

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



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

Mémoire de MASTER

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

Par:
FEKAIRI Safia Louiza

Thème

Activité antioxydante des extraits phénoliques des feuilles de *Pistacia lentiscus*

Soutenu publiquement devant le jury composé de:

<i>Mr HAMDI Ahmed</i>	M.A.A	Président
<i>Mr SAIDAT Boubakeur</i>	M.C.A	Examineur
<i>M^{me} NOUREDDINE Asmaa</i>	M.A.A	Examinatrice
<i>Mr BENAHMED Ziyad</i>	M.A.A	Encadreur

Année Universitaire 2015/2016

Dédicace

Je dédie ce travail à mes parents,

Mon père Ali

Et ma mère Anissa

Pour leurs sacrifices et leurs soutiens tout au long de mes études

A mon époux Sofiane

A mes frères Abdelatif, Fares, Mohamed

A la famille FEKAIRI

A mon oncle Abdelghani et sa femme Nabila

A ma cousine Fadoua et son frère Abdelhakim

*A mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux moments au cours de
mon cursus à l'université: O.Yasmine, CH.Nawel, M. Kheira,*

A tous mes amis de ma promotion de Chimie Organique

Louiza

REMERCIEMENTS

*Je remercie Allah tout puissant, maître des cieux et de la terre,
qui m'a permis de mener à bien ce travail.*

*Au terme de ce travail, qui a été réalisé au sein de laboratoire de chimie fondamentale de département de science de la matière à l'université de Laghouat, je remercie M^{me} **BENMOULAY Sarah** et Mr **BOUZIDI**.*

*Je tiens surtout à adresser mes plus vifs remerciements à mon encadreur Mr. **BENAHMED Ziyad** qui m'a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, pour sa grande patience, pour sa disponibilité et ses conseils judicieux.*

*Je remercie également Mr **HAMDI Ahmed**, Maître assistant à la faculté des Sciences de la Matière à l'université d'avoir accepté de présider le jury.*

*Je remercie Mr **SAIDAT Boubakeur**, Directeur du laboratoire de recherche chez l'université, d'avoir accepté de juger ce modeste travail et participer au jury.*

*J'adresse mes remerciements à M^{me} **NOUREDDINE Asmaa** pour avoir accepté de juger ce travail et que nous sommes honorés par leur présence.*

Je remercie également tous nos enseignants durant les années des études.

*Un grand merci à mon époux **SAROUT Sofiane**, pour sa compréhension et ses encouragements.*

Enfin, mes remerciements iront à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merci infiniment

Louiza

Liste des abréviations

A : Absorption.

ADN : Acide ribonucléique

AAEAC : Ascorbic Acid Equivalent Antioxydant Capacity

DAD : Barrette de diodes

DO : Densité optique

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

g : gramme.

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

ERO : Espèces réactives de l'oxygène ou oxygénées

GAE : Gallic acid equivalent

mg/ml : milligramme par millilitre.

ml: millilitre.

min : minute.

mM : millimolaire

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit

nm : nanomètre.

NO• : monoxyde d'azote

O₂•- : anion superoxyde

•O₂ : oxygène singulet

OH : groupe hydroxyle

•OH : radical hydroxyle

ROO• : radical peroxyde

ROOH : peroxydes organiques

TCA : Acide trichlorure acétique.

tr : temps de rétention

μl: microlitre.

UV: Ultra-violet.

CLHP : Chromatographie en Phase Liquide de haute Performance

AAEAC : Ascorbic acid Equivalent Antioxydant Capacity

v/v : volume par volume

°C : degré.

% : pourcentage.

λ max : longueur d'onde.

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Conditions du gradient d'analyse HPLC	26
2	Aspect, couleur d'extraction des composés phénoliques du <i>P. lentiscus</i> .	30
3	Teneur en composés phénoliques des extraits du <i>P. lentiscus</i> .	31
4	Teneur et taux des flavonoïdes dans les feuilles de <i>P. lentiscus</i> .	33
5	Teneur et taux des tanins dans les feuilles de <i>P. lentiscus</i>	34
6	les standards des composés phénoliques injectés et leur temps de rétention	39
7	Les valeurs des extraits déterminées par le test DPPH	41
8	Les valeurs des AAEAC des extraits acétate d'éthyle et dichlorométhane	43
9	Les valeurs des TEAC déterminées par le test d'ABTS	45

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	<i>Pistacia lentiscus</i> [Anacardiaceae], arbuste commun des maquis et garigues en Algérie	6
2	Description botanique de <i>P.lentiscus</i>	6
3	Aire de répartition de <i>P. lentiscus</i> L. autour du bassin Méditerranéen	7
4	Structure de base des acides benzoïque et cinnamique	10
5	Structure chimiques des flavonoïdes	11
6	Piégeage des radicaux libres par les flavonoïdes	12
7	Exemples de tannoïdes	15
8	Structure des tanins condensés (R=H, OH)	15
9	Réaction de FENTON et de HABER-WEISS	17
10	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	31
11	Courbe d'étalonnage de la quercétine	32
12	Courbe d'étalonnage de la catéchine	34
13	Chromatogramme d'HPLC de l'acide chlorogénique enregistré à 254 nm	35
14	Chromatogramme d'HPLC de l'acide férulique enregistré à 254 nm	36
15	Chromatogramme d'HPLC gallyocatéchine enregistré à 254 nm	36
16	Chromatogramme d'HPLC épicatechine enregistré à 254 nm	36
17	Chromatogramme d'HPLC hespéridine enregistré à 254 nm	37
18	Chromatogramme d'HPLC myricétine enregistré à 254 nm	37
19	Chromatogramme d'HPLC de l'acétate d'éthyle du <i>P. lentiscus</i> enregistré à 254 nm	38
20	Chromatogramme d'HPLC de dichlorométhane du <i>P. lentiscus</i> enregistré à 254 nm	38
21	Principe du test de DPPH	40
22	La courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique	40
23	Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique	42
24	Réduction de l'ABTS	44
25	Courbe d'étalonnage de calibration de TEAC	44

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction générale 1

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1	Définition des plantes	3
I.2	Etudes des plantes	3
I.3	L'intérêt de l'étude des plantes	3
II	Notions sur la plante étudiée	4
II.1	Caractérisation botaniques du <i>Pistacia lentiscus</i>	4
II.2	Classification systématiques et description botanique	5
II.2.1	Classification taxonomique	5
II.2.2	Description botanique	6
II.3	Principaux constituants	7
II.4	Principaux métabolites secondaire isolés de <i>Pistacia lentiscus</i>	7
II.5	Propriétés biologiques et pharmacologiques	8
III	principes actifs	8
III.1	Différents groupes des principes actifs	9
III.1.1	Composés phénoliques	9
III.1.2	Les différentes classes de composés phénoliques	9
IV	Stress oxydant	17
IV.2	Génialité sur l'oxydation et les antioxydants	18
IV.3	Définition des antioxydants	18
IV.3.1	Principaux antioxydants	18
IV.4	Classification des antioxydants	19
IV.4 1	Classifications des antioxydants par rapport à leurs mécanismes d'action	19
VI.5.2	Classification des antioxydants suivant la nature chimique dans les aliments	20
V	Méthode d'étude d'activité des antioxydants des plantes médicinales	21
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES		
I	Matériels et méthodes	22
I.1	Matériels	22

I.2	Matériel végétal	22
I.3	Appareils et produits chimiques	22
II	Méthodes d'analyses	23
II.1	Extraction	23
	II.1.1 Méthodes d'extraction des composés phénoliques	23
II.2	Analyse quantitative	24
	II.2.1 Analyse quantitative des composés phénoliques	24
II.3	Analyse des extraits par HPLC-DAD	26
III	Evaluation de pouvoir antioxydant des extraits de <i>P.lentiscus</i>	27
III.1	Test de DPPH [•]	27
III.2	Test réduction de fer	28
III.3	Test d'ABTS	28

CHAPITRE III : Résultats et discussions

I	Extraction des composés phénolique	30
I.1	Teneur des polyphénols	30
I.2	Teneur des flavonoïdes	32
I.3	Teneur des Tannins condensé	33
II	Analyse qualitative par HPLC	35
III	l'étude de pouvoir antioxydant	39
III.1	Activité antioxydante	39
	III.2.1 Test DPPH	39
	III.2.2 Test chimique d'hexacyanoferrate (III)	42
	III.2.3 Réduction du radical- cation ABTS ou détermination du TEAC	43

Conclusion générale	46
----------------------------	----

Références

Annexe

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Historiquement, les plantes ont été une source d'inspiration pour des nouveaux composés médicamenteux, comme les médicaments dérivés des plantes ont apporté une importante contribution à la santé humaine. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2008, plus de 80% de la population mondiale repose sur la médecine traditionnelle pour leurs besoins de soins de santé primaires [1].

Presque toutes les cultures et les civilisations de l'Antiquité à nos jours ont dépendu entièrement ou partiellement de la phytothérapie en raison de leur efficacité, l'accessibilité, la disponibilité, la faible toxicité et d'acceptabilité [2].

Pendant millénaires, l'utilisation des plantes médicinales fut le principal recours pour guérir l'homme. Cette utilisation est généralement adaptée aux pathologies légères, en visant un traitement symptomatique.

Il y'a environ 500 000 plantes sur terre, 100 000 d'entre elles, environ, possèdent des propriétés médicinales attribuées à leur principes actifs qui agissent directement sur l'organisme.

On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie : elles présentent en effet des avantages dont les médicaments conventionnels sont souvent dépourvus [3,4].

En effet, l'usage de plantes médicinales peut apporter directement des réponses à certains problèmes de santé; mais avant de pouvoir recommander l'usage de telle espèce pour une maladie, il est nécessaire de valider l'usage traditionnel qui en est fait. En d'autres termes, il convient d'évaluer scientifiquement l'activité pharmacologique de la plante médicinale retenue, et apprécier si celle-ci confirme sa réputation. De plus, il est impératif de vérifier également l'absence de toxicité des plantes employées. L'usage de plantes médicinales locales, en réponse à des problèmes de santé peut-être perçu comme une alternative aux médicaments conventionnels.

Le *Pistacia lentiscus* est un arbrisseau appartenant à la famille des *Anacardiaceae* (syn.*Pistaciaceae*). Du fruit comestible de cette espèce est extraite une huile qui autrefois était couramment utilisée pour l'alimentation, l'éclairage et elle entrait aussi dans la confection de savon. L'Algérie possède une flore végétale riche et diversifiée. Cette plante est parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, largement utilisée pour traiter les troubles digestives, les ulcères, les plaies et les brûlures,... etc. a constitué le sujet de plusieurs études qui ont déterminé leur compositions chimiques [5-8]. Ainsi que les propriétés biologiques [8-10].

De nombreuses études ont mis en évidence la présence de métabolites secondaires doués d'activités biologiques telles que les polyphénols, alcaloïdes, terpènes ...etc.

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail de recherche dont le but principal est d'étudier les activités antioxydantes des différents extraits Organiques d'*Pistacia lentiscus*. Malgré sa large utilisation, aucune étude toxicologique de quelle nature que ce soit n'a été effectuée sur l'huile de lentisque. De même, la chimie et la pharmacologie de l'huile demeurent peu étudiées, alors que certaines d'entre elles ont étudié les extraits organiques et aqueux.

Le présent travail a pour objectif d'extraire les molécules bioactives, avec la détermination de la concentration de certains groupes, comme il vise à tester les activités biologiques des différents extraits organiques surtout l'activité antioxydante. Ces extraits des feuilles de *P. lentiscus*, arbuste de la famille des Anacardiacees, commun à tous les pays du bassin méditerranéen.

Ce mémoire est constitué de trois parties :

- Une première partie, consacrée à une revue bibliographique, est constituée notamment d'une étude sur les plantes médicinales et une description botanique du *lentisque*, de sa pharmacologie, étayée à la chimie, propriétés thérapeutiques
- La deuxième partie décrit le matériel et méthodes utilisées dans le cadre de cette étude
- La troisième partie contient les principaux résultats et leur discussion.

Une conclusion générale, avec les références bibliographiques.

CHAPITRE I : RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Définition des plantes médicinales

Dans le code de la Santé publique, il n'existe pas de définition légale d'une plante médicinale au sens juridique, mais en Algérie « une plante » est dite médicinale lorsqu'elle est inscrite à la pharmacopée et que son usage est exclusivement médicinal. C'est-à-dire qu'elles sont présentées pour leurs propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales [11].

Ce sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Leur action provient de leurs composés chimiques (métabolites primaires ou secondaires) ou de la synergie entre les différents composés présents [12].

I.1. Etude des plantes médicinales

Au cours des dernières décennies, les recherches scientifiques les plus modernes n'ont fait que confirmer le bien fondé des vertus thérapeutiques de la plupart des plantes médicinales utilisées de façon empirique depuis des millénaires [13].

Ce savoir traditionnel ancestral transmis de génération en génération est devenu aujourd'hui une mine d'informations extrêmement précieuses pour tous les chercheurs de l'industrie pharmaceutique [14].

Les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît. Les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus.

I.2. L'intérêt de l'étude des plantes médicinales

La plus part des espèces végétales qui poussent dans le monde possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie : elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus [15].

Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les conditions des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques ; mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs.

La tubocurarine, le relaxant musculaire le plus puissant, est dérivée du curare (Chondrodendron tomentosum), la morphine, l'analgésique le plus puissant, est tirée du pavot à opium (Papaver somniferum) et la cocaïne utilisés comme anesthésiants, est tirés du coca (Erythroxylum coca) [14].

L'exploration des ressources naturelles, et notamment du monde végétal, est encore capitale à l'heure actuelle. Elle est réalisée par :

- Etude chimio-taxonomique : qui consiste à rechercher des catégories de molécules dans les plantes en fonction de leur appartenance botanique. Ainsi les apocynaceae, les rutaceae, les rubiaceae renferment souvent des alcaloïdes et c'est parmi ces familles que l'on recherche d'abord les alcaloïdes.
- Etude ethno-pharmacologique : qui consiste à recueillir des renseignements sur l'utilisation des plantes auprès des populations vivant encore près de la nature en Amérique du Sud, dans les îles du Pacifique, en Afrique ou dans le Sud-Est Asiatique.
- Etude pharmacologique : est caractérisée par l'observation du comportement des plantes dans leur environnement naturel. Les interactions plantes-plantes (allélopathie), plantes-microorganismes, plantes-insectes, plantes-animaux sont associées à des signaux chimiques [14].

II. Notions sur la plante étudiée

II.1. Caractéristiques botaniques du *Pistacia lentiscus*

Le lentisque connu également comme étant l'arbre au mastic est une plante médicinale soignant de nombreux problèmes et troubles, on le retrouve principalement sous forme d'huile essentielle pour traiter les affections pulmonaires. Le *Pistacia lentiscus* soigne la toux et la bronchite, ainsi que la sinusite et aide dans l'emphysème, il agit aussi sur la circulation sanguine.

Noms communs: Lentisque, arbre au mastic, pistachier lentisque, restinle.

Nom latin: *Pistacia lentiscus*.

De la famille: Famille des Anacardiaceae (*Anacardiaceae*).

Nom anglais: Chios mastic tree, lentisc, Cyprus sumac, lentisk.

Nom allemand: Lentisk, mastixpistacie, mastixpistazie.

Nom espagnol: Charneca, lentischio.

Nom italien: Lentischio, sondro, stinco.

Nom néerlandais: Mastiekboom.

Nom arabe: Drou, الضرور

Nom d'Afrique du nord: Drew ,Tidekt, Tidekst,(Berbère)

Règne: Plantae

Embranchement: Spermatophyta (Angiospermae)

Classe: Dicotylédones

Ordre: Sapindales

Synonymes:

Lentiscus massiliensis (Mill.) Fourr.

Lentiscus vulgaris Fourr.

Pistacia brevifolia Gand.

Pistacia chia Desf.

Pistacia gummifera Salisb.

Pistacia carbonensis Mill.

Terebinthus lentiscus (L.) Moench

Terebinthus vulgaris Fourr [16].

II.2. Classification systématique et description botanique

II.2.1. Classification taxonomique

Le *P. lentiscus* est une espèce appartenant à la famille des *Anacardiaceae* (syn. *Pistaciaceae*). Les espèces les plus importantes dans le monde du genre *Pistacia* sont :

- *Pistacia atlantica*
- *Pistacia chinensis*
- *Pistacia lentiscus* L. — pistachier lentisque
- *Pistacia terebinthus* L. — pistachier térébinthe
- *Pistacia vera* L. — pistachier vrai (qui donne la pistache)
- *Pistacia integerrima*
- *Pistacia palestina*

En Algérie, le genre *Pistacia* est représenté par quatre espèces, en l'occurrence *Pistacia lentiscus*, *Pistacia terebinthus*, *Pistacia vera* et *Pistacia atlantica* [17].

Parmi les espèces du genre *Pistacia*, le *Pistacia lentiscus* L. est un arbrisseau très commun dans notre pays [18, 19].



Figure.1: *Pistacia lentiscus* [Anacardiaceae], arbuste commun des maquis et garigues en Algérie.

II.2.2. Description botanique

Arbrisseau dioïque thermophile de 1 à 3 mètres, à odeur résineuse forte et à écorce lisse et grise; les feuilles persistantes, composées, alternes pourvues d'un pétiole ailé, paripennées à 4- 10 petites folioles elliptiques-obtuses, mucronulées, coriaces, luisantes en dessus, mates et pâles en dessous. L'arbre est de hauteur de 1 à 3 m, largeur jusqu'à 2 mètres, son origine est le pourtour méditerranéen, Afrique du nord et îles Canaries.

Les fleurs en grappes spiciformes denses, naissant 1 ou 2 à l'aisselle d'une feuille et égalant au plus la longueur d'une foliole. Le fruit petit, subglobuleux, apicule, rouge, puis noir à la maturité [15, 20, 21].

Arbuste de P. lentiscus



Partie aérienne avec Fruit



Fruit



Figure.2: Description botanique de *P. lentiscus*.

Le pistachier lentisque est très commun dans le bassin méditerranéen (**Figure 3**), il se trouve à l'état sauvage, dans les maquis et les garrigues dans tout type de sols, bien qu'il préfère les terrains siliceux. En Algérie, le lentisque se trouve sur le long du tell et dans les zones forestières [21].

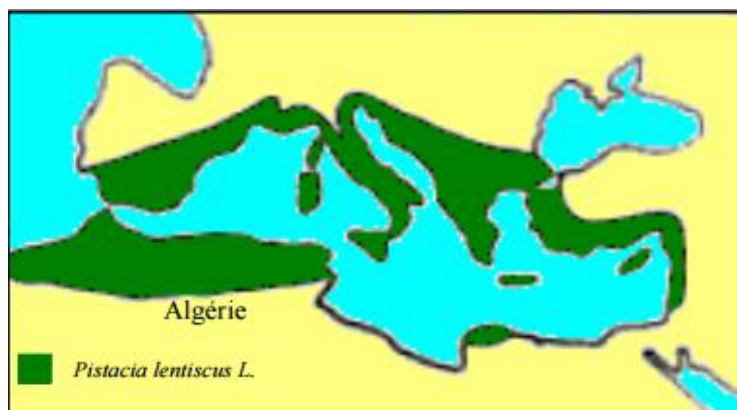


Figure.3: Aire de répartition de *P.lentiscus* L. autour du bassin Méditerranéen.

Une étude portant sur la variabilité naturelle de *Pistacia lentiscus* du bassin méditerranéen utilisant une analyse par RAPD (random amplifié dpolymorphic DNA), combinée à des examens chimiques et morphologiques, conclue à l'existence d'une grande variabilité génotypique de cette espèce [23].

II.3. Principaux constituants

La résine et les feuilles du lentisque refferment les principes actifs, cela comprend une huile grasse et des tanins, de l'acide mastique et de la masticine, des monoterpènes et sesquiterpènes ainsi que des monoterphénols et sesquiterphénols.

