanthones et autres phloroglucinols où les flavonoïdes représentent le groupe le plus commun et largement distribué. La grande diversité structurale des composés phénoliques rend difficile une présentation globale des méthodes qui permettent leur extraction et leur isolement, des processus mis en jeu au cours de leur biosynthèse, de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques [19].

Les polyphénols sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Les principales sources alimentaires sont les fruits et légumes, les boissons (vin rouge, thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs [20].

Les recherches des dix à quinze dernières années ont démontré que les composés phénoliques ne sont nullement des produits inertes du métabolisme. Ils subissent dans les tissus végétaux d'importantes variations quantitatives et qualitatives et interviennent dans de processus vitaux les plus divers. Le mode de leur action et sa signification physiologique ne sont pas encore toujours claires. Un rôle important est attribué aux phénols dans la résistance des plantes aux maladies, comme c'est le cas de la résistance du cotonnier à la maladie de flétrissement, la verticilliose. Le phénomène d'accumulation des substances phénoliques dans les tissus végétaux infectés ou dans les zones proximales est également observé à la suite de blessures causées par des facteurs mécaniques et dans le cas de carence en certains éléments minéraux comme l'azote et le soufre [21].

Des travaux plus anciens de Nitsch et Alibert [22, 23] ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation organogène, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation. Les polyphénols sont aussi connus pour leurs effets protecteurs contre le rayonnement UV, l'effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs et pour ces propriétés antifongique et antibactérienne. Ils interviennent dans la qualité alimentaire des fruits en déterminant la saveur, nous citons : les flavanones sont responsables de l'amertume des *Cistus* et peuvent donner naissance par transformation chimique à des

Chapitre I : Synthèse bibliographique

dihydrochalcones à saveur sucrée, les anthocyanes, composés de couleur rouge à violet, participent à la coloration des fruits mûrs et les tannins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs.

A partir des années quatre-vingt, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt des polyphénols en particulier les flavonoïdes dont les propriétés antioxydantes sont très marquées.

II.1.1. Les différentes classes de composés phénoliques

Les composés phénoliques sont une vaste classe de substances organiques cycliques très variées, d'origine secondaire qui dérivent du phénol C_6H_5OH qui est un monohydroxybenzène. Les composés phénoliques sont fort répandus dans le règne végétal : on les rencontre dans les racines, les feuilles, les fruits et l'écorce. La couleur et l'atome ou l'astringence des plantes dépendent de la concentration et des transformations des phénols. Les composés phénoliques représentent de 2 à 3 % de la matière organique des plantes et dans certains cas jusqu'à 10 % et même d'avantage. Tous les phénols, à de très rares exception (exemple : la lignine) sont des métabolites énergétiques des échanges cellulaires et interviennent activement dans différents processus : photosynthèse, respiration, croissance aux maladies infectieuses [27]. Dans la nature, ces composés sont généralement dans un état lié sous forme d'esters ou plus généralement d'hétéroside. Ils existent sous forme des polymères naturels (tanins)

II.1.2. Classification des polyphénols

Les polyphénols peuvent se regrouper en deux grands groupes : Les non flavonoïdes dont les principaux composés sont : les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les lignines et les coumarines et les flavonoïdes, dont on caractérise principalement : les flavones, flavanones, flavonols, isoflavonones, anthocyanines, proanthocyanidines et flavanols [25].

II.1.2.1. Les non flavonoïdes

II.1.2.1.1. Acides phénoliques (C_6-C_1 ou C_6-C_3)

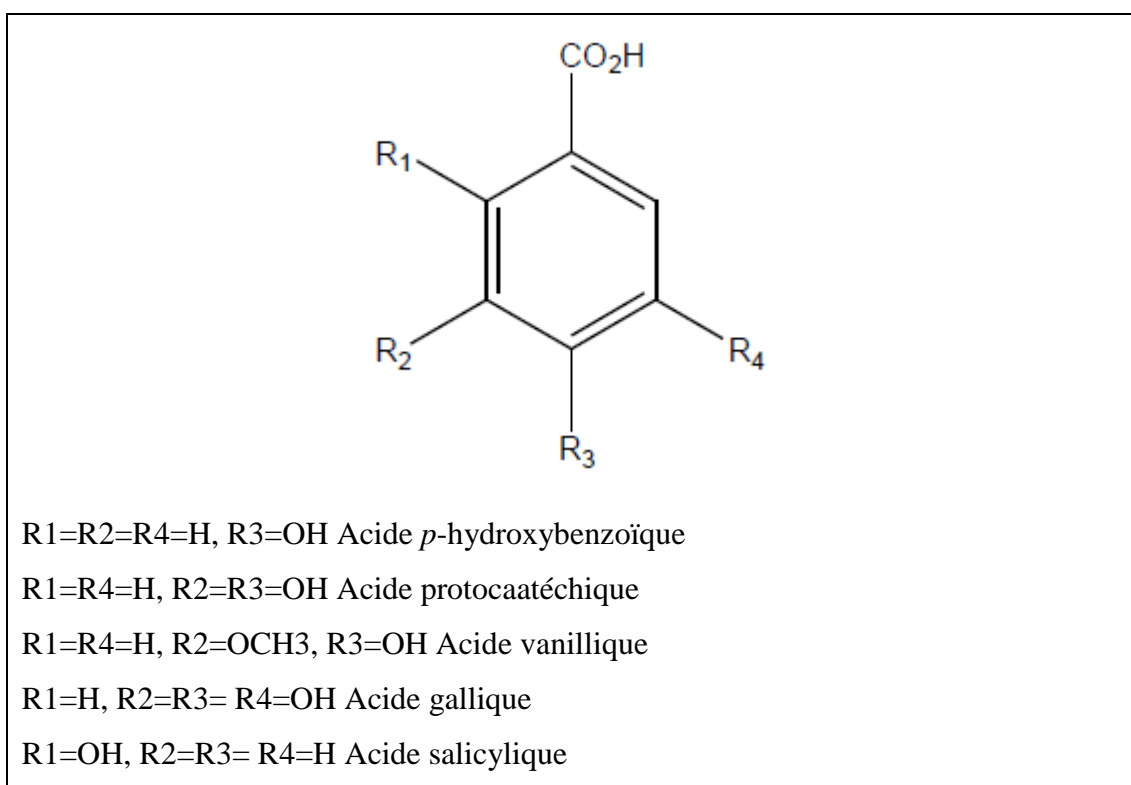
Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes distincts qui sont les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

II.1.2.1.1.1. Acides hydroxybenzoïques C₆-C₁

Les acides hydroxybenzoïques sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C₆-C₁ (Figure I.1). Ils sont particulièrement représentés chez les Gymnospermes et les Angiospermes d'où ils sont souvent libérés après hydrolyse alcaline du matériel végétal.

Les acides hydroxybenzoïques existent fréquemment sous formes d'esters ou de glycosides. Les principaux acides hydroxybenzoïques retrouvés dans les végétaux sont les acides p-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique et salicylique [26].



. **Figure I.1:** Quelques exemples des acides hydroxybenzoïques [26]

Le thé, certains fruits, les pommes de terre sont des sources importantes des acides hydroxybenzoïques. Les baies, ainsi que les fraises, peuvent en contenir plusieurs dizaines de milligrammes par kilogramme de fruit frais, principalement sous formes d'acides gallique et *p*-hydroxybenzoïque. Par ailleurs, les céréales comme le blé et l'avoine contiennent de l'acide vanillique, de l'acide salicylique et de l'acide *p*-hydroxybenzoïque. Certains condiments (herbes et épices) peuvent également contenir des acides hydroxybenzoïques [26].

Chapitre I : Synthèse bibliographique

II.1.2.1.1.2. Acides hydroxycinnamiques C₆-C₃

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base C₆-C₃ dérive de celle de l'acide cinnamique (Figure I.2). Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires sont un des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules. De plus, l'existence d'une double liaison dans la chaîne latérale conduit à deux séries isomères (*cis* ou *Z* et *trans* ou *E*) dont les propriétés biologiques peuvent être différentes. Les formes *trans* sont cependant naturellement prépondérantes et il est possible que les formes *cis* ne correspondent qu'à des artéfacts d'extraction [27].

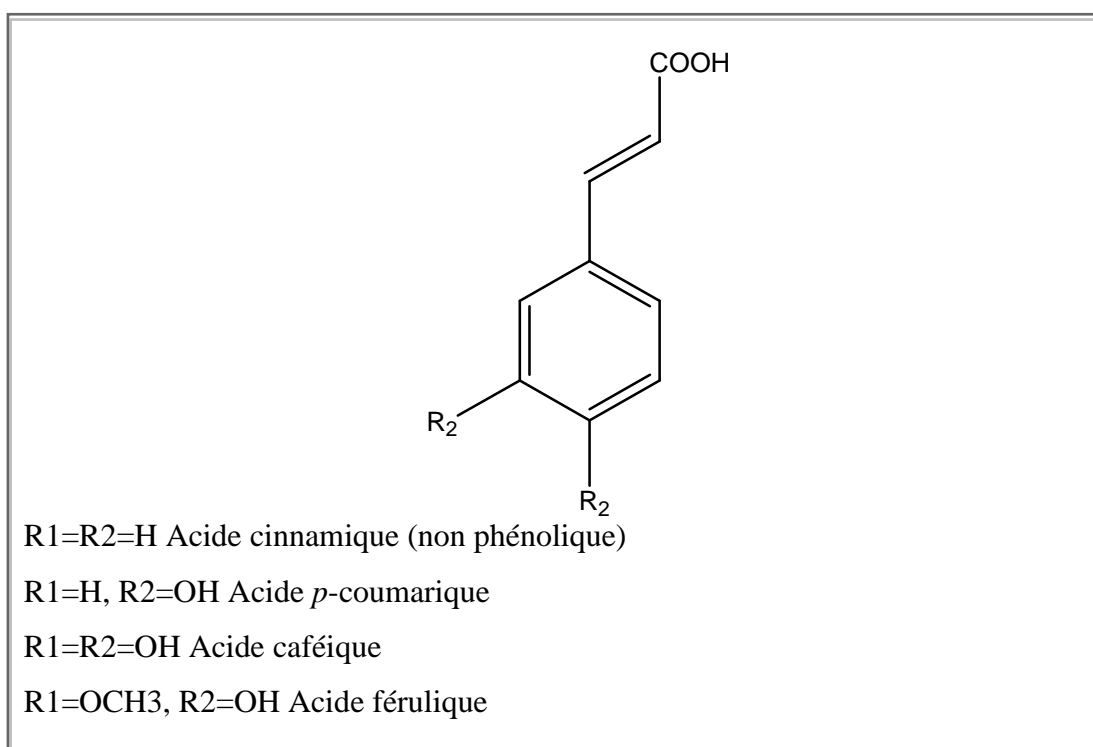


Figure I.2 : Quelques exemples des acides hydroxycinnamiques [27]

Les acides hydroxycinnamiques sont retrouvés dans toutes les parties des fruits et des légumes, quoique les concentrations les plus élevées soient observées dans la partie externe du fruit mûr. Les laitues, les carottes, les myrtilles, les patates douces (entières, cuites, et crues), les pommes de terre, les pêches, le jus d'orange, les pommes, les tomates et le raisin sont les sources les plus riches en acides hydroxycinnamiques. L'acide chlorogénique (ou acide 5-Ocaféoylquinique) est la forme combiné de l'acide caféique, il est retrouvé en forte concentration dans le café [28].

II.1.2.1.2. Stilbènes C₆-C₂-C₆

Les stilbènes présentent une structure en C₆-C₂-C₆, avec un cycle A portant deux fonctions hydroxyles en position méta et un cycle B portant des fonctions hydroxyles ou méthoxyles en méta, ortho et para (Figure I.3). Les deux noyaux aromatiques sont reliés par un double liaison, formant un système conjugué. Cette particularité leur confère une grande réactivité due à la délocalisation des électrons π sur la totalité de la molécule. Les stilbènes se trouvent en petites quantités dans l'alimentation humaine. Ils sont généralement isolés des plantes sous formes hydroxylés, méthylés, estérifiés, glycosylés ou même prenylés. Leur solubilité est négligeable dans l'eau et accrue dans la plupart des solvants organiques [29].

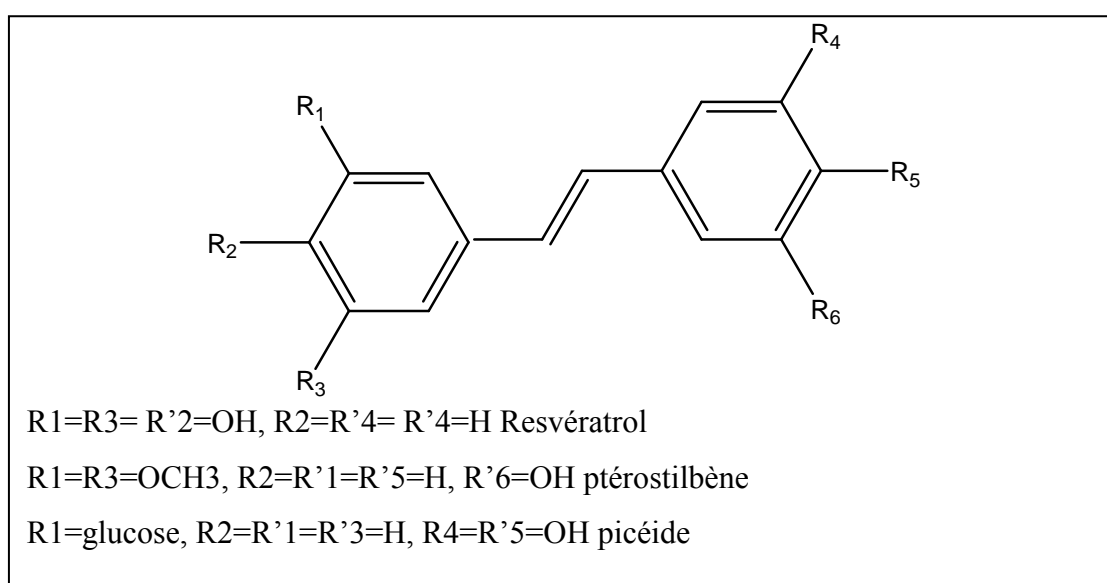


Figure I.3: Quelques exemples des structures chimiques des stilbènes. [29]

Ces composés sont présents dans de nombreuses familles de plantes supérieures mais les principales sources alimentaires sont le raisin (les graines, la peau, et les tiges) et le vin [30].

Le resvératrol ou le 3, 5,4'-trihydroxystilbène est un polyphénol non flavonoïde et appartenant à la classe des stilbènes. Il est surtout présent dans la pellicule du grain de raisin, Seul son isomère *trans* est actif. Le resvératrol possède de nombreuses propriétés biologiques ; cependant, son pouvoir anticancéreux a suscité un grand intérêt.

II.1.2.1.3. Coumarines C₆-C₃

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. Ils ont été isolés pour la première fois par Vogel en 1820 dans le

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Coumarouna odorata [31]. Ce sont des composés phénoliques cyclisés (Figure I.4) qui dérivent des acides *t*-cinnamique et *p*-coumarique pour la majorité d'entre eux. Cependant, leur voie de biosynthèse peut varier d'une espèce à l'autre. En effet, la scopolétine de tabac dérive de l'acide férulique, tandis que des expériences d'apport de précurseurs marqués semblent montrer que ce n'est pas le cas chez le tournesol.

