

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des sciences Alimentaires

MEMOIRE DE FIN DE CYCLE

**En vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat
Option : Contrôle de Qualité et Analyse**

THEME

Teneurs en composés phénoliques et activité
antioxydante de quelques matières végétales
locales

Réalisé par :

M^{elle} : MEZIANE Yasmina

M^{elle} : MEKAOUCHE Kahina

Membres de jury

Présidente : Mme BOUALI N.

Promotrice : Mme HASSISSENE N.

Co-promoteur : M^r ZAIDI F.

Examinatrice : Mme MARZOUK H.

Examinatrice : Mme BELHADI-ZENATI K.

2011/2012

Remerciements

Au terme de ce travail, nous tenons à remercier Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce travail.

Nous avons l'honneur et le plaisir de présenter notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à M^r ZAIDI F et Mme HASSISSENE N pour leurs précieuses aides, leurs orientations et le temps qu'ils nous ont accordé pour notre encadrement.

Nos remerciements les plus sincères à Mme BOUALI N d'avoir accepté de présider le jury, ainsi que Mme MARZOUK H et Mme BELHADI-ZENATI K d'examiner notre travail.

Merci également à toute l'équipe du laboratoire d'alimentation : Lila, Louisa, Nadia, Salima, Fatima et Mebarka...pour leur convivialité dont nous garderons un très agréable souvenir.

Nous tenons à exprimer notre vive gratitude à tous les enseignants qui ont participé de près ou de loin à notre formation, du primaire au cycle universitaire.

Nos remercions également tous ceux qui nous ont prêté main forte pour la mise au point de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à ceux que j'ai tant aimés avec beaucoup d'affection, mes parents.

Tous les mots du monde ne peuvent exprimer l'amour et le respect que je porte à ma mère Nora et mon père Mouhoub pour leur soutien et leurs sacrifices énormes.

A mes petits frères Zazak et Rayane

A mes adorables sœurs Roza, Katia et Sarah

A la mémoire de mes grands parents Yaya Nouara et djedi Mouhoub

A mes grands parents djedi Smail et Yaya Nouara

A mes oncles et tantes

A mes cousines et cousins

A mon amie Kahina pour toutes les épreuves et moments partagés je te remercie pour ta grande simplicité

Merci à tous mes amis (es) Nadir, Kenza, Hassina et Assia.

A tous(tes) mes camarades du laboratoire de Nutrition et Alimentation.

Et à toute la promotion CQA (2011/2012).

Merci

YASMINA

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à ceux que j'ai tant aimés .Je leur exprime mon affection et ma fierté de les avoir comme parents.

Tous les mots du monde ne peuvent exprimer l'amour et le respect que je porte à ma mère Malika et mon père Abd rrahim

Merci pour votre soutien et pour les sacrifices énormes

A mes frères Massi et Abdelhak et leurs femmes Salima et Fariza

A mon adorable sœur Assia

A mon cher fiancé Ahmed et toute sa famille

A mon neveu Rahim

A mon amie Yasmina pour toutes les épreuves et les moments partagés. Je te remercie pour ta grande simplicité.

Merci à tous mes amis (es) : Rosa, Farida, Zina, Nassima, Sonia

A tous (es) mes camarades du laboratoire de Nutrition et Alimentation.

Et à toute la promotion CQA 2011/2012

Merci.

KAHINA



Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Glossaire	
Introduction	1

Partie bibliographique

Chapitre I : Métabolites secondaires des végétaux

I-1-Les alcaloïdes.....	2
I-2-Les huiles essentielles.....	2
I-3-Les composés phénoliques	2
I-3-1-Classification	3
I-3-1-1) Les acides phénoliques	4
I-3-1-2) Les flavonoïdes	4
I-3-1-3 Les tanins	7
I-3-1-4) Les stilbènes	8
I-3-1-5) Lignines	8
I-4-3-Biosynthèse des composés phénoliques	8

Chapitre II : propriétés biologiques des composés phénoliques

II-1-Action sur les végétaux	10
II-2-Fonction organoleptique	10
II-3- Interaction protéines- polyphénols	10
II-4- Activité antinutritionnelle.....	11
II-5-Activité antimicrobienne	11
II-6- Activité neuroprotectrice	13
II-7-Activité anticancérigène	13
II-8- L'activité antihypertensive	13
II-9- L'activité anti inflammatoire	13
II-10- Activité antioxydante	14

Chapitre III : radicaux libres, stress oxydatif et activité antioxydante

III-1- Les radicaux libres	15
III-1-1-Les sources des radicaux libres.....	15
III-1-2-Les cibles des radicaux libres	15
III-2- Stress oxydatif	16
III-2-1-Origine du stress oxydatif	16
III-2-2-Maladies liées au stress oxydatif	16
III-3-Les antioxydants	17
III-3-1-Classification des antioxydants.....	17
III-3-2-Système de défense des antioxydants	17
III-3-2-1-Système de défense enzymatique	17
III-3-2-2- Système de défense non enzymatique	19

Chapitre IV : Généralités sur les plantes étudiées

IV-1-Romarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	22
IV-2-Myrte (<i>Myrtus communis</i>).....	22
IV-3-Genévrier (<i>Juniperus communis</i>).....	23
IV-4-Arbousier (<i>Arbutus unedo L.</i>).....	24
IV-5-Globulaire (<i>Globularia alypum L.</i>).....	24

Partie pratique

Chapitre V : Matériel et méthodes

V-1-Matériels végétaux	25
V-2-Méthodes.....	25
V-2-1-Extraction des polyphénols	25
V-2-2-Analyses phytochimiques	27
V-2-2-1-Dosage des polyphénols totaux solubles et les phénols attachés à la paroi.....	27
V-2-2-2-Dosage des flavonoïdes.....	28
V-2-2-3-Dosage des phénols polymérisés et des phénols simples non attachés à la protéine.....	28
V-2-3-Détermination de l'activité antioxydante.....	30
V-2-3-1- Mesure de l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique.....	30
V-2-3-2- Mesure l'activité antiradicalaire (DPPH).....	31
V-2-4- Analyse statistique.....	32

Chapitre VI Résultats et discussion

VI-1-Résultats.....	33
VI-1-1-Teneurs en phénols totaux (extraits solubles et attachés à la paroi).....	33
VI-1-2- Teneurs en flavonoïdes	35
VI-1-3- Teneurs en phénols polymérisés.....	36
VI-1-4- Inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique	38
VI-1-5-Activité antiradicalaire des extraits de plantes.....	39
VI-2-Discussion générale.....	41
Conclusion	43

Annexes

Références bibliographiques

Liste des abréviations

- Abs** : Absorbance
- AlCl₃**: Chlorure d'aluminium
- AS** : Anthocyanidine synthase
- BSA** : Bovin Sérum Albumin
- CHI** : Chalcones Flavanone isomérase
- CHS** : Chalcone synthase
- DFR** : Dihydroflavonol réductase
- DNS** : Difference Non Significatif
- DPPH** : 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
- DS** : Différence significative
- EAG** : Equivalent d'Acide Gallique
- EAT** : Equivalent d'Acide Tannique
- EQ** : Equivalent Quercitine
- ERO** : Espèces réactives de l'oxygène.
- F3OH** : Flavanone-3hydroxylase
- FDR** :Flavane-3,4-diols réductase
- FeCl₂** : Chlorure ferreux
- FeCl₃** : Chlorure ferrique
- FLS** : Flavonols synthétase
- FS** : Flavones synthétase
- GT** :Glucosyltransférases
- IFS** : Isoflavones synthétase
- Na₂CO₃** : carbonate de sodium
- NaOH** : Hydroxyde de Sodium
- PP** : Phénols Polymérisés
- PSAP** : Phénols simples attachés à la paroi
- PSNAP** : Phénols simples non attachés à la protéine
- PTS** : phénols totaux solubles
- ROS**: Réactive Oxygene Species
- SDS/TEA**: Sodium Dodecyl Sulfate/TriEthanol Amine
- SOD**: Superoxide dismutase

Liste des figures

Figure 1: Classification des composés phénoliques.....	3
Figure 2: Structure de base des flavonoïdes.....	4
Figure 3 : Exemple de structure d'un tanin condensé.....	7
Figure 4 : La structure des stilbènes.....	8
Figure 5 : Les grandes lignes de biosynthèse des principaux groupes de composés phénoliques.....	9
Figure 6 : Mécanisme d'action des isoflavones sur le métabolisme du virus.....	12
Figure 7 : Classification des antioxydants.....	18
Figure 8 : Structure de la vitamine E.....	19
Figure 9 : Structure de la vitamine C.....	20
Figure 10 : Structure de la vitamine A.....	20
Figure 11 : <i>Rosmarinus officinalis</i> dans son milieu naturel	22
Figure 12 : <i>Myrtus communis</i> dans son milieu naturel	23
Figure 13 : <i>Juniperus communis</i> dans son milieu naturel	23
Figure 14 : <i>Arbutus unedo</i> dans son milieu naturel	24
Figure 15 : <i>Globularia alypum</i> dans son milieu naturel	24
Figure 16 : Protocole d'extraction des composés phénoliques	26
Figure 17: Protocole de dosage des composés phénoliques totaux solubles et les phénols attachés à la paroi	27
Figure 18 : Protocole de dosage des flavonoïdes	28
Figure 19 : Protocole de dosage des phénols polymérisés et des phénols simples non attachés à la protéine.....	29
Figure 20 : Inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique	30
Figure 21 : Piégeage de DPPH par les flavonoïdes.....	31
Figure 22 : Activité scavenger du radical DPPH	32
Figure 23 : Teneurs en phénols totaux solubles des feuilles des plantes.....	33
Figure 24 : Teneurs en acides phénoliques attachés à la paroi cellulaire des feuilles des plantes.....	34
Figure 25 : Proportion en phénols totaux solubles et phénols attachés à la paroi des feuilles des plantes	35
Figure 26 : Teneurs en flavonoïdes des feuilles des plantes.....	36
Figure 27 : Teneurs en phénols polymérisés des feuilles des plantes.....	37

Figure 28 : Proportions en phénols attachés à la protéine des feuilles des plantes...	38
Figure 29 : Inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique	39
Figure 30 : Activité antiradicalaire des extraits des feuilles des plantes.....	40

Liste des tableaux

Tableau I : Les structures des principaux composés phénoliques6

Tableau II : Les principaux radicaux libres.....15

Glossaire

GLOSSAIRE

Alzheimer : Est une maladie neurodégénérative incurable du tissu cérébral qui entraîne la perte progressive et irréversible des fonctions mentales et notamment de la mémoire.