II.4. Principaux métabolites secondaires isolés de *Pistacia lentiscus*

La chimie de la plante est relativement peu étudiée. *P. lentiscus* est connue pour contenir une huile essentielle et fixe [24], une huile grasse [25], des tanins condensés et hydrolysables [26], des glycosides flavonoïques [27], des anthocyanes [28], une résine « mastic de Chio » [29], et des tri terpènes [30]. De la résine extraite du tronc et des tiges de *Pistacia lentiscus* ont été isolé une huile essentielle, riche en mono terpènes en quantité majoritaire, des monoterpénols et des sesquiterpènes en quantité moyenne, et des esters terpéniques en quantité mineure [31,32]. Des feuilles de *P. lentiscus* ont été isolés des tanins proanthocyanidiques et galliques, des glycosides flavonoïdes et des anthocyanes, et des

dérivés à noyau gallique et qu'inique [28]. Des baies est extraite par expression une huile végétale dont la composition demeure peu étudiée.

II.5. Propriétés biologiques et pharmacologiques

Les études expérimentales effectuées sur cette plante ont mis en évidence différents activités biologiques et pharmacologiques. Une activité antiulcéreuses du *Pistacia lentiscus* a été signalée par plusieurs auteurs [33], tels que l'effet antifongique [34], antibactérien [35], antiulcéreux duodénal [33], et hepatoprotecteur [36]. En médecine traditionnelle, on utilise la résine de pistachier lentisque afin de combattre les ulcères d'estomac. Son efficacité contre la bactérie *Helicobacter pylori* a en effet été confirmée. Cette méthode consiste à éliminer la bactérie *H. pylori* par mastication de résine du pistachier lentisque, comme une gomme à odeur prononcée. L'huile de lentisque est souvent utilisée en médecine comme astringent, expectorant, et cicatrisant [22], Selon [31], et d'autres auteurs, les huiles essentielles de lentisque sont utilisées pour leurs effets pharmacologiques entant que décongestionnant veineux-lymphatique et antispasmodique [15, 20, 24, 31].

III. Principes actifs

Le principe actif c'est une molécule contenu dans une drogue végétale ou dans une préparation à base de drogue végétale et utilisé pour la fabrication des médicaments [37]. Cette molécule présentant un intérêt thérapeutique curatif ou préventif pour l'homme ou l'animale, elle est issue de plantes fraîches ou des séchées, nous pouvons citer comme des parties utilisées: les racines, écorces, sommités fleuries, feuilles, fleurs, fruits, ou encore les graines [38], Les plantes contiennent des métabolites secondaires peuvent être considérées comme des substances indirectement essentiels à la vie des plantes par contre aux métabolites primaires qu'ils sont les principales dans le développement et la croissance de la plante, les métabolites secondaires participent à l'adaptation de la plante avec l'environnement, ainsi à la tolérance contre les chocs (lumière UV, les insectes nocifs, variation de la température ...etc) [39]. Ces composés sont des composés phénoliques, des terpènes et stéroïdes et des composés azotés dont les alcaloïdes.

III.1. Différents groupes des principes actifs

III.1.1. Composés phénoliques

Les polyphénols ou composés phénoliques forment une grande classe de produits chimiques qui on trouve dans les plantes au niveau des tissus superficielles, ils sont des composés photochimiques poly hydroxylés et comprenant au moins un noyau aromatique à 6 carbones. Ils subdivisent en sous classe principales; les acides phénols, les flavonoïdes, les lignines, les tanins... [39]. Comme ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes, elles ont un rôle principale à la vie de plante, à la défense contre les pathogènes; principalement les moisissures et les bactéries phytopathogènes et la protection contre les rayonnements UV; sachant que tous les composés phénoliques absorbent les rayonnements solaires [39].

III.1.2. Différentes classes de composés phénoliques

Les composés phénoliques sont une vaste classe de substances organiques cycliques très variées, d'origine secondaire qui dérivent du phénol C_6H_5OH qui est un monohydroxybenzène.

Les composés phénoliques sont fort répandus dans le règne végétal ; on les rencontre dans les racines, les feuilles, les fruits et l'écorce. La couleur et l'arôme, ou l'astringence des plantes dépendent de la concentration et les transformations des phénols. Les composés phénoliques représentent de 2 à 3 % de la matière organique des plantes et dans certains cas jusqu'à 10% et même d'avantage. Tous les phénols, à de très rares exceptions (exemple: la lignine) sont des métabolites énergétiques des échanges cellulaires et interviennent activement dans différents processus: photosynthèse, respiration croissance, aux maladies infectieuses. Dans la nature, ces composés sont généralement dans un état lié sous forme d'esters ou plus généralement d'hétérosides. Ils existent également sous forme de polymères naturels (tanins).

Le groupe le plus vaste et plus répandu des phénols est celui des flavonoïdes. Le terme « flavonoïde », est utilisé pour la première fois par Seissman et Hinreiner [40].

III.1.2.1. Acides phénoliques

Les phénols ou les acides phénoliques sont des petites molécules constituées d'un noyau benzénique et au moins d'un groupe hydroxyle, elles peuvent être est ériifiées,

éthérifiées et liées à des sucres sous forme d'hétérosides, ces phénols sont solubles dans les solvants polaires, leur biosynthèse dérive de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique [41]. Les phénols possèdent des activités anti-inflammatoires, antiseptiques et analgésiques (médicament d'aspirine dérivée de l'acide salicylique) [15].

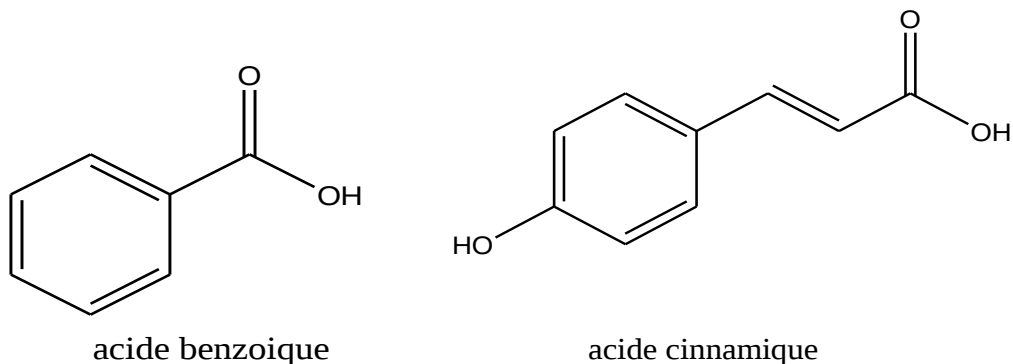


Figure.4: Structure de base des acides benzoïque et cinnamique.

III.1.2.2. Flavonoïdes

Terme en latin; flavus= jaune. Ils peuvent être considérés parmi les agents responsables des couleurs de plante à côté des chlorophylles et caroténoïdes [41].

Les flavonoïdes ont des sous-groupes caractérisés à contenant deux ou plusieurs cycles aromatiques existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides, chacun portant une ou plusieurs groupes hydroxyles phénoliques et reliées par un pont carboné.

III.1.2.3. Structure chimique et classification

Structuralement les flavonoïdes ont un squelette de base commun constitué de 15 atomes de carbone assemblés en trois cycles nommés A,C et B. selon la structure du cycle intermédiaire (cycle C), les flavonoïdes se répartissent en plusieurs de molécules dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols [42].

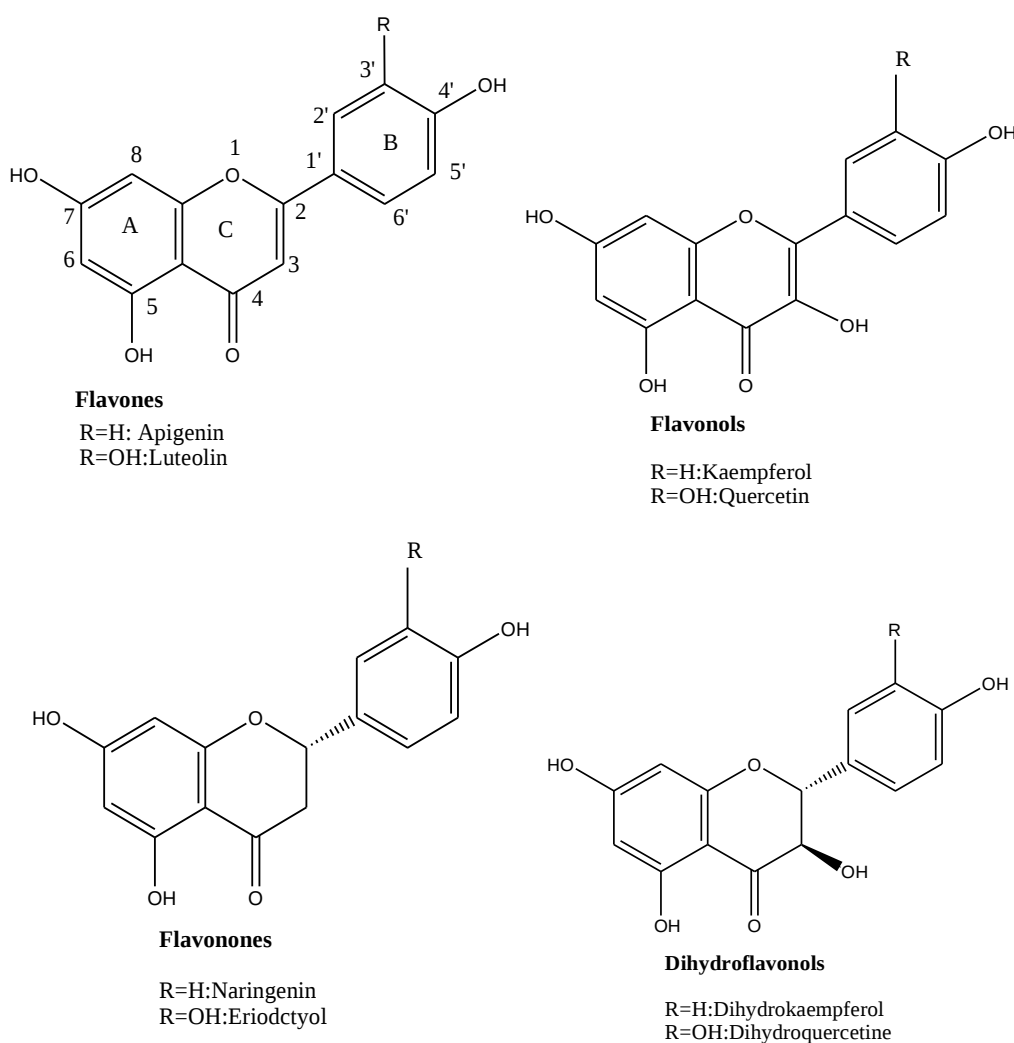


Figure.5: Structure chimiques des flavonoïdes.

Leur biosynthèse se fait à partir d'un précurseur commun, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalacon.

A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylés. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone.

III.1.2.3. Distribution et localisation

Les flavonoïdes sont largement abondants dans les légumes feuilles (salade, choux, épinards, etc), ainsi que dans les téguments externes des fruits. Présentes dans tous les organes aériens, ils ont une teneur maximale dans les organes jeunes (feuilles et boutons floraux). Sur le plan tissulaire, les flavonoïdes sont rencontrés plus précisément dans les vacuoles des cellules ainsi que dans les chloroplastes [43].

Récemment, de nombreux travaux ont montré que certains fruits et légumes sont très riches en flavonols, flavones et flavanones [44- 49].

Le monde animal est lui aussi concerné par les flavonoïdes. On trouve par exemple de la chrysine, de la quercétine, et de la galangine dans propolis des abeilles. Ces insectes les synthétisent à partir des sécrétions de bourgeons de nombreux arbres comme le bouleau, l'aulne, le sapin et les modifient grâce à leurs enzymes salivaires.

III.1.3. Flavonoïdes comme antioxydants

Les flavonoïdes (Fl –OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libre oxydant comme le super oxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène [48].

Radical instable

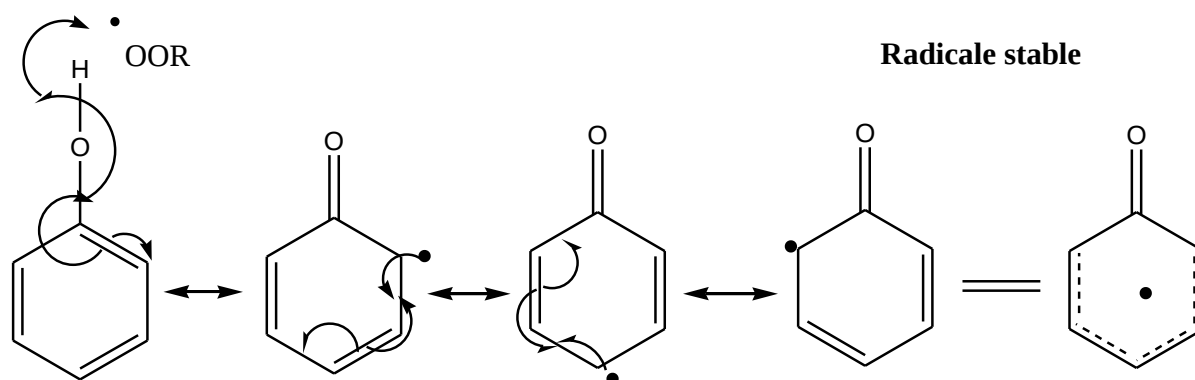


Figure.6: Piégeage des radicaux libres par les flavonoïdes.

III.1.3.1. Propriétés biologique et pharmacologique des flavonoïdes

✚ **Effets Antiallergique :** Ces effets sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et ATPase Ca^{2+} -dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles [49].

✚ **Effets Anti-inflammatoires :** Sous l'action de la cyclo-oxygénase, l'acide Arachidonique se métabolise respectivement en prostaglandines et leucotriènes

induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. Landolfi et son groupe ont montré que certains flavonoïdes tels la quercétine et la myricétine, l'apigénine et la chrysine que sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes en inhibant ces enzymes [50].

✚ **Effets Anti-Ulcereux:** Dans des expériences réalisées sur des rats, il a été démontré que la quercétine et la naringénine jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcéré et la protection des cellules gastriques. Il a été suggéré que la quercétine exerce son activité via un mécanisme complexe impliquant la production du mucus, le piégeage de radicaux libres, et également l'inhibition de la production de leucotriènes [49]. D'autres études ont permis d'établir une relation étroite entre les propriétés antiulcéreuses de la quercétine, naringénine, rutine et kaempférol, et la production du PAF (PlateletActivating Factor) qui est un agent ulcérogène [51]. En effet, il s'est avéré que la réduction des dommages gastro-intestinaux est due probablement à l'inhibition du PAF par ces flavonoïdes.

✚ **Effets Anticancereux:** Présente pratiquement dans tous les types de thé en particulier dans le thé vert, la catéchine a montré une activité anti-tumorale [52]. Une telle activité est attribuée à la capacité de ce flavonoïde d'inactiver activateur tissulaire du plasminogène (t-PA 5 tissue-type plasminogenactivator) en greffant à celui-ci la laminine, une molécule de la matrice extracellulaire qui joue un rôle important durant la mort cellulaire et en bloquant les sites récepteurs des hormones [53]. La croissance cellulaire peut être inhibée également par d'autres mécanismes, à savoir : la stabilisation du collagène, l'altération de l'expression des gènes, et la réduction des radicaux libres [49], En effet, la catéchine augmente la résistance du collagène [55], et inhibe l'activité de la collagénase [56].

✚ **Autres Effets Biologiques:** Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase [57]. Ong et Khoo ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques [58,59]. Certains flavonoïdes peuvent entraver l'athérosclérose et par conséquent réduisent le risque des maladies cardiovasculaires [60]. Les effets antiviraux des flavonoïdes ont été également démontrés [61].

III.1.3.2. Tanins

Tanin est un terme provient d'une pratique ancienne qui utilisait des extraits de plantes pour tanner les peaux d'animaux, On distingue deux catégories :

- **Tanins condensés** : polymères d'unités flavonoïdes reliées par des liaisons fortes de carbone, non hydrolysable mais peuvent être oxydées par les acides forts libérant des anthocyanidines.
- **Tanins hydrolysables** : Polymères à base de glucose dont un radical hydroxyle forme une liaison d'ester avec l'acide gallique [62].

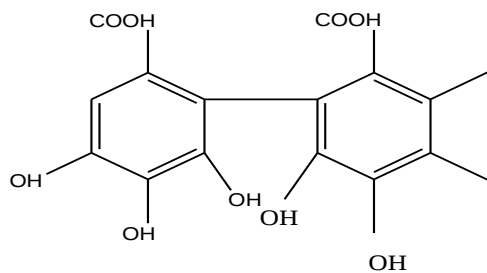
Les plantes riches en tanins sont utilisées pour retendre les tissus souples et pour réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure, elles rendent les selles plus liquides, facilitant ainsi le transit intestinal [15].

III.1.3.2.1. Structure chimique

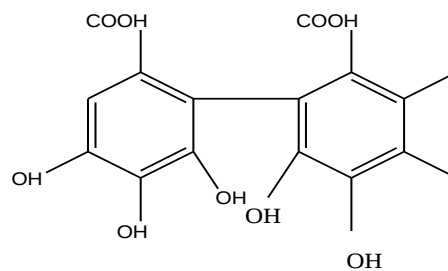
On distingue les tanins hydrolysables ou tannoïdes (**Figure 7**) qui sont des polymères de l'acide gallique et les tannins vrais non hydrolysables (condensés) (**Figure 8**), qui sont es polymères de certains flavanols, les catéchines ou catéchols et de proanthocyanidols.

L'astringence des fruits et des boissons provient souvent de l'interaction des polyphénols présents avec les protéines salivaires. Donc les tanins ont la propriété de coagular les protéines du derme, d'où leur utilisation dans le tannage des peaux, ils précipitent également les protéines de la salive ce qui correspond à leur action astringente. Cette propriété rend les tissus riches en tannins peu consommables par les herbivores. L'importante quantité de tannin rencontrée chez les plantes parasitées correspond à une réaction de défense.

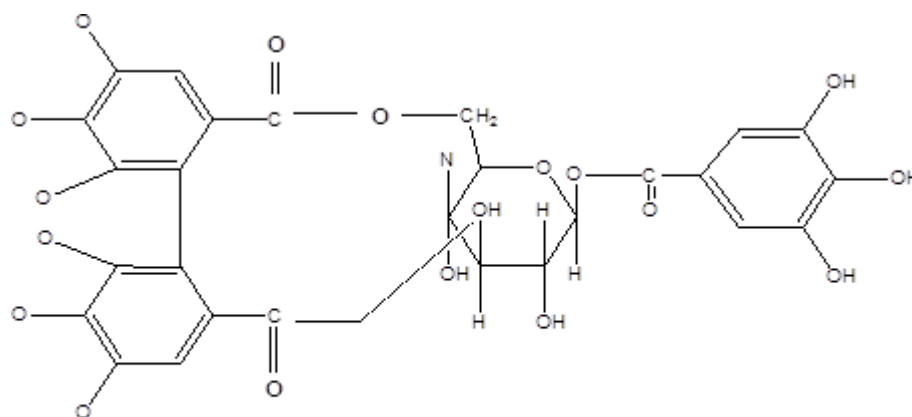
La dispersion des tannins chez de nombreux fruits lors de leur maturation indique qu'ils peuvent, comme de nombreux autres composés phénoliques, être réutilisés par la plante [63].



Acide digallique



Acide digallique



Trimaire d'acide gallique

Figure.7 : Exemples de tannoïdes.