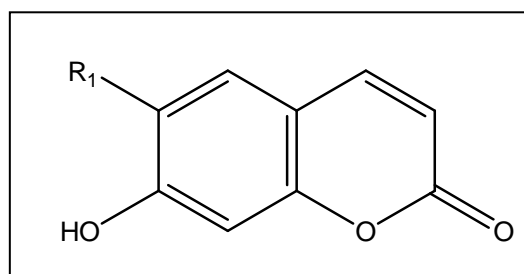


Figure I.4 : Quelques exemples des structures chimiques des coumarines. [31]

Les coumarines ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration mais aussi suivant l'espèce. Dans la cellule, les coumarines sont principalement présentes sous forme glycosylée. Cette glycosylation serait une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques des coumarines sur la cellule et la croissance. Elles sont considérées comme des phytoalexines. Celles-ci sont des molécules de faible masse moléculaire provenant de voies métaboliques variées comme celle des phénylpropanoïdes ou des sesquiterpènes [32].

II.1.2.2. Flavonoïdes

II.1.2.2.1. Définition

Le nom flavonoïde proviendrait du terme *flavedo*, désignant la couche externe des écorces d'orange, cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du *flavus* ; (*flavus*=jaune).

Les flavonoïdes ont été isolés par le scientifique Chervreul, mais ont été réellement découverts qu'en par Albert Szent-Györgyui, désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes [33].

Les travaux relatifs aux flavonoïdes sont multiples depuis la découverte du célèbre correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez les habitants des régions méditerranéennes, associant une consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées. Près de 4000 flavonoïdes ont été décrits [34].

II.1.2.2.2. Structure

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C₃ en formant ainsi l'hétérocycle (C). Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C₆-C₃-C₆, en formant une structure de type diphényle propane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule [35]

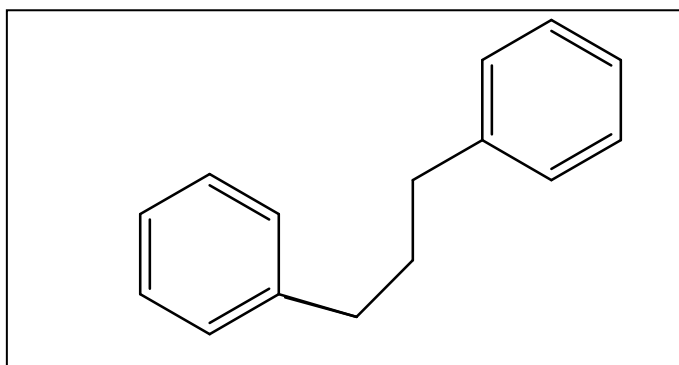


Figure I.5 : Squelette de base des flavonoïdes [36].

II.1.2.2.3. Distribution et classification

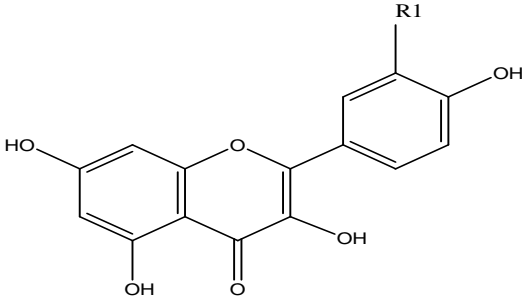
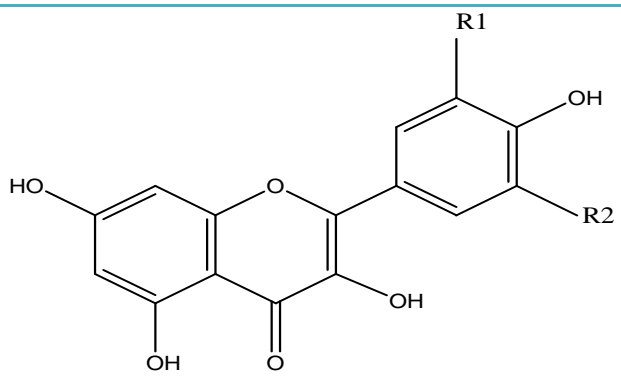
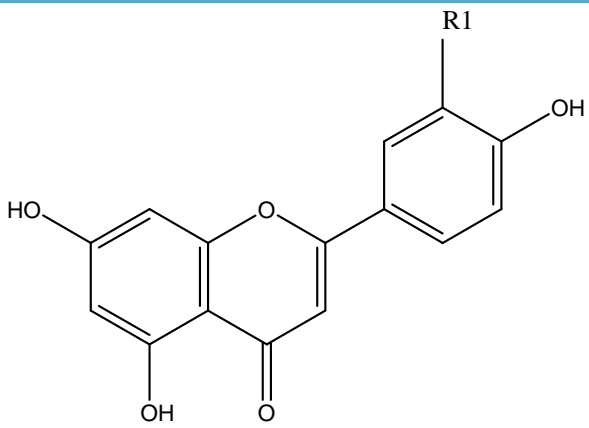
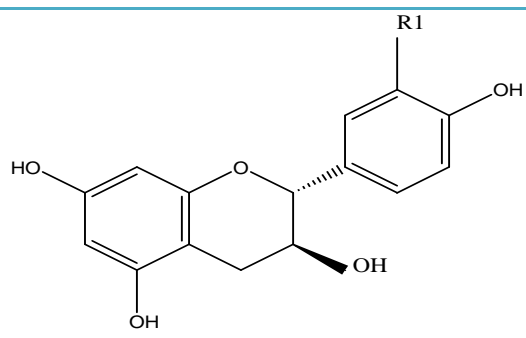
Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollens, ils peuvent aussi être rencontrés dans certains boissons et chez certains fourrages (ex: trèfle).

Certaines classes de flavonoïdes sont présentes exclusivement chez certains végétaux, on trouvera par exemple, les flavanones dans les agrumes, les isoflavones dans le soja, les anthocyanes et les flavonols ont eu une large distribution dans les fruits et les légumes tandis que les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs, sont considérés comme des pigments naturels au même titre que les chlorophylles et les caroténoïdes [37].

Le Tableau I.1 représente la distribution des principaux flavonoïdes dans certains aliments :

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Tableau I.1 : Distribution alimentaire des principales classes des flavonoïdes. [37]

| Classes | Structure chimique | Exemple |
|---------------------------------|--|---|
| Flavonols |  | R1=H Kaempférol R1=OH Quercétine R1=OCH3 Isorhamnétine |
| Flavones |  | R1=R2=H Apigénine R1= OH, R2=H Lutéoline R1=R2= OCH3 Tricine |
| Flavanons |  | R1=H Naringénine R1=OH Eriodictyol R1=OCH3 Héspératine |
| Flavan-3 ols ou flavanols |  | (+)-catéchine |

II.1.2.2.4. Propriétés biologiques et pharmacologiques des flavonoïdes

- ✓ Effets Antiallergiques
- ✓ Effets Anti-Inflammatoires
- ✓ Effets Anti-Ulcereux
- ✓ Effets Anticancereux

II.1.2.3. Tannins

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présente, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines [38, 39]. Les tannins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toutes les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines [40]. On distingue deux groupes de tannins différents par leur structure et par leur origine biogénétique :

II.1.2.3.1. Tannins hydrolysables

Qui sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins soit l'acide ellagique dans le cas des tannins classiquement dénommés ellagitannins (Figure I.6) [19].

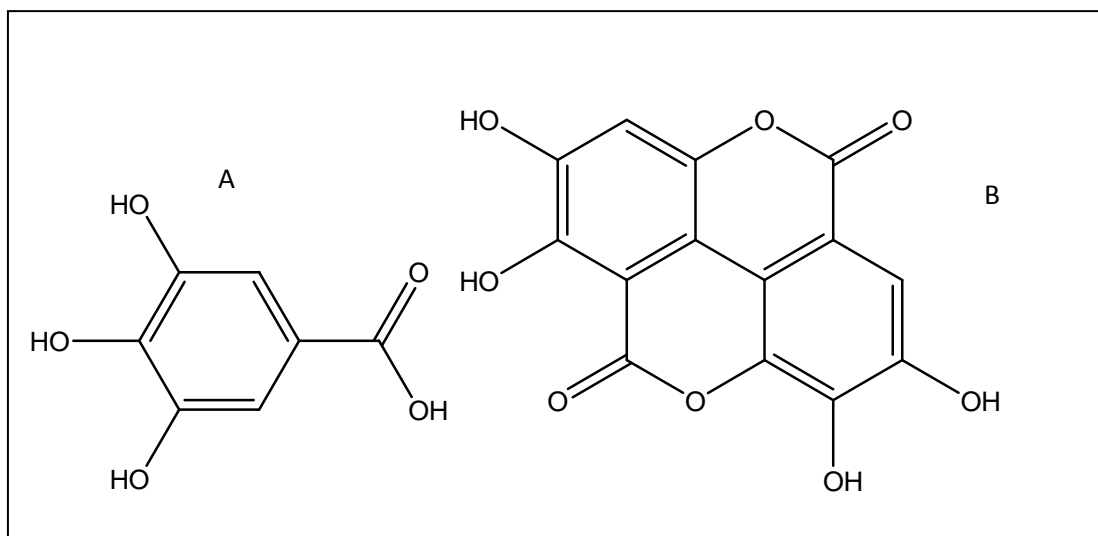


Figure I.6: Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B)

II.1.2.3.2. Tannins condensés ou tannins catechiques ou proanthocyanidols

Qui se différencient fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles

Chapitre I : Synthèse bibliographique

par des liaisons carbone-carbone. Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes végétaux, Gymnospermes et Fougères [41].

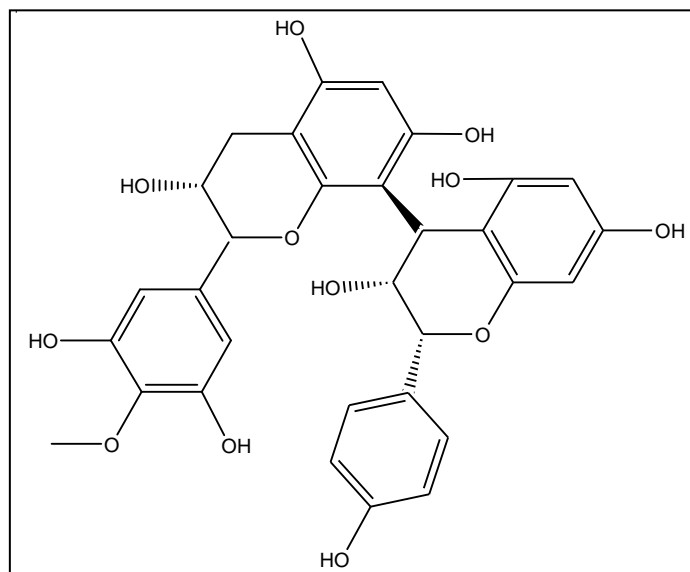


Figure I.7 : Structure chimique des tanins condensés [41]

III. Les antioxydants

III.1. Radicaux libres

Un radical est une molécule ou un fragment moléculaire qui contient un électron (ou plus) non apparié. De par sa structure particulière, il a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner sa stabilité. Plusieurs éléments peuvent être à l'origine de radicaux libres. Les sources des radicaux libres sont nombreuses [41].

III.2. Origine des radicaux libres

Ils sont produits par divers mécanismes physiologiques (Figure 8) afin de détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires) ou pour réguler des fonctions cellulaires létales telle la mort cellulaire programmée ou apoptose.

Toutefois, au contact entre l'oxygène et certaines protéines du système de la respiration, une production d'anions superoxydes se produit lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Des sources importantes de radicaux libres sont les mécanismes de cycles redox que produit dans l'organisme l'oxydation de molécules comme les quinones. Ce cycle redox a lieu soit spontanément, soit surtout lors de l'oxydation de ces composés au niveau du cytochrome. Les rayonnements UV sont capables de générer des radicaux libres et les particules inhalées (amiante, silice) sont aussi des sources de radicaux libres. L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Tableau I.2 : Liste des principaux radicaux libres [45].

| Radical | Formule |
|-----------------------|----------------|
| Anion superoxyde | $O_2^{\cdot-}$ |
| Radical hydroxyle | OH^{\cdot} |
| Radical hydroperoxyde | HO_2^{\cdot} |
| Radical peroxyde | RO_2^{\cdot} |
| Radical alcoxyde | RO^{\cdot} |
| Peroxyde d'hydrogène | H_2O_2 |
| Acide hypochloreux | $HOCl$ |
| Ozone | O_3 |
| Oxygène singulet | 1O_2 |
| Peroxynitrite | $ONOO^-$ |
| Monoxyde d'azote | NO^{\cdot} |

III.4. Production des radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être produits par notre propre organisme au cours de réactions particulières, il s'agit de la voie endogène de production de radicaux libres. Les radicaux libres peuvent également avoir une origine exogène liée à notre environnement.

III.4.1. production endogène

Le système endogène est constitué d'enzymes ou d'agents réducteurs (superoxyde dimutase, catalase, glutathion peroxydase, complexe enzymatique de la thiorédoxine) dont l'action est de neutraliser les radicaux libres oxygénés par leur transformation en molécules stables et non réactives. L'organisme possède une seconde ligne de défense (les piègeurs de radicaux libres) qui sont des composés pour la plupart apportés par l'alimentation et dont le rôle essentiel est de neutraliser les effets toxiques des radicaux libres oxygénés, limitant ainsi toute atteinte de l'intégrité cellulaire. Le Tableau I.3 reporte les principaux antioxydants non-enzymatiques retrouvés dans l'alimentation. Parmi ceux-ci, on retrouve certaines vitamines : la vitamine E (α -tocophérol), la vitamine C (ascorbique), les caroténoïdes (vitamine A et β -carotène, les flavonoïdes...). Ce Tableau I.3 montre tout l'importance d'une alimentation

Chapitre I : Synthèse bibliographique

équilibrée, riche en fruit et légumes, pour l'efficacité cellulaire de notre système antioxydant.

Tableau I.3 : Principaux antioxydants non enzymatique et sources alimentaires associées. [46]

| Principaux nutriments antioxydants | Source alimentaires |
|--|--|
| Vitamine C | Agrume, melon, brocoli, kiwi, chou, poivron |
| Vitamine E | Huile de tournesol, de soja, de maïs, beurre, œufs, noix |
| B-carotène | Légumes et fruit orange, et vert foncés |
| Sélésium | Poisson, œuf viandes, céréales, volaille |
| Zinc | Viande, pain complet, légumes verts, huitre laitiers |
| Flavonoïdes | Fruit, légumes, thé vert |
| Acide phénoliques | Céréales complètes, baies, cerises |
| Tanins | Lentilles, thé, raisins, vin |
| Métabolisme de la cystéine, glutathion | Caséine, lactalbumine (petit-lait), produits laitiers, brocoli, chou (œuf, poisson, viandes) |

III.4.2. Production exogène

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents extérieurs capables de donner naissance à des espèces oxygénées réactives [46] :

- ❖ Les rayonnements UV (par l'intermédiaire d'agents photo sensibilisants) et les radiations ionisants induisent la synthèse de radicaux libres dérivés de l'oxygène tels qu' O_2^- , OH^\bullet , $1/2O_2$ et de molécules génératrices de radicaux libres.
- ❖ L'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO₂), des toxiques présents dans notre environnement (suie, goudron, tabac, polluants industriel) sont également responsables de la synthèse de radicaux libres. Ils sont à l'origine d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) des alvéoles pulmonaires.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

- ❖ Il a aussi été montré que l'ingestion d'alcool pouvait être à l'origine de la production de radicaux libres. Ils sont produits au cours de l'oxydation de l'acétaldéhyde, principal métabolite de l'éthanol.

