

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة عمّار ثليجي 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 :

REZZOUG Maria Assia

THEME

Etude de l'activité antioxydante d'une plante médicinale (*Arbutus unedo.L*)

Soutenu publiquement devant le jury composé de:

<i>Mr. SAÏDAT Boubakeur</i>	<i>M.C.A</i>	<i>Président</i>
<i>Mr. GHERIB Abdelaziz</i>	<i>M.C.A</i>	<i>Examineur</i>
<i>Mme. BOUZIANE Amel</i>	<i>M.A.B</i>	<i>Examineur</i>
<i>Mlle. NOUREDDINE Asmaa</i>	<i>M.A.B</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>Mr. BAKCHICHE Boulanouar</i>	<i>M.A.A</i>	<i>Co-Rapporteur</i>

Année Universitaire 2014/2015

Dédicaces

A mes chers grands parents en témoignage de ma reconnaissance pour leur patience leur soutien tout au long de mes études. Que dieu leurs prête santé.

A mes chers parents en témoignage de mon affection et ma reconnaissance pour leur soutien et encouragement.

A ma chère tante, qui souhaite tout le temps que je pousse mes études jusqu'au bout avec un soutien incontestable. Merci...

A toute ma famille.

A mes amies qui me sont très chères.

Maria

Remerciement

Avant toutes choses, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.

Le travail présenté a été effectué au sein du laboratoire pédagogique de département Science de la matière de l'université Amar Telidji de Laghouat, sous L'encadrement de M^{lle}. Nouredine Asmaa. maitre assistant B à l'université Ammar Telidji de Laghouat. Je tiens à s'exprimer ma profonde gratitude et mes vifs remerciements d'avoir accepté de m'encadrer durant ce travail. Son soutien scientifique, ses remarques et conseils, sa modestie m'ont aidé à mener à bien ce travail.

Mes remerciements les plus vifs s'adressent à mon Co-Rapporteur de ce mémoire M^r. Bakchiche Boulanouar Maître assistant A à l'université Ammar Telidji de Laghouat, qui m'a honoré en acceptant d'accorder à l'orientation et à la réalisation de ce travail, je lui exprime mes sentiments de reconnaissances les plus sincères pour sa précieuse aide, ses encouragements et ses conseils.

J'adresse mes sincères remerciements à M^r. Saïdat Boubakeur, maitre de conférences A à l'université Amar Telidji de Laghouat d'avoir accepté de présider le jury.

Je tiens également mes vifs remerciements à M^r. Gherib Abdelaziz, Maître de Conférences A à l'université Amar Telidji de Laghouat, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

J'exprime mes vifs remerciements à M^{me}. Bouziane Amel, maitre-assistant B à l'université Amar Telidji de Laghouat Pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de faire partie de jury.

J'aimerai en particulier à remercier M^r. Ferhat Mahmoud, maitre-assistant A à l'université Amar Telidji de Laghouat, pour son encouragement et ses précieux conseils.

Je le remercie pour ses qualités humaines et intellectuelles.

Aux personnels du laboratoire pédagogique de l'université de Laghouat et de Ghardaïa pour leur aide.

À toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.

Liste des Notions

ABTS	:	2,2'-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid).
AcO	:	Acétone.
BHA	:	Butylated hydroxyanisole.
%	:	Pourcentage.
°C	:	Degré Celsius.
µg	:	Microgramme.
µl	:	Microlitre.
DPPH	:	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.
EtOH	:	Ethanol.
FRAP	:	Ferric ion Reducing Antioxidant Power.
IC₅₀	:	Concentration de l'extrait nécessaire pour inhiber 50 % des radicaux libres.
MeOH	:	Methanol.
EAG	:	Equivalente en acide gallique.
g	:	Gramme.
g/mol	:	Gramme par mol.
M	:	Molaire.
mg	:	Milligrammes.
min	:	Minutes.
ml	:	Millilitres.
mM	:	Millimolaire.
nm	:	Nanomètre.
PI	:	Pourcentage d'inhibition.
TEAC	:	Trolox Equivalent Antioxydant Capacity.
UV	:	Ultraviolet.
VCEAC	:	Vitamin C Equivalent Antioxydant Capacity.

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Caractérisation de la plante étudiée.	3
Tableau 2 :	Aspect, couleur et rendement d'extraction des composés phénoliques.	12
Tableau 3 :	Teneurs des phénols totaux dans les extraits phénoliques des fractions organiques.	13
Tableau 4 :	Teneurs des phénols totaux dans les extraits phénoliques des fractions aqueuses.	14
Tableau 5 :	Teneurs et pourcentages des flavonoïdes totaux des fractions organiques.	15
Tableau 6 :	Teneurs et pourcentages des flavonoïdes totaux des fractions aqueuses.	15
Tableau 7 :	Valeurs de VCEAC des extraits phénoliques des deux parties de la plante étudié et de BHA.	17
Tableau 8 :	Valeurs des IC50 trouvées pour les extraits méthanoïques des deux parties de la plante.	20
Tableau 9 :	Valeurs des IC50 trouvées pour les extraits éthanoïques des deux parties de la plante.	21
Tableau 10 :	Valeurs des IC50 trouvées pour les extraits acétonoïques des deux parties de la plante.	22
Tableau 11 :	Valeurs de TEAC des extraits phénoliques des deux parties de la plante étudiée, et de vitamine C.	26

Liste des figures

Figure 1 :	Organigramme expliquant les différentes étapes dans ce travail.	5
Figure 2 :	Protocole expérimental d'extraction des composés phénoliques	7
Figure 3 :	Réduction de radical libre DPPH [•] en présence d'antioxydant.	10
Figure 4 :	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	13
Figure 5 :	Courbe d'étalonnage de la rutine.	14
Figure 6 :	Courbe d'étalonnage de la vitamine C.	16
Figure 7 :	corrélation entre les valeurs VCEAC des extraits avec leurs contenue en polyphénols totaux et flavonoïdes totaux.	18
Figure 8 :	% I _{DPPH} = f (C) pour les extraits méthanoïques et ces fraction. aqueuses des deux parties étudiées d' <i>ArbutusUnedo. L.</i>	20
Figure 9 :	Corrélations entre les valeurs IC ₅₀ des extraits avec leurs contenue en polyphénols totaux et flavonoïdes totaux.	23
Figure 10 :	Corrélation entre la capacité antiradicalaire DPPH et l'antioxydante FRAP.	23
Figure 11 :	Courbe d'étalonnage de Trolox.	25
Figure 12 :	Corrélations entre les valeurs TEAC des extraits avec leurs contenue en polyphénols totaux et flavonoïdes totaux.	27
Figure 13 :	Corrélation entre la capacité antiradicalaire ABTS et l'antioxydante FRAP.	27

Sommaire

Liste des notions

Liste des tableaux

Liste des figures

I. Introduction générale	Erreur ! Signet non défini.
II. Matériels et méthodes	3
II.1. Matériels.....	3
II.1.1. Matière végétal.....	3
II.1.2. Réactifs.....	4
II.2. Méthodes.....	5
II.2.1. Extraction des composés phénoliques.....	6
II.2.2. Dosage des phénols totaux.....	8
II.2.3. Dosage des flavonoïdes.....	8
II.2.4. Estimation du pouvoir antioxydant.....	9
II.2.4.1. Test du pouvoir réducteur (Ferric reducing antioxidant power).....	9
II.2.4.2. Test de DPPH.....	10
II.2.4. 3. Test d'ABTS.....	11
III. Résultats et discussions	12
III.1. Extraction des composés phénoliques.....	12
III.1.1. Quantification des phénols totaux.....	12
III.1.2. Estimation de la teneur des flavonoïdes totaux.....	14
III.2. Évaluation de l'activité antioxydante.....	16
III.2.1. Test de pouvoir réducteur.....	16
III.2.2. Test de DPPH.....	19
III.2.3. Test d'ABTS.....	24
IV. Conclusion générale	29
Références bibliographiques	
Annexes	

I. Introduction générale

De tous les temps, les plantes ont occupé une place prépondérante dans la vie de l'homme. Toutes les civilisations connues ont utilisé les plantes soit sauvages soit cultivées pour se nourrir, se défendre, et se vêtir ou se soigner. Ces utilisations se sont diversifiées au fil des temps pour s'adapter aux besoins [1] .

L'homme pour ce protégé contre toute agression fait appel quotidiennement à ses systèmes de défense interne notamment son système immunitaire. Mais parfois ces systèmes de défense ne s'encourent pas capable à se défendre tout seul pour cela l'homme utilise des ressources thérapeutiques que parmi eux en cite les ressources végétales qui sont des entités vivantes ayant la capacité de produire une grande diversité de substances ne participant pas à leur métabolisme de base, mais représentant plutôt des produits du métabolisme secondaire comme, les polyphénols, les huiles essentielles, les alcaloïdes...etc. Qui aide les systèmes de défense interne [2].

Initialement dénommés « tanin végétal », les polyphénols n'ont été définis qu'au début des années 1980 pour caractériser une classe de plusieurs milliers de molécules bioactives présentes dans les plantes, aux structures très hétérogènes ayant pour point commun la présence d'au moins un noyau aromatique (groupement phénol) sur lequel sont présents plusieurs groupements hydroxyles (OH) [3] .

Les polyphénols sont des molécules synthétisées par les végétaux. Ils appartiennent à leur métabolisme secondaire et participent à leur défense contre les agressions environnementales. Ce sont des phytomicronutriments et généralement des pigments responsables des teintes automnales des feuilles et des couleurs des fleurs et fruits (jaune, orange, rouge). C'est une classe constituée d'environ 8 000 composés, divisés en plusieurs catégories qui sont les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins issus de la polymérisation des flavonoïdes, les lignanes qui, avec les isoflavones, sont nommées phyto-oestrogènes [4] .

Les éventuels bénéfices que pourraient apporter à la santé humaine les polyphénols intéressent plusieurs domaines : thérapeutiques, produits pharmaceutique des médicaments utilisé contre les maladies liées au stress oxydant telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies cerebrovasculaires, les maladies métaboliques et le cancer, cosmétique

(maquillages; gommage minceur) et agroalimentaires comme conservateurs et colorant [5,6].

Dans le présent travail nous s'intéressons aux polyphénols existant dans les feuilles et les fruits de L'Arbousier (*Arbutus unedo*). Le travail est structuré en trois parties :

La première partie consiste à l'extraction des polyphénols par des solvants de polarité différentes puis l'analyse quantitative du contenu en polyphénols et en flavonoïdes des différents extraits aqueux et organiques des fruits et des feuilles de l'**Arbousier**.

La seconde partie étudie l'activité antioxydante des extraits par des différentes méthodes.

La troisième partie du mémoire sera consacrée à la présentation de l'ensemble des résultats obtenus et aux discussions qui en découlent.

II. Matériels et méthodes

II.1. Matériels

II.1.1. Matière végétal

La matière végétale qui a fait l'objet de ce travail est constituée de la partie aérienne (feuilles et fruits) de la plante de L'Arbousier (*Arbutus unedo L.*).

Les échantillons ont été récoltés dans la localité de l'ouest Algérien au mois d'Octobre 2014. La plante étudiée est séchée à l'abri de la lumière pendant 1 mois. Le tableau suivant présente les différentes caractéristiques de la plante étudiée.

Tableau 1 : Caractérisation de la plante étudiée

Description	Photos
<ul style="list-style-type: none">Noms vernaculaires : Anglais : Arbutus, Cane Apples, Irish Strawberry Tree, Killarney Strawberry Tree, Strawberry Madrone, Strawberry Tree Français : Arbousier, Arbousier Commun, Fraisier Arbre : Outlubقطلب, Ticisnou (Algerie) [7] .Description botanique : <i>Arbutus unedo L.</i> est un arbuste à feuilles persistantes qui a une distribution circumméditerranéenne, étant trouvé en Europe occidentale, centrale et australe, au nord-est de l'Afrique (hors Egypte et la Libye) et les îles Canaries et en Asie occidentale. <i>Arbutus unedo</i> pousse à 9-12 m de haut, L'écorce est fissurée et il se détache en petits flocons, principalement brun terne. Les feuilles sont alternes, simples, oblancéolées, sombre vert, coriace et ont une marge dentelée, généralement 2-3 fois plus longues que larges, glabres avec un pétiole de 10 mm ou moins. Les fleurs, avec des lobes recourbés, sont en forme de cloche, 8-9 mm de long, blanc, et souvent rose pâle. Les fleurs sont une source importante de nectar et de pollen pour les abeilles. Les fruits sont globuleux, rouge orangé à maturité, de plus en plus jusqu'à 2 cm de diamètre, sont récupérés avec conique papilles et mature à l'automne .ils prennent environ 12 mois pour mûrir; par conséquent, l'arbre porte les fruits et les fleurs matures en même temps. Le processus de floraison et de fructification se étend de Octobre a Février [8] .	 <p data-bbox="1193 1317 1305 1350">L'arbre</p>  <p data-bbox="1174 1962 1331 1995">Les feuilles</p>

- **Classification botanique :**

Régne : Plantae- Plantes.

Sous-règne : Tracheobionta-plantesvasculaires.

Super division : Spermatophyta-Seed plants.

Division : Magnoliophyta-Les plantes à fleurs.

Classe : Magnoliopsida-dicotylédones.

Sous-classe : Dilleniidaea.

Famille : Ericaceae-famille Heath.

Genre : ArbutusL.-madrone.

Espèce :Arbutus unedo L.arbousier [9,10].

