

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

Université Amar Téliidji Laghouat  
Faculté des Sciences  
Département de biologie

جامعة عمارثليجي-الأغواط -  
كلية العلوم  
قسم البيولوجيا



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES  
En vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat en Biologie  
Option : Génie Biologique

**Thème:**

**Etude comparative des propriétés antioxydantes  
des différents extraits de feuilles de Pin d'Alep  
« *Pinus halepensis* »**

Soutenu publiquement le : 22/06/2014

**Présentés par :**

- ❖ *Mell ABDI Messaouda*
- ❖ *Mell BENMIZOURA Friha*

**Encadré par :**

- ❖ *M. SIFI Ibrahim*

## ملخص

يهدف هذا العمل إلى تقييم الفعالية المضادة للأكسدة لبعض المركبات الأيضية الثانوية المستخلصة من عينتان لشجرة الصنوبر الحلبي (عينة P1 الأغواط، عينة P2 الجلفة) من خلال قدرتها على تثبيط الجذور الحرة DPPH و FRAP. إن المركبات الفينولية المستخلصة من الأوراق الإبرية لشجرة الصنوبر الحلبي لمنطقة الأغواط P1 أعطت مردود عالي مقارنة بالعينة الأخرى.

تراوحت كمية المركبات الفينولية بين  $25.43 \pm 3.07$  و  $72.46 \pm 4.58$  مغ/مغ مكافئ لحمض الغاليك أما بالنسبة للفلافونويدات فتراوح تركيزها ما بين  $0,104 \pm 0,10$  و  $4,059 \pm 1,23$  مغ/مغ مكافئ الكرسيتين. بينت نتائج تقييم الفعالية المضادة للأكسدة بتثبيط الجذور الحرة DPPH و FRAP أهمية كبيرة بالنسبة للعينة P1 مقارنة مع P2.

**الكلمات المفتاحية:** الصنوبر الحلبي, المركبات الفينولية, FRAP, DPPH.

## Résumé :

Dans le cadre de recherche sur les antioxydants naturels, il est intéressée de valoriser certains métabolites secondaires de deux échantillons de la plante *Pinus Halepensis* collectés à Laghouat et à Djelfa par l'évaluation de leurs capacités de piégeage du radical DPPH et de réduction de fer FRAP.

Les résultats obtenus montrent que les composés phénoliques extraient à partir d'aiguilles de *Pinus halepensis* pour la région de Laghouat (P1) à révélé un rendement élevé, comparé à l'échantillon de Djelfa (P2).

Les teneurs en phénols totaux varient entre  $25,43 \pm 3,07$  à  $72,46 \pm 4,58$  mg/g de matière sèche en équivalent d'acide gallique. La concentration la plus élevée est celle enregistrée au niveau de l'extrait Acétate d'éthyle (AcEt). Les concentrations des flavonoïdes varient  $0,104 \pm 0,10$  à  $4,059 \pm 1,23$ mg en équivalent de la quercitine par gramme de la matière sèche.

D'après les tests de DPPH et FRAP, l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits, exprimée par l'EC<sub>50</sub> et l'indice TEAC, montre une activité plus importante pour l'échantillon de Djelfa (P2) et une activité plus faible pour de Laghouat (P1).

**Mots clés :** *Pinus halepensis*, , polyphénols, DPPH, FRAP.

## Abstract:

Within the framework of research on natural antioxidants, it appeared necessary to valorize some secondary compounds of metabolites on two samples of *Pinus halepensis*, collected in Laghouat and Djelfa regions, by evaluating their scavenger capacity of radical DPPH and FRAP.

The results obtained for Laghouat sample (P1) showed high amounts of phenols compounds compared to the other sample (P2).

The total phenols compounds extracted vary from  $25.43 \pm 3.07$  to  $72.46 \pm 4.58$  mg/g dry extract plant equivalent of Gallic acid. The highest concentration is recorded to the level of the Acetic extract (AcEt). On the other side, the content of flavonoids ranged between  $0,104 \pm 0,10$  à  $4,059 \pm 1,23$ mg in equivalent of the quercitine for gram of dry plant extract.

According to the tests of DPPH and FRAP the evaluation of the antioxidant activity of the extracts, expressed by the EC<sub>50</sub> and TEAC showed a more significant activity for the (P2) sample compared to (P1).

**Mots clés :** *Pinus halepensis*, polyphenols, DPPH, FRAP.

# Remerciements

*Notre remerciement s'adresse en premier dieu à Allah le tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il nous a donné durant toutes ces longues années.*

*Ce travail de recherche a été effectué au laboratoire de Biochimie, département de Biologie Université Amar Thelidji – Laghouat., sous la direction de*

*🌿 M. SIFI Ibrahim 🌿*

*Nous tiens particulièrement à remercier mon encadreur M. SIFI Ibrahim pour m'avoir ouvert les portes de la recherche et l'encadrement continu qu'il m'a assuré lors de la réalisation de cette étude. nous lui suis très reconnaissant pour, ses conseils, sa disponibilité, sa patience et surtout son sérieux dans le travail. Nous saisi aussi l'occasion, pour lui exprimer ma reconnaissance et ma gratitude en tant que mon enseignant de la graduation, de la poste graduation, et responsable de la poste graduation.*

*Nos remerciements s'adressent également à toutes les personnes qui ont contribué à l'obtention de ce diplôme sans exception.*

*Nous pensons en particulier à Mr. Gouzi Hicham et Mme. Benarous Kadidja et M. Boukerouis Djoudi et M. Siridi Abdelkader et à tous les enseignants qui nous accompagnent durant ces cinq ans d'étude.*

*Nous remercions aussi les personnes qui nous font l'honneur de participer à notre jury de soutenance.*

*A tous les étudiants de 5<sup>ème</sup> année génie biologie.*

## Dédicace

*A mon père et à ma mère, depuis mes premiers pas à l'école, vous ne vous êtes jamais lassé de me relater l'importance des études. Vous m'avez toujours incité à être assidue, excellente. Votre affection sans limite m'a accompagné tout au long de la réalisation de cet œuvre. Je ne pourrai jamais vous en remercier assez. Puisse ce travail vous combler de joie et d'espoir.*

*Qu'Allah vous garde longtemps parmi nous.*

*A mes frères et leurs femmes*

*A mes sœurs : Aicha et son mari Mohamed Omelkhair, Khaira, Malika, Seaad, Hadjer.*

*A mon chère marie : Mohamad Hicham*

*A ma grande mère.*

*A mes neveux et nièces :*

*Widad, Manal, Zahra, Taher, Nour, Asma, Ihssane, Hamoud, Aya, zakaria, Hanaa et spécialement Ibrahim El-khalil.*

*A mon binôme Farah*

*A mes amis : safia, zahra, fatima ,Imane, Khadra, Saida.*

*Messaouda*



# Dédicace

*Avant tous, je remercie Dieu qui a illuminé mon chemin et qui m'armé de courage pour achever mes études.*

*Je dédie le fruit de ce modeste travail:*

*A ma chère maman:*

*Tu es pour moi un tout et un bijou au qu'elle j'attache un précieux prix e vertu to affection digne d'une mère résolue acquise.*

*A mon père:*

*Ce travail est le fruit de tes sacrifices ton éducation, tes comforts moral et matériel que tu ma apporté.*

*A mes chères frères: Mohamed et sa femme Naima, Ali, Abdelkader et ma petit frère Slimane.*

*A mes chère sœurs : Messaouda et son mari Neuridine, Amal.*

*A mes neveux et nièces :*

*Salsabile, Fatima, Farah, Raime, Deaae*

*A mes grandes mères et grand père.*

*A toute la famille ben mizoura et khouiled*

*A mon binôme messaouda*

*A mes amis : Nadjat, neura, safa, safia, sabrina, fatima, Imane, Khadra, Saida.*

*A tous mes s collègues de la promotion 2014*



**Friha**

# Liste des abréviations

<b>Abs</b>	Absorbance.
<b>AlCl<sub>3</sub></b>	Trichlorure d'aluminium.
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique.
<b>ADN</b>	Acide désoxyribose nucléique.
<b>BHA</b>	Butyl-hydroxy-anisole .
<b>BHT</b>	Butyl-hydroxy-toluène .
<b>CAT</b>	Les catalases.
<b>DPPH</b>	1,1-diphényle-2-dipicrylhydrazyl.
<b>ERON</b>	Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.
<b>ERO</b>	Espèces réactives de l'oxygène.
<b>FRAP</b>	Ferric Reducing/Antioxidant Power.
<b>EAG</b>	Equivalent Acide Gallique
<b>ERN</b>	Espèces Réactives Nitrogénées (RNS)
<b>GPX</b>	Glutathion peroxydase.
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène.
<b>I(%)</b>	Inhibition (pourcentage)
<b>LDL</b>	Lipoprotéines de basse densité (low density lipoprotein)
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Bicarbonates de sodium.
<b>NO•</b>	Monoxyde d'azote ou oxyde nitrique.
<b>OH•</b>	Radical hydroxyle.
<b>ONOOH</b>	Nitroperoxyde.
<b>O<sub>2</sub>•-</b>	Anion superoxyde.
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxygène
<b>PRX</b>	Les peroxyredoxines .
<b>ROS</b>	Espèces réactives oxygénées.
<b>RL</b>	Radical libre.
<b>SOD</b>	Superoxyde dismutase.
<b>Trolox</b>	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

## *Liste des figures*

<b>Figure 1</b> : Notion du stress oxydatif (Smith et al., 2007).....	6
<b>Figure 2</b> : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003).....	9
<b>Figure 3</b> : ROS et Maladies : Les ROS endommagent les protéines, lipides et ADN entraînant des changements de structure et de fonction des structures biologiques et sont impliquées dans de nombreuses maladies (Mohammedi, 2013).....	10
<b>Figure 4</b> : Structure générale des phénols et les différents substituants possibles (R, R1, R2) .....	15
<b>Figure 5</b> : Classification des polyphénols (Bouguendoura, 2011).....	16
<b>Figure 6</b> : Structure de base des flavonoïdes (Derbel et Ghedira, 2005) .....	18
<b>Figure 7</b> : Photos illustres la plante <i>Pinus halepensis</i> .....	19
<b>Figure 8</b> : Carte géographique montrant les deux régions de récolte de l'espèce végétale .....	22
<b>Figure 9</b> : Protocole expérimental exprime les démarches d'extraction des composés phénoliques .....	24
<b>Figure 10</b> : Photo illustre le Rota-vapeur (Original).....	25
<b>Figure 11</b> : Réduction du radical libre DPPH• (Molyneux, 2004) .....	27
<b>Figure 12</b> : hoto illustre les extraits obtenus après l'évaporation par Rota-vapeur.....	30
<b>Figure 13</b> : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (mg/mL).....	31
<b>Figure 14</b> : Courbe d'étalonnage de la quercetin (mg/mL).....	32
<b>Figure 15</b> : Histogrammes présente les teneurs en polyphénols totaux (a) et les flavonoïdes (b) de différents solvants organiques (HEX, DCM, AcET, ACT).....	33
<b>Figure 16</b> : Courbes représente le pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction des concentrations des extraits de plantes (P1 et P2) .....	36
<b>Figure 17</b> : Pouvoir antioxydant de Trolox, Vitamine C et BHA par le test DPPH .....	37
<b>Figure 18</b> : Classement croissant des valeurs EC50 (extraits et standards) .....	38
<b>Figure 19</b> : Courbe représente l'activité antioxydante par test FRAP(l'absorbance des extraits de plante (P1 et P2) en fonction de leurs concentrations) .....	39
<b>Figure 20</b> : Représentation graphique présente la corrélation entre les polyphénols totaux et les valeurs d'EC50 .....	41
<b>Figure 21</b> : Représentation graphique présente la corrélation entre les flavonoïdes et les valeurs d'EC50..	41
<b>Figure 22</b> : Représentation graphique présente la corrélation entre les polyphénols totaux et les flavonoïdes .....	56

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1</b> : Principaux antioxydants endogènes (enzymatiques) et leurs actions .....	12
<b>Tableau 2</b> : Principaux antioxydants exogènes (non enzymatiques) et sources alimentaires associées .....	13
<b>Tableau 3</b> : Activités biologiques de quelques composés phénoliques .....	17
<b>Tableau 4</b> : Domaine d'utilisation de l'espèce <i>Pinus halepensis</i> .....	20
<b>Tableau 5</b> : Situation géographique des deux régions d'études.....	22
<b>Tableau 6</b> : Rendements de l'extraction par les solutions organique de la plante étudiée (P1 et P2).....	30
<b>Tableau 7</b> : Teneur en polyphénols totaux (mg EAG/g de résidu sec) et flavonoïdes (mgEQ/g de résidus sec) de <i>Pinus halenpensis</i> de deux région P1 et P2 .....	32
<b>Tableau 8</b> : Les valeurs EC50 du test DPPH des extraits de plante <i>Pinus halepensis</i> (P1 et P2).....	38
<b>Tableau 9</b> : Les valeurs TEAC du test FRAP des extraits de plante <i>Pinus halepensis</i> (P1 et P2).....	39

# Sommaire

Résumé .....	
Liste des abréviations.....	
Liste des figures.....	
Liste des tableaux.....	
Sommaire.....	

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
---------------------------	----------

---

## CHAPITRE I : Synthèse Bibliographique

---

<b>1. Les plantes et la médecine .....</b>	<b>4</b>
1.1. Historique.....	4
1.2. Définition des plantes médicinales .....	4
1.3. Domaines d'application des plantes médicinales .....	5
1.4. Intérêt de l'étude des plantes médicinales.....	6
<b>2. Le stress oxydatif.....</b>	<b>6</b>
2.1. Définition.....	6
2.2. Origine du stress .....	6
2.3. Les radicaux libres .....	7
2.3.1. Espèces réactives oxygénées (ROS).....	7
2.3.2. Espèces réactives de l'azote (RNS) .....	8
2.4. Les conséquences du stress oxydant .....	8
<b>3. Les antioxydants .....</b>	<b>10</b>
3.1. Définition.....	10
3.2. Utilisation des antioxydants .....	11
3.3. Classification des antioxydants .....	12
3.3.1. Les antioxydants endogènes.....	12
3.3.2. Les antioxydants exogènes.....	13
3.4. Mécanismes d'action des antioxydants .....	13
3.4.1. Antioxydants primaires ou distributeurs de chaîne .....	14
3.4.2. Antioxydants secondaires.....	14
<b>4. Les composés phénoliques ou polyphénols .....</b>	<b>14</b>
4.1. Généralités .....	14
4.2. Les principales classes des composés phénoliques .....	15
4.3. Le rôle des composés phénoliques .....	17
<b>5. Les flavonoïdes.....</b>	<b>18</b>
5.1. Structure chimique .....	18
5.2. Propriétés des flavonoïdes .....	18

<b>6. Etude bibliographique sur l'espèce végétale (<i>Pinus halepensis</i> Mill.)</b> .....	<b>19</b>
6.1. Noms vernaculaires.....	19
6.2. Présentation et description botanique.....	19
6.3. Systématique.....	19
6.4. Utilisations et propriétés biologiques.....	20

---

## **CHAPITRE II : Matériels et Méthodes**

---

<b>1. Objectif</b> .....	<b>22</b>
<b>2. Matériel</b> .....	<b>22</b>
2.1. Matériel végétale (source, récolte, séchage et conservation).....	22
2.2. Produits chimiques.....	23
<b>3. Méthodes de préparation des extraits phénolique</b> .....	<b>23</b>
3.1. Protocole d'extraction.....	23
3.2. Calcule de Rendement.....	25
<b>4. Méthodes de dosage des composés phénoliques</b> .....	<b>25</b>
4.1. Dosage des polyphénols totaux.....	25
4.1.1. Mode opératoire.....	25
4.1.2. La courbe d'étalonnage.....	26
4.2. Dosage des flavonoïdes.....	26
4.2.1. La courbe d'étalonnage.....	26
<b>5. Evaluation de l'activité antioxydants</b> .....	<b>26</b>
5.1. Méthode de piégeage de radical «DPPH'».....	26
5.1.1. Principe de la méthode.....	26
5.1.2. Mode opératoire.....	27
5.2. La méthode FRAP ( <i>Feric Reducing Antioxidant Power</i> ).....	27
5.2.1. Mode opératoire.....	28
<b>6. Etude statistique</b> .....	<b>28</b>

---

## **CHAPITRE III : Résultats et Discussion**

---

<b>1. Résultats du rendement d'extraction</b> .....	<b>30</b>
<b>2. Résultats de dosage des composés phénoliques</b> .....	<b>31</b>
2.1. Teneur en polyphénols totaux.....	31
2.2. Teneur en flavonoïdes.....	32
2.3. Discussion.....	34
<b>3. Résultats du pouvoir antioxydants</b> .....	<b>36</b>
3.1. Test DPPH'.....	36
3.2. Test FRAP ( <i>Ferric Reducing Ability Antioxidant</i> ).....	39
3.3. Discussion.....	40
<b>Conclusion</b> .....	<b>43</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>45</b>
<b>Annexe</b> .....	<b>55</b>

# *Introduction*

## **Introduction**

Un grand nombre de plante, aromatiques, médicinales, des plantes épices et autres, possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent application dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture.