Antiseptiques : Sont des médicaments ayant pour but de détruire les germes pathogènes ou d'empêcher leur multiplication sur la peau et les muqueuses.

Lipoxygénase : Est un type de protéine enzymatique qui catalyse l'oxydation des acides gras.

Métalloprotéine : Est un terme générique pour toute protéine qui comporte un cofacteur métallique.

Parkinson : Est une maladie neurologique chronique affectant le système nerveux central responsable de troubles essentiellement moteurs d'évolution progressive.

Phytothérapie : D'un point de vue étymologique, le terme « phyto » dérive du grec ancien qui veut dire « végétal ». La phytothérapie est donc « la thérapie par le végétal ou par le monde végétal ».

Xanthine oxydase : Est une enzyme qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et qui de plus catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique.

L'apoptose : Est un processus par le quel les cellules déclenchent leur auto-destructions en réponse à un signal.

Rétrovirus : Groupe de virus à acide ribonucléique, dont fait partie le virus du SIDA. à la différence des autres virus l'ARN des rétrovirus se réplique comme l'ADN.

Transcriptase réverse : Enzyme permettant la synthèse de l'ADN à partir de l'ARN

Phagocytoses : Est le procédé par le quel les microbes sont détruits par certains globules blancs ou leucocytes.

In vivo : Se dit d'une opération biologique effectuée dans l'organisme.

In vitro : Se dit d'une opération biologique effectuée hors de l'organisme.

L'angiotensine : Substrat protidique qui résulte de l'action de la rénine sur l'angiotensinogène. Elle provoque une vasoconstriction des artérioles des reins et une hypertension.

Protéine globulaire : Egalement appelée globuline ou sphéroprotéine est l'une des deux principales classes de protéines, comprenant des protéines de forme globulaire qui sont plus ou moins solubles en milieu aqueux (dans lequel elles forment des solutions colloïdales).

Phosphodiesterase : Est une enzyme hydrolysant les liaisons phosphodiester, un groupe de liaisons riche en énergie reliant entre eux des atomes de phosphore dans un groupement phosphate et deux autres molécules via deux liaisons ester.

L'élastase : Désigne une enzyme digestive de la famille des serine protéases qui catalyse l'hydrolyse des liaisons peptidiques au niveau des acides aminés neutres.

La protéine kinase : Est une enzymes qui catalyse le transfert d'un groupe phosphate de l'adénosine triphosphate (ATP) sur l'hydroxyle (groupe -OH) des chaînes latérales des acides aminés ayant une fonction alcool : sérine, thréonine et tyrosine.

Topoisomérase : Sont des enzymes qui contrôlent la structure topologique de l'ADN en générant des coupures transitoires dans celui-ci et en catalysant le passage des segments d'ADN à travers ces coupures avant de les refermer. Elles permettent notamment d'ajouter et d'enlever des supertours dans les molécules d'ADN. Elles jouent un rôle essentiel lors de nombreuses étapes de la vie cellulaire (réplication, transcription, séparation des chromosomes, etc.).

La cycloxygénase : Est une enzyme qui permet la formation de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Son action est inhibée par les comme l'aspirine.

Peroxisome : Est un organite cellulaire entouré par une membrane simple, Il est chargé de la détoxification de la cellule par dégradation du peroxyde d'hydrogène .

Maladie de Wilson : Est une maladie génétique secondaire liée à une accumulation de cuivre dans l'organisme en se manifestant par des atteintes du foie et du système nerveux.

Introduction

Depuis la nuit des temps, les hommes apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes. Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours à leurs propriétés curatives. A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales **(Iserin, 2001)**.

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. Parmi ces composés, on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se caractérisent par une grande diversité de structure chimique et un très large éventail d'activités biologiques **(Wills et Morgan, 2000)** et demeurent l'objet de nombreuses recherches *in vivo* et *in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels **(Marc et al., 2004 ; Huang et al., 2005 ; Popovici et al., 2009)**.

Ce travail est motivé par la volonté de valoriser les plantes aromatiques et médicinales locales de la wilaya de Bejaia qui passe par une connaissance des éléments chimiques présents dans les plantes, l'évaluation du potentiel de ces résultats et la détermination des modalités d'utilisation futures.

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre travail. Il porte d'une part sur l'extraction et la quantification des composés phénoliques des feuilles de cinq plantes aromatiques et médicinales locales largement utilisées par la population : le Romarin (*Rosmarinus officinalis L.*), le Myrte commun (*Myrtus communis L.*), le Genévrier commun (*Juniperus communis L.*), l'Arbousier (*Arbutus unedo L.*) et le Globulaire (*Globularia alypum L.*) et d'autre part sur l'activité antioxydante des différents extraits obtenus à partir de ces plantes.

Partie Théorique

Chapitre I

Les métabolites secondaires des végétaux

Les métabolites primaires interviennent dans différentes fonctions de la vie : la division cellulaire, la croissance, la respiration, stockage des substances et la reproduction. En biologie, ces métabolites s'opposent aux métabolites secondaires (**Bourgoud *et al.*, 2001**). Ces derniers sont synthétisés par les cellules végétales et font l'objet de plusieurs recherches. Les métabolites secondaires sont généralement présents dans toutes les plantes à des quantités et qualités différentes (**Dorninburg et Knorr, 1995 ; Castellanos et Espinosa-Garcia, 1997**).

I-1-Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances azotées, basiques, d'origine naturelle et de distribution restreinte ; ils ont une structure complexe (**Bruneton, 1999**). A l'état naturel ils sont salifiés par des acides organiques ou combinés à des tanins. Les alcaloïdes ne se rencontrent pas chez toutes les plantes (**Guignard, 1979**). Plus de 200 alcaloïdes sont identifiés dans 300 plantes différentes, dont les principales sources sont selon **Prakash *et al.* (1999)** les légumineuses et la famille des Borraginacées.

I-2-Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des produits de composition assez complexe qui renferment les principes volatils contenus dans les végétaux. Leur volatilité les différencie des huiles fixes (**Bruneton, 1999**). Se sont des mélanges de deux groupes : les terpénoides et les composés aromatiques dérivés du phénylpropanes. Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs et ils peuvent être stockés dans tous les organes végétaux (**Bruneton, 2009**).

I-3-Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires (**Balasundram *et al.*, 2006**), ils sont synthétisés par les plantes durant la croissance et pour répondre à différentes situations (stress, UV, radiation...) (**Hurtado-Fernandez *et al.*, 2010**). Plus de 8000 structures ont été identifiées (**Macheix *et al.*, 2005 ; Hurtado-Fernandez *et al.*, 2010**). Les composés phénoliques appartiennent à la famille des composés aromatiques (**Guignard, 1979**). Ils se reconnaissent par la présence d'un ou plusieurs groupes hydroxyles modifiés ou pas ; attachés à une structure aromatique (**Richter, 1993**). Les composés phénoliques sont l'un des groupes bioactifs des fruits, légumes et graines ; ils sont localisés au niveau des tissus des plantes (**Li *et al.*, 2011**).

I-3-1-classification

Les composés phénoliques peuvent être classés (Figure 1) en se basant sur :

- Le nombre de carbones
- La structure de base du phénol (Hurtado-Fernandez *et al.*, 2010).