- **Utilisations :**

les fruits de l'*Arbutus unedo.L* ont une certaine importance dans l'agriculture locale les communautés où ils sont utilisés pour la production des boissons alcoolisées, les confitures, et les gelées marmelades. *A. unedo* est utilisée dans la cuisine pour faire ressortir le gout dans un plat ou de la compléter, les fruits de l'arbousier (*Arbutus unedo L.*) sont consommés principalement comme des produit transformés ils peuvent être une bonne source d'antioxydants si consommé des fruits frais. Ils contiennent une gamme d'antioxydant large et excellent composants, y compris des composés phénoliques (par exemple les anthocyanes, les dérivés de l'acide gallique, flavonoïdes et tanins), la vitamine C, la vitamine E et les caroténoïdes suggérant un potentiel a valeur élevé en tant que "la nourriture de promotion de la santé" [7] .



Les fleurs



Le fruit

II.1.2. Réactifs

Les produits chimiques utilisés dans ce travail ont une haute qualité (Annexe1), la liste des marques des produits est comme suit :

Sigma – Aldrich

Biochem

Prolabo

Laboratory reagents

Merck

Riedel-de Haen

Fluka

II.2. Méthodes

L'ensemble des méthodes expérimentales que nous avons mené dans ce travail se structure comme illustré l'organigramme ci-après :

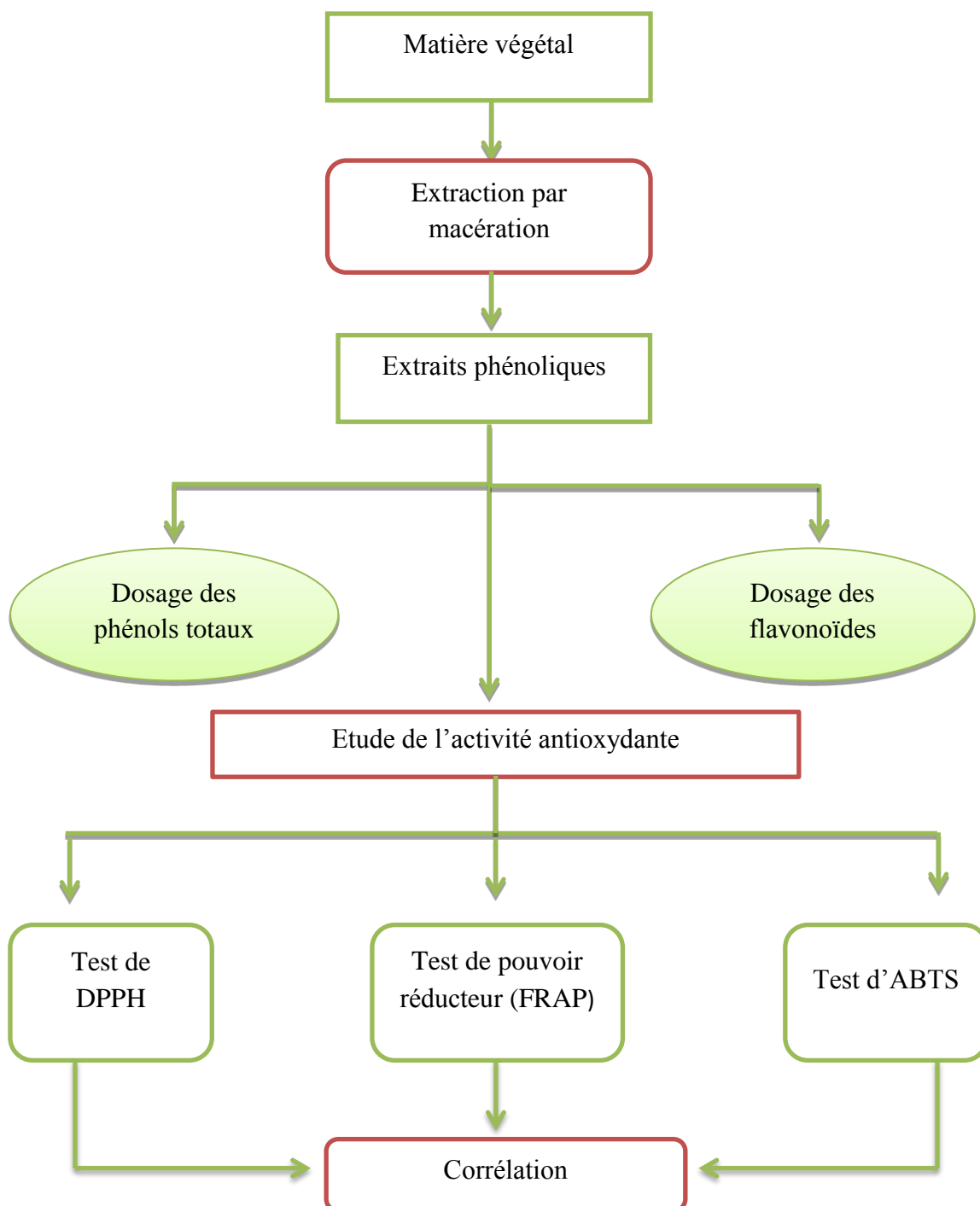


Figure 1 : Organigramme expliquant les différentes étapes dans ce travail

II.2.1. Extraction des composés phénoliques

Une quantité de 5 g de poudre fine de la matière végétal secs ont été macérer dans un mélange hydro-alcoolique (Méthanol/eau 80/20 : v/v), (Ethanol /eau 50 /50 : v /v) et (Acétone /eau 70/30 :v/v) pendant 72 heures, dans l'obscurité, à température ambiante sous agitation , le Macérât a été filtré à travers un papier filtre pour obtenir un extrait clair, et on a évaporé le solvant sous vide à une température de 40°C. Après traitement à l'hexane afin d'éliminer toutes traces de composés apolaires (pigments, lipides, etc.), la phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle, La phase organique obtenue est évaporé sous vide à 40°C. Le résidu est repris dans 10 ml d'éthanol et conserver au réfrigérateur jusqu'à le temps d'analyse. la phase aqueuse sera aussi conservée pour l'analyse. La série d'extraction permet d'obtenir six extraits : l'extrait hydro-méthanoïque, l'extrait hydro-Ethanoïque et l'extrait hydro-acétonoïque plus les trois fractions aqueuses de chaque solvant. L'organigramme suivant explique les différentes étapes d'extraction des composés phénoliques :

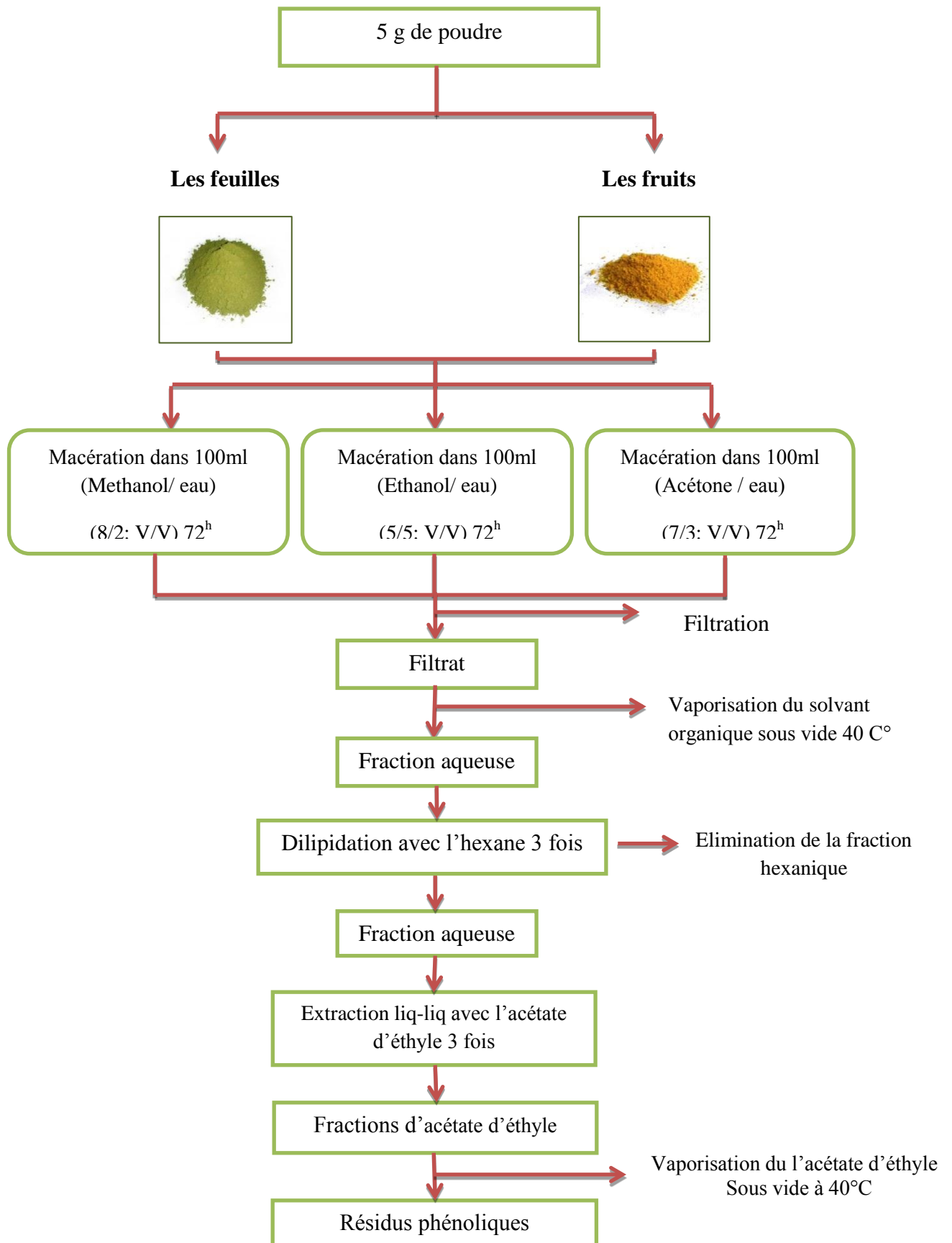


Figure 2 : Protocole expérimental d'extraction des composées phénoliques

II.2.2. Dosage des phénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par une méthode adaptée par Singleton et Ross en 1965 avec le réactif de Folin–Ciocalteu [11]. Le réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique, $H_3PW_{12}O_{40}$, et l'acide phosphomolybdique, $H_3PMo_{12}O_{40}$, qui après oxydation des phénols, est réduit en un mélange d'oxydes bleus de tungstène, W_8O_{23} , et de molybdène, Mo_8O_{23} . La coloration bleue produite possède une absorption maximale dans la région de 750 nm et est proportionnelle à la quantité totale de composés phénoliques initialement présentes [12].

250 µl d'extrait dilué été mélangés avec 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (10%) dilué dans l'eau, après agitation pendant 3 min, 0,8 ml de carbonate de sodium (7,5%) est ajouté à l'ensemble. Les échantillons ont été incubés à température ambiante pendant 30 minutes. L'absorbance est mesuré à 760 à l'aide d'un spectrophotomètre UV (*SP-3000 nano*) contre un blanc. L'acide gallique est utilisé comme standard pour tracer la courbe d'étalonnage. La teneur totale en polyphénol a été exprimée en mg d'équivalent acide gallique par gramme de matière végétal sèche.

II.2.3. Dosage des flavonoïdes

La concentration des flavonoïdes a été déterminée en utilisant une méthode chlorométrique [13]. La méthode repose sur le principe du dosage direct par le chlorure de l'aluminium. En effet, les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle libre en position 5 susceptible de donner (en présence de chlorure d'aluminium), un complexe jaunâtre par chélation de l'ion Al^+ . La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes présente dans l'extrait [14].

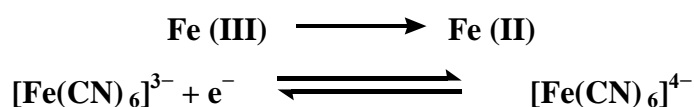
Brièvement, un millilitre d'extrait dilué dans l'éthanol est ajouté à 1 ml d' $AlCl_3$ 2%. Après 15 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm. La courbe d'étalonnage est effectuée par la rutine, préparée dans l'éthanol, à différentes concentrations, dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage. Les résultats sont ainsi exprimés en mg d'équivalent de rutine par 1g du poids sec de la matière végétal. Toutes les mesures sont répétées 3 fois [15].

II.2.4. Estimation du pouvoir antioxydant

Afin d'évaluer l'activité antioxydante des extraits phénoliques des feuilles et des fruits de l'*Arbutus unedo L*, trois tests *in vitro* ont été utilisés : le test, du pouvoir réducteur FRAP (Ferric reducing antioxidant power), de DPPH et d'ABTS.

II.2.4.1. Test du pouvoir réducteur (Ferric reducing antioxidant power)

Le pouvoir réducteur des échantillons a été déterminé selon le procédé d'Oyaizu, 1986 ; dont le principe de ce test est basé sur la réaction chimique suivante [15] :



La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de 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 dans le milieu réactionnel à 700 nm. En d'autre terme, le système $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe(CN)}_6$ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semiquantitative » des concentrations des polyphénols, qui participent à la réaction rédox [16] .

