

N° d'ordre:
N° de série:

UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA
Faculté des Sciences Techniques et Sciences de la Matières
Département de Génie des Procédés



Mémoire

MASTER ACADEMIQUE

Domaine : Sciences Techniques

Filière : Génie des Procédés

Spécialité : Analyse et Control de la Qualité

Présenté par: LOUNASSI Ibrahim

BENSANIA Yacine

Thème

Étude de l'activité antioxydante de la plante

Limonistrum guyonianum

Soutenu publiquement

Le : 22/06/2013

Devant le jury :

M. Kahoul Fares	MCB	Université d'Ouargla	Président
Melle .Kendour Zaouia	MAA	Université d'Ouargla	Examinatrice
Mme .Ghiaba Zineb	MAA	Université d'Ouargla	Encadreur

Année Universitaire : 2012 /2013



Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A mon père.

A ma mère.

A ma famille.

A mes frères et sœurs.

Ainsi que tous mes amis et proches.

Yacine et

Brahim

Remerciement

*Au terme de ce travail,
Nous tenons à remercier Allah pour le
Courage et la pascience qu'il nous donné afin de
Mener ce projet a terme. Nous remercions vivement notre encadreur
Mme. GHIABA Zineb.*

*Nos remerciements s'adressent aussi aux membres du jury, qui ont accepté d'examiner notre
mémoire de fin d'étude, et qui ont manifesté un intérêt pour notre travail.*

Ainsi que

*tous les enseignants du département de génie des procédés pour leur contribution notre
formation et leur disponibilité à orienter les étudiants.*

*Nous remercions également le personnel du labo des (VPRS) de l'université KASDI
MERBAH d'OUARGLA pour leur aide durant mon travail. Surtout Mehdi et Assia et
Chiamaa et les personnels de laboratoire.*

*Enfin nous remercions toute personne ayant contribué de près de loin à la réalisation de
ce travail.*

Sommaire

Liste des figures.....	i
Liste des tableaux	ii
Liste des abréviations	iii

Introduction générale	1
------------------------------------	----------

PARTIE THEORIUE

Chapitre I: Les composés phénoliques

I.1.Définition.....	3
I.2.Classification des polyphénols	4
I.2.1.Les polyphénols monomériques.....	5
I.2.1.1.Les acides phénoliques	5
I.2.2. Les flavonoïdes.....	6
I.2.2.1. Classification des flavonoïdes	6
I.3.Intérêt biologique des flavonoïdes et composés phénoliques.....	7

Chapitre II: Les radicaux libres et les antioxydants

II.Les radicaux libres	9
II.1.La définition des radicaux libres	9
II.2. La nature et l'origine des radicaux libres	9
II.2.1.Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO).....	9
II.2.1.1.Radical libre hydroxyle:OH [•]	9
II.2.1.2.Oxygène singulet: O ₂ ¹	10
II.2.2.Espèces libres non oxygénées	11
II.3.Les antioxydants.....	11
II.3.1. Définition	12

II.3.2.Utilisation des antioxydants	12
II.3.3.Classification des antioxydants	13
II.3.3.1.Les antioxydants de synthèses.....	13
II.3.3.2.Les antioxydants naturels	13
II.3.4.Toxicité topiques des antioxydants	13
II.3.5.Mécanismes d'action des antioxydants.....	14
II.3.5.1.Antioxydants primaires ou distributeurs de chaine	14
II.3.5.2.Antioxydants secondaires.....	14
II.3.6.Evaluation de la capacité antioxydant par des tests in vitro	15
II.3.7.Effet des antioxydants sur la santé humaine	15

Chapitre III: Étude botanique de *Limoniastrum guyonianum*

III.1. <i>Limoniastrum guyonianum</i>	16
III.2.Description botanique	16
III.2.1.Caractères morphologiques	16
III.2.2.Taxonomies et systématiques	17
III.2.3.Habitat et répartition géographique	17
III.2.4.Noms vernaculaires	17
III.2.5.Utilisations en médecine traditionnelle	17

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre IV: Matériels et méthodes

IV.1. Matériels	18
IV.1.1. Les produits utilisés	18
IV.1.2. Les appareils utilisés	19
IV.1.3. Matériel végétal	19
IV.1.3.1. Récolte des échantillons	19
IV.1.3.2. Séchage des échantillons	19
IV.2. Méthodes	19
IV.2.1. Extraction et Analyses phytochimiques	20
IV.2.2. Réaction et Analyse quantitatives	20
IV.2.2.1. Extraction des composés phénoliques	20
IV.2.2.2. Détermination du rendement d'extraction	23
IV.2.2.3. Dosage des phénols totaux	23
V.2.2.3.1. Courbe étalonnage d'acide gallique	23
IV.2.2.4. Dosage des flavonoïdes	24
IV.2.2.5. Test antioxydant	25
IV.2.2.5.1. Estimation du pouvoir antioxydant par la méthode au DPPH	25
IV.2.2.5.2. Méthode de la réduction du fer FRAP	27

Chapitre V: Résultats et Discussions

V.1. Détermination du rendement d'extraction	28
V.2. Dosage des phénols totaux	28
V.3. Dosage des flavonoïdes	29
V.3.1. En équivalent Rutine	31

V.3.2.En équivalent Quercétine.....	31
V.4. Comparaison des teneurs des polyphénols et des flavonoïdes.....	31
V.5. Résultats du test du pouvoir antioxydant	32
V.5.1. Estimation du pouvoir antioxydant par la méthode au DPPH.....	32
V.5.1.2 Comparaison des IC ₅₀ avec les teneurs en polyphénols et flavonoïdes...	34
V.5.2.Méthode de la réduction du fer FRAP	35

Chapitre VI: Les corrélations entre les méthodes

VI.1.Les corrélations entre les méthodes.....	39
VI.1.1.La corrélation de Phénols Totaux avec Flavonoïdes.....	39
VI.1.2.La corrélation des Phénols Totaux et Flavonoïde avec IC ₅₀ de DPPH	39
VI.1.3.La corrélation de Phénols Totaux et Flavonoïde avec AEAC de réduction de fer	40
Conclusion générale.....	42
Référence	42

Liste des figures

Fig.1: la structure de Phénol.....	3
Fig. 2: Exemples d'acides phénoliques.	5
Fig. 3: Le squelette de base des flavonoïdes	6
Fig. 4: Formation des Espèces Oxygénées Réactives (EOR).....	11
Fig. 5: Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par le système de défenses antioxydants.....	12
Fig. 6: Stabilisation de radicaux par l'hydroxytyroso.....	14
Fig. 7: <i>Limoniastrum Guyonianum</i>	16
Fig. 8: Protocol d'extraction des polyphénols	22
Fig. 9: Forme libre DPPH.....	25
Fig. 10: Courbe d'étalonnage des polyphénols.	28
Fig. 12: Courbe d'étalonnage de le Quercetine.....	30
Fig. 12: Courbe d'étalonnage de la rutine	30
Fig. 13: Comparaison des teneurs des polyphénols et des flavonoïdes dans les extraits	32
Fig. 14: Courbes représentants la réduction du DPPH' par les extraits phénoliques, BHT BHA et Acide Ascorbique.....	33
Fig. 15: Comparaison de IC ₅₀ d'inhibition DPPH par les extrait étudiés, BHA et BHT, AC..	35
Fig. 16: Courbes représentants le pouvoir réductrice des extraits phénoliques.....	36
Fig. 17: Pouvoir réducteur des extraits et de BHA, BHT	38
Fig. 18: Les variation des valeurs phénols totaux en fonction du flavonoïdes.....	39
Fig. 19: Les variation des valeurs IC ₅₀ DPPH en fonction du contenu en phénols totaux, Flavonoïdes.....	40
Fig. 20: Les variation des valeurs AEAC en fonction du contenu en phénols totaux. , IC ₅₀ DPPH, Flavonoïdes.....	41

Liste des tableaux

Tableau 1: Les principales classes de composés phénoliques.	4
Tableau 2: Les principales classes des flavonoïdes.	7
Tableau 3: Les activités biologiques des composés polyphénoliques.	8
Tableau 4: Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques.	10
Tableau 5: Les produits utilisés.	18
Tableau 6: Les appareils utilisés.	19
Tableau 7: Récapitulatif regroupant les différents extraits.	28
Tableau 8: Teneur en polyphénols totaux (mg/g de poids sec de la plante).	29
Tableau 9: la quantité des flavonoïdes dans les extraits.	30
Tableau 10: IC ₅₀ de DPPH des différents extraits étudiés.	34
Tableau 11: Les valeurs d'AEAC des différents extraits étudiés.	37

Liste des abréviations

%	Pourcentage.
°C	Degré Celsius
µl	Microlitre
¹O₂	Oxygène singulet
AC	Acide ascorbique
ACE	Acétone
ACID ASC	Acide ascorbique
ADN	Acide disoxyrube- nucléique
AEAC	Capacité antioxydant équivalent d'acide ascorbique
BHA	3-tertiobutyl-4-hydroxyanisole
BHT	Butylhydroxytoluène
d	la densité
DPPH	2.2 diphenyl-1-picryl hydrazyl
e	Electron
EAG	Equivalent d'acide gallique
EQ	Equivalent la Quercétine
ER	Equivalent la Rutine
ETH	Ethanol
FRAP	(Ferric reducing antioxidant power) pouvoir antioxydant de reduction de fer
g	Gramme
g/l	Gramme par litre
g/mol	Gramme par mole
I%	Pourcentage d'inhibition
IC₅₀	La minimum concentration de l'extrait (antioxydant) qui inhibité 50%
M	La masse molaire
m	Mètre
MeOH	Méthanol
METH	Méthanol
mg EAG /g	Milligramme équivalent acide gallique par gramme
mg/g	Milligramme par gramme

mg/l	Milligramme par litre
min	Minute
ml	Millilitre
mM	Milli mole
mm	Millimètre
nm	Nanomètre
OH[·]	Radicale hydroxyle
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
pH	Potentiel d'hydrogène
ROO	Radical hydroperoxyde
ROOH	Radical hydroperoxyde
TCA	Acide trichloracétique
TEAC	Trolox Equivalent Antioxydant Capacity
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
UV	Ultra-violet
UV-VIS	Ultra-violet visible

INTRODUCTION GENERAL

Introduction générale

Introduction générale

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

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

On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques, il reste difficile de définir les molécules responsables de l'action bien que certains effets pharmacologiques prouvés sur l'animal aient été attribués à des composés tels que les alcaloïdes et ces dérivés, des terpènes, stéroïdes et des composés poly phénoliques [1].

Beaucoup de métabolites secondaires sont également important pour notre alimentation (goût, couleur), alors que d'autres parmi alcaloïdes, anthocyanines, flavonoïdes, quinine, lignanes, les stéroïdes, et les terpenoïdes ont une application commerciale dans les domaines pharmaceutiques et biomédicaux et font partie des drogues, colorants, arômes, parfums et des insecticides [2].

Le continent africain est un des continents dotés d'une biodiversité la plus riche dans le monde, avec une avalanche de beaucoup de plantes utilisées comme herbes, aliments naturels et pour des buts thérapeutiques. C'est en grande partie dû à la géographie vaste englobant une masse de terre approximativement de 216, 634.000 hectares de secteurs forestiers fermés. Plus de 5.000 de substances naturelles différentes ont été identifiées et beaucoup d'entre elles se sont avérées utiles dans la médecine traditionnelle pour la prophylaxie et le traitement des maladies. Malgré la nature hétérogène du continent, il y a eu peu d'efforts consacrés au développement des agents chimio thérapeutiques et prophylactiques de ces plantes [3].

Introduction générale

Sachant que le Sahara représente les trois quart des terres de notre pays, et qu'il contient une vaste flore pratiquement inexplorée. De ce fait nous avons essayé d'étudier une plantes qui trouve dans le Sahara algérienne qui est appelé « *Limonistrum guyonianum.*», utilisée extraits en médecine traditionnelle en Algérie.

La présente étude est consacrée à la valorisation phytochimique de cette plante *Limonistrum guyonianum* (zeita) aux propriétés anti radicalaire et antioxydants. Cette valorisation consiste à étudier l'activité antioxydante de différents extraits ont été analysées en termes de composés phénoliques totaux (PT) par la méthode de Folin-Ciocalteu, de flavonoïdes totaux (FAT) par la méthode de chlorite d'aluminium.

Notre travail sera donc réparti en six chapitres, initié par une recherche bibliographique où nous apportons dans le premier chapitre un abrégé sur les substances actives: Les composés phénoliques et ses dérivés on basé sur les flavonoïdes .Le deuxième chapitre définit les antioxydants .Le troisième chapitre a pour objectif de décrire la plante sélectionnée: *Limonistrum guyonianum.*

En suite La partie pratique est subdivisé en trois parties, la première présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail et la deuxième partie discute les résultats obtenus dans cette étude.

Enfin le sixième chapitre présente la corrélation entre les méthodes et les techniques utilisées dans ce travail.

PARTIE THEORIQUE

Chapitre I

Les composés phénolique

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées [4].

En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides et lipides), les végétaux accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représente une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire [5].

Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques très variés tels les alcaloïdes, les terpènes, les composés phénoliques, etc [4].

I.1.Définition

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés, comme l'indique le nom, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire. Ces composés sont les produits du métabolisme secondaire des plantes [6].