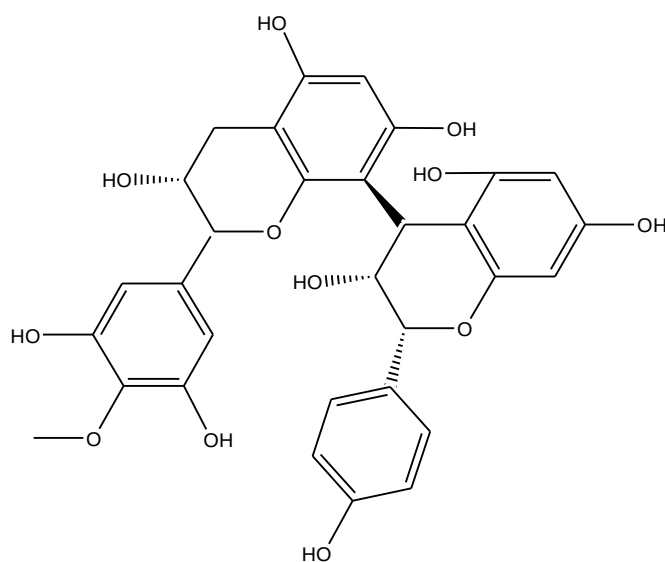


Figure 8: Structure des tanins condensés.

III.1.3.2.2. Activité biologique des tanins

La plupart des propriétés biologiques des tanins sont liés au pouvoir qu'ils ont de former des complexes avec des macromolécules en particulier avec les protéines. Cette propriété semble être essentielle dans leurs activités à l'encontre des virus. Ainsi, leur association avec les protéines de surface des virus ou des cellules hôte serait à l'origine de la diminution charge viral. De telles activités ont été trouvées à l'encontre de l'herpès [64], et en particulier contre le HIV ou SIDA [65]. L'acide chébulagique extrait de *terminaliachebula*, par exemple, utilise ce mode d'action contre le HIV. Egalement, il apparait que les tanins agissent en inhibant des enzymes essentielles à la réplication du virus, comme l'acide ellagique inhibiteur de la VHI transcriptase reverse' ou l'acide chébulagique et la corilagine, extraits de deux espèces de *phyllantus*, inhibiteurs de la ADN polymérase du virus Epstein-Barr [66].

De façon plus générale, les tanins sont des inhibiteurs enzymatiques de l'élastase, de l'histidine décarboxylase et de l'enzyme de conversion de l'angiotensine [67].

L'acide chébulagique est réputé comme inhibiteur de la topoisomérase I et surtout II de l'ADN humain. Ce dernier possède également la propriété, qu'ont de nombreux autres tanins ellagiques, d'être cytotoxique à l'encontre de lignées cellulaires cancéreuses. Plus récemment, des propriétés antiplasmodiales ont pu être trouvées. L'extrait méthanolique d'écorces de *tristianopsis calobuxus* de Nouvelle Calédonie, contenant de nombreux tanins, a donné des résultats prometteurs [68].

L'acide ellagique est l'un des composés actifs. Plusieurs drogues à tanins existent mais leurs applications restent restreintes. Elles sont utilisées par voie interne pour leur effet anti-diarrhéique et par voie externe pour imperméabiliser les couches les plus externes de la peau et des muqueuses, protégeant ainsi les couches sous-jacentes. Elles ont également un effet vasoconstricteur sur les petits vaisseaux superficiels. En limitant la perte en fluides et en empêchant les agressions extérieures, les tanins favorisent la régénération des tissus en cas de blessure superficielle ou de brûlure. Quelle que soit la voie d'administration, l'effet antiseptique (antibactérien et antifongique) clairement démontré de ces molécules est intéressant (diarrhées infectieuses, dermatose, ...) [67,69].

D'autres tanins sont aussi connus pour leurs propriétés antimicrobiennes. En effet, l'acide chébulagique ou la corilagine extraits de *terminaliacitrina* (plante utilisée dans la médecine traditionnelle Thaïlandaise) présentent de nombreuses activités à l'encontre de

souches pathogènes de l'homme, comme *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* ou encore *Enterococcus* SPP [70].

Enfin, les potentialités des tanins dans l'inhibition de la peroxydation des lipides ont mis en évidence leurs propriétés de piègeurs de radicaux libres et d'inhibiteurs de la formation de l'ion super oxyde (inhibiteurs de la xanthine oxydase).

IV. Stress oxydant

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants [73] en faveur des premiers et impliquant la production d'espèces réactives de l'oxygène [74]. La formation incontrôlée d'espèces réactives de l'oxygène comme l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le radical hydroxyle ($OH^\cdot$) aura la conséquence souvent lourde pour l'organisme. La formation d'espèces réactives n'est pas toujours synonyme de toxicité. En effet, certaines sont des intermédiaires de processus physiologiques normaux. Ce n'est que lorsque les systèmes de défense sont dépassés et ne suffisent plus à neutraliser la surproduction de ces espèces que la toxicité apparaît. Un stress oxydative pourra être induit lors de la surproduction d'espèces réactives et /ou par suite de l'inhibition des systèmes antioxydants qui peuvent être inactivés, soit directement, soit par défaut de synthèse. Parmi les espèces réactives de l'oxygène, le radical hydroxyle, présenté comme le plus toxique malgré sa faible diffusion, peut attaquer tous les types de constituants cellulaires et engendrer diverses altérations (dégradation protéique, inactivation enzymatique, lipoperoxydation, adduits à l'ADN, etc.). Il résulte de la rupture homolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène [74]. Il peut être produit par les réactions de Fenton et de Haber-Weiss (**Figure 9**) [74].

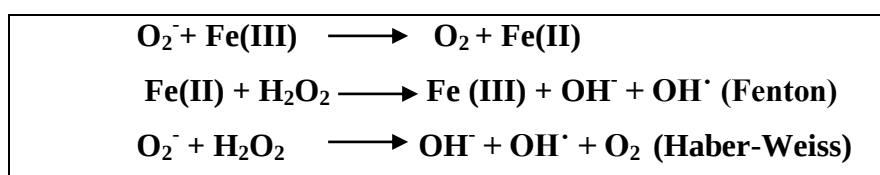


Figure.9 : Réaction de Fenton et de Haber-Weiss

IV.1. Généralité sur l'oxydation et les antioxydants

L'oxydation est le phénomène qui fait rouiller les métaux, qui fait flétrir les légumes et les fruits, rancir les graisses. Il modifie le goût et la couleur des aliments.

L'organisme subit également le phénomène d'oxydation, mais il est équipé pour lutter contre ces altérations: un énorme système de défense est en permanence en place, avec des systèmes enzymatiques et/ou des systèmes dégénératifs de complexe mettant en jeu par exemple l'acide ascorbique (vitamine C) ou le glutathion. Mais ce système de défense est parfois débordé, surtout quand les agressions sont multipliées sous l'effet de la fumée du tabac, de pollution, du soleil, d'un effort physique intense, etc.

- Soit dans des conditions de stress et alors l'oxydation augmente au point de ne pas pouvoir être régulée.
- -Soit dans des conditions de mauvaise alimentation et alors des quantités d'antioxydants apportés ne sont pas suffisantes pour rétablir l'équilibre. C'est là où il y a des dégâts [75].

IV.3. Définition des antioxydants

Les antioxydants sont définis par Halliwell comme «toute substance qui en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat» [76].

Les antioxydants piègent les radicaux libres en inhibant les réactions à l'intérieur des cellules provoquées par les molécules de dioxygène et de peroxyde, aussi appelées espèces oxygénées radicalaires (EOR) et espèces azotées radicalaires [72].

Les antioxydants sont largement présents dans nos aliments, soit sous forme naturelle, soit sous forme d'additifs utilisés dans l'industrie agroalimentaire [76].

IV.3.1. Principaux antioxydants

Il existe de très nombreuses sources d'antioxydants (tant ceux fabriqués par l'organisme que ceux qui sont fournis par les aliments) et que ces derniers réagissent constamment avec d'autres molécules et tissus, ce qui en change la forme. Il est difficile de départager, par rapport à la quantité totale d'antioxydants présents dans l'organisme, la proportion d'antioxydants attribuables à l'alimentation (antioxydants exogènes) et la proportion attribuable à la synthèse par l'organisme (antioxydants endogènes). Cela dit, on en

sait beaucoup sur le rôle et l'importance relative des sources d'antioxydants endogènes et exogènes [72].

- Antioxydants Endogènes.
- Antioxydants Exogènes
- Alimentation.

IV.4. Classification des antioxydants

IV.4.1. Classification des antioxydants par rapport à leurs mécanismes d'action

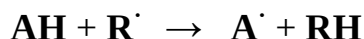
Il y a deux options pour retarder la réaction d'oxydation :

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

Ces deux options fournissent la base de classification des antioxydants sous forme primaire ou secondaire selon leur mécanisme d'action [75].

IV.4.1.1. Antioxydants primaires ou radicalaires ou vrais

Antioxydants primaires permettent l'interruption de la chaîne auto catalytique :

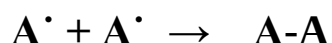


$\text{A}^{\bullet}$: radical libre.

AH : molécule antioxydant [75].

La molécule AH est antioxydant si le radical formé $\text{A}^{\bullet}$ est plus stable. La stabilité du radical $\text{A}^{\bullet}$ peut s'expliquer par sa conversion en composés non radicalaires [75].

Selon la réaction suivante :



IV.4.1.2. Antioxydants secondaires

Les antioxydants secondaires assurent l'inhibition de la production des radicaux libres. Ce sont des substances décomposant les hydroperoxydes en alcool, comme thiols (glutathion, acides aminés soufrés) ou les disulfures, des protecteurs vis-à-vis des UV, comme les carotènes, des chélatants des métaux promoteurs d'oxydation type fer et cuivre, comme l'acide citrique et les lécithines ou enfin de séquestrant d'oxygène comme l'acide ascorbique [75].

IV.4.2. Classification des antioxydants suivant la nature chimique dans les aliments

Les antioxydants sont classés dans trois catégories différentes (naturelles, synthétiques et synergiques) [77].

IV.4.2.1. Antioxydants naturels

Les antioxydants naturellement sont présents dans presque toutes les plantes, tous les micro-organismes, les champignons et même dans les tissus animaux. Le groupe le plus important d'antioxydants naturel comprend la vitamine E (tocophérol), les flavonoïdes et autres composés végétaux [77].

IV.4.2.2. Antioxydants synthétiques

Les antioxydants synthétiques sont généralement préparés en laboratoire, et principalement à partir de composants chimiques. Dans l'industrie alimentaire, l'ajout d'antioxydants naturels dans les aliments est une technique complètement nouvelle. Depuis à peu près 1980, les antioxydants naturels sont apparus comme alternative aux antioxydants, ils sont aujourd'hui généralement préférés par les consommateurs. Toutefois, le fait de trouver communément une substance dans un aliment ne constitue pas une garantie de son absence totale de toxicité. Les antioxydants synthétiques ont été testés quant à leurs effets carcinogènes ou mutagènes, mais de nombreux constituants naturels des aliments n'ont pas encore été testés [77].

IV.4.3. Antioxydants synergiques

Les antioxydants synergiques sont des substances qui ne sont guère actives en tant qu'antioxydants, et dont les propriétés apparaissent surtout en présence des autres antioxydants. Il en est ainsi des lécithines, des acides citrique et tartrique, des acides aminés, de certains flavonoïdes. Leurs propriétés peuvent s'expliquer par un effet chélatant de métaux comme le fer ou le cuivre, dont on connaît bien l'effet pro-oxydant à faible dose. Cependant, ce n'est peut-être pas la seule explication, car plusieurs de ces produits sont d'assez mauvais chélatants. Certains produits ont un effet inhibiteur de la décomposition des hydroperoxydes, et d'autres semblent régénérer des antioxydants, comme les tocophérols ou les dérivés de l'acide ascorbique à partir de leurs formes oxydées.

C'est sans doute à ce groupe des synergistes qu'il faut rattacher les lipoaminoacides étudiés par Morelle et ces collaborateurs [78], qui trouveraient leurs applications spécifiques en cosmétologie. Ce sont des sels d'acides aminés basiques comme la lysine et l'arginine avec des acides gras. Ils sont commercialisés sous le nom de Lysofat®. Le glutathion a également été proposé en formulation cosmétique [78].

V. Méthode d'étude d'activité des antioxydants des plantes médicinales

L'activité antioxydant ne doit pas être conclue sur la base d'un seul modèle de test antioxydant. Et en pratique, plusieurs essais in vitro procédures sont menés pour évaluer les activités antioxydantes avec les échantillons d'intérêt. Un autre aspect est qu'un antioxydant des modèles de test varient dans les différents points de vue. Par conséquent, il est difficile pour comparer une méthode entièrement à autre. Dans une certaine mesure, la comparaison entre différentes méthodes in vitro a été effectuée par Badarinarath, Nuralamet et ces collaborateurs [79]. Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination de l'activité antioxydante, nommées d'après le nom de la substance utilisée comme source de radicaux libres, par exemple: FRAP (Ferric reducing antioxidant power), ORAC (oxygen radical absorbance capacity), TEAC (Trolox équivalent antioxidant capacity) ou ABTS (2,2-azino-bis 3-éthyl-benzothiazoline 6-sulphonate) et DPPH⁺ (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) etc. Il est à indiquer que différentes méthodes donnent des résultats assez différents et devraient être appliquées préférentiellement pour la comparaison de produits similaires [80].

CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Matériels et méthodes

Notre travail de recherche a été réalisé au sein du laboratoire des sciences fondamentales de l'université de Laghouat.

I.1. Matériel

I.2. Matériel végétal

Les feuilles de *Pistacia lentiscus* sont collectées et séchées en 2010

1.3. Appareils et produits chimiques

Appareillage

- Balance de précision.
- Agitateur.
- Centrifugeuse.
- Rotavapor
- Spectrophotomètre UV/visible
- Chauffe ballon.
- Hôte chimique.

Réactifs et produits

- Méthanol (SIGMA-ALDRICH)
- Réactif de Folin-Ciocalteu (PROLABO)
- Vanilline.
- DPPH (SIGMA-ALDRICH)
- ABTS (SIGMA-ALDRICH)
- Chlorure d'aluminium (BIOCHEM)
- Hexacyanoferrate de potassium.
- Chlorure de fer (III) (RIEDEL-DE HAEN)
- Acétate d'éthyle (RIEDEL-DE HAEN)
- Acide trichloracétique TCA (FLUKA)

II. Méthodes d'analyses

II.1. Extraction

II.1.1.Méthodes d'extraction des composés phénoliques

La méthode d'extraction Utilisés pour les composés phénoliques est celle d'Amiot[82].

L'objectif de l'étape de l'extraction est de séparer les substances phénoliques de la poudre solide et de les faire passer en solution. Elle est réalisée en trois étapes :

II.1.1.1 Extraction des composés phénoliques

L'échantillon déjà séchée et finement broyée, 2g de la poudre ainsi obtenue est ensuite macérée dans 100ml d'un mélange hydro-alcoolique (méthanol/eau) (70/30 : V/V) pendant 96 heures à température ambiante. L'extrait est filtré à l'aide d'un filtre milliporeux de 0.45 μm chaque 24 heures, On évapore le méthanol et on récupère la phase aqueuse et on fait une extraction par l'acétate d'éthyle, puis on récupère la phase organique et on l'évaporer à sec $T^\circ = 50^\circ\text{C}$ puis on le solubilise au méthanol pour obtient l'extrait brut de l'acétate d'éthyle.

II.1.1.2. Dépigmentation

On évapore le méthanol sous pression réduite à 50°C . La phase aqueuse (l'eau) est lavée plusieurs fois avec demi volume d'acétate d'éthyle jusqu'à l'épuisement des pigments.

II.1.1.3. Purification des composés phénoliques

La phase aqueuse est on suit extraite une 2ème fois par l'acétate d'éthyle et on obtient deux phase, on fait une évaporation à sec a $T^\circ = 50^\circ\text{C}$ à la phase organique, le résidu aussi est repris par un volume de 10ml de méthanol. Pour obtient un 2ème extrait brut de dichlorométhane, et on le néglige la phase aqueuse.

II.2. Analyse quantitative

II.2.1. Analyse quantitative des composés phénoliques

II.2.1.1. Dosage des composés phénoliques

Le dosage des polyphénols dans les différents extraits est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu [82,83].

-Principe

Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique $H_3PW_{12}O_{40}$ et acide phosphomolybdique $H_3PMO_{12}O_{40}$, il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de Tungstène W_8O_{23} et de Molybdène MO_8O_{23} , 5. Cette Coloration bleu dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu donne un maximum d'absorption à 750 nm.

-Mode opératoire

A partir des solutions d'acide gallique on obtenue une courbe d'étalonnage standard à différentes concentrations massique. Des solutions filles ainsi préparées. Par une micropipette, 100 μ l d'extrait de dichlorométhane est introduite dans des tubes a essais, d'autre coté on met 10 μ l d'acétate d'éthyle avec 990 μ l méthanol dans des tubes a essais, on prend 100 μ l de ce solvant suivi par 990 μ l de méthanol, suivi de l'addition de 0.5ml (500 μ l) du réactif de Folin-Ciocalteu (10fois dilue dans l'eau) dans chaque tubes et 2ml de carbonate de sodium Na_2CO_3 à 4% (m/v) ont été ajoute, aussi le blanc est représenté par 100 μ l méthanol additionné à 500 μ l de Folin-Ciocalteu, par la suite ces solutions sont maintenus à l'obscurité pendant 30 minute à température ambiante. La lecture de l'absorbance de chaque solution est effectuée à une longueur d'onde de 750nm contre un blanc l'aide d'un spectrophotomètre, ce qui nous permet de tracer la courbe d'étalonnage.

II.2.1.2. Dosage des flavonoïdes

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux dans les extraits de *P. lentiscus* est réalisée par la méthode de Bajorun et Brunton [83,84].

-Principe

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons, Dans cette méthode, la quercétine a été utilisée comme étalon [83, 84].

-Mode opératoire

500 µl d'extrait dichlorométhane à analyser est ajoutés à 500 µl de méthanol, 1000µl de $AlCl_3$ 1% (m/v) 1g $AlCl_3$ dans 100 ml méthanol.

J'ai ajouté 100 µl d'extrait d'acétate d'éthyle à 900 µl de méthanol, 100 µl de $AlCl_3$ 1% (m/v) 1g $AlCl_3$ dans 100ml méthanol.

Le blanc est représenté par 100 µl de méthanol additionné à 100 µl de $AlCl_3$.

Les mélanges sont agités puis incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 15 min. le blanc est réalisé par remplacement de l'extrait par du méthanol et l'absorbance est mesurée à 430 nm en utilisant un spectrophotomètre UV. Les résultats sont exprimés en mg équivalent quercétine/g MS en se référant à la courbe d'étalonnage de la quercétine.

II.2.1.3. Dosage des tanins condensés

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode de la vanilline en milieu acide décrite par Ba et ses collaborateurs [85].

-Principe

Le réactif de vanilline a 4% (m/v) été préparé dans un mélange d'un volume de 100ml méthanol et 4g de vanilline.

-Mode opératoire

100 µl de chaque extrait à analyser ont été ajoutés à 300 µl de réactif de vanilline et 150 µl d'HCl . Le mélange a été agité puis incubé à l'obscurité pendant 15 min. l'absorbance est mesurée à 500 nm par un spectrophotomètre UV contre un blanc constitué d'un mélange de 100 µl d'extrait et 300 µl méthanol et 150 µl HCl .

Les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine/g MS en se référant à la courbe d'étalonnage du catéchine.