Pour réaliser ce test, on ajoute 0,5 ml du tampon phosphate (0,2 M, PH 6,6) à 25 μl d'extrait, et de 0,5 ml du ferricyanide $\text{K}_3\text{Fe(CN)}_6$ 1 %. Ce mélange est incubé 20 min au bain-marie à 50°C , après l'incubation on additionne 0,5ml de l'acide trichloracétique TCA 10% pour stopper la réaction, Ce volume (1,75 ml) a été mélangé avec 1,75 ml de l'eau distillée et de 0,5 ml de FeCl_3 0,1% , l'absorbance est lue à 700 nm, contre un blanc sans l'antioxydant [17] .

Également nous avons comparé le pouvoir antioxydant de nos extraits à la vitamine C comme antioxydante synthétique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés [11].

II.2.4.2. Test de DPPH

L'activité antioxydante est tributaire de la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés phénoliques. En présence d'un radical libre, 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH[•]) ; l'atome H est transféré sur ce dernier alors transformé en une molécule stable DPPH (Figure 3), ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à l'épuisement de la capacité d'antioxydant donneur d'hydrogène [18].

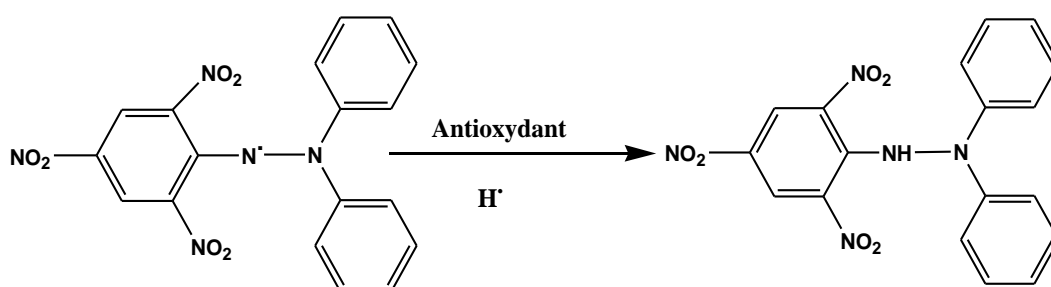


Figure 3: Réduction de radical libre DPPH en présence d'antioxydant

Le DPPH présente une coloration violette sombre mais lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes sa couleur vire vers le jaune pâle, le virage vers cette coloration et l'intensité de cette coloration dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance anti-radicalaire [19].

Pour réaliser ce test, un volume de 50 µl des divers concentrations préparées de chaque extraits a été mélangé avec 1950 µl de solution méthanoïques de DPPH (60 µmol /l), le mélange a été secoué vigoureusement et incubé à l'obscurité pendant 30 minutes. La réduction du radical DPPH a été mesurée en surveillant en continu la diminution de l'absorption à 517 nm contre un blanc contenant la solution de DPPH et du solvant.

La capacité à piéger le radical libre DPPH a été calculé comme pourcentage d'inhibition I % utilisant l'équation suivante :

$$I\% = \left[\frac{A_{DPPH} - A_S}{A_{DPPH}} \right] * 100$$

Où :

A_S : est l'absorbance de l'extrait de l'échantillon lorsque la solution a été ajoutée.

A_{DPPH} : est l'absorbance de la solution DPPH.

La concentration en extrait fournissant 50% d'inhibition (IC_{50}) a été calculée à partir du graphe pourcentage d'effet de balayage en fonction de la concentration en extrait [20].

Nous avons comparé le pouvoir antioxydant de nos extraits à la vitamine C et au BHA comme des antioxydants naturels et synthétiques.

II.2.4. 3. Test d'ABTS

La méthode de radicale ABTS est l'un des tests les plus utilisés pour la détermination de la concentration des radicaux libres. 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) : $ABTS^{\bullet}$ (Annexe 2)



Cette réaction est suivie spectrophotométriquement par la variation du spectre d'absorption. Les résultats obtenus sont généralement recalculés à la concentration de Trolox, et sont décrites comme "Trolox équivalente antioxydante capacité" (TEAC) [21].

Le procédé utilisé était tel que décrit par Re et al. (1999), basé sur la capacité d'un échantillon à inhiber le radical cationique $ABTS^{\bullet+}$ par rapport à un antioxydant de référence (Trolox). Le radical cationique $ABTS^{\bullet+}$ est générée par une réaction chimique avec le persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$) [22].

Pour pouvoir générer le radical cationique $ABTS^{\bullet+}$ nous avons préparé une solution aqueuse de persulfate de potassium $K_2S_2O_8$ (2,45 mM) et à partir de cette solution on prépare la solution ABTS (7 mM) qui présente une coloration bleu-vert correspondant à la formation du radical cationique $ABTS^{\bullet+}$.

Ce mélange a été incubé à l'obscurité pendant 12 à 16 heures. La solution obtenue est diluée avec l'éthanol pour obtenir une absorbance de 0,700. L'ABTS absorbe à 734 nm et lors qu'il est réduit, il vire du vert foncé au vert clair. Le pouvoir antioxydant d'un échantillon sera proportionnel à la variation de la couleur du radical [23] .

III. Résultats et discussions

III.1. Extraction des composés phénoliques

L'extraction des polyphénols à partir de la poudre de feuilles ou des fruits séchée d'*Arbutus unedo* L a permet d'obtenir des teneurs, aspects et couleurs différents consignés dans le tableau 2.

Tableau 2: Aspect, couleur et rendement d'extraction des composés phénoliques

	<i>Les feuilles</i>			<i>Les fruits</i>		
	<i>Aspect</i>	<i>Rendement %</i>	<i>Couleur</i>	<i>Aspect</i>	<i>Rendement %</i>	<i>Couleur</i>
EtOH/eau 5/5 : v/v	Visqueux	13,50	Vert d'olive	Visqueux	11,50	Orange
MeOH/eau 8/2 : v/v	Visqueux	8,20	Marron claire	Visqueux	17,50	Orange
AcO/eau 7/3 : v/v	Visqueux	3,60	Marron foncé	Visqueux	4,30	Orange

Cependant, le rendement est comparable selon les deux parties feuilles et fruits, mais selon le solvant de macération l'éthanol a enregistré le rendement le plus important pour les feuilles, suivis de méthanol puis l'acétone. Alors que pour les fruits, le méthanol qui a enregistré le rendement le plus important suivis d'éthanol puis l'acétone.

III.1.1. Quantification des phénols totaux

L'analyse quantitative des phénols totaux des extraits phénoliques a été réalisée en adaptant la même procédure utilisée pour effectuer la courbe d'étalonnage (Figure 4), en remplaçant l'acide gallique par l'extrait dilué. La quantité des phénols totaux dans nos échantillons est exprimée en milligrammes par un gramme de la matière végétale sèche équivalent en acide gallique (mg EAG/g). Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux 3 et 4.

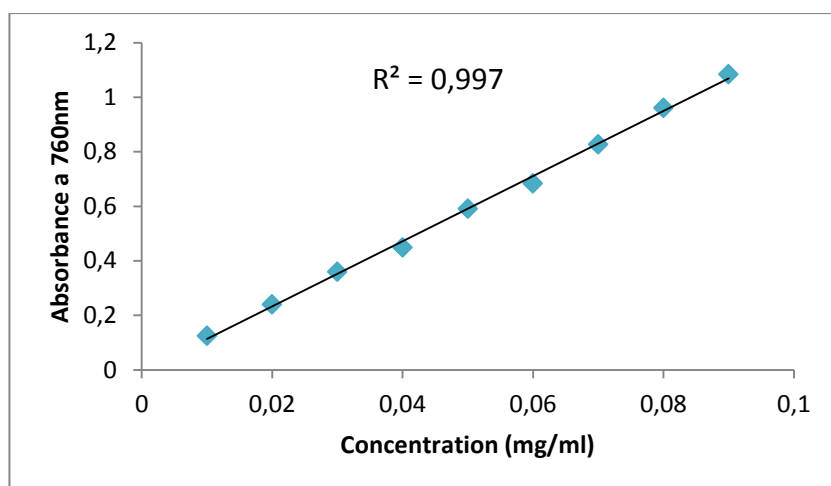


Figure 4 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Tableau 3 : Teneurs des phénols totaux dans les extraits phénoliques des fractions organiques

<i>Solvants de macération</i>	<i>Les fractions organiques</i>					
	<i>Les feuilles</i>			<i>Les fruits</i>		
	<i>EtOH/eau 5/5 : v/v</i>	<i>MeOH/eau 8/2 : v/v</i>	<i>AcO/eau 7/3 : v/v</i>	<i>EtOH/eau 5/5 : v/v</i>	<i>MeOH/eau 8/2 : v/v</i>	<i>AcO/eau 7/3 : v/v</i>
<i>Teneur en phénols totaux (mgEAG/g)</i>	207,34±0,04	182,07±0,16	173,90 ±0,06	15,86±0,13	13,55±0,25	8,09 ±0,02

Pour les deux parties de la plante *d'Arbutus unedo L* étudiée nous avons remarqué une variabilité des teneurs en phénols totaux. La teneur la plus élevée est constatée dans les feuilles, elle est de l'ordre de $207,34 \pm 0,04$ mg /g suivi par les fruits avec une teneur de $15,86 \pm 0,13$ mg /g. on remarque aussi que les extraits éthanoïques et méthanoïques ont une teneur en phénols totaux élevé que les extraits acétonoïque.

L'ensemble de ces résultats importants reflètent les données trouvées dans le tableau 2 où nous avons enregistré des rendements élevés des extraits méthanoïques et éthanoïques (essentiellement pour les feuilles) ce qui prouve la richesse de cette partie de la plante en polyphénols totaux.

Tableau 4 : Teneurs des phénols totaux dans les extraits phénoliques des fractions aqueuses

<i>Les fractions aqueuses</i>						
<i>Les feuilles</i>				<i>Les fruits</i>		
<i>Solvants de macération</i>	<i>EtOH/eau 5/5 : v/v</i>	<i>MeOH/eau 8/2 : v/v</i>	<i>AcO/eau 7/3 : v/v</i>	<i>EtOH/eau 5/5 : v/v</i>	<i>MeOH/eau 8/2 : v/v</i>	<i>AcO/eau 7/3 : v/v</i>
<i>Teneur en phénols totaux (mgEAG/g)</i>	82,41 ±0,67	163,50 ±0,48	76,31 ±0,56	7,29 ±0,05	11,54 ±0,10	13,04 ± 0,47

Les fractions aqueuses des feuilles enregistrés aussi des teneurs en polyphénols importantes par rapport aux fruits, et cela montre sa richesse en polyphénols, et qui appelle à l'étude de ces fractions sans les négliger.

III.1.2. Estimation de la teneur des flavonoïdes totaux

La teneur des flavonoïdes totaux dans nos échantillons a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage de la rutine (Figure 5).

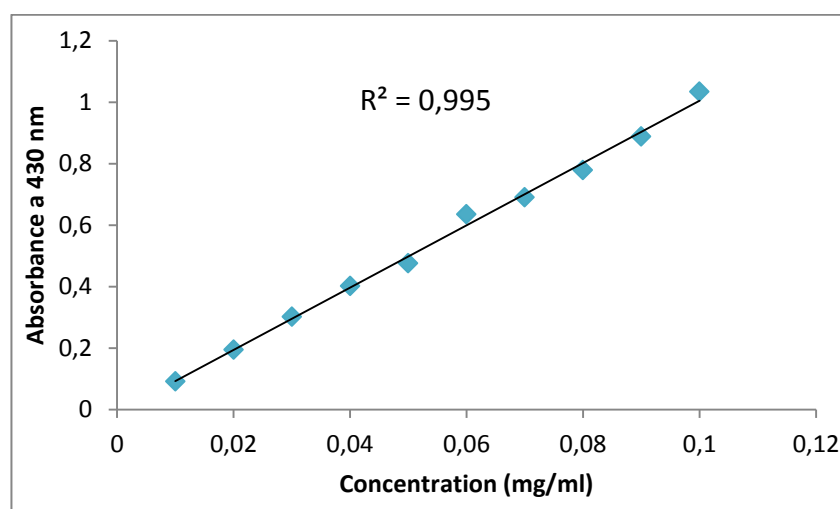


Figure 5 : Courbe d'étalonnage de la rutine

Les résultats obtenus exprimés en milligrammes par gramme de la matière sèche en équivalent de la rutine, ainsi que en flavonoïdes par rapport aux teneurs en phénols totaux, sont regroupés dans les tableaux 5 et 6.

Tableau 5 : Teneurs et pourcentages des flavonoïdes totaux des fractions organiques

<i>Les fractions organiques</i>						
	<i>Les feuilles</i>			<i>Les fruits</i>		
<i>Solvants de macération</i>	<i>EtOH/eau</i> 5/5 : v/v	<i>MeOH/eau</i> 8/2 : v/v	<i>AcO/eau</i> 7/3 : v/v	<i>EtOH/eau</i> 5/5 : v/v	<i>MeOH/eau</i> 8/2 : v/v	<i>AcO/eau</i> 7/3 : v/v
<i>Teneur en Flavonoïdes totaux (mg/g)</i>	68,46 ± 0,37	55,32 ± 0,60	56,78 ± 0,34	0,48 ± 0,02	0,40 ± 0,02	0,59 ± 0,05
<i>Pourcentage (%)</i>	33,02 ± 0,18	30,38 ± 0,31	32,65 ± 0,20	3,04 ± 0,15	2,99 ± 0,21	7,33 ± 0,67

D'après le tableau 5, nous avons observé des teneurs variables en flavonoïdes dans les deux parties feuilles et fruits, et des teneurs rapprochées selon les trois fractions organiques.