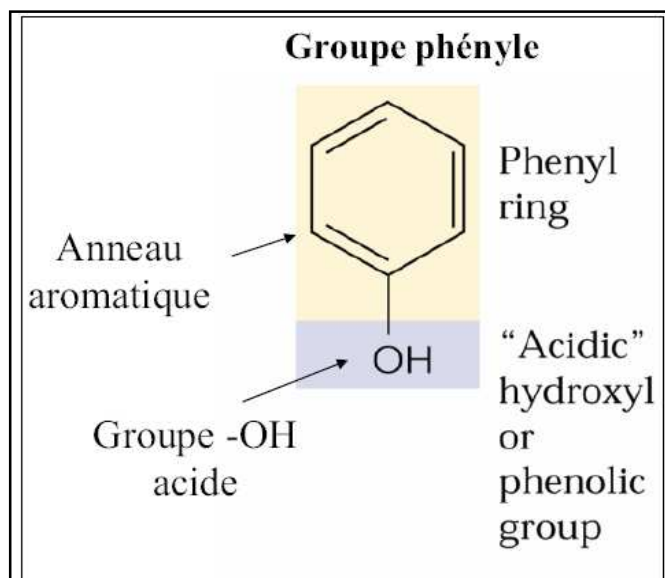


Fig.1: La structure de Phénol.

I.2. Classification des polyphénols

Une classification de ces substances a été proposée par HARBORNE en 1980 (Tableau.1) [7]. On peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base.

Les principales classes qui sont largement répandues:

- Les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques);
- Les flavonoïdes;
- Les tanins et lignines;

Plus rares, les coumarines, les stilbènes ne seront pas décrit en détail ici.

Tableau 1: Les principales classes de composés phénoliques.

Squelette carboné	Classe	Exemple	origine
C_6	Phénols simples	Catéchol	
$C_6 - C_1$	Acides hydroxybenzoïques	<i>p</i> -Hydroxybenzoïque	Epices, fraise
$C_6 - C_3$	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Acides caféïque, férulique Scopolétine, esculétine	Citrus Citrus
$C_6 - C_4$	Naphtoquinones	Juglone	Noix
$C_6 - C_2 - C_6$	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
$C_6 - C_3 - C_6$	Flavonoïdes <ul style="list-style-type: none"> • Flavonols • Anthocyanes • Flavanols • Flavanones Isoflavonoïdes	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélargonidine Catéchine, épicatechine Naringénine Déidzéine	Fruits, légumes, fleurs Fleure, fruits rouges Pomme, raisin Citrus Soja, pois
$(C_6 - C_3)_2$	Lingnanes	Pinorésinol	Pin
$(C_6 - C_3)_n$	Lignines	Entérodsiol	Bois, noyau des fruits
$(C_{15})_n$	Tannins	Procyanidol	Raisin rouge, Kaki

I.2.1. Polyphénols monomériques

I.2.1.1. Acides phénoliques

Ces composés sont universellement rencontrés chez les plantes, deux sous-groupes peuvent être distingués (fig.2.):

- Les acides hydroxybenzoïques, dont les plus répandus sont l'acide salicylique et l'acide gallique;
- Les acides hydroxycinnamiques, dont les plus abondants sont l'acide caféique et l'acide férulique.

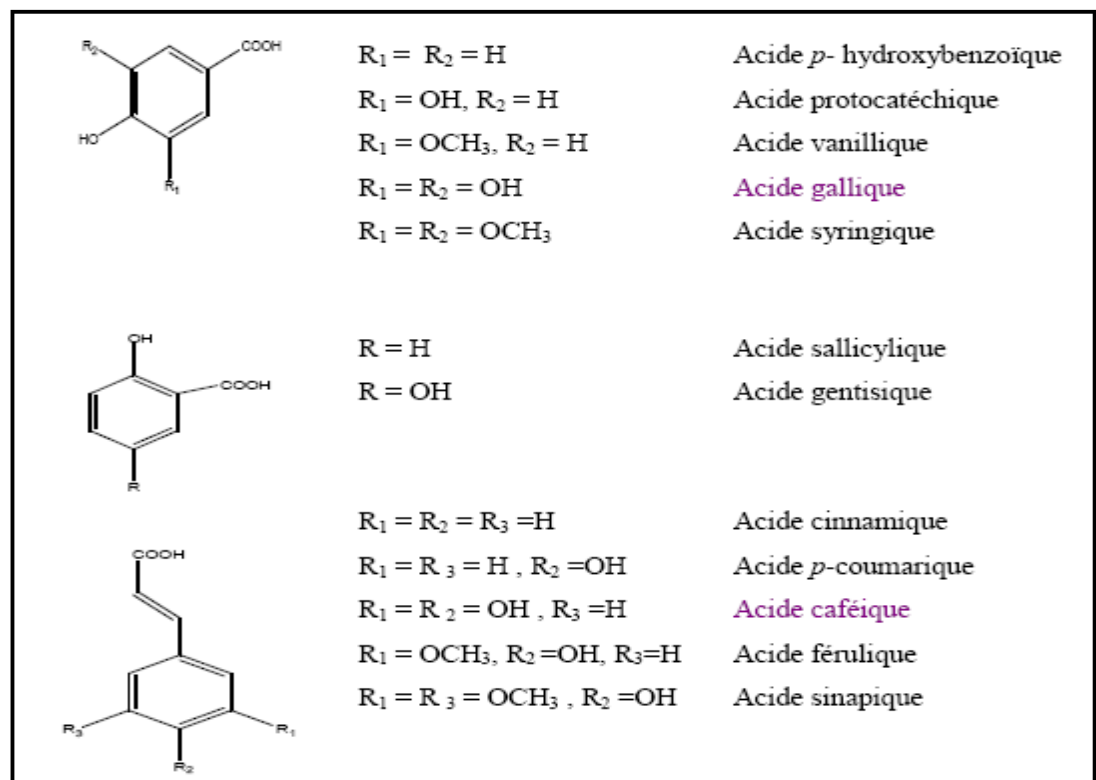


Fig. 2: Exemples d'acides phénoliques.

Les acides hydroxycinnamiques peuvent exister sous deux formes diastéréoisomères (présence de la double liaison de la chaîne latérale): cis (Z) et trans (E); Les formes trans sont les plus abondantes, car thermodynamiquement plus stables.

Les acides hydroxycinnamiques sont naturellement présents associés avec diverses molécules provenant de voies métaboliques différentes. On les trouve sous forme:

➤ d'esters avec des acides-alcools, dont le plus commun est l'acide quinique. L'acide 5 caféoylquinique est l'acide chlorogénique, composé très répandu dans le règne végétal et l'alimentation ;

- d'esters glycosidiques (sucres liés à la fonction acide);
- d'hétérosides (sucres liés à la fonction phénolique).

I.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes (du latin *flavus*, jaune) sont des substances généralement colorées ré pondues chez les végétaux, on les trouve dissoutes dans la vacuole à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes.

Le terme flavonoïdes rassemble une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines, bois. Leur fonction principale semble être la coloration des plantes (au-delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bétalaïnes), même si leur présence est parfois masquée par leur présence sous forme "leuco", ce qui explique leur intérêt commercial dans l'industrie alimentaire [8].

I.2.2.1. Classification

Tous les flavonoïdes on compte plus de 4000 composés ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, possèdent le même squelette de base a «15» atomes de carbones constitués de deux cycles aromatique (A et B) reliés par une chaîne de trois atomes de carbones [9].

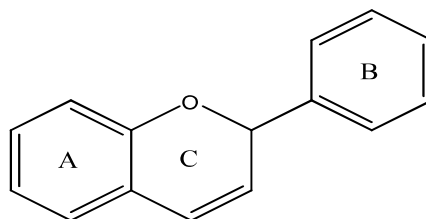
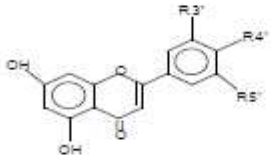
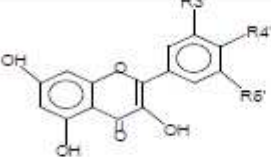
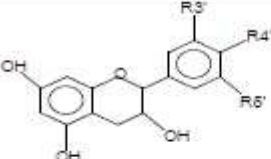
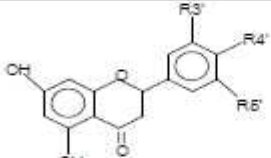
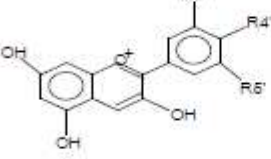
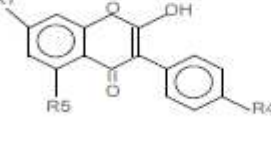


Fig. 3: Le squelette de base des flavonoïdes

Selon l'état d'oxydation du cycle centrale et dépendant le nombre, l'emplacement et la nature des substitutions on peut classés les dérivés flavonoïdes comme suite:

Tableau 2: Les Principales classes des flavonoïdes.

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daïdezine

I.3. Intérêt biologique des flavonoïdes et composés phénoliques

Les flavonoïdes sont depuis longtemps reconnus comme des molécules possédant un nombre remarquables d'actions biochimiques et pharmacologiques. Suggèrent que ces composés peuvent affecter significativement les fonctions de multiples systèmes cellulaires. Certaines d'entre eux (essentiellement dans des préparations à base de Rutine, et de Quercétine) sont depuis longtemps employées empiriquement dans la pathologie circulatoire en tant que veine tonique et vacuole protecteur [6,8].

Tableau 3: Les activités biologiques des composés polyphénoliques.

Polyphénols	Activités
Acides Phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériens Antifongiques Antioxydants
Coumarines	vasoprotectrices et antioedémateuses
Flavonoïdes	Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydants
Anthocyanes	Protection des veines et capillaires
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène Antioxydants Antitumorales Antifongiques Anti-inflammatoires
Tannins galliques et Catéchiques	Antioxydants

Chapitre II

Les radicaux libres et Les antioxydants

La protection contre les effets délétères induits par les radicaux oxygénés s'effectue à l'aide de trois types d'agents différents : les protéines non enzymatiques, les enzymes tels que les superoxyde-dismutases et les glutathion-peroxydases et enfin les antioxydants d'origine nutritionnelle tels que les caroténoïdes, les tocophérols (vitamine E), l'acide ascorbique (vitamine C) et les polyphénols qui sont des antioxydants essentiels pour l'homme [10].

II. Les radicaux libres

II.1. Définition des radicaux libres

Un radical est une molécule ou un fragment moléculaire qui contient un électron (ou plus) non apparié. De par sa structure particulière, il a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner sa stabilité. Cet électron leur confère des propriétés physico-chimiques particulières [11].

➤ Les radicaux libres sont instables et ont tendance à rechercher un état plus stable en recouvrant un nombre pair d'électrons. La durée de vie des radicaux libres est très courte.

II.2. Nature et origine des radicaux libres

Plusieurs éléments peuvent être à l'origine de radicaux libres. Les sources des radicaux libres sont nombreuses, Il existe deux grandes voies de formation de ces derniers [12]:

- **Voie Chimique** (agents oxydants ou des catalyseurs chimiques);
- **Voie Photochimique** (rayonnement) Il y a une autre petite voie appelé;
- **Voie Biologique** (catalyseurs enzymatiques).

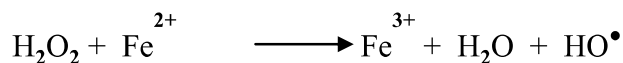
II.2.1. Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO)

L'oxygène doit sa grande réactivité à sa structure particulière. En effet, il possède deux électrons célibataires non appariés sur sa couche orbitale externe. Cette molécule est essentielle au bon fonctionnement de l'organisme [10].

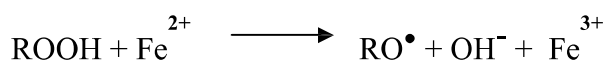
II.2.1.1. Radical libre hydroxyle: OH^\bullet

Le radical libre hydroxyle (OH^\bullet) est très réactif; Il peut réagir avec de nombreuses molécules comme l'ADN, les glucides, les nucléotides, les protéines et être à l'origine de lésions de nécrose. C'est un dérivé de l'ion superoxyde. Il peut être produit à la suite de diverses réactions. Nous en citerons une réaction à titre d'exemple:

➤ La réaction de Fenton: consiste en un transfert d'électrons catalysé par les métaux de transition (Fe, Cu), ils transforment H_2O_2 en radical hydroxyle (OH^\bullet), encore plus toxique, et accélèrent la peroxydation lipidique [10].

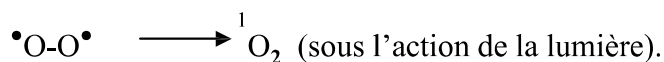


Dans l'oxydation des lipides, la réaction de Fenton peut s'écrire de la manière suivante:



II.2.1.2. Oxygène singulier: $^1\text{O}_2$

Lorsque l'énergie apportée à l'oxygène est nécessaire, celui-ci passe à l'état singulier qui représente la forme activée. C'est une forme très énergétique de grande réactivité qui peut oxyder de nombreuses molécules. Il est formé à partir de l'ion superoxyde selon la réaction suivante:



Cette voie nécessite de l'énergie qui pourra être fournie par les radiations ionisantes, par la lumière, la chaleur et les ultrasons [09].

Tableau 4: Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques.

Nom	Symbole	Nom	Symbole
Espèces Radicalaires		Espèces non Radicalaires	
Anion superoxyde	$\text{O}_2^{\bullet-}$	Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical hydroxyle	OH^\bullet	Acide hypochlorique	HOCl
Monoxyde d'azote	NO^\bullet	Oxygène singulier	$^1\text{O}_2$

II.2.2.Espèces libres non oxygénées

Les espèces libres non oxygénées sont les produits des réactions de certaines molécules avec les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO).

Ils peuvent à leur tour réagir avec d'autres molécules et être à l'origine de la multiplication des réactions d'oxydation et de la propagation de dommages oxydatifs.

Nous citerons, par exemple, les acides gras peroxydés, résultats de l'action des espèces oxygénées sur les membranes biologiques.

Les fractions protéiques, les acides aminés et les acides nucléiques peuvent aussi réagir avec les ERO générant des molécules réactives et nocives [09].