Enfin, certains médicaments anti-cancéreux comme les anthracyclines peuvent aussi générer des radicaux libres.

Notre organisme a donc besoin d'un équilibre nutritionnel afin de préserver un équilibre cellulaire adéquat entre les radicaux libres oxygénés et antioxydants. Cet équilibre «redox». Or, dans de nombreuses conditions (malnutrition, maladies, inflammatoires, tabagisme, stress, hypoxie, hyperoxie.....), cet équilibre ou homéostasie redox est perturbé de manière chronique. La balance entre les radicaux libres oxygénés et antioxydants est déséquilibrée, en faveur des oxydants. C'est ce que littérature définit comme le (stress oxydant).

III.5. Définition du stress oxydant

Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence et en faible quantité et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents.

Dans ces circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé stress oxydant [44].

Chaque individu ne possède pas le même potentiel antioxydant selon ses habitudes alimentaires, son mode de vie, ses caractéristiques génétiques ou l'environnement dans lequel il vit [47]. L'importance des dommages du stress oxydant dépend de la cible moléculaire, de la sévérité de l'effort et du mécanisme par lequel l'effort oxydant est imposé [48].

III.6. Antioxydants et systèmes de défense

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro- ou liposolubles. Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d'antioxydants dans tous les

Chapitre I : Synthèse bibliographique

compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires [49].

III.6.1. Antioxydants enzymatiques

Pour faire face à ces attaques, les organismes ont développé des systèmes d'action antioxydant qui visent :

1. A éliminé les espèces réactives de l'oxygène et les catalyseurs de leur formation.
2. A induire la synthèse des antioxydants.
3. A augmenté l'activité des systèmes de réparation et d'élimination des molécules endommagées.

Trois types d'enzymes antioxydantes sont mis en œuvre pour la destruction des espèces réactives de l'oxygène [50] comme illustre la Figure I.9.

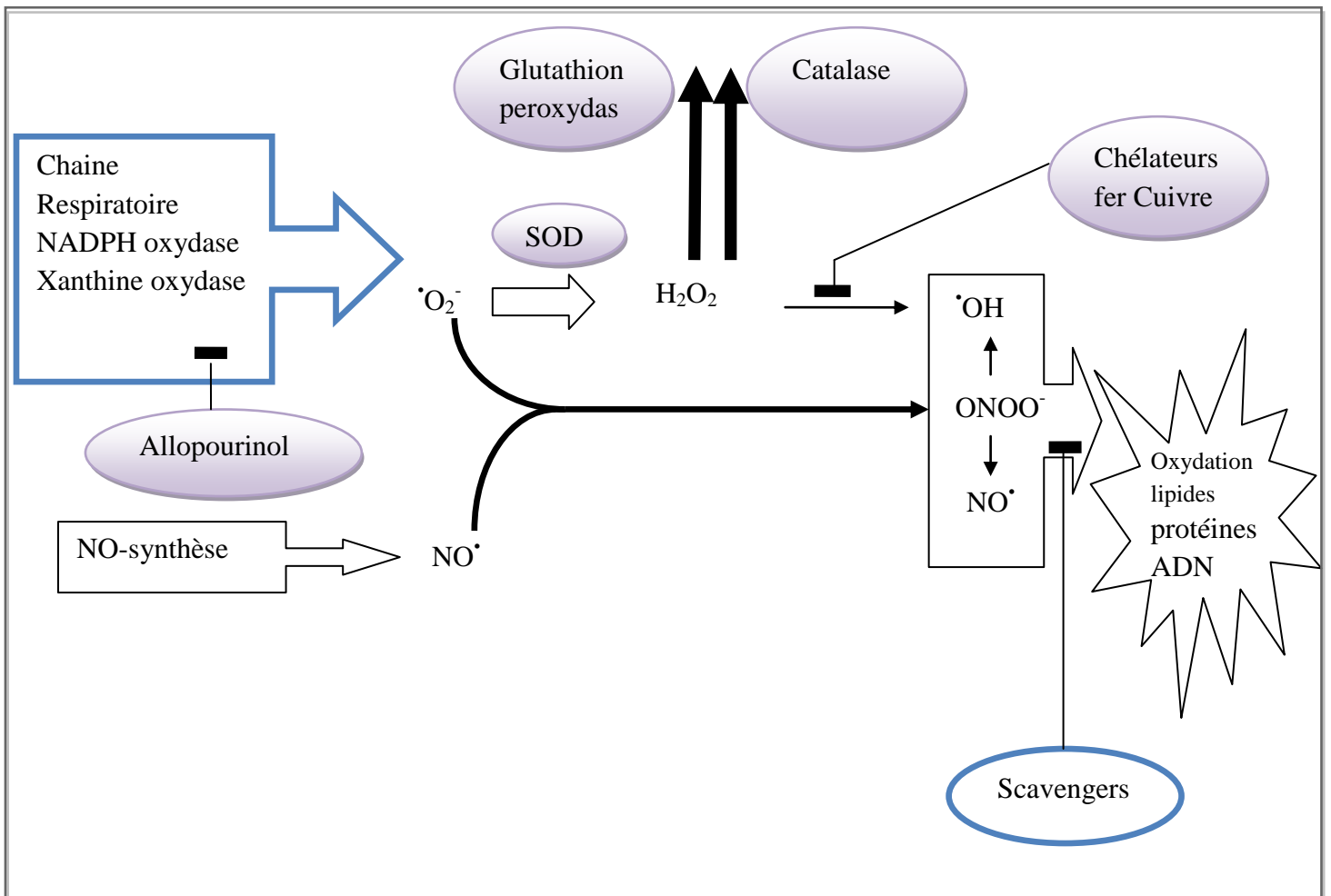


Figure I.9 : Action des antioxydants au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène. [50]

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Les superoxydes dismutases (SOD) qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène [51].

- ❖ La catalase qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau permettant l'élimination de celui-ci [52].
- ❖ La glutathion peroxydase (GPX) qui décompose aussi le peroxyde d'hydrogène en utilisant le glutathion comme donneur d'hydrogène [53].

III.6.2. Antioxydants non enzymatiques

Ce sont des antioxydants naturels capables de prévenir les dommages oxydatifs. Ils peuvent se comporter comme des piègeurs des radicaux libres par les interventions directes sur les molécules prooxydantes ou indirectement, en chélatant les métaux de transition, empêchant ainsi la réaction de Fenton. Ce type d'antioxydants possède un avantage considérable par rapport aux antioxydants enzymatiques. Du fait de leur petite taille, ils peuvent en effet pénétrer facilement au cœur des cellules et se localiser à proximité des cibles biologiques. Ce type d'antioxydants regroupe un grand nombre de substances hydrophiles ou lipophiles et ils sont en partie produits par l'organisme au cours de processus biosynthétiques. Néanmoins le nombre d'antioxydants produits *in vivo* est très limité ; on peut citer parmi les plus actifs : le glutathion [54], le NADPH, les dipeptides [55], l'acide urique, l'acide lipoïque ou la bilirubine [56].

Le taux de ce système de défense dans l'organisme est essentiellement assuré par un apport alimentaire. Parmi les antioxydants naturels de faible poids moléculaire, on peut citer les plus connus et les plus importants ci-dessous :

Acide ascorbique (vitamine C)

La vitamine C ou acide ascorbique représentée par la Figure I.10 est une vitamine hydrosoluble, sensible à la chaleur, aux ultraviolets et à l'oxygène. Après ingestion, elle passe rapidement dans le sang puis diffuse de façon variable dans tous les tissus. Un apport quotidien minimal d'origine alimentaire est donc nécessaire, celui-ci provient essentiellement des fruits et légumes frais [57].

La vitamine C est nécessaire pour de nombreuses fonctions physiologiques de la biologie humaine. La plupart des plantes et des animaux peuvent synthétiser l'acide ascorbique sauf les singes et les humains en raison du manque de l'enzyme gulonolactone oxydase [58].

Chapitre I : Synthèse bibliographique

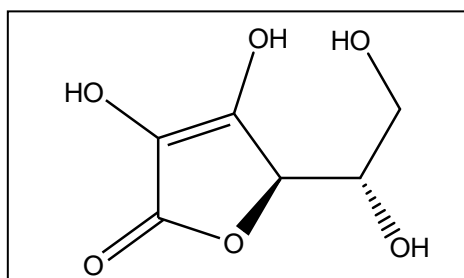


Figure I.10: La structure de l'acide ascorbique. [58]

Elle est un antioxydant puissant hydrosoluble, capable de piéger / neutraliser à des concentrations très faibles les espèces réactives de l'oxygène. Elle est un réducteur susceptible de limiter la peroxydation lipidique et intervient dans la régénération des autres antioxydants tels que les α -tocophérol [59].

✚ Tocophérols (dont la vitamine E)

Les tocophérols (Figure I.11) sont des composés liposoluble, ils regroupent quatre substance dont l'alpha-tocophérol aussi appelé Vitamine E est l'antioxydant majeur, la plus active biologiquement [60].

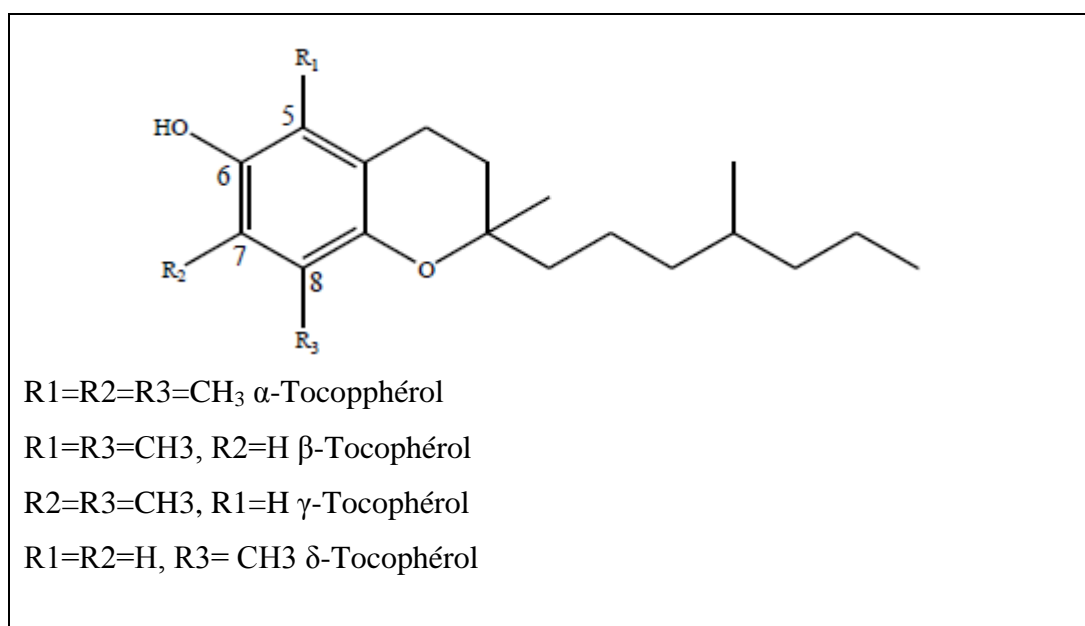


Figure I.11 : Structures des tocophérols. [60]

L' α -tocophérol a été largement étudiée comme complément alimentaire potentiellement préventive dans les maladies cardiovasculaires. Il joue un rôle dans l'atténuation du stress oxydatif, dans les symptômes des maladies neurodégénératives, et en particulier dans la maladie d'Alzheimer qui a récemment reçu un grand intérêt. En conséquence, il entrave l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales, l'agrégation des plaquettes et la formation consécutive des plaques d'athérome. Il est

Chapitre I : Synthèse bibliographique

présent dans les membranes des cellules et les organites cellulaires, où il joue un rôle important dans la suppression de la peroxydation des lipides et il s'accumule sur ces sites au sein des cellules dans lesquelles la production des radicaux d'oxygène est plus grande. Il neutralise les radicaux peroxy, alkyle et alcoxy.

III.6.3. Antioxydants synthétiques

Parmi les antioxydants phénoliques de synthèse qui sont autorisés dans certains aliments : le BHT 321 (3,5-ditertiobutyl-4-hydroxytoluène), BHA 320 (3-tertiobutyl-4-hydroxyanisole), sont l'un et l'autre soluble dans les lipides et résistent bien à la chaleur. Ils ont une action synergique, ils présentent l'inconvénient d'avoir une odeur désagréable et s'évapore rapidement. Le TBHQ (tertiobutyl-hydroxyquinone) est moins soluble dans les graisses et le PG (gallate de propyle) à l'avantage d'être relativement soluble dans l'eau, mais l'inconvénient d'être peu soluble dans les lipides, peu résistant à la chaleur et de donner avec le fer des sels de couleur foncée. Le nitrite présente des propriétés anti oxydantes, il peut aussi former des nitrosamines cancérigènes. Les chélateurs de métaux utilisés et plus efficaces sont les polyphosphates et les dérivés d'acide citrique [61].

Référence bibliographique

Référence bibliographique

- [1] **Iserin Paul** (2001). Encyclopédie des plantes médicinales, Ed, Larousse-Bordas Paris, 14
- [2] **Carillon E.** (2000). La phytothérapie face à l'évaluation médicale. Ed : phyto.,10-15
- [3] **Fouché J.G., A. Marquet et Hambuckers A** (200). Les plantes médicinales de la plante au médicament. Exposition temporaire du 19.09. au 30.06.2000
- [4] **Barka S et Ben Attallah S**, « L'effet de deux plantes médicinales sur quelques Bactéries pathogènes », Mémoire de fin d'étude d'ingénieur (université de Ouargla), 2010, P3-P13
- [5] **Benarous K**, « Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales sur les enzymes: a-amylase, trypsine et lipase », Mémoire de fin d'étude d'Ingénieur d'état en génie biologique (université Amar Telidji Laghouat), 2009.
- [6] **Baba Arbi H**, « Importance relative d'exploitation des plantes médicinales dans la pharmacopée traditionnelle à l'Est du Sahara septentrional (cas de Ouargla et Touggourt », Mémoire de fin d'étude d'ingénieur (université de Ouargla), 2010.
- [7] **Belouad A.**, Plantes médicinales d'Algérie. Office des Publications Universitaires, Alger, 5-10 (2001)
- [8] **Bahaz M et Rachdi H**, « Quantification des principes actifs (Les composés phénoliques) de *Rhazinolepis Lonadoides* Coss (Tichert) », Mémoire de fin d'étude d'ingénieur (université de Ouargla), 2010.
- [9] **Monjauze A.** (1980). Connaissance du bétoum *Pistacia atlantica* Desf. Biologie et foret. Revue Forestière Française, 4 : 357-363.9313.
- [10] **Baba Aissa F.** (2000). Encyclopédie des plantes utiles : Flore d'Algérie et du Maghreb. Ed : EDAS.,217.
- [11] **Quezel, P., Santa, S.** (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, Ed. CNRS, Paris.
- [12] **Monastra F, M. Rovira. F,J. Vargas. M.A. Romero. I. Battle. D. Rouskas et Mendes Gaspar** (2000). Caractérisation isoenzymatique de diverses espèces du genre *pistacia* et leurs hybrides : Etude de leurs comportement comme protegrefe du pistachier *pistacia vera* L. Ed : CIHEAM- Options Metiterranneennes : 135.
- [13] **Belhadj S** (2003). Les pistacheraies Algérienne : Etat actuel et dégradation Centre Universitaire de Djelfa., 107-109.