Tableau 6 : Teneurs et pourcentages des flavonoïdes totaux des fractions aqueuses

<i>Les fractions aqueuses</i>						
	<i>Les feuilles</i>			<i>Les fruits</i>		
<i>Solvants de macération</i>	<i>EtOH/eau</i> 5/5 : v/v	<i>MeOH/eau</i> 8/2 : v/v	<i>AcO/eau</i> 7/3 : v/v	<i>EtOH/eau</i> 5/5 : v/v	<i>MeOH/eau</i> 8/2 : v/v	<i>AcO/eau</i> 7/3 : v/v
<i>Teneur en Flavonoïdes totaux (mg/g)</i>	1,55 ± 0,13	2,21 ± 0,05	1,57 ± 0,26	1,21 ± 0,01	0,93 ± 0,07	0,95 ± 0,009
<i>Pourcentage (%)</i>	1,88 ± 0,16	1,35 ± 0,03	2,05 ± 0,35	16,68 ± 0,17	8,07 ± 0,70	7,32 ± 0,19

Pour les fractions aqueuses on observe des teneurs très faibles en flavonoïdes totaux pour les feuilles, En revanche les fractions aqueuses des fruits ont enregistré des teneurs en flavonoïdes totaux élevés par rapport à leurs fractions organiques.

La comparaison entre la teneur des flavonoïdes et phénols totaux dans chaque extrait, nous a permis de dire que la variation des quantités des flavonoïdes est relative à celle des phénols totaux c'est-à-dire elles varient dans le même sens, cela peut être expliqué par la

composition de chaque extrait de même types de polyphénols mais avec des quantités différentes. Si on parle des pourcentages des flavonoïdes par rapport aux teneurs en phénols totaux, ces pourcentages ne varient pas dans le même sens avec la teneur en flavonoïdes. Par conséquent, on peut conclure que la quantité de différents composés phénoliques est un caractère spécifique pour chaque partie de la plante, Elle est aussi influencée par la capacité de chaque solvant d'extraire le maximum de ces composés selon leur polarité.

III.2. Évaluation de l'activité antioxydante

III.2.1. Test de pouvoir réducteur

L'activité antioxydante des extraits de la plante étudiée a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP (Ferric reducing antioxidant power). ce test est universel et peut être appliqué aussi bien chez les plantes que les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux [16].

Au cours de ce test, Le pouvoir réducteur est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneurs d'électrons. Par conséquent, les antioxydants peuvent être considérés comme des réducteurs et in activateurs des oxydants [24].

De la fin, plus d'attention a été concentrée sur la détermination de la capacité antioxydante totale des composés en utilisant L'activité antioxydante de la vitamine C en termes d'équivalence.

Donc, à partir d'une courbe d'étalonnage de la vitamine C (Figure 6), nous avons calculé le paramètre VCEAC.

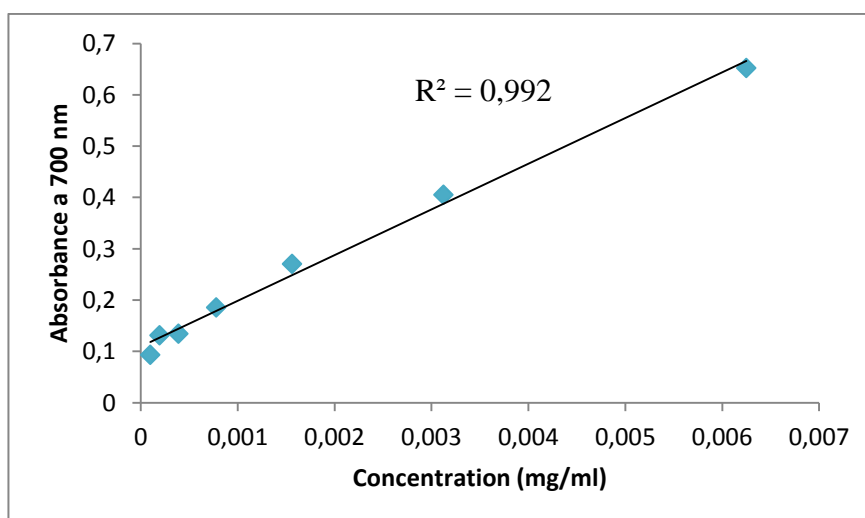


Figure 6 : Courbe d'étalonnage de la vitamine C

Le VCEAC est définie comme la capacité antioxydante équivalente à la concentration de la vitamine C (mg/mL) [25].

Nous avons évalué le pouvoir réducteur des extraits phénoliques et celui de BHA par rapport l'acide ascorbique en calculant les rapports K_i/K , tel que K_i représente les pentes des courbes des extraits et de BHA, alors que K est la pente de la courbe d'étalonnage de la vitamine C . Plus la valeur de VCEAC est importante, plus le pouvoir antioxydant des extraits est important [26].

Le tableau 7 présente le pouvoir réducteur des extraits organiques et aqueux pour les deux parties de la plante étudié. De même celle de BHA choisis comme antioxydants standard dans ce test.

Tableau 7: Valeurs de VCEAC des extraits phénoliques des deux parties de la plante étudiée et de BHA.

<i>Valeurs de VCEAC</i>						
	<i>Fractions organiques</i>			<i>Fraction aqueuses</i>		
<i>Solvants de macération</i>	<i>EtOH/eau 5/5 : v/v</i>	<i>MeOH/eau 8/2 : v/v</i>	<i>AcO/eau 7/3 : v/v</i>	<i>EtOH/eau 5/5 : v/v</i>	<i>MeOH/eau 8/2 : v/v</i>	<i>AcO/eau 7/3 : v/v</i>
<i>Les feuilles</i>	1,01 ± 0,10	0,84 ± 0,05	0,44 ± 0,01	0,15 ± 0,003	0,43 ± 0,01	0,13 ± 0,006
<i>Les fruits</i>	0,07 ± 0,006	0,05 ± 0,003	0,04 ± 0,001	0,03 ± 0,002	0,04 ± 0,001	0,05 ± 0,001
<i>BHA</i>	1,44 ± 0,04					

D'après ces valeurs, on constate que les extraits des feuilles possèdent une bonne action vis-à-vis Fe^{3+} présent dans la solution testée, et elle se rapproche beaucoup à l'action de BHA comme antioxydant synthétique, par contre les extraits des fruits enregistrés une action réductrice du Fe^{2+} très faible. Elles sont de même impuissantes par rapport aux fractions aqueuses des feuilles. Cette déférence peut être attribuée à la présence de certaines

molécules individuelles dont leurs structures ne correspondent pas aux structures phénoliques responsables de cette activité.

D'un autre côté, les valeurs VCEAC les plus élevées sont observées pour les extraits éthanoïques et méthanoïques, tandis que, les extraits acétoniques donnent un statut réducteur faible. Cependant, nous avons constaté que l'extraction par macération avec des solvants très polaires donne des résultats plus intéressants.

Afin de confirmer que l'activité antioxydante des extraits d'*Arbutus unedo L* issue de leurs richesses en composés phénoliques, nous avons essayé de trouver des corrélations linéaires entre les valeurs de capacité antioxydante VCEAC de nos extraits avec leurs contenue en polyphénols totaux et flavonoïdes totaux. (Figure7).

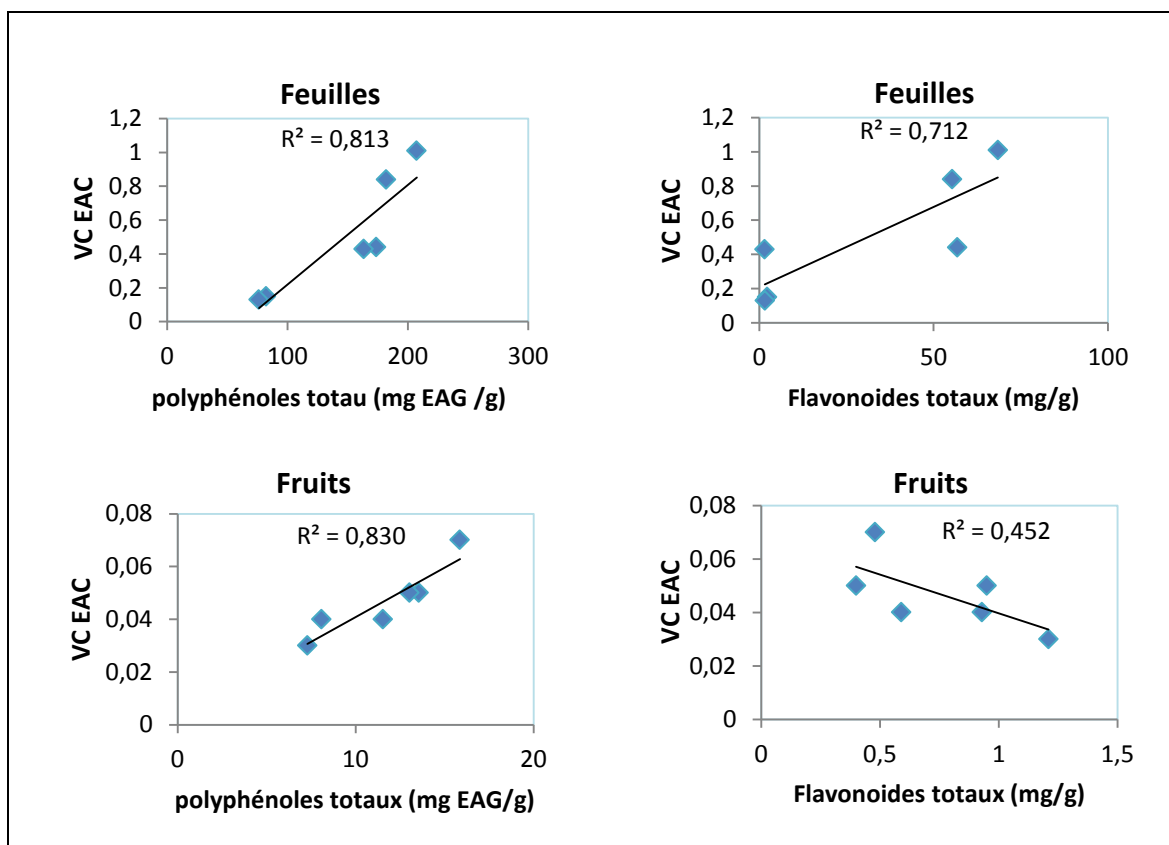


Figure 7 : Corrélations entre les valeurs de VCEAC des extraits avec leurs contenue en polyphénols totaux et flavonoïdes totaux

D'après ces tracés, une corrélation significative est observée entre la teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante de réduction du fer avec $R^2 = 0,813$ et $R^2 = 0,830$ pour les feuilles et les fruits respectivement, entre autre les corrélations entre la teneur en flavonoïdes totaux et l'activité antioxydante des feuilles et des fruits sont par ordre

$R^2 = 0,710$ et $R^2 = 0,452$. Alors cette coordinance confirme que l'activité antioxydante de réduire le fer est due principalement à la teneur élevée en polyphénols totaux dans les feuilles et les fruits. Cette activité est fortement dépendante à la présence des flavonoïdes totaux pour les feuilles, mais pour les fruits, l'explication qui peut être retenue dans la diminution du coefficient de corrélation selon les flavonoïdes, est que cette activité antioxydante est liée à la présence des autres composés telle que les alcaloïdes, les tanins ...

III.2.2. Test de DPPH

Dans notre travail nous avons étudié l'activité antioxydante des différents extraits de la plante étudiée afin de préjuger et localiser la fraction la plus active.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure exponentielle avec présence d'une phase stationnaire qui signifie la réduction presque totale du DPPH en sa forme non radicalaire. A partir de ces courbes nous pouvons calculer la valeur d'IC₅₀ de chaque extrait. Les résultats obtenus à partir de ce test sont regroupés dans des tableaux (8, 9, et 10).

III.2.2.1. Extrait méthanoïque :

L'extrait méthanoïque des feuilles a montré un pouvoir de piégeage du radical DPPH[•] plus important par rapport à l'extrait méthanoïque des fruits, ceci est démontré par l'allure des graphes qui trace une courbe exponentielle avec la présence d'une phase stationnaire qui définit la réduction presque totale du DPPH[•] en sa forme non radicalaire (Figure 8).