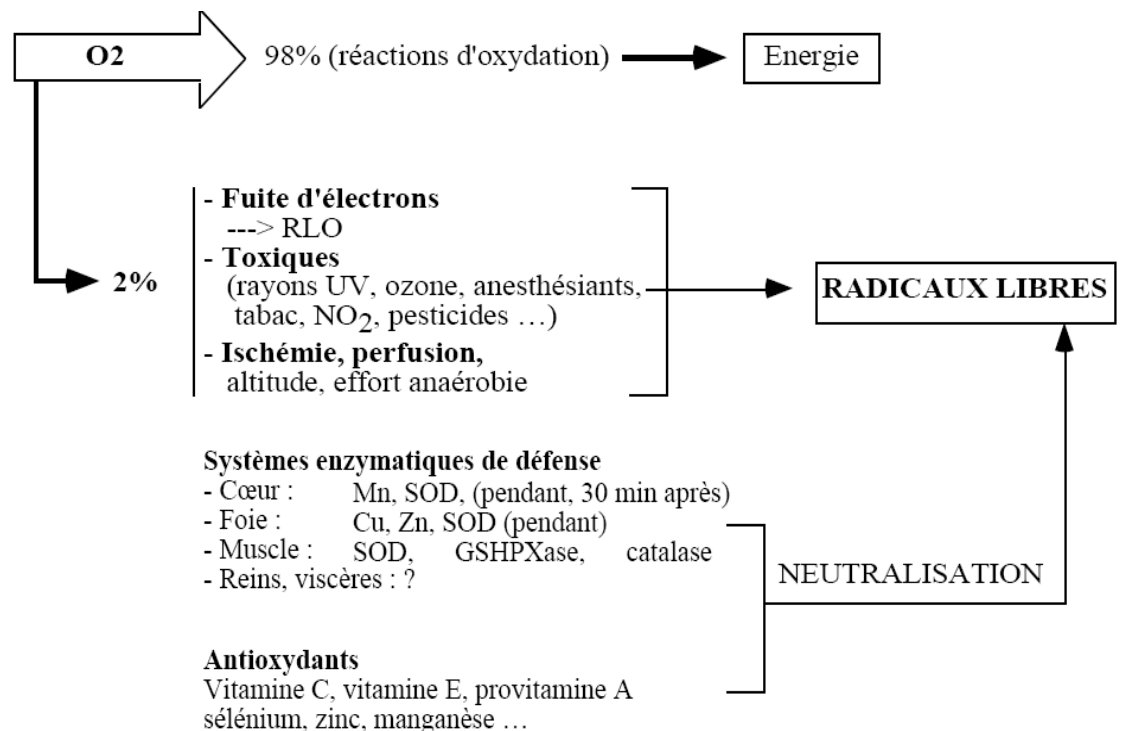


Fig. 4: La formation des Espèces Oxygénées Réactives .

II.3.Les antioxydants

L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydo-réduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Les antioxydants sont capables de stopper ou de retarder ces réactions en chaîne en se réduisant avec les radicaux libres et

annihilant ainsi leur action. Ces propriétés se trouvent beaucoup dans les familles des thiols et des phénols [10].

II.3.1. Définition

Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats [13]. Les cellules utilisent de nombreuses stratégies anti oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (Fig.5).

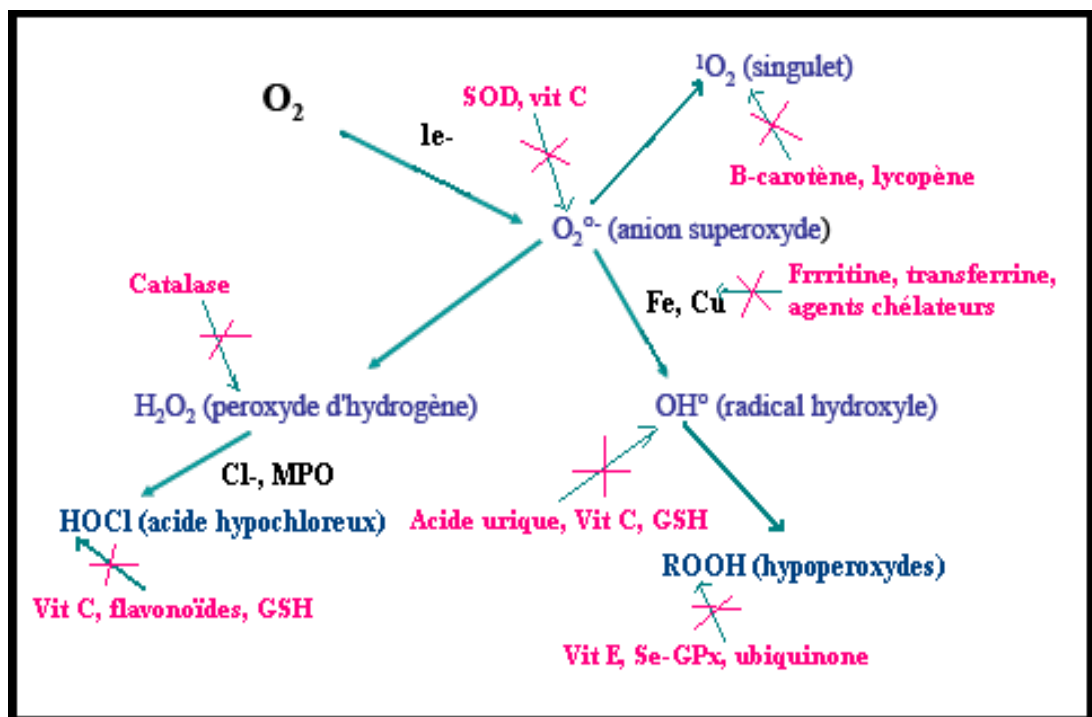


Fig. 5: Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par le système de défenses antioxydants.

II.3.2. Utilisation des antioxydants

On peut utiliser les antioxydants dans plusieurs domaines comme suivants :

- Dans l'industrie chimique: pour éviter le durcissement du caoutchouc ou en métallurgie pour protéger les métaux de l'oxydation;
- Dans l'industrie agro-alimentaire: pour éviter le rancissement des corps gras;
- Dans l'industrie teinturerie: pour éviter l'oxydation des colorants au soufre ou des colorants de cuve lors de la teinture [10].

II.3.3. Classification des antioxydants

Les antioxydants sont classés dans deux grandes catégories différentes:

- Les antioxydants de synthèses;
- Les antioxygènes d'origine végétale;

II.3.3.1. Les antioxydants de synthèses

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (**BHA**), butylhydroxytoluène (**BHT**), gallate propylée (**PG**) et le tetra-butylhydroquinone (**TBHQ**), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matières de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture [14].

II.3.3.2. Les antioxydants naturels

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants in vivo ont été proposées. Elles incluent le bêta carotène, l'albumine, l'acide urique, les œstrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E...etc. Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres.

II.3.4. Toxicité topiques des antioxydants

Le principal risque d'utilisation des antioxydants dans le domaine cosmétique ou le domaine pharmaceutique est celui de réactions d'hypersensibilités au contact de la peau [14]. Il existe beaucoup de travaux de recherches sur les effets biologiques des BHA/BHT, qui tournent autour de leurs actions au niveau du métabolisme énergétique des cellules ainsi que l'effet carcinologique.

II.3.5.Mécanismes d'action des antioxydants

Il y a deux options pour retarder la réaction d'oxydation [10]:

- 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.

II.3.6.1.Antioxydants primaires ou distributeurs de chaîne

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

La figure (fig. 6) montre une stabilisation d'un radical hydroperoxyde (ROO^\bullet) par un phénol qui est l'hydroxytyrosol [10].

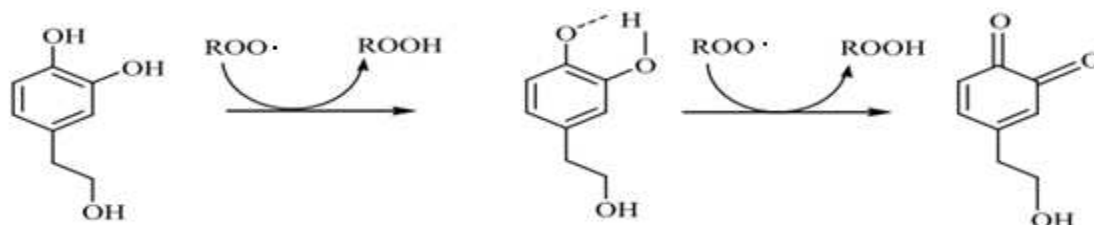


Fig. 6: Stabilisation de radicaux par l'hydroxytyroso.

II.3.5.2.Antioxydants secondaire

Ils fonctionnent au moyen de la décomposition des hydroperoxydes en produits inertes, et évitent ainsi ou ralentissent le taux d'initiation de la chaîne. Pour cette raison, on fait parfois référence aux antioxydants secondaires sous le nom d'antioxydants préventifs. Les antioxydants secondaires sont presque toujours utilisés en conjonction avec les antioxydants primaires, ils sont connus également sous le nom d'agents synergiques. Les phosphites et les thioesters constituent les deux types chimiques les plus importants au sein de cette catégorie[10].

II.3.6. Evaluation de la capacité antioxydant par des tests in vitro

Les antioxydants peuvent réduire les radicaux primaires par deux mécanismes: par transfert d'électron singletier ou par transfert d'atome d'hydrogène. Les méthodes ABTS⁺ Decolorization Assay (ou TEAC) et DPPH jouent sur le transfert l'électron singlet, alors que la méthode ORAC joue sur le transfert d'un atome d'hydrogène.

Les méthodes ABTS et DPPH sont couramment utilisés pour analyser les extraits de plantes et de fruits. La méthode ORAC est plus récente et est applicable sur quasiment toutes les matrices (extraits végétaux, aliments, plasma sanguin).

II.3.7. Effet des antioxydants sur la santé humaine

Lors de la photosynthèse, les plantes fabriquent des substances antioxydantes pour se protéger des effets délétères des radiations solaires. Par conséquent, des vitamines (C, E, caroténoïdes) et des enzymes (catalases, peroxydases) sont synthétisés. De plus, Ces plantes élaborent des flavonoïdes qui préviennent l'oxydation. Ces substances jouent deux rôles au niveau de la plante : celui d'un filtre solaire et celui d'un antioxydant vis à vis des radicaux libres produits par les radiations. Tous ces antioxydants sont directement assimilables par notre organisme quand on consomme des végétaux.

Il existe une forte corrélation entre la consommation de légumes et de fruits et une moindre incidence des maladies cardio-vasculaires et les cancers. Les antioxydants végétaux ont des propriétés protectrices en matière de vaisseaux sanguins, leurs vertus antiviellissement et leurs implications probables dans la prévention des pathologies liées au stress oxydatif. Les potentiels antioxydants, comparés à celui de la vitamine E, les plus élevés pour les fruits et légumes sont respectivement ceux de la fraise [15].

Chapitre III

étude botanique de L. Guyonianum

III.1. *Limoniastrum guyonianum*

L. Guyonianum est une plante qui appartient à la famille des Plombaginacées, est une famille de plantes dicotylédones qui comprend 775 espèces en 14 à 24 genres. Ce sont des plantes herbacées la plupart du temps, des arbustes ou des lianes. C'est une famille cosmopolite, que l'on peut rencontrer dans tous les milieux, y compris salins, des régions froides à tropicales [16].

L. Guyonianum est une plante saharienne qui se rencontre en grande abondance dans les terrains salés des sebkhas et des chotts.

III.2. Description botanique

III.2.1. Caractères morphologiques

Arbuste élevé de 0.5 à 1m, tiges très rameux gris-vert. Les branches ont souvent de grosses galles. Longues feuilles linéaires ou presque cylindriques coriaces à extrémité un peu pointue. Les feuilles comportent des incrustations calcaires et sont couvertes de dépôts de sel. Fleurs roses purpurines à cinq pétales. C'est une espèce halophile [1].



Fig. 7: *Limoniastrum Guyonianum*.— de la région de Djamaa de la wilaya d'El Oued (Algérie) - 03/02/2013.

III.2.2. Taxonomies et systématiques

Règne:	Végétal;
Embranchement:	Spermatophytes;
Sous Embranchement:	Angiospermes;
Classe:	Dicotylédones;
Ordre:	Plumbaginales;
Famille:	Plumbaginaceae;
Genre:	<i>Limoniastrum</i> ;
Espèce	<i>guyonianum</i> .

III.2.3. Habitat et répartition géographique

Elle est répandue dans les déserts du nord africain. Espèce endémique du Sahara septentrional (Algérie, Tunisie) dans les sols salés des grands chotts [16].

III.2.4. Noms vernaculaires

En Algérie, dans certaines régions, *Limoniastrum guyonianum* s'appelle Zeita , et dans d'autres régions, elle s'appelle Zita.

III.2.5. Utilisations en médecine traditionnelle

Dans le sud de la Tunisie, la tisane des feuilles, des branches et des galles de *L. guyonianum* a été utilisée dans la médecine populaire comme un remède de la dysenterie [1].

L'importance de la décoction des racines est considérable à ses applications en tant que dépuratif, les extraits des galles sont utilisés pour le tannage des cuirs [1].

**PARTIE
EXPERIMENTALE**

Chapitre IV

Matériels et Méthodes

IV.1. Matériels

IV.1.1. Les produits utilisés

Le tableau suivant est représenté les produits chimiques utilisés dans notre étude et leurs différentes propriétés:

Tableau 5: Les produits utilisés.