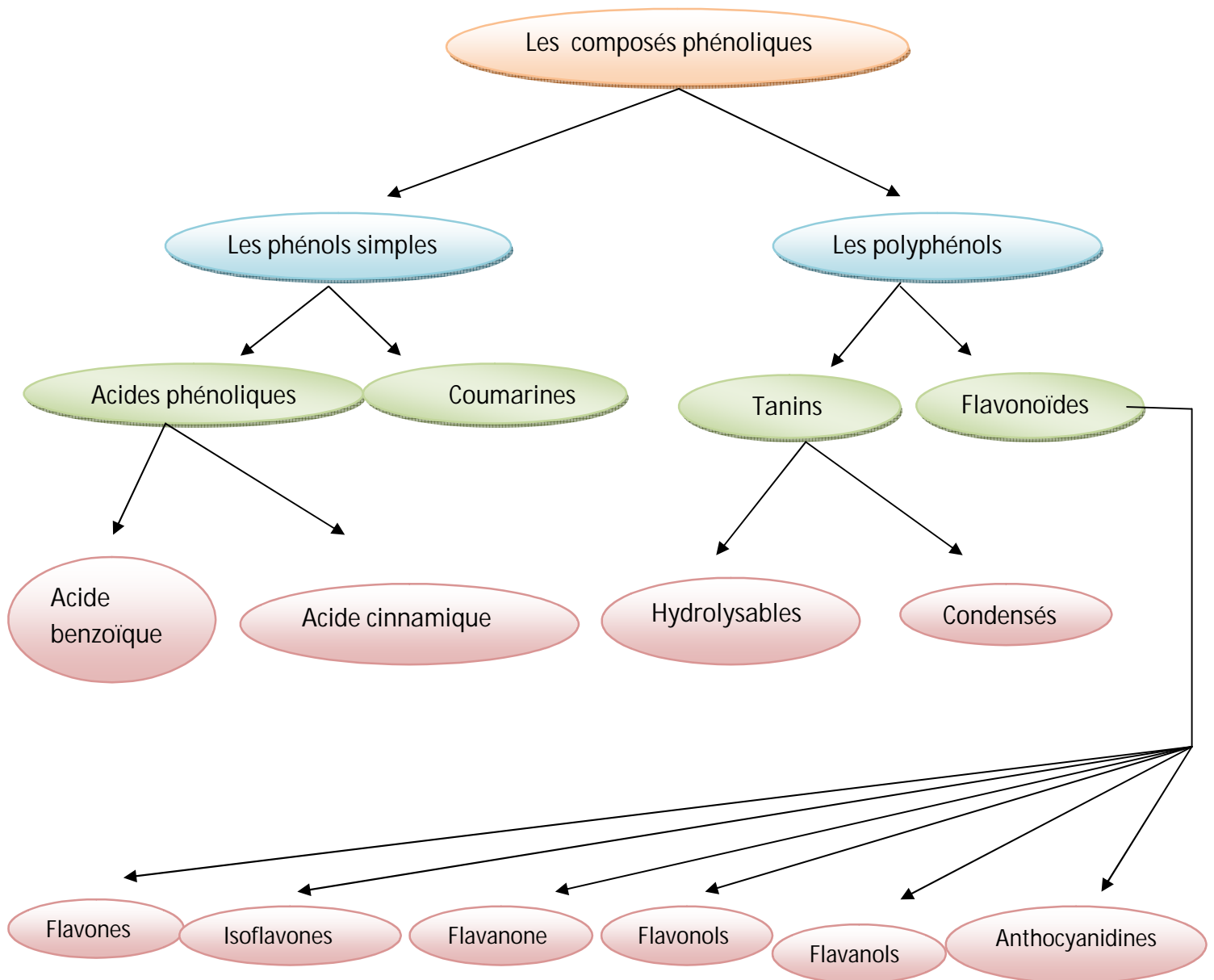


Figure 1: Classification des composés phénoliques (Hurtado-fernandez *et al.*, 2010)

I-3-1-1) Les acides phénoliques

Ce sont des acides phénoliques simples (**Hurtado-Fernandez *et al.*, 2010**), largement retrouvés dans la nature (**Lee, 2011**) ; ils sont composés d'un noyau aromatique substitué de groupements hydroxyles et d'une fonction acide et parfois de groupements méthyles (**Richter, 1993**). Les acides phénoliques sont rarement présents à l'état libre ; ils sont généralement liés avec des molécules organiques donnant des esters avec les sucres et les alcools acides, et donnant les phénolamides avec les mono ou diamines (**Machaix *et al.*, 2005**). Les acides phénoliques (libres ou liés à d'autres molécules) représentent environ un tiers des composés phénoliques (**Zadernowski *et al.*, 2009**).

I-3-1-2) Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde dérive du latin (flavus=jaune) (**Richter, 1993**). Les flavonoïdes ont une structure générale de C₁₅ (C₆-C₃-C₆) (**Machaix *et al.*, 2005** ; **Balasundram *et al.*, 2006** ; **Ghasemnezhad *et al.*, 2011**). Ils se composent de deux noyaux benzéniques (Figure2) désignés par A et B réunis par une chaîne à trois carbones qui forme un anneau hétérocyclique oxygéné appelé anneau C (**Guignard, 1979**). La plus part des flavonoïdes se trouvent sous forme d'aglycone lié avec des glycosides, des constituants glucidiques différents peuvent se fixer aux groupements hydroxyles du cycle A ou plus fréquemment à la position C3 de l'hétérocycle C (**Richter, 1993**). Les flavonoïdes représentent la plus grande classe des polyphénols (**Heim *et al.*, 2002** ; **Valls *et al.*, 2009**) et sont largement distribués dans les feuilles, les graines, les écorces et les fleurs des plantes . Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés jusqu'ici. Ils protègent la plante des UV, microorganismes pathogènes et des herbivores (**Heim *et al.*, 2002**).

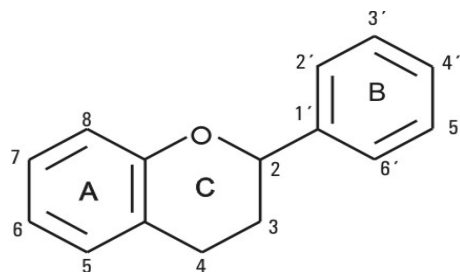


Figure 2: Structure de base des flavonoïdes
(**Rackova *et al.*, 2005**)

La classification (Tableau I) des flavonoïdes selon **Valls et al. (2009)** est basée sur :

- le degré d'hydroxylation des différents cycles
- le niveau de méthylation
- le niveau de glycosylation.

a) Flavones et isoflavones

La structure des flavones et isoflavones est composée de deux anneaux aromatiques A et B liés à l'anneau hétérocycle oxygéné C (**Luthria et al., 2007 ;Valls et al., 2009**) ayant une double liaison entre C2 et C3 de l'anneau hétérocyclique (**Fliegmann et al.,2010**). La position de l'anneau B est à l'origine de la différenciation de ces deux classes de flavonoïdes : C1 de l'anneau B est lié à C2 de l'anneau C dans les flavones ; alors qu'il est lié à C3 de l'anneau C dans les isoflavones (**Valls et al., 2009**).

Des études bibliographiques ont montré que les isoflavones possèdent des propriétés antivirales importantes (**Andres et al., 2009**).

b) Flavanones

Ils ont une double liaison de moins dans leurs hétérocycles que les flavones et les isoflavones (**Richter, 1993**). Incolores, ils absorbent fortement dans l'ultraviolet (**Guignard, 1979**).

c) Flavanols et flavanidiol

Ils composent le groupe des tanins condensés peu ou pas du tous hydrolysables, les flavanols appelés également flavane -3-ols ils se forment à partir de flavanediols par une seule réaction non enzymatique en une seule étape (**Richter, 1993**).

Les flavanediols ou flavane-3,4-diol appelés également leuco-anthocyanes sont incolores et portent deux groupements hydroxyles sur la chaîne réunissant les deux noyaux benzéniques (en position 3,4) (**Guignard, 1979**).

d) Flavonols

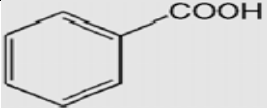
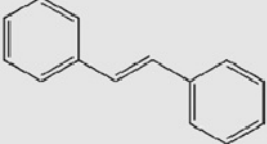
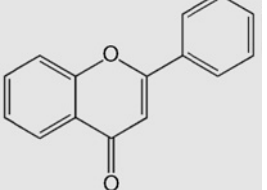
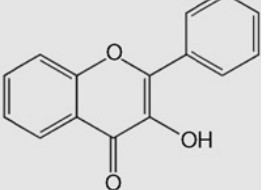
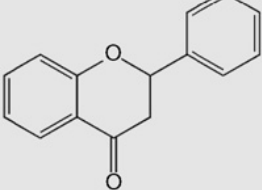
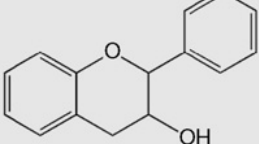
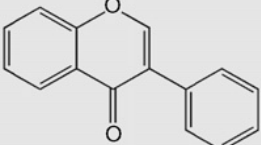
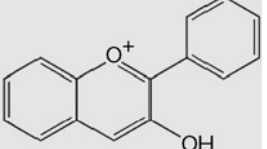
Ils dérivent des flavones par addition d'un groupement hydroxyle en position 3 de l'hétérocycle C (**Guignard, 1979**) ; ils colorient certaines fleurs en jaunes (**Richter, 1993**).

e) Anthocyanine

Ils dérivent du grec (antho : fleur, cyan : bleu) (**Valls et al., 2009**). L'anthocyanine est un pigment vacuolaire responsable de la couleur rouge ou bleue de beaucoup de fruits et légumes comme les framboises, cassis, aubergines, betterave ... (**Richter, 1993**).

Il est également utilisé comme colorant alimentaire en plus de ses propriétés anti oxydantes, anti-inflammatoires et anti cancérigènes. Ce sont des hétérosides d'unités d'aglycone (anthocyanidine) dérivés de l'ion flavylum. Les propriétés chimiques, la stabilité et la couleur sont influencées par le nombre de groupements hydroxyles, le nombre et la nature du sucre lié à l'anthocyanidine (Valls *et al.*, 2009) .

Tableau I : Les structures des principaux composés phénoliques (Valls *et al.*,2009)

Classes	Structure	Exemples	Aliments
Acide Phénolique Acide hydroxycinnamique		Acide Gallique Acide Caféique Acide Coumarique	-Café -Raisins -vin
Stilbenes		Resveratrol Piceid Viniferine	-Vin rouge - raisins
Flavones		Apigénine Lutéoline	-Celeri -Persil -Vin blanc
Flavonols		Quercétine Myricétine Kaempferol Rutine	-oignon -cerise -pomme
Flavanones		Naringénine Hesperidine Eriodictiol	-Orange -Citron
Flavanols Proanthocyanidines Tannins		Catéchine Epicatéchine Epigallocatechine Procyanidine	- Cacao - chocolat - vin - thé - pommes
Isoflavones		Genistéine Daidzéine Glycitéine	- Soja
Anthocyanines		Malvidine Cyanidine Malvidin-3-glucoside	-raisin - cerise - aubergine - betteraves

I-3-1-3 Les tanins

D'après **Macheix *et al.* (2005)** ; **Valls *et al.* (2009)** ils sont responsables du goût astringent et amer des vins et de certains fruits et légumes (cacao, thé...). Ce phénomène varie et dépend largement de leur degré de polymérisation et de leur structure (**Valls *et al.*, 2009**). Les tanins sont considérés comme une forme phénolique condensée capable de se lier aux protéines en solution et de provoquer leur précipitation. Classiquement, on distingue deux groupes de tanins qui diffèrent par leurs propriétés chimiques et leurs compositions (**Macheix *et al.*, 2005**).

➤ Les tanins hydrolysables

Très répandus chez les dicotylédones, ils se caractérisent par le fait qu'ils peuvent se dégrader par hydrolyse chimique (acide ou alcaline) ou enzymatique libérant alors une partie phénolique (l'acide gallique ou l'acide ellagique) (**Macheix *et al.*, 2005**).

➤ Les tanins condensés

Se sont des oligo ou polymères de flavane-3-ols et éventuellement de flavane-3,4-diols (Figure3) (**Richter, 1993**). Contrairement aux tanins hydrolysables ils résistent à l'hydrolyse et seules les attaques chimiques fortes permettent de les dégrader ; ils se transforment en pigment rouge par un traitement acide à chaud ; c'est pour cette raison que la forme dimère ou oligomère est appelée proanthocyanidine (**Macheix *et al.*, 2005 ; Valls *et al.*, 2009**).