Cependant, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme antioxydante et antimicrobienne, demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquentes ou non connues dans la médecine et les traditions médicinales folklorique. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs. En effet, les métabolites secondaires font et reste l'objet de nombreuses recherches in vivo comme in vitro, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels les composés phénoliques, les saponosides et les huiles essentielles (**Bahorun, 1997**).

D'après longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques, il reste difficile de définir les molécules responsables de l'action bien que certains effets pharmacologiques prouvés sur l'animal aient été attribués à des composés tels que les alcaloïdes et dérivés, des terpènes, stéroïdes et des composés polyphénoliques (**Bahorun, 1997**).

Les métabolites secondaires des plantes se présentent généralement par les huiles essentielles, les alcaloïdes et les composés phénoliques.....ect. Ces derniers sont constitués, en grande partie, des acides phénols simples, des flavonoïdes et des tannins. Les composés phénoliques, tellement sont doués de diverses activités biologiques notamment l'activité antioxydante, ils constituent le centre d'intérêt de plusieurs travaux de recherche.

La reconnaissance des composés phénoliques comme des antioxydants naturels est maintenant bien acquise et est pour une part à l'origine du regain d'intérêt que l'on porte à ces composés dans le domaine de la nutrition et de la pharmacologie. En effet, un très grand nombre de données expérimentales plaide aujourd'hui en faveur de leur implication dans la prévention de diverses pathologies associées au stress oxydant telles que les cancers, les maladies cardio-vasculaires ou maladies inflammatoires (**Macheix et al., 2005**).

Dans ce contexte, notre travail a pour objectif d'évaluer l'activité anti-oxydante des extraits phénoliques des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill de deux régions d'un étage bioclimatique différentes ; « Djelfa » de climat semi-aride et « Laghouat » de climat aride.

Ce travail est subdivisé en trois parties :

- ✓ La première partie consiste à une synthèse bibliographique, dans lequel nous rappelons des généralités sur les plantes médicinales (historique, définition...) et les composés phénoliques (classification, intérêt biologique...), ainsi le stress oxydatif et les antioxydants.
- ✓ La deuxième partie, concerne la partie expérimentale qui se structure en deux volets :
  - Le premier volet concerne la procédure expérimentales menée : extraction et dosage des composés phénoliques de l'espèce *Pinus halepensis*.
  - Le second volet présente l'évaluation de l'activité anti-oxydante des extraits phénoliques en appliquant la méthode du piégeage du radical libre (DPPH') et la méthode de réduction de fer (FRAP).

En fin, La troisième partie a été consacrée à l'interprétation et la discussion des résultats obtenus.

# CHAPITRE I :

---

*Synthèse*

*Bibliographique*

## 1. Les plantes et la médecine traditionnelle

### 1.1. Historique

Des plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeur thérapeutique. Depuis toujours les plantes ont constitué la source majeure de médicaments grâce à la richesse de ce qu'on appelle le *Métabolisme Secondaire*. 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 (8000 ans av. J.C.). L'observation liée à l'expérience et la transmission des informations glanées au cours du temps font que certains hommes deviennent capables de poser un diagnostic, de retrouver la plante qui soigne et finalement de guérir le malade (**Fouché et al., 2000**).

Le soin de la peau a commencé 3.000 ans avant naissance du Christ, quand les Egyptiens ont enregistré en forme hiéroglyphique le soin de la peau sur des peintures de mur de temple (**Dweck, 2002**).

Les grands médecins grecs, dont le plus célèbre est Hippocrate (5<sup>e</sup> siècle av. J.-C.), utilisaient couramment les narcotiques, les laxatifs ou des émétiques (vomitifs). Théophraste (370-285 av. J.-C.) classe les plantes dans son ouvrage *Historia plantarum* (**Fouché et al., 2000**).

A l'apogée de l'empire arabe (dont les frontières allaient de l'Inde à l'Espagne), tous les documents écrits furent réunis à Bagdad dans la plus grande bibliothèque de l'époque (entre le 7<sup>e</sup> et 9<sup>e</sup> siècle). Les Arabes avaient aussi leurs spécialistes en médecine et en pharmacie : Abu Bakr al-Razi ou Rhazès (865-925), fut l'un des grands médecins de son temps et aussi le précurseur de la psychothérapie. Il fut suivi par *Ibn Sina* ou *Avicenne* (980-1037) qui écrivit le "*Canon de la médecine*". Ce livre servira de base à l'enseignement de la médecine dans les universités de Louvain et de Montpellier jusqu'aux environs de 1650. Ibn al Baytar (1197-1248) rédigea le très complet *Somme des Simples* : ce livre contenait une liste de 1400 préparations et plantes médicinales dont un millier étaient connues des auteurs grecs (**Fouché et al., 2000**).

### 1.2. Définition des plantes médicinales

Une plante médicinale est définie par la pharmacopée française note 1 comme une « drogue végétale au sens de la pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses ». Une « drogue végétale » est une plante ou une partie de plante, utilisées en l'état, soit le plus souvent sous la forme desséchée, soit à l'état frais.

L'expression drogue végétale ou, plus couramment, drogue, désigne donc une matière première naturelle servant à la fabrication des médicaments (Mohammedi, 2013).

### 1.3. Domaines d'application des plantes médicinales

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi-synthèse (Bahorun, 1997).

Il y a eu donc un réveil vers un intérêt progressif dans l'utilisation des plantes médicinales dans les pays développés comme dans les pays en voie de développement, parce que les herbes fines guérissent sans effet secondaire défavorable. Ainsi, une recherche de nouvelles drogues est un choix normal (Scientific Correspondence, 2003).

Utilisation en médecine en tant que médicament pour l'homme ; exemple :

- ✓ En urologie, dermatologie, gastrites aiguës, toux, ulcères d'estomac, laxatifs, sommeil et troubles nerveux (Svoboda et Hampson, 1999).
- ✓ Systèmes cardiovasculaires, ex : Flavocoe est un médicament constitué par la flavone non substituée en combinaison avec la rutine et isoquercétine est utile dans le traitement de l'athérosclérose (Narayana et al., 2001).
- ✓ Les maladies du stress, des activités antioxydantes ; tels le thé noir, le thé vert et le cacao sont riches en composé phénoliques, parmi lesquels theaflavine, le resvératrol, le gallate et epigallocatechine procyanidine, très étudiés en raison de leur rôle en tant qu'agents chimiopréventifs basés sur leurs capacités antioxydantes (Lee et al., 2003).
- ✓ En Agriculture exemple : l'arbre *Azadirachta indica*, qui se développe dans tout le sous-continent indien, est une des plantes médicinales les plus importantes au Bangladesh. Les huiles de cet arbre ont des utilisations dans l'agriculture dans le contrôle de divers insectes et nématodes (vers parasites) (Amjad Hossain, 2005).
- ✓ En alimentation assaisonnements, des boissons, des colorants (Svoboda et Hampson, 1999 ; Porter, 2001) et des composés aromatiques (Smallfield, 2001).

## 1.4. Intérêt de l'étude des plantes médicinales

La plupart des espèces végétales contiennent des substances qui peuvent agir, à un niveau ou un autre, sur l'organisme humain et animal. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie. Elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus. La raison fondamentale est que les principes actifs végétaux proviennent de processus biotiques répandus dans tout le monde vivant, alors que l'essentiel des médicaments de synthèse sont des xénobiotiques aux effets secondaires très mal maîtrisés (Iserin et al., 2001).

Les plantes médicinales sont donc importantes pour la recherche pharmaceutique et l'élaboration des médicaments, directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matière première pour la synthèse des médicaments ou comme modèle pour les composés pharmaceutiques actifs (Decaux, 2002).

## 2. Le stress oxydatif

### 2.1. Définition

Le stress oxydatif est le déséquilibre entre la génération des ERO et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (Boyd et al., 2003). Il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire (Morel et Barouki, 1999). (Figure 1)

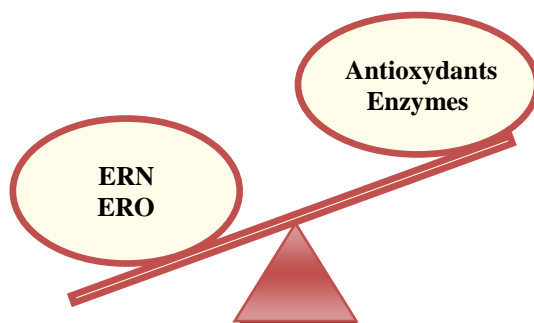


Figure 1 : Notion du stress oxydatif (Smith et al., 2007)

### 2.2. Origine du stress

Les radicaux libres (RL) sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans les 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 » (Favier, 2003).

### 2.3. Les radicaux libres

Un radical libre (RL) est une espèce chimique (atome, molécule, fragment de molécule) capable d'exister sous forme indépendante, contenant au moins un électron libre sur sa couche externe (ou contenant deux électrons de même spin dans une case quantique), ce qui augmente considérablement sa réactivité par nécessité de se combiner avec un autre électron pour atteindre la stabilité selon un phénomène d'oxydation (**Finaud et al., 2006, Mac Laren 2007**). Sa durée de vie est très courte et il est symbolisé par un point qui indique où l'électron libre se situe (Exemple : OH<sup>•</sup>) (**Mac Laren 2007 ; Sayre et al. 2008 ; Goto et al., 2008**).

Les radicaux libres peuvent être formés par trois procédés :

- 1) Addition d'un électron libre à un non radical ( $\text{NR} + e^- \rightarrow \text{R}^\bullet$ )
- 2) Perte d'un électron par un non radical ( $\text{NR} - e^- \rightarrow \text{R}^\bullet$ )
- 3) Scission homolytique d'une liaison covalente ( $\text{A} : \text{B} \rightarrow \text{A}^\bullet + \text{B}^\bullet$ ).

#### 2.3.1. Espèces réactives oxygénées (ROS)

Les espèces réactives oxygénées peuvent être définies comme des molécules qui contiennent de l'oxygène et sont plus réactives que l'oxygène présent dans l'air. Les EOA incluent les RL et des composés réactifs oxydants non radicalaires (sans électrons libres dans leur couche externe) (**Mac Laren, 2007**). Les ROS comprennent le radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>), l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et l'oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). En raison de leur extrême réactivité, les radicaux hydroxyles (OH<sup>•</sup>) sont les ROS les plus toxiques.

#### *Caractéristiques biologiques*

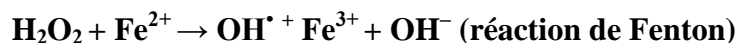
- ✓ Le radical hydroxyle réagit presque sans distinction avec les acides gras, les protéines, les sucres (notamment les riboses qui structurent l'ADN et l'ARN) (**Badwey et Karnovsky, 1979**).
- ✓ Le peroxyde d'hydrogène a une réactivité moins importante que le radical hydroxyle, mais cela n'en fait pas une molécule inoffensive pour autant (**Halliwell et Gutteridge, 1999**).
- ✓ La durée de vie relativement longue du radical superoxyde a été mise à profit par les êtres vivants : il est par exemple utilisé comme messager lors de l'apoptose, et joue un rôle important dans l'agrégation plaquettaire (**Gardès-Albert et al., 2003**).

### 2.3.2. Espèces réactives de l'azote (RNS)

Le monoxyde d'azote (NO<sup>•</sup>) est issu de l'oxydation de l'un des azotes terminaux de l'acide aminé L-Arginine. NO<sup>•</sup> peut réagir avec une grande variété de substances et de radicaux libres et conduire, par exemple après réaction avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, à la formation de nitrite (NO<sup>2-</sup>) ou de nitrate (NO<sup>3-</sup>). Le peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>) est formé suite à la réaction entre O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et NO<sup>•</sup> (**Huie et Padmaja, 1993**). La forme protonnée du radical peroxy-nitrite (ONOOH) est un puissant agent oxydant causant des dommages importants similaires à ceux observés avec OH<sup>•</sup> (**Jourd'heuil et al., 1997**).

La respiration cellulaire au niveau de la mitochondrie constitue une des sources d'EOA, dans les conditions physiologiques, un faible pourcentage de l'oxygène échappe à la réduction à 4 électrons, la réduction mono-conduite à la formation électronique d'anion super-oxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) et par voie conséquence à la formation en cascade tous les autres oxydants :

- ✓ L'O<sub>2</sub><sup>-</sup> ainsi formé converti en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) grâce à l'action catalytique du superoxyde dismutase (**Fridovich, 1989**).
- ✓ En présence de fer, O<sub>2</sub><sup>-</sup> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peuvent être interagir pour former le radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) (**Griendling et al., 2000**).



L'anion super-oxyde peut être également réagir directement avec la forme réactive azotée (NO) (monoxyde d'azote) pour donner le peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>) (**Beckman et Kappenol, 1996**).

### 2.4. Les conséquences du stress oxydant

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (Figure 2) : oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides et des glucides.

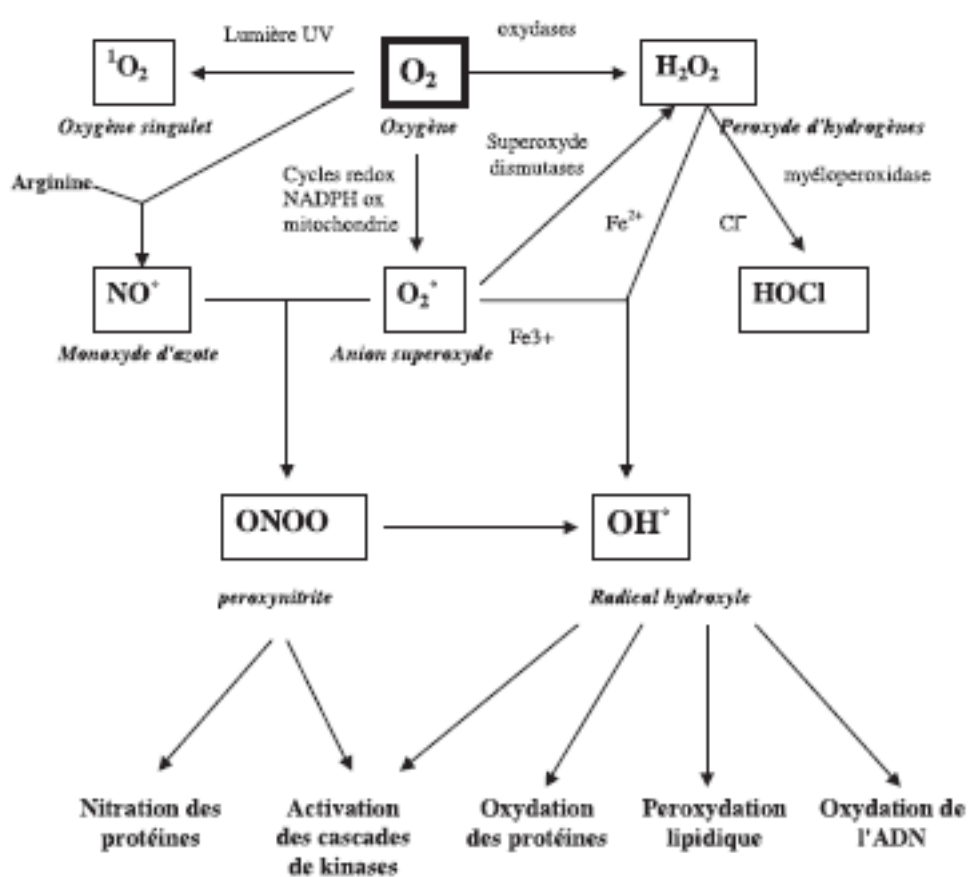
Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle, réaction appelée peroxydation lipidique. Les conséquences seront différentes : l'attaque des lipides circulants aboutissant à la formation de LDL oxydées qui, captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires, l'attaque des phospholipides

membranaires modifiant la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux (Favier, 2003).

Les radicaux libres peuvent induire des effets mutagènes ou l'arrêt des réplifications de l'ADN. Ils agissent en provoquant des altérations de bases, des pontages ADN-protéines ou des ruptures de brins (Hadi, 2004). Ils inhibent la sécrétion d'insuline (Krippeit-Drews et al., 1994), modifient les structures primaire, secondaire et tertiaire des protéines (Pincemail et al., 1999)

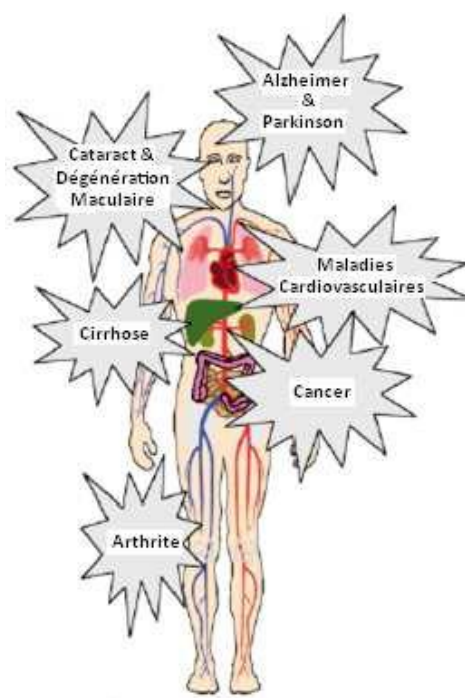
Par ailleurs, le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques, en présence de traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes,  $H_2O_2$  et  $OH^\bullet$ , qui entraîneront la coupure de protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde.

Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (Favier, 2003).



**Figure 2 :** Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Favier, 2003)

Le stress oxydant, principale cause initiale de plusieurs maladies (figure 3) : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré, le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Favier, 2003), maladie de Parkinson, les inflammations gastro-intestinale, ulcères (Atawodi, 2005), les oedèmes et vieillissement prématuré de la peau (Georgetti et al., 2003). La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux.



**Figure 3 :** ROS et Maladies : Les ROS endommagent les protéines, lipides et ADN entraînant des changements de structure et de fonction des structures biologiques et sont impliquées dans de nombreuses maladies (Mohammedi, 2013)

### 3. Les antioxydants

#### 3.1. Définition

Le terme « antioxydant » a été formulé comme « une substance qui en faibles concentrations, en présence du substrat oxydable, ralentit ou empêche significativement l'oxydation des substrats matériels » définit les antioxydants comme substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques, endogènes ou exogènes.

Les systèmes de défense contre les dommages induits par ROS/RNS sont classés dans trois catégories : Les antioxydants préventifs qui suppriment la formation de radicaux libre, les antioxydants piègeurs de radicaux, qui inhibent ou empêchent le déclenchement des réactions en chaîne et arrêtent la propagation et les antioxydants impliqués dans des processus de réparation (**Vansant, 2004**).

### 3.2. Utilisation des antioxydants

La présence des « *antioxydants* » aident à contribuent la réduction des pathologies en neutralisant les *radicaux libres* qui sont produits par oxydation dans les tissus gras présent dans l'organisme aux niveaux de plusieurs systèmes (la peau, les poumons, les conduits sanguines,...), Ces derniers sont affectés par la réaction de réduction des radicaux libres ou ils ont cumulatives ce qui peut engendrer les maladies dégénératives suivantes :

- ✓ Cataractes.
- ✓ Arthrite.
- ✓ Vieillessement
- ✓ Maladies cardio-vasculaires
- ✓ Problèmes pulmonaires
- ✓ Certains cancers

La neutralisation des radicaux libres par les antioxydants pu traduit par :

- ✓ Combat l'effet nocif des radicaux libres
- ✓ Stimulant immunitaire
- ✓ Prévient plusieurs formes de cancers
- ✓ Retarde le processus du vieillissement
- ✓ Accélère la guérison des plaies
- ✓ Prévient les dommages cellulaires
- ✓ Protège contre les maladies cardio-vasculaires
- ✓ Protège contre les allergies
- ✓ Désintoxique (**Zoubeidi, 2004**).

Il aussi utilisée :

- ✓ Dans l'industrie chimique : pour éviter le durcissement du caoutchouc ou en métallurgie pour protéger les métaux de l'oxydation ;
- ✓ Dans l'industrie agro-alimentaire : pour éviter le rancissement des corps gras.

Dans l'industrie teinturerie : pour éviter l'oxydation des colorants au soufre ou des colorants de cuve lors de la teinture (**Kahina, 2011**).

### 3.3. Classification des antioxydants

#### 3.3.1. Les antioxydants endogènes

Ce sont des enzymes ou protéines antioxydants (Superoxyde dismutase, Catalase, Glutathion peroxydase et peroxyredoxines) (Tableau 1), élaborés par notre organisme avec l'aide de certains minéraux. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge (**Mik et al., 2004**).

- ✓ Les *Super-Oxydes Dismutases* (SOD) : diminue la durée de vie de l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  (**Arora et al., 2002**).
- ✓ Les *Catalases* (CAT) : transforme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en simple molécule d'eau (**Arora et al., 2002**).
- ✓ *Glutathion Peroxydase* (GPX) : détruit le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes lipidiques.
- ✓ Les *Peroxyredoxines* (PRX), aussi appelées thiorédoxines peroxydases, sont des peroxydases non-hémiques contenant un résidu cystéine au niveau de leur site catalytique. Les PRX sont des éléments essentiels du système de détoxication des espèces réactives de l'oxygène.

**Tableau 1** : Principaux antioxydants endogènes (enzymatiques) et leurs actions

Antioxydant	Phase	Action
<i>Superoxyde dismutase (SOD)</i>	Hydrophile	Dismutase d' $O_2^{\cdot-}$ en $H_2O_2$ et $O_2$
<i>Catalase</i>	Hydrophile	Dismutase d' $H_2O_2$ en $H_2O$ et $O_2$
<i>Glutathion peroxydases (GPX)</i>	Hydrophile ou lipophile	Réduction de R-OOH en R-OH
<i>Peroxyredoxines (PRX) (Thiorédoxines)</i>	Hydrophile	Réduction de R-S-S-R en R-SH
<i>Sélénium</i>	Amphiphile	Constituant de la GPX et Thiorédoxines

**3.3.2. Les antioxydants exogènes**

Ils sont présents dans l'alimentation tels que les vitamines A, C, E et les polyphénols en particulier les flavonoïdes, ainsi que les cofacteurs des enzymes impliquées dans les systèmes antioxydants endogènes comme le sélénium, le zinc et le manganèse (Tableau 2).

Ces antioxydants nutritionnels sont indispensables mais leur action est limitée jusqu'à ce qu'ils soient régénérés.

**Tableau 2 :** Principaux antioxydants exogènes (non enzymatiques) et sources alimentaires associées

<b>Principaux nutriments antioxydants</b>	<b>Protège contre</b>	<b>Sources alimentaires</b>
<i>Vitamine C</i>	Les maladies cardio-vasculaires, les cataractes, et certains types de cancer	Agrumes, tomate, melon, fraise, kiwi, poivron, brocoli
<i>Vitamine E</i>	Les maladies cardiaques et cancer de la prostate, ralentit la maladie d'Alzheimer	Noix et graines, huiles, fruits et Légumes
<i>Caroténoïdes</i>	Les cancers, en particulier le cancer du poumon, et les maladies cardiovasculaires	Carotte, patate douce, courge, brocoli, chou frisé, épinard ; fruits : abricot, pêche
<i>Flavonoïdes</i>	Cancer	Bleuet, cerise, canneberge, mûre, cassis, prune, raisin rouge
<i>Sélénium</i>	Réduction de l'incidence des cancers de la prostate, du côlon et du poumon	Céréales complètes, noix, oignon, ail, volaille, viande

**3.4. Mécanismes d'action des antioxydants**

Il y a deux options pour retarder la réaction d'oxydation :

- ✓ Soit intercepter les radicaux libres responsables de la réaction en chaîne.
- ✓ Soit éviter la décomposition des hydro-péroxydes dans les radicaux libres.

Ces deux options fournissent la base de classification des antioxydants sous forme primaire ou secondaire selon leur mécanisme d'action.

### 3.4.1. Antioxydants primaires ou distributeurs de chaîne

Ils sont caractérisés par la possession d'atomes d'hydrogènes faibles à soustraire. Ces antioxydants jouent le rôle d'évacuateurs de radicaux. Dès lors qu'ils fonctionnent au stade de la propagation, leur action est essentiellement palliative. On notera bien que les antioxydants primaires sont consommés au cours de la transformation. Les phénols, dont l'activité stérique est réduite, et les amines aromatiques secondaires constituent les deux classes chimiques les plus importantes dans cette catégorie.

### 3.4.2. Antioxydants secondaires

Ils fonctionnent au moyen de la décomposition des hydro-péroxydes en produits inertes, et évitent ainsi ou ralentissent le taux d'initiation de la chaîne. Pour cette raison, on fait parfois référence aux antioxydants secondaires sous le nom d'antioxydants préventifs. Les antioxydants secondaires sont presque toujours utilisés en conjonction avec les antioxydants primaires, ils sont connus également sous le nom d'agents synergiques. Les phosphites et les thioesters constituent les deux types chimiques les plus importants au sein de cette catégorie. (Kouame, 2004).

## 4. Les composés phénoliques ou polyphénols

### 4.1. Généralités

Les composés phénoliques ou « polyphénols » constituent un large ensemble de métabolites secondaires ubiquitaires chez toutes les plantes du royaume végétal, de plusieurs milliers de molécules de structure très diversifiée (Hennebelle et al., 2004 ; Macheix et al., 2005 ; Mohammedi, 2005 ; Boudet, 2007 ). De point de vue structural, elles possèdent toutes au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de substituant hydroxylés (OH) (figure 4) (Hennebelle et al., 2004 ; Proestos et al., 2004 ; Mohammedi, 2005 ).

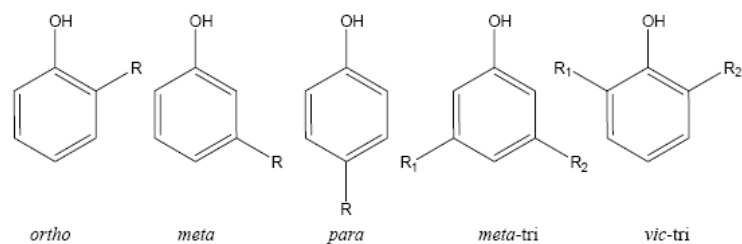
Il est à noter que parmi les composés phénoliques il y a ceux qui ne comportent, en fait, aucun hydroxyle libre, de même qu'on peut signaler la présence de fonctions phénoliques chez des composés naturels appartenant à d'autres groupes phytochimiques (terpènes et alcaloïdes) (Hennebelle et al., 2004).

Certains composés phénoliques sont largement distribués dans tous les organes végétaux : feuilles, racines, écorces et fleurs, comme l'acide chlorogénique, mais la distribution de plusieurs autres est restreinte à certains genres, ce qui constitue un bon outil

pour les études chimio-taxonomiques des végétaux (Boudet, 2007). On peut les trouver, dans ces organes, souvent sous forme glycosylée ou estérifiée, plutôt que sous forme libre (Proestos et al., 2004 ; Vermerris et Nicholson, 2006), c'est la raison pour laquelle que ces composés sont très hydrosolubles (Proestos et al., 2004).

De point de vue biosynthétique, les polyphénols résultent de deux voies synthétiques : la voie de shikimate et celle de l'acétate. Plusieurs classifications peuvent être apportées à ces composés, selon leur structure chimique de base. Ils peuvent être subdivisés en plusieurs classes, allant de molécules simples, telles que les acides phénoliques, aux composés fortement polymérisés, tels que les tanins (Mohammedi, 2005).

Ces métabolites suscitent actuellement beaucoup d'intérêt en raison du bénéfice qu'ils pourraient apporter en terme des propriétés préventives vis-à-vis les maladies (Hennebelle et al., 2004) ou de leur large impact dans les secteurs agro-industriels et alimentaires (Boudet, 2007).



**Figure 4 :** Structure générale des phénols et les différents substituants possibles (R, R1, R2)

#### 4.2. Les principales classes des composés phénoliques

Les polyphénols constituent l'un de nombreux groupes de substances largement distribués dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connues. Ces composés ont connus ces dernières décennies un engouement important dans le cadre de ce que l'on appelle la nouvelle pharmacie qui consiste à faire un traitement préventif et non curatif.

Les polyphénols sont principalement classés en deux grandes familles : les acides phénoliques et les flavonoïdes. Ils sont probablement les composants naturels les plus répandus dans la nature et de ce fait sont des éléments faisant partie de l'alimentation animale (Haslam, 1989).

Les différentes classes de ces composés phénoliques, sont représentées dans la Figure 5.

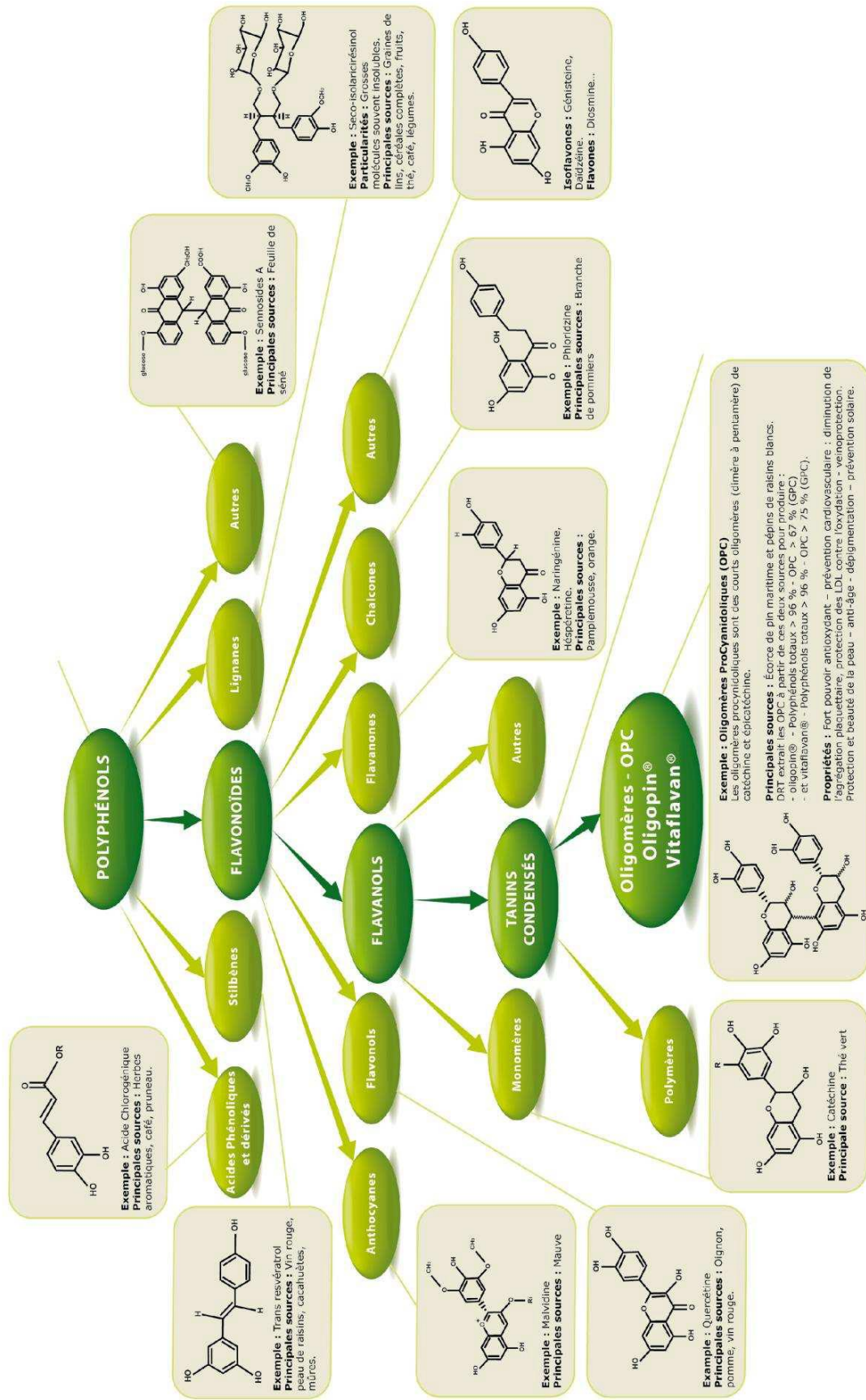


Figure 5 : Classification des polyphénols (Bouguendoura, 2011)

### 4.3. Le rôle des composés phénoliques

Le rôle des composés phénoliques est maintenant reconnu dans différents aspects de la vie. Ils peuvent en effet intervenir dans certains aspects de la physiologie de la plante et dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies, en raison de leur action possible avec de nombreuses enzymes (**Gentiana, 2002**).

De nombreuses études ont montré que les polyphénols renforcent nos défenses naturelles en protégeant les constituants tissulaires (lipides et autres macromolécules) contre le stress oxydant ainsi les diverses maladies chroniques associées, telles que les cancers, les maladies cardio-vasculaires ou la ostéoporose. Les polyphénols sont en effet capables d'abaisser la pression artérielle et inhiber la prolifération des cellules immunitaires. Ils ont ainsi été décrits comme étant des antioxydants, des anti-inflammatoires, des anti-thrombotiques et des anti-tumoraux (**Giner -Chavez, 1996**).