Produits	Propriétés
Méthanol	CH_4O ; $M=32.04$ g/mol
Acétate d'éthyle	$d=88.1$; 99.8%, $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$
Ethanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$; 95%, $d=46.7$, $M=46.07$ g/mol
Sulfate d'ammonium	$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$; $M=132.14$ g/mol
Acid ortho- phosphorique	H_3PO_4 ; 85%; $M=98$ g/mol
Folin ciocalteu	$d=1.22$
Acetone	$M=58.08$ g/mol; $\text{CH}_3\text{H}_6\text{O}$; 99.78%
Carbonate de sodium	$d=105.99$; 99.8%; Na_2CO_3
Sulfate de sodium	Na_2SO_4 ; $M=142.042$ g/ml
Acide ascorbique	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$; $M=176.13$ g/mol
Acide gallique	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$; $M=170.1195$ g/mol
Quercetine	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$; $M=302.2357$ g/mol
Rutine	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$; $M=610.5175$ g/mol
BHA	$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_2$; $M=180.25$ g/mol
BHT	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$; $M=220.353$ g/mol
Chlorure de fer	FeCl_3 ; $M=162.204$ g/mol
Ferricyanure de potassium	$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$; $M=329.244$ g/mol
Acétate de sodium	CH_3COONa ; $M=82.03$ g/mol
Chlorure d'aluminium	AlCl_3 ; $M=137.43$ g/mol
DPPH	$\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$; $M=394.33$ g/mol
Eau distillée	H_2O ; $M=18$ g/mol
Hexane	C_6H_{12} ; $M=84$ g/mol
TCA	$\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$; $M=163.387$ g/mol
Tris	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$; $M=121.14$ g/mol
$\text{NaH}_2\text{PO}_4(2\text{H}_2\text{O})$	$\text{NaH}_2\text{PO}_4(2\text{H}_2\text{O})$; $M=156$ g/mol
$\text{Na}_2\text{HPO}_4(12\text{H}_2\text{O})$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4(12\text{H}_2\text{O})$; $M=358.13$ g/mol

IV.1.2. Les appareils utilisés

Le tableau suivant est représenté les différents appareils utilisés dans notre étude et leurs caractéristiques :

Tableau 6: Les appareils utilisés

L'appareil	Propriétés
Balance électrique	OHAUS; 0.0000g
Etuve sous vide	LDO-080N; Tmax=320°C
Rotavapeur	R-210 Buchi; Tmax=95°C
Spectrophotomètre. UV-visible	Spectro Scan 80D/80DV
Micropipette	SL-plus 100
Ballons pour le rota-vapeur.	(50ml→2000ml)
Broyeur	
Papier filtre	1-4 Whatman

IV.1.3. Matériel végétal

IV.1.3.1. Récolte des échantillons

Les feuilles de *Limoniastrum guyonianum* ont été collectées en février 2013, la Plante est de la région de Djamaa de la wilaya d'El Oued (Algérie).

IV.1.3.2. Séchage des échantillons

Le séchage des feuilles a été effectué dans un endroit aéré sous l'ombre à une température ambiante, puis le stockage dans des sacs en tissu jusqu'à à l'utilisation.

Avant toute procédure expérimentale, les échantillons sont bien broyés avec un broyeur électrique, on a obtenu des poudres fines de couleurs verts. Ces poudres ont été utilisées pour les investigations phytochimiques mentionnées ci-après.

IV.2. Méthodes

Notre étude a été guidée par la comparaison entre différents extraits de la *Limoniastrum guyonianum* par trois systèmes de solvants (hydroacétonique, hydrométhanolique et hydroéthanolique) selon deux paramètres:

- Teneur en composés phénoliques (phénols totaux et flavonoïdes);
- Activité antioxydante des différents extraits (évaluée par plusieurs méthodes).

IV.2.1.Extraction et Analyses phytochimiques

Ce sont des techniques qui permettent de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques.

Les groupes phytochimiques sont nombreux, mais on peut citer les principaux: les alcaloïdes, les polyphénols (flavonoïdes, anthocyanes, tannins), les saponosides, les stéroïdes, les coumarines, les stérols, les terpènes...etc.

IV.2.2.Réaction et analyse quantitative

IV.2.2.1.Extraction des composés phénoliques

La méthode d'extraction des composés phénoliques utilisée est celle d'Amiot (Marie-JosBphe Amiot et al, 1986) modifiée (Djeridane et *al.*, 2006) [17,18] 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:

➤ Dépigmentation

A partir d'une quantité bien déterminé **100g** de matière végétale sèche introduit dans un flacon et macéré dans un mélange de **250ml** de solvant Hexane afin d'éliminer toutes traces de composés apolaires (pigments, lipides, etc...).

➤ Macération

Après filtration, on fait une autre macération sur le même résidu dans trois mélange de **solvant /Eau**: Méthanol/Eau (**80/20**), Acétone/Eau (**70/30**), Ethanol/Eau (**60/40**) séparément, pendant **48 heures** à température ambiante. Les extraits hydroalcooliques et hydroacétoniques ont été récupérés dans un premier temps après filtration des mélanges, les solvants méthanol, acétone et éthanol ont été éliminés des filtrats par évaporation sous pression réduite à **40°C** dans un rotavapeur. Permettant ainsi d'obtenir des extraits caractérisés par une couleur verte foncée qui sont considérés comme étant les extraits bruts des feuilles de la *Limoniastrum guyonianum*.

➤ Purification des composés phénoliques

Ensuite, les composés phénoliques ont été extraits par extraction liquide-liquide en utilisant l'acétate d'éthyle en présence d'un mélange de deux solutions aqueuses de **20%** de sulfate d'ammonium $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et de **2%** d'acide orthophosphorique qui facilitent le passage des composés phénoliques vers la phase organique.

Ces opérations sont schématisées dans l'organigramme suivant:

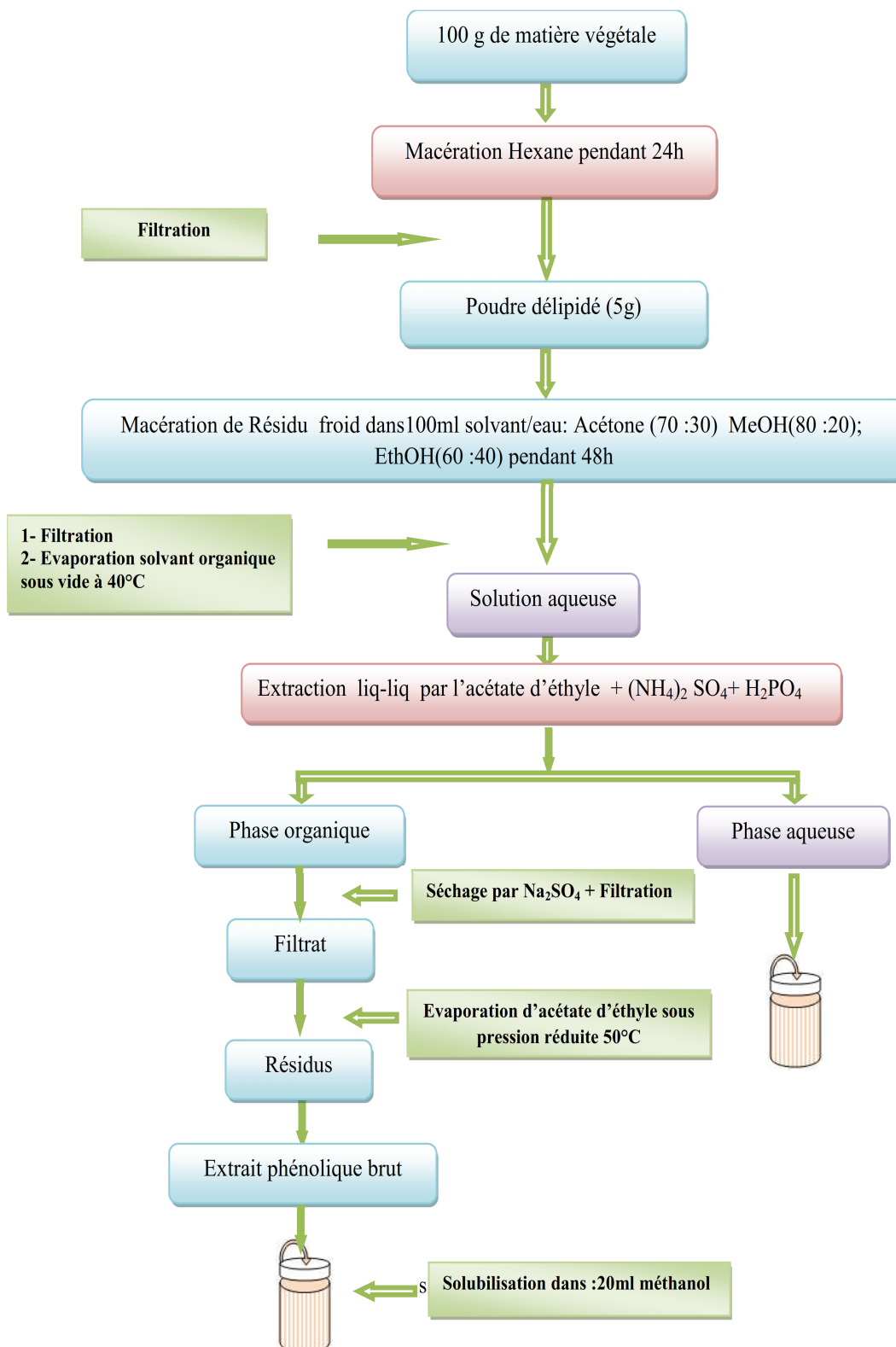


Fig. 8: Le protocole d'extraction des polyphénols.

IV.2.2.2. Détermination du rendement d'extraction

La phase organique ainsi obtenue (acétate d'éthyle) pour chaque extrait est concentrée à sec sous pression réduite, pesées, puis les extraits sont récupérés avec le méthanol.

On calcule le rendement de chaque extrait avec la relation suivante:

$$(R\%) = \frac{m}{m_0} 100$$

Avec :

R(%): le rendement.

m: la masse d'extrait obtenu en g.

m₀: la masse totale en g (**5 g**).

IV.2.2.3. Dosage de phénols totaux

Cette analyse permet d'avoir une estimation de la teneur en composés phénoliques totaux dans chaque extrait. Le dosage de phénols totaux a été effectué par une méthode adaptée de Singleton-Ross (1965) avec le réactif Folin-Ciocalteu [17].

Le dosage de phénols totaux a été effectué on utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu qui est formé d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{42}$) et l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) qui sont réduits par les phénols en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration des oxydes est mesurée dans le spectre visible à **760 nm** ce qui nous a permis de lier l'absorbance en fonction de la concentration des composés phénoliques réducteurs.

V.2.2.3.1. Courbe étalonnage d'acide gallique

Une courbe d'étalonnage a été obtenue à partir des solutions d'acide gallique des concentrations massiques allant de **0.03** jusqu'à **0.3mg/ml**.

100µl de chaque solution ont été introduits à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai, puis on ajoute **0.5ml** d'une solution de réactif de Folin-Ciocalteu dilué **10 fois** dans l'eau distillée. Après incubation pendant deux minutes, **2ml** de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à **20%** sont ajoutés.

Les solutions sont maintenues à l'obscurité pendant 30min à température ambiante. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 760nm. Les lectures de la densité optique à **760nm**, des solutions ainsi préparées ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

L'analyse quantitative des phénols totaux des extraits phénoliques a été réalisée en adaptant la même procédure utilisée pour l'établissement de la courbe d'étalonnage. La quantité des phénols totaux dans les extraits est exprimée en équivalent d'acide gallique en milligramme par **1g** de la matière végétale (mg/g). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau.8. La concentration de chaque variété est déterminée par la relation suivante:

$$C \text{ (mg/g)} = \frac{A}{K} \times F \times \frac{V}{P}$$

Tels que:

A: l'absorbance en nm.

F: coefficient de dilution.

V: volume de l'extrait de plante en ml (**20ml**).

K: pente de la courbe d'étalonnage.

P: poids sec de la plante en g (**5g**).

IV.2.2.4.Dosage des flavonoïdes

La méthode au AlCl_3 a été employée pour la détermination de la teneur totale en flavonoïdes des extraits échantillons [19; 20].

Un millilitre (1ml) de la solution diluée de l'extrait ou standards à été ajoutée à **1ml** d'une solution de **10%** AlCl_3 (10g dans 100ml méthanol) et **1ml** d'une solution d'acétate de sodium (CH_3COONa , **0.1N**). Le mélange a été vigoureusement agité, et l'absorbance à **410nm** a été lue après **30minutes** d'incubation.

Le trichlorure d'aluminium forme un complexe très stable avec les groupements hydroxydes OH des phénols. Ce complexe jaune absorbe la lumière visible à une longueur d'onde **410nm**.

Une courbe d'étalonnage ($y = k \cdot x$) réalisée par la Rutine et Quercétine à différentes concentrations dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons, servira à la quantification des flavonoïdes.

IV.2.2.5. Test antioxydant

Des nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques purs ou des extraits ; La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Dans notre étude nous avons utilisé deux différents tests chimiques à savoir: le test ferric Reducing / Antioxydant Power Assay qui mesure le pouvoir de réduction des ions de fer, et le test par la méthode au DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl).

IV.2.2.5.1. Estimation du pouvoir antioxydant par la méthode au DPPH

Le pouvoir antioxydant de nos extraits a été testé par la méthode au DPPH ce radical libre stable (Fig.9) possède une coloration violette foncée, lorsqu'il est réduit, la coloration devient jaune pâle [21; 22] selon le mécanisme réactionnel suivant:

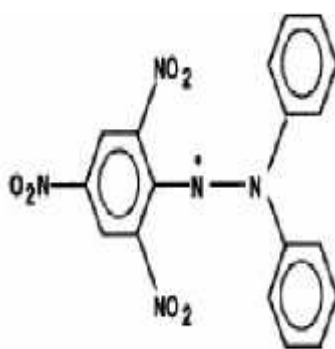
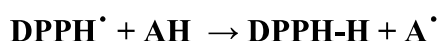


Fig. 9: La structure radicale libre DPPH.