Référence bibliographique

- [14] **Densharad Aet Y aynehichi** (1980). Chemical Studies of the Oil Pistacia Nuts Growing Wild in Iran. *Oil Chem. Soc.*, **57** : 248-249
- [15] **Yousfi M., B. Nedjemi, R. Belel et D. Ben Bertal** (2003). Etude des acides gras de huile de fruit de pistachier de l'Atlas algérien. *OCL*. **10** :1-3
- [16] **Yousfi M., A. Djeridane, I. Bombarda, C.Hamia, A Duhem et E.M. Gaydou** (Accepted : Feb 8 :2008 In press). Isolation and Caractérisation of a New Hispolone Derivative From Antioxydant Extracts of Pistacia atlantica. *Phytotherapy Ressearch*.
- [17] **Mompon, B., Lemaire, B., Mengal, P., Surbled, M.** (1998). Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. Ed. INRA, Paris (les Colloques, N° 87).
- [18] **Heimeur, N., Idrissi Hassani, L.M., Amine Serghini, M.** (2004). Les polyphénols de *Pyrus mamorensis* (Rosaceae). *Reviews in Biology and Biotechnology*, 3 (1): 37 42.
- [19] **Bruneton, J.** (1993). Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 2ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.
- [20] **Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C.** (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*, 52: 673-839
- [21] **Loche, J.** (1966). Contribution à l'étude des polyphénols de la plante de tabac (Seita, ed). *Ann de la direction des études et de l'équipement, France*, 3 : 15.
- [22] **Nitsch, J.P., Nitsch, C.** (1961). Synergistes naturels des auxinex et des giberellines. *Bull. Soc. Fr*, 26: 2237-2240.
- [23] **Alibert, G., Ranjeva, R., Boudet, M.A.** (1977). Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques. *Physiol. Veg*, 15 : 279-301.
- [24] **Rakipov N.** (1987). Biochimie des cultures tropicales, Ed : Mir, 151-165
- [25] **Pincemail, J., Degrunne, F., Voussure, S., Malherbe, C., Paquot, N. & Defraigne, J.-O.** (2007). Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition clinique et métabolisme* **21**, 66–75.
- [26] **CHANFORAN, C.** (2010). Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation : études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-

Référence bibliographique

cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate. Thèse de Doctorat : Université D'AVIGNON et des PAYS de VAUCLUSE.

[27] Macheix, J.-J., Fleuriet, F. & Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *PPUR presses polytechniques*, p 134.

[28] Crozier, A., Clifford, M. N. & Ashihara, H. (2008). Plant secondary metabolites : Occurrence, structure and role in the human diet. *Edition John Wiley and Sons*, p 321.

[29] JEAN-DENIS, J. B. (2005). Caractérisation de polyphénols stilbéniques et de dérivés induits ou constitutifs de la vigne impliqués dans sa défense contre l'agent pathogène du mildiou de la vigne, *Plasmopara viticola* (Berk. and Curt.). Thèse de Doctorat : Université de NEUCHÂTEL.

[30] Sun, B., Ribes, A. M., Leandro, M. C., Belchior, A. P. & Spranger, M. I. (2006). Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. *Analytica Chimica Acta* **563**, 382–390.

[31] Lacy, A. & O'Kennedy, R. (2004). Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer. *Current Pharmaceutical Design* **10**, 3797-3811.

[32] HOFFMANN, L. (2003). Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Thèse de Doctorat : Université de LOUIS PASTEUR-STRASBOURG I.

[33] Nijveldt R. J., Van Nood E., Van Hoorn D. E. C., Boelens P. G., Van Norren K. et Van Leeuwen P. A. M. 2001. Flavonoids : a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American journal of clinical nutrition*. **74** : 418-425.

[34] Medić-Šarić M., Jasprica I., Smolčić-Bubalo A. ET Monar A. 2004. Optimisation of chromatography of flavonoids and phenolic acids. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA*. **77** (1-2): 361-366.

[35] Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R. et Krishna D. R. 2001. Bioflavonoid classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology*. **33**: 2-16.

Référence bibliographique

- [36] Bruneton.J. **Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales**, (3ème Éd.). Paris: Editions médicales internationales, éditions Tec & Doc Lavoisier, **1999**, 1120p
- [37] Lahouel, M., Boulkour, S., Segueni, N., Fillastre, J.P. (2004) The flavonoids effect against vinblastine, cyclophosphamide and paracetamol toxicity by inhibition of lipideperoxydation and increasing liver glutathione concentration. *Pathologie Biologie*. **52**:314-322.
- [38] Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat Pro*, 59: 205 215.
- [39] Cowan, M.M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol Re*, 12 (4): 564- 582.
- [40] Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30: 3875-3883.
- [41] Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales*. 3ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.
- [42] K. Bouhadjra (2011), étude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge, thèse pour l'obtention du diplôme de magister, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.
- [43] Z.Mohammedi (2005), Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et falvonoides de quelques plantes de la région du Tlemcen, Thèse de magistère, Université-Abou Bakr Belkaid-Telemcen.
- [44] Favier, A. (2003) Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. 108-115.
- [45] Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., Delattre, J. (2003) Radicaux libres et anti-oxydants. In : *Biochimie pathologique : aspects moléculaires et cellulaires*. Médecine-sciences. Flammarion (Ed). Paris, pp 59-81.
- [46] Vergly C., Rochette L ., 2003. Stress oxydant dans le domaine cardiovasculaire. *Médecine thérapeutique Cardiologie*. Stress oxydant. 113-9
- [47] Diallo A., 2005. Etude de la phytochimie et des activites biologiques de *Syzygium guineense* willd. (*MYRTACEAE*). Thèse de Doctorat. Mali.
- [48] Aruoma, O I. (1999) Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pacific J Clin Nutr*. **8**: 53-63.

Référence bibliographique

- [49] **Cano, N., Barnoud, D., Schneider, S. M., Vasson, M.-P., Hasselmann, M. & Lerverve, X.** (2006). Traité de nutrition artificielle de l'adulte. *Edition Springer*, p255.
- [50] **Pelletier, E., Campbell, P. G. C. & Denizeau, F.** (2004). Écotoxicologie moléculaire : Principes fondamentaux et perspectives de développement. *Edition PUQ*, p 182.
- [51] **Droillard, M.-J. & Paulin, A.** (1990). Isozymes of Superoxide Dismutase in Mitochondria and Peroxisomes Isolated from Petals of Carnation (*Dianthus caryophyllus*) during Senescence. *Plant Physiology* **94** (3), 1187-1192.
- [52] **Yoshimoto, M., Sakamoto, H., Yoshimoto, N., Kuboi, R. & Nakao, K.** (2007). Stabilization of quaternary structure and activity of bovine liver : Catalase through encapsulation in liposomes. *Enzyme and Microbial Technology* **41**, 849–858.
- [53] **Bédane, C.** (2008). Photodermatologie : Photobiologie cutanée, photoprotection et photothérapie. *Edition Wolters Kluwer France*, p 20.
- [54] **Piquet, M.-A. & Hébuterne, X.** (2007). Nutrition en pathologie digestive. *Edition Wolters Kluwer France*, p 93.
- [55] **Boldyrev, A. A.** (1993). Does carnosine possess direct antioxidant activity? *Int. J. Biochem.* **25**(8), 1101-1107.
- [56] **Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A. F., Glazer, A. N. & Ames, B. N.** (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* **235** (4792), 1043-1046.
- [57] **Fain, O.** (2004). Mise au point : Carences en vitamine C. *La revue de médecine interne* **25**, 872–880.
- [58] **Naidu, K. A.** (2003). Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An Overview. *Nutrition Journal* **2** (7), 1-10.
- [59] **Carr, A. Frei, B.** (1999). Does vitamin C act as pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.* **13**(9), 1007-1024.
- [60] **Wang, X. & Quinn, P. J.** (2006). The structure and phase behaviour of α -tocopherol-rich domains in 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamine. *Biochimie* **88**, 1883-1888.
- [61] **Z.Hellal** (2011), Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de Magister, Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou.

Chapitre II :

Matériels et

méthodes

Chapitre II : Matériels et méthodes

I. Matériels

I.1. Appareils et Produits

Produits

Tableau II.4 : Les produits chimiques et les réactifs

| Produits | Propriétés |
|--|--------------------|
| Méthanol (CH ₃ -OH) | M=32.04 g/mol, 99% |
| Acétone | |
| L'eau distillée | M=19 g/mol |
| Acétate d'éthyle (CH ₃ COOHCH ₂ CH ₃) | D=88.1, 99.8% |
| Dichlorométhane | |
| Sulfate de sodium Na ₂ SO ₄ | M=142.04 g/mol |
| Acide gallique monohydrate (C ₇ H ₆ O ₅ H ₂ O) | M=188.14 |
| Folin-ciocalteu | d =1.22 |
| Carbonate de sodium Na ₂ CO ₃ | |
| Chlorure d'aluminium(AlCl ₃) | M=241.43 g/mol |
| HCl | M=36 g/mol |
| DPPH | M = 394.3g/mol |
| TCA ou acide trichloracétique (CCl ₃ COOH) | M=163.39 |
| Potassium ferricyanate K ₃ Fe(CN) ₆ | M=329g/mol |
| Chlorure ferrique FeCl ₃ | M=162.21g/mol |
| Acide ascorbique | M=152g/mol |
| Quercétine. | M=302 g/mol |

Chapitre II : Matériels et méthodes

Appareils et instruments

Tableau II.5: Appareils et instruments

| Appareils et matériels | Caractéristiques |
|---------------------------------------|------------------|
| Balance électronique | |
| Bécher | |
| Erlenmeyer | |
| Ballon | |
| Eprouvette | |
| Fiole jaugée | |
| Pipette | |
| Propipette | |
| Tube à essai | |
| Micropipette | SL-plus 100 |
| Rota vapeur | |
| Ampoule à décanter | 250 ml |
| Ballons pour le rota-vapeur | 250 ml-1000ml |
| Agitateur | |
| Centrifugeuse | |
| Etuve | |
| Spectrophotomètre ultraviolet-visible | |
| UPLC | |

I.2. Matériel végétal

I.2.1. Récolte de l'échantillon

Les galles du *P. atlantica* sont récoltées de la région de Laghouat au cours du mois d'Aout 2013.

I.2.2. Séchage et conservation

Après la récolte le matériel végétale est nettoyé (débarrassé de ses débris), étale sur papier et laissé sécher à température ambiante dans une pièce aérée à l'abri de la lumière et protégé de l'humidité.

II. Méthode d'extraction

II.1.Extraction des composés phénoliques

La méthode d'extraction utilisée pour les composés phénolique est celle d'Amiot [1] et modifiée [2]. L'objectif de l'étape de l'extraction est de séparer les substances phénoliques de la poudre solide et les faire passer en solution. Elle est réalisée en trois étapes :

On pèse 2 g de matière végétale obtenue est mise à macération dans un mélange hydro alcoolique (Acétone / eau ; 70 / 30 ; V / V). Cette macération est répétée 5 fois avec renouvellement du solvant chaque 24 heure à température ambiante et à l'obscurité.

➤ La dépigmentation

Après la filtration d'extrait hydro-alcooliques, il subit une évaporation sous vide dans un rotavapeur à une température de 60°. La phase aqueuse est extraite un ou plusieurs fois jusqu'à épuisement total avec un demi-volume d'éther de pétrole dans une ampoule à décanter afin d'éliminer toutes traces de composés apolaires (pigments, lipides...)

➤ La Purification

La solution résulte a subi des extractions successives de type liquide-liquide, en utilisant des solvants de polarité croissante, dichlorométhane et l'acétate d'éthyle.

Les phases organiques obtenues sont séchées par le sulfate de sodium anhydride Na_2SO_4 pour éliminer toutes les traces d'eau. Après la filtration de solvant sont évaporé sous pression réduite à 60°C. Les extraits obtenus sont sous forme d'une poudre, ils sont pesés pour calculer le rendement de plante. Le résidu est repris dans 10 ml de méthanol pur et conserve à -10°C dormant l'extrait phénolique purifié.

II.2. Analyses quantitative des composés phénoliques

La teneur en phénols totaux estimée par la méthode de Singleton et Ross pour chaque extrait a été rapportée en mg équivalent d'acide gallique/g de matière sèche. La teneur en flavonoïdes déterminée par la méthode de Lamaison et carnat pour chaque extrait a été rapportée en mg équivalent de quercétine/g de la matière sèche [3].

II.2.1. Dosage des phénols totaux

Le dosage des composés phénoliques totaux a été effectué par une méthode adaptée de singleton et Ross [4] avec le réactif de folin-Ciocalteu. En milieu basique, le réactif de folin-Ciocalteu qui est formé d'acide phosphotungstique $H_3PW_{12}O_{40}$ et l'acide phosphomolybdique $H_3PMO_{12}O_4$ oxyde les groupements oxydables des composés polyphénoliques présents dans l'échantillon. Les produits de réduction (oxydes métalliques W_8O_{23}/Mo_8O_{23}) de couleur bleue, présentent un maximum d'absorption dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des composés phénoliques présents dans l'échantillon. La concentration massique des constituants utilisés dans la préparation des réactifs, a été optimisée pour obtenir la réponse analytique la plus linéaire possible en respectant le rapport réactifs/composés phénoliques totaux. Dans cette méthode on a utilisé l'acide gallique comme étalon [5].

Les lectures de la densité sur un spectrophotomètre, des solutions ainsi préparées ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique[6].