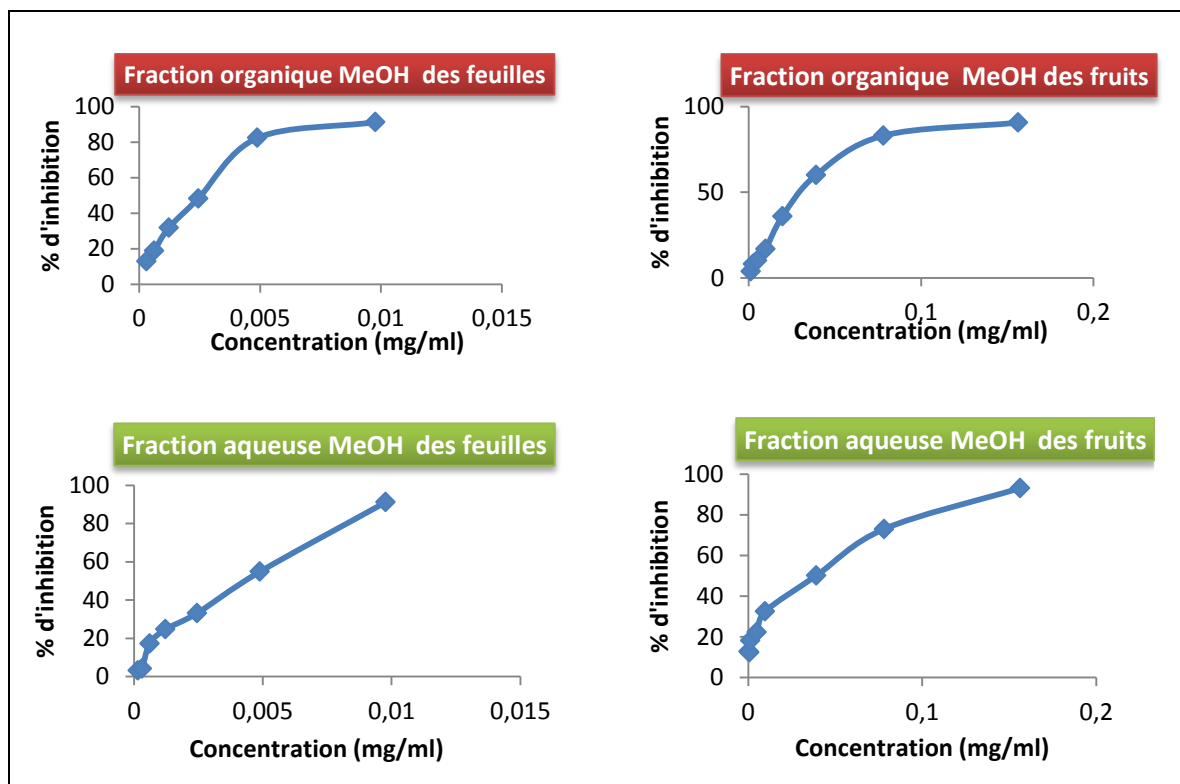


Figure 8 : % $I_{DPPH} = f(C)$ pour les extraits méthanoïques et ces fraction aqueuses des deux parties étudiées d'*ArbutusUnedo. L*

Le tableau suivant présente les valeurs des IC_{50} trouvées pour les extraits méthanoïques des deux parties de la plante comparé à la vitamine C et BHA comme standards.

Tableau 8 : Valeurs des IC_{50} trouvées pour les extraits méthanoïques des deux parties de la plante

	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	
	<i>Les feuilles</i>	<i>Les fruits</i>
Fraction organique	$2,55 \pm 0,10$	$32,07 \pm 0,42$
Fraction aqueuse	$4,46 \pm 0,07$	$44,23 \pm 0,24$
Vitamine C	$0,15 \pm 0,004$	
BHA	$1,68 \pm 0,65$	

Les valeurs de IC₅₀% sont de l'ordre de 2,55µg/ml et de 32,07 µg/ml pour l'extrait méthanoïque des feuilles et des fruits respectivement, et pour les fractions aqueuses, la fraction des feuilles a enregistré un IC₅₀% = 4,46 µg/ml suivit par la fraction des fruits avec un IC₅₀% = 44,23 µg/ml.

On comparant ces valeurs obtenues par les extraits phénoliques avec les standards, BHA et la vitamine C, on trouve que ces extraits ont une activité anti radicalaire puissante mais ils sont moins actifs que la vitamine C (la plus puissante).

III.2.2.2. Extrait éthanoïque :

La fraction éthanoïque des feuilles a montré une activité très élevée de piégeage du radical DPPH[•] par rapport à l'extrait brut des fruits. L'inhibition du DPPH[•] est presque complète à partir de faible concentration. Cela est confirmé par l'allure du graphe qui assure la présence d'une phase stationnaire (Annexe 3).

Le tableau suivant présente les valeurs des IC₅₀ trouvées pour les extraits éthanoïques des deux parties de la plante comparé à la vitamine C et BHA comme standards.

Tableau 9 : Valeurs des IC₅₀ trouvées pour les extraits éthanoïques des deux parties de la plante

	<i>IC₅₀ (µg/ml)</i>	
	<i>Les feuilles</i>	<i>Les fruits</i>
Fraction organique	2,10 ± 0,29	43,41 ± 0,42
Fraction aqueuse	13,10 ± 0,12	76,36 ± 0,27
Vitamine C	0,15 ± 0,004	
BHA	1,68 ± 0,65	

Pour les fractions éthanoïque, le meilleur résultat obtenu est celui de la fraction éthanoïque des feuilles qui a donné un IC₅₀ = 2,10 µg/ml. En ce qui concerne la fraction éthanoïque des fruits et les deux fractions aqueuses (feuilles et fruits) nous constatons une activité faible. Malgré que l'activité des extraits éthanoïques soit inférieure à celle des standards, on peut dire que les feuilles possèdent une excellente activité anti radicalaire.

III.2.2.3. Extrait acétonoïque:

L'extrait acétonoïque des feuilles a montré une activité de piégeage du radical DPPH[•] intéressante par rapport aux fruits, ceci est démontré par l'allure du graphe qui trace une courbe exponentielle avec la présence d'une phase stationnaire qui définit la réduction presque totale du DPPH[•] en sa forme non radicalaire (Annexe 3).

Tableau 10 : Valeurs des IC₅₀ trouvées pour les extraits acétonoïques des deux parties de la plante

	<i>IC₅₀ (µg/ml)</i>	
	<i>Les feuilles</i>	<i>Les fruits</i>
Fraction organique	4,81 ± 0,47	55,19 ± 0,20
Fraction aqueuse	12,65 ± 0,43	38,46 ± 0,37
Vitamine C	0,15 ± 0,004	
BHA	1,68 ± 0,65	

Les valeurs d'IC₅₀ sont de l'ordre de 4,81µg/ml et de 55,19 µg/ml pour l'extrait acétonoïque des feuilles et des fruits respectivement.

Pour la fraction aqueuse acétonoïque des fruits, les résultats obtenus révèlent une activité plus puissante que la fraction organique avec un IC₅₀ = 38,46µg/ml.

En analysant l'ensemble des résultats obtenus et sachant que le paramètre IC₅₀ est inversement proportionnel à l'activité antioxydante, on peut constater que le pouvoir anti radicalaire des extraits phénoliques des feuilles est plus important que celle des fruits et que les extraits des fractions éthanoïques et méthanoïques ont un pouvoir anti radicalaire important par rapport au extraits acétonoïques. Ceci confirme les résultats obtenus précédemment par le test de pouvoir réducteur de fer.

On Comparant ces valeurs obtenus par les extraits phénoliques avec les standard, BHA et la vitamine C, on trouve que ces extraits ont une activité anti radicalaire importante mais ils sont moins actif que la vitamine C qui reste la plus puissante par un IC₅₀ = 0,15 µg/ml.

Nous avons essayé de trouver une corrélation linéaire entre la présence des composés phénoliques et l'activité antiradicalaire DPPH de nos extraits et une corrélation entre les deux tests *in vitro* FRAP et DPPH (Figure 9 et 10).

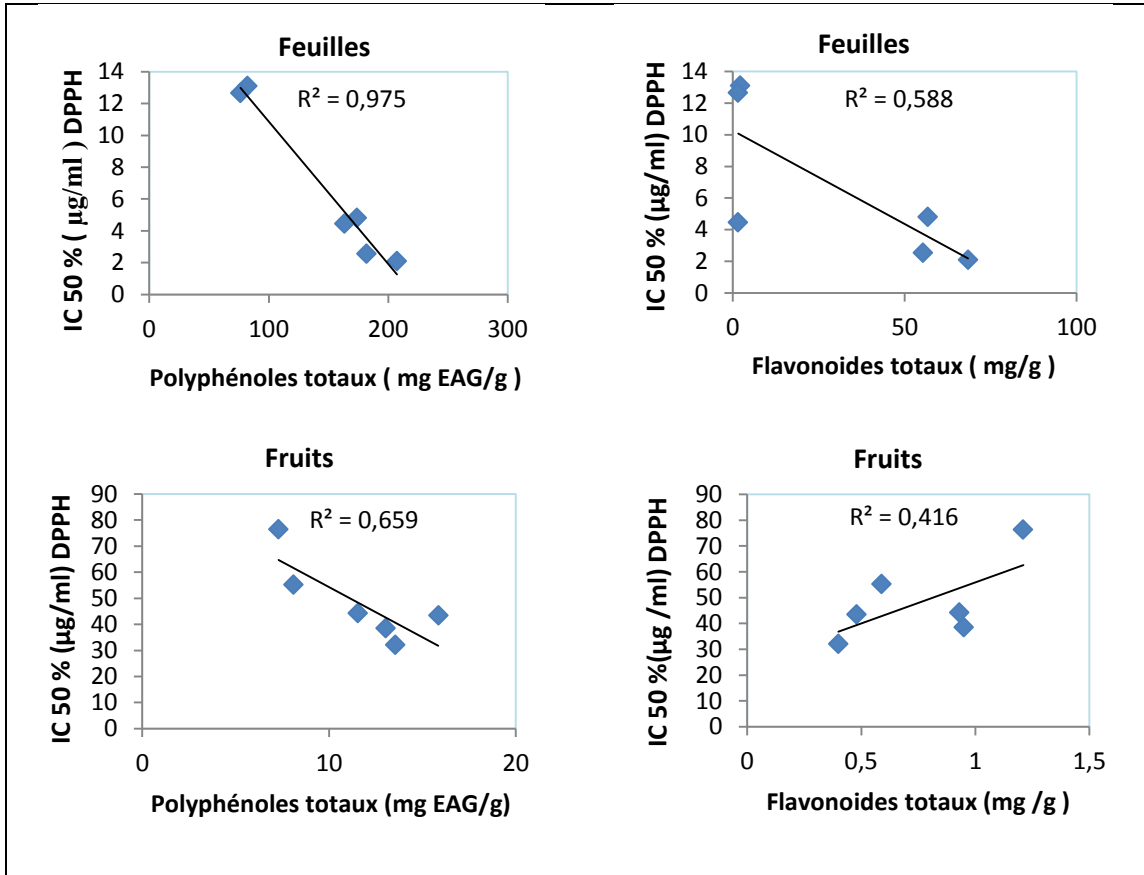


Figure 9 : Corrélations entre les valeurs IC₅₀ des extraits avec leurs contenu en polyphénols totaux et flavonoïdes totaux

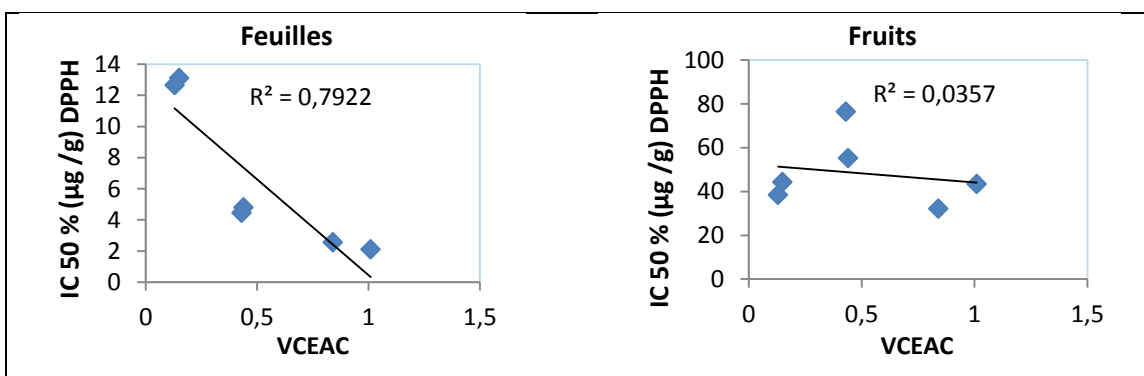


Figure 10 : Corrélation entre la capacité antiradicalaire DPPH et l'antioxydante FRAP

D'après ces tracés, une corrélation significative est observée entre la teneur en polyphénols totaux contenu dans les extraits des deux parties de la plante étudiées (feuilles et fruits) et l'activité antiradicalaire, mesurée par la méthode du test DPPH, ceci indique que le piégeage des radicaux libres est due à la présence des polyphénols totaux mais pas forcément les flavonoïdes, ces derniers ont enregistré des coefficients de corrélation faibles vis-à-vis le radical DPPH.

Si nous prenons en compte la corrélation entre l'activité antiradicalaire DPPH et l'activité antioxydante FRAP, on remarque qu'il y a une bonne convenance entre les deux méthodes pour les feuilles $R^2 = 0,79$, par contre aucune corrélation est remarquable pour les fruits cela peut être expliqué comme suit : les composés phénoliques responsables au pouvoir réducteur sont différents au composés phénolique piégeant des radicaux libres. De plus les fruits renferment certaines molécules comme les sucres qui peuvent être pris en considération dans l'activité antiradicalaire.

III.2.3. Test d'ABTS

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique $ABTS^{\bullet+}$ de coloration bleu-verte en le transformant en $ABTS^+$ incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxydant.

Nous avons déterminé pour chaque extrait le pourcentage d'inhibition de l' $ABTS^{\bullet+}$

Calculé selon la formule ci-dessous :

$$I\% = \left[\frac{A_0 - A_S}{A_0} \right] * 100$$

A_0 : est l'absorbance de la solution ABTS.

A_S : est l'absorbance de l'extrait de l'échantillon lorsque la solution a été ajoutée.