IV.2.2.5.1.1.L'essai au DPPH

Dans des tubes secs et stériles, on introduit 1ml de la solution de l'extrait à tester déjà dilué par une solution tampon Tris (**0.1M**, pH=7.4), on ajoute 1ml de solution au DPPH. Après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité, à la température ambiante pendant **30** minutes.

- La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à **517nm** par un spectrophotomètre;
- Le blanc est constitué de **3ml** de la solution tampon Tris;
- Le contrôle est composé de **1ml** de la solution méthanolique au DPPH (**0.5mM**) et de 1ml de la solution Tris;
- Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard; l'acide ascorbique dont l'absorbance est mesuré dans les mêmes conditions que l'échantillon test.

IV.2.2.5.1.2.Expression des résultats

Pour obtenir la concentration efficace IC_{50} qui réduit la concentration initiale de DPPH de 50%, les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition

$$(I\%)_{DPPH} = \frac{(A_0 - A)}{A_0} 100$$

I%: Inhibition de DPPH à **517nm**.

A₀: Absorbance de Blanc à **517nm**.

A: Absorbance d'extrait à **517nm**.

La valeur IC_{50} (autrement appelée la valeur EC_{50}) a été déterminée pour chaque extrait, est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de **50%** de l'activité de DPPH. Ou encore, c'est la concentration de l'échantillon exigé pour donner une diminution de **50%** de l'absorbance de la solution contrôle constitué de Tris et DPPH.

Les valeurs IC_{50} ont été calculées par les régressions linéaires, où l'abscisse est représentée par la concentration des composés testés et l'ordonnée par le pourcentage

d'inhibition [23] Les différents extraits sont traités de la même façon que ceux de la solutions de l'acide Ascorbique, BHA et le BHA pour faire une comparaison entre eux.

IV.2.2.5.2.Méthode de la réduction du fer FRAP

L'activité réductrice du fer de nos extraits est déterminée selon la méthode décrite par (Oyaizu, M. 1986) [24], basée sur la réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fe^{2+} .

➤ Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations est mélangé avec **2.5ml** d'une solution tampon phosphate **0.2M** (pH **6.6**) et **2.5ml** d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à **1%**.

➤ L'ensemble est incubé au bain marie à **50°C** pendant 20 minutes ensuite;

➤ **2.5ml** d'acide trichloroacétique à **10%** sont ajoutés pour stopper la réaction;

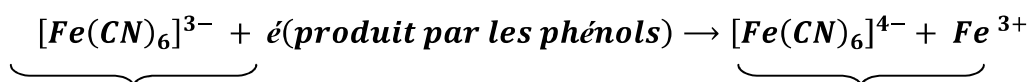
➤ **2.5ml** du surnageant sont mélangés à **2.5ml** d'eau distillée et **0.5ml** d'une solution de chlorure ferrique fraîchement préparé à **0.1%**.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à **700nm** contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre).

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard, l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

L'activité antioxydant est mesuré avec un nouveau terme appelé **AEAC**: qui présente l'activité antioxydant en équivalant de l'acide ascorbique (vitamine C) des extraits étudiés et les standards (BHA, BHT) pour faire une comparaison.

La réduction de fer est fonctionnée selon le mécanisme réactionnel suivant:



coloration jaune

Complexe bleu

Chapitre V

Résultats et Discussions

V.1.Détermination du rendement d'extraction

La teneur des composéés des extraits regroupé dans le tableau suivant:

Tableau 7: Récapitulatif regroupant les différents extraits.

Extraits	Acéton	Méthanol	Ethanol
Le poids (g)	0.39	0.12	0.05
Rendement(%)	7,8	2,4	1

D'après ces résultats de (tableau.7) on observe que le rendement le plus fort est celui de l'extrait d'acétone de l'ordre de **7.8%**, suivi par l'extrait de méthanol qui a un rendement moyen égal a **2.4%**, en fin l'extrait éthanologique a un rendement faible de l'ordre de **1%**.

V.2. Dosage de phénols totaux

L'étude quantitative des extraits bruts au moyen des dosages spectrophotométriques, avait pour objectif la détermination de la teneur totale des polyphénols. Une courbe d'étalonnage (Fig.10) a été tracée pour cet objectif, en fonction de l'acide gallique à différentes concentrations. Des mesures de densité optique pour chaque extrait se sont réalisées à **760nm**.

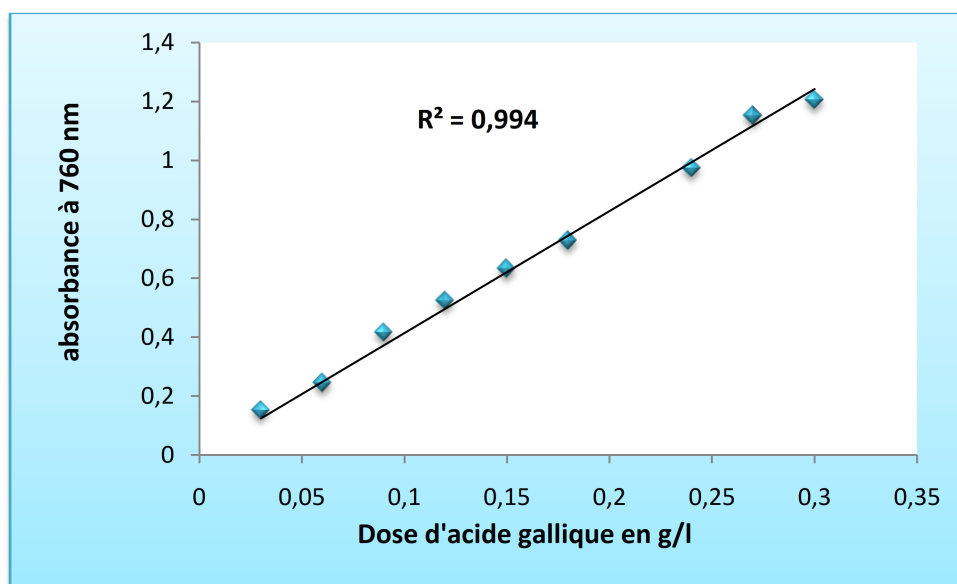


Fig. 10: Courbe d'étalonnage des polyphénols.

Les quantités des polyphénols correspondantes ont été rapportées en mg équivalent d'acide gallique par g du poids sec, elles sont déterminées par une équation de type: $y = k \cdot x$

Les teneurs des différents extraits en Phénols Totaux sont représentées dans le tableau suivant:

Tableau 8: Teneur en polyphénols totaux (mg/g de poids sec de la plante).

Extraits	Acétone	méthanol	Ethanol
Concentration (mg EAG /g) masse sec	3.43	4.6	1.48

Le tableau montre qu'il y a une différence de quantité des composés phénoliques dans les divers extraits étudiés, et les quantités sont comprises entre **1.48** et **4.6**mg/g.

On a enregistré en équivalent acide gallique: **1.48, 3.43, 4.6**mg par g de matériel végétal sec, respectivement avec les extraits éthanolique, acétonique et méthanolique. L'extrait méthanolique représente la teneur la plus élevée en polyphénols.

V.3. Dosage des flavonoïdes

L'absorbance du mélange de deux standards a été mesurée par spectroscopie UV à longueur d'onde 410nm contre un blanc; En utilisant les valeurs des absorbances obtenues pour les différentes solutions de Rutine et Quercétine ainsi préparées nous avons tracé la courbe d'étalonnage.

Les différents extraits sont traités de la même façon que ceux des solutions standards de la Rutine ou Quercétine; La quantité des flavonoïdes dans chaque extrait est exprimée en milligramme par gramme en équivalent en Rutine ou Quercétine.

Les valeurs d'absorbance des différentes solutions et des standards Quercétine et Rutine à 410nm sont représentés dans les courbes suivantes:

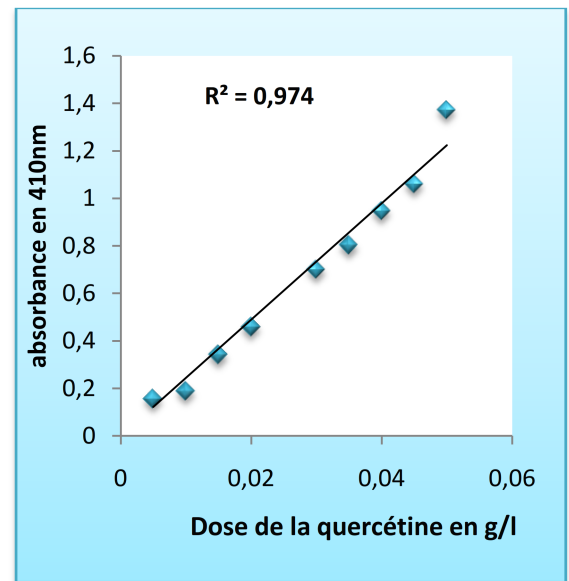
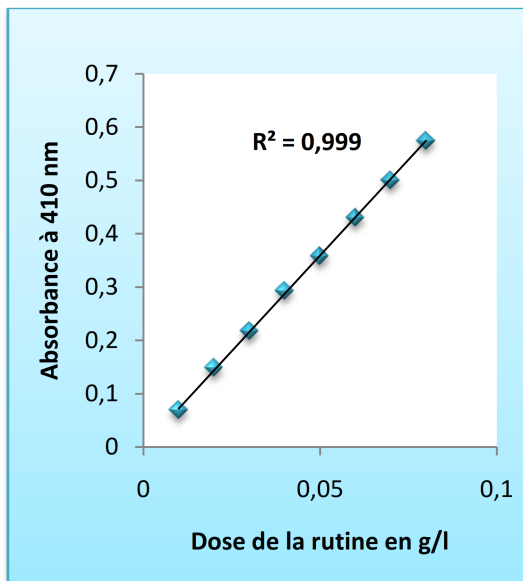


Fig. 12: La courbe d'étalonnage de la Rutine.

Fig. 12: La courbe d'étalonnage de le Quercétine.

La concentration de chaque extrait est déterminée comme les polyphénols par la relation suivante:

$$C \text{ (mg/g)} = \frac{A}{K} \times F \times \frac{V}{P}$$

L'ensemble des résultats obtenus par ce test est regroupé dans le tableau suivant:

Tableau 9: La quantité des flavonoïdes dans les extraits

	(mg ER/g)	(mg EQ/g)
Acétone	7,323	2.16
Méthanol	7,206	2.12
Ethanol	4,167	1.224

A partir de des résultats de tableau (09), on remarque que la quantité des flavonoïdes en équivalent Rutine est variée dans les différents extraits mais suit le même sens que celui remarqué dans le cas des flavonoïdes en équivalent Quercétine.

V.3.1. En équivalent Rutine

Suivant le tableau (09), on a enregistré en équivalent Rutine **7.323, 7.206, 4.167**mg par g de matériel végétal sec, respectivement avec les extraits acétonique, méthanolique et éthanolique.

On déduire l'extrait d'acétone représente la teneur la plus élevée en flavonoïdes.

V.3.2. En équivalent Quercétine

On a enregistré aussi en équivalent Quercétine: **2.16, 2.12, 1.224** mg par g de matériel végétal sec, respectivement avec les extraits acétonique, méthanolique et éthanolique.

On remarque l'extrait d'acétone représente la teneur la plus élevée en flavonoïdes.

Quand on comparé par rapport à la Rutine le contenu des flavonoïdes est très élevés par rapport à ceux qui chez Quercétine.

Cette différence trouve probablement son explication dans la différence du standard utilisé pour le dosage des flavonoïdes, parmi les résultats obtenus de deux méthodes le standard Rutine a la capacité à dissoudre une grande classe des flavonoïdes que Quercétine.

On remarque aussi que la quantité des flavonoïdes en équivalent Rutine et Quercétine est très proche dans les deux extraits d'acétone et de méthanol.

V.4. Comparaison des teneurs des polyphénols et des flavonoïdes

On la figure (Fig.13) qui représente une comparaison entre la quantité des phénols totaux et des flavonoïdes dans les différents extraits étudiés.

Nous constatons que l'extrait de méthanol est plus faible que les deux extraits d'acétone et de méthanol en teneur en polyphénols et flavonoïdes.

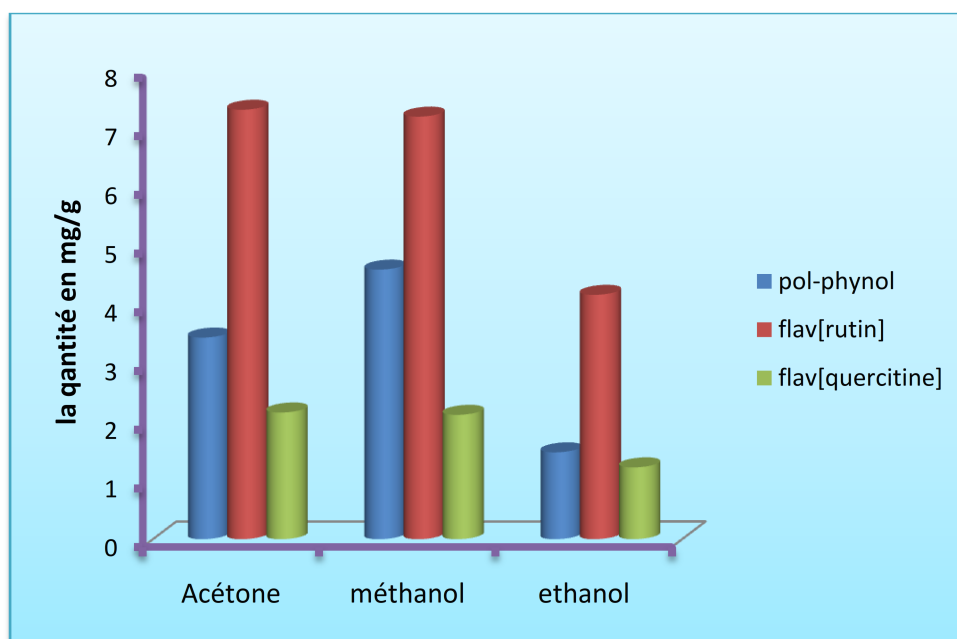


Fig. 13: La comparaison des teneurs des polyphénols et des flavonoïdes dans les extraits.