Le tableau 3 illustre les Activités biologiques des différentes classes de polyphénols

**Tableau 3 :** Activités biologiques de quelques composés phénoliques

Composés phénoliques		Activité biologique
<i>Acides Phénols</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acide Cafeique</li> <li>• Acide salicylique</li> </ul>	Antibactérienne Antifongique Antioxydant
<i>Flavonoïdes</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lutéoline</li> <li>• Catéchine</li> <li>• Hespéridine</li> <li>• Quercétine</li> <li>• Naringénine</li> </ul>	Anti-tumorale Anti-carcinogène Anti inflammatoire Antioxydant Antiallergique Antiulcéreuse Antivirale Antimicrobienne, hypotenseur diurétique
<i>Tanins</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tanin gallique</li> <li>• Proanthocyanidine</li> </ul>	Effet stabilisant sur le collagène Antioxydant Anti-diarrhéique Effet antiseptique Effet vasoconstricteur
<i>Coumarines</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dicoumarol</li> </ul>	Anticoagulant Antioxydant, protectrice Vasculaire et antioedémateuse

(Bruneton, 2009 ; Hennebelle, 2006)

## 5. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une des mieux classes diverses et étudiées des polyphénols naturelles qui sont présents abondamment dans des divers tissus végétaux. L'ensemble des flavonoïdes, de structure générale en C<sub>15</sub>, se compose de deux cycles aromatiques (A et B), relié par trois atomes de carbone (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) (Figure 6), comprend à lui seul plusieurs milliers de molécules regroupées en plus de dix classes dont certaines ont une très grande importance biologique et technologique (Macheix et al., 2005 ; Tarahovsky et al., 2014).

### 5.1. Structure chimique

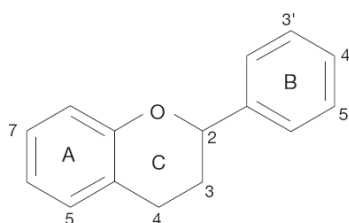


Figure 6 : Structure de base des flavonoïdes (Derbel et Ghedira, 2005)

Il y a six classes des flavonoïdes, qui diffèrent par leur structure chimique : flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones et anthocyanidines (Medić-Šarić et al., 2004)

### 5.2. Propriétés des flavonoïdes

Il est important de noter, que les flavonoïdes sont rencontrés dans les fruits et les légumes, et ils constituent des pigments responsables de colorations jaune, orange et rouge des différents organes végétaux (Marais et al., 2006 ; Buer et al., 2010). Les travaux sur les flavonoïdes confirment leurs diverses propriétés antioxydantes, vasculoprotectrices et hépatotoxiques (Nijveldt et al., 2001 ; Ghedira, 2005).

Des études chez l'homme, ont permis de montrer que les flavonoïdes, et notamment les isoflavones contenus dans le soja, permettent de réduire le taux du mauvais cholestérol (Hubert, 2006). Les flavonoïdes sont très utilisés pour leurs importants bénéfices, par exemple les citroflavonoïdes (provenant de divers citrus).

Ces bioflavonoïdes sont riches en rutine, hespéridine, éryodyctol et naringénine. Les citroflavonoïdes présentent des propriétés antioxydantes qui agissent en synergie avec la vitamine C, ces composés empêchent les réactions inflammatoires en plus de leur action antioxydante. Cela a été démontré à la fois *in vitro* et *in vivo* (Edeas, 2007).

## 6. Etude bibliographique sur l'espèce végétale (*Pinus halepensis* Mill.)

### 6.1. Noms vernaculaires

- *Nom français* : Pin d'Alep
- *Nom anglais* : Aleppo pine
- *Nom arabe* : الصنوبر الحلي

### 6.2. Présentation et description botanique

C'est un arbre toujours vert (Figure 7) , vivace, de 5 à 20 mètres de haut, à écorce lisse, grise argentée au début puis épaisse et crevassée tournant au rouge-brun avec les années, a bourgeons non visqueux, au feuillage vert clair léger et aéré. Les feuilles ou aiguilles de 6-10 cm de long pour 1 mm de large, sont fines, molles, lisses et aigues, groupées par 2 en pinceaux à l'extrémité des rameaux( **Yahiaoui et Aidel, (2012).**



Figure 7 : Photos illustres la plante *Pinus halepensis*

### 6.3. Systématique

La systématique de l'espèce *Pinus halepensis* a été établie selon (**Beloued, 2001**).

<b>Règne</b>	<i>Plantae</i>
<b>Sous- règne</b>	<i>Tracheobionta</i>
<b>Embranchement</b>	<i>Spermaphytes</i>
<b>Sous- embranchement</b>	<i>Gymnospermes</i>
<b>Classe</b>	<i>Pinopsida</i>
<b>Ordre</b>	<i>Coniferales</i>
<b>Famille</b>	<i>Pinaceae</i>
<b>Sous- famille</b>	<i>Pinoideae</i>
<b>Genre</b>	<i>Pinus</i>
<b>Espèce</b>	<i>halepensis</i> Miller, 1768 subsp. <i>Halepensis</i>

#### 6.4. Utilisations et propriétés biologiques

L'utilisation de L'espèce *Pinus halepensis* dans plusieurs domaines (pharmaceutique, cosmétique, agriculture, industries alimentaire) a été citée par plusieurs auteurs (Nahal, 1986 ; Rohdewald, 2002 ; Maester et al., 2003 ; Vuorela et al., 2005 ; Guri et al., 2006 ; Kadri et al., 2013).

Le tableau ci-dessous résume les différents domaines d'application de cette espèce :

**Tableau 4 :** Domaine d'utilisation de l'espèce *Pinus halepensis*

Domaine d'application	Utilisations
Parfumerie / Cosmétique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Décoction de fruits blondi les cheveux</li> <li>• Fleurs et résine utilisées en parfumerie</li> <li>• Utilisation de 'l'eau d'ange', essence aromatique</li> <li>• Peu appréciée en parfumerie</li> </ul>
Pharmacologie / Médecine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Régulation du rythme cardiaque</li> <li>• Les feuilles ont un effet diaphorétique</li> <li>• Utilisée pour les problèmes de voies respiratoires</li> <li>• Propriétés antibactériennes</li> <li>• Utilisée pour lutter contre l'artériosclérose</li> <li>• Traitement des crampes abdominales</li> <li>• Traitement externe contre les rhumatismes</li> <li>• Racines utilisées pour cataplasmes anti-infectieux</li> </ul>
Agriculture	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilisé pour fabriquer des petits abris agricoles</li> <li>• Utilisée pour la trufficulture</li> <li>• Fut utilisé pour tenter de remplacer le coton</li> <li>• Bois utilisé pour la fabrication de piquets</li> <li>• Production de biocarburant</li> </ul>
Industries	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilisé pour faire des contreplaqués</li> <li>• Utilisée comme fibre végétale</li> <li>• Racines utilisées pour le tannage des cuirs</li> <li>• Bois d'industrie</li> </ul>
Alimentaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chair très consommée en Méditerranée</li> <li>• Utilisé pour parfumer le café par les Bédouins</li> <li>• Utilisation dans la soupe de poisson de roche</li> <li>• Fabrication de poison par fermentation des baies</li> <li>• Feuilles consommées en salade ou en légumes</li> <li>• Fruits utilisés comme colorant naturel</li> </ul>

# CHAPITRE II :

---

## *Matériels et Méthodes*

## 1. Objectif

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Biochimie, département de Biologie Université Amar Thelidji – Laghouat. Le présent travail a pour objectif d'évaluer l'activité anti-oxydante des extraits phénoliques des aiguilles de *Pinus halepensis* (les feuilles) par le biais de deux méthodes : la méthode de piégeage des radicaux libres « DPPH » et la méthode de réduction de fer « FRAP ».

Le matériel et les méthodes expérimentales utilisées dans ce travail, sont décrits comme suit.

## 2. Matériel

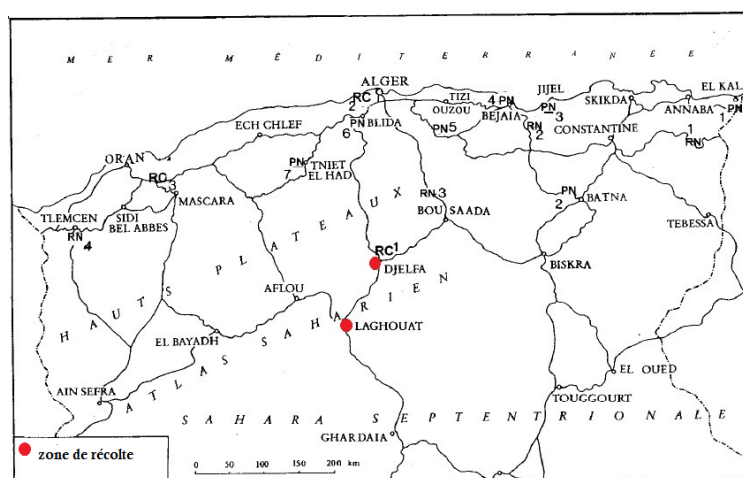
### 2.1. Matériel végétale (source, récolte, séchage et conservation)

La récolte de nos échantillons (feuilles de *Pinus halepensis*) a été faite au mois Février 2014, sur deux régions d'études : *Laghouat* (P1) , *Djelfa* (P2) (Figure 8).

**Tableau 5 :** Situation géographique des deux régions d'études

Région	Altitude	Latitude	Longitude	Etage bioclimatique
<i>Laghouat</i>	765m	33° 46' N	002-56 E	Aride
<i>Djelfa</i>	1140m	34°41' N	002-15 E	Semi-aride

Après chaque récolte, la matériel végétale est nettoyée (débarassé de ses débris) , étalé sur papier et laisse sécher à température ambiante, dans une pièce aérée, à l'abri de humidité et de la lumière. Une fois séché, il est conserve dans des sacs en papier jusqu'au moment de l'extraction.



**Figure 8 :** Carte géographique montrant les deux régions de récolte de l'espèce végétale

## 2.2. Produits chimiques

Les produits chimiques utilisés dans notre travail sont les suivants :

- |   |  |
|---|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> Hexane (HEX)            | <input checked="" type="checkbox"/> Folin-Ciocalteu                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dichlorométhane (DCM)   | <input checked="" type="checkbox"/> Carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) |
| <input checked="" type="checkbox"/> Acétate d'éthyle (AcEt) | <input checked="" type="checkbox"/> Trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ )      |
| <input checked="" type="checkbox"/> Acétone (ACT)           | <input checked="" type="checkbox"/> Acide gallique                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> Méthanol                | <input checked="" type="checkbox"/> Quercétine                                       |

## 3. Méthodes de préparation des extraits phénolique

Cette étape consiste à extraire le maximum de molécules polyphénoliques contenues dans les parties aériennes de la plante en utilisant des solvants organiques qui accélèrent et augmentent le rendement d'extraction.

Pour une bonne démarche et une manipulation plus aisée, nous avons choisi des lettres pour nommer la plante étudiées d'où : P<sub>1</sub> et P<sub>2</sub> signifie le *Pinus halepensis* (P1) : région de Laghouat, (P2) : région de Djelfa.

### 3.1. Protocole d'extraction

L'extraction est effectuée comme décrit dans les travaux de (Diallo, 2004). On commençant par macération de 10g de chaque plante coupée en petit morceaux (P<sub>1</sub> et P<sub>2</sub> séparément) dans de 100 ml des solvants à polarité croissante (l'Hexane (HEX) ; Dichlorométhane (DCM) ; Acétate d'éthyle (AcEt) et l'Acétone (ACT) respectivement. cette macération est répétée 2 fois en renouvelant le solvant chaque 24 heures. Les macérations (HEX ; DCM ; AcEt ; ACT) sont réunies séparément et filtrées à l'aide de papier filtre ; puis l'extrait brut est évaporées à sec sous pression réduite à 45°C par le rota-vapeur.

Le schéma ci-dessous (figure 9) représente le protocole d'extraction des composées phénoliques.

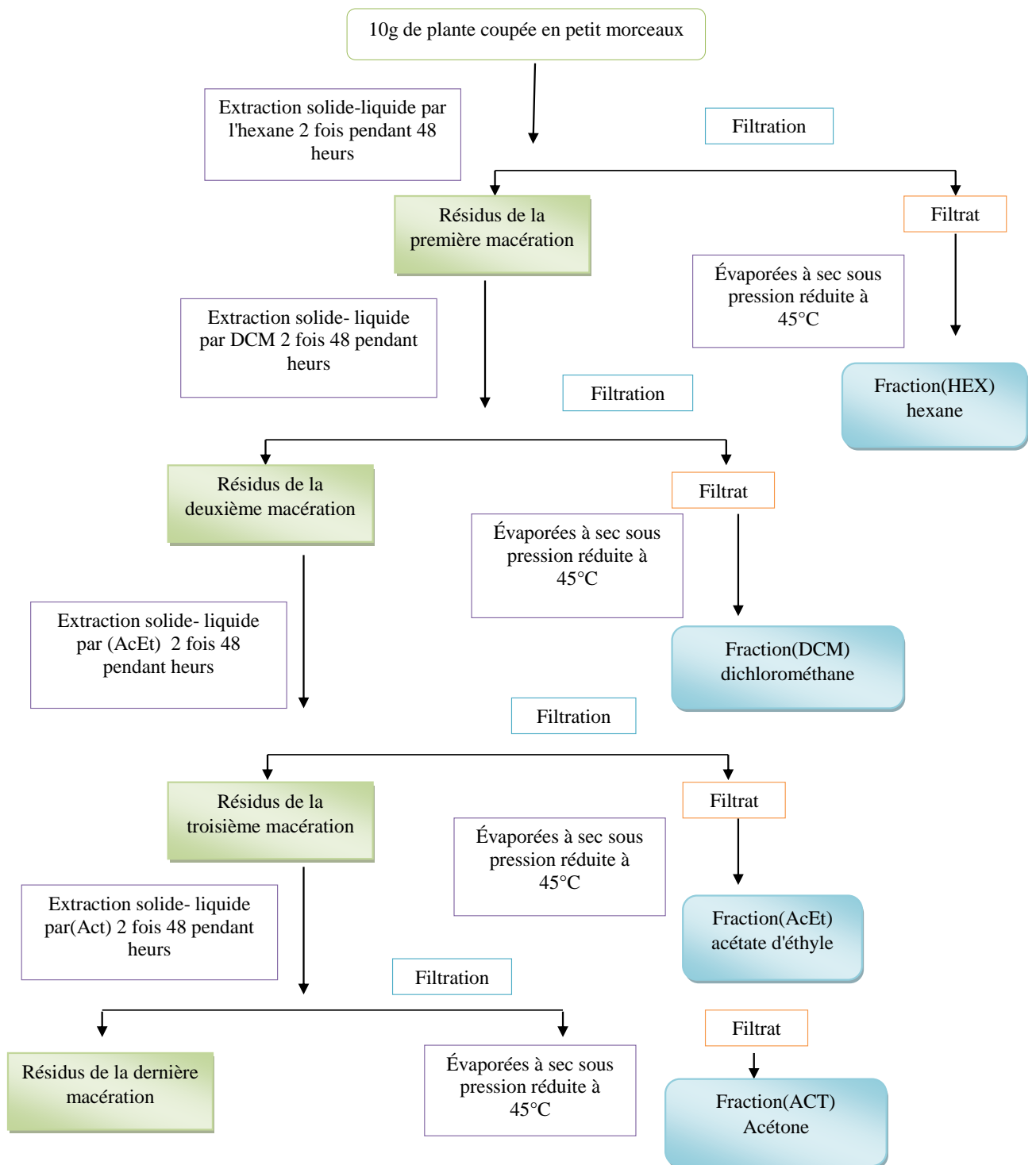


Figure 9 : Protocol expérimental exprime les démarches d'extraction des composés phénoliques

### 3.2. Calcul de Rendement

Le pourcentage en extrait bruts sec des fractions phénoliques ont été calculé par la formule suivante :

$$R\% = \frac{m}{m_0} \times 100$$

- ✓ **R %** : Rendement exprimé en %.
- ✓ **m** : Masse en gramme de l'extrait sec résultant
- ✓ **m<sub>0</sub>** : Masse en gramme du matériel végétal à traiter



Figure 10 : Photo illustre le Rota-vapeur (Abdi et Ben maizoura 2014).

## 4. Méthodes de dosage des composés phénoliques

### 4.1. Dosage des polyphénols totaux

Tout le contenu phénolique dans l'extrait brut de (P1) et (P2) a été déterminé par spectrophotomètre au biais de la méthode *Foline-Ciocalteu*, rapportée dans **Slinkard et Singleton 1977**, le réactif est formé d'acide phosphotungestique  $H_3PW_{12}O_{40}$  et d'acide phosphomolybdique  $H_3PM_{12}O_{40}$ , qu'ils sont réduits lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène (**Giner-Chavez, 1996**).

#### 4.1.1. Mode opératoire

20 $\mu$ L pour chaque solution des fractions (**P1, P2**) et 1,58 ml d'eau distillée sont ajouté à 100 $\mu$ L de réactif de *Foline-Ciocalteu*, après 3min d'incubation, 300 $\mu$ L de la solution  $Na_2CO_3$  (20%) est ajouté ; la solution final est incubée pendant 30min à 40°C. L'absorbance a été déterminé à  $\lambda = 765$  nm contre le blanc (20 $\mu$ L MeOH).