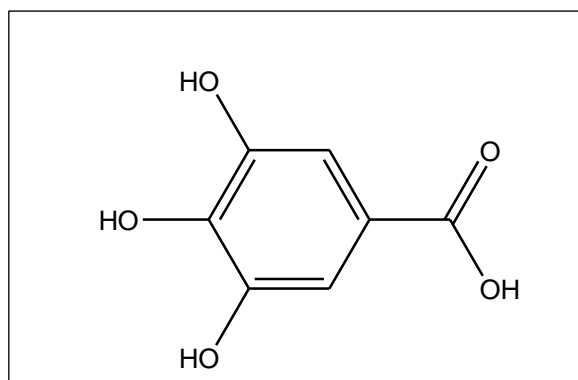


Figure II.12 : Structure de l'acide gallique [6]

➤ Procédure expérimentale

La courbe d'étalonnage standard a été obtenue à partir des solutions d'acide gallique de différentes concentrations (0-0.3mg/ml). On prend 100µl de chaque solution diluée ont été introduit à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai, suivi de l'addition de 500µl du réactif de folin-Ciocalteu (diluée 10 fois). Après incubation pendant 2 minutes, 2 ml de carbonates de sodium Na_2CO_3 à 4% (favoriser un milieu alcalin pour déclencher la réaction d'oxydoréduction) ont été ajoutées, puis maintenues dans l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 760 nm contre un blanc préparé de la même manière sauf qu'il ne contient pas d'acide gallique (l'extrait phénolique). Les lectures de la densité optique à 760 nm, des solutions ainsi préparées ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

II.2.2. Dosage des flavonoïdes

Flavonoïdes sont été quantifiés par un dosage direct à l'aide d'une solution aqueuse de trichlorure d'aluminium). Cette solution forme un complexe très stable avec les groupements hydroxydes OH des phénols. Ce complexe jaune absorbe la lumière visible à une longueur d'onde 415 nm. Les phénols sont estimés par une spectroscopie UV, dont la quercétine est utilisé comme un standard à une longueur d'onde $\lambda = 430$ nm [7,8].

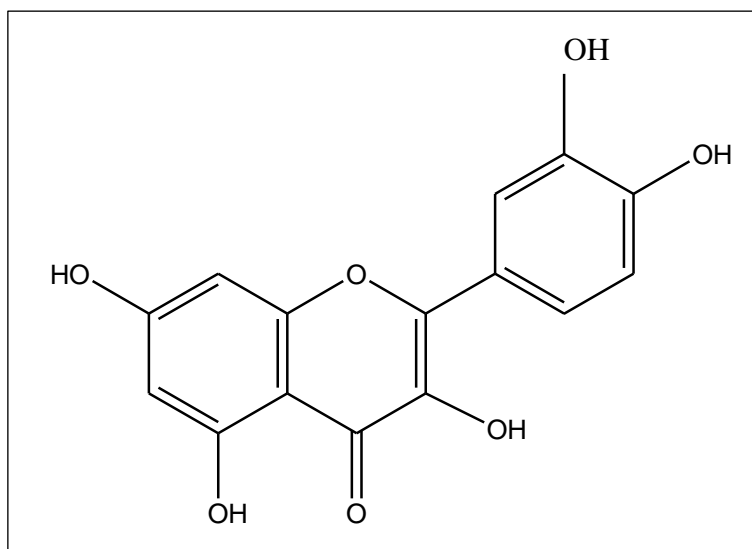


Figure II.13 : Structure du quercétine

Chapitre II : Matériels et méthodes

➤ Procédure expérimentale

Un standard de calibration a été préparé en utilisant des solutions de quercétine de différentes concentrations de 0 jusqu'à 0.012mg/ml.

A une quantité de 1 ml de chaque solution diluée ainsi préparée on ajoute le même volume d'une solution de 1% de trichlorure d'aluminium. Après incubation à l'obscurité et à la température ambiante pendant 15 min, l'absorbance du mélange de la réaction a été mesurée à 430 nm contre un blanc en employant la même spectrophotométrie utilisée précédemment.

On trace la courbe d'étalonnage de la quercétine qui représente la variation de l'absorbance du mélange des solutions déjà préparées pour déterminer la quantité des flavonoïdes.

II.3. Analyse des extraits par Chromatographie en Phase Liquide Ultra haute Performance (UPLC)

L'analyse chromatographique des extraits bruts, des 2 fractions acétate d'éthyle et dichlorométhane de galle du *P. atlantica* ont été réalisées par UPLC dans le laboratoire de pharmacognosie de l'Université Catholique de Louvain. Le chromatographe utilisé est de type Perkin Elmer série 200 muni d'une pompe quaternaire, d'un injecteur automatique, d'un four à effet pelletier et d'un détecteur UV à barrette de diodes (DAD). La méthode développée est un gradient constitué d'H₂O ultra-pure et de méthanol tous les deux acidifiés à 1% d'acide acétique (CH₃COOH) dont les proportions sont résumées dans le Tableau II.6. La séparation a été réalisée à 0.3 ml/min et à 25°C sur une colonne Chromolith™ Performance RP-18e columns (100 mm × 4.6 mm I.D.) en injectant 5 µL d'extrait.

Tableau II.6 : Conditions du gradient d'analyse UPLC

| Time (min) | Solvant A (H ₂ O : 1% CH ₃ COOH) | Solvant B (MeOH : 1% CH ₃ COOH) |
|------------|---|---|
| 0 | 5 | 95 |
| 12 | 95 | 5 |
| 12 | 95 | 5 |
| 13 | 5 | 95 |
| 17 | 5 | 95 |

II.4. Evaluation de pouvoir antioxydant

Des nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques purs ou des extraits. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Dans notre étude nous avons utilisé 2 tests chimiques différents à savoir :

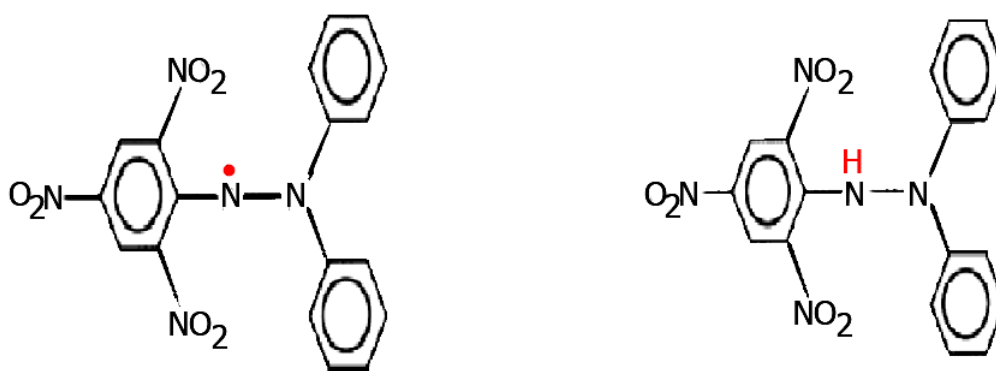
- La méthode du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) (Ascorbic Acid Equivalent Antioxydant Capacity) (Brand-Williams) [9]
- Réduction de fer (Reducing Power Assay) (Ascorbic Acid Equivalent Antioxydant Capacity) [10]

II.4.1. Méthode de radical DPPH

Le DPPH [9] [11] (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité anti-oxydante en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité de l'analyse. Il absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520nm [12].

- **Principe**

Le DPPH (2,2-Diphényl-1-1picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés antiradicalaire, le radical DPPH[•] est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm (Figure II.14) [13].



DiPhenyle1PicrylHydrazyle (radical libre) DiPhenyle1PicrylHydrazyle (non radical)

Figure II.14 : Réduction du radical libre DPPH[•] [14]

Le radical stable DPPH[•] est utilisé comme radical oxydant pour être réduit par l'antioxydant (AH) et comme indicateur coloré de la réaction selon le mécanisme suivant:

Chapitre II : Matériels et méthodes



Il fixe un radical hydrogène arraché à l'antioxydant AH pour former le DPPH-H lequel n'absorbe pas à 517 nm.

➤ Procédure expérimentale

On mélange 1 ml de chaque de l'extrait qui été diluée dans le méthanol avec 1 ml d'une solution de DPPH[•] (250 µM) préparée dans le méthanol. En laisser le mélange incubé à l'obscurité pendant 30 min à une température ambiante, l'absorbance du milieu réactionnel est mesurée à 517nm contre un blanc. En trace la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique à différentes concentrations pour déterminer le pouvoir antioxydant de nos extraits en AAEAC (Acid Ascorbic Equivalent Antioxydant Capacity).

II.4.2. Le pouvoir réducteur des composés phénoliques (Reducing Power Assay)

Ce test est découvre par **Oyaizu [10]**. Ce test est considéré comme un test direct et rapide dont est utilisé pour mesurer le pouvoir des antioxydants non enzymatiques, et utiliser pour déterminer l'activité antioxydant des extraits étudiés dans un milieu neutre. Ce test est basé sur la réduction des ions $[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3^-$ à des ions de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]_4^-$ [16], qui peut être mesurer leur absorbance à une longueur d'onde $\lambda = 700$ nm. L'activité antioxydant est mesuré avec un nouveau terme appelé AAEAC : qui présente l'activité antioxydant en équivalent de l'acide ascorbique des extraits étudiés (Acid Ascorbic Equivalent Antioxydant Capacity). L'évolution de l'activité antioxydant de nos extraits est comparée par rapport à l'acide ascorbique et cela en traçant une courbe d'étalonnage.

➤ Procédure expérimentale :

Dans une tube à essais contenant 2.5 ml de l'échantillons dilué mélangé avec 2.5 ml de tampons phosphate 200 mM, pH 6.6 et 2.5 ml de hexacyanoferrate de potassium $[\text{K}_3\text{FeCN}_6]$ 1% l'ensemble chauffé 50 °C pendant dans bain marie pendant 20 min. Un volume de 2.5 ml trichlorure acétique est ensuite ajouté et le mélange centrifugé à 300 min /tours pendant 10 min. enfin 2.5 ml du surnageant ont été mélangé avec 2.5 ml de l'eau distillé et 0.5 ml de chlorure ferrique (0.1 %) FeCl_3 on remarque l'apparition une coloration bleue. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 700 nm contre un blanc. Les lectures de la DO à 700 nm, des solutions ainsi préparées ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique [17]

Référence bibliographique

Référence bibliographique

- [1] **Hertog M.G.L et P.C.H. Hollman** (1992). Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J. Agric. Food Chem.* **40** : 1591-1598.
- [2] **Djeridane A., M. Yousfi, B. Nadjemi, D. Boutassouna, P. Stocker et N. Vidal** (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry.* **97**(4) : 654-660.
- [3] **Bougandoura N., Bendimerad N.**, 2012. Evaluation de l'activité antioxydante des extrais aqueuse et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briqu. *Nature & Technologie* p 14-19.
- [4] **Singleton V.L., Orthofer R., and Lamuela-Raventos R. M.** (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteu reagent. *Method.Enzymol.* **299**: 152-178.
- [5] **S. Dendougui** (2010), contribution à l'étude phytochimique et l'activité antioxydante de *Cleome Arabica*, mémoire de master, Université Kasdi Merbah Ouargla.
- [6] **Djerdane A**, 2008 « Evaluation du pouvoir antioxydant et de l'inhibition d'enzymes (la Carboxylestérase et l'Acylase) par des extraits phénoliques de dix-neuf plantes médicinales locales », Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat (L'école normale supérieur de KOUBA-ALGER DOCTEUR).
- [7] **Lamaison, J. L., Petitjean-Freyet, C., & Carnat, A.** (1991). LAMIACEES MEDICINALE A PROPRIETES ANTIOXYDANTES, SOURCES POTENTIELLES D'ACIDE-ROSMARINIQUE. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 66 (7), 185-188.
- [8] **Sadashivam S. and Manickam A.**; (2004) Phenolics. *Biochemical Methods.* New age international (P) publishers, (New Delhi)., 195-197.
- [9] **Williams W. B., Cuvelier M. E. and Berset C.**; (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel- Wissenschaft und- technologie, Lebensmittel - Wissenschaft und technologie* **28**, 25–30.
- [10] **Oyaizu M.** (1986) Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of nutrition*, 44 : 307-315.
- [11] **Kulisc T., Radonic A., Katalinic V. and Milos M.**; (2004) Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil; *Food Chem.* **85**, 633–640.

Référence bibliographique

- [12] **Quezel P., Santa S.;** (1963) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, Ed. CNRS, Paris.
- [13] **Parejo I., Viladomat F., Bastida J ; et al.** (2003). Investigation of bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life Sci*, 73 :1667-81.
- [14] **Molyneux P.** (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 26(2) : 211-219.
- [15] **Dangles, O., Fargeix, G., Dufour, C.,** *J. Chem. Soc. Perkin Trans., 2*, 1999, 1387-1395.
- [16] **Karagözler A., Erdag C.S., Çalmaz Emek Y.** (2008). Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*. *Food Chemistry*, 111 :400-407.
- [17] **H.jrah harz allah** (2010), antioxydant and antigenotoxic activities of *Globularia alypum* leaves extracts, *journal of medicinal plants research* vol.4 (19), pp.2048-2053.

Chapitre III :

Résultat et

discussion

Chapitre III : Résultat et discussion

I. Extraction des composés phénoliques

Les extraits phénoliques obtenus présentent généralement un aspect d'une poudre de couleur rouge brique pour les extraits des galles de *Pistacia atlantica*, les caractéristiques organoleptiques sont représentées dans le Tableau III.7 ci-dessous.

Tableau III.7 : Caractéristique organoleptique des galles de *P.atlantica*

| Extrait | Aspect physique | Couleur |
|---------------------------|-----------------|---------------|
| Pistacia atlantica | Poudre | Rouge brique. |

I.1. Dosage des composés phénoliques totaux

Cette analyse permet d'avoir une estimation sur la teneur en phénols totaux de l'échantillon. Le dosage des phénols totaux a été effectué par une méthode adaptée de Singleton et Rossi en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 760 nm. [1]

I.2. Teneur en composés phénoliques totaux

La quantification des composés phénoliques a été fait en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($Y=AX$) réalisés par une solution étalon (en utilise l'acide gallique comme un standard) a différentes concentrations.