II.3-Analyse des extraits par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) UV à barrette de diodes (DAD)

Les composés phénoliques *P. lentiscus* ont principalement été séparés par CLHP-DAD dans le laboratoire de Pharmacognosie de l'Université Catholique de Louvain. Les phases stationnaires habituellement employées pour la séparation de composés phénoliques sont les colonnes de silice greffées avec des chaînes C_{18} . La séparation peut être réalisée en mode isocratique ou en mode gradient d'élution, toutefois la vaste gamme de polarité de ces molécules nécessitent souvent de travailler en gradient d'élution pour éviter les co-élutions et pour éluer l'ensemble des composés. Les systèmes de solvant sont alors composés d'eau (H_2O) et d'un modificateur organique le méthanol (MeOH). La phase mobile est souvent acidifiée par (CH_3COOH) à un pH situé entre 2 et 4, afin d'éviter l'ionisation des nombreux groupes hydroxyles des composés phénoliques pendant l'analyse, ce qui améliore en même temps la résolution et la reproductibilité [86].

En se basant sur ces généralités, la méthode chromatographique a été optimisée à partir d'un extrait brut pour objectif de visualiser un maximum des molécules extraites à une longueur d'onde caractéristique des composés phénoliques: 254 nm. La méthode développée est un gradient constitué d' H_2O ultra-pure et de MeOH tous les deux acidifiés à 1% d'acide acétique (CH_3COOH) dont les proportions sont résumés dans (**Tableau 1**). La séparation a été réalisée à 1 mL/min et à 25°C sur une colonne ChromolithTM Performance RP-18e columns (100 mm × 4.6 mm I.D.) en injectant 10 µL d'extrait.

Tableau.1: Conditions du gradient d'analyse HPLC.

Time (min)	Solvant A (H_2O : 1% CH_3COOH)	Solvant B (MeOH : 1% CH_3COOH)
0	5	95
50	95	5
60	95	5
65	5	95
80	5	95

III-Evaluation de pouvoir antioxydant des extraits de *P. lentiscus*

La mise en évidence du pouvoir antioxydant de nos extraits phénoliques, a été réalisée par eux tests in vitro, un test chimique et l'autre biologique. Dans le test chimique, on s'intéresse à mesurer l'activité de balayage d'un radical libre par les fractions antioxydant en employant le 1,-diohenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH).

III.1-Test du DPPH[•]

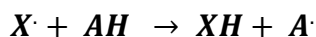
La réduction du radical libre DPPH[•] par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517nm provoquée par la présence des extraits phénoliques.

Le DPPH est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie. Cette décoloration est représentative de la capacité des composés phénolique à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de différentes substances phénoliques de nos extraits [87].

-Principe

La réduction du radicale libre DPPH[•] par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV-Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants [87]. En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH. De couleur violette se réduit à une couleur jaune.

Si nous représentons le radicale DPPH[•] par X et la molécule donneuse d'hydrogène par AH, la réaction peut s'écrire de façon suivante :



Certaines molécules peuvent donner deux atomes d'hydrogène, c'est le cas de l'acide ascorbique.

-Mode opératoire

On mélange 10 µl de chaque extrait phénoliques dilué dans 990 µl de méthanol Nous prenons 10µl à partir d'extrait de dichlorométhane mélanger avec le méthanol, avec 100 µl d'une solution de DPPH[•] (250 µM) préparée aux le méthanol dans les les mélanges réactionnels ont été bien mélange et incubé à l'obscurité pendant 30minutes à une température ambiante pour

que la réaction s'accomplisse. L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 517 nm contre un blanc contenant 100 µl méthanol et 100 µl DPPH.

Une courbe d'étalonnage a été établie pour des différentes concentrations de l'acide ascorbique afin d'exprimer le pouvoir antioxydant de nos extraits.

III.2. Test réduction de fer

Le pouvoir réducteur de fer (Fe^{3+}) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par Oyaiz [88].

-Principe

L'analyse de hexacyanoferrate (III) est un test direct qu'on l'emploie principalement pour mesurer la possibilité et la puissance des antioxydants non enzymatique.

Cette méthode dépend de la réduction de fer (III) au fer (II) en présence des extraits ou des composés purs et la formation d'un complexe d'hexacyanoferrate de couleur verte, qui est détecté par spectrophotométrie en mesurant le changement de l'absorbance 700nm.

-Mode opératoire

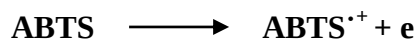
Dans tube à essai contenant 100 µl de la solution d'échantillon sont ajoutés 250 µl de tampon phosphate (0.2 mol/l PH= 6.6) puis 250 µl d'hexacyanoferrate de potassium 1% l'ensemble est chauffé à 50°C au bain marie pendant 20 minutes. Un volume de 250 µl d'acide trichlorure acétique 10% est ensuite ajouté et le mélange est centrifugé à 300 tours/min pendant 10 minutes. Enfin 250 µl de surnageant ont été mélangés avec 250 µl d'eau distillée et 50 µl de chlorure ferrique 0.1% on remarque l'apparition d'une coloration bleu. Une courbe d'étalonnage a été établie pour des différentes concentrations de l'acide ascorbique afin d'exprimer le pouvoir antioxydant de nos extraits.

III.3. Test d'ABTS

La méthode de radical ABTS est l'un des tests les plus utilisés pour la détermination de la concentration des radicaux libre.

-Principe

Il est basé sur la neutralisation d'un radical – cation résultant de la mono électronique oxydation du chromophore synthétique 2,2'- azino-bis (3 –éthylbenzothiazoline-6- sulfonique acide) (ABTS[•]) :



Cette réaction est suivie par spectrophotométrie par la variation de spectre d'absorption [81].

L'ABTS absorbe à 734 nm et alors qu'il est réduit, il vire du vert foncé au vert clair. Ainsi, le pouvoir antioxydant d'un échantillon sera proportionnel à la variation de la couleur du radical.

-Mode opératoire

Pour pouvoir générer le radical cationique ABTS^{•+} nous avons préparé deux solutions différentes constituées ; d'une solution aqueuse d'ABTS 14 mM et une solution aqueuse de persulfate de potassium K₂S₂O₈ 4.9 mM. Le mélange des deux solutions présente une coloration bleu-vert correspondant à la formation du radical cationique ABTS^{•+}.

Ce mélange a été incubé à l'obscurité pendant 16 à 24 heures la solution obtenu est diluée avec l'éthanol pour obtenir une absorbance entre 0.680 et 0.780.

750 µl de chaque dilution de l'extrait, nous avons ajouté 750 µl de la solution bleu-vert d'ABTS^{•+}, le mélange est ensuite incubé pendant 6 minute à l'abri de la lumière. La mesure de l'absorbance du milieu réactionnel est faite à 734 nm contre un blanc 100 µl (ABTS +K₂S₂O₈) outre de 10ml de méthanol, Une courbe d'étalonnage de calibration de Trolox, Trolox qui a été exprimer on TEAC été établie pour chaque extraits.

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

I. Extraction des composés phénolique

Les extraits phénoliques obtenus présentent généralement un aspect d'une poudre de couleur verte pour les feuilles de *P. lentiscus*.

Tableau.2 : Aspect, couleur d'extraction des composés phénoliques du *P. lentiscus*.

	Aspect	Couleur
Feuille de <i>P. lentiscus</i>	Poudre	Verte

I.1.Teneur des composés phénoliques

La méthode d'extraction doit permettre l'extraction complète des composés d'intérêt et doit éviter leur modification chimique. L'eau, les mélanges aqueux l'éthanol, et le méthanol sont généralement utilisés pour l'extraction [89].

La solubilité des composés phénoliques (CP) est en fonction de leur degré de polymérisation, l'interaction avec les autres constituants et le type de solvant utilisé. L'acétone a été recommandée et fréquemment employé pour l'extraction des composés phénoliques [90]. Le hydro-acétonique (acétone/eau, v/v 70/30) est deux fois plus efficace que l'acétone pure, pour l'extraction des composés phénoliques [91].

La teneur en composés phénoliques a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. C'est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en polyphénols, des plantes médicinales et les nourritures [92].

L'acide gallique est le standard le plus souvent employé dans la méthode de Folin-Ciocalteu [94]. La teneur en composés phénoliques de chaque extrait a été alors calculée à partir de la courbe d'étalonnage d'acide gallique (**Figure 10**), et exprimée en milligrammes par gramme de la matière sèche (MS) équivalent en acide gallique. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 3**.

Généralement, toutes les plantes de la famille des Anacardiaceae sont connues pour leurs richesses en composés phénoliques [95,96]. *P. lentiscus* étudiées par Benhammou et ses collaborateurs [97], présente une teneur très riche en composés phénoliques. Ceci est en accordance avec nos résultats présentés dans le **Tableau 3**.

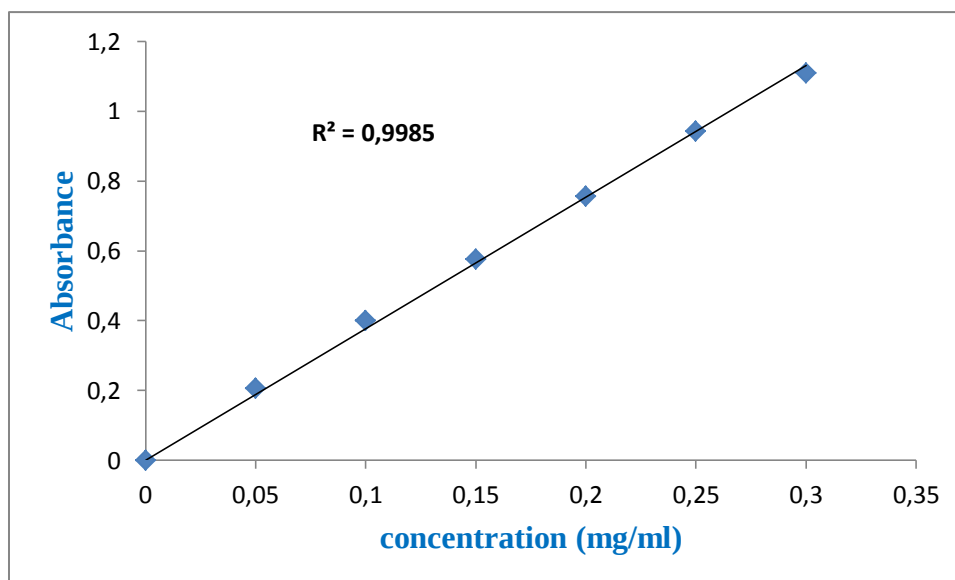


Figure.10 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Nous rappelons que les quantités des composés phénoliques ont été déterminées dans les deux fractions d'extraction obtenues à partir de l'extrait hydro-méthanoïque et en utilisant deux solvants organiques à polarité croissante: dichlorométhane et acétate d'éthyle.

Tableau.3 : Teneur en composés phénoliques des extraits du *P. lentiscus*. ($\pm$ SD) standard de déviation moyenne de six mesures.

Extrait	Composés phénoliques (mg GAE/g MS)
Dichlorométhane	0.621 $\pm$ 0.24
Acétate d'éthyle	50.36 $\pm$ 2.55

Les résultats du dosage révèlent que la quantité des CP dans les extraits bruts est plus importante en utilisant l'acétate d'éthyle comme solvant d'extraction comparativement au dichlorométhane. Les teneurs en composés phénoliques montrent que l'extrait brut de l'acétate d'éthyle contient 50.36 $\pm$ 2.55 mg GAE/g MS et que l'extrait de dichlorométhane présente une teneur très faible de 0.62 mg GAE/g MS. Ce résultat (**Tableau 3**) peut être expliqué par la solubilité différentielle des différentes composées phénoliques ou les CP

polaires sont solubles dans les solvants polaires et les CP apolaires sont solubles dans les solvants apolaires.

De ce résultat, on peut en conclure que notre plante d'étude *P. lentiscus* contient beaucoup plus de CP polaires qu'apolaires, ceci peut être confirmé par des dosages ultérieurs. Il ressort de résultat obtenu du dosage spectral de nos composés phénoliques que les feuilles de *P. lentiscus* renferment ces métabolites secondaire en quantité considérable. Cette richesse est indiquée par khazaal et ses collaborateurs [109], qui stipulent quelques arbustes méditerranéens sont généralement riches en composés phénoliques.

I.2.Teneur des flavonoïdes

La raison principale pour laquelle on a choisi cette classe de composés phénoliques, réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits [99]. Selon Elâgoun et ses collaborateurs [100], l'acétate d'éthyle est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes aglycones ou flavonoïdes mono O glycosides et partiellement di-O-glycosides, tandis que le dichlorométhane est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes C-glycosides. La teneur en flavonoïdes déterminée par la méthode du trichlorure d'Alumiumm ($AlCl_3$) pour chaque extrait a et exprimée en milligrammes par gramme de la matière sèche (MS) équivalent en quercétine. Les résultats de la courbe d'étalonnage de la quercétine sont représentés dans la **Figure 11**.

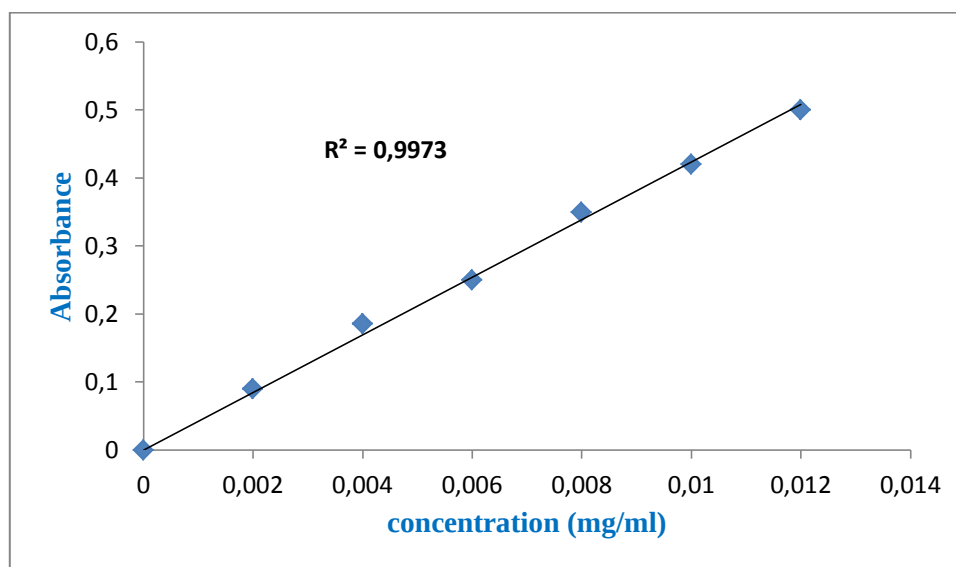


Figure.11: Courbe d'étalonnage de la quercétine.

On remarque que les flavonoïdes de l'extrait du *P. lentiscus* est beaucoup plus polaires qu'apolaires, ce qui explique le rendement élevées de l'extrait d'acétate d'éthyle (0.52 ± 0.038 mg QE/mg MS) par rapport à l'extrait de dichlorométhane (0.16 ± 0.003 mg QE/mg MS), alors que les flavonoïdes apolaires sont moins présents, 3 fois moins abondants que les flavonoïdes polaires.

Tableau.4: Teneur et taux des flavonoïdes dans les feuilles de *P. lentiscus*. ($\pm$ SD) standard de déviation moyenne de six mesures.

Extrait	Teneur en flavonoïdes (mg QE/g MS)	Taux des flavonoïdes %
Dichlorométhane	0.16 ± 0.003	25.76
Acétate d'éthyle	0.52 ± 0.038	1.04

A partir de ces données, on peut déduire que les flavonoïdes représentent la fraction minoritaire avec un taux de 1% par rapport aux composés phénolique dans l'extrait d'acétate d'éthyle et un quart (25%) aux CP dans l'extrait dichlorométhane.

Et d'autre part on observe que l'extrait dichlorométhane du *P. lentiscus* est pauvre en composés phénoliques et en flavonoïdes, tandis que l'extrait acétate d'éthyle est riche en composés phénoliques et en flavonoïdes. Ceci en tenant compte, de la sélectivité de chaque solvant utilisé pour le fractionnement on admet que le *P. lentiscus* est riche en aglycones.

Maisuthisakul et ses collaborateurs [94], ont constaté que la teneur totale des flavonoïdes des extraits de 28 plantes, est liée à la teneur des composés phénoliques totaux. Ceci concorde avec nos résultats (**Tableau 3 et 4**) qui peut être traduit par le fait que la quantité en flavonoïdes varie proportionnellement avec tout le contenu en composés phénoliques d'un extrait à un autre et d'une fraction à une autre.

I.3.Teneur des tanins condensé

Dans la littérature, les tanins condensés peuvent être également nommés proanthocyanidines ou tanins catéchiques. Ces composés, qui correspondent à des polymères de flavan-3-ols, peuvent être répertoriés en différentes classes: les monomères, les dimères,

les oligomères et les polymères. La quantité des tanins dans nos extraits a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de la catéchine prise comme tannins étalon (**Figure 12**).

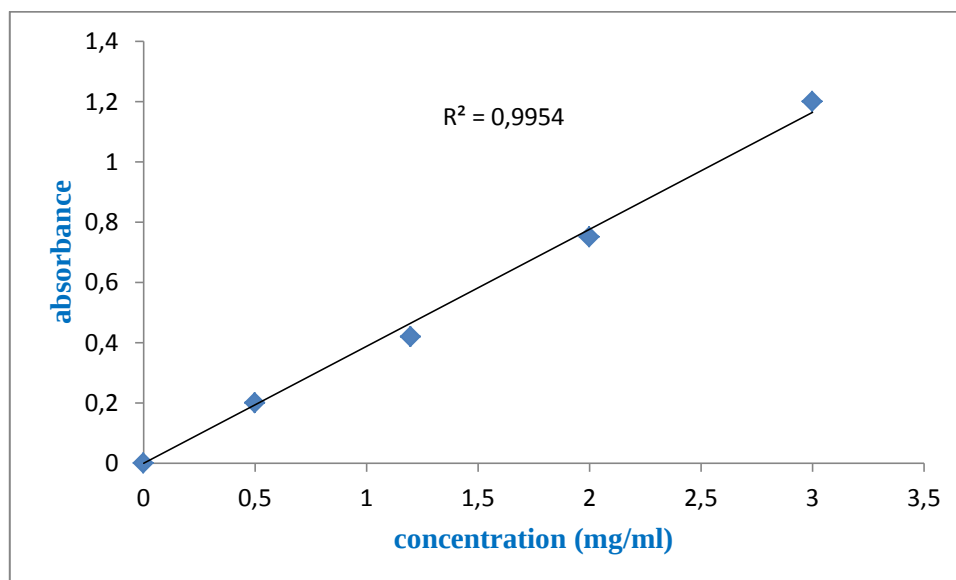


Figure.12: Courbe d'étalonnage de la catéchine.

La teneur en tanins condensés des deux extraits du *P. lentiscus* se révèle nettement plus élevée que la teneur en flavonoïdes extraites par les mêmes solvants. Cette teneur varie de 1.65 à 9.45 mg/g MS selon le solvant utilisé pour l'extraction. En revanche, si on parle de taux des tanins condensé par rapport aux teneurs en composés phénoliques, l'extrait de l'acétate d'éthyle présente un taux de 3.28 % et 15.21 % pour l'extrait dichlorométhane.

Tableau.5 : Teneur et taux des tanins dans les feuilles de *P .Lentiscus*. ($\pm$ SD) standard de déviation moyenne de six mesures.

Extrait	Teneur en tanins mg CA/g MS	Taux des tanins%
Dichlorométhane	9.45 $\pm$ 0.08	15.21
Acétate d'éthyle	1.65 $\pm$ 0.18	3.28

A partir de ces données, on peut déduire que l'extraction de ces substances est plus efficace avec le solvant apolaire qu'avec les solvants polaire. Sachant que les solvants

éthéropétroliques dichlorométhaniques sont exempts de tanins condensés [101]. Les résultats obtenus par Kamalaket ses collaborateurs [101], sont très élevées par rapport à nos résultats, cette différence trouve probablement son explication dans la différence du standard utilisé pour le dosage des tanins condensés. Cette variabilité entre les teneurs en tanins condensés peut être due par l'effet de plusieurs facteurs tels que : la sensibilité des tanins à des plusieurs voie de dégradation (l'oxydation, la lumière...), le stade de maturité des feuilles, les conditions culturales et plusieurs d'autres facteurs.