#### 4.1.2. La courbe d'étalonnage

Une courbe d'étalonnage standard a été obtenue à partir des solutions d'acide gallique de concentrations allant de 0, 25 g/l jusqu'à 1 g/l, (même Protocole des échantillons).

#### 4.2. Dosage des flavonoïdes

Le contenu total en flavonoïdes a été déterminé en adoptant le procédé modifié, décrit par **Kumaran et Karunakaran (2007)**. Le mélange est composé de 20 $\mu$ L de l'échantillon, 0,980  $\mu$ L de MeOH, 1ml d' $AlCl_3$  préparé dans le MeOH. Le blanc contient 20 $\mu$ L de l'extrait, 1,98  $\mu$ L de MeOH, le tout a été incubé pendant 15min à l'obscurité. L'absorbance a été mesurée à  $\lambda = 420$  nm.

##### 4.2.1. La courbe d'étalonnage

La quercétine a été utilisée comme étalon pour tracer la courbe d'étalonnage. Une solution mère de concentration 0,5g/l préparée dans le MeOH a été diluée pour obtenir des solutions filles de concentrations différentes variant entre 0,1g/l et 0,5g/l.

### 5. Evaluation de l'activité antioxydants

L'évaluation de l'activité anti-oxydante des composés phénoliques font généralement intervenir à la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'un antioxydant. Parmi ces techniques d'analyse on a utilisé le test DPPH $\cdot$  (2,2 diphenyle-1-picryl-hydrazyle) (le transfert d'atome d'hydrogène), et FRAP jouent sur la réduction du fer pour différentes concentrations de l'extrait (transfert d'un simple électron) et une comparaison avec des antioxydants synthétiques Trolox ; BHA et Vitamine C (**Sanchez-Moreno, 2002 ; Huang et al., 2005**).

#### 5.1. Méthode de piégeage de radical «DPPH $\cdot$ »

##### 5.1.1. Principe de la méthode

La méthode est basée sur la réduction de la solution alcoolique de DPPH $\cdot$  en présence d'un donneur d'hydrogène H $\cdot$  (le cas d'un antioxydant). La solution de DPPH $\cdot$  montre une forte bande d'absorption à 517 nm, avec une couleur violet foncé et qui se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie (figure 11). La décoloration qui en résulte est stœchiométrique ; elle concerne le degré de réduction. Le DPPH $\cdot$  restant, mesuré après un certain temps, correspond inversement à l'activité de piégeage des radicaux libres par

l'antioxydant (Brand-Williams *et al.*, 1995 ; Cuendet *et al.*, 1997 ; Burits et Bucar, 2000 ; Mensor *et al.*, 2001 ; Molyneux, 2004 ; Tepe *et al.*, 2005).

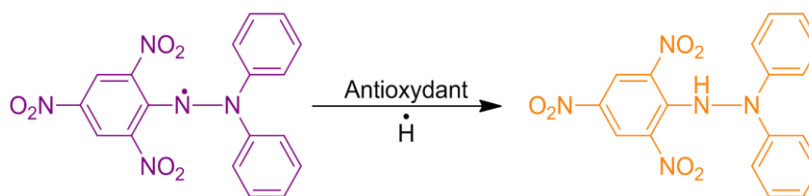


Figure 11 : Réduction du radical libre DPPH• (Molyneux, 2004)

### 5.1.2. Mode opératoire

Un volume de 100µL, de chaque solution fille (fractions d'extrait brut), récemment préparée dans le MeOH, est ajouté à 1,9 ml de solution de DPPH• (100µM) fraîchement préparée. Après 30 min d'incubation, à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est lu contre le blanc à 517 nm par spectrophotomètre (UV/Vis). Le pourcentage (%) d'inhibition des radicaux libres de DPPH• a été calculé par la relation suivante :

$$I\% = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \times 100$$

A : Absorbance de la solution de DPPH• en présence de l'échantillon

A<sub>0</sub> : Absorbance de la solution de DPPH• en absence de l'échantillon

A partir de la courbe du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des échantillons, les valeurs EC<sub>50</sub> ont été déterminées en (µg/ml), qui représentent les concentrations des échantillons à 50% de neutralisation des radicaux libres (DPPH•).

Les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence (standards), comme l'acide ascorbique (vitamine C), Trolox et BHA (Molyneux, 2004).

### 5.2. La méthode FRAP (*Feric Reducing Antioxidant Power*)

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) présent dans le complexe K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>). En effet le Fe<sup>3+</sup> participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 750 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Berker *et al.*, 2007).

### 5.2.1. Mode opératoire

400 µl de l'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 1ml de l'acide chlorhydrique HCl (1M) et 200 µl de SDS (1%) et 300 µl d'une solution de ferricyanure de potassium  $K_3Fe(CN)_6$  (1%), L'ensemble est incubé au bain marie à 50°C pendant 20 minutes puis refroidi à température ambiante. 200 µl d'une solution de chlorure ferrique  $FeCl_3$  (0,1%) a été ajouté au mélange réactionnel.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 750nm à l'aide de spectrophotomètre UV-Vis contre, un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil.

L'indice TEAC (*Trolox Equivalent antioxidant capacity*) a été calculé par la formule suivante :

$$\text{TEAC} = \text{Pente de l'extrait} / \text{pente de Trolox (mg Trolox /g de résidu sec)}$$

## 6. Etude statistique

Tous les expériences ont été faite en deux essais, et les résultats sont présenter en : *Moyenne ± l'erreur standard (SD)*. Le logiciel SigmaPlot®12.0 a été utilisé pour tracer les courbes nécessaires (courbes d'étalonnages, courbes du pouvoir antioxydant).

Le modèle choisis pour nos données expérimentales est :

$$y = a \cdot x + b$$

Tel que (a) et (b) sont des paramètres calculés par le logiciel.

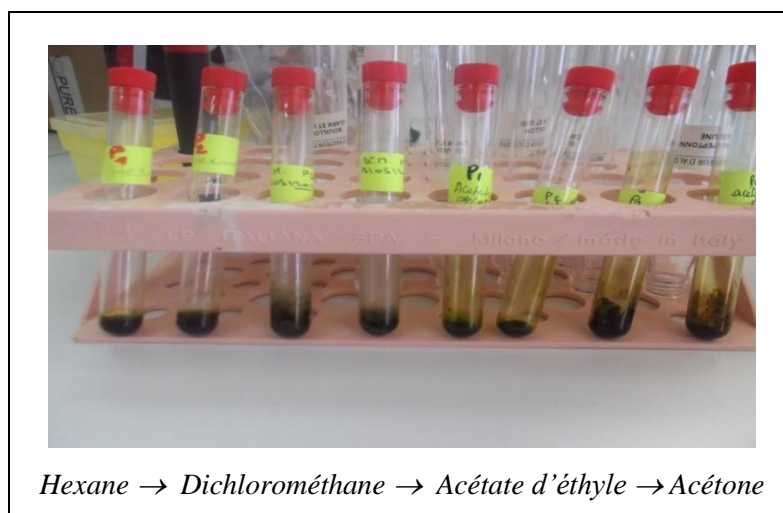
# CHAPITRE III :

---

## *Résultats et Discussion*

### 1. Résultats du rendement d'extraction

La préparation des extraits a été effectuée selon la méthode modifiée par Diallo, 2004. Cette méthode est basée sur l'utilisation des solvants à polarité croissante suivant (figure 12) :



**Figure 12 :** photo illustre les extraits obtenus après l'évaporation par Rota-vapeur

Ceci nous a permis de déterminer le rendement de leur extrait brut, qui ce présentés dans le Tableau 6.

**Tableau 6 :** Rendements de l'extraction par les solutions organique de la plante étudiée (P1 et P2)

	Rendement %	
	Laghouat (P1)	Djelfa (P2)
<i>Extraits</i>		
Hexane (HEX)	/	/
Dichlorométhane (DCM)	2,30	1,93
Acétate d'éthyle (AcET)	0,85	0,88
Acétone (ACT)	0,95	1,24

Nous constatons alors le rendement le plus élevé a été signalé pour l'extrait DCM (2,3% et 1,93%) de l'échantillon (P1) et (P2) respectivement, par contre le plus faible a été remarqué pour l'extrait acétate d'éthyle (AcET) de 0,85% échantillon (P1) et 0,88% échantillon (P2). Généralement, il a été constaté une légère différence de rendement entre les deux échantillons régions (P1) de la région *Laghouat* et (P2) de la région *Djelfa*.

Le rendement de l'extraction varie en fonction de l'espèce végétale, l'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de séchage, le contenu de chaque espèce en métabolites (de son métabolisme) et de la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou fractionnement et de sa polarité. L'utilisation de différents solvants à polarité différente permet de séparer des composés selon leurs degrés de solubilité dans le solvant d'extraction. Cette méthode d'extraction menée à température ambiante, dont la température élevée provoque une activation des composés phénoliques, la diminution de leur rétractibilité dans le solvant, aussi affect leur quantification (Hagermann *et al.*, 2000).

## 2. Résultats de dosage des composés phénoliques

L'étude quantitative des extraits bruts phénoliques au moyen des dosages spectrophotométriques, avaient pour objectif la détermination de la teneur totale des polyphénols et les flavonoïdes.

### 2.1. Teneur en polyphénols totaux

L'analyse quantitative des phénols totaux des extraits a été réalisée par la méthode de *Folin-Ciocalteu*. La teneur en composé phénolique de chaque extrait de plante a été alors calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (figure 13) par rapport le résidu sec de plante.

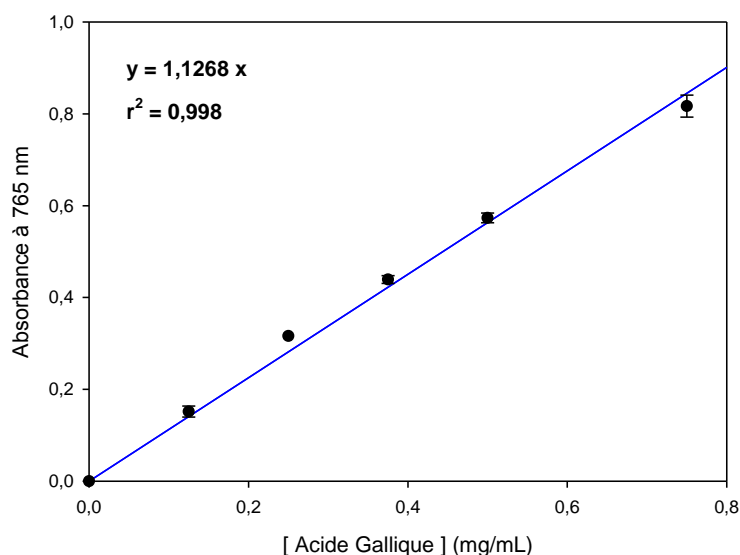
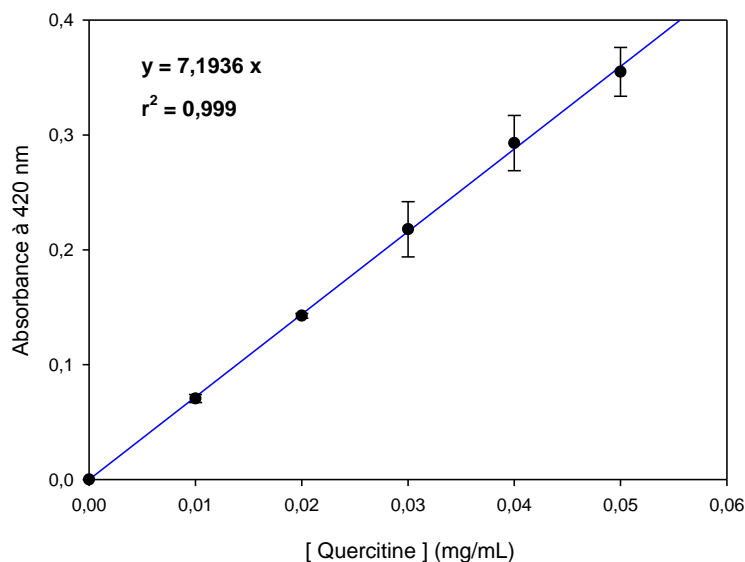


Figure 13 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (mg/mL)

## 2.2. Teneur en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes totaux de nos échantillons de plantes, elle a été effectuée par la méthode d'AlCl<sub>3</sub>. Pour cette objectif, une courbe d'étalonnage réalisée par la quercetin a été tracée (figure14).



**Figure 14 :** Courbe d'étalonnage de la quercetin (mg/mL)

Des mesures de densité pour chaque extrait se sont réalisées à 765 nm pour les polyphénols et à 420 nm pour les flavonoïdes.

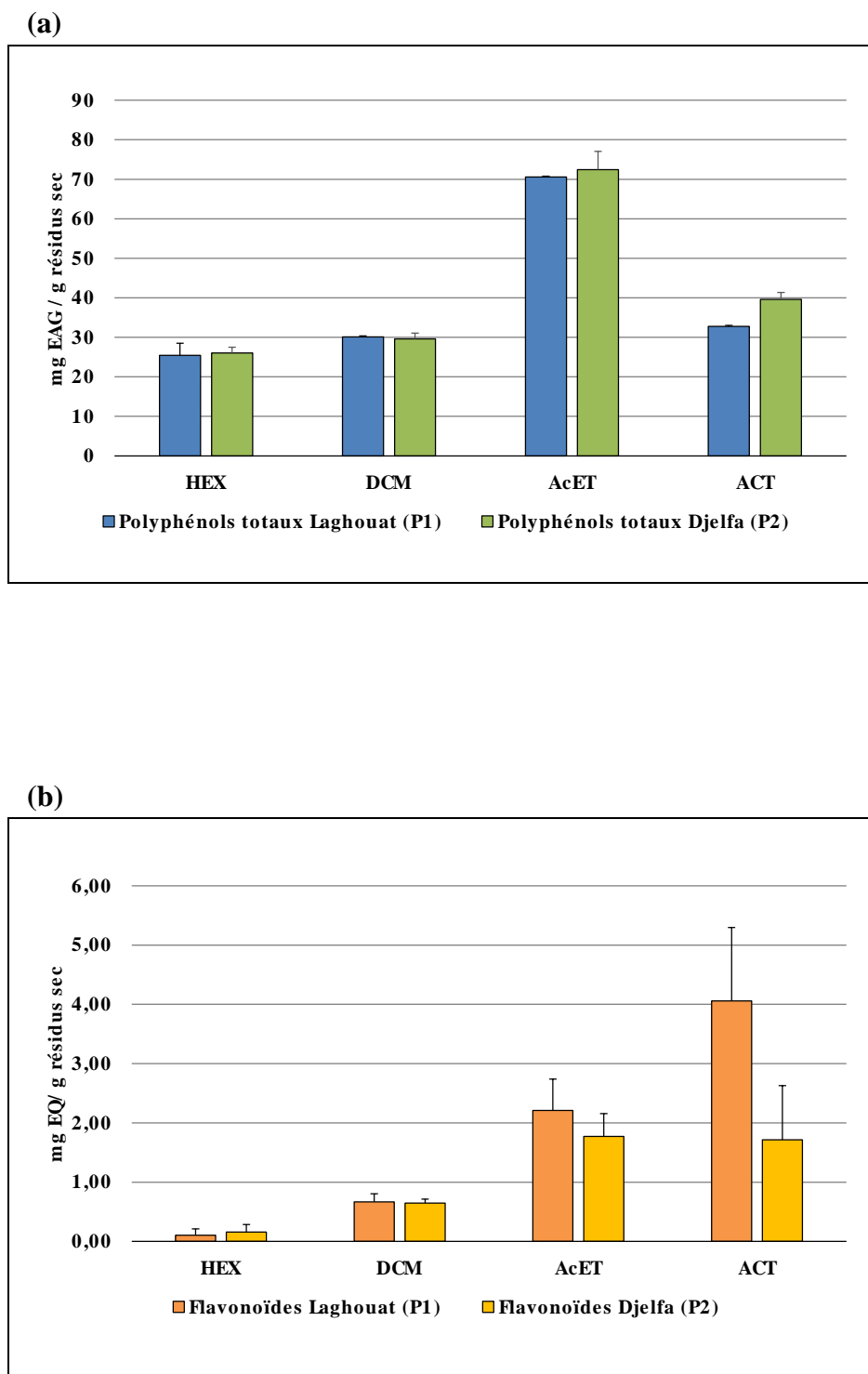
Les quantités des polyphénols totaux et flavonoïdes correspondantes ont été rapportés en équivalent gramme de l'étalon utilisé et déterminés par les deux équations de type :

$$y = a \cdot x + b$$

Les teneurs obtenues sont présentés dans le tableau 5 et la figure 11. Selon les résultats illustrés ci-dessous (Tableau 7), on distingue que les espèces étudiées sont riches en phénols totaux.