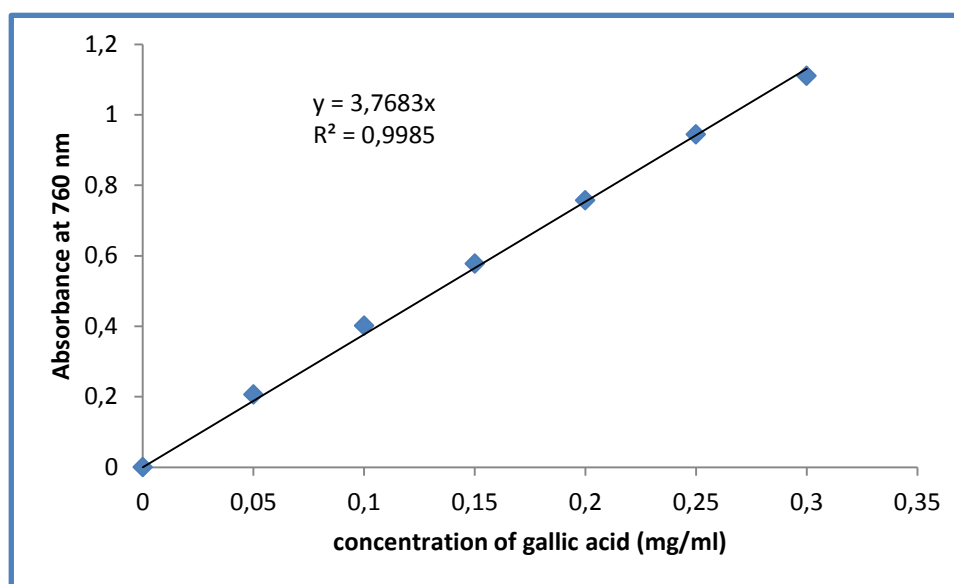


Figure III.15 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

La teneur en composés phénolique de chaque fraction été alors calculée à partir de courbe d'étalonnage est exprimée en milligrammes équivalente en acide gallique par

Chapitre III : Résultat et discussion

gramme de la matière sèche (MS), la mesure de la densité optique a été effectuée a la longueur d'onde de 760 nm. Les résultats obtenus sont représentés dans la Figure III.16 suivant :

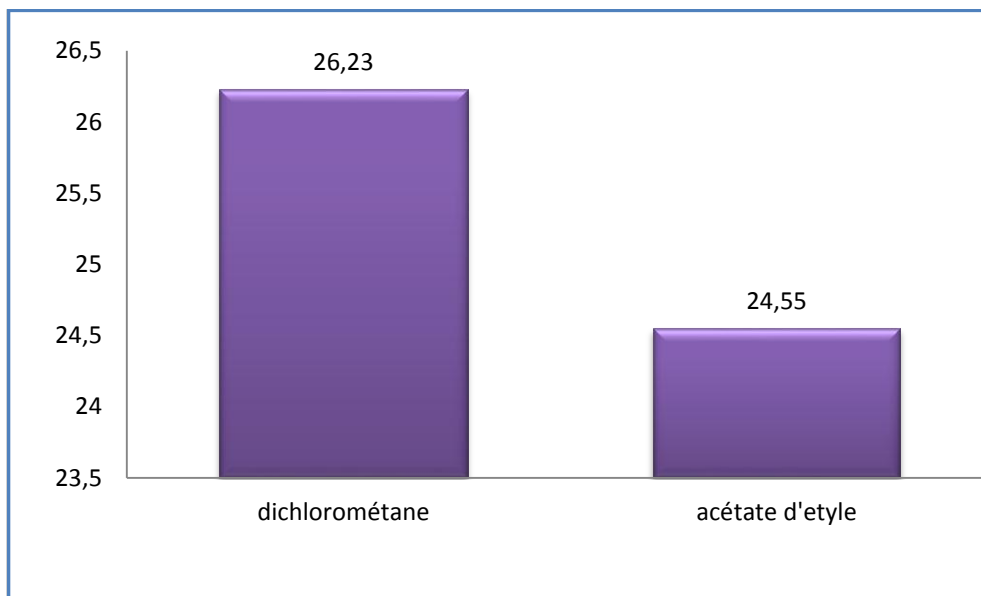


Figure III.16 : Quantité des phénols totaux dans les deux fractions

Le réactif de folin-ciocalteu a été réduit par les phénols en mélange d'oxyde bleu de tungstène et le molybdène, on remarque d'après le résultat consigné dans la Figure III.16 que la quantité des composés phénoliques varie entre 26 et 24 mg GAE/g MS. Le teneur des composés phénoliques est le plus élevé ont été détecté dans l'extrait par le dichlorométhane (26.23 ± 2.84 mg GAE/g MS) par rapport à celle de fraction de l'acétate d'éthyle (24.55 ± 2 mg GAE/g MS), cela a peut être justifié par la quantité des composés phénolique qui soluble dans les solvants moyennement polaire (dichlorométhane).

Ce résultat indique que les galles de *P. atlantica* contiennent des composés phénoliques apolaires.

En comparant nos résultats avec ceux de littérature (galle du *Calliandra brevipes Benth*), on remarque un écart remarquable [2]. Ce dernier a un teneur plus élevé (173 mg GAE/ g MS) que nos extraits. Cet écart peut être lié aux conditions climatiques de l'Algérie et celle du Brésil. En effet, la teneur phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (conditions climatiques, les pratiques culturelles, la maturité à la récolte et les conditions de stockage) [3, 4]. Rababah et ses collaborateurs [5] ont montré l'effet du traitement de

pré-extraction (irradiation ionisante) et du solvant d'extraction, sur la concentration des composés phénoliques totaux dans les extraits du *Pistacia atlantica*.

Les résultats de Michelle de Lima Detoni [2] s'étend de 34.1 à 173 mg GAE/g MS confirment que cette teneur montre des différences considérables, au cours des différents intervalles de l'année et même avec les conditions géographiques.

Comparativement à d'autres travaux sur la quantité des composés phénoliques des feuillies du *P. atlantica* déjà étudiées [6], On peut déduire que la teneur des composés phénoliques des galles du *Pistacia atlantica* est très faible par rapport à ses feuilles (239 mg GAE/g MS). La seule explication de l'indépendance de l'accumulation des composés phénoliques entre les feuilles et les galles peut être interprétée que les feuilles sont plus exposées aux agressions environnementales (les *éliciteurs*, micro-organisme, rayons solaires...).

I.3. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par Lamaison et Carnat [7] basée sur la complexation des flavonoïdes par l'Aluminium en utilisant le trichlorure d'aluminium comme réactif dans cette méthode.

I.3.1. Principe

La méthode de chlorure d'aluminium est basée sur la formation d'un complexe flavonoïdes-aluminium, ce dernier a un maximum d'absorption 430 nm [8].

I.3.2. Teneur en composés flavonoidique totaux

La quantification des flavonoïdes a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = a x$) réalisée par un standard étalon "la quercétine" à différentes concentrations (0-0.014 mg/ml) dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/ MS g).

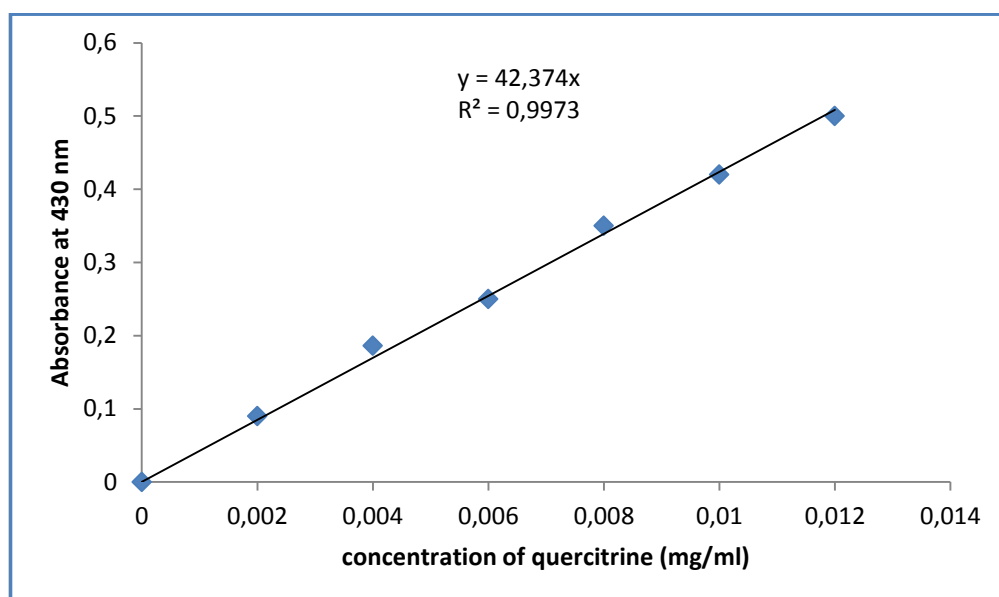


Figure III.17 : Courbe d'étalonnage de quercétine

La quantité des flavonoïdes dans nos extraits a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de quercétine. Les résultats obtenus exprimés en milligrammes par gramme de la matière sèche en équivalent de quercétine. Ainsi que le taux en flavonoïdes par rapport aux teneurs en phénols totaux, sont regroupés dans le Tableau III.8.

Tableau III.8 : La teneur et le taux des flavonoïdes des galles de *P. atlantica* dans les deux fractions

| Fraction | Teneur en flavonoïde (mg EQ/ MS g) | Taux des flavonoïdes % |
|------------------|---------------------------------------|------------------------|
| Dichlorométhane | 0.11±0.036 | 0.42±0.009 |
| Acétate d'éthyle | 0.154±0.022 | 0.62±0.005 |

(± : Standard de déviation de 6 répliques).

Les résultats d'analyse du dosage des composés flavonoidique des galles de *P. atlantica* montre clairement que l'extrait de acétate d'éthyle est plus riche en flavonoidiques est présente une valeur moyenne de l'ordre 0.154±0.022mg QE/gMS. En revanche l'extrait de dichlorométhane présente la teneur la plus faible par une valeur moyenne est de l'ordre 0.11±0.036 mg QE/gMS.

En revanche, les taux des flavonoïdes de dichlorométhane (0.42 %) moins élevés part apport à celle de l'extrait de l'acétate d'éthyle (0.62%), ce qui laisse supposer que les flavonoïdes des galles du *P. atlantica* sont en grande partie polaires. L'acétate d'éthyle est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes aglycones ou flavonoïdes mono

Chapitre III : Résultat et discussion

O- glycosides et partiellement di-O-glycosides, tandis que le dichlorométhane est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes C- glycosides [9].

Dans un souci de simplification les deux fractions ont été classées par ordre décroissant en teneur des composés phénoliques. Nous présentons alors, dans l'histogramme ci-dessous (Figure III.18) les deux valeurs du contenu en phénols totaux et en flavonoides pour chaque extrait. Il est clair à partir de cet histogramme que les quantités des phénols totaux et les flavonoïdes ne varient pas dans le même sens à titre d'exemple, on remarque que le pourcentage en flavonoïdes dans l'extrait de l'acétate d'éthyle est plus important que l'autre extrait (dichlorométhane) alors qui n'est pas l'extrait le plus riche en composés phénoliques (Tableau III.8). Ce résultat peut être traduit par le fait que la quantité des composés flavonoïdes varie inversement proportionnelles avec tout le contenu en composés phénoliques. Cette corrélation indique que les composés flavonoides représentent donc un groupe de substances naturelles importantes à la fois par le nombre de molécule concernée mais également par l'originité d'une origine biosynthèse mixte (celle d'acétate d'éthyle et celle de l'acide schikmique) part apport aux composés phénoliques.

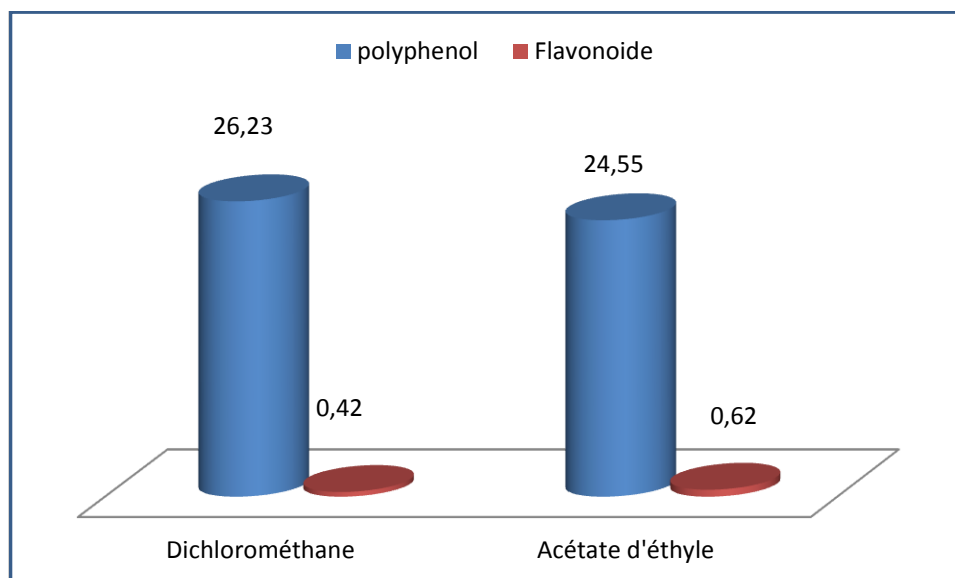


Figure III.18: Comparaison du contenu en composés phénoliques et en flavonoïdes dans les deux fractions

II. Analyse par Chromatographie Liquide Ultra Performance (UPLC)

La chromatographie est une technique de séparation, d'analyse quantitative et qualitative. Le principe de base repose sur les équilibres de concentration des composés entraînés entre deux phases non miscibles dont l'une, dite stationnaire, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support et l'autre, dite mobile, qui se déplace au contact de la première. L'échantillon doit impérativement être soluble dans la phase mobile (solvant d'élution). Le temps de rétention associé à un pic chromatographique (Figure III.19 et III.20) caractérise qualitativement une substance dans des conditions chromatographiques données. L'aire ou la hauteur des pics chromatographiques permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté. L'analyse des métabolites présents dans les deux fractions d'acétate d'éthyle et dichlorométhane a été réalisée à l'aide d'une Chromatographie Liquide Ultra Performance. L'utilisation de l'UPLC augmente la sélectivité et la sensibilité par rapport à l'HPLC. Lors de la chromatographie liquide, les molécules présentes dans l'échantillon analysé sont séparées en fonction de leur nature chimique. On remarque d'après les résultats des deux chromatogrammes (Figure III.19 et III.20) que le nombre des pics de l'extrait de l'acétate d'éthyle (17 composés) est supérieure part apport à celle de dichlorométhane (9 composés).