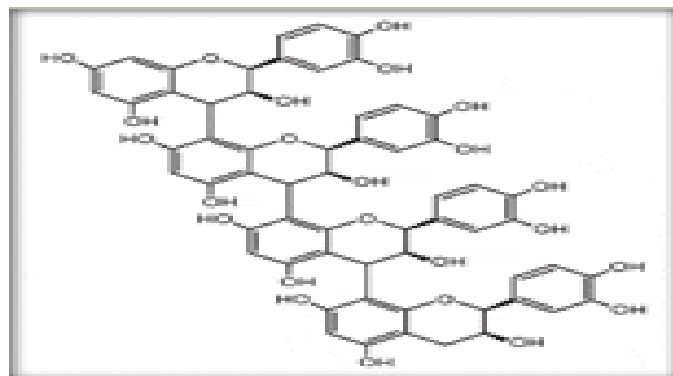
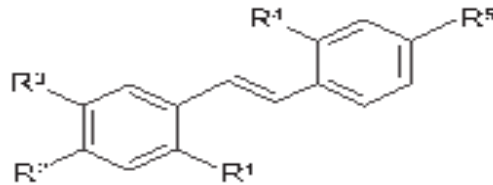


Figure 3 : Exemple de structure d'un tanin condensé
(**Macheix *et al.*, 2005**)

I-3-1-4) Les stilbènes

Les stilbènes sont des phytoalexines (**Sun et al ., 2006**), des dérivés de phénylpropanoïdes, produits par les plantes (**Goodwin et al., 2000**). D'après **Serazedinova et al. (2005)** leur squelette est basé sur la structure des résveratroles (Figure 4).



**Figure 4 : La structure des stilbènes
(Aslam et al., 2009)**

I-3-1-5) Lignines

Les lignines sont des composés phénoliques issues de la polymérisation des molécules de phénylpropane (**Jolivet et al., 2001**). Se sont des mélanges de trois constituants fondamentaux ; les alcools hydroxycinnamiques, coniféryliques et sinapyliques (**Richter, 1993**). Les lignines constituent 15 à 35% du bois des angiospermes et des gymnospermes (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**). Ils sont présents dans la paroi cellulaire associé avec les celluloses et l'hémicellulose (**Terashima et al., 2004**).

I-3-2-Biosynthèse des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont synthétisés (figure 5) par plusieurs voies

a- Voie de shikimate

L'acide cinnamique se forme par l'intermédiaire de l'acide shikimique, autrement dit par la voie de shikimate. Cette voie est aussi responsable de la synthèse des acides aminés, parmi lesquels, la phénylalanine (**Richter, 1993**), puis par désamination, aux acides cinnamiques et à de très nombreux dérivés : acide benzoïque, lignane, coumarine, etc (**Bruneton, 1993**).

b- Voie des poly acétates

L'acide acétique occupe une position centrale dans la biosynthèse des molécules complexes : une série de condensation entre unités dicarbonées aboutit à des chaînes polycétométhyléniques qui conduisent à une variété de composés aromatiques (**Bruneton, 2009**). La diversité structurale des polyphénols est due à cette double origine biosynthétique (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

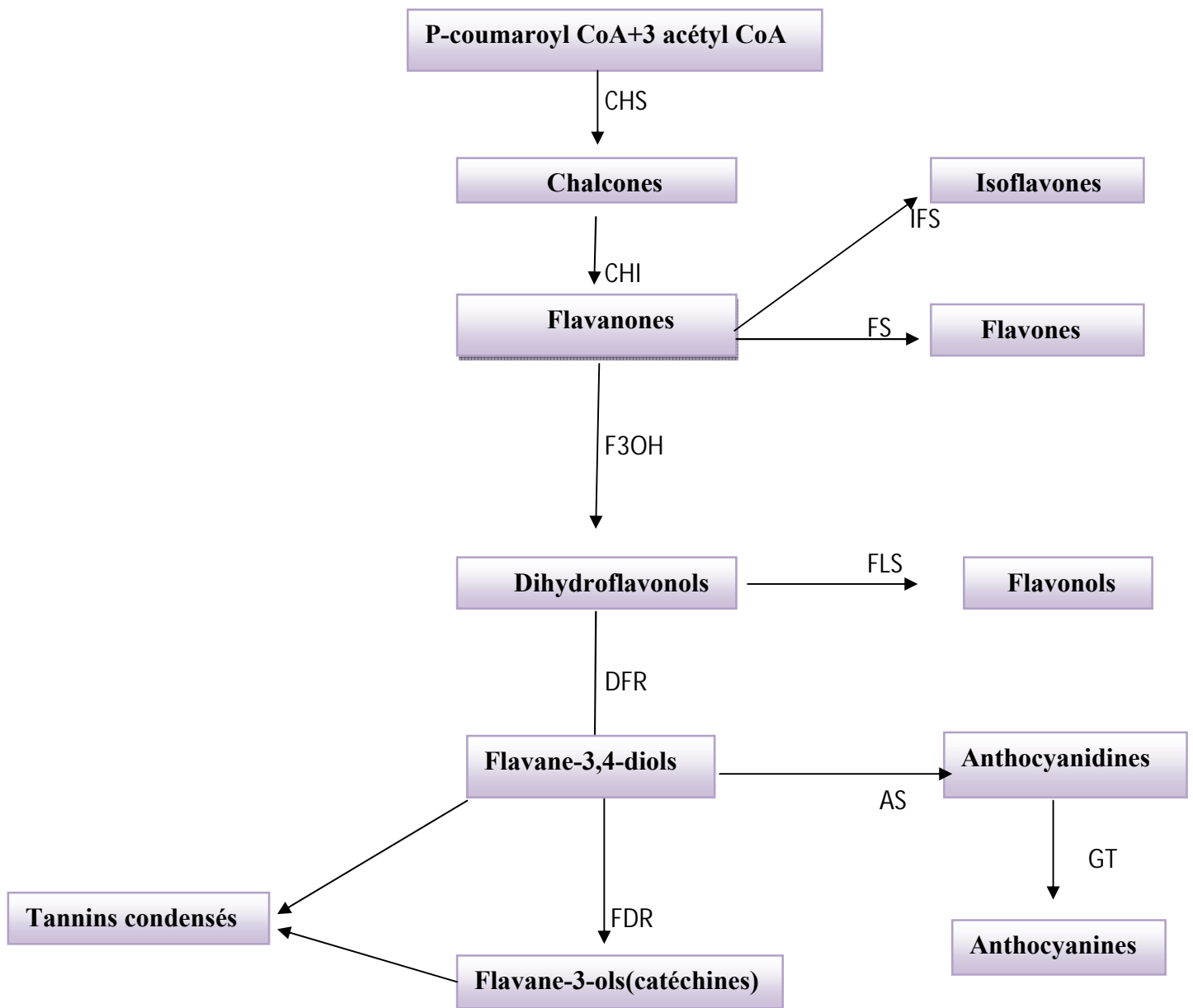


Figure 5 : les grandes lignes de biosynthèse de quelques classes de composés phénoliques.

(Macheix *et al.*, 2005)

Chapitre II

Propriétés biologiques des composés phénoliques

Les activités biologiques des plantes sont en relation directe avec la présence des métabolites secondaires (**Kamatou et al., 2008**). Certaines de ces activités sont résumées dans les paragraphes suivants

II-1-Action sur les végétaux

Les pigments de nature phénolique (anthocyanes, flavonols) participent à la coloration des organes végétaux. Les insectes et les oiseaux sont attirés par certaines couleurs et peuvent de ce fait assurer la pollinisation des graines (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

Tous les composés phénoliques absorbent les rayonnements UV et participent à la protection des végétaux contre les rayonnements solaires. Les lignines sont responsables de la rigidité des fibres végétales (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**) et les stilbènes permettent aux végétaux la résistance aux maladies fongiques (**Sun et al., 2006**).

II-2-Fonction organoleptique

Les composés phénoliques jouent un rôle important dans la qualité sensorielle des fruits et légumes et autres plantes (**Abu-Reidah et al., 2012**).

Les polyphénols peuvent contribuer aux saveurs acides grâce à la présence d'une fonction carboxylique ; mais leur contribution est négligeable dans les milieux fortement tamponnés comme les produits alimentaires d'origine végétale (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

Les tanins sont responsables du goût astringent et amer des vins et de certains fruits et légumes (cacao, thé...) (**Macheix et al., 2005 ; Valls et al., 2009**). Cette astringence dépend largement du degré de polymérisation et de la structure de ces composés (**Valls et al., 2009**).

II-3- Interaction protéines- polyphénols

Le noyau phénolique est une unité structurale très favorable à l'interaction avec certaines protéines par formation de liaisons hydrogènes et hydrophobes entraînant l'inhibition de certaines enzymes (**Almajano et al., 2008**).

D'après **Freitas et al. (2003)** les polyphénols peuvent se lier à la protéine globulaire (sérum albumine bovine) en plusieurs points de surface de leurs résidus aromatiques. Certains polyphénols inhibent la phosphodiesterase de l'AMP_c et l'aldose réductase. D'après **Bruneton (2009)** les flavonoïdes inhibent certaines enzymes telles que l'élastase.

La protéine kinase C et la phospho-inositide 3-kinase sont des enzymes impliquées dans la régulation de la multiplication cellulaire et de l'apoptose, sont efficacement inhibées par les flavones et les flavonols (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

II-4- Activité antinutritionnelle

Les tanins ont le pouvoir de former des complexes avec les macromolécules, en particulier avec les protéines (**Bruneton, 2009**). De ce fait, ils inhibent les enzymes digestives entraînant la diminution de la digestibilité (**Duenas et al., 2006**).

II-5-Activité antimicrobienne

II-5-1- Activité antivirale

Les flavonoïdes et principalement les flavones et isoflavones possèdent des propriétés antivirales importantes mises en évidence « *in vivo* » et « *in vitro* » sur une gamme importantes de virus ; aussi bien sur les virus à un brin que sur les virus à double brins d'ADN ou d'ARN.