On conclue que la plante étudiée est une source importante soit des phénols totaux et des flavonoïdes qui sont des composés connus par leurs activités antioxydant.

V.5. Résultats du test du pouvoir antioxydant

V.5.1. Estimation du pouvoir antioxydant par la méthode au DPPH

L'activité antioxydant des différents extraits de la plante vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée avec spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune, mesurable à 517nm .Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti radicalaires [25].

Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant, nous avons introduit le paramètre IC_{50} .

IC_{50} : il définit la concentration efficace du substrat qui cause la réduction de 50% du DPPH en solution.

Les valeurs d' IC_{50} des différents extraits ont été estimées en utilisant la courbe de régression linéaire: $y=k \cdot x$

Les résultats obtenus par ces tests sont regroupé dans ces courbes suivantes qu' illustrent l'inhibition des trios extraits et les standards(acide ascorbique, BHA et BHT):

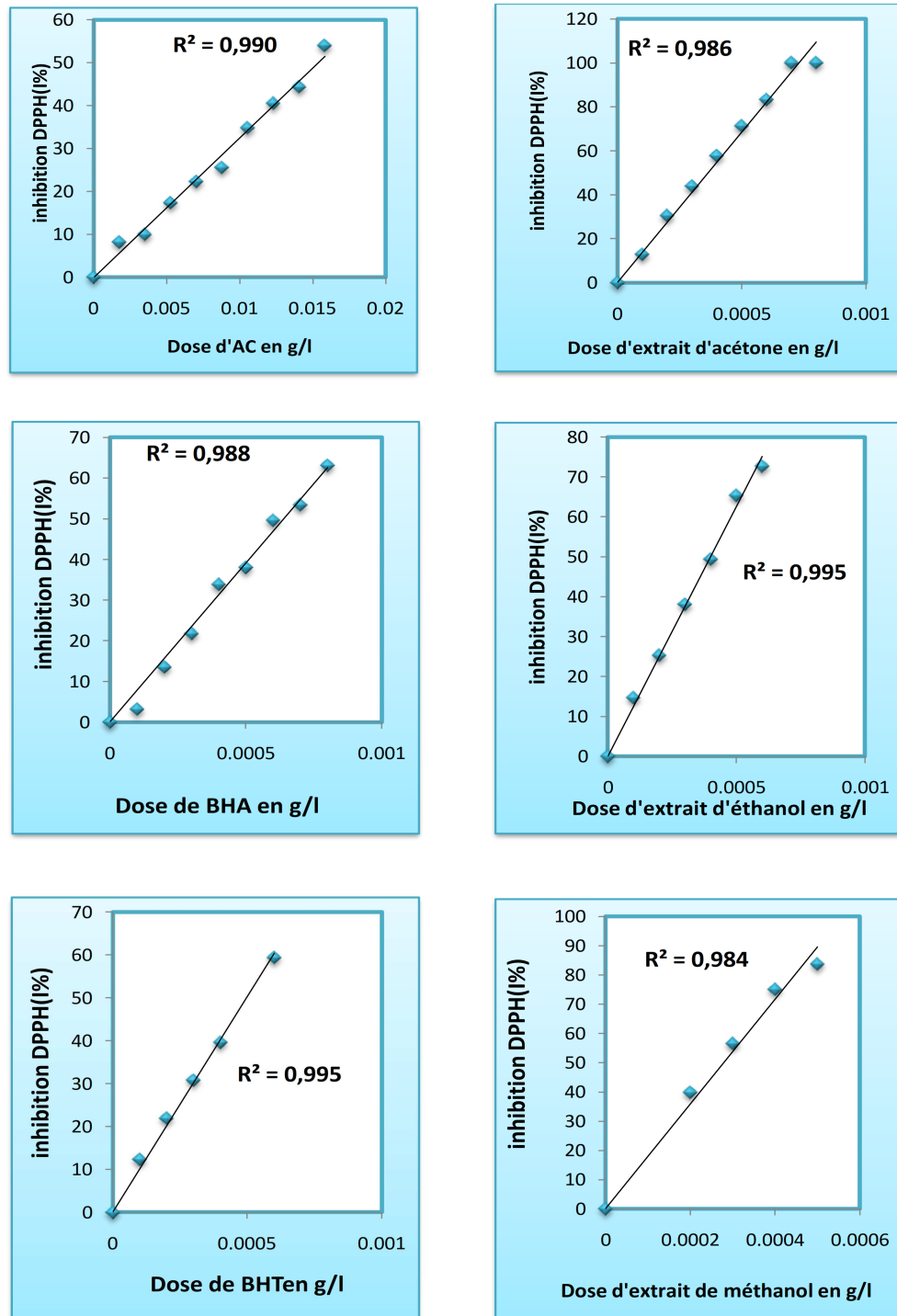


Fig. 14: Evaluation de la réduction du DPPH' par les extraits phénoliques, BHT BHA et Acide Ascorbique.

D'après les courbes précédentes obtenant la concentration correspondre pour éliminer 50% des radicaux libres à partir les extraits phénoliques IC_{50} (mg/l).

On résume les résultats des tests du pouvoir réductrice dans le tableau suivant:

Tableau 10: IC_{50} de DPPH des différents extraits étudiant.

	Acide ascorbique	BHA	BHT	Acétone	Méthanol	Ethanol
IC_{50} (mg/l)	15,389	115,154	10,898	13,729	11,052	15,969

Les résultats exprimés en tant que pourcentage de l'activité anti-radicalaire révèlent que tous les extraits testés ainsi que l'acide Ascorbique et BHA et BHT pris comme des standards pour comparer leurs IC_{50} des extraits phénoliques.

À des fins comparatives des antioxydants standards sont utilisés, il a montré une activité anti radicalaire très puissante avec IC_{50} de l'ordre de **10.898mg/l**, suivi de **15.389mg/l**, respectivement avec BHT et l'acide ascorbique est très faible de l'ordre de **115.154mg/l** avec BHA.

Pour les trois extraits, l'extrait méthanolique est le plus actif, son IC_{50} est de **11.052mg/l**, suivi de l'extrait acétonique avec une IC_{50} de l'ordre de **13.729mg/l** et enfin l'extrait de éthanol de l'ordre de **15.969mg/l**.

Donc l'extrait méthanolique est le plus actif en BHA et acide ascorbique.

V.5.1.2. Comparaison des IC_{50} avec les teneurs en polyphénols et flavonoïdes

A partir de figure (Fig.15), et quand on comparer les résultats obtenu on peut dire que:

La capacité à piéger le radical libre, DPPH a été mesurée pour chaque variété montré des valeurs très proche ce sont comprise entre **10.89** et **15.96** mg/l, sauf que l'BHA de IC_{50} d'ordre **115.154** mg/l, qui révèle la plus faible efficacité de péager le radical libre.

Donc en peut dire Cette activité pourrait être liée à sa richesse en polyphénols; Et on peut dire que nos extraits ont un pouvoir réducteur pour neutraliser les radicaux libres.

Cette étude a démontré l'importance des composés phénoliques comme une source d'anti oxydation et de chélation de radicaux libres, ces derniers étant à l'origine de plusieurs maladies cardiovasculaires et du développement de plusieurs cancers.

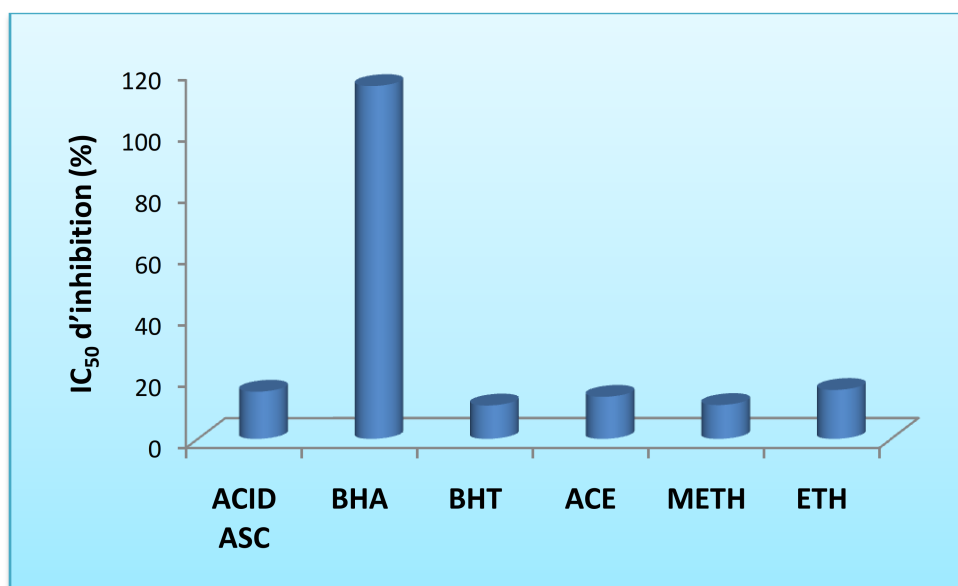


Fig. 15: Comparaison d'IC₅₀ d'inhibition DPPH par les extraits étudiés, BHA, BHT et AC.

V.5.2.Méthode de la réduction du fer FRAP

L'activité antioxydante des extraits de la plante étudiée a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP (Ferric reducing antioxidant power). 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. La présence des réducteurs dans les extraits de la plante provoque la réduction de Fe³⁺/ complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, Fe²⁺ peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm [26, 28].

La figure (fig.16) représente le pouvoir réducteur de l'acide ascorbique, des extraits de méthanol, d'éthanol et d'acétone de la plante, et celui de BHA et BHT à différentes concentrations.

Nous avons évalué le pouvoir réducteur de trois extraits et celui de BHA et BHT par rapport l'acide ascorbique en calculant les rapports Ki/K, tel que Ki représente les pentes des courbes des extraits et de BHA et BHT, alors que K est la pente de la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique.

Les différents extraits sont traités de la même façon que ceux des solutions standards de l'acide ascorbique (Vitamine C). Nous avons tracé les courbes représentant la variation du pouvoir réducteur exprimée en absorbance en fonction de l'inverse du nombre de dilution

L'ensemble des résultats obtenus par ce test est regroupé dans ces courbes suivantes qui illustrent AEAC des trois extraits et BHA, BHT:

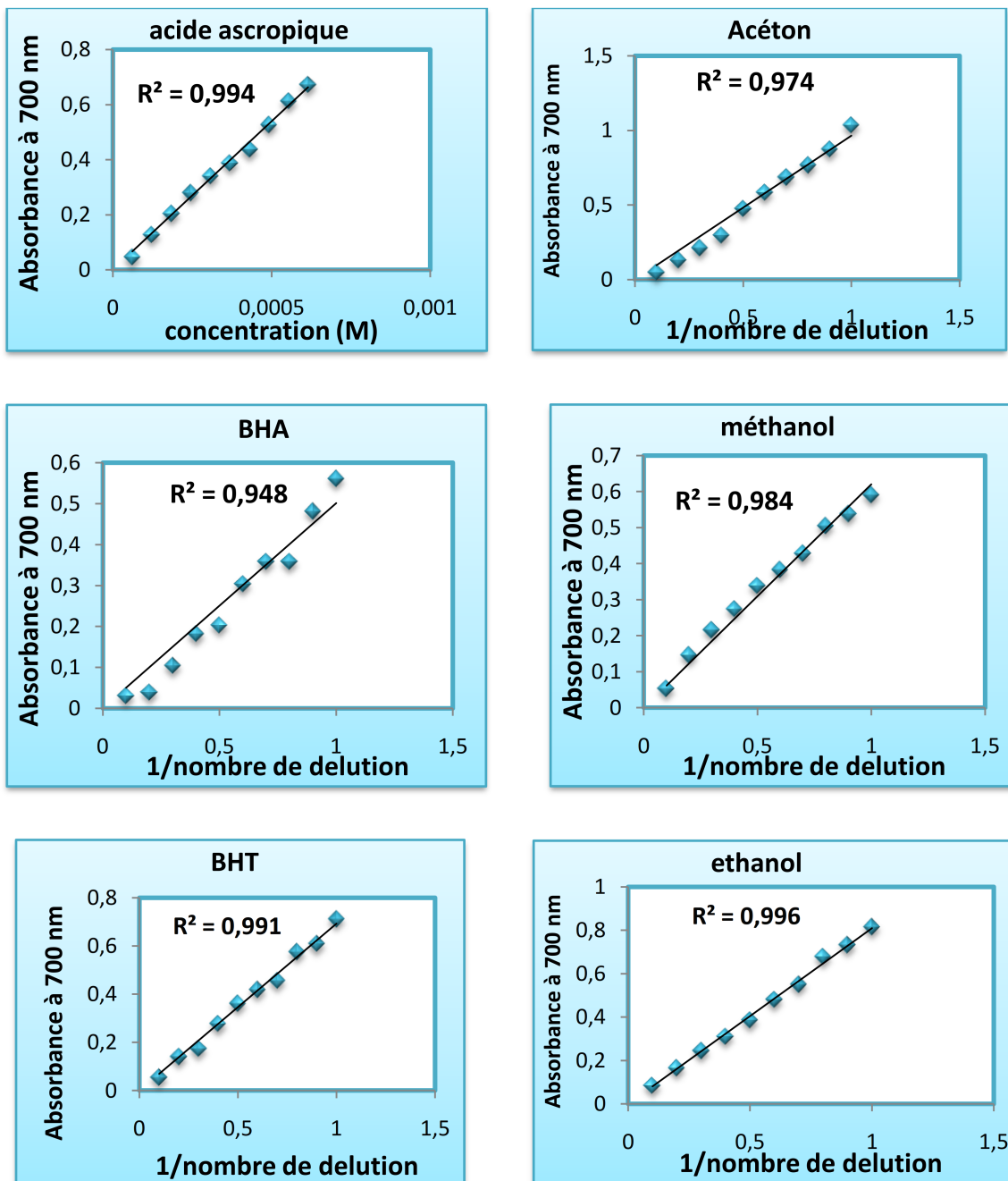


Fig. 16: Courbes représentant le pouvoir réductrice des extraits phénoliques.