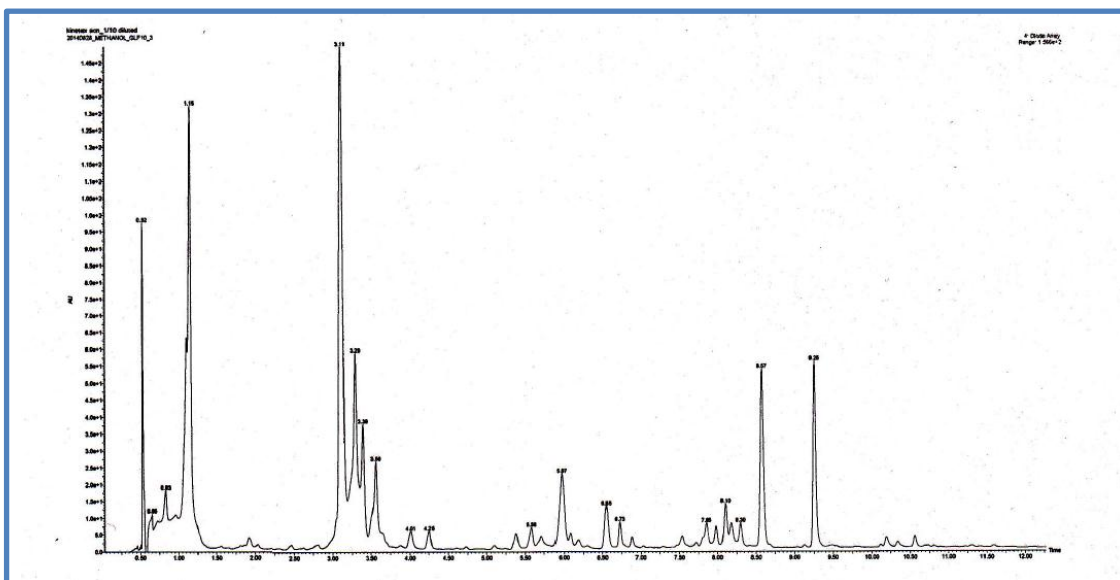


Figure III.19 : Chromatogramme d'UPLC de l'extrait de l'acétate d'éthyle enregistré à 254 nm

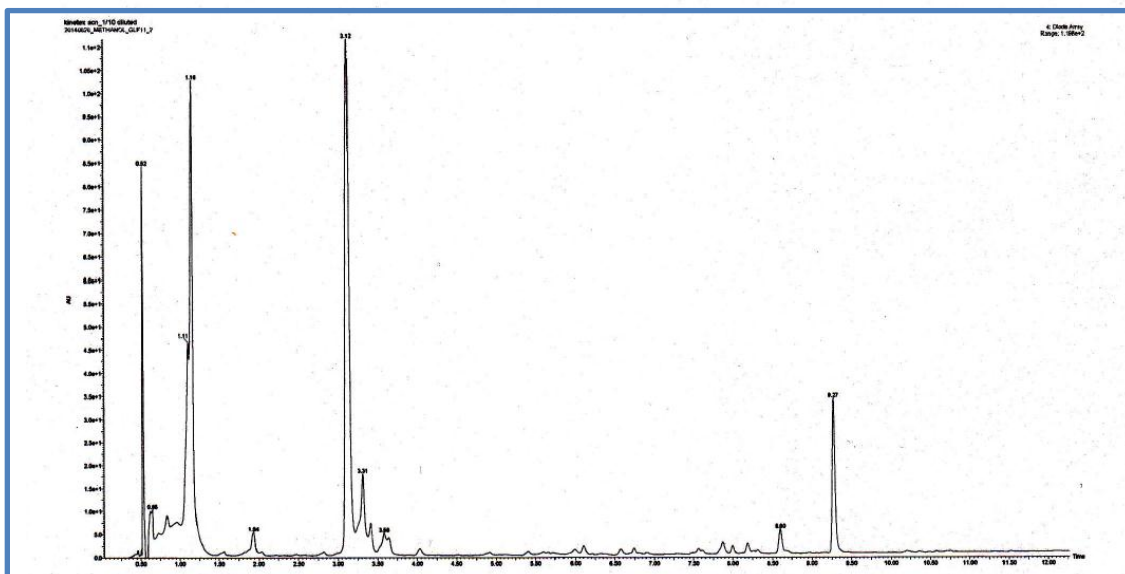


Figure III.20 : Chromatogramme d'UPLC de l'extrait de dichlorométhane enregistré à 254 nm

A partir des deux chromatogrammes des deux fractions, nous avons dressé les Tableaux III.9 et III.10 qui indiquent le pourcentage relatif de chaque composé obtenu par les deux fractions de l'acétate d'éthyle et dichlorométhane.

Nous avons observé que l'extrait de l'acétate d'éthyle contient 17 composés est caractérisé par leur richesse en trois composés (pic 3 ayant le temps de rétention de 3.11 min) suivi de composé **2** (pic 2 ayant le temps de rétention 1.15 min) et le composé **4** (pic 4 ayant le temps de rétention 3.29 min). Ces trois composés présentent un pourcentage supérieur à 40% de l'ensemble de la fraction de l'acétate d'éthyle.

Chapitre III : Résultat et discussion

Tableau III.9: Les composés de l'acétate d'éthyle identifié par UPLC

| Les composés | Temps de rétention (min) | % |
|---------------|--------------------------|--------------|
| Pic 1 | 0.52 | 12 |
| Pic 2 | 1.15 | 15.53 |
| Pic 3 | 3.11 | 19.89 |
| Pic 4 | 3.29 | 8.63 |
| Pic 5 | 3.39 | 5.45 |
| Pic 6 | 3.56 | 3.45 |
| Pic 7 | 4.01 | 0.78 |
| Pic 8 | 4.25 | 0.84 |
| Pic 9 | 5.58 | 0.93 |
| Pic 10 | 5.97 | 3.21 |
| Pic 11 | 6.55 | 2.89 |
| Pic 12 | 6.73 | 2.45 |
| Pic 13 | 7.85 | 2.21 |
| Pic 14 | 8.10 | 2.81 |
| Pic 15 | 8.30 | 2.15 |
| Pic 16 | 8.57 | 7.79 |
| Pic 17 | 9.25 | 7.33 |

Le profil chromatographique de la fraction dichlorométhane, réalisé dans les mêmes conditions de la fraction acétate d'éthyle, permet d'obtenir 9 composés. Toutefois, cette estimation est basée sur les pourcentages relatifs des aires des pics des constituants (méthode de normalisation) et ne constitue donc pas un dosage au sens strict de chacun des constituants. A partir de ces données, on peut déduire que les 3 composés ; **4** (pic 4 ayant le temps de rétention de 3.12 min), **2** (pic 2 ayant le temps de rétention 1.16 min) et **1** (pic 1 ayant le temps de rétention 0.52 min) représentent la fraction majoritaire avec un taux de 42% par rapport l'ensemble de la dichlorométhane.

Chapitre III : Résultat et discussion

Tableau III.10: Les composés de dichlorométhane identifié par UPLC

| Les composés | Temps de rétention (min) | % |
|--------------|--------------------------|--------------|
| Pic 1 | 0.52 | 11.38 |
| Pic 2 | 1.16 | 13.53 |
| Pic 3 | 1.94 | 2.56 |
| Pic 4 | 3.12 | 17.36 |
| Pic 5 | 3.31 | 4.33 |
| Pic 6 | 3.58 | 2.33 |
| Pic 7 | 8.60 | 0.93 |
| Pic 8 | 9.27 | 7.22 |
| Pic 9 | 5.58 | 0.93 |

Si l'on compare la composition des métabolites secondaire des deux fractions de l'acétate d'éthyle et dichlorométhane, on note une différence du point de vue qualitatif. On constate la disparation de ces substances ; **10** (pic 10 ayant le temps de rétention 5.97 min), **11** (pic 11 ayant le temps de rétention 6.55 min), **12** (pic 12 ayant le temps de rétention 6.73 min), **13** (pic 13 ayant le temps de rétention 7.85 min), **14** (pic 14 ayant le temps de rétention 8.10 min), **15** (pic 15 ayant le temps de rétention 8.30 min), **16** (pic 16 ayant le temps de rétention 8.57 min) et **17** (pic 17 ayant le temps de rétention 9.25 min) lors de passage d'un system d'extraction l'acétate d'éthyle à dichlorométhane. Ce résultat montre principalement que les composés phénoliques ne sont pas abondants au niveau de la fraction de dichlorométhane ce qui revient probablement à la solubilité relative des composés phénoliques présents dans les galles du *P. atlantica*. En effet la solubilité des composés phénoliques est conditionnée par le type de solvant utilisé ; pour une haute récupération des composés phénoliques l'acétate d'éthyle est le solvant approprié.

III. Résultats de l'étude du pouvoir antioxydant

Activité anti-oxydante

Les extraits sont des mélanges de plusieurs composés, avec différents groupements fonctionnels, polarités et comportements chimiques. Cette complexité chimique des extraits pourrait mener à des résultats dispersés selon l'essai utilisé. Par conséquent, une approche avec des analyses multiples pour évaluer l'activité antioxydant des extraits serait plus instructive et même nécessaire.

Dans ce travail, deux méthodes sont utilisées : DPPH, réduction de fer (K_3FeCN_6)

III.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil)

L'activité antioxydant d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation [10]. De nombreuses méthodes sont utilisées actuellement pour évaluer cette activité. Le radical DPPH[•] a été largement utilisé pour l'étude de l'activité anti radicalaire des différents extraits végétaux [11].

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques [12, 13]. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. La réduction de ce radical s'accompagne par son passage de la couleur violette caractéristique de la solution de DPPH à la couleur jaune mesurable par spectrophotométrie à 517 nm.

La mesure de l'absorbance (ou densité optique DO) a été effectuée par spectrophotométrie à 517 nm.

L'évaluation de l'activité antioxydant de nos extraits a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (Figure III.21). Exprimée en AAEAC (Acide Ascorbique Equivalent Antioxydant Capacity)

Chapitre III : Résultat et discussion

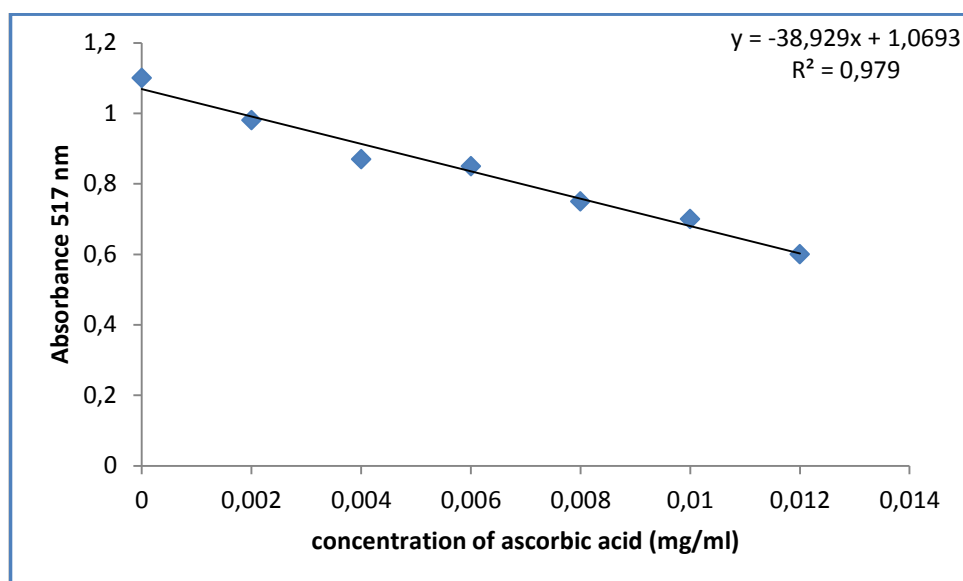


Figure III.21: Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour le DPPH

A partir de la courbe d'étalonnage qui exprimer en milligramme de l'acide ascorbique de la matière sèche (MS) on vous calculer AAEAC des galles de *P. atlantica* dans les deux fractions les résultats sont obtenue dans le tableau suivant (Tableau III.11) et la (Figure III.22) :

Tableau III.11 : Les valeurs de AAEAC des extraits qui déterminées par le test de DPPH

| Fraction | AAEAC (mg AAE/g MS) |
|------------------|---------------------|
| Dichlorométhane | 494.01±17.40 |
| Acétate d'éthyle | 552.557±23.10 |

(± : Standard déviation de trois réplias)

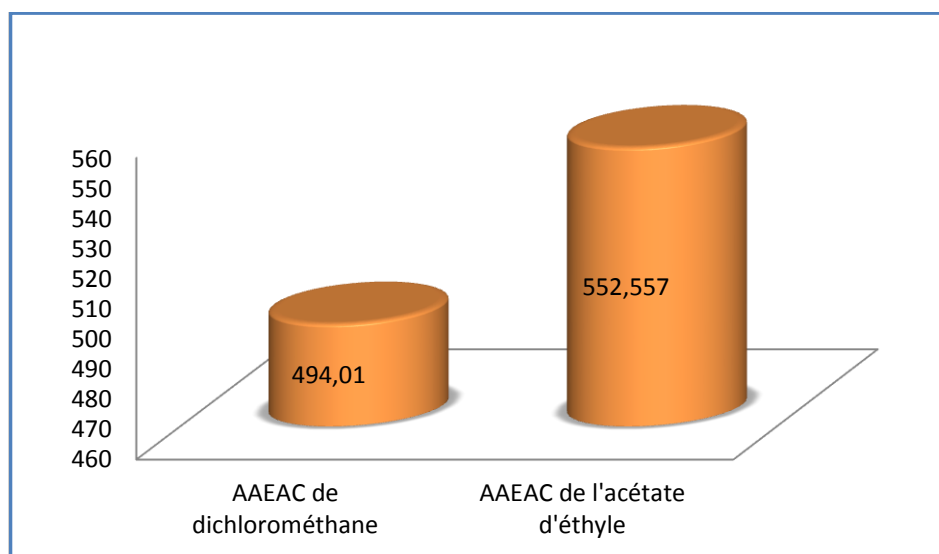


Figure III.22: Les valeurs obtenues d'AAEAC dans les deux fractions

Chapitre III : Résultat et discussion

On remarque d'après les résultats obtenue qu'AAEAC d'acétate d'éthyle possède une activité antiradicalaire considérable contre le radical DPPH (bonne capacité à piéger le radical DPPH) avec une valeur d'AAEAC (552.55 ± 23.10 mg AAE/g MS) par apport à l'extrait de dichlorométhane (494.01 ± 17.40 mg AAE/g MS) malgré qu'elle ne contienne pas une grande quantité en phénols totaux. Ce résultat a été constaté par Droman [14], qui a montré que la capacité antiradicalaire des extraits des plantes examinées (organe, sauge et le thym) dépend essentiellement de leurs structures individuelles et leurs taux dans l'extrait et aussi le milieu réactionnel du test utilisé pour évaluer l'activité antioxydante car le test DPPH est classé comme un test pour le milieu réactionnel de système polaire. Il faut noter que la plus grande valeur d'AAEAC (l'extrait le plus antioxydant) est enregistrée dans la fraction de l'acétate d'éthyle, qu'elle contienne une grande quantité en flavonoïdes par rapport au dichlorométhane (Tableau III.11), indiquant que la capacité antioxydante de l'extrait est due la contribution des composés flavonoidiques qui sont les antioxydants dominant dans cet extrait. Selon Turkemen [15], les composés flavonoidiques semblent être des donateurs efficaces d'un hydrogène en raison de leur chimie structurale idéale. Ils ont constaté que les extraits du thé noire possèdent une activité antioxydante très élevés également un contenue plus élevés des composés flavonoidiques.

III.2.Hexacyanoferrate(III)

C'est une méthode de mesure de la capacité des substances de nos extraits à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} . C'est une technique rapide, facile et reproductible [16].

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antiradicalaire. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}). En effet le Fe^{3+} participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm [17]. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés [18].

L'évaluation de l'activité antioxydant de nos extraits a été déterminée à partir d'un courbe étalonnage de l'acide ascorbique (Figure III.23), exprimée en AAEAC (Ascorbic Acid Equivalent Antioxydant Capacity) pour chaque extrait.