Les flavonoïdes affectent la machinerie métabolique du virus à différent niveaux (Figure 6)

- ✓ La pénétration du virus dans la cellule hôte
- ✓ La réplication
- ✓ La traduction et la synthèse des protéines impliquées dans la formation de l'enveloppe virale.

Des études récentes ont montré l'impact des flavonoïdes sur le rétrovirus HIV responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) ; les flavones et isoflavones inhibent la réplication du rétrovirus et la transcriptase réverse, comme ils peuvent agir sur les glycoprotéines de surface en empêchant ainsi la liaison du virus sur la cellule hôte (**Andes et al., 2009**).

II-5-2- Activité antibactérienne

Le phénol fut le premier antiseptique et désinfectant largement utilisé pour réduire le risque d'infections durant les interventions chirurgicales .Il agit par dénaturation des protéines et altération des membranes cellulaires des bactéries (**Prescott et al., 2003**).

Les flavonoïdes peuvent affecter la croissance et le métabolisme bactérien par inhibition de la synthèse de l'acide nucléique, inhibition des fonctions liées aux membranes cytoplasmiques et du métabolisme énergétique.

Des études effectuées par **Rodriguez vaquero et al. (2006)** ont montré l'effet bactéricide de l'acide hydrocyanique sur *Listeria monocytogenes*. Cela est du

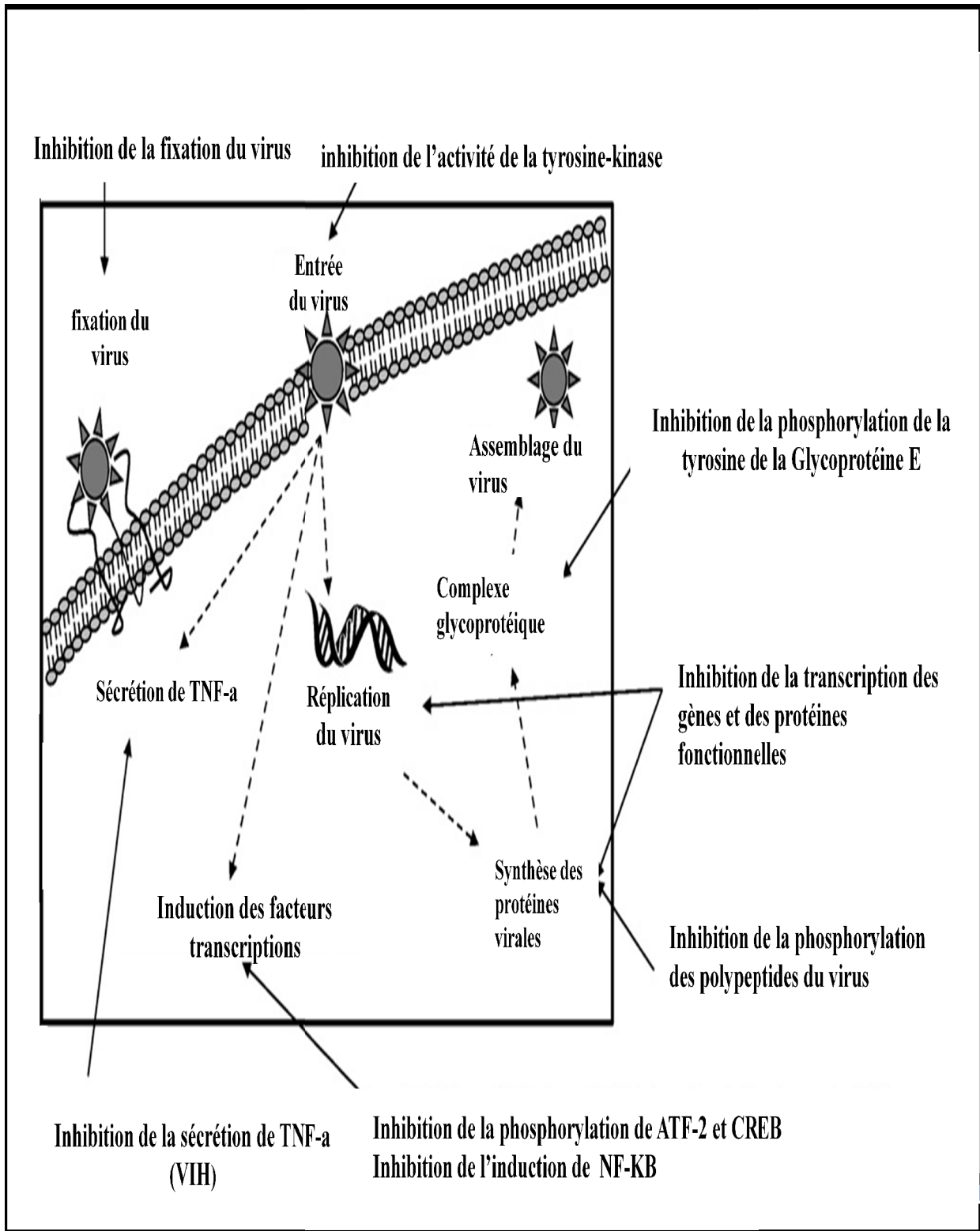


Figure 6 : Mécanisme d'action des isoflavones sur le métabolisme du virus (Andes et al., 2009)

à la propriété de la chaîne latérale de l'acide hydrocynamique qui est moins polaire comparée aux autres composés phénoliques et peut ainsi facilement traverser la membrane cellulaire de la bactérie et se lier aux constituants cellulaires perturbant ainsi le métabolisme bactérien. D'autres études sur *Escherichia coli* et *Salmonella enterica* ont montré que l'acide coumarique, l'acide cinnamique, l'acide caféique, et l'acide ferulique provoquaient une inhibition à une concentration élevée (10mg/ml).

II-6- Activité neuroprotectrice

Selon les travaux de **Boudet (2007)** les composés phénoliques ont un effet protecteur contre les maladies neuro-dégénératives telles que l'Alzheimer et la maladie de Parkinson qui sont associées au stress oxydatif.

II-7-Activité anticancérogène

D'après **Hale (2003)** l'acide caféique et l'acide ferulique empêchent la formation du cancer des poumons chez les souris. L'acide gallique inhibe la formation du cancer œsophagien chez les rats.

Certains flavonoïdes sont anti cancérogènes et inhibiteurs de la croissance des cellules tumorales (**Bruneton, 2009**). Ils favorisent la génération de la prostaglandine à partir de l'acide arachidonique retardant ainsi la phase promotionnelle de la cancérogénèse (**De Majia et al., 2010**).

Les polyphénols inhibent la topoisomérase nécessaire à la division cellulaire, ainsi que la prolifération des cellules cancéreuses (**De Majia et al., 2010**). Cette activité antitumorale des polyphénols est due, d'après **Shi et al. (2009)** aux propriétés des tanins à se complexer avec les protéines.

II-8- L'activité antihypertensive

Selon **Park et Jhon (2009)** des études effectuées *in vitro* ont montré que les composés phénoliques inhibent l'enzyme responsable de la formation de l'angiotensine qui est à l'origine de l'augmentation de la tension artérielle.

II-9- L'activité anti inflammatoire

Les composés phénoliques et précisément les anthocyanidines inhibent la lipoxygénase et la cyclooxygénase. Ces dernières sont impliquées dans la biosynthèse des médiateurs inflammatoires lipidiques comme la leucotriène et la prostaglandine. L'inhibition de ces deux enzymes prévient les maladies liées à l'inflammation (**Xanthopoulou et al., 2009 ; Sreerama et al., 2012**).

II-10- Activité antioxydante

Plusieurs composés phénoliques extraits à partir de plantes sont des antioxydants puissants (**Shikanga et al., 2010**). Les forts caractères réducteurs et donneurs d'atome hydrogène des polyphénols se manifestent par des réactions rapides avec les espèces oxygénées réactives (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

D'après **Bruneton (2009)** les acides-phénols sont des piègeurs de radicaux libres. Ils ont la capacité de réduire l'oxydation qui est à l'origine de plusieurs maladies (**Siddhuraju et Manian, 2007**).

Le groupe de composés naturels le plus exploré quant à leur activité antioxydante est celui des flavonoïdes qui ont, selon **Fotti et Ruberto (2001)**, des principes actifs capteurs de radicaux libres oxygénés.

Les composés phénoliques peuvent défendre contre le stress oxydatif et les espèces réactives de l'oxygène (**Heo et al., 2006**). Ils sont des chélateurs de métaux (**Hayouni et al., 2007**).

Grâce à cette activité biologique, les composés phénoliques sont utilisés comme des ingrédients fonctionnels dans les produits alimentaires (**Hayouni et al., 2007**).

Chapitre III

Radicaux libres, Stress
oxydatif et activité
antioxydante

III-1- Les radicaux libres

Un radical libre est une molécule ou espèce chimique instable (**Cesarini, 2004 ; Ratnam *et al.*, 2006**). Il a un ou plusieurs électron(s) non apparié(s), Il peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron (**Demoffarts *et al.*, 2005**), sa durée de vie est très courte et les réactions induites se font généralement en chaîne conduisant à des lésions cellulaires importantes (**Cesarini, 2004**).

III-1-1-Les sources des radicaux libres

D'après **Thomas *et al.* (2010)**, les radicaux libres sont des espèces réactives de l'oxygène, produits dans le corps comme sous produits de la respiration cellulaire aérobie. Plusieurs tissus peuvent synthétiser les ERO durant l'exercice (**Powers *et al.*, 2011**). Ces espèces peuvent se former lors de la synthèse de l'ATP mitochondrial et le métabolisme oxydatif (**Poston et Raijmakers, 2004**). Les conditions pathologiques ou l'exposition aux différents facteurs exogènes favorisent la formation des ces radicaux (**Jayaprakasha *et al.*, 2006**).