II. Analyse qualitative par CLHP

Le méthanol utilisé pour l'extraction a un rôle protecteur. Il peut empêcher les composés phénoliques d'être oxydée par des enzymes, telles que des phénoloxydases. La colonne utilisée pour séparer les composés phénoliques est exclusivement chromolith. Ce système est une haute technique de résolution chromatographique largement répandue, pour la séparation et la quantification simultanée des substances phénoliques [102]. Les chromatogrammes de le CLHP des standards et des deux extraits sont représentés ci-dessous.

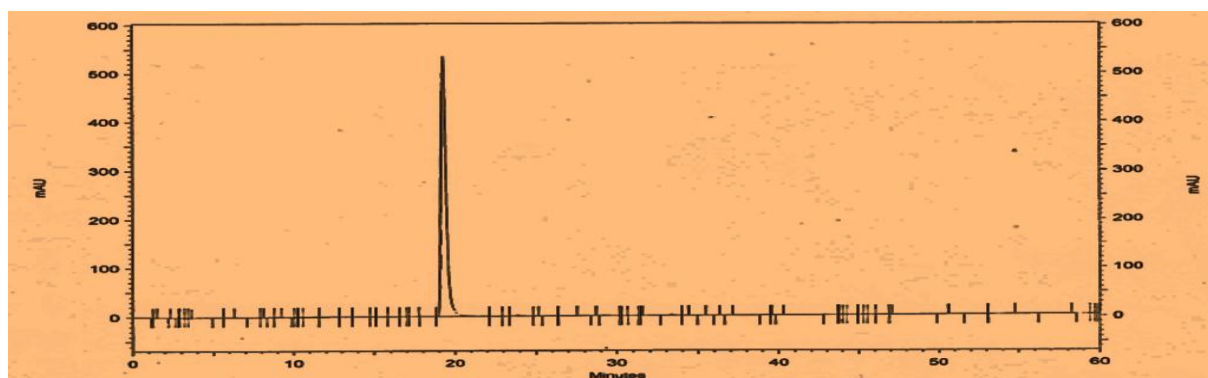


Figure.13: Chromatogramme de CLHP du standard de l'acide chlorogénique enregistré à 254 nm.

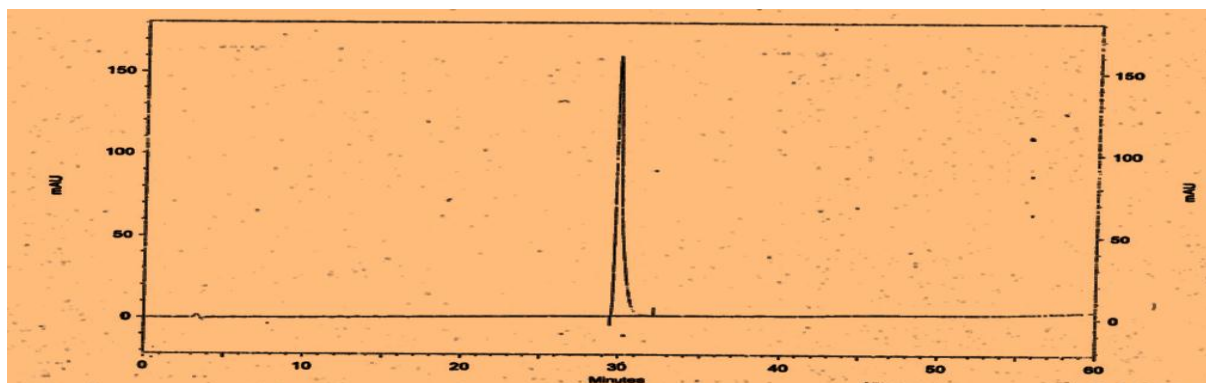


Figure.14: Chromatogramme de CLHP du standard de l'acide férulique enregistré à 254 nm.

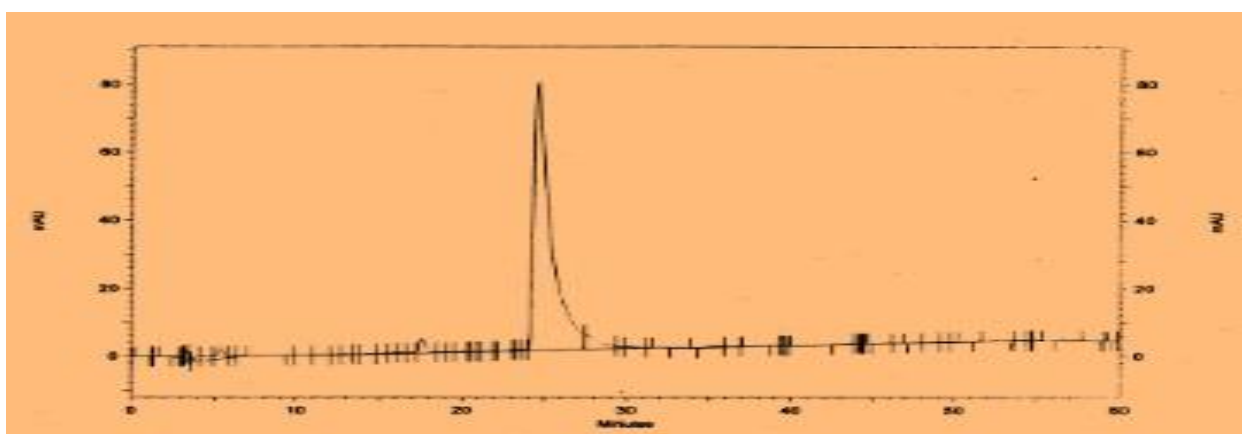


Figure.15: Chromatogramme de CLHP du standard gallyocatéchine enregistré à 254 nm.

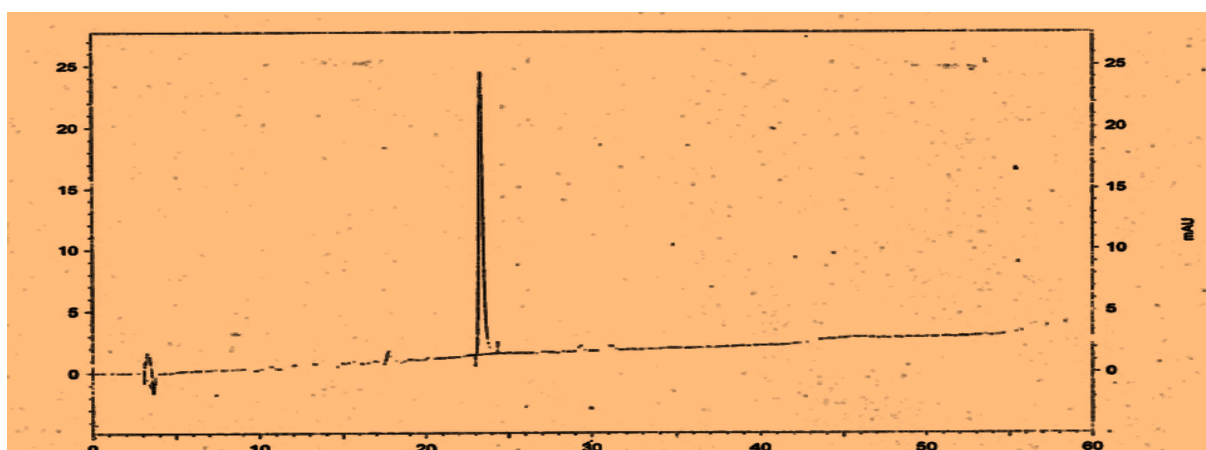


Figure.16: Chromatogramme de CLHP du standard épicatechine enregistré à 254 nm.

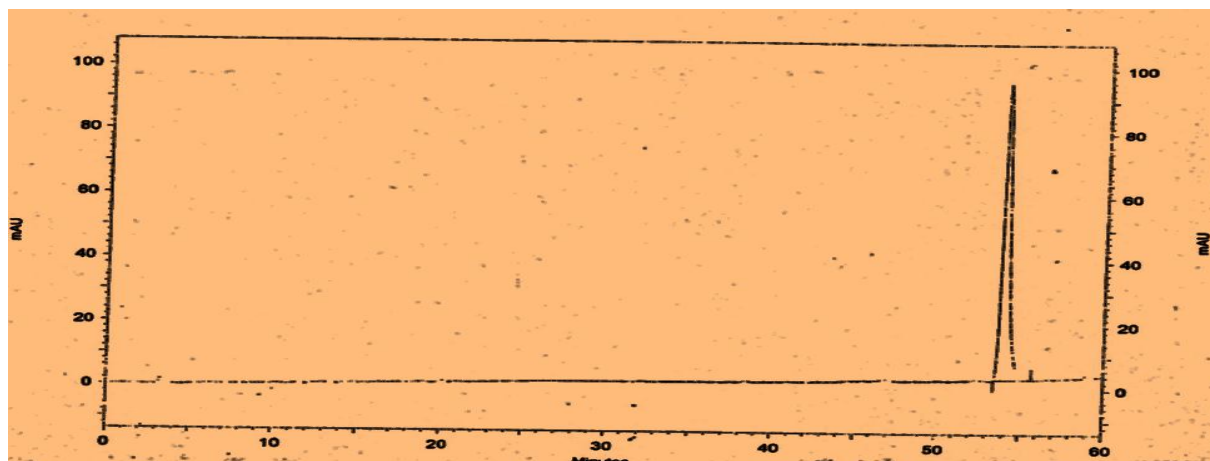


Figure.17: Chromatogramme de CLHP du standard hespéridine enregistré à 254 nm.

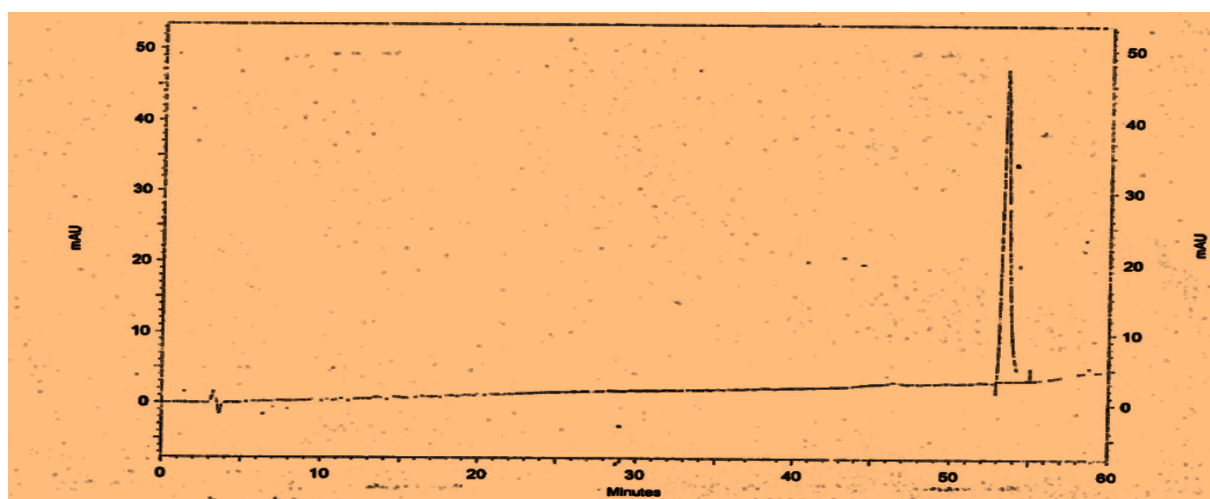


Figure.18: Chromatogramme de CLHP du standard myricétine enregistré à 254 nm

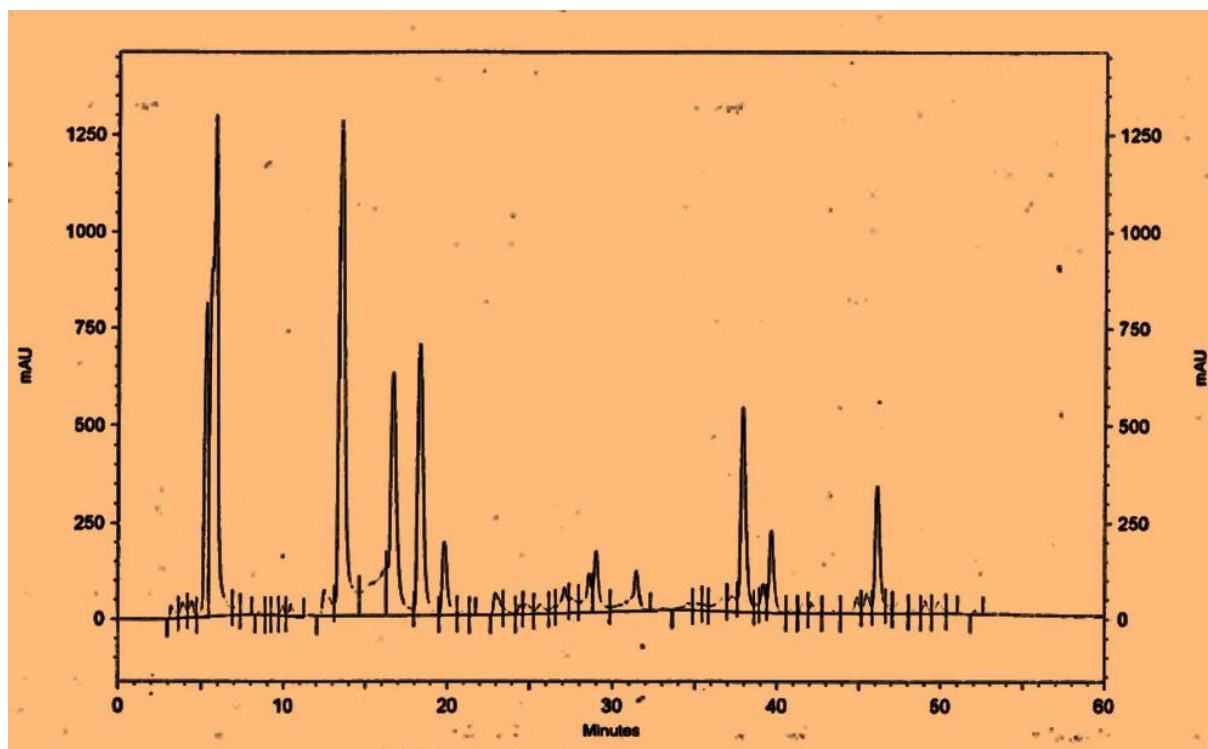


Figure.19: Chromatogramme de CLHP de la fraction d'acétate d'éthyle du *P. lentiscus* enregistré à 254 nm.

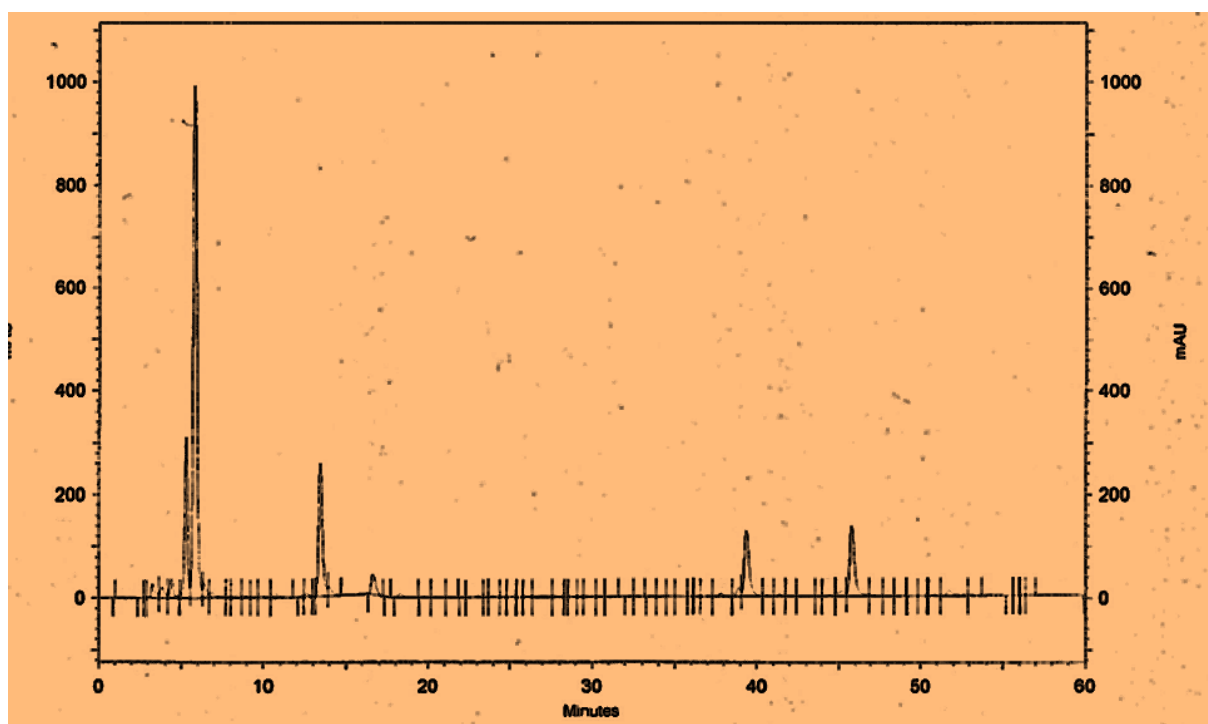


Figure.20: Chromatogramme d'HPLC de fraction dichlorométhane du *P. lentiscus* enregistré à 254 nm.

La comparaison des temps de rétention des standards avec ceux enregistrés dans les différents chromatogrammes (**Tableau 6**), permet l'identification probable de certains flavonoïdes dans nos extraits [103].

Tableau.6: Les standards des composés phénoliques injectés et leur temps de rétention.

Temps de rétention (min)	Standard des composés phénoliques
20.93	Acide chlorogénique
23.29	Epicatéchine
25.86	Gallyocatéchine
29.85	Acide férulique
53.42	Myricétine
54.01	Hespéridine

Les résultats montrent la présence de l'acide chlorogénique, épiatéchine, gallyocatéchine et l'acide férulique dans l'extrait de l'acétate d'éthyle. On constate l'absence de ces composés phénoliques dans l'extrait dichlorométhane.

III. l'étude de pouvoir antioxydant

III. 1. Activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination de l'activité antioxydant, nommées d'après le nom de la substance utilisée comme source de radicaux libres, par exemple: FRAP (Ferric reducing antioxidant power), ORAC (oxygen radical absorbance capacity), TEAC (Trolox équivalent antioxidant capacity) ou ABTS (2,2-azinobis 3-ethylbenzothiazoline 6-sulphonate) et DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl) etc. Il est à indiquer que différentes méthodes donnent des résultats assez différents et devraient être appliquées préférentiellement pour la comparaison de produits similaires [80].

III.1.2. Test chimique DPPH

La réduction du radical libre DPPH[•] par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV- Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants [101]. En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH[•] (2.2

Diphenyl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en (2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazine) de couleur jaune [110].