On remarque que chaque une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits et des standards testés.

On résume les résultats des tests du pouvoir réductrice dans le tableau suivant:

Tableau 11: Les valeurs d'AEAC des différents extraits étudiés.

	BHA	BHT	Acétone	Méthanol	Ethanol
Activité AEAC (mM)	0.423	0.585	0.814	0.523	0.685

Les résultats d'activité réductrice exprimée en AEAC (tableau.11), montrent clairement que tous les extraits ont un pouvoir réducteur important.

Les valeurs des rapports AEAC pour le BHA, BHT et pour les extraits acétonique, méthanolique et éthanolique sont respectivement **0.423**, **0.585**, **0.814**, **0.523** et **0.685**mM équivalent acide ascorbique.

D'après ces valeurs, on constate que l'extrait acétonique possède une bonne action vis-à-vis Fe^{3+} présent dans la solution testée, suivi l'extrait éthanolique puis BHT et l'extrait méthanolique, et en fin de pouvoir réducteur très faible de BHA.

Ces résultats expliqués que l'extrait acétonique présentent un pouvoir réducteur important renferment des molécules ayant un potentiel réducteur donneur d'électron plus fort

Le pouvoir réducteur des trois extraits est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneurs d'électron. Par conséquent, les antioxydants peuvent être considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydations.

Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle [1].

Par comparaison des résultats obtenu dans l'histogramme suivants :

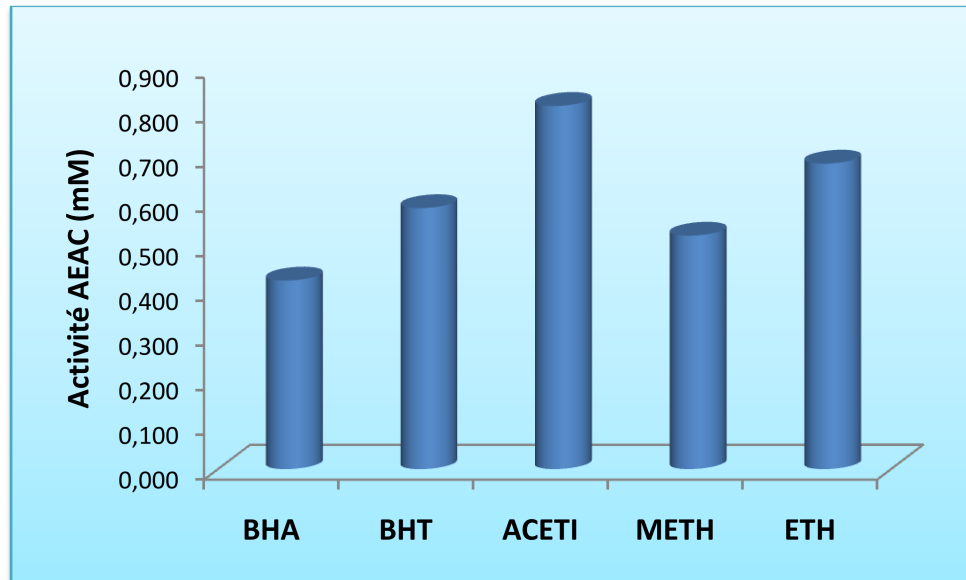


Fig. 17: Le pouvoir réducteur des extraits et de BHA, BHT.

Chapitre VI

Les corrélations entre les méthodes

VI.1. Les corrélations entre les méthodes

Dans cette partie nous avons cherché à établir une relation entre la présence des composés phénoliques, flavonoïdes et l'activité antioxydant de certains extraits. Cette relation établie une corrélation linéaire entre les composés phénoliques et la capacité antioxydant qu'ils manifestent.

VI.2.1. La Corrélation de Phénols Totaux avec Flavonoïdes.

Nous représentons dans la figure (fig18) la variation des valeurs de quantité polyphénols pour chaque extrait en fonction du contenu flavonoïdes.

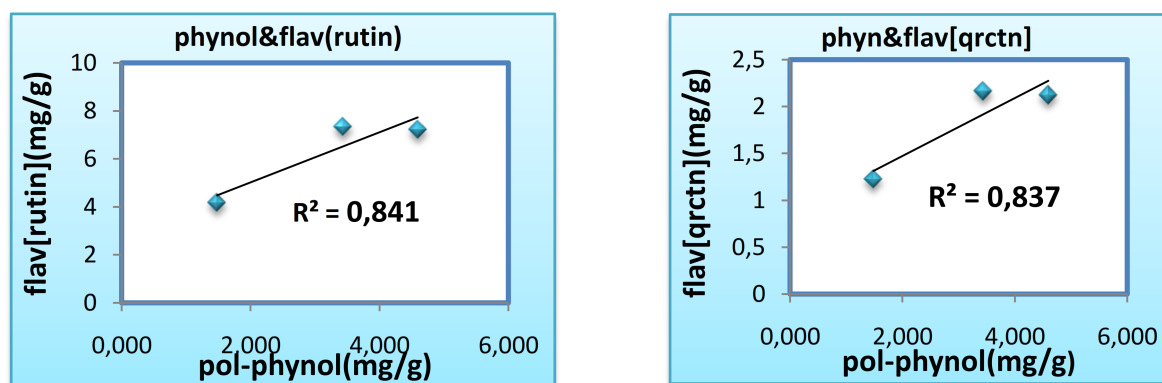


Fig. 18: Variation des valeurs phénols totaux en fonction du Flavonoïdes.

D'après la droite de corrélation, il est clair que le phénol totaux se corrèle positivement avec les Flavonoïdes avec un coefficient fort de corrélation de l'ordre $R^2=0.841$, en équivalent de Rutine, et $R^2 = 0.837$ en équivalent de Quercetine.

VI.2.2. La Corrélation de Phénols Totaux et Flavonoïde avec IC_{50} de DPPH

Quel que soit la nature du pouvoir antioxydant de nos extraits végétaux on peut constater qu'il existe une corrélation entre les pouvoirs antioxydant, anti radicalaire et les teneurs en phytoconstituants phénoliques (polyphénols, flavonoïdes).

L'idée de réévaluation de réactivité antioxydant est dans le but de trouver une corrélation d'activité antioxydant et le pouvoir inhibiteur des radicaux libre.

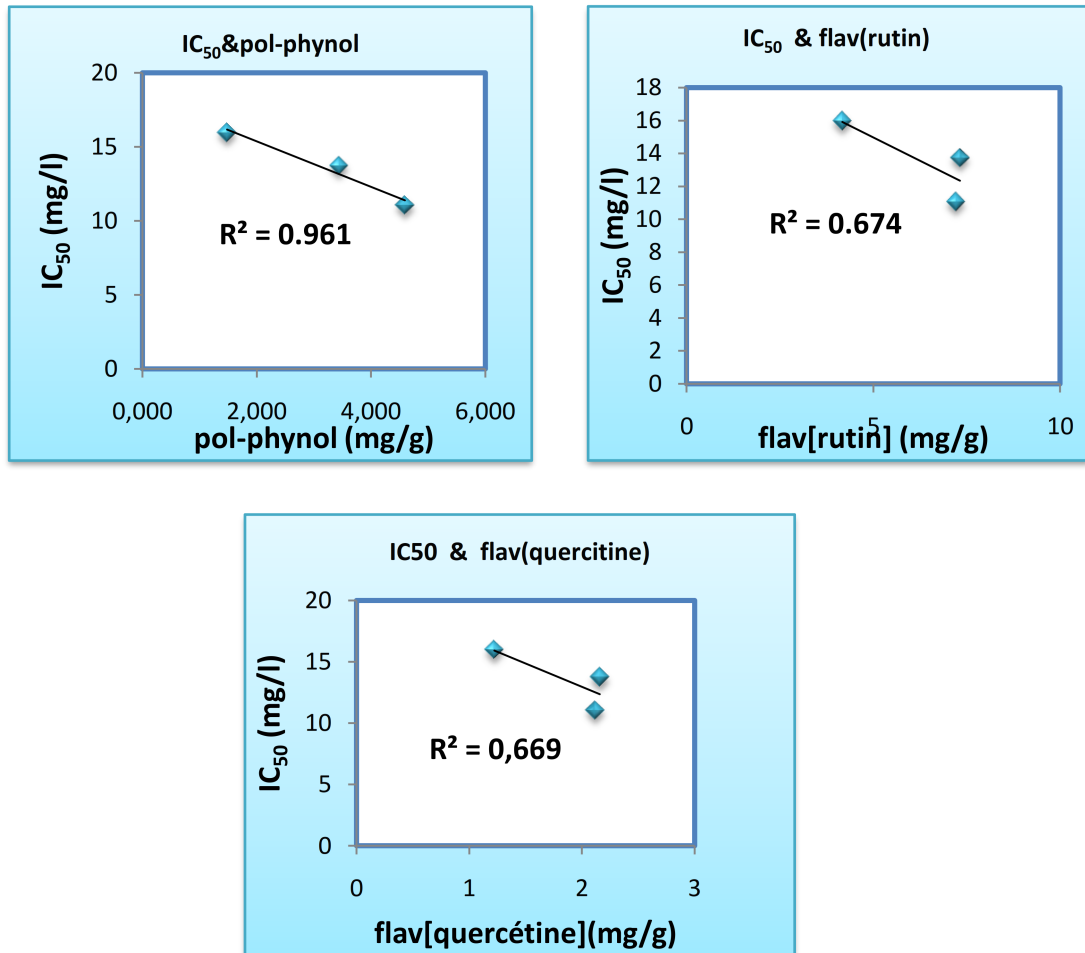


Fig. 19: Variation des valeurs IC₅₀ DPPH en fonction du contenu en phénols totaux, Flavonoïdes.

Suivant ces tracés (Fig.19), on peut déduire que les polyphénols totaux se corréle positivement par une corrélation plus fort en fonction de pouvoir antioxydant IC₅₀ avec un $R^2=0.961$, et pour la corrélation des flavonoïdes presque bien est de l'ordre $R^2=0.6$

VI.2.3.La Corrélation de Phénols Totaux et Flavonoïde avec AEAC de réduction de fer

Nous représentons dans la figure (Fig.20) la variation des valeurs de quantité polyphénols pour chaque extrait en fonction du contenu flavonoïdes.