Les principales sources des radicaux libres peuvent être nombreuses et variées ; elles sont résumées dans le tableau III

Tableau II : Les principales sources des radicaux libres
(Poortmans et Boisseau, 2003)

Endogènes	Exogènes
❖ Mitochondries	❖ Cigarette
❖ Phagocytoses	❖ Radiation ionisantes
❖ Métaux de transition	❖ Pollution diverses
❖ Peroxysomes	❖ Rayonnement UV
❖ Inflammation	❖ Produits chimiques
❖ Choc	❖ Ozone

III-1-2-Les cibles des radicaux libres

III-1-2-1- Les lipides

Selon **Cherubini *et al.* (2005)** la peroxydation des lipides est l'une des principales conséquences des radicaux libres, c'est une réaction en chaîne qui continue jusqu'à l'épuisement du substrat ou l'arrêt de la réaction par l'intervention des antioxydants.

La peroxydation des phospholipides membranaires provoque des dommages cellulaires importants qui sont dus à la fragmentation de la chaîne lipidique, réticulation des lipides et l'endocyclisation, donnant des esters d'acides gras provoquant le changement de la fluidité et la perméabilité des membranes cellulaires

induisant l'altération des propriétés fonctionnelles des cellules, à l'origine de plusieurs maladies (**Poston et Raijmakers, 2004**).

III-1-2-2- Les protéines

Les ERO peuvent attaquer les protéines (**Agostinho, 1996**), provoquant leur dénaturation et inactivation par oxydation des acides aminés, désamination en dérivés carbonylés et fragmentation des chaînes polypeptidiques (**Cherubini et al., 2005**).

III-1-2-3-L'ADN

Les bases de l'ADN sont en effet très sensibles aux attaques par les radicaux libres, qui induisent la formation de nombreux dérivés, par oxydation ou fragmentation. (**Cherubini et al., 2005**).

Les ERO peuvent causer la rupture de l'ADN (**Deaton et Marlin, 2003**) en provoquant des lésions au niveau des di nucléotides mono phosphate (**Box et al., 2001**) ce qui induit des mutations qui contribuent à la cancérogénèse (**Jayaprakasha et al., 2006**). Ils peuvent aussi provoquer directement l'altération de l'expression des gènes (**Fu et al., 2011**).

III-2- Stress oxydatif

L'augmentation de la production des radicaux libres dans la cellule provoque le stress oxydatif (**Powers et al., 2011**) qui est un déséquilibre de la balance physiologique entre les oxydants et les antioxydants (**Deaton et al., 2003 ; Jearamraja, 2005**). Il se produit lorsque la génération des radicaux libres excède la capacité du mécanisme de défense des antioxydants (**Poston et Raijmakers, 2004**).

III-2-1-Origine du stress oxydatif

Le stress oxydatif est un événement important dans la cellule (**Therriault et al., 2006**). Les effets de ce stress sont les conséquences de l'oxydation des molécules importantes (**Jearamraja, 2005**), tels que les lipides, les protéines et l'ADN (**Thomas et al., 2010**).

III-2-2-Maladies liées au stress oxydatif

Le stress oxydatif provoqué par les ERO jouent un rôle important dans l'apparition de plusieurs maladies chroniques et dégénératives (**Fu et al., 2011 ; Nair et al., 2012**). Le stress oxydatif provoque l'oxydation des lipides de la membrane cellulaire (**Sun et al., 2011**) et affecte les fonctions physiologiques et mentales (**Miwa et Fujita, 2008**).

Certaines maladies liées aux stress oxydatif sont résumées dans le tableau suivant

D'après **Miwa et Fujita (2008)** le stress oxydatif augmente par la présence de divers facteurs de risques tels que : le tabagisme l'hypertension, le diabète et l'obésité.

III-3-Les antioxydants

Un antioxydant est défini comme une substance qui retarde ou empêche l'oxydation d'un substrat oxydable (**Deaton et Marlin, 2003**). Les antioxydants peuvent empêcher ou retarder le processus d'oxydation causé par les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène (**Heo et al., 2006 ; Vannucchi et al.,2007**). D'origine diverses, ils peuvent être produits dans l'organisme, ou être apportés par l'alimentation ou bien issus d'une synthèse chimique (**Tamimi et al., 2002**). Les antioxydants des plantes sont hydrosolubles (**Hayouni et al., 2007**).

III-3-2-Classification des antioxydants

On distingue deux grandes classe d'antioxydants ; enzymatiques et non enzymatiques. Les principaux antioxydants sont résumés dans la figure 7.

III-3-3-Système de défense des antioxydants

Le système de défense des antioxydants est composé de molécules de faible poids moléculaire ; enzymes intracellulaires, les vitamines (A, E, C...), les composés phénoliques et certain minéraux tels que le Zinc et Magnésium qui jouent le rôle de cofacteurs pour l'action des enzymes antioxydantes (**Vannucchi et al., 2007**).

III-3-3-1-Système de défense enzymatique

Les enzymes constituent la première ligne de défense contre les radicaux libres (**Parrilla-Taylor et Zenteno-Savín, 2011**).

➤ Superoxide dismutase (SOD)

Elle est la première ligne de défense contre les radicaux libres (**Gaté et al., 1999**) ; c'est une métalloprotéine possédant du fer et zinc dans son site actif (Poortmans et Boisseau, 2003). Elle catalyse la conversion de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (**Gaté et al., 1999 ; Ratnam et al., 2006 ; Parrilla-Taylor et Zenteno-Savín,2011**).

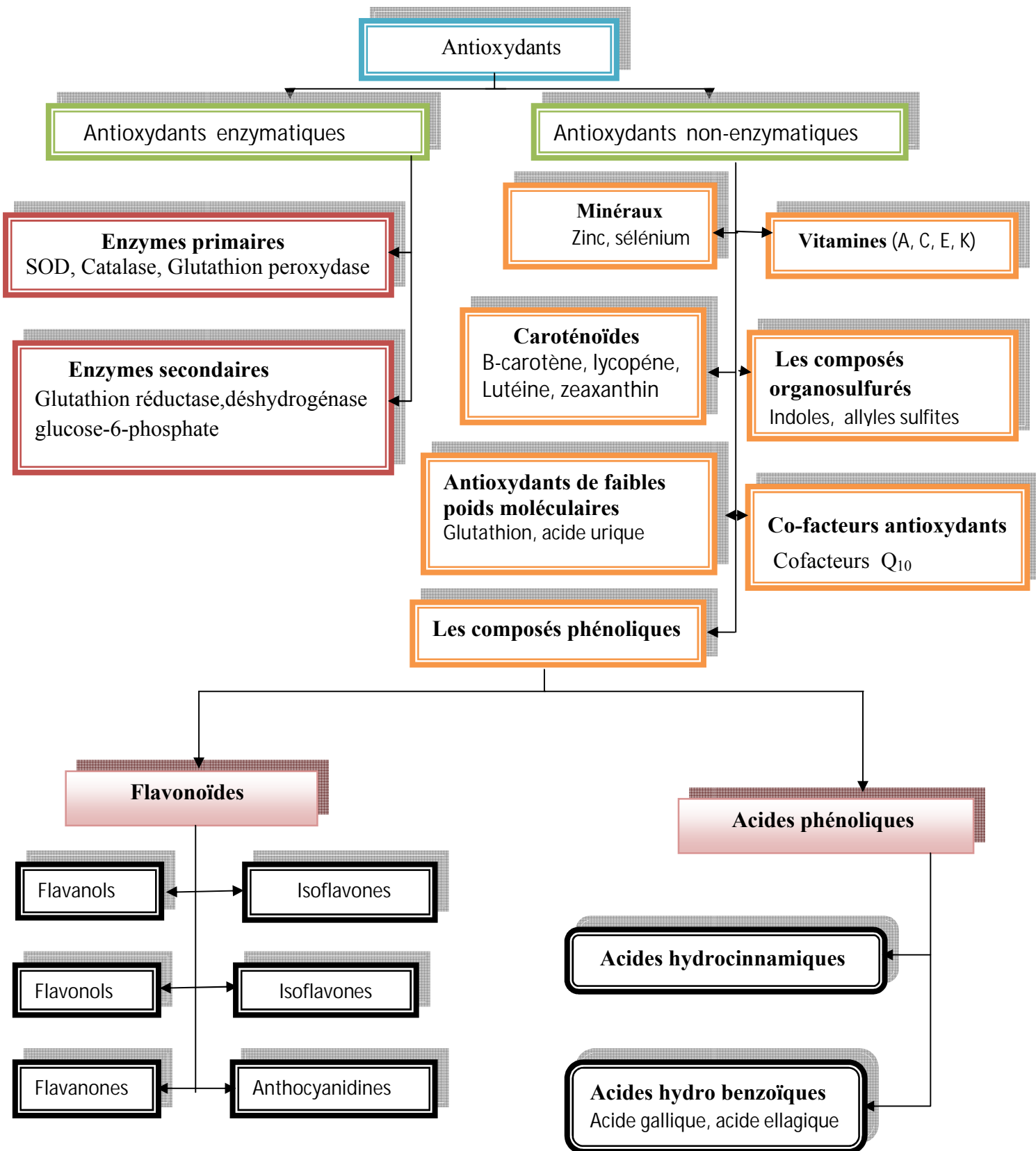


Figure 7 : Classification des antioxydants (Ratnam et al., 2006)

➤ **Catalase (CAT)**

C'est une enzyme qui nécessite un cofacteur (Cu) pour son fonctionnement (Poortmans et Boisseau, 2003). Elle catalyse la décomposition de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en H_2O et O_2 (Gaté *et al.*, 1999 ; Ratnam *et al.*, 2006 ; Parrilla-Taylor et Zenteno-Savín, 2011).

➤ **Glutathion peroxidase (GPX)**

C'est une sélénoenzyme (Poortmans et Boisseau, 2003) qui détruit le peroxyde d'hydrogène et l'hydroperoxyde organique (Parrilla-Taylor et Zenteno-Savín, 2011).