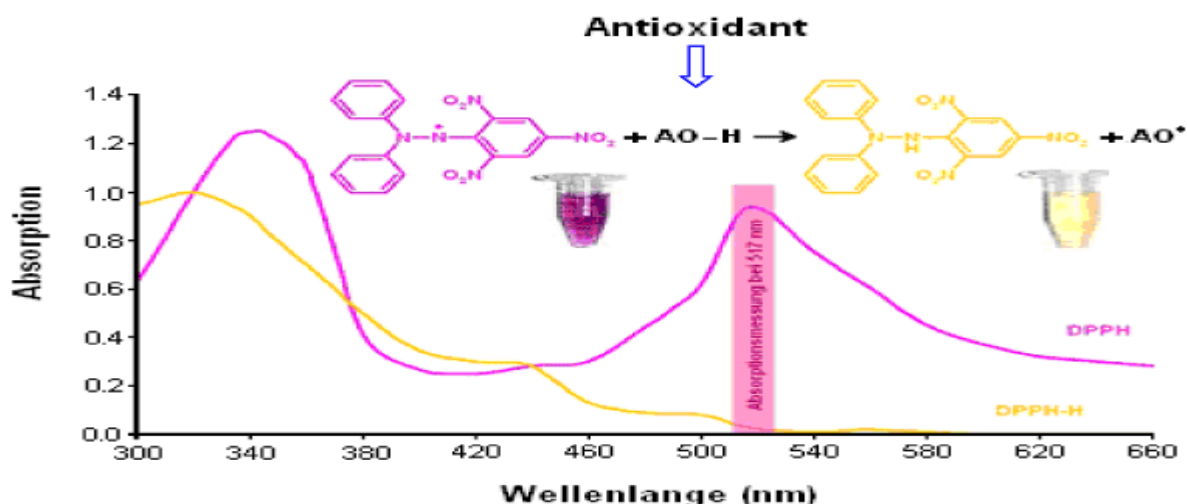


Figure.21: Principe du test de DPPH.

L'évolution de l'activité antiradicalaire de nos extraits a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (**Figure 21**) exprimée en AAEAC (Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant) pour chaque extrait.

Les valeurs d'AAEAC ont été déterminées pour tous les extraits après 30 min à partir de la (**Figure 22**) qui représente la diminution de l'absorbance du radical en fonction de la concentration de chaque extrait.

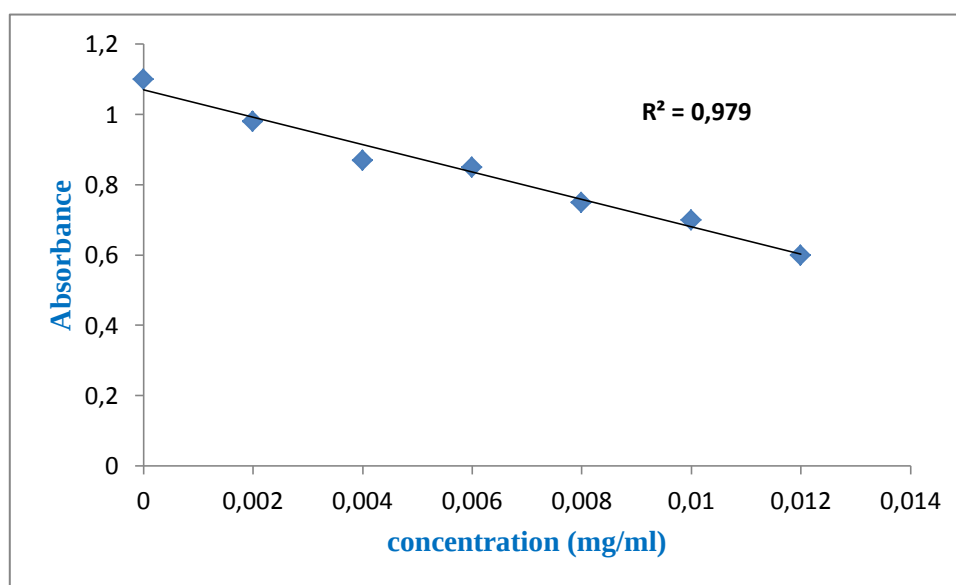


Figure.22: Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique.

Puisque l'AAEAC représente la quantité en mg de l'acide ascorbique donnant la même activité antioxydante de l'extrait étudié. Le **Tableau 7** suivant résume le résultat obtenu de deux fractions acétate éthyle et dichlorométhane.

Tableau.7: Les valeurs des extraits déterminées par le test DPPH. ($\pm$ SD) standard de déviation moyenne de six mesures.

Extrait	DPPH (mg AAE/g MS)
Dichlorométhane	3.23 $\pm$ 0.61
Acétate d'éthyle	431.62 $\pm$ 6.410

Un premier diagnostic nous a permis de constater d'une part que l'extrait de l'acétate d'éthyle possédant une activité antiradicalaire 143 fois supérieure à celle de l'extrait dichlorométhane. Ce résultat peut être expliqué par deux phénomènes à savoir :

L'extrait d'acétate d'éthyle et dichlorométhane ne renferment pas les mêmes compositions phénoliques en plus la polarité du solvant change la capacité de dissoudre un groupe choisi de composé antioxydants, ce qui influe l'évaluation de l'activité antiradicalaire.

L'extrait d'acétate d'éthyle est riche en antioxydant incluant des composés phénoliques de classe de l'acide chlorogénique, épigallocatechine, galloycatechine et l'acide férulique qui auraient un impact puissant en empêchement le radicale DPPH par rapport aux composés de la fraction dichlorométhanoïque qui contient d'autre structures phénolique qui moins antioxydant.

Les résultats de l'activité antiradicalaire de nos extraits sont en accord avec ceux obtenus par Yousfi et ces collaborateurs [96], Ces derniers ont constaté que l'activité antiradicalaire corrèle avec leur teneur en CP. Généralement, les composés phénoliques avec un nombre élevé du groupements hydroxyles présentent l'activité antioxydante la plus élevée [99], due à leur pouvoir de donner plus d'atomes pour stabiliser les radicaux libres [98], ce qui peut expliquer en partie la faible activité antioxydante du tyrosol qui ne possède qu'un seul groupement hydroxyle (-OH) dans sa structure. Ainsi, l'effet antioxydant n'est pas seulement dose-dépendant mais également structure dépendant [104].

III.2. Test chimique d'hexacyanoferrate (III)

L'activité anti-oxydante des deux extraits a été évaluée en utilisant la méthode K_3FeCN_6 . Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible. Il est universel peut être appliqué aussi bien chez les plantes que les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux [105]. La présence des réductants dans les extraits provoque la réduction de fer Fe^{3+} complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu vert dans le milieu réactionnel à 700 nm. En d'autre terme, le système $FeCl_3/K_3Fe(CN)_6$ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semi quantitative » des concentrations des composés phénoliques, qui participent à la réaction Red/Ox [118], L'évaluation de l'activité réductrice de nos extraits a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (**Figure 23**) exprimée AAEAC pour chaque extrait.

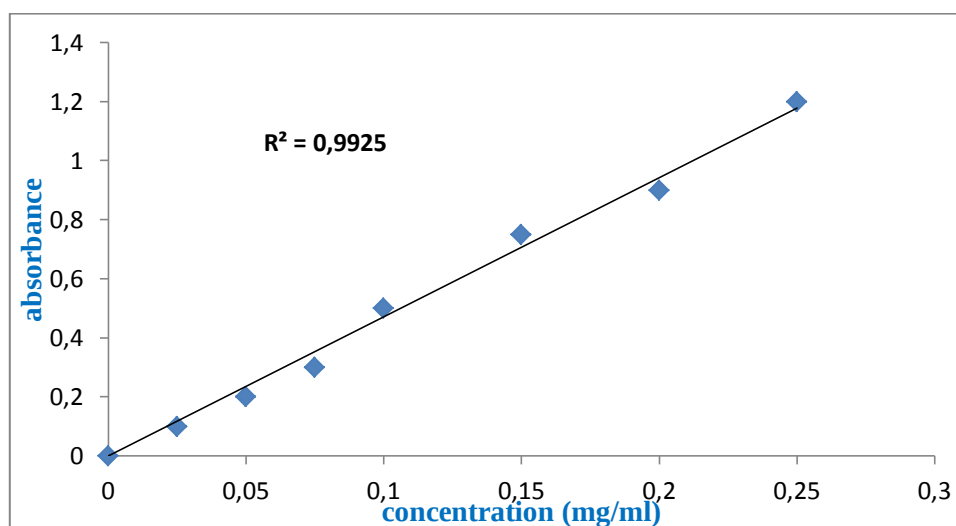


Figure.23: Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique.

Les résultats relatifs à ce test sont consignés dans le (**Tableau 8**). D'après ces résultats, on remarque que les valeurs d'AAEAC varient d'une fraction à une autre et que l'extrait de l'acétate d'éthyle généralement les plus antioxydants par rapport à l'extrait de dichlorométhane car la valeur d'AAEAC dans l'extrait de l'acétate d'éthyle est 2 fois supérieure à celle de l'extrait de dichlorométhane (**Tableau 8**). Il faut noter que la plus grande valeur d'AAEAC (l'extrait le plus antioxydant) est enregistrée dans la fraction de l'acétate d'éthyle, qu'elle contienne une grande quantité en composés phénoliques et en flavonoïdes par rapport au dichlorométhane (**Tableau 8**) Le pouvoir réducteur de l'extrait de

l'acétate d'éthyle est dû à la présence des composés phénoliques et flavonoïdiques. Plusieurs études ont montré que les groupements hydroxyles dans les composés phénoliques et flavonoïdes sont responsables de leur pouvoir antioxydant [99,89] ont constaté que les extraits du thé noir ayant une activité antioxydante très élevée, ont également un contenu plus élevé en composés phénoliques.

Tableau.8: Les valeurs des AAEAC des extraits acétate d'éthyle et dichlorométhane. ($\pm$ SD) standard de déviation moyenne de six mesures.

Extrait	Réduction de fer (mg AAE/g MS)
Dichlorométhane	47.81 $\pm$ 2.10
Acétate d'éthyle	102.19 $\pm$ 1.92

L'efficacité de l'antioxydant (AH) augmente si la force de la liaison A-H est faible et le radical (A) résultant doit être le plus stable possible, ce qui est le cas pour les composés phénoliques l'acide chlorogénique, et l'acide férulique, se sont des meilleurs donneurs d'électron ou d'hydrogène [106], En revanche l'activité réductrice de dichlorométhane relativement moyenne.

La seule explication de ce résultat peut être interprétée par l'existence de certains composés flavonoïdiques ou tanniques individuels responsables de cette activité.

III. 3. Réduction du radical- cation ABTS ou détermination du TEAC

Le radical ABTS préformé est généré par l'oxydation de la molécule stable d'ABTS avec le persulfate de potassium [107], La méthode d'ABTS présente une coloration bleue turquoise lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes. La forme réduite confère à la solution une coloration jaune, le virage vers cette coloration et l'intensité de la coloration de la couleur de la forme libre en solution dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance antiradicalaire [108]. L'évolution de l'activité antioxydante de nos extraits a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage de Trolox (**Figure 24**) exprimée en TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) pour chaque extrait.

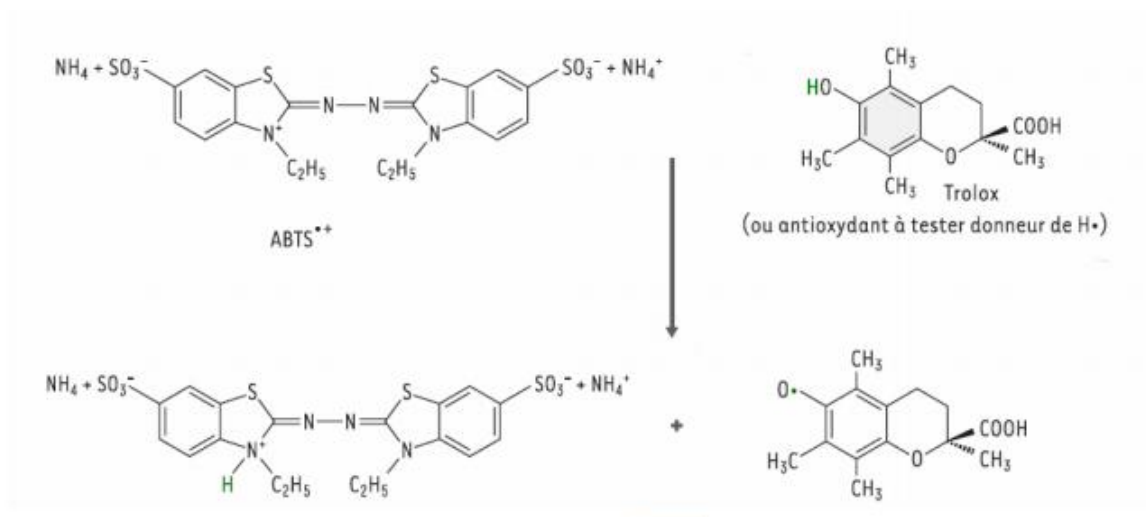


Figure.24 : Réduction de l'ABTS.

Les valeurs de TEAC ont été déterminées pour tous les extraits après 6 min à partir de la **Figure 25** qui représente la diminution de l'absorbance du radical en fonction de la concentration de chaque extrait.

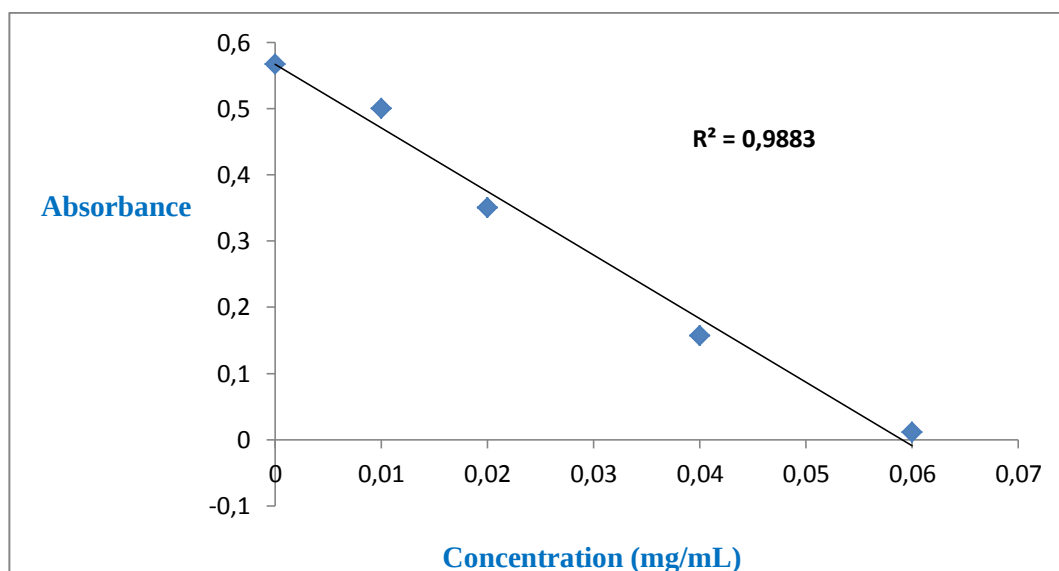


Figure.25 : courbe d'étalonnage de calibration de Trolox.

Puisque le TEAC représente la quantité en mg de Trolox qui donnant la même activité antioxydante de l'extrait étudié. Le **Tableau 9** suivant résume les résultats obtenu de deux fractions d'acétate éthyle et dichlorométhane.

Tableau.9: Les valeurs des TEAC déterminées par le test d'ABTS. ($\pm$ SD) standard de déviation moyenne de six mesures.

Extrait	ABTS (mg TE/g MS)
Dichlorométhane	0.39 $\pm$ 0.0001
Acétate d'éthyle	0.31 $\pm$ 0.019

Les résultats d'analyses du test d'ABTS des feuilles de *P. lentiscus* compris entre (0.39 et 0.31 mg TE /g MS). L'extraits du dichlorométhane dévoile un pouvoir d'oxydation presque le même (0.39 mg TE/g MS) par apport aux extrait de l'acétate d'éthyle (0.31 mg TE/g MS) mais renferment des teneurs en composés phénoliques, flavonoïdiques et tanniques différent. Al' issus de ce résultat, on peut conclure que l'activité antioxydant pour piégeage le cation radical de l'ABTS n'est pas liée directement au contenu en composés phénoliques mais la nature des molécules individuelles présentes dans l'extrait.

Également les résultats obtenus montrent clairement l'existence des composés phénoliques ne diffère pas thermodynamiquement. Par ailleurs un composé peut réduire le radical cation ABTS s'il a une potentielle inférieure à celui-ci 0.68 V [107]. Ce lui que nous aide à conclure que les feuilles du *P. lentiscus* ne contienne pas des composés à bas potentiels Red/Ox.

En revanche les TEAC obtenus de manière générale beaucoup plus faible que lors du DPPH et $K_3Fe(CN)_6$. Ces valeurs confirment la plus grande sensibilité du test d'ABTS.

En effet, les paramètres qui peuvent agir sur les capacités antioxydantes des extraits des trois tests sont le pH, la solubilité, la concentration, la structure, la taille et le potentiel oxyde-réducteur, la présence de certain agent (Co-facteur) qui peuvent agir en synergie avec les composés phénoliques.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les dernières décennies sont parcourues par l'intérêt particulier porté à la mise en valeur des plantes à l'intérêt médicinale comme source de substances bioactives naturelles. De ce fait, de nombreuses études s'intéressent, de plus en plus, aux effets antioxydants d'origine naturelle. Dans ce contexte, nous avons évalué le pouvoir antioxydant des feuilles du *P. lentiscus*, une plante très utilisée dans la médecine traditionnelle.

L'extraction des composés phénoliques des feuilles de la plante a été effectuée par une macération dans un mélange hydroalcoolique.

Les résultats obtenus dans l'analyse qualitative a mis en évidence la présence des polyphénols des flavonoïdes et des tanins dans les deux extraits.

Le dosage quantitatif des composés phénoliques, par le réactif de Folin-Ciocalteu a révélé que l'extrait d'acétate d'éthyle s'est révélé le plus riche par rapport à l'extrait de dichlorométhane. La teneur en composés phénoliques de la fraction de l'acétate d'éthyle qui est de 50.23 mg GAE/g MS est trouvée 80 fois supérieure à celle de la fraction de dichlorométhane.

Le dosage quantitatif des flavonoïdes par la méthode d' AlCl_3 a révélé que les flavonoïdes de l'extrait du *P. lentiscus* est beaucoup plus polaires qu'apolaires, ce qui explique le rendement élevés de l'extrait d'acétate d'éthyle (0.52 ± 0.038 mg QE/mg MS) par rapport à l'extrait de dichlorométhane (0.16 ± 0.003 mg QE/mg MS).

De point de vue comparative les feuilles de *Pistacia lentiscus* sont plus riches en aglycone, mono-O-glycoside par rapport au C-glycoside

Le dosage quantitatif des tanins condensés par la méthode de Vanilline-HCl a révélé que l'extrait de dichlorométhane est plus riche en tanins condensés est présente une valeur moyenne de l'ordre 9.45 mg CA/g MS. En revanche l'extrait de l'acétate d'éthyle présente la teneur la plus faible la valeur moyenne est de l'ordre 1.65 mg CA/g MS.

L'analyse effectuée par CLHP montre que la fraction de l'acétate d'éthyle contient deux classes de composés phénoliques ; composés phénoliques simples (acide chlorogénique et acide férulique), et tanins condensé (Epicatechine et Gallyocatechine).

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

Les résultats du test au DPPH ont montré que les deux fractions testées montrent une activité inhibitrice vis-à-vis le radicale DPPH. L'extrait de l'acétate d'éthyle possédant une activité antiradicalaire 143 fois supérieure à celle de l'extrait dichlorométhane. Cette fraction contient une grande quantité en composés phénoliques et flavonoïdiques par rapport au dichlorométhane, indiquant que la capacité antiradicalaire du *P. lentiscus* est due la contribution de ces deux classes phénoliques.

En revanche, le test d'hexacyanoferrate montre clairement que l'extrait de l'acétate d'éthyle est 2 fois supérieur à celle de l'extrait de dichlorométhane. Ce qui conduit à conclure que l'activité réductrice mesuré par le test K_3FeCN_6 est dû à la teneur des composés phénoliques et flavonoïdiques.