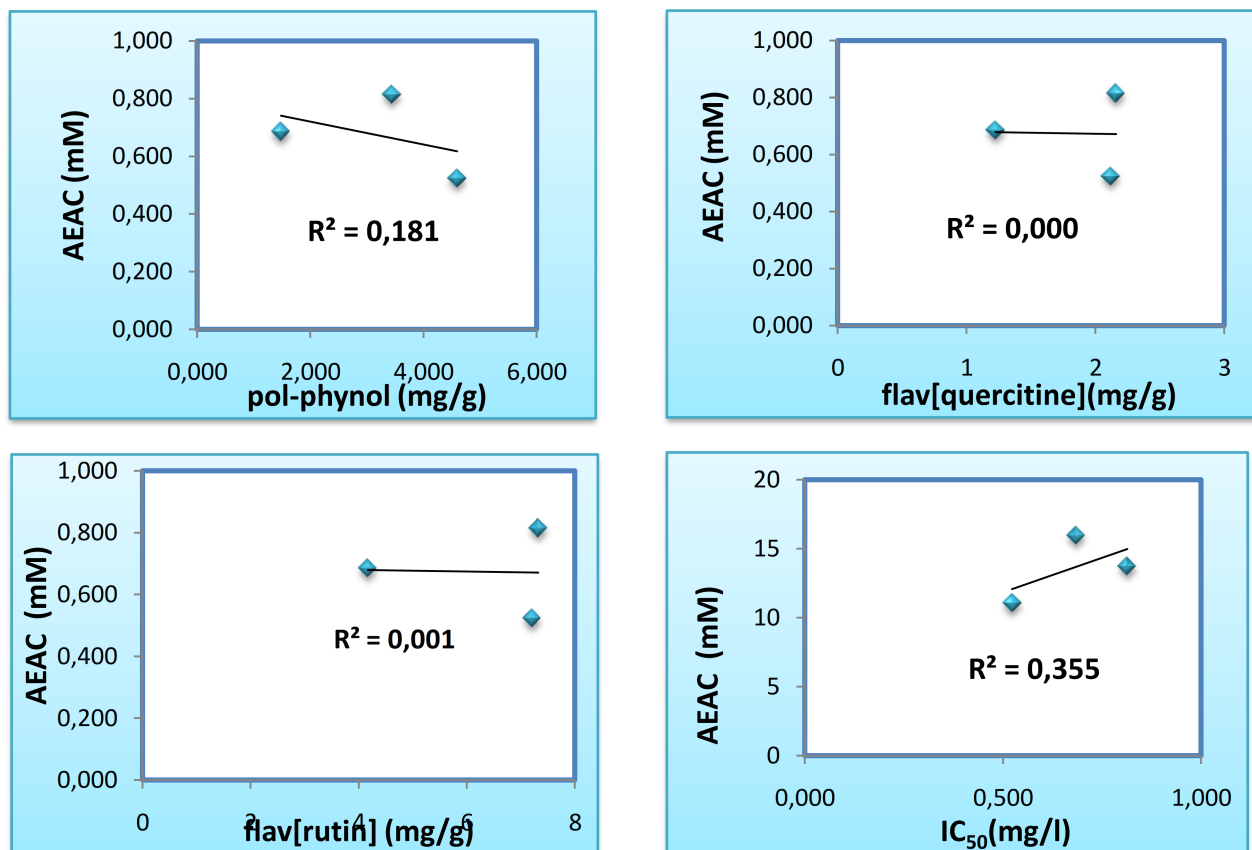


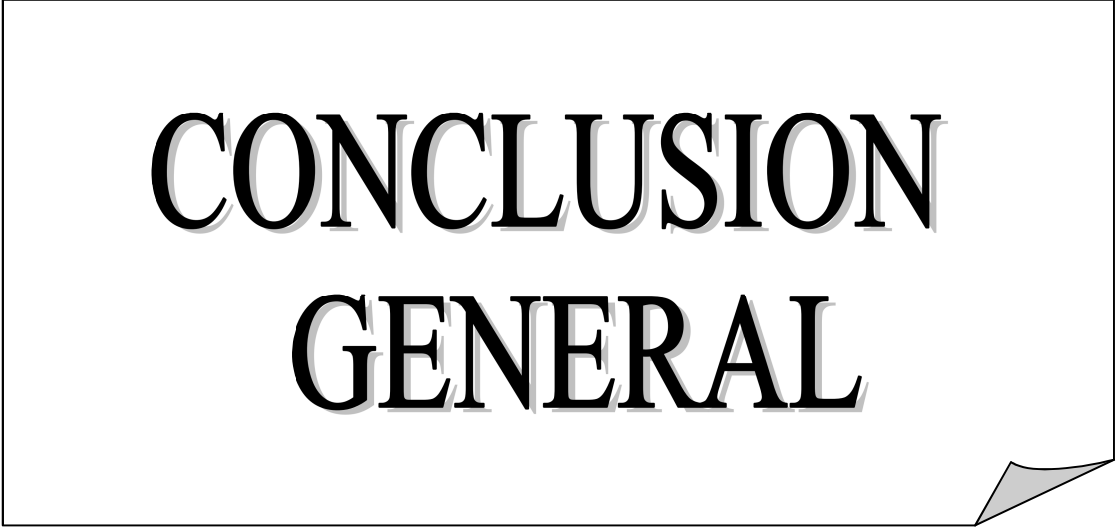
Fig. 20: Variation des valeurs AEAC en fonction du contenu en phénols totaux, IC₅₀ DPPH, Flavonoïdes.

D'après le droite de corrélation, on déduit que la corrélation est très faible du les phénols totaux et les flavonoïdes en fonction de pouvoir antioxydant AEAC représente un R^2 inférieur de **0.181**

Mais pour La corrélation entre les méthodes de mesure l'activité antioxydant, on peut dire que IC₅₀ se corréle en fonction de AEAC avec un coefficient de corrélation $R^2=0.355$

Ces résultats peut être confirmé que les composés des extraits de plante *Limoniastrum guyonianum* qui possède le pouvoir inhibiteur des radicaux libre, elles ne sont pas responsables de pouvoir antioxydant AEAC.

CONCLUSION GENERAL



Conclusion générale

La découverte des ressources naturelles du règne végétal reste capitale pour la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques.

La présente étude a porté sur l'espèce *Limoniastrum guyonianum*, elle a permis de mettre en évidence à travers un criblage phytochimique la présence des polyphénols comme les flavonoïdes.

Le dosage des phénols totaux des trois extraits acétonique, méthanolique et éthanolique a révélé des teneurs **3.43**, **4.6** et **1.48mg** par g de matériel végétal sec respectivement. L'extrait méthanolique représente la teneur la plus élevée en polyphénols.

D'autre part, le dosage des flavonoïdes a montré que les trois extraits: acétonique, méthanolique et éthanolique présentent des teneurs de l'ordre de **7.323**, **7.206**, et **4.167mg** respectivement en équivalent la Rutine, et de l'ordre **2.16**, **2.12** et **1.224mg/g** en équivalent Quercetine.

L'extrait acétonique représente la teneur la plus élevée en flavonoïdes équivalent la Rutine et la Quercetine.

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode de réduction de fer des extraits acétonique, méthanolique et éthanolique comparés avec l'acide ascorbique, a montré que l'extrait acétonique possède une bonne action (**0.814mM**) vis-à-vis Fe^{3+} présent dans la solution testée, suivi de l'extrait éthanolique (**0.685mM**) puis l'extrait méthanolique (**0.523mM**).

D'autre part, l'étude du pouvoir antioxydant de nos extraits par la méthode de piégeage du radical libre DPPH s'est montré modérée dont les valeurs de **IC₅₀** sont classées dans l'ordre du pouvoir antioxydant suivant: l'extrait méthanolique (**11.052mg/l**), l'extrait éthanolique (**15.969mg/l**) et l'extrait acétonique (**13.729mg/l**).

La comparaison de ces valeurs avec celle des antioxydants standards, BHT (**10.898mg/l**) et l'acide ascorbique (**15.389mg/l**), nous a permis de déduire que le pouvoir antioxydant de trois extraits testés est très proche, et plus forte que BHA (**115.154mg/l**).

Conclusion générale

D'autre part, l'étude de corrélation montre qu'il existe une bonne corrélation entre les quantités des polyphénols et l'efficacité antioxydante.

Notre étude montre clairement que l'espèce *Limoniastum guyonianum* est riche en composés phénoliques, et elle possède une activité antioxydante et un pouvoir réducteur important.

Une exploitation de ses propriétés antioxydantes implique une recherche plus poussée de ses principes actifs.

Un travail complémentaire s'impose en vue d'identifier les différentes molécules en particulier les composés phénoliques présents dans les extraits bruts secs et les purifier en utilisant diverses techniques chromatographiques notamment la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et des méthodes spectrales pour l'élucidation structurale.

Références

- [1]: hamidi. A. (2012) : Mémoire diplôme magister en chimie organique. *Limoniastrum guyonianum* (université kasdi-merbah Ouargla)
- [2]: Teixeira da Silva J-A. (2004) Mining the essential oils of the Anthemideae. *African Journal of Biotechnology*. 3 (12), 706-720.
- [3] : Farombi E. O. (2003) African indigenous plants with chemotherapeutic potentials and biotechnological approach to the production of bioactive prophylactic agents. *African Journal of Biotechnology*. 2 (12), 662-671.
- [4]: M^{lle} .Bellebcir .L (2008) Mémoire diplôme magister en biologie et écologie option biodiversité et production végétale. Etude des composés phénolique en tant marqueurs chez les céréales. (université mentouri constantine)
- [5]: Herbert, R.B. 1989. *The Biosynthesis of secondary metabolites*. 2^{ème} édition Chapman and Halle p 2, 11-115.
- [6] <http://fr.wikipedia.org/wiki>
- [7]: Harborne J.B., 1980. *Plant Phenolics: Encyclopedia of Plant Physiology, New series*, vol 8, 329-402.
- [8]: Zoubeidi. C. (2004) : Mémoire de fin d'étude Pour l'obtention du diplôme magister en Chimie organique. etude des antioxydants dans le *rosmarinus officinalis*. Labiatea (UV OUARGLA) .
- [9]: Ben Slimane .M et Bourasse .M.T (2010) contribution a l'étude de l' activite antioxydante de la plante *acacia arabica* ;. (Ingénieur d'état). Université kasdi-merbah Ouargla.
- [10]: M^{me} . bouhadjra .k (2011) etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthese sur la stabilite oxydative de l'huile d'olive vierge ;. Magister Chimie de l'environnement. Université mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.
- [11]: Lehucher-Michel, M.P., Lesgards, J.F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., Prost, M. (2001) Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*. **30**: 1076-1081

- [12]: Turrens. JF., Alexandre .A., Lehninger. AL. (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. Arch BiochemBiophys,237: 408-414.
- [13]: Berger, M.M. (2006) Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. Nutrition Clinique et Métabolisme. **20**: 48-53.
- [14]: Perrin J.L., (1992). Les composés mineurs et les antioxygènes naturels de l'olive et de son huile. Revue française des corps gras. N° 39. P 25-32.
- [15]: Moussaoui.R ; Siziani.D; Youyou.A; Sharrock.P and M.L.Fiallo.M. (2010). Antioxidant effect of phenolic compounds recovered from olive mill wastewater of Chemlal variety cultivated in Kabylia (Algeria) on the oxidative stability of virgin olive oil.Journal of Food, Agriculture & Environment. Vol.8 (3& 4): 8 6 - 8 9.
- [16]: <http://fr.wikipedia.org/wiki/Plumbaginaceae>.
- [17]: Singleton V.L., Ross J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent, Am. J. Enol. Vitic., (1965) Volume 16 (3), 144-158.
- [18]: Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Maamri S, Djireb F, & Stocker P.(2006). Phenolic extracts from various Algerian plants as strong inhibitors of porcine liver carboxylesterase. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 21, 719–726
- [19]: Lamaison et Carnet A. (1990). Teneurs en principaux flavonoids des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret D. C) en fonction de la vegetation. Pharm. Acta. Helv. 65, 315-320.
- [20]:Huang D-J., Lin C-D, Chen H-J. et Lin Y-H. (2004) Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam 'Tainong 57' constituents Bot. Bull. Acad. Sin. 45, 179-186.
- [21]: Leitão G.G., Leitão S. G. et Vilegas W. (2002) Quick Preparative Separation of Natural Naphthopyranones with Antioxidant Activity by High-Speed Counter-Current Chromatography. Z. Naturforsch. 57c, 1051-1055.

- [22]: Chen C-N, Weng M-S, Wu C-L et Lin J-K. (2004) Comparison of Radical Scavenging Activity, Cytotoxic Effects and Apoptosis Induction in Human Melanoma Cells by Taiwanese Propolis from Different Sources. *eCAM*. 1(2), 175-185.
- [23]: Mensor L. L., Menezes F. S., Leitão G. G., Reis A. S., Santos T. C., Coube C. S. et Leitão S. G. (2001) Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant isoactivity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res.* 15, 127-130.
- [24]: Oyaizu, M. ; 1986. Studies on products of browning reaction-Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307–315.
- [25]: Majhenic L., Kerget M.S., Knez Z. ; 2007. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 104, 1258–1268.
- [26]: Benzie I.F.F., Strain J.J. ; 1996. The ferric reducing ability of plasma as a measure of “antioxidant power” the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.
- [27] Li H-B. , Wong C-C., Cheng K-W., Feng C. ; 2008. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technology*, 41(3), 385–390.
- [28]: Chung Y-C., Chang C-T., Chao W-W., Lin C-F., Chou S-T. ; 2002. Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2454–2458.

ملخص

يتناول هذا البحث دراسة ثلاثة عينات لمستخلصات نبتة *Limoniastrum guyonianum* (الزيتة) بثلاثة مذيبات مختلفة القطبية هي الأسيتون والميثانول وإيثانول، قصد استخلاص المركبات الفينولية ثم التقدير الكمي لها عن طريق المطيافية فوق البنفسجية. تبين الدراسة إن نبتة الزيتة غنية بالمركبات الفينولية. بعدها تم تحديد مدى النشاطية المضادة للأكسدة لهذه المستخلصات بواسطة اختبارين هما DPPH واختبار إرجاع شوارد الحديد الثلاثي FRAP. حيث تم تحديد نسب التثبيط بدلالة التراكيز وحساب المقدار IC_{50} للعينات المدروسة وكذا المقدار AEAC. أعطت جميع المستخلصات نشاطية مضادة للأكسدة جيدة.

الكلمات المفتاحية: *Limoniastrum guyonianum*، الفينولات، الفلافانويدات، مضادة للأكسدة، الجذر الحر، المقدار IC_{50} , AEAC.

Résumé

Cette recherche est une étude sur trois échantillons d'extraits de la *Limoniastrum guyonianum* par trois solvants polaires différents sont : l'acétone, le méthanol, l'éthanol et ce grâce à l'extraction de composés phénoliques et de sa quantification par spectroscopie UV. L'étude montre que la plante *Limoniastrum guyonianum* est riche en composés phénoliques.

Ensuite on détermine l'activité antioxydant des extraits par deux essais, le test de DPPH et le test de réduction de fer FRAP. Et on détermine les taux d'inhibition par calculer le montant IC_{50} des échantillons étudiés, ainsi que le terme AEAC. Tous les extraits ont donné une bonne activité antioxydante.

Mots-clés: *Limoniastrum guyonianum*, Polyphénols, Flavonoïdes, antioxydants, radical libre, IC_{50} , AEAC.

Abstract

Find a study of three samples of plant extracts *Limoniastrum guyonianum* by three different polar solvents are: acetone, methanol, ethanol and this through the extraction of phenolic compounds and its quantification by UV spectroscopy. The study shows that the plant *Limoniastrum guyonianum* rich in phenolic compounds.

Then determine the activity antioxidant to this topic extracts by two tests DPPH and test Ferric reducing antioxidant power. Where damping inhibition by calculate the IC_{50} amount of samples studied, as well as the amount AEAC. All extracts have a good anti-oxidant.

Keywords: *Limoniastrum guyonianum*, Phenolic, Flavanoids, antioxidants, lib radical, IC_{50} , AEAC.