III-3-3-2- Système de défense non enzymatique

➤ **La vitamine E**

La vitamine E ou α tocophérol (Figure 8) est un antioxydant lipophile (Gaté *et al.*, 1999 ; Alzoubi *et al.*, 2012). Elle agit sur les membranes cellulaires en inhibant l'oxydation des acides gras polyinsaturés (Fardet *et al.*, 2008) et elle réduit la formation des radicaux libres tels que les lipoperoxydes et les radicaux d'oxygène (Gaté *et al.*, 1999). Cette vitamine inhibe la propagation de la réaction de peroxydation (Gouttebel *et al.*, 1996).

Des études récentes ont montré que la vitamine E prévient certaines maladies comme l'Alzheimer et retarde le vieillissement cellulaire (Alzoubi *et al.*, 2012).

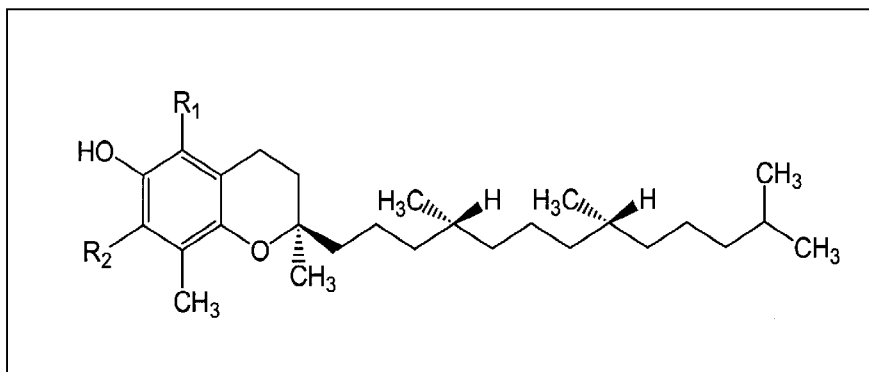


Figure 8 : Structure de la vitamine E
(Bast et Haenen, 2002)

➤ **La vitamine C**

La vitamine C ou l'acide ascorbique (Figure 9) est un antioxydant hydrosoluble, connu pour son pouvoir réducteur important. Il inhibe la peroxydation des lipides dans le plasma (Gaté *et al.*, 1999) et piège le radical (O_2^-) par formation du radical semi dehydroascorbate qui est réduit par le glutathion (Ratnam *et al.*, 2006).

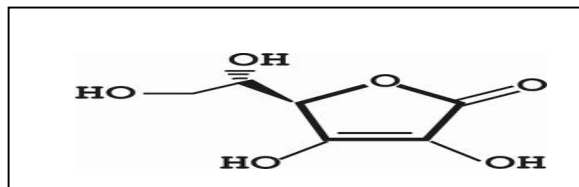


Figure 9 : Structure de la vitamine C
(Gaté *et al.*, 1999)

➤ **La vitamine A**

D'après Gaté *et al.* (1999) la vitamine A ou rétinol (Figure 10) est un antioxydant lipophile qui protège les membranes biologiques et le LDL contre le stress oxydatif, et agit en synergie avec la vitamine E pour mieux combattre l'oxydation.

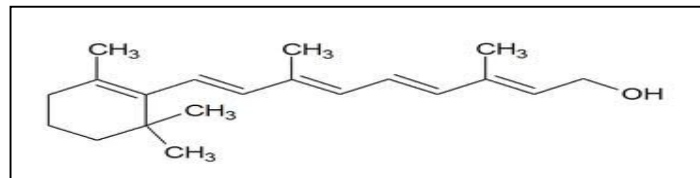


Figure 10 : Structure de la vitamine A
(Gaté *et al.*, 1999)

➤ **.Les composés phénoliques**

Ils peuvent servir comme antioxydants (Falleh *et al.*, 2011). Ils répriment la formation des espèces radicalaires par inhibition d'enzymes intervenant lors de la formation des radicaux libres (xanthine oxydase, protéine kinase C), par chélation de métaux lourds ou encore comme des donneurs d'hydrogène en phases aqueuses ou lipidiques (Rocha-Guzman *et al.*, 2007).

Chapitre IV

Généralités sur les plantes étudiées

Les principes actifs des plantes sont des composants essentiels d'une grande partie de nos médicaments et produits de soins ; grâce à la présence de métabolites actifs qui agissent directement sur l'organisme (**Zeghad, 2009**).

IV-1-Romarin (*Rosmarinus officinalis*)

Il appartient à la famille des Lamiaceae, il est très commun dans tous le bassin méditerranéen (**Bruneton, 1999**). Selon **Gonzalez-Trujano et al. (2007)** le romarin (figure 11) est un petit arbuste aromatique, mesurant environ 0,8- 2m, ces fleurs sont violettes avec des bouts violet-bleus. Cette plante possède des feuilles touffus, persistantes et qui sont sessiles, opposées, linéaires et coriaces, enroulées sur les bords (**Bruneton, 1999 ; Zegura et al., 2011**). Elle est riche en métabolites actives, et utilisée en médecine traditionnelle (**Abutbul et al., 2004**).



Figure 11: *Rosmarinus officinalis* dans son milieu naturel

IV-2-Myrte (*Myrtus communis*)

Le myrte (figure 12) est connue comme une plante médicinale (**Aidi Wannes et al., 2009**) appartient à la famille des Myrtaceae (**Aidi Wannes et al., 2010**). C'est un arbuste annuel, il se développe dans plusieurs régions partout dans le monde (**Aydin et Ozcan, 2007**). C'est une plante aromatique très odorante, le myrte est diploïde (**Messaoud et al., 2011**), il a des fleurs blanches. Ses fruits sont sphériques rouge-pourpres foncées (**Montoro et al., 2006**) de diamètre 5 millimètre avec de nombreuses graines (**Barboni et al., 2010**). Ces feuilles sont ové-lanceolées aigu, coriace, ponctuées (**Messaoud et al., 2011**) et selon **Hayder et al. (2004)** elles sont riches en huiles essentielles.



Figure 12: *Myrtus communis* dans son milieu naturel

IV-3-Genévrier (*Juniperus communis*)

Le genévrier (figure 13) est un gymnosperme (Garcia *et al.*, 1999) de la famille des Cupressaceae. C'est un arbrisseau buissonnant à ramure serrée, il est commun dans les régions montagneuses et les landes de l'hémisphère nord (Bruneton, 1999). Cette arbuste est un conifère (Gordiena *et al.*, 2009). Les feuilles, étroites, linéaires et verticillées par trois, sont effilées en une pointe piquante (Bruneton, 1999). Les fruits sont bleuâtres et glauques à maturité (Mansouri *et al.*, 2011).



Figure 13: *Juniperus communis* dans son milieu naturel

IV-1-4-Arbousier (*Arbutus unedo* L.)

L'arbousier (figure 14) est une plante médicinale (Afkir *et al.*, 2008) de la famille des Ericaceae (Fiorentino *et al.*, 2007). D'après Oliveira *et al.* (2009) elle est fréquente dans les régions méditerranéennes. C'est un arbuste touffu de 1,5 à 3 m de hauteur (Celikel *et al.*, 2008), il produit des fruits sphériques rouges (Oliveira *et al.*, 2011) de 2 à 3 cm de diamètre. Ces feuilles sont persistantes (Celikel *et al.*, 2008), ovales, à bordure dentée d'une dizaine de centimètres de long, ils sont vert foncé au-dessus, vert pale dessous (Soufleros *et al.*,2005). L'arbousier est rarement consommé à l'état frais mais il est utilisé lors de la fabrication de boissons alcooliques, confitures et gelées (Mendes *et al.*, 2011).



Figure 14 : *Arbutus unedo* dans son milieu naturel

IV-5-Globulaire (*Globularia alypum* L.)

Globularia alypum L appelée communément Tasselgha (figure 15) est une plante médicinale (Taleb-Dida *et al.*, 2011) de la famille des Globulariaceae (Es-Safi *et al.*, 2007). C'est un arbuste rameux d'environ 60 cm de hauteur. Les feuilles du globulaire sont coriaces, glauques, de forme ovale, se terminant en une petite pointe. Ces fleurs sont petites bleus et odorantes (Katz *et al.*, 2003), atteignent près de 2 cm de diamètre (Boutiti, 2005).



Figure 15: *Globularia alypum* L. dans son milieu naturel

Partie pratique

Chapitre V

Matériel et Méthodes

V-1-Matériels végétaux

Cette étude a été réalisée sur différents échantillons de poudre de feuilles de cinq plantes, disponibles au laboratoire d'alimentation et nutrition. Elles sont obtenues après séchage, broyage et délipidage des échantillons récoltés.

Ce délipidage est rendu nécessaire en raison des teneurs en matières grasses enregistrés et de la présence de pigments chlorophylliens.

Nous disposons ainsi des poudres de feuilles de :

- Romarin (*Rosmarinus officinalis*)
- Myrte (*Myrtus communis*)
- Genévrier (*Juniperus communis*)
- Arbousier (*Arbutus unedo L*)
- Globulaire (*Globularia alypum L*)

V-2-Méthodes

V-2-1-Extraction des polyphénols

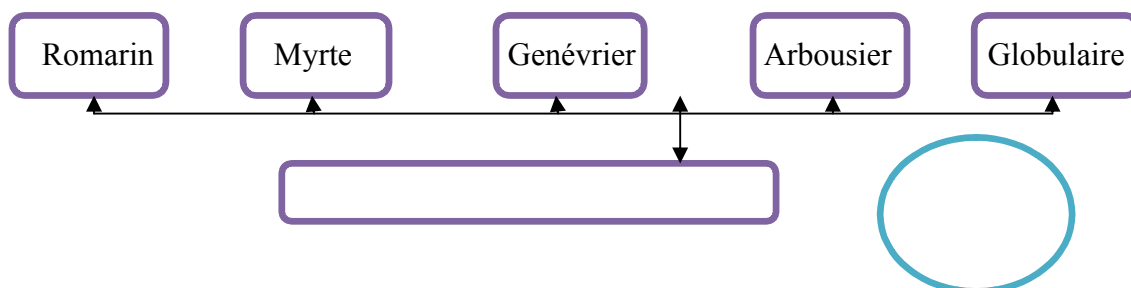
Principe

L'extraction se présente comme une interaction solide/liquide (**Ben amor, 2008**).