Enfin l'étude de l'activité antioxydante en utilisant le test ABTS montre que l'extrait du dichlorométhane dévoile un pouvoir d'oxydation presque le même (0.39 mg TE/g MS) par apport aux extrait de l'acétate d'éthyle (0.31 mg TE/g MS) suggèrent que le piégeage du cation radical de l'ABTS n'est pas liée directement au contenu en composés phénoliques mais la nature des molécules individuelles présentes dans l'extrait. De même on ne constate que les résultats des activités antioxydantes enregistrés avec ABTS beaucoup plus faibles à ceux enregistrés avec DPPH et K_3FeCN_6 . Ces valeurs confirment la plus grande sensibilité du test d'ABTS.

Sachant que notre pays possède une biodiversité immense dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par les recherches, de cet effet, et comme perspectives on propose de :

- Faire une étude biochimique sur les fruits de *P. lentiscus*.
- Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments synthétiques.
- Développer des médicaments antiradicalaires à base de plantes, doués d'une activité antioxydante.
- Ainsi une étude sur l'activité antimicrobienne et antibactérienne.

RÉFÉRANCES

- [1] Pierangeli G., Vital G., Windell Rivera L., J. Medic. Plants Res. 3 (7) (2009) 511.
- [2] Akharaiyi F.C., and Boboye B., J. Nat. Prod. (3) (2010) 27-34.
- [3] Gilles W., L'Encyclopédie des Médecines Naturelles et des Secrets de Santé, Elina, Lavoisier, Paris, (1976) pp 212-222
- [4] Iserin P., Encyclopédie des Plantes Médicinales, Identification, Préparation, Soins 2^{ème} édition Ed Larousse/VUEF, (2001) pp13-16, p 250, pp291-296
- [5] De Pascual J.T., Gonzalez M.S., Muriel M.R and Bellid I.S. Phenolic derivatives from *Artemisia campestris* Subsp *Glutinosa*. *Phytochemistry*. (1984) 23 (8): 1819-1821.
- [6] Rauter A.P., Branco I., Tostao Z., Pais M.S., Gonzalez A.G et Bermejo J.B. Flavonoids from *Artemisia campestris* Subsp *Maritima*. *Phytochemistry*. (1989) 28 (8): 2173-2175.
- [7] Joa O.M., Vasconcelos., Artur M.S.S and Jose A.S.C. Chromones and flavones from *Artemisia campestris* Subsp *Maritima*. *Phytochemistry*. (1998) 49 (5): 1421-1424
- [8] Akrouit A., Chemli R.C., Chrief., and Hammami M. Analysis of the essential oil of *Artemisia campestris* L. J. Flavour Fragr. . (2001) 16: 337–339.
- [9] Memmi A., Sansa G., Rjeibi I., El ayeb M., Srairi-Abid N., Bellasfer Z., and Fekhih A. Use of medicinal plants against scorpionic and ophidian venoms. *Arch. Inst. Pasteur. Tunis*. (2007) 84 (1-4): 49-55.
- [10] Sefi M., Fetoui H., Makni M., and Najiba Zeghal N. Mitigating effects of antioxidant properties of *Artemisia campestris* leaf extract on hyperlipidemia, advanced glycation end products and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *J. Food. Chem. Toxicol.* (2010) 48: 1986–1993
- [11] GHABRIER J. Y., Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Henri Poincaré-Nancy1 (France). (2010) 165.
- [12] SANAGO R., Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université Bamako (Mali). (2006) 53.
- [13] Carillon E. La phytothérapie face à l'évolution médicale, Ed : phyto., (2000) 10-15.
- [14] Fouché J.G., Marquet et Hambuchers A. Les plantes médicinales de la plante au médicament, Exposition temporaire du 19.09. au 30.06.2000.
- [15] HARBORNE B., Methods in plant biochemistry, plant phenolics. Academic press, London, UK. 1989.
- [16] Feidemann J., World Spices Plants: Economic Usage, Botany, Taxonomy Springer Verlag, Berlin Heidelberg, European Union, (2005) p 196

- [17] Quezel P. et Santa S., Nouvelle Flore d'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales, Tome I, Centre Nationale de la Recherche Scientifique, (1962) p 611
- [18] Mitcheh A., Tous les Arbres de nos Forêts, édition Bordas, (1986) p 319
- [19] Baudière A., Monange Y., Gauquelin Th. Le Monde des Plantes; Intermédiaire des Botanistes, Toulouse; N° 477, (2002) pp2 - 5
- [20] Yahia M., La Thérapeutique par les Plantes Communes en Algérie, Ain Taya, (1992) p59
- [21] More D. et White J., Encyclopédie des Arbres plus de 1800 Espèces et Variétés du Monde, Flammarion, (2005) pp 18 ; 797
- [22] Seigue A., La Forêt Circumméditerranéenne et ses Problèmes, Maisonneuve & Larose, pp 22- 27, (1985) p 137 - 139
- [23] Barazani O.Z., Dudai N., et A. Golan-Goldhirs, Comparaison of Mediterranean *Pistacia lentiscus* Genotype by Random Amplified Polymorphic DNA, Chemical, and Morphological Analyses Journal of Chemical Ecology, Vol. 29, No. 8. (2003)
- [24] Grosjean N., L'Aromathérapie, Santé et bien-être par les Huiles Essentielles, Albin Michel, p99 (2001)
- [25] Charef M., Yousfi M., Saidi M., Stocker P., Determination of the Fatty Acid Composition of Acorn (*Quercus*), *Pistacia lentiscus* Seeds Growing in Algeria, Springerlink.(2008)
- [26] Abbas M., Boudriche D. Identification et Extraction des Molécules Bioactives de *Pistacia lentiscus* L. et Détermination de Quelques Effets Pharmacologiques, Centre de recherche et de développement, Saidal, Alger, (2007)
- [27] Vaya J, Mahmood S., Flavonoid Content in leaf Extracts of The fig (*Ficus carica* L.), Carob (*Ceratonia siliqua* L.) and Pistachio (*Pistacia lentiscus* L.), Biofactors.; (2006) 28(3-4):169-75. PubMed PMID: 17473377.
- [28] Longo L., Scardino A., Vasapollo G., Identification and Quantification of Anthocanins in The Berries of *Pistacia lentiscus* L Elsevier, Italy . (2007)
- [29] Leonti M., Casu L., Sanna F., Bonsegnore L., A Comparison of Medicinal Plant Use in Sardinia and Sicily, De Materia Medica 72, 09122, Italy (2001)
- [30] Atmani D., Chaher N., Berboucha M., Ayouni K., Lounis H., Boudaoud H., Debbache N., et Atmani D., Antioxydant Capacity and Phenol Content of Selected Algerian Medicinal Plants, J. Elsevier, Food Chemistry (2009) 112 / 303–309
- [31] Baudoux D. L'aromathérapie : Se soigner par les Huiles Essentielles, édition Amyris, (2003) pp 145-146

- [32] Grosjean N., L'Aromathérapie, Santé et bien-être par les Huiles Essentielles, Albin Michel, (2001) p99
- [33] Al-Said M.S., Ageel A.M., Parmar N.S., Tariq M. Evaluation of mastic, a Crude Drug obtained from *Pistacia lentiscus* for Gastric and Duodenal Anti-ulcer Activity, *Ethnopharmacol*;15(3):271-8. PubMed PMID: 3724207(1986)
- [34] Ali-Shtayeh M.S., Abu Ghdeib S.I. Antifungal Activity of Plant Extracts Against Dermatophytes, *Mycoses* ;42(11-12):665-72. PubMed PMID: 10680445.(1999)
- [35] Iauk L., Ragusa S., Rapisarda A., Franco S., Nicolosi V.M. In vitro Antimicrobial Activity of *Pistacia lentiscus* L. Extracts: Preliminary Report, *Chemother* ; 8(3):207-9. PubMed PMID: 8808717. (1996)
- [36] Janakat S, Al-Merie H. Evaluation of Hepatoprotective Hffect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea latifolia* and *Nicotiana glauca*, *Ethnopharmacol* ; 83(1-2):135-8. PubMed PMID: 12413719. (2002)
- [37] PELT J. M., Les drogues, leur histoire et leurs effets. Édition Doin, Paris, 1980. 221.
- [38] BENGHANOU M., La phytothérapie entre la confiance et mefiance. Mémoire professionnel infirmier de la sante publique, institut de formation paramédical CHETTIA (Alger): 2012.56.
- [39] SARNI-MANCHADO P., VERONIQUE C., Les polyphénols en agroalimentaires. Collection sciences et techniques agroalimentaires, édition TEC et DOC, Paris (France): 398. 2006.
- [40] HARBORNE J. B., WILLIAMS C. A., Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry*, 2000. 55: 481–504.
- [41] WICHTL M., ANTON R., Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Édition LAVOISIR, Paris 2009. 38, 41
- [42] Graham T.L. Flavonoid and flavonal glycoside metabolism in arabiodopsis.plant physical and biochem, (1998). 36(1-2): 135-144.
- [43] Brunton J. Elément de phytochimie et de pharmacologue, Ed : Lavoisier (1987). 156-407.
- [44] Guignard .J.L. Biochimie végétale, Ed : Masson,Paris, (1996). 255.
- [45] Bronner W.E.et G.R.Beecher, Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. *Journal of Chromatography A*, (1995). 705: 247-256.
- [46] Hollman P.C.H., Hertog M.G.L et M.B. Katan Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chem.*, (1996). 57: 1591-1598.

- [47] Crozier A., E. Jense, M.E.J. Lean et M.S. McDonald. Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography J.Chromatography A, (1997). 761: 315-321.
- [48] Van Acker S.A.B.E., D.J. van de berg,M.N.J.L ; Tromp, D.H. Griffioen, W.P. van Bennekom., W.J.F. van der Vijgh et A. Bast. Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. Free Rad. Biol. Mes., (1996). 20:331-342.
- [49] Di Carlo G., N.Mascolo, A.A. Izzo et F. Capasso. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Review. Life Sci, (1999) 65: 337-53.
- [50] Landolfi R., R.L. Mower et M. Steiner, Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. Biochem Pharmacol. (1984) 3: 1525-1530.
- [51] Izzo A. PAF and the digestive tract. A review. J Pharmarmacol., (1996). 48:1103-11.
- [52] Bracke M., B.Vyncke, G. Opdenakker, J.M. Foidart, G. De Pestel et Mareel M. Effect of catechins and citrus flavonoids on invasion in vitro. Clin Exp Metastasis, (1991). 9:13-25.
- [53] Larocca L.M., M. Giustacchini, N.Maggiano, F.O. Ranelletti, M. Piantelli, E. Alcini. Et A. Capelli , Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type II estrogen binding sites in primary human transitional cell carcinomas. J Urol. (1994) 152: 1029-1033.
- [54] Scutt A., S. Meghji, J.P. Canniff. Et W. Harvey. Stabilisation of collagen bybetel nut polyphenols as a mechanism in oral submucous fibrosis. Experientia. (1987) 43: 391-393.
- [55] Makimura M., M. Hirasawa, K Kobayashi, J Indo, S. Sakanaka, T. Tagouchi et S. Otake . Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity.J Periodontol. (1993) 64:630-636.
- [56] Chaudhry P.S., J.Cabrera, H.R. Juliani et S.D. Varma, Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethanic. Biochem Pharmacol, (1983). 32:1995.
- [57] Ong K.C Khoo. Biological Effects of Myricetin. General Pharmacol. (1997) 29:0121-126.
- [58] Ong K.C et H.E. Khoo. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. Life Sci. (2000) 67: 1695-1705.
- [59] Hertog M.G.L., Feskens, P.C. Hollman, M.B. Katan et D. Kromhout. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. Lancet. (1993) 342: 1007-1011.
- [60] Chu S.C., Y.S. Hsieh et Lin J.Y. Inhibitory effects of flavonoids on Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase activity. J Nat Prod. (1992) 55: 179-183.
- [61] HOPKINS W. G., 2003. Physiologie végétale. 2ème édition américaine, de Boeck et Lancier S A, Paris, 2003. 514.

- [62] Guignard J.L., L. Cosson et M. Henry. Abrégé de Phytochimie. Ed : Masson, Paris, (1985) 121-150.
- [63] Takechi M., Y. Tanaka, M. Takehara, G.I. Nonaka et I. Nishioka, Phytochemistry, (1985). 24, (10), 2245-2250.
- [64] Vlietinck A.J.n T. De Bruyne, S. Apers et L.A. Pieters. Planta. Medica., (1997) 64 : 79-109.
- [65] Chen Lui K.C.S., S.S. Lee,J.F. Chiou et R.Ren.Science et lien, E.J, (1999) 65 : 43-46.
- [66] Bruneton J. Pharmacognosie, Photochimie, Plantes Médicinales, Tec et Doc, Ed : Lavoisier, Paris, (1993) 915.
- [67] Quideau S et K.S. Feldman. Chemical Reviews, (1996) 96 : 475-503.
- [68] Veroffa L., M. Dell'agli, A.Giolito, M. Guerini, P. Cabalion et E. Basisio. Journal of NaturalProduct, (2001) 64 : 603-307.
- [69] Mazza G et E Miniati “ Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains”, C.Press, Boca Roton, (1993) 362.12-18.
- [70] TANGUY M., Antioxydants Première partie: Les antioxydants dans l'alimentation. Médecine. Vol 5 (6): 2009, 256-260.
- [71] BENBROOK M., Accroître la teneur antioxydants des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologiques. Ed.The organic center : 2005. 6-8.
- [72] PINCEMAIL J., MEURISSE M., LIMET R., DEFRAIGNE JO., L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. Vaisseaux, Coeur, Poumons. Vol 4(5) : 1999. 133- 8
- [73] PELLETIER E., CAMPBELL P., DENIZEAU F., Ecotoxicologie moléculaire. Ed. Presses de l'université du Québec.canada : 2004. 182p.
- [74] ROLLAND Y., Actualités des lipides en cosmétique .Antioxydants naturels végétaux. OCL. Vol 11(6) : 2004. 419 - 424.
- [75] PASTRE J., PRIYMENKO N., Intérêt des anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Revue Méd. Vét. (4) : 2007. 187p.
- [76] PELLI K., LYLLY M., Les antioxydants dans l'alimentation. VTT Biotechnology Finlande. (3) : 2003. 9p.
- [77] MARIE-CLAUDE M., Les antioxydants. Actifs et additifs en cosmétologie .Ed.Tec & Doc : 2004. 337 -352.

- [78] NUR ALAM M., BRISTI N., RAFIQUZZAMAN M., Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. (21) : 2013.145-149.
- [79] GEORGIEVA S., BOYADZHIEV L., ANGELOV G., Caractérisation des vins bulgares par leur capacité antioxydant. *Revue de génie industriel*. (5): 2010.124-132.
- [80] JIRI S., MARKETA R., OLGA K., PETR S., VOJTECH J., LIBUSE T., LADISLAV H., MIROSLAVA B., JOSEF Z., IVO P., RENE K., Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. *Molécules*. (15): 2010. 8618-8640.
- [81] Singleton, V. L., & Rossi, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, (1965). 16(3), 144-158.
- [82] Hertog M.G.L et P.C.H. Hollman. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J. Agric. Food Chem.*, (1992). 40: 1591-1598.
- [83] Bahorun T. Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Université de Maurice. (1996).
- [84] Brunton J. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales,. Paris : Editions médicales internationales (3 éme éd.), Ed : Tec et Doc Lavoisier, (1999). 1120.
- [85] Ruberto, G., Renda, A., Daquino, C., Amico, V., Spatafora, C., Tringali, C. and Tommasi, N.D. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chemistry*, (2007) 100(1), 203-210.
- [86] Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, (2004). 26 (2): 211-219.
- [87] BOUGANDOURA N., BENDIMERAD N., Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta (L.)* Briq. *Nature & Technologie*. 2013. (9): 15p.
- [88] Türkmen, S., Jakob, C., Egerer, K., Liebisch, P., Zavrski, I., Kuckelkorn, UKleeberg, L. Circulating proteasome levels are an independent prognostic factor for survival in multiple myeloma. *Blood*, (2007). 109(5), 2100-2105.
- [89] Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdelly, C. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, (2008). 331(5), 372-379.

- [90] Vuorela, S., Morelló, J. R., Romero, M. P., Motilva, M. J., & Heinonen, M. Antioxidant activity of olive pulp and olive oil phenolic compounds of the Arbequina cultivar. *Journal of agricultural and food chemistry*, (2005). 53(6), 2002-2008
- [91] Abdel-Hameed, E. S. S. Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples. *Food Chemistry*, (2009). 114(4), 1271-1277.
- [92] Maisuthisakul, P., Pasuk, S., & Ritthiruangdej, P. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *Journal of Food Composition and Analysis*, (2008). 21(3), 229-240.
- [93] Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Salehi Surmaghi, M. H., Shams-Ardekani, M. R., & Rahimi, R. Five Pistacia species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): a review of their traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *The Scientific World Journal*, 2013.
- [94] Yousfi, M., Duhem, B., & Gaydou, E. M. Isolation and characterization of a new hispolone derivative from antioxidant extracts of *Pistacia atlantica*. *Phytother. Res*, (2009). 23, 1237-1242.
- [95] Benhammou N, Atik Bekkara F, Panovska TK. Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *atlantica* extracts. *Afr J Pharm Pharm*. 2008;2(2):22–28.
- [96] de Pinedo, A. T., Penalver, P., Pérez-Victoria, I., Rondón, D., & Morales, J. C. Synthesis of new phenolic fatty acid esters and their evaluation as lipophilic antioxidants in an oil matrix. *Food chemistry*, (2007). 105(2), 657-665.
- [97] Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, (2002). 13(10), 572-584.
- [98] Elâgoun, S. (LAMIACEAE) العائلة إلى تنتمي طبية لنبته الفلافونيدي الثانوي الأيض منتوج وتحديد فصل (2003) الشفوية.
- [99] Kamalak, A., Canbolat, O., Ozkose, E., Ozkan, C. O., Sahin, M., & Karabay, P. Effect of polyethylene glycol on in vitro gas production, metabolizable energy and organic matter digestibility of *Quercus cerris* leaves. *Livestock Research for Rural Development*, (2005). 17(4).
- [100] Proestos, C., Boziaris, I. S., Nychas, G. J., & Komaitis, M. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, (2006). 95(4), 664-671.
- [101] Merken, H. M., & Beecher, G. R. Markowicz Bastos, D. H., Saldanha, L. A., Catharino, R. R., Sawaya, A.C.H. F., Cunha, I B. Measurement of food flavonoids by high-performance

liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2000). 48(3), 577-599.

[102] Fotofísica de colorantes sobre sólidos particulados: interacciones moleculares y transferencia de energía Rodríguez, Hernán Bernardo 2009117[103] Li, B. J., Yang, S. D., & Shi, Z. J. Recent advances in direct arylation via palladium-catalyzed aromatic CH activation. *Synlett*, 2008(7), 949-957.

[104] Shahidi, F Naczki, M., &. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, (2004). 1054(1), 95-111.

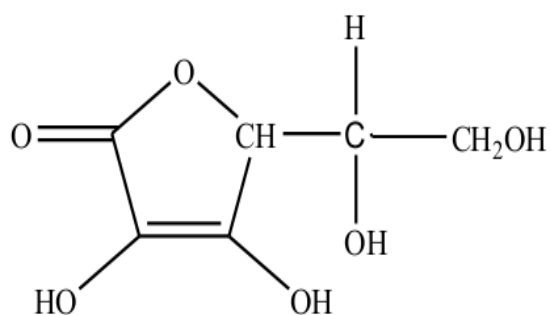
[105] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, (1999). 26(9), 1231-1237.

[106] Miguel, E. Blattman, C., &. Civil war. *Journal of Economic Literature*, 3-57. *Molecules*. (2010). 12: 423-432.