**Tableau 7 :** Teneur en polyphénols totaux (mg EAG/g de résidu sec) et flavonoïdes (mgEQ/g de résidus sec) de *Pinus halepensis* de deux régions P1 et P2

	Polyphénols totaux (mg EAG/g)		Flavonoïdes (mg EQ/g)	
	Laghouat (P1)	Djelfa (P2)	Laghouat (P1)	Djelfa (P2)
<b>Extraits</b>				
Hexane (HEX)	25,43 ± 3,07	26,05 ± 1,44	0,104 ± 0,10	0,159 ± 0,12
Dichlorométhane (DCM)	30,09 ± 0,25	29,60 ± 1,44	0,667 ± 0,13	0,646 ± 0,06
Acétate d'éthyle (AcET)	70,60 ± 0,19	72,46 ± 4,58	2,210 ± 0,53	1,772 ± 0,38
Acétone (ACT)	32,75 ± 0,25	39,58 ± 1,76	4,059 ± 1,23	1,716 ± 0,91



**Figure 15 :** Histogrammes présente les teneurs en polyphénols totaux (a) et les flavonoïdes (b) de différents solvants organiques (HEX, DCM, AcET, ACT)

### 2.3. Discussion

Les taux de composés phénoliques les plus élevés ont été détectés dans : l'extrait Acétique (AcET) obtenu par l'extraction solide-liquide avec une concentration de 72,46 mg EAG/g pour P2 et 70,60 mg EAG/g pour P1, suivi par l'extrait acétoniques 39,58 mg EAG/g pour P2 et 32,75 mg EAG/g pour P1 de la matière sèche, tandis que la teneur la plus basse a été remarquée dans l'extrait hexanique avec un taux de 26,05 mg EAG/g pour P2 et 25,43 mg EAG/g pour P1 de la matière sèche.

Ces résultats, confirment aussi que l'acétate d'éthyle dans ce cas nous a permis d'avoir la teneur la plus importante. La différence des teneurs en phénols totaux entre les quatre extraits pourrait être expliquée par la polarité des molécules de notre matière végétale.

Le contenu polyphénolique varie qualitativement et quantitativement selon plusieurs facteurs :

- ✓ Facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol, agressions et maladies ...etc. (**Ebrahimi et al., 2008**).
- ✓ Le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante (**Miliauskas et al., 2004**).
- ✓ La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux (**Lee et al., 2003**).

Il a été prouvé que les teneurs des phénols totaux et des flavonoïdes sont élevées lorsque le milieu de vie de la plante n'est pas adéquat, dans ce cas la plante favorise la synthèse des métabolites secondaires afin de s'adapter et survivre (**Tim & Lamb, 2005**).

Les résultats de teneur en flavonoïdes totaux exprimés en mg équivalent de quercétin/g de résidus secs, sont variés entre  $0,104 \pm 0,10$  à  $4,059 \pm 1,23$ . La variation des flavonoïdes en terme de quantité pour les deux échantillons P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> et peut être due à l'influence de certains facteurs climatiques, morphologiques, et aussi la localisation.

D'après la synthèse des différents résultats obtenus, la teneur en composés phénoliques et les flavonoïdes peut être liée au mode d'extraction que nous avons utilisé au cours de notre travail parmi les facteurs qui influent sur le rendement d'extraction on peut noter : le système de solvant et la durée d'extraction ainsi que le type de contact matière-solvant, la température.

De même une corrélation moyenne a été observée entre le contenu polyphénolique et flavonoïdes ( $R^2 = 0,728$ ; voir **Annexe**). C'est le cas des extraits de nos plantes étudiées qui sont riches en phénols totaux, mais ils ne présentent pas la teneur la plus élevée en flavonoïdes.

L'étude menée par **Yahiaoui et Aidel, (2012)**, sur les huiles essentielles et les extraits phénoliques de l'espèce *Pinus halepensis* Mill., montre que la fraction méthanolique riche en polyphénol totaux ( $128,68 \pm 4,91$  mg EAG/g) par contre la fraction d'acétate d'éthyle est la plus faible en composés phénolique ( $8,14 \pm 0,29$  mg EAG/g). Ainsi que la fraction de méthanol révèle une teneur de  $1,87 \pm 0,36$  mg équivalent de quercetin/g de résidus sec et aussi la fraction d'acétate d'éthyle présente de  $4,83 \pm 0,24$  mg EQ/g.

**Ustun et al., (2012)**, ont travaillé sur plusieurs espèces de *Pinus* en Turquie, cette étude montre que les extraits les plus riches en polyphénol totaux étaient l'extrait d'éthanol de *Pinus sylvestris* ( $128,27 \pm 5,88$  mg EAG/g), et l'extrait d'acétate d'éthyle de *Pinus halepensis* ( $102,56 \pm 5,47$  mgEAG/g). Cependant ; les extraits ont été trouvés aucun ou de faibles quantités de flavonoïdes totaux, tandis que l'extrait d'acétate d'éthyle de l'espèce *Pinus halepensis* avait la teneur en flavonoïdes la plus élevée ( $52,49 \pm 3,57$  mg).

En revanche, nos valeurs de teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes pour l'extrait acétonique (ACT) et l'extrait de l'acétate d'éthyle (AcET) sont totalement différentes par rapport les études précédentes, tel que notre extrait (AcET) révèle :  $70,60 \pm 0,19$  mg EAG/g et  $2,210 \pm 0,53$  mg EQ/g et l'extrait (ACT) révèle :  $32,75 \pm 0,25$  mg EAG/g et  $4,059 \pm 1,23$  mg EQ/g.

Les travaux mené par **Pinelo et al., (2004)**, sur l'espèce *Pinus pinaster* et *Prunus amygdalus*, (elles ont été extraites par solvant dans différentes conditions expérimentales pour optimiser le rendement en composés polyphénoliques) ; montre, que les variables importantes dans les procédés d'extraction dépendent fortement du solvant utilisé et de la matière soumise à extraire. Sauf pour l'éthanol, la complexité des modèles est beaucoup, car ils comprennent de nombreux effets significatifs (effets du même mélange).

Les Caractéristiques chimiques du solvant et la structure diverse et la composition des produits naturels en sorte que chaque système matériel-solvant montre un comportement différent, qui ne peut pas être prédit (**Pinelo et al., 2004**).

Matthaus (2002), a utilisé différents mélanges de solvants organiques pour effectuer l'extraction des résidus de différents oléagineux. Aucune tendance n'a été trouvée pour le contenu des extraits.

### 3. Résultats du pouvoir antioxydants

#### 3.1. Test DPPH<sup>\*</sup>

L'activité antioxydant des différents extraits vis-à-vis du radical DPPH<sup>\*</sup> a été évaluée par spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm.

La figure 16 regroupe les résultats du pouvoir antioxydants des trois extraits de deux régions P1 et P2 (pourcentage d'inhibition de radical DPPH<sup>\*</sup> en fonction de la concentration des échantillons de plante), par la méthode de piégeage du radical libre DPPH<sup>\*</sup>.

Les valeurs d'EC<sub>50</sub> (concentration efficace pour réduire 50% des radicaux libre de DPPH<sup>\*</sup>) ont été déterminées pour nos extraits à partir des représentations graphiques (figure 16). De même, on a calculé l'EC<sub>50</sub> des antioxydants de référence (Trolox, Vitamine C et BHA) à fin de les comparer avec nos extraits (figure 17).

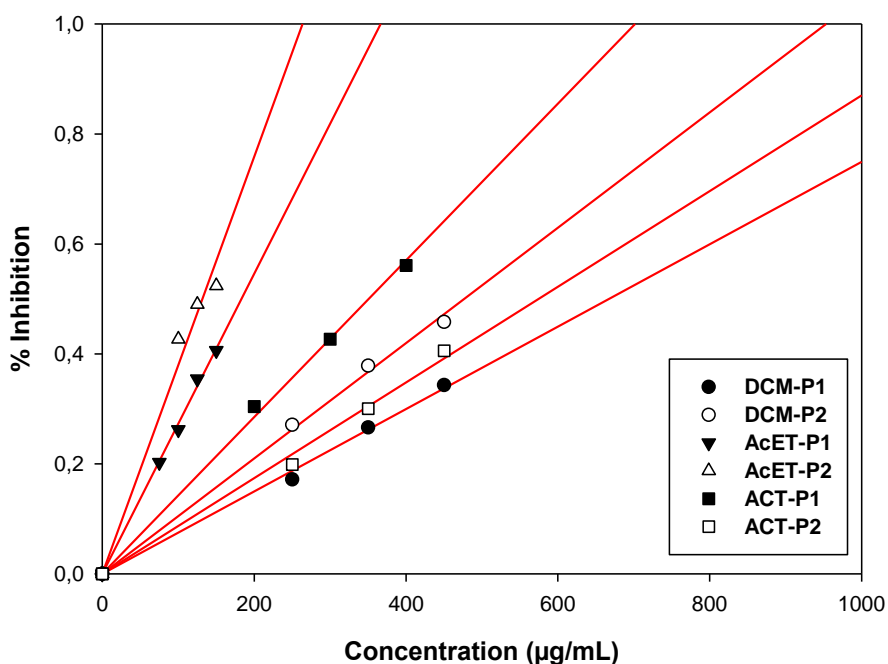


Figure 16 : Courbes représentes le pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction des concentrations des extraits de plantes (P1 et P2)

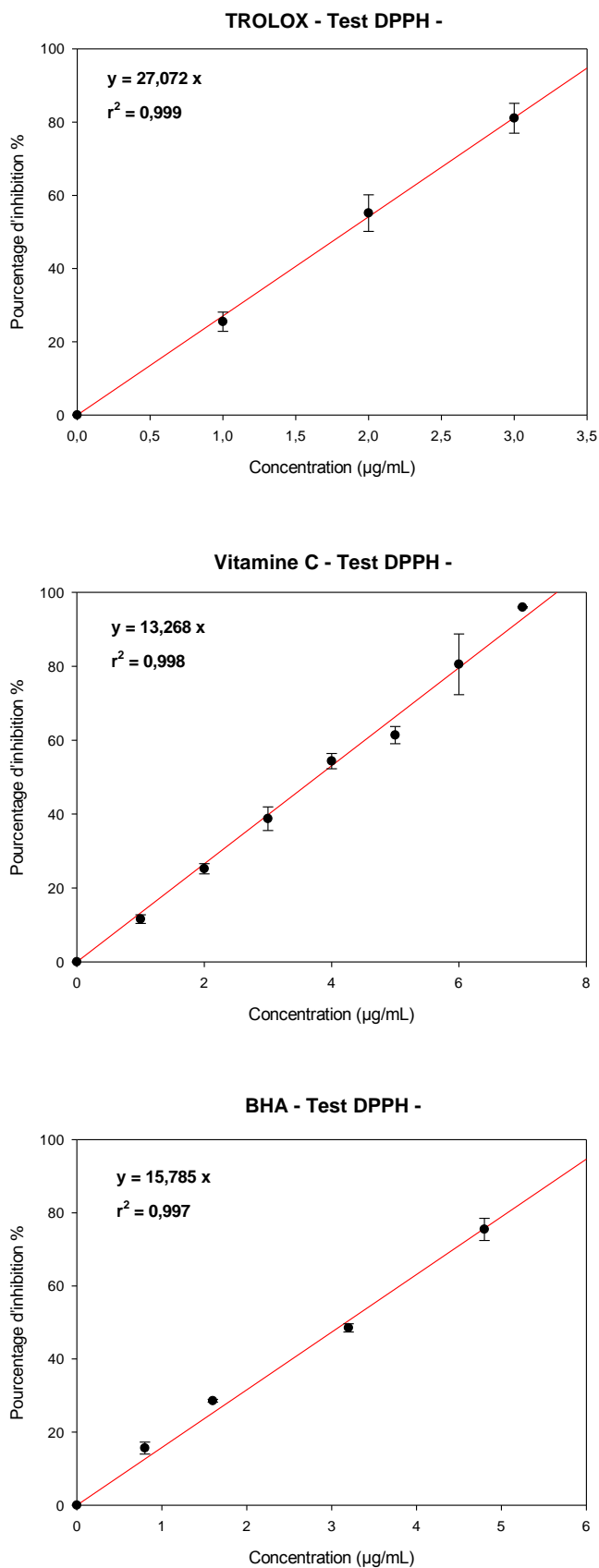


Figure 17 : Pouvoir antioxydant de Trolox, Vitamine C et BHA par le test DPPH

Les valeurs calculées d'EC<sub>50</sub> en (µg/ml) pour les différents échantillons (P1, P2) et les standards (antioxydant de référence), sont regroupés dans le Tableau 8.

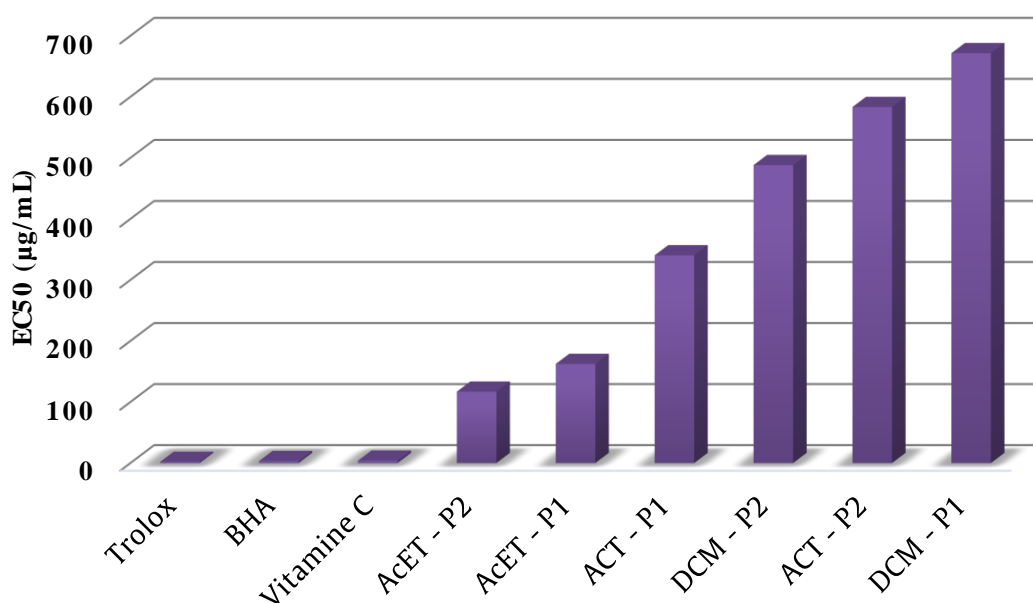
**Tableau 8 :** Les valeurs EC<sub>50</sub> du test DPPH des extraits de plante Pinus halepensis (P1 et P2)

	Valeurs de l'EC <sub>50</sub> (µg/mL)	
	Laghouat (P1)	Djelfa (P2)
<i>Extraits</i>		
Dichlorométhane (DCM)	671,43 ± 05,48	488,07 ± 16,16
Acétate d'éthyle (AcET)	162,33 ± 28,11	116,87 ± 21,12
Acétone (ACT)	340,27 ± 09,50	583,21 ± 12,02
<i>Standards</i>		
Trolox	1,85 ± 0,12	
Vitamine C	3,77 ± 0,17	
BHA	3,17 ± 0,13	

Toutes les extraits testées (DCM), (AcET), (ACT) ont provoqué une réduction importante de l'absorbance à 517 selon leur concentrations.

De manière générale, il ressort que les valeurs de l'EC<sub>50</sub> des extraits phénoliques DCM, AcET et ACT des deux régions (P1) et (P2) et les antioxydants de référence se présentent dans l'ordre suivant (figure 18) :

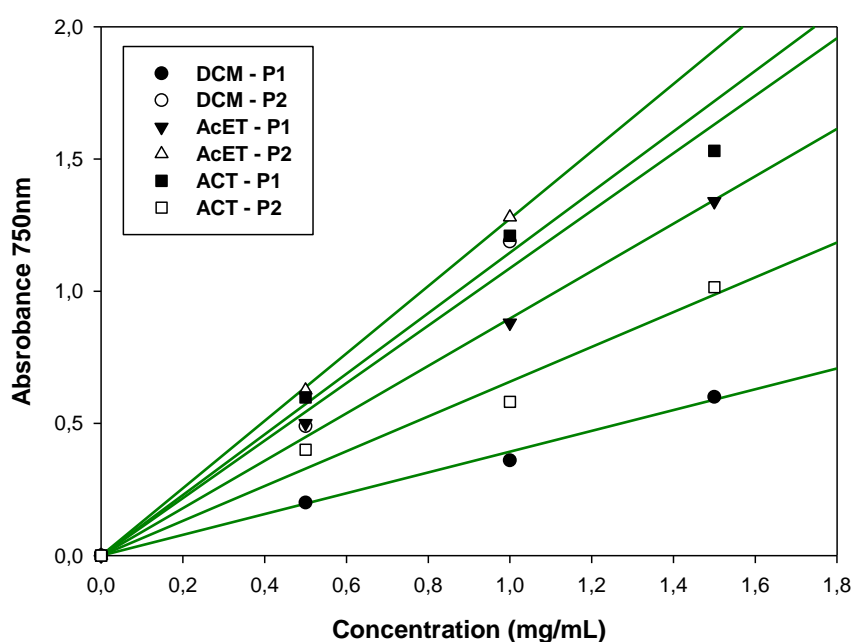
**Trolox < BHA < Vit. C < P<sub>2</sub> (AcET) < P<sub>1</sub> (AcET) < P<sub>1</sub> (ACT) < P<sub>2</sub> (DCM) < P<sub>2</sub> (ACT) < P<sub>1</sub> (DCM)**



**Figure 18 :** Classement croissant des valeurs EC<sub>50</sub> (extraits et standards)

### 3.2. Test FRAP (Ferric Reducing Ability Antioxidant)

L'activité antioxydante des extraits des plantes étudiées a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP (*Ferric Reducing Ability Antioxidant*). Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) présent dans le complexe  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). En effet le  $\text{Fe}^{3+}$  participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 750 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (figure 19).