Une comparaison est faite avec la capacité du Trolox à capturer ABTS. Cette dernière est exprimée en équivalent Trolox (TEAC), le TEAC est égale à la concentration millimolaire d'une solution de Trolox ayant la capacité équivalente d'antioxydant à une solution de 1mM de la substance à étudiée. Tel qu'il est utilisé par Rice-Evans et Miller (1997), le TEAC reflète la capacité relative d'un antioxydant donneur d'hydrogène pour piéger le radical cation ABTS comparée à celle du Trolox [27] .

La droite $\% I = f(C)$ est tracée pour chaque extrait afin de déterminer le TEAC. La pente de cette droite est extraite et rapportée à la pente de la droite de référence du Trolox

(Figure11). Ainsi, toutes les valeurs supérieures à un indiquent une grande capacité de ces composés [28] .

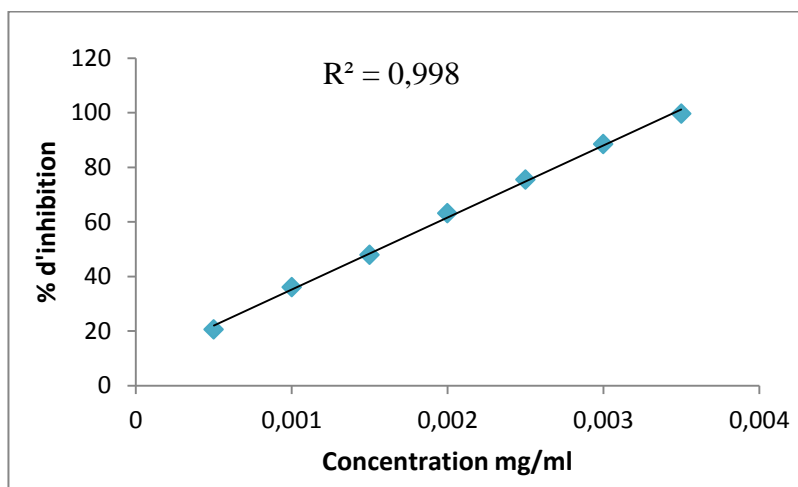


Figure 11 : Courbe d'étalonnage de Trolox

Le tableau suivant présente le pouvoir anti radicalaire (TEAC) des extraits organiques et aqueux pour les deux parties de la plante étudiée. De même, celle de vitamine C, choisis comme antioxydants standard dans ce test.

Tableau 11: Valeurs de TEAC des extraits phénoliques des deux parties de la plante étudiée, et de vitamine C

<i>Solvants de macération</i>	<i>Valeurs de TEAC</i>					
	<i>Fractions organiques</i>			<i>Fraction aqueuses</i>		
	<i>EtOH/eau 5/5 : v/v</i>	<i>MeOH/eau 8/2 : v/v</i>	<i>AcO/eau 7/3 : v/v</i>	<i>EtOH/eau 5/5 : v/v</i>	<i>MeOH/eau 8/2 : v/v</i>	<i>AcO/eau 7/3 : v/v</i>
<i>Les feuilles</i>	0,44± 0,04	0,38± 0,01	0,34 ± 0,01	0,15 ± 0,001	0,34 ± 0,004	0,13 ± 0,004
<i>Les fruits</i>	0,05 ± 0,001	0,06 ± 0,006	0,01 ± 0,006	0,03 ± 0,001	0,05 ± 0,001	0,07 ± 0,003
<i>Vitamine C</i>	0,82 ± 0,04					

À la lumière de ces résultats, une étude comparative par la méthode TEAC indique que les feuilles possèdent une activité anti radicalaire supérieure que les fruits. Ceci est en accord avec leur haute teneur phénolique.

D'un autre coté les valeurs TEAC les plus importantes sont enregistrées par les extraits éthanoïques et méthanoïques, Ceci montre le fort potentiel des solvants polaires à extraire le maximum des composés phénoliques, ces derniers sont les responsables de piégé le radical cation $ABTS^{\bullet+}$ en donnant des protons H^+ .

On comparant ces résultats avec celle obtenue par de la vitamine C, on trouve que nos extraits sont moins actif que la vitamine C qui possède une action anti radicalaire puissante (TEAC = 0,82).

La différence d'activité antioxydante observée entre nos extraits et le standard utilisé, pourra être expliquée par le fait que l'antioxydant de référence est un agent pur qui peut agir directement et avec leur concentration totale sur la réaction radicalaire.

Par contre, les extraits testés sont des mélanges qui renferment plusieurs molécules dont certaines sont inactives et leurs actions antiradicalair sont été mesurées par rapport à la concentration totale du mélange qui prend en considération toutes les substances actives et non actives. Egaleme nt nous avons représenté l'activité antiradicalaire mesurée par la méthode TEAC en fonction de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux de plus nous avons cherché la présence d'une corrélation linéaire entre les deux tests *in vitro* FRAP et ABTS (Figure 12 et 13).

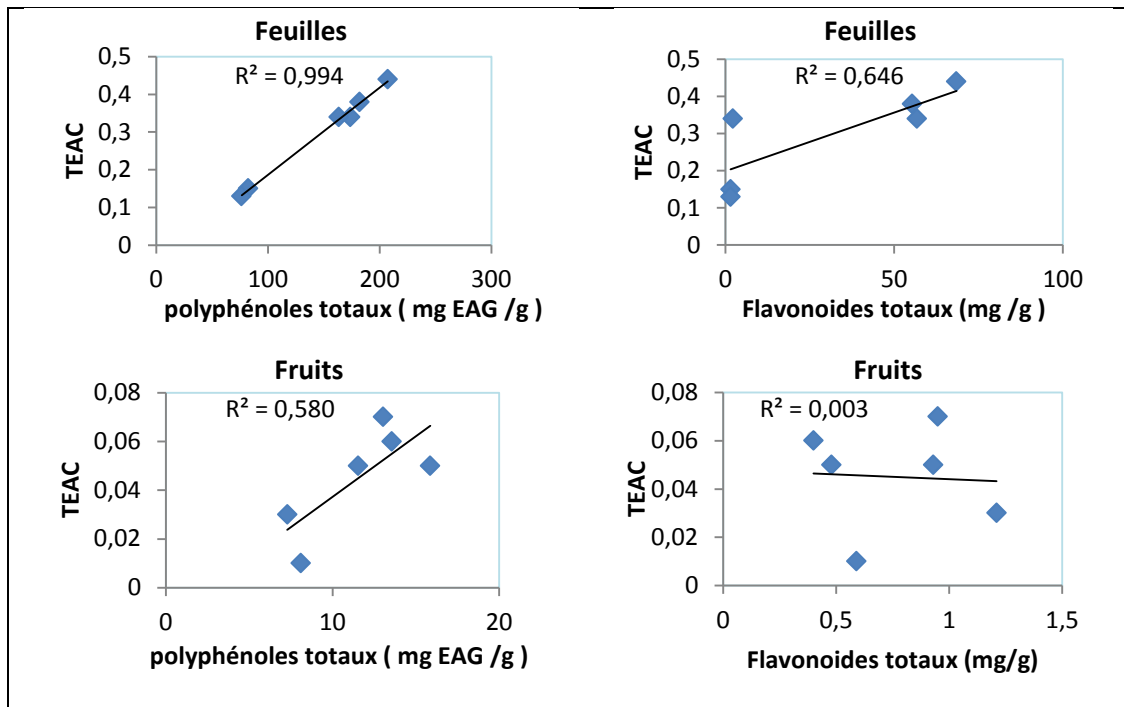


Figure 12 : Corrélations entre les valeurs TEAC des extraits avec leurs contenu en polyphénols totaux et flavonoïdes totaux.

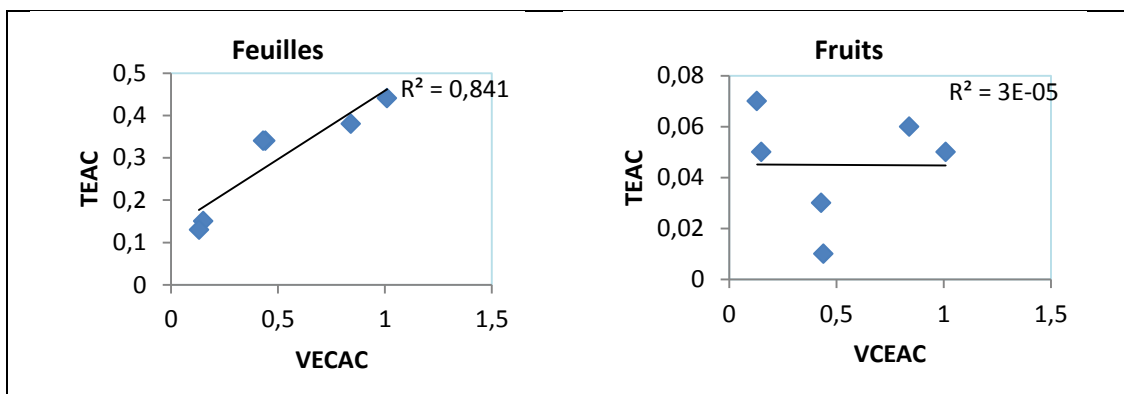


Figure 13 : Corrélation entre la capacité antiradicalaire ABTS et l'antioxydante FRAP.

D'après ces tracés des corrélations obtenus des deux parties de l'Arbousier, on remarque qu'il y a une forte corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et l'activité anti radicalaire mesuré par la méthode TEAC pour les extrais des feuilles, avec un coefficient $R^2 = 0,99$ et il est clair que cette activité ne due pas principalement à la présence des flavonoïdes. En revanche la corrélation en fonction des polyphénols des extrais des fruits est très faible. Et elle est nulle en fonction des teneurs en flavonoïdes.

La Mise en évidence des corrélations entre la méthode ABTS et FRAP, indique qu'il y a une proportion directe entre ces deux méthodes selon les feuilles $R^2 = 0,84$, mais selon les

fruits cette corrélation est presque nul .Ceci indique que les feuilles possèdent des composés phénoliques (flavonoïdes) adaptés à l'action antioxydante et antiradicalaire, simultanément, par contre les fruits manquant ces composés.

IV. Conclusion générale

Ce travail est basé sur l'étude comparative des différentes parties d'arbousier (feuilles et fruits) de région ouest algérien, on fonction d'extraction par macération on utilisant des systèmes de solvants a des polarités différentes afin de déterminer le pouvoir antioxydant de chaque extrait.

L'extraction des composés polyphénoliques est une étape cruciale pour la valorisation de ces principes actifs, elle dépend du solvant approprié qui préservent leurs propriétés biologiques.

L'extraction des composés phénoliques des différentes parties de la plante a été effectuée par une macération dans des mélanges hydro alcooliques. De cette étude, il ressort que la macération par EtOH/eau (5/5) et par MeOH/eau (8/2) sont les meilleures techniques d'extraction des polyphénols totaux.

Quantitativement, l'évaluation du contenu des polyphénols totaux en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu révèle la présence des quantités importantes en polyphénols. Dont le rendement le plus remarquable est celui d'extrait éthanolique des feuilles ($207,34 \pm 0,04$ mg EAG/g).

De même nous avons dosé les flavonoïdes par la méthode d' $AlCl_3$ qui nous mène à conclure que cette plante contient une quantité considérable de flavonoïdes surtout pour feuilles.

Concernant l'activité antioxydante, nous avons étudié le pouvoir antioxydant de tous les extraits des deux parties de la plante par trois tests : l'estimation du pouvoir réducteur de fer, l'analyse par le radical stable DPPH \cdot et le radical cationique ABTS $^{+\cdot}$.

Nous avons constaté pour l'activité antioxydante par la méthode FRAP, que les extraits des feuilles ont une capacité de réduire le fer très importante par rapport aux fruits et qui augmente en fonction de la concentration.

Cependant, pour le piégeage du radical libre DPPH \cdot et en comparant les IC_{50} des différents extraits testés par rapport à celle de l'acide ascorbique, nous avons remarqué une activité antiradicalaire très importante des fractions organiques des feuilles comparativement à les fruits et essentiellement la fraction éthanolique ($IC_{50} = 2,10 \pm 0,29$ mg/ml) mais elle est inférieure à la capacité du piégeage du radical DPPH \cdot de la vitamine C ($IC_{50} = 0,15 \pm 0,004$ mg/ml). Il en est de même pour les fractions aqueuses des feuilles, qui représentent une activité antiradicalaire presque similaire et intéressante.

Pour le test à l'ABTS, les feuilles montrent des valeurs très importantes par rapport aux fruits.

D'après tous les tracés de corrélation obtenus des différentes fractions organiques et aqueuses des deux parties étudiées, on conclut qu'il y a une forte corrélation entre les trois tests antioxydants pour les feuilles ce qui confirme les propriétés puissantes que possèdent les polyphénols à réduire le fer et à piéger les radicaux libres. Entre autre, les composés phénoliques des fruits possèdent une forte action réductrice et une faible action antiradicalaire.

Selon les résultats obtenus dans cette étude, il est indiqué clairement que les extraits de *l'Arbutuse unedo* ont de bonnes activités antioxydante et capacité de piégeage des radicaux libres pour les différents systèmes antioxydants *in vitro*, en particulier l'extrait phénoliques des feuilles. Cette analyse trouve une importante application dans l'industrie pharmaceutique comme elle peut trouver aussi une application dans l'industrie alimentaire.