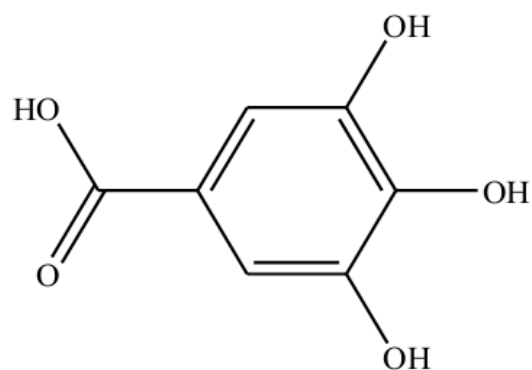
[107] Khazaal, K. ; Boza, J. ; Ørskov, E. R.,. Assessment of phenolics-related antinutritive effects in Mediterranean browse: a comparison between the use of the in vitro gas production technique with or without insoluble polyvinylpyrrolidone or nylon bag. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 1994. 49 (1-2): 133-149.

[108] Maataoui, A., Khan, M. F., Dogan, S., Wesarg, S., Gurung, J., Ackermann, H., ... & Vogl, T. J. Navigation-based needle puncture of a cadaver using a hybrid tracking navigational system. *Investigative radiology*, (2006). 41(10), 713-720.

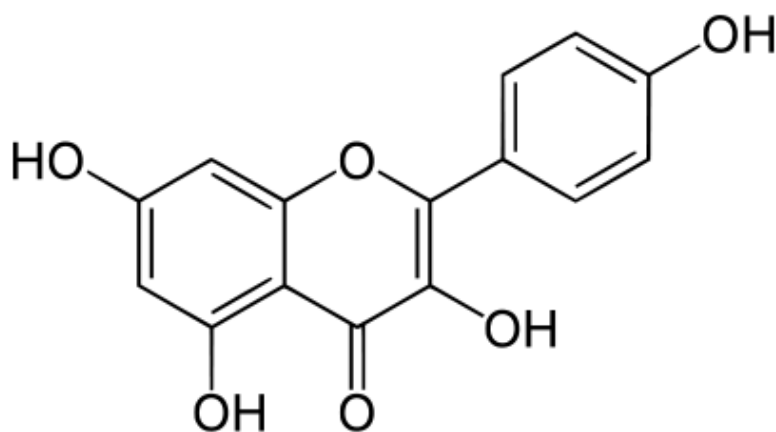
ANNEXE



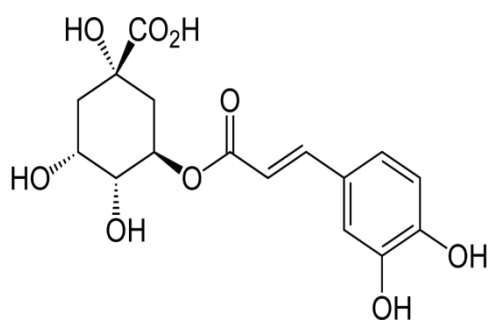
Structure de l'acide ascorbique (Vitamine C)



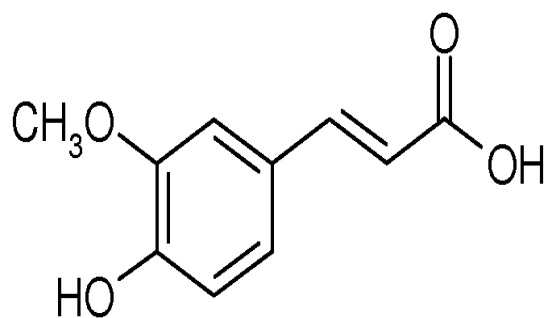
Structure de l'acide gallique



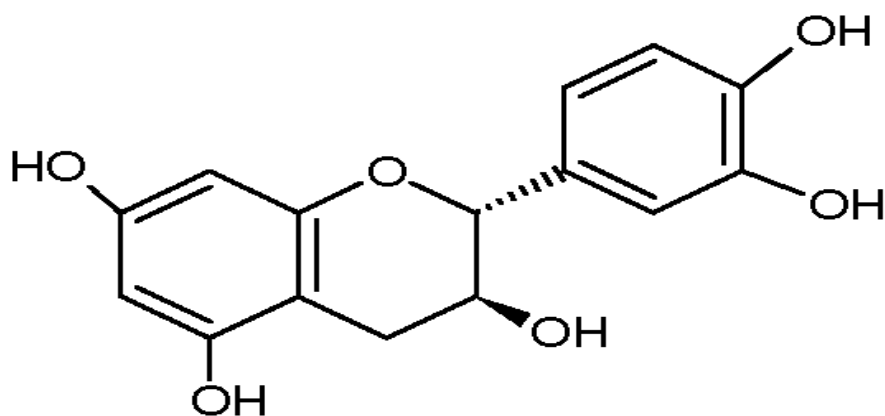
Structure de la catéchine



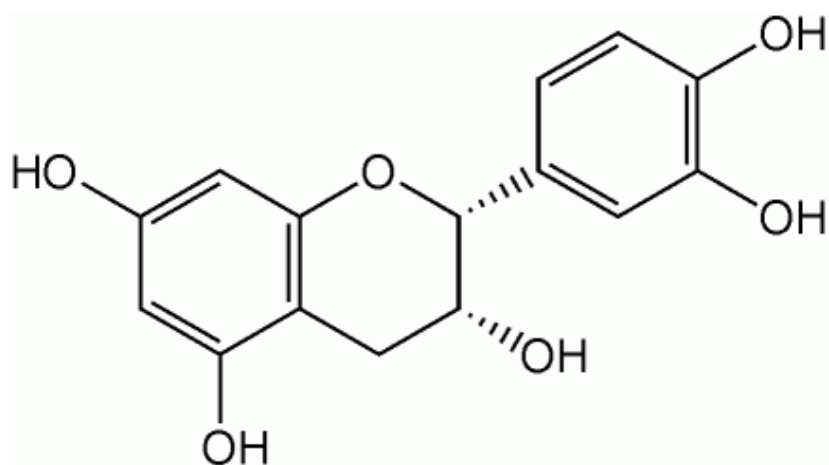
Structure de l'acide chlorogénique



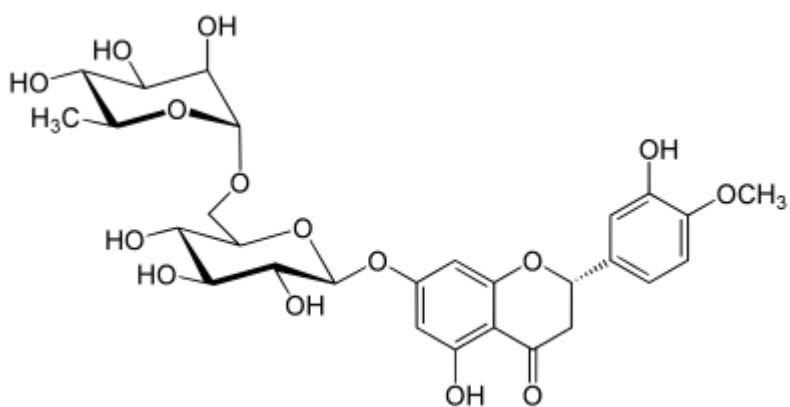
Structure de l'acide férulique



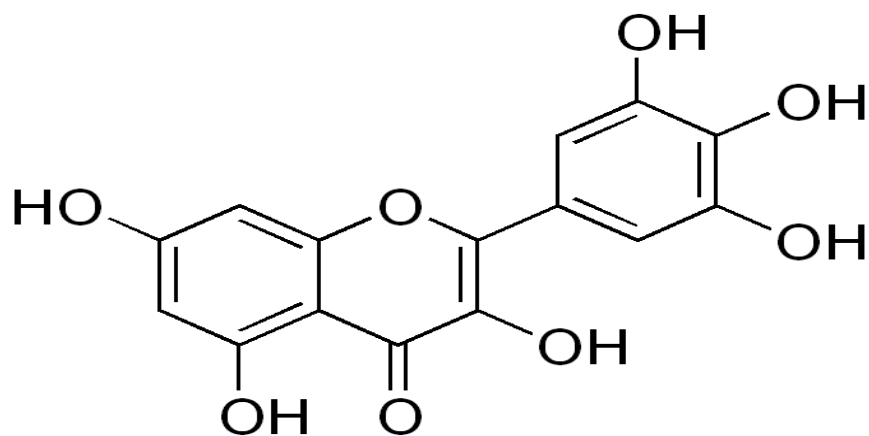
Structure de gallyocatéchine



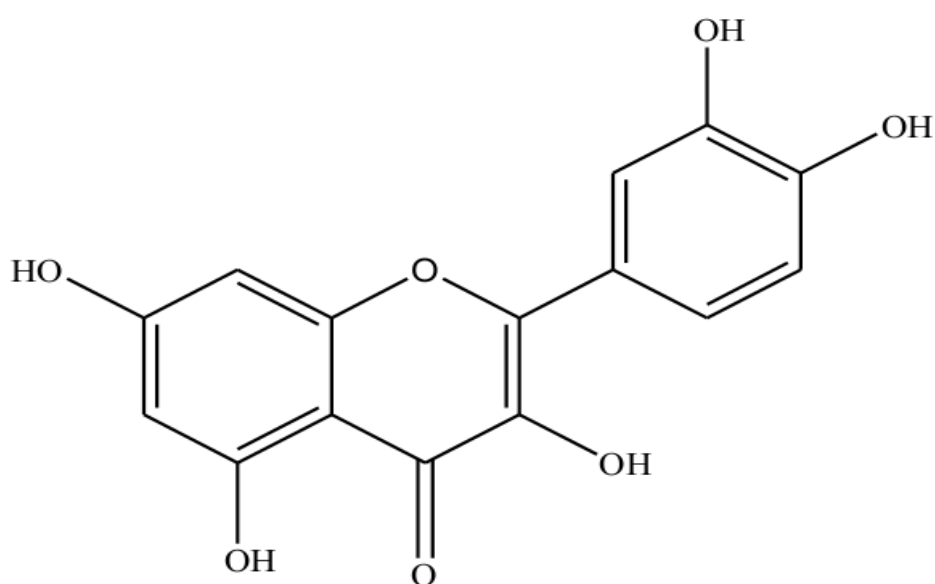
Structure de l'èpicatéchine



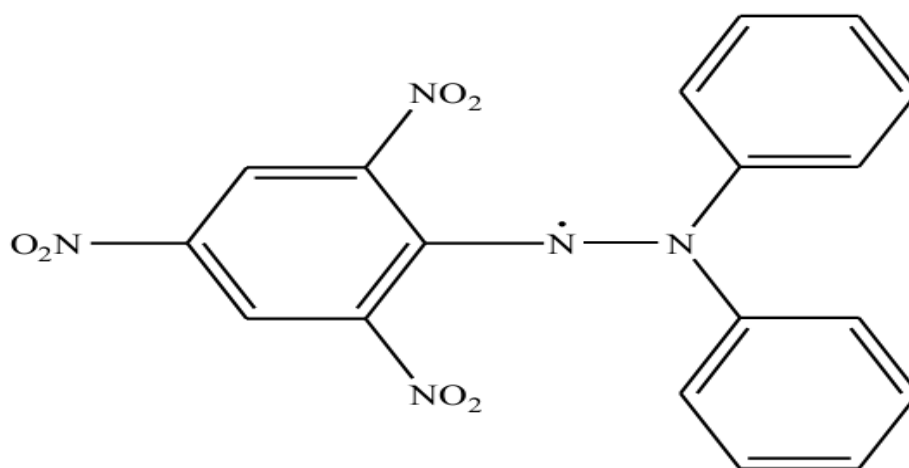
Structure de l'hésperidine



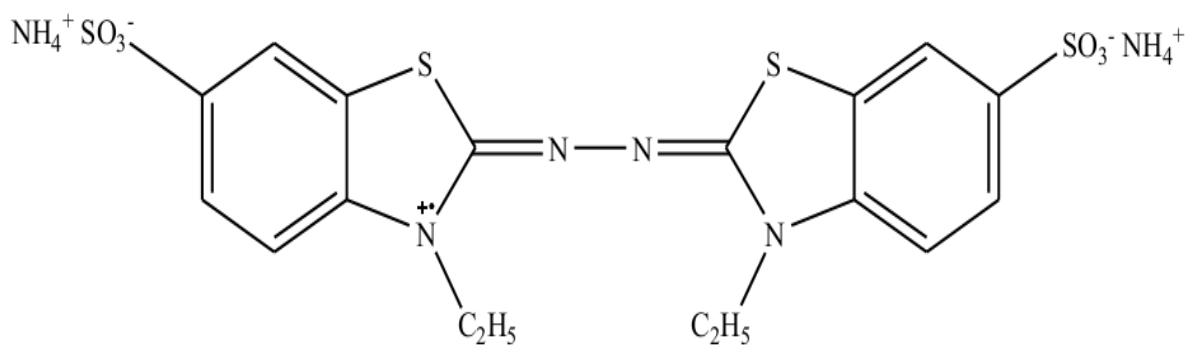
Structure de myricétine



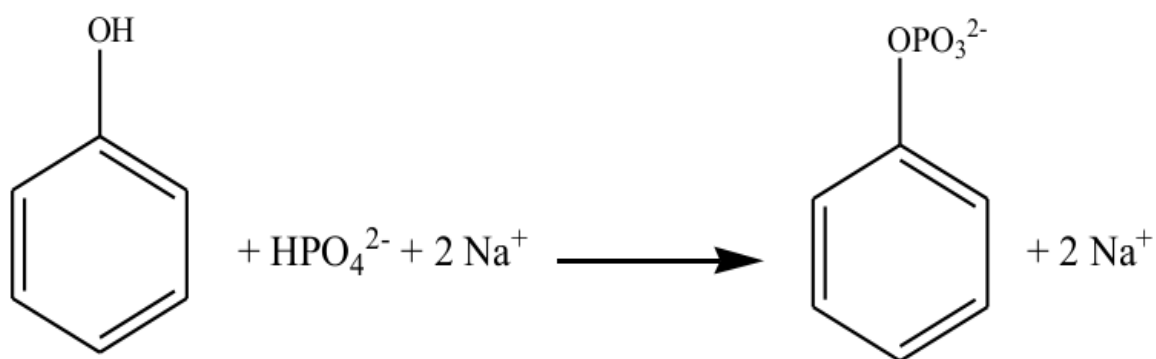
Structure de la quercétine



Structure de radical DPPH[•]



Structure de radical cation ABTS^{•+}



Principe de la réduction du réactif de Folin-Ciocalteu

ملخص

تنتمي شجيرة *Pistacia lentiscus* إلى عائلة *Anacardiaceae* وهي نبتة طبية واسعة الاستعمال في الطب التقليدي في الجزائر. تنتشر هذه النبتة المعروفة باسم "الضرو" بصفة خاصة في منطقة الشمال الجزائري. تم الحصول على المستخلصات العضوية بواسطة النقع وذلك باستعمال نوعين من المذيبات العضوية: ثنائي كلور الميثان و أسيتات الاثيل.

تم تحديد محتوى متعدد الفينول في المستخلصات باستعمال طريقة الكاشف Folin-Ciocalteu وكانت النتائج كما يلي : 0.62 – 50.36 mg GAE/g (MS) في مستخلصات كل من ثنائي كلور الميثان و أسيتات الاثيل على الترتيب. وتم تقدير الفلافونويدات باستعمال طريقة $AlCl_3$. كان تركيز هذه الأخيرة: 0.16-0.52 mg QE/g MS في مستخلصات كل من ثنائي كلور الميثان و أسيتات الاثيل على الترتيب. بينما قدرت الدباغ باستعمال طريقة الفانيلين وقد كان تركيزها كما يلي : 1.65-9.45 mg CA/g MS في مستخلصات كل من ثنائي كلور الميثان و أسيتات الاثيل على الترتيب. التحليل الذي قمنا به CLHP تبين ان المستخلصات تحتوي على فنتين من المركبات الفينولية; مركبات فينولية بسيطة, و الدباغ المكثفة. قدرت النشاطية المضادة للأكسدة باستعمال ثلاث طرق مختلفة: اختبار ABTS و ارجاع الحديد و تقنية ارجاع الجذر الحر DPPH. اظهرت نتائج الاختبار الاول ان القيم كانت كما يلي: 0.39-0.31 mg TEAC/g MS (بالنسبة لمستخلصات كل من ثنائي كلور الميثان و أسيتات الاثيل على الترتيب. اما فيما يخص الاختبار الثاني كانت بنسبة 0.47-0.19 mg/g MS (بالنسبة لمستخلصات كل من ثنائي كلور الميثان و أسيتات الاثيل على الترتيب. اما الاختبار الثالث فكانت 3.23-431.62 mg/g MS (بالنسبة لمستخلصات كل من ثنائي كلور الميثان و أسيتات الاثيل على الترتيب.

الكلمات المفتاحية: متعدد الفينول، *Pistacia lentiscus*، نشاط مضاد للأكسدة، *Anacardiaceae*، DPPH، ABTS.

Résumé

Pistacia lentiscus est un arbrisseau qui appartient à la famille d'*Anacardiaceae*, est une plante médicinale largement utilisée en médecine traditionnelle en Algérie. Cette espèce connue sous le nom de "Draw", est très répandue dans le Nord Algérienne, les extraits ont été obtenus par macération en utilisant deux solvants, dichlorométhane et acétate d'éthyle.

La teneur totale en composés polyphénoliques a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, la teneur quantifiée est de l'ordre 0.62-50.36 mg GAE/g MS dans les extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle respectivement. Les Flavonoïdes en été évalués en utilisant la méthode de $AlCl_3$, leurs teneur est de 0.16 et 0.52 mg QE/g MS pour les extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle respectivement. Les tanins sont estimés par la vanilline, leur teneur est de 9.45 et 1.65 mg CA/g MS pour les extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle respectivement.

L'analyse effectuée par CLHP montre que les extraits du *P. lentiscus* contient deux classes de composés phénoliques ; composés phénoliques simples, et tanins condensés.

L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant trois méthodes différentes : test ABTS, réduction de feret la méthode de réduction de radical libre DPPH. Pour le DPPH test a été estimé avec un ordre varier entre 0.39 et 0.31 mg AAE/g MS dans les extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle respectivement, pour le K_3FeCN_6 test a été estimé à 0.47-102.19 mg AAE/g MS et pour le ABTS test a été estimé à 3.23-431.62 mg TE/g MS.

Mots clés: polyphénols, *Pistacia lentiscus*, activité antioxydante, *Anacardiaceae*, DPPH, ABTS.

Abstract

Pistacia lentiscus is a tree which belongs to the *Anacardiaceae* family, it's a medicinal plant largely used in Algerian traditional medicine. This species known as "Draw" is very widespread in the North of Algeria. Organic extracts were obtained by maceration with two solvents: dichloromethane and ethyl acetate. Total phenolic contents were determined using Folin-Ciocalteu reagent, the level of phenolic compounds of *P. lentiscus* varied between 0.62 to 50.36 mg GAE/g dry leaf weight for the f the dichloromethane and ethyl acetate, respectively. The flavonoids contents was determined using a method $AlCl_3$, the level of the flavonoid contents for the dichloromethane and ethyl acetate was 0.16 and 0.52 mg QE/g MS respectively. The tannins are estimated by the vanillin, their content is varied between 9.45 and 1.65 CA mg/g MS for the dichloromethane and ethyl acetate, respectively.

Analysis by HPLC shows that the extract of *P. lentiscus* contains two classes of phenolic compounds; simple phenolics, and condensed tannins.

The antioxidant activity was evaluated using three different methods: ABTS test, iron reduction and free radical DPPH reduction method. The antiradical activity of DPPH ranged from 3 to 431 mg AAC/g dry leaf weight for dichloromethane and ethyl acetate, respectively. The reducing power capacity of *P. lentiscus* ranged from 0.47 to 102.19 mg AAE/g dry leaf weight for dichloromethane and ethyl acetate respectively, while values of ABTS ranged from 3.23 to 431.62 mg TE/g for dichloromethane and ethyl acetate, respectively.

Key words: polyphenols, *Pistacia lentiscus*, antioxidant activity, *Anacardiaceae*, DPPH, ABTS.