**Figure 19 :** Courbe représente l'activité antioxydante par test FRAP (l'absorbance des extraits de plante (P1 et P2) en fonction de leurs concentrations)

Les valeurs de TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant capacity*) ont été déterminées pour nos extraits à partir des représentations graphiques (figure 19). Les valeurs de TEAC sont regroupées dans le Tableau 9.

**Tableau 9 :** Les valeurs TEAC du test FRAP des extraits de plante *Pinus halepensis* (P1 et P2)

<i>Extrait</i>	TEAC (mg Equivalent Trolox/g résidus sec)	
	Laghouat (P1)	Djelfa (P2)
Dichlorométhane (DCM)	27,68	80,71
Acétate d'éthyle (AcET)	63,19	89,73
Acétone (ACT)	76,58	46,35

### 3.3. Discussion

D'après **Molyneux, 2004** ; les valeurs  $EC_{50}$  sont inversement proportionnelles à l'effet inhibiteur des radicaux libres dont les valeurs petites indiquent un potentiel anti-radicalaire important.

Nous avons constaté que la fraction d'acétate d'éthyle (AcET) de l'échantillon (P1) et (P2) présente une activité plus élevée que celles des autres fractions, dont les valeurs d' $EC_{50}$  sont  $162,33 \pm 28,11 \mu\text{g/mL}$  (P1) et  $116,87 \pm 21,12$  (P2).

En revanche, le test FRAP révèle des valeurs de TEAC moyennement faible pour la fraction d'acétate d'éthyle (AcET) de l'échantillon (P1) (63,19 mg Equivalent Trolox/g résidus sec) que la fraction d'acétate d'éthyle (AcET) (89,73 mg Equivalent Trolox/g résidus sec) pour P2.

Cette activité pourrait être liée à sa richesse en polyphénols ( $70,60 \pm 0,19$  mg EAG/g pour l'échantillon (P1) et  $72,46 \pm 4,58$  mg EAG/g pour l'échantillon (P2)).

Ces résultats expliqueraient non seulement la richesse des extraits en polyphénols, mais la nature de leurs composés phénoliques hydrosolubles (flavonoïdes c'est notre cas  $4,059 \pm 1,23$  mg EQ/g l'échantillon (P1)) qui sont caractérisés par des groupements hydroxyles fortement impliqués dans l'activité anti-radicalaire (**Robards et al., 1999**).

Selon **Turkmen et al., 2007**, les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur chimie structurale idéale. Les autres composés phénoliques mineurs ne devraient pas être négligés, par ce que la synergie entre les différents produits chimiques devrait être prise en considération dans l'activité biologique (**Bourgou et al., 2008**).

Nous avons trouvé une corrélation moyenne ( $R^2 = 0,729$ ) entre le pouvoir antioxydant exprimé par la valeur d' $EC_{50}$  et la teneur en phénols totaux (figure 20), par contre nous avons trouvé une corrélation faible ( $R^2 = 0,208$ ) entre l'activité antioxydante et la teneur en flavonoïde (figure 21).

La présence de composés phénoliques dans les extraits végétaux contribue de manière significative à leur potentiel d'activité anti-oxydante. La corrélation entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante a été décrite dans de nombreuses études (**Anesini et al., 2008** ; **Pasko et al., 2009**).

Cependant, certain auteur suggère qu'il n ya pas de relation entre la teneur en phénols totaux et les valeurs de l'efficacité anti-radicalaire, et que cette activité n'est pas limité aux composés phénoliques, elle peut être due à la présence d'autres antioxydant des métabolites secondaires, comme les lignanes, les alcaloïdes, les terpènes, les caroténoïdes et les vitamines (acide ascorbique) (Javanmardi *et al.*, 2003).

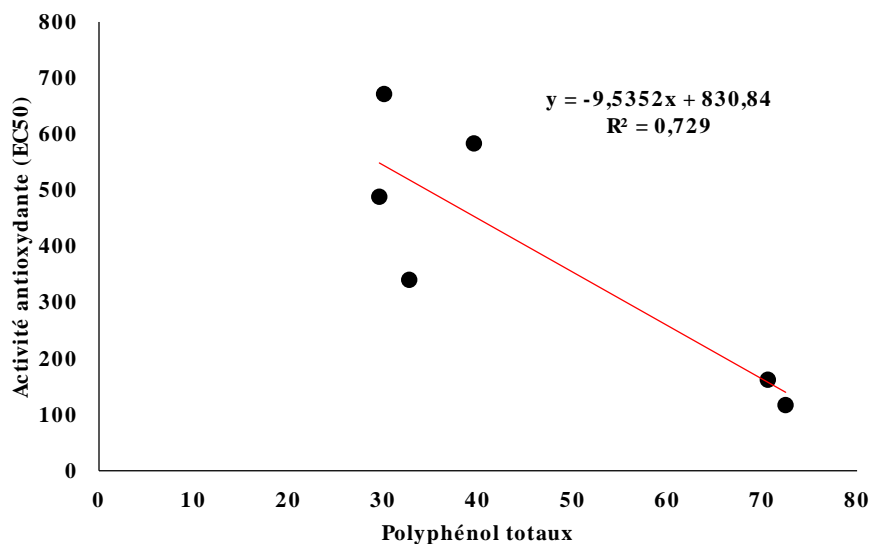


Figure 20 : Représentation graphique présente la corrélation entre les polyphénols totaux et les valeurs d'EC50

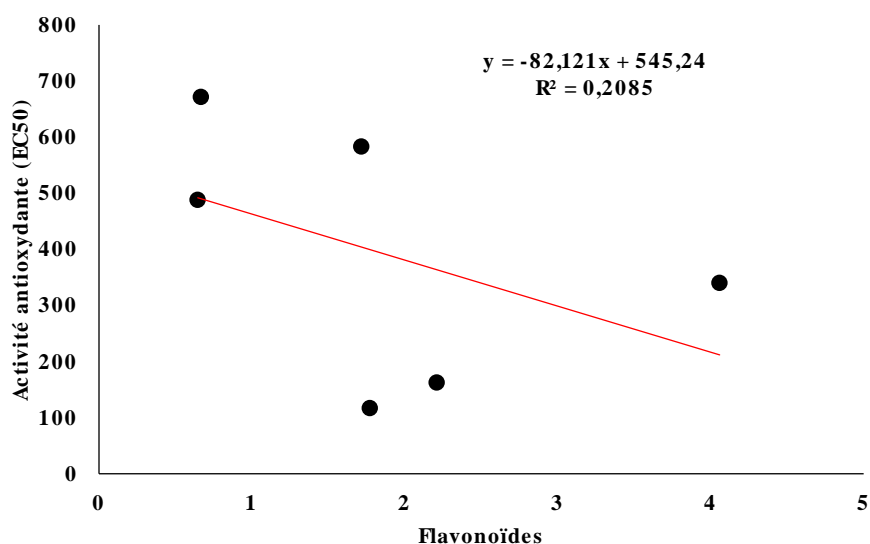


Figure 21 : Représentation graphique présente la corrélation entre les flavonoïdes et les valeurs d'EC50

# *Conclusion*

## Conclusion

Lors de ce travail, les extraits bruts des aiguilles de la plante médicinale : *Pinus halepensis* Mill de deux régions différentes « Laghouat P1 » et « Djelfa P2 », ont fait l'objet d'une étude scientifique, commençant par l'extraction et le dosage des composés phénoliques ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante.

Le rendement des extraits de *Pinus halepensis* de deux régions que nous avons étudié, montrent que les aiguilles du *Pinus halepensis* (P1) sont les plus élevés en comparaison au (P2).

Le dosage des phénols totaux, par la méthode de *Folin-ciocalteu* pour les différents extraits étudiés (HEX, DCM, AcET et ACT) varient entre  $25,43 \pm 3,07$  à  $72,46 \pm 4,58$  exprimés en mg équivalent de l'acide gallique/g de résidus sec, ainsi que la teneur en flavonoïdes de nos extraits révèle une variation échelonnée de  $0,104 \pm 0,10$  à  $4,059 \pm 1,23$  exprimés en mg équivalent de quercétine/g d'extrait sec.

L'étude de l'activité antioxydante des extraits bruts de la plupart de nos échantillons a révélé une capacité importante de réduction du radical libre DPPH· avec une  $EC_{50}$  variant entre  $116,87 \pm 21,12$  à  $671,43 \pm 05,48 \mu\text{g/ml}$  (extraits phénoliques). Cette activité est aussi remarquée par le test FRAP dont les valeurs TEAC varient entre 27,68 et 89,73 (mg Equivalent Trolox/g résidus sec) pour les extraits phénoliques.

Ces résultats restent partiels et d'autres travaux sur ces plantes s'imposent aux niveaux pharmacologiques et chimiques, car les approches sont restées globales en ne prenant en compte que l'ensemble des composés présents dans les extraits.

En perspective, il serait essentiel, à l'avenir de préciser la nature des composés phénoliques, en utilisant des méthodes plus avancées telles que l'HPLC, la HPLC-MS et la RMN. Aussi, il serait intéressant de tester les composés identifiés individuellement en faisant appel à des tests pharmacologiques *in vivo*.

Finalement, il est impératif de vérifier également l'absence d'effets cytotoxiques des composés.

*Références*  
*Bibliographiques*

Références bibliographiques

-A-

- Amjad Hossain M. (2005)**Neem seed oil: Bangladesh. Examples of the Development of Pharmaceutical Products from Medicinal Plants. Bangladesh Council of Scientific and Industrial Research (BCSIR). 10, 59-63.
- Anesini C. ; Ferraro G. E. et Filip R. (2008).** Total polyphenol content and antioxidant capacity of commercially available tea (*Camellia sinensis*) in Argentina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 9225–9229.
- Arora A., Sairam R., Srivastava G. ; 2002.** Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, **82**, 1227-1238.
- Atawodi S.E. (2005)** Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*. 4 (2), 128-133.

-B-

- Badwey J. A., Karovsky M.L.,(1979).** Production of superoxide and hydrogen peroxide by an NADH-oxidase in guinea pig polymorphonuclear leukocytes .Modulation bay nucleotides and divalent cations.*JBiolchem* .Nov 25:254(22):11530-11537.
- Bahorun T. (1997).** Substances Naturelles Actives: La Flore Mauricienne, Une Source D’approvisionnement Potentielle. AMAS. Food and Agricultural Research Council. Réduit.Mauritius.
- Beckman JS, Kappenol WH.(1996).** Nitric oxide ; la flore mauricienne une source d’approvisionnement potentielle, AMAS, *food and agricultural research council*.
- Benbrook C.M. ; 2005.** Accroître la teneur en antioxydants des aliments grâce à l’agriculture et à la transformation alimentaire biologiques. Rapport sur l’état des connaissances scientifiques. The Organic Center for Education and Promotion, 45.
- Berker, K. I., Guclu, K., Tor, I., & Apak, R. (2007).** Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72(3), 1157-1165.
- Beloued A.** plante médicinale d’Algérie. 2001
- Boudet, A.M. 2007.** Evolution and current status of research in phenolic compounds *Phytochemistry*, 68 : 2722-2735.
- Bouguendoura, N (2011).** *pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d’espèces végétales Satureja calamintha ssp. nepta (nabta) et Ajujaiva L. (chendgoura) de l’ouest d’Algérie. (Thèse de magister), Faculté des Sciences. Université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen. 125.*

- Bourgou S. ; Ksouri R. ; Bellila A. ; Skandrani I. ; Falleh H.; Marzouk B. (2008).** Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *C. R. Biologies*, 331: 48–55.
- Boyd B., Ford C., Koepke Michael C., Gary K., Horn E., McAnalley S. et McAnalley B. (2003)** Étude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *GlycoScience & Nutrition*. 4 (6), 7p.
- Brand-Willians W ;Cuvelier M.E and Berest C.(1995).**Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel- Wissenschaft und- Technologie. Food Science and Technology*, 28, 25-30
- Bruneton, J. 1999.** Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. Technique et documentation. 1120 p.
- Bruneton, J. (2009).** *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales* (4<sup>e</sup> ed.). Paris: Lavoisier
- Buer C. S., N. Imin and M.A. Djordjevic., 2010.** Flavonoids: New Roles for Old Molecules, *Journal of Integrative Plant Biology*, 98-111 pp.
- Burist M., Bucar F., 2000.**Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother. Res.* 14, 323-328.

-C-

- Cuendet M., Hostettman K., Potterat O., 1997.**Iridoidglucosides with free radical scavenging properties from *fagraeablumie*. *Helv. Chim. Acta* 80, 1144-1152.
- Cuvelier M-E., Berset C. et Richard H. (1990)** Use of a new test for determining comparative antioxidant activity of BHA, BHT,  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherols and extracts from rosemary and sage. *Sci. Aliments*. 10, 797-806.

-D-

- Decaux, I. (2002).***Phytothérapie : Mode d'emploi: Le bien public.*
- Delaveau P. (1987)** Les Epices. Histoire, description et usage des différents épices, aromates et condiments. Albin Michel Editeur. 372 p.
- Derbel, S. ; et Ghedira, K. 2005.** Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*, 1 : 28-34.
- Diallo, D. ; Sanogo, R. ; Yasambou, H. ; Traoré, A. ; Coulibaly, K. ; and Maïga, A. 2004.** Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana Lam.* (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *C. R. Chimie*, 7 : 1073–1080.
- Diallo A. ; 2005.** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* WILLD. (MYRTACEAE). Thèse de Doctorat en Pharmacie. Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de Bamako, Mali.
- Dweck A. C. (2002)** Herbal Medicine for the Skin. Their Chemistry and Effects on Skin and Mucous Membranes. *Personal Care Magazine*. 3(2), 19-21.

-E-

- Ebrahimi, N.S., Hadian, J., Mirjalili, M.H., Sonboli, A., & Yousefzadi, M. (2008).** Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food chemistry*, 110, 927-931.
- Edeas M., 2007.** Citroflavonoïdes, *Phytothérapie*; 210–211 pp.
- Elqaj, M. Ahami, A., &Belghyti, D. (2007).** *La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Paper presented at the Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotique"*, Maroc.

-F-

- 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.
- Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D. D., &Guo, Z. (1986).** Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé*, 64(2), 159-164.
- Finaud J.; Lac G.; Filaire E. (2006).** oxidative stress. Relationship with Exercise and training. *Sports Med* 36(4):p327-58.
- Fouché J. G., Marquet A. et Hambuckers A. (2000)** Les Plantes Médicinales, de la plante au médicament. *Observatoire du Monde des Plantes Sart-Tilman*.
- Fridovich I (1989).** Superoxidasedismutases. An adaptation to paramagnetic gas *J Biol. chem.* 264:7761-7764.

-G-

- Gardès-Albert M. ; Bonnefont-Rousslot D. ; Abedinzadeh Z et Jore D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'Actualité Chimique* 91-96.
- Georgetti S. R., Casagrande R., Di Mambro V. M., Azzolini Ana ECS. Et Fonseca Maria.JV. (2003)** Evaluation of the Antioxidant Activity of Different Flavonoids by the Chemiluminescence Method. *AAPS PharmSci.* 5 (2), 5p.
- Giner-Chavez, Bertha I. (1996).** *Condensed tannins in tropical forages.* (Doctoral Thesis), Cornell University, Ithaca, NY.
- Goto M. ; Ueda K. ; Hashimoto T. ;Fujiwara S. ; Matsuyama K. ; Kometani T. et Kanazawa K. (2008).** A formation mechanism for 8-hydroxy-2-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2-deoxythymidine. *Free Radical Biology and Medicine.* 45:1318-1325.
- Griendling K.K. ; Sorescu D. ; Ushio-Fukai M (2000).** NAD(P)H Oxidase Role in Cardiovascular Biology and Disease. *Circ. Res.*, 86,pp. 494-501.
- Gentiana**, une fondation pour les plantes : importance des plantes médicinales dans notre société, Optima, mai 2002.

- Guri, A., Kefalas, P., Roussis, V., 2006.** Antioxidant potential of six pine species. *Phytotherapy Research* 20, 263–266.
- Ghedira K., 2005.** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 162-169 pp.