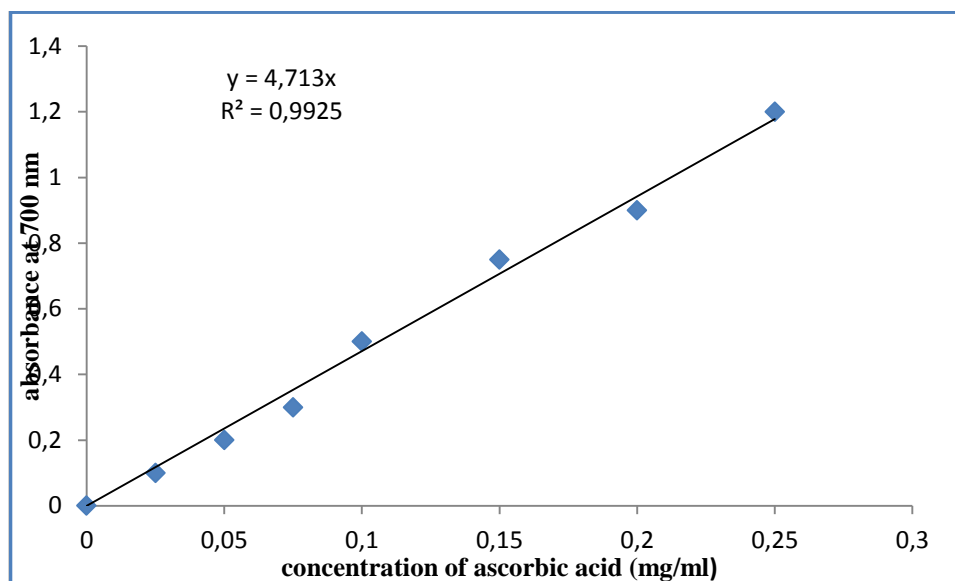


Figure III.23: Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique

AAEAC de chaque fraction été alors calculée à partir de courbe d'étalonnage est exprimée en milligrammes équivalente en acide ascorbique par millilitre de la matière sèche (MS), la mesure de la densité optique a été effectuée à la longueur d'onde de 700 nm. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau III.12: les valeurs de AAEAC des extraits qui déterminée par la méthode de hexacyanoferrate

| Fraction | AAEAC (mg/g) |
|-------------------------|--------------|
| Dichlorométhane | 79.07±9.93 |
| Acétate d'éthyle | 113.09±6.098 |

(± : Standard déviation de quatre répliques)

On remarque d'après les résultats obtenue qu'AAEAC que l'extrait du dichlorométhane dévoile un pouvoir réducteur presque inférieure par rapport au extrait de l'acétate d'éthyle mais renferment des teneurs en composés phénoliques, le plus élevés (Figure III.16). A l'issus de ce résultat, on peut conclure que l'activité réductrice n'est pas liée directement au contenu en composés phénoliques. Ce résultat peut être traduit par l'effet que la faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également de certains sucres et de protéines etc. [19, 20].

Chapitre III : Résultat et discussion

Le solvant d'extraction emporte des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique [21]. Le dosage par ce réactif donne donc une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait. Il n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec le réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé [22].

La fraction acétate d'éthyle est riche en flavonoïdes, ceci suggère un lien entre l'activité réductrice de cette fraction. Ce lien reste conditionné par la structure des flavonoïdes, particulièrement la substitution hydroxy pour les anneaux aromatiques A et B et le modèle de substitution de l'anneau C, les flavonoïdes les plus actifs possèdent de 3 à 6 groupes d'hydroxyle [23,24], tandis que l'hydroxylation en position C₃ semble être nuisible pour leur pouvoir antioxydant et pour l'activité de réductrice.

La Figure III.24 montre la structure de flavonoïde des différents principaux éléments de l'activité antioxydant.

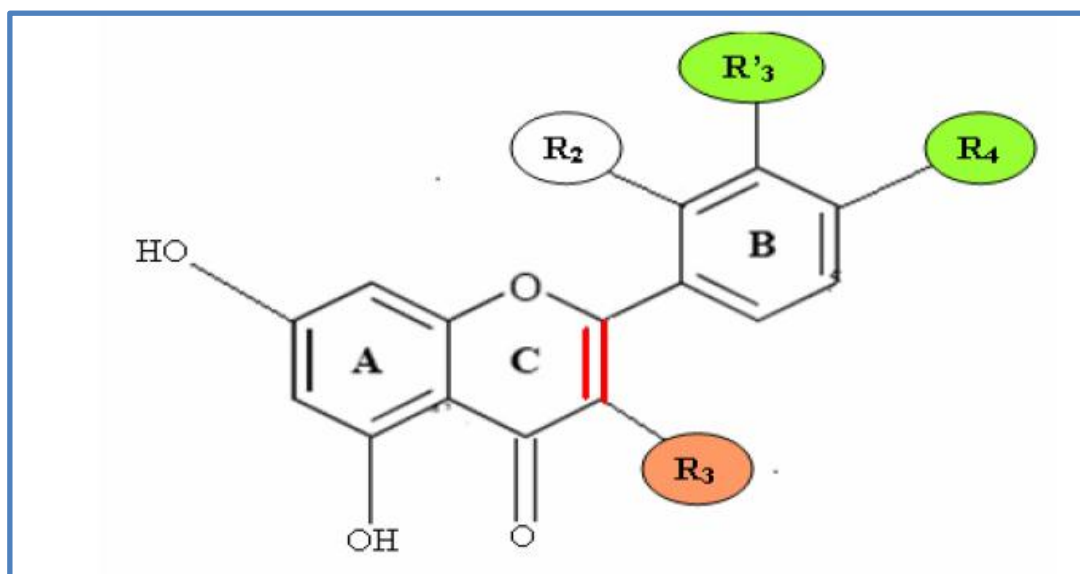


Figure III.24 : Principaux éléments de l'activité antioxydant des flavonoïdes [23]

En revanche la glycosylation des flavonoïdes réduit leurs capacités de piéger les radicaux libres [25].

A titre d'exemple, le pouvoir antioxydant augmente du kaempferol, quercétine à la myricétine, qui coïncide avec l'augmentation du modèle d'hydroxylation [24].

Le niveau de corrélation entre le contenu phénolique et l'activité anti-oxydante est un aspect intéressant, mais il faut prendre en considération que les composés phénoliques répondent différemment dans l'analyse, selon le nombre de groupes

Chapitre III : Résultat et discussion

phénoliques et que les composés phénoliques totaux n'incorporent pas nécessairement tous les antioxydants qui peuvent être présents dans un extrait [22].

L'attribution exacte de la capacité anti-oxydante à un composé, ou un petit groupe de composants dans un extrait de plante est une tâche difficile, puisque l'activité efficace dépend de plusieurs facteurs, tels que la concentration, les formes isomériques et l'interaction synergique avec d'autres composants [26].

L'extrait obtenu en utilisant deux solvants de haute polarité (acétate d'éthyle) a été considérablement plus efficace que celui obtenu en utilisant un solvant de basse polarité (dichlorométhane).

La polarité des solvants change la capacité de dissoudre un groupe choisi de composés antioxydants, ce qui influence l'évaluation de l'activité anti-oxydante [27, 28].

Conclusion
et
perspective

Conclusion et perspective

Ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour l'utilisation des antioxydants naturels. De nombreux chercheurs ont été intéressés par les composés biologiquement actifs isolés des extraits de plantes.

La présente étude a pour objectif l'étude de la galle de *P. atlantica* provenant de la région de Sud Algérienne (Laghouat) à travers leurs teneurs en composés phénoliques et l'activité antioxydante.

Les résultats obtenus dans l'analyse quantitative des composés phénoliques nous ont permis de déduire que ces deux fractions l'acétate d'éthyle et dichlorométhane de la galle de *Pistacia atlantica* constituent une source prometteuse en composés phénoliques. La teneur en composés phénoliques de la fraction dichlorométhane qui est de 26.33 ± 2.84 mg GAE/g MS est trouvée supérieure à celle de la fraction de l'acétate d'éthyle (24.55 ± 2 mg GAE/g MS). En conséquence la quantité de différents composés phénoliques existants dans les deux fractions dichlorométhane et l'acétate d'éthyle constitué un caractère spécifique pour chaque fraction.

Le dosage quantitatif des flavonoïdes par la méthode d' AlCl_3 a révélé que l'extrait de l'acétate d'éthyle est plus riche en flavonoidiques est présente une valeur moyenne de l'ordre 0.154 ± 0.022 mg QE/g MS. En revanche l'extrait de dichlorométhane présente la teneur la plus faible la valeur moyenne est de l'ordre 0.11 ± 0.036 mg QE/g MS.

L'analyse qualitative par UPLC de la fraction de l'acétate d'éthyle a montré la présence **17** composés par leur richesse en **3** composés ayant le temps de temps de rétention 3.11 1.15, et 3.29 min. Ces trois composés présentent un pourcentage supérieur à 40% de l'ensemble de la fraction de l'acétate d'éthyle. En conséquence, la fraction de dichlorométhane contient **9** composés avec **3** composés (ayant le temps de rétention 0.52, 1.16 et 3.12 min) qui représentent la fraction majoritaire avec un taux de 42% par rapport l'ensemble de la dichlorométhane.

L'évaluation de l'activité antioxydante s'est portée sur l'application d'une analyse *in vitro*, comprenant un balayage du radical stable du DPPH et l'estimation du pouvoir réducteur comme une technique chimique.

Dans le test DPPH la fraction d'acétate d'éthyle est plus active par rapport à la fraction de dichlorométhane. Cette fraction contient une grande quantité en flavonoïdes par rapport au dichlorométhane, indiquant que la capacité antioxydante de

Conclusion et perspective

l'extrait est due la contribution des composés flavonoidiques qui sont les antioxydants dominant dans cet extrait.

En revanche, le test d'hexacyanoferrate montre clairement que la fraction de dichlorométhane renferme des molécules ayant une potentielle réductrice inférieure à celle de la fraction de l'acétate d'éthyle, mais contient des teneurs en composés phénoliques, le plus élevés. A l'issus de ce résultat, on peut conclure que l'activité réductrice n'est pas liée directement au contenu en composés phénoliques. Par conséquence, la fraction de l'acétate d'éthyle est riche en flavonoïdes, ceci suggère un lien entre l'activité antioxydante des deux fractions et ces composants.

Selon les résultats obtenus dans cette étude, nous pouvons dire que les galles du *Pistacia atlantica* est riche en composés phénoliques. Les extraits donne une bonne activité antioxydante soit une capacité de piégeage de radicaux libres et la réduction de fer. Notre perspective d'avenir est d'étudier chaque extrait séparément puis isoler et identifier les différents composés qui existent.

Les résultats présentés ici peuvent contribuer à la connaissance des potentiels antioxydants des deux fractions de l'acétate d'éthyle et dichlorométhane des galles du *P. atlantica*.

Une prolongation de ce travail à l'avenir est souhaitable pour étudier les composants présents dans les galles du *P. atlantica* et pour évaluer leur activité antioxydante. Ainsi nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- Il reste encore beaucoup des plantes locales utiles qui n'ont pas été analysées et qui méritaient de l'être afin de déterminer leur potentialité dans les domaines étudiés.
- La multiplication de nombre essais in vitro vis-à-vis d'autre pathologies douloureuse, abdominales, inflammatoires et infectieuses
- L'activité antioxydante issue des extraits naturels de plantes locales permettent d'isoler et caractériser d'éventuelles nouvelles molécules ou de trouver des molécules déjà connus responsables à cette activité et qui pourront être utilisé pour étude chimiotaxnomiques.

Référence bibliographique

Référence bibliographique

- [1] **Bougandoura N., Bendimerad N.**, 2012. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueuse et méthanolique de *Saturejacalamintha ssp.Nepeta* (L.) Brriqu. *Nature & Technologie* p 14-19.
- [2] **Michelle de Lima Detoni, M., Vasconcelos, E. G., Maia, A. C. R. G., do Nascimento Gusmão, M. A., dos Santos Isaias, R. M., Soares, G. L. G., ... & Fernandes, G. W.** (2011). Protein content and electrophoretic profile of insect galls on susceptible and resistant host plants of *Bauhinia brevipes* Vogel (Fabaceae). *Australian Journal of Botany*, 59(6), 509-514.
- [3] **Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdelly, C.** (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379.
- [4] **Podsędek, A.** (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Science and Technology*, 40(1), 1-11.
- [5] **Rababah, T. M., Ereifej, K. I., Al-Mahasneh, M. A., Alhamad, M. N., Alrababah, M. A., & Al-u'datt, H. M.** (2010). الخصائص الفيزيوكيميائية لثمار صنفين من (2) البلوط من حوض البحر المتوسط. المجلة الاردنية في العلوم الزراعية, 4
- [6] **Yousfi. M., Duhem, B., & Gaydou, E. M.** (2009). Isolation and characterization of a new hispolone derivative from antioxidant extracts of *Pistacia atlantica*. *Phytother. Res*, 23, 1237-1242.
- [7] **Lamaison, J. L., Petitjean-Freyet, C., & Carnat, A.** (1991). LAMIACEES MEDICINALE A PROPRIETES ANTIOXYDANTES, SOURCES POTENTIELLES D'ACIDE-ROSMARINIQUE. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 66 (7), 185-188.
- [8] **Ayoola G. A., Ipav S. S., Solidiya M. O., Adepoju-Bello A. A., Coker H. A. B., Odugbemi T. O.** (2008) Phytochemical screening and free radical scavenging activities of the fruits and leaves of *Allanblackia floribunda* Oliv (Guttiferae). *International journal of health research* ; 1 (2):81-93.
- [9] **Lu Y, L Yeap.** (2002) Polyphenolics of *Salvia*. *Food Phytochemistry* 59:117–140.
- [10] **Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B.** (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res*, 22(4): 375-83.

Référence bibliographique

- [11] **Sanchez-Moreno, C.** (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Sci Tech Int*, 8(3): 121-137. **(Sanchez-Moreno, 2002)**
- [12] **Blois M.S.** (1958) Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 181, 1199:1200.
- [13] **Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A.** (1998). Main methods used in lipid oxidation determination. *Food Sci. Technol. Int*, 4: 391-399.
- [14] **Dromán, M., Boa, E., & Woodward, S.** (2006). Wild-gathered fungi for health and rural livelihoods. *Proceedings of the Nutrition Society*, 65(02), 190-197.
- [15] **Türkmen, H ., Lovering, J.,** (2011). Bulldozer neo-liberalism in Istanbul: The state-led construction of property markets, and the displacement of the urban poor. *International Planning Studies*, 16(1), 73-96.
- [16] **Karagözler A., Erdag C.S., Çalmaz Emek Y.** (2008). Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*. *Food Chemistry*, 111 :400-407.
- [18] **Hubert A.J.** (2006) Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de Soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaine. Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse, école doctoral des sciences écologiques, vétérinaires, agronomiques et bioingénieries, spécialité : qualité et sécurité des aliments, p 174
- [19] **Vuorela, S., Morelló, J. R., Romero, M. P., Motilva, M. J., & Heinonen, M.** (2005). Antioxidant activity of olive pulp and olive oil phenolic compounds of the Arbequina cultivar. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 2002-2008.
- [20] **Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A.** (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(4), 1220-1234.
- [21] **Djeridane A., M. Yousfi, B. Nadjemi, D. Boutassouna, P. Stocker et N. Vidal** (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*. **97**(4) : 654-660.
- [22] **Tawaha, K., Alali, F. Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., & El-Elimat, T.** (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, 104(4), 1372-1378.

Référence bibliographique

- [23] Tsimogiannis, D., Samiotaki, M., Panayotou, G., & Oreopoulou, V. (2007). Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules*, 12(3), 593-606.
- [24] Le, J. Y., & Tang, C. Y. (2007). Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food chemistry*, 101(1), 140-147.
- [25] Ramassamy, C. (2006). Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *European journal of pharmacology*, 545(1), 51-64.
- [26] Almela, L., Sánchez-Muñoz, B., Fernández-López, J. A., Roca, M. J., & Rabe, V. (2006). Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography A*, 1120(1), 221-229.
- [27] Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouix, M., & Hamdi, M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105(3), 1126-1134.
- [28] Turkmen, N., Velioglu, Y. S., Sari, F., Polat, G. (2007) Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules*. 12:484-496.