Références bibliographiques

- [1] L. Messai, Etude phytochimique d'une plante medicinale de l'est algerien (artemisia herba alba), Mémoire de Doctorat, Université Mentouri Constantine, 2011.
- [2] A. Gurib-Fakim, Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow, *Molecular Aspects of Medicine.*, vol. 27, pp. 1–93, 2006.
- [3] É. Bertin, Les polyphénols, des actions bien au-delà du resvératrol et des effets anti-oxydants!, *Cahier de Nutrition et de diététique.*, vol. 49, no. 4, pp. 139–140, 2014.
- [4] M. Edeas, Les polyphénols et les polyphénols de thé, *Phytotherapie*, vol. 5, pp. 264–270, 2007.
- [5] J. Bouayed, H. Rammal, C. Younos, A. Dicko, and R. Soulimani, Caractérisation et bioévaluation des polyphénols: Nouveaux domaines d'application en santé et nutrition, *Phytotherapie*, vol. 6, pp. 71–74, 2008.
- [6] T. Hennebelle, S. Sahpaz, and F. Bailleul, Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif, *Phytothérapie*, vol. 2, pp. 3–6, 2004.
- [7] T. K. Lim, Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants, *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*, vol. 2, pp. 867–878, 2012.
- [8] M. Miguel, M. Faleiro, A. Guerreiro, and M. Antunes, Arbutus unedo L.: Chemical and Biological Properties, *Molecules*, vol. 19, pp. 15799–15823, 2014.
- [9] J.S. Peterson, Arbutus unedo L. Strawberry tree , Plants , Natural Resources Conservation Service, 2015.
- [10] P. Quézel and S. Santa, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, *Volume 2*. Éditions du Centre national de la Recherche scientifique, , p. 1170, 1962.
- [11] V. L. Singleton and J. A. Rossi, Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 16, no. 3, pp. 144–158, Jan. 1965.
- [12] N. Boizot and J.-P. Charpentier, Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d ' un arbre forestier, *Le Cahier de Technique de l'Inra*, pp. 79–82, 2006.

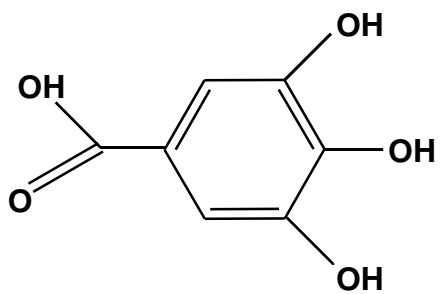
- [13] M. Dahmouni, M. Lahbib, B. Jamâa, and G. Mabrouk, Relation entre les chenilles d'*Orgyia trigotephras* (Lepidoptera ,Lymantriidae), insecte polyphage ravageur du chêne-liège , et ses plantes hôtes en Tunisie, *IOBC/wprs Bulletin*, vol. 76, pp. 271–278, 2012.
- [14] A. Basli, M. Chibane, K. Madani, and N. Oukil, Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum glandulosum* Desf., *Phytotherapie*, vol. 10, pp. 2–9, 2012.
- [15] A. Manallah, Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L, Mémoire de Magister, Université Ferhat Abbas. Setif, 2012.
- [16] N. Bougandoura, N. Bendimerad, Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp . *Nepeta* (L.) Briq , *Nature & Technologie. B- Sci. Agron. Biol.*, vol. 9, pp. 14–19, 2013.
- [17] C. Sarikurkcü, Antioxidant activities of solvent extracts from endemic *Cyclamen mirabile* Hildebr. tubers and leaves, *African journal of biotechnology*, vol. 10, no. 5, pp. 831–839, 2011.
- [18] A. Beldjord, Évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles d'*Ammoides Verticillata* de la région de Tlemcen, Mémoire de Master, Université Abou Bekr Bel kaid. Tlemcen, 2014.
- [19] F. Otmani, Étude de l'activité antioxydante des huiles essentielles d'*haloxyylon scoparium* pomel de la région de Naâma. Mémoire de Master. Université Abou Bekr Bel kaid. Tlemcen, 2014.
- [20] I. Oliveira, V. Coelho, R. Baltasar, J. A. Pereira, and P. Baptista, Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals, *Food Chem. Toxicol.*, vol. 47, no. 7, pp. 1507–1511, 2009.
- [21] J. Sochor, M. Ryvolova, O. Krystofova, P. Salas, J. Hubalek, V. Adam, L. Trnkova, L. Havel, M. Beklova, J. Zehnalek, I. Provaznik, and R. Kizek, Fully automated spectrometric protocols for determination of antioxidant activity: Advantages and disadvantages, *Molecules*, vol. 15, no. October, pp. 8618–8640, 2010.
- [22] A. Zulueta, M. J. Esteve, and A. Frígola, ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products, *Food Chem.*, vol. 114, no. 1, pp. 310–316, 2009.
- [23] D.O. Kim, S.W. Jeong, and C.Y. Lee, Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums, *Food Chem.*, vol. 81, pp. 321–326, 2003.
- [24] N. Prasad, B. Yang, K. W. Kong, H. E. Khoo, J. Sun, A. Azlan, A. Ismail, and Z. Bin Romli, Phytochemicals and antioxidant capacity from *Nypa fruticans* Wurmb. Fruit, *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2013, 2013.

- [25] M. Filipović, Z. Marković, J. Đorović, J. D. Marković, B. Lučić, and D. Amić, QSAR of the free radical scavenging potency of selected hydroxybenzoic acids and simple phenolics, *Comptes Rendus Chim.*, vol. 18, pp. 492–498, 2015.
- [26] A. Abdelrazag, Etude phytochimique et activité biologique de la plante *Limoniastrum guyonianum*, Mémoire de Magister, Université Kasdi Merbah. Ouargla, 2013.
- [27] M. Antolovich, P. D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, and K. Robards, Methods for testing antioxidant activity, *Analyst*, vol. 127, pp. 183–198, 2002.
- [28] K. Schlesier, M. Harwat, V. Böhm, and R. Bitsch, Assessment of Antioxidant Activity by Using Different In Vitro Methods, *Free Radic. Res.*, vol. 36, no. 2, pp. 177–187, Jan. 2002.

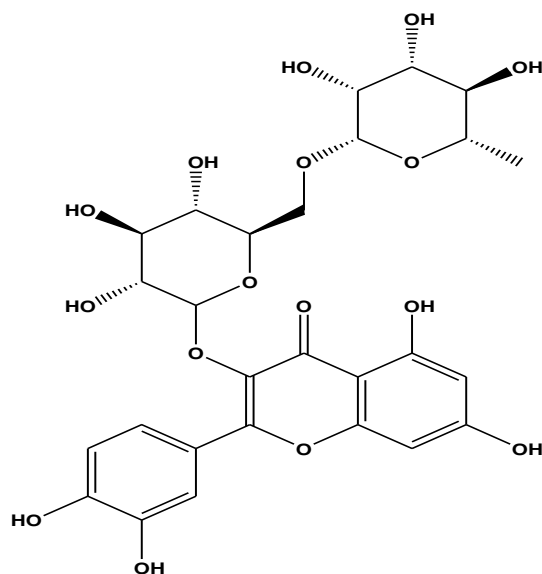
Annexe 1 : Réactifs utilisé dans ce travail

<i>Produits</i>	<i>Marque</i>
Carbonate de sodium	
Sodium dihydrogeanorthophosphate	
Di-Sodium hydrogenphosphat	BIOCHEM
Acide gallique	
Acide ascorbique	
Methanol absolue	
Ethanol absolue 99,8%	
Acetone	
Rutine	SIGMA-ALDRICH
DPPH : 2,2-diphenyl-1- picrylhydrazyl	
BHA	
ABTS	
Hexane	
Reactif de follin Ciocalteu	PROLABO
Acétate d'éthyle	
chlorure de fer(III)	RIEDEL-DE HAËN®
Persulfat de potassium	
trichlorure d'aluminium hydraté	MERCK
Ferricyanure de potassium	LABORATORY REAGENTS
Acide trichloracétique TCA	
Trolox	FLUKA

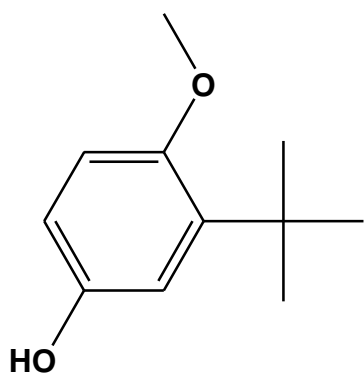
Annexe 2 : Structure des réactifs utilisés dans ce travail