**-H-**

- Hadi M. (2004)** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro- oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse Présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences de l'Université Louis Pasteur Domaine : Pharmacochimie. 155p.
- Hale A. L. (2003)** Screening Potato Genotypes for Antioxidant Activity, Identification of the Responsible Compounds, and Differentiating Russet Norkotah Strains Using Aflp and Microsatellite Marker Analysis. Office of Graduate Studies of Texas A&M University. Genetics, 260p.
- Halliwell B. (1994)** Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.* 52, 253-265.
- Haslam.E,** plant polyphénol : végétales Tannins Cambridge Université presse, 1989, pp1-13.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., & Bailleul, F. (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1), 4.
- Hennebelle, T. (2006).** *Investigation chimique et chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants. Marrubium peregrinum, Ballota larendana, Ballota Pseudodictamnus (Lamiacées) et Lippia alba (Verbénacées).* (Thèse Doctorat Chimie Organique et Macromoléculaire), Université des Sciences et Technologique de Lille 1, France.
- Hagerman A.E. (2002).** Tannin Handbook. 2<sup>ème</sup> édition. *Miami University.* Oxford, USA, 116 p.
- Hubert J., 2006.** Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja – Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines, *Thèse ; Institut National Polytechnique de Toulouse ;* 174 pp
- Huie R.E. et Padmaja S. ( 1993).** The reaction of NO with superoxide ;*Free Rad. Res.* 18 pp195-199.

**-I-**

- Iserin, P ., Masson, M., Restellii , J. P ., Ybert, E., De Laage de Meux, A., Moulard, F., . . . Botrel, A. (2001).***Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins*(Laroesse Ed.) : Larousse.

**-J-**

- Javanmardi J. ; Stushnoff C. ; Locke E. et Vivanco J.M.,(2003).** Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry* 83, 547-500.
- J. Hubert., 2006.** Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja – Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines, *Thèse ; Institut National Polytechnique de Toulouse* ; 174 pp.
- Jourd'heuil D . ; Kang D. et Grisham M.B. (1997).** Interaction between superoxide and nitricoxide : implication in DAN damage and mutagenesis ; *Frpnt. Biosci .*, p 189-196.

**-K-**

- Kadri, N., Khettal, B., Yahiaoui-Zaidi, R., Barragan-Montero, V., Montero, J.L., 2013.** Analysis of *Pinus halepensis* Mill. seeds from North Algeria. *Industrial Crops and Products* 51, 116–122.
- Kahina, B . (2011).** étude de l'effet des antioxydantes naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge. Thèse de magister. Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, 56p.
- Kouame. A. E .F : Etude de la migration des antioxydants phénoliques dans les boissons en sachet (Abidjan- cote d'ivoire).** Thèse de doctorat en pharmacie .**28 juin 2004 N° 26.** Université Cheikh antadiop de Dakar.
- Koehlin-Ramonatxo C. ; 2006.** Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition Clinique et Métabolique*, **20**, 165-177.
- Krippeit-Drews P., LANG F., Haussinger D. et Drews G. (1994)** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced hyperpolarization of pancreatic B-cells. *Pflugers Arch.* 426, 552 - 554.
- Kubola, J. ; and Siriamornpun, S.2008.** Phenolic contents and antioxidant activities of bitter melon (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food Chemistry* ,110 : 881–890.
- Kumaran. A, Karunakaran .RJ (2007).** *In-vitro* antioxidant activities of methanol extract of *Phyllanthus* species from India. *Lebens-Wiss technologie*, 40: 344-352

**-L-**

- Lahouel M., Amedah S., Zellagui A., Touil A., Rhouati S., Benayache F., Leghouchi E., et Bousseboua H. ; 2006.** The interaction of new plant flavonoids with rat liver mitochondria: relation between the antiand prooxydant effect and flavonoids concentration. *Thérapie*, **61(4)**, 347-355.
- Lee K. W., Kim Y. J., Lee H. J. et Lee C. Y. (2003)** Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7292-7295.
- Lugasi A., Hóvári J., Sági K. V. et BíróL. (2003).** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis.* 47(1-4), 119-125.

-M-

- Marc F., Davin A., Deglène-Benbrahim L., Ferrand C., Baccaunaud M., Fritsch P.; 2004.** Méthodes d'évaluation du potentialantioxydant dans les aliments. *Médecines Sciences*, **20**, 458-464.
- Mac Laren D. (2007).** Advances in sports and exercise science series. Nutritionad Sport: Chapitr 8: *Antioxydants and free radicals by Close Gland Mc Ardle F* . Churchill Livingstone p 272.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A. et Jay- Allemand, C.H. 2005.** Les composés phénoliques des végétaux. *Presses Polytechniques et Universitaires Romandes*. 192p.
- Maestre, F.T., Cortina, J., Bautista, S., Bellot, J., 2003.** Does *Pinus halepensis* facilitate the establishment of shrubs in Mediterranean semi-arid afforestations? *Forest Ecology and Management* 176, 147–160.
- Marais J. P.J., B. Deavours., R. A. Dixon and D. Ferreira., 2006.** The Science of Flavonoids, *Library of Congress*, 273 pp.
- Matthäus, B. (2002).** Antioxydant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **50**, 3449–3452.
- Medić- Šarić M., Jasprica I., Smolčić-Bubalo A. et Mornar A. (2004).** Optimization of Chromatographic Conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids. *Croatica Chemica Acta*. **77** (1–2), 361-366.
- Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leitão, G.G., Reis, A.S., Dos Santos, T.C., Coube, C.S., Leitao, S.G., 2001.** Screening of Brazilian plant extracts for antioxydant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Res.* **15**, 127–130.
- M. Edeas., 2007.** Citroflavonoïdes, *Phytothérapie*; 210–211 pp.
- Mika A., Minibayeva F., Beckett R., Lüthje S. ; 2004.** Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews*, **3**, 173-193.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., & Van Beek, T. A. (2004).** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food chemistry*, **85**, 231-237
- Miller N-J., Sampson J., Candeias L.P., Bramley P.M., Rice-Evans C.A. ; 1996.** Antioxydant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, **384**, 240-242.
- Mohammedi, Z. (2006).** *Eude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen.* (These de Magister), Université Abou Bekr Belkaid, TLEMEN. 154.
- Mohammedi, Z. (2013).** *Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie.* (Thèse de Doctorat en Biologie), Université Abou Bekr Belkaid, TLEMEN. 22p.

**Molyneux P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl(DPPH) for estimating Antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* Vol.26 No. 2, pp 211-219.

**Morel Y. et Barouki R. (1999)** Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J.* 342 (3), 481-496.

-N-

**Nahal, I., 1986.** Taxonomie et aire géographique des pins du groupe halepensis. CIHEAM Options Méditerranéennes 86, 1.

**Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R. et Krishna D. R. (2001)** Bioflavonoids Classification, Pharmacological, Biochemical Effects and Therapeutic Potential. *Indian Journal of Pharmacology.* 33, 2-16.

**Nijveldt R. J., E. van Nood., D. EC van Hoorn., P. G Boelens., K. van Norren and P. AM van Leeuwen., 2001.** Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *Am J Clin Nutr,* 418–425 pp.

**Njus D., Kelley P.M. ; 1991.** Vitamins C and E donate single hydrogen atoms in vivo. *FEBS. Letters,* 284(2), 147-151.

**Nostro A., Germanò M. p., D'Angelo V., Marino A. et Cannatelli M.a. (2000).** Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lettres en microbiologie appliquée.* 30 (5), p379.

-P-

**Pasko P. ; Barton H. ; Zagrodzki P. ; Gorinstein S. ; Folta M. et Zachwieja Z. (2009).** Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoaseeds and sprouts during their growth. *Food Chemistry,* 115, 994–998.

**Pincemail J., Meurisse M., Limet R. et Defraigne J. O. (1999)** L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumon.* 4 (5).

**Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., Nunez M.J., (2004).** Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chemistry,* 85, 267–273.

**Porter N. (2001)** Essential oils and their production. *Crop & Food Research.* Number 39.

**Pourrut B. ; 2008.** Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat à l'Institut National Polytechnique de l'Université de Toulouse spécialité : Ecotoxicologie. France.

**Proestos, C.; Sereli, D.; and Komaitis, M. 2004.** Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chemistry,* 95 : 44-52.

-R-

- Robards P. ; Renzeler P.D. ; Turcker G. ; Swatsitang P. et Glover W. (1999).** Penoliccompounds and their role in oxidative process in fruits *Food Chemistry*,66:401-436.
- Rohdewald, P., 2002.** A review of the French maritime pine bark extract(Pycnogenol), an herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Inter-national Journal of Clinical Pharmacology and Therapy* 40, 158–168.
- Rolland, Y. 2004.**Antioxydants naturels végétaux. *OCL*, 11: 419-424.

**-S-**

- Sayre L M ;Moreira PI ; Smith MA et Perr G. (2005).**Metal ions and oxidative proteinmodification in neurological disease. *Ann IstSuprSanità. 41(2):143-164.*
- Schnaubelt K. (1998)** Advanced Aromatherapy. Vermont:Healing Arts Press.
- Scientific Correspondence. (2003)**Broad spectrumantimycotic drug for the treatment of ringworm infection in human beings. 85 (1), 30-34.
- Svoboda K.P. et Hampson J.B. (1999)** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related. pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW.
- Smallfield B. (2001)** Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop & Food Research*. Number 45, 4p.
- Smith, C.; Marks, A. D.; and Lieberman, M. 2007.**Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach, *2nd Edition. Marks* : 920.

**-T-**

- Tepe B., Daferera D., Sokmen M., Polissiou M. &Sokmen A., 2005.**Antimicrbial and antioxidant activity of the essential oil and various extract of *Saliva tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chem. 90*, 333-340.
- Tim, T. P. C., & Lamb, A. J. (2005).** Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26, 343-356.
- Turkmen N. ; Velioglu Y.S. ; Sari F. et Polat G. (2007).** Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, 12: 484-496.
- Tarahovsky .Yury S. ; Yuri A. Kim.; Elena A Yagolnik .;Eugeny N. Muzafarov.;2014.** Flavonoid–membrane interactions: Involvement of flavonoid–metal complexes in raft signaling, 1236p.

**-U-**

- Ustun, O., SezerSenol, F., Kurkcuoğlu, M., Orhan I. E., Kartal, M., Husnu Can Baser, K., (2012).**Investigation on chemical composition, anticholinesterase and antioxidantactivities of extracts and essential oils of Turkish *Pinus* species and pycnogenol. *Industrial Crops and Products*, 38, 115– 123.

-V-

- Vansant G. (2004)** Radicaux libres et antioxydants : principes de base. Symposium « Antioxydants et alimentation ». Institut Danone.
- Vermerris, W. ; and Nicholson, R. 2006.** Phenolic Compound Biochemistry. *Springer Science. Netherlands.* 276 p.
- Vuorela, S., Kreander, K., Karonen, M., Nieminen, R., Hamalainen, M., Galkin, A.,2005.** Preclinical evaluation of rapeseed, raspberry, and pine bark phenolics for health related effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53,5922–5931.

-Y-

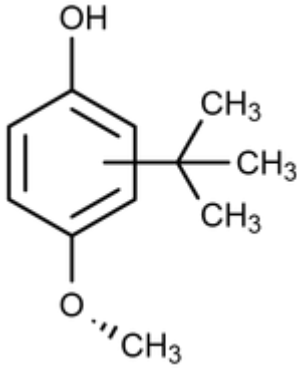
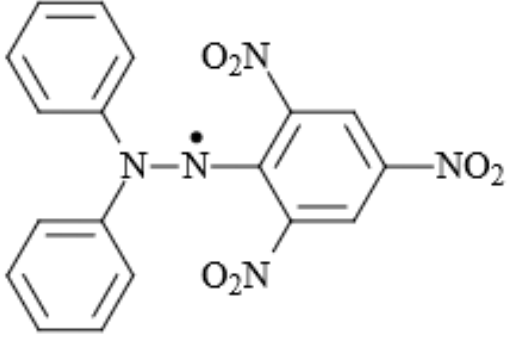
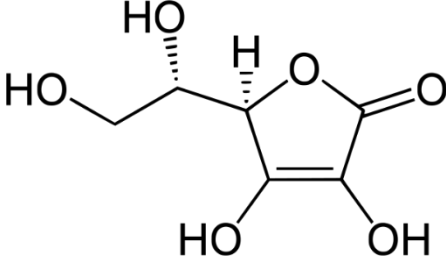
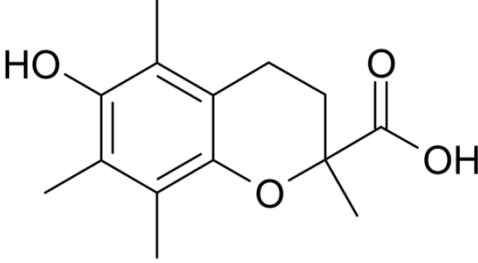
- Yahiaoui, F. et Aidel, D., (2012).** Evaluation de l'activité anti-oxydante des huiles essentielles et des extraits phénoliques de *Pinus halepensis*. *Mémoire d'ingénieur d'état en Génie-Biologique.* Université Amar Télidji Laghouat, 73p.

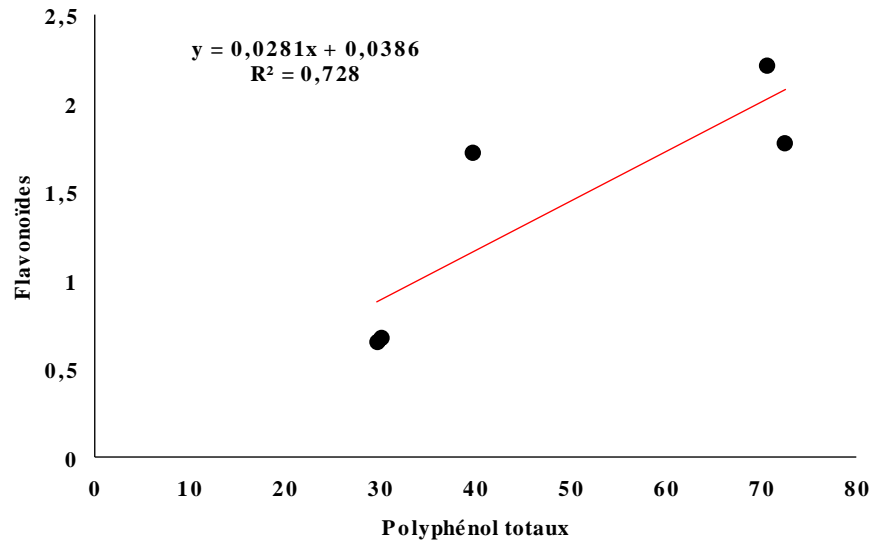
-Z-

- ZOUBEIDI, C. 2004.** Etude des antioxydants dans le *Rosmarinus Officinalis.Labiataea* Mémoire Présenté pour l'obtention du diplôme de MAGISTER. Université d'Ouargla, 1p.

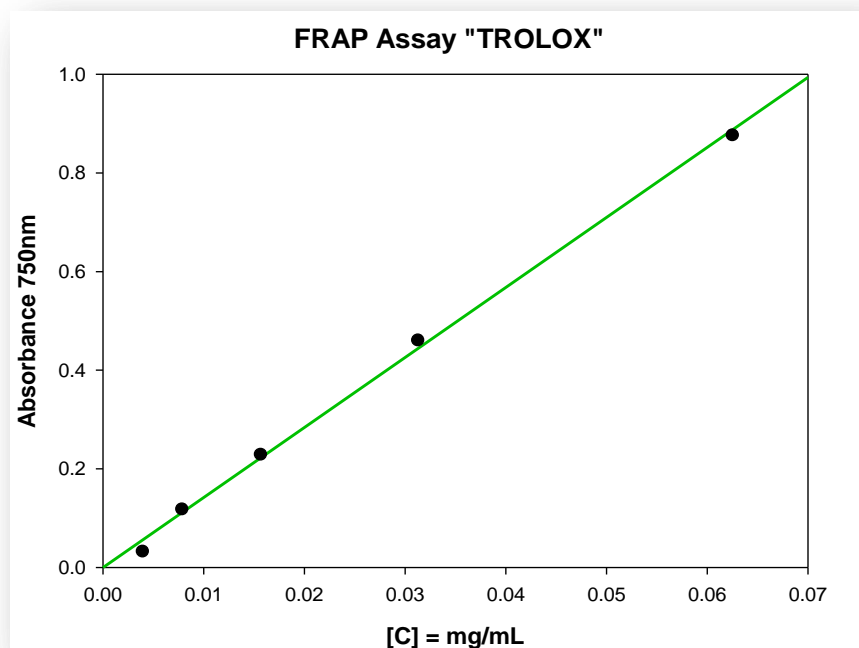
# **Annexe**

## Annexe

<p><b>BHA</b> Hydroxyanisole butylé</p>	
<p><b>DPPH</b> (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)</p>	
<p><b>Vitamine C</b></p>	
<p><b>Trolox</b></p>	



**Figure 22 :** Représentation graphique présente la corrélation entre les polyphénols totaux et les flavonoïdes



**Figure 23 :** variation de l'abtoncesorbance en fonction des concentrations de Trolox(Test FRAP)