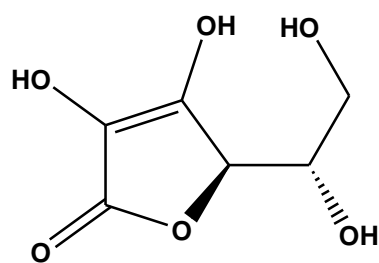
Acide gallique



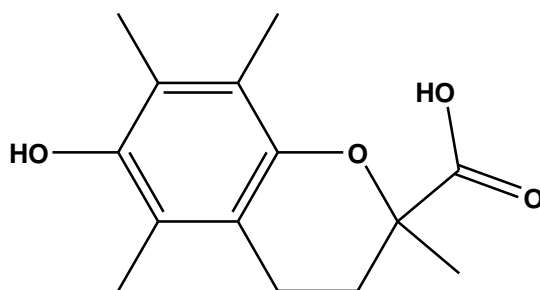
Rutine



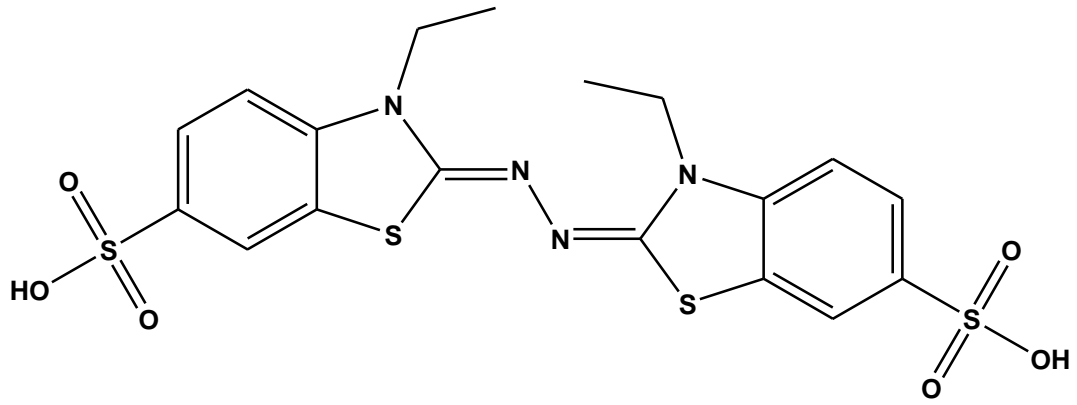
BHA



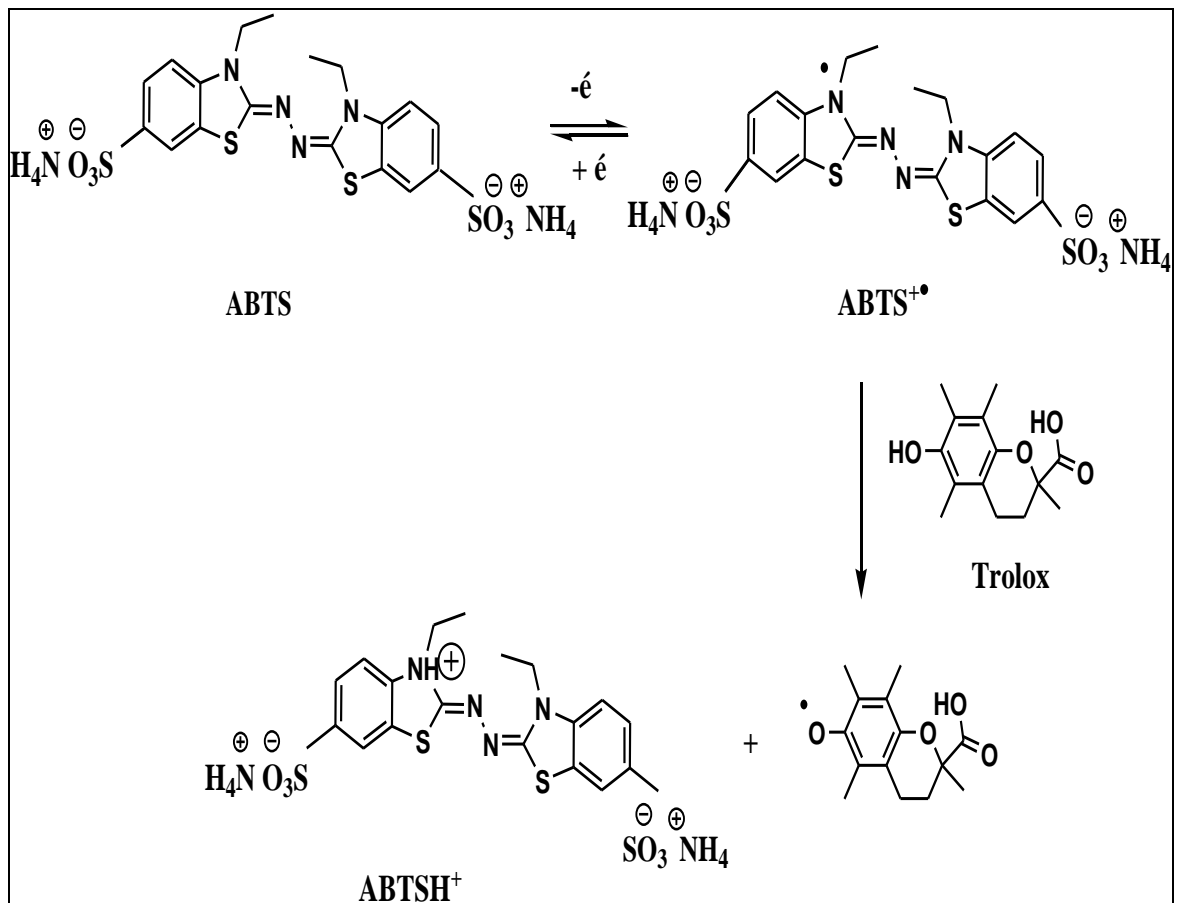
Acide ascorbique



Trolox

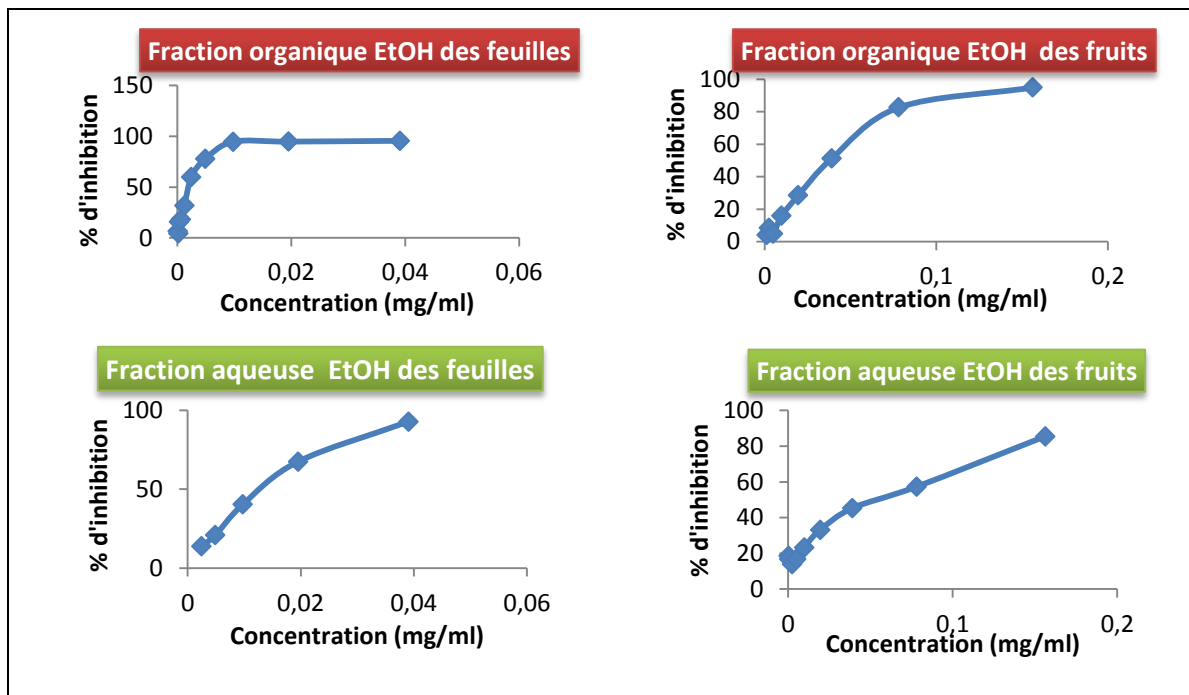


ABTS

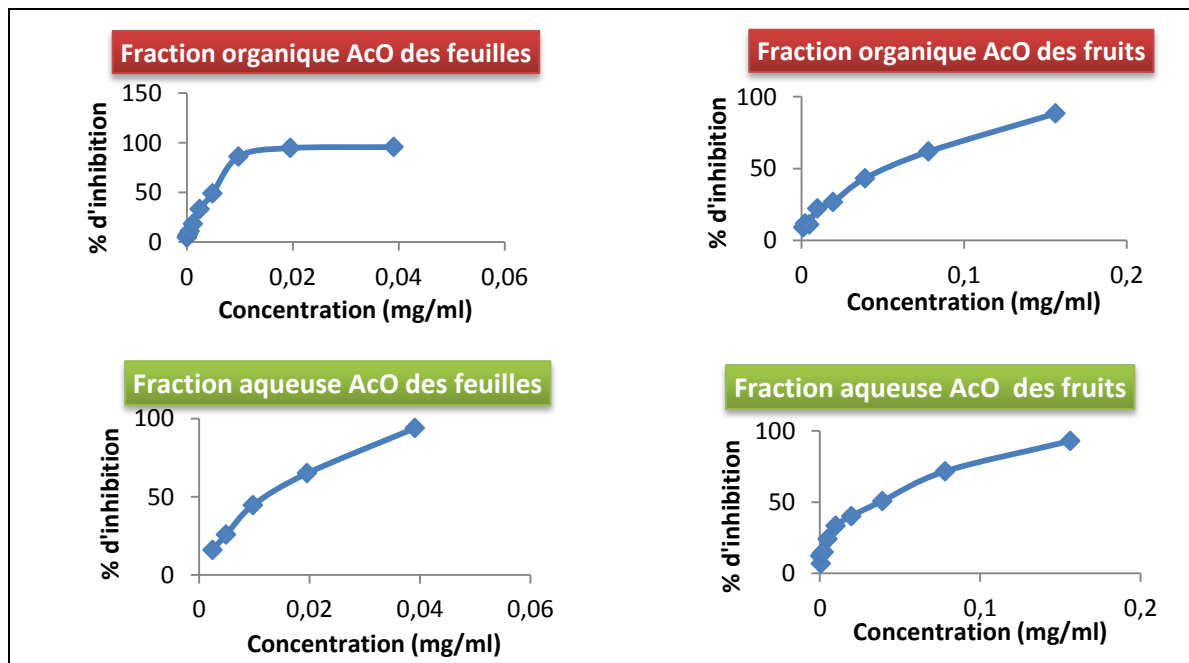


Formation et piégeage du radical ABTS^{•+} par un antioxydant donneur de H[•]

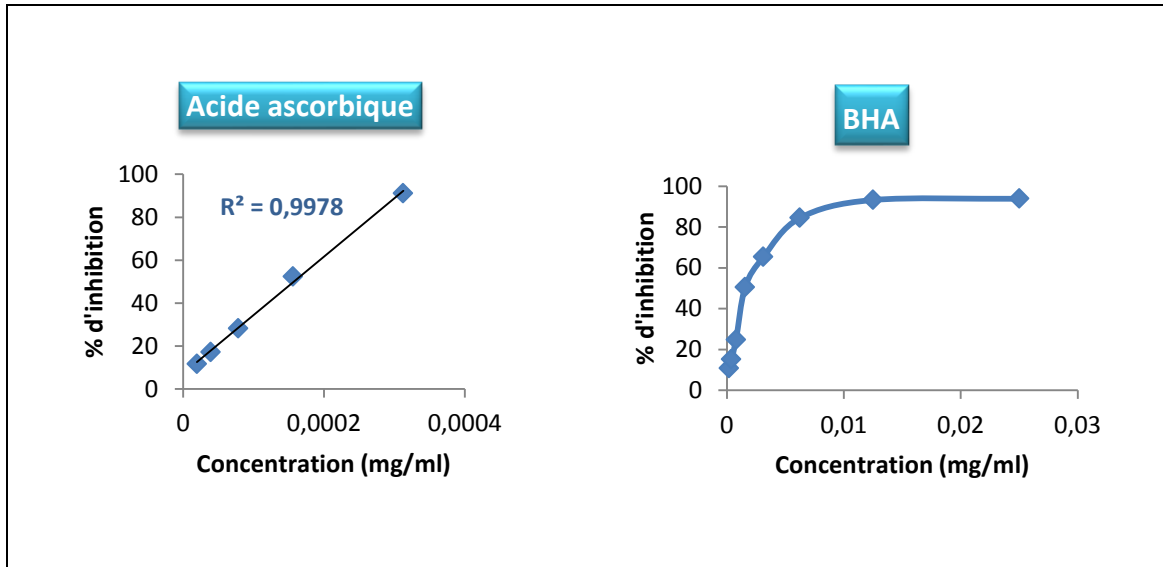
Annexe 3 : Activité antioxydante des différents extraits mesurés par le test du DPPH



% I_{DPPH} = f (C) pour les extraits éthanoïques et ces fractions aqueuses des deux parties étudiées d'*Arbutus Unidro .L*



% inh_{DPPH} = f (C) pour les extraits acetoniques et ces fraction aqueuses des deux parties étudiées d'*Arbutus Unidro.L*



Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH[•] en fonction des différentes Concentrations utilisées pour la vitamine C et le BHA

Résumé

Dans le cadre des études portant sur la recherche d'antioxydants naturels, la présente étude a été effectuée sur une plante médicinale de la région de l'ouest Algérien: *Arbutus unedo* L. et cela dans le but d'évaluer l'activité antioxydante de leurs composés phénolique.

Nous avons fait une comparaison entre le contenu de polyphénols totaux, les concentrations de flavonoïdes et l'activité antioxydante des trois fractions différentes (méthanoïque, éthanoïque, acétonoïque) des parties aériennes d'*Arbutus unedo* : feuilles et fruits. De cette étude, il ressort que la macération par EtOH/eau (5/5) et par MeOH (8/2) sont les meilleures techniques d'extraction des polyphénols totaux. L'estimation quantitative des phénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu et les flavonoïdes par la méthode d' $AlCl_3$ a montré la richesse des feuilles d'Arbousier aux phénols totaux et flavonoïdes par rapport aux fruits. L'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée par trois méthodes : la réduction du fer, le piégeage du radical libre DPPH et le piégeage du radical cation ABTS⁺⁺. L'extrait éthanoïque des feuilles a montré le potentiel antioxydant le plus élevé selon les trois tests *in vitro*. Les résultats mettent en évidence que l'extrait des feuilles a manifesté une action adaptée à réduire le fer et a piégé les radicaux libre simultanément. En revanche l'extrait des fruits a présenté une faible action antiradicalaire.

Mots-clés: Arbousiers, activité antioxydante, phénols, flavonoïdes, FRAP, DPPH, ABTS.

Abstract

As part of studies on the search for natural antioxidants, the present study was carried out on medicinal plants of the area of the Algerian west: *Arbutus unedo* L. and that with an aim of evaluating the antioxydant activity of their compounds phenolic. We made a comparison between the total polyphenol contents, the concentrations of flavonoïdes and the antioxydant activity of the three fractions different (methanoic, ethanoic, acetoic) from the air parts of *Arbutus unedo* L: sheets and fruits. From this study, it comes out that maceration by EtOH/water (5/5) and by MeOH/water (8/2) are the best techniques of extraction of total polyphenols. The quantitative estimate of total phenols by the method of Folin-Ciocalteu and the flavonoïdes by the method of $AlCl_3$ showed the richness of the sheets of *Arbutus* in total phenols and flavonoïdes compared to the fruits. The antioxydant activity of the various extracts was evaluated by three methods: Ferric reducing antioxidant power, trapping of free radical DPPH and trapping of the radical cation ABTS⁺⁺. The éthanoïque extract of the sheets showed the highest potential antioxydant according to the three *in vitro* tests. The results highlight that the extract of the sheets expressed an action adapted to reduce iron and trapped the radicals free simultaneously. On the other hand the extract of the fruits presented a weak action antiradicalaire

Key words : *Arbutus*, antioxydant activity, phenols, flavonoïdes, FRAP, DPPH, ABTS.

ملخص

في إطار الدراسات حول البحث عن المواد المضادة للاكسدة الطبيعية، أجريت هذه الدراسة على نبتة طبية من منطقة غرب الجزائر : *Arbutus unedo* L. وذلك من أجل تقييم النشاط المضاد للأكسدة لمركبات الفينول الخاصة بها. لقد قمنا بإجراء مقارنة بين محتوى إجمالي البوليفينول، وتركيزات مركبات الفلافونويد والنشاط المضاد للأكسدة من ثلاثة مستخلصات مختلفة (ميثانولية، إيثانولية، و أسيتونية) للأجزاء الهوائية لشجرة القطلب : الأوراق و الثمار. من خلال هذه الدراسة، تبين أن عملية النقع مع EtOH/eau (5/5) و MeOH/eau (8/2) هي أفضل التقنيات لاستخراج إجمالي البوليفينول. أظهر التقدير الكمي من إجمالي الفينولات بطريقة Follin-Ciocalteu ومجموع الفلافونيدات من خلال طريقة $AlCl_3$ ثروة أوراق القطلب إلى إجمالي الفينولات والفلافونيدات الكلية بالمقارنة مع الفواكه. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات المختلفة من خلال ثلاث طرق: ارجاع الحديد، تثبيط الجذور الحرة DPPH و تثبيط الجذر الأيوني الموجب ABTS⁺⁺. أظهر مستخلص الايثانول من الأوراق اعلى امكانية مضادة للاكسدة في الاختبارات الثلاثة. وبينت النتائج أن مستخلصات الأوراق تتكيف للعمل على ارجاع الحديد و تثبيط الجذور الحرة. بينما أظهرت مستخلصات الثمار تأثيرها الضعيف على مكافحة الراديكالية.

الكلمات المفتاحية : القطلب، النشاط المضاد للأكسدة، الفينولات، الفلافونويدات، FRAP، DPPH، ABTS.