Le transfert de molécules actives recherchées, vers le milieu extérieur, a lieu grâce à une diffusion ayant pour élément moteur le gradient de concentration en soluté entre la solution au voisinage intime de la phase solide (plus concentrée) et la phase liquide. La diffusion se poursuit jusqu'à l'épuisement de la phase solide (**Lapornik et al., 2005**).

Mode opératoire

L'extraction des composés phénoliques (Figure 16) contenus dans nos échantillons a été réalisée selon la méthode de **Ranalli et al. (2006)** rapportée par **Zaidi et al. (2009)**. Nous avons utilisé trois solvants : acétone/eau (70/30), éthanol/eau (70/30) et méthanol/eau (70/30). Une extraction avec une solution de NaOH (1N) est réalisée sur les résidus solides d'échantillon pour doser les acides phénoliques attachés à la paroi cellulaire (**Scehovic, 1990**).



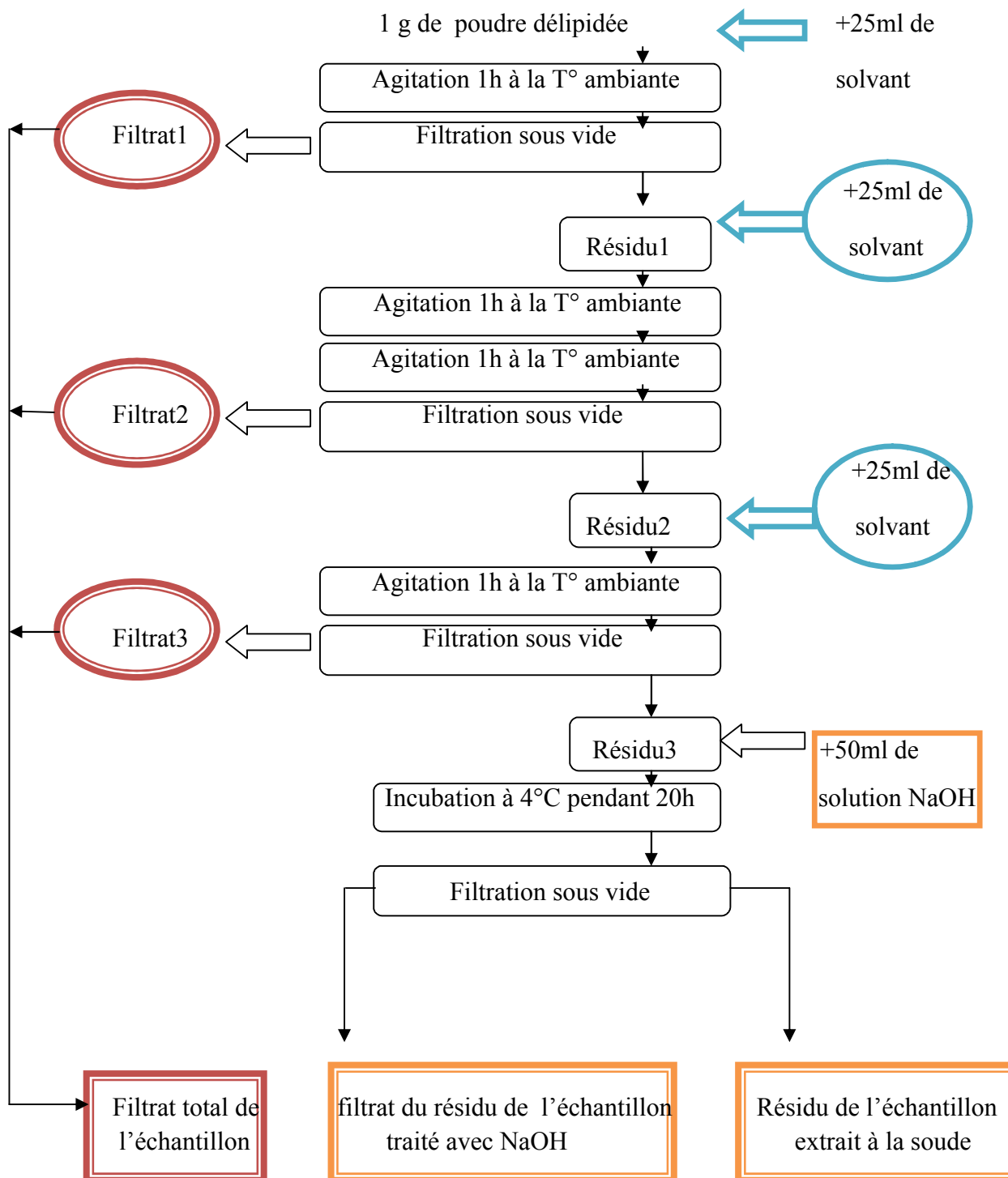


Figure 16: Protocole d'extraction des composés phénoliques (Ranalli *et al.*, 2006)

V-2-2-Analyses phytochimiques

Les phénols totaux solubles, les phénols totaux attachés à la paroi et les phénols non attachés à la protéine sont dosés (Figure 17) selon la méthode de Singleton *et al.* (1999). Les teneurs

en flavonoïdes sont évalués (Figure 18) selon la méthode décrite par **Lamaison et Carnet (1990)**. Pour les phénols polymérisés (Figure 19) nous avons utilisé la méthode de **Hagerman et Butler (1978)**.

V-2-2-1-Dosage des polyphénols totaux solubles et les phénols attachés à la paroi

Principe

Le réactif de folin-ciocalteu (mélange d'acide phosphotungstique et phosphomolibdique) oxyde les phénolate induisant ainsi à la formation d'un complexe bleu de molybdène-tungstène (**Blouin et al., 1998 ; Carrasco et al., 2005**). La coloration produite absorbe fortement à une longueur d'onde 760 nm. (**Ribereau-Gayon, 1968**).

Mode opératoire

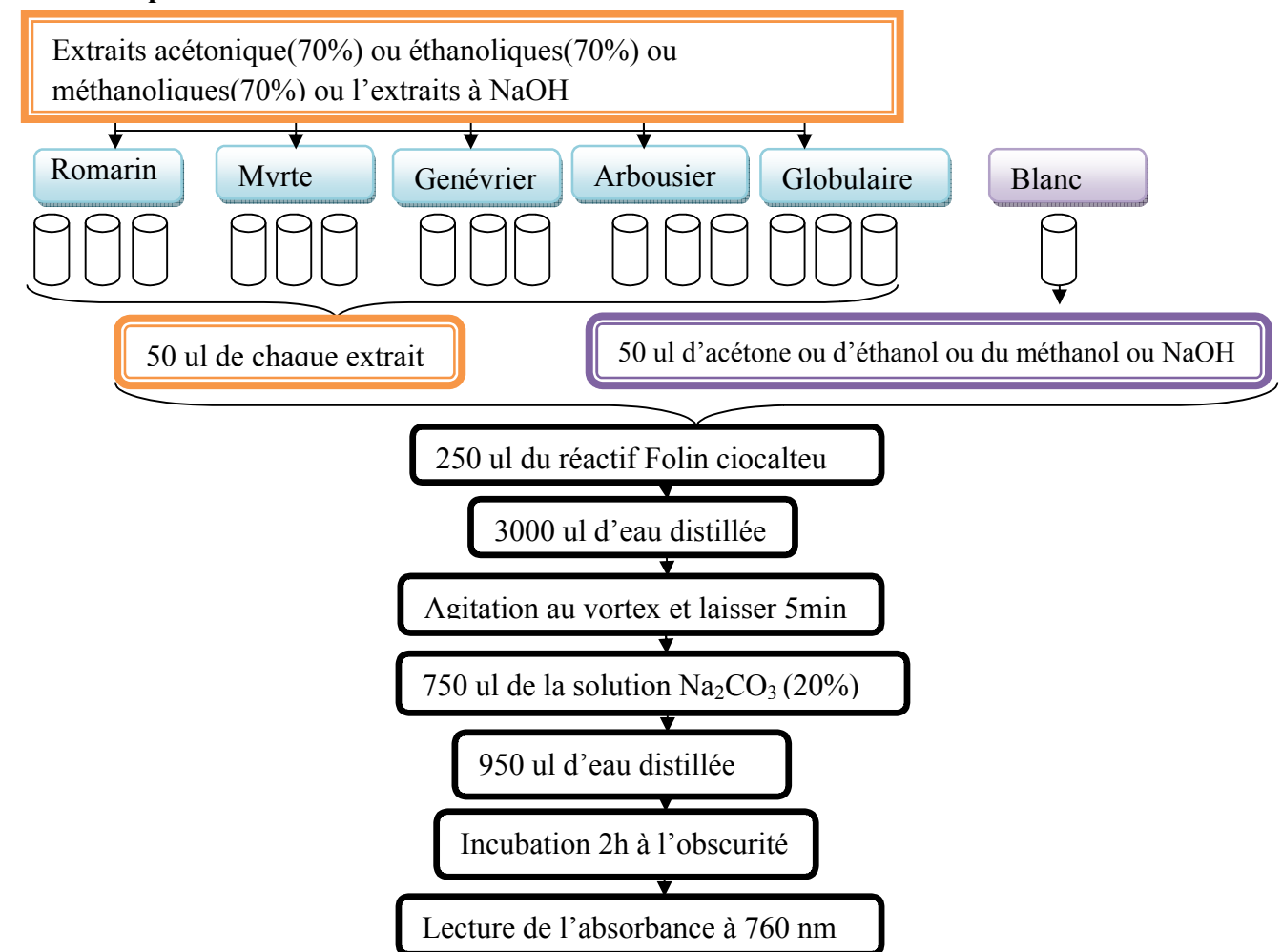


Figure 17 : protocole de dosage des composés phénoliques totaux solubles et les phénols attachés à la paroi (**Singleton et al., 1999**)

Principe

Le dosage repose sur la capacité des flavonoïdes à former des complexes flavonoïde-aluminium qui donnent une couleur jaune (Ribéreau-Gayon, 1968).

Mode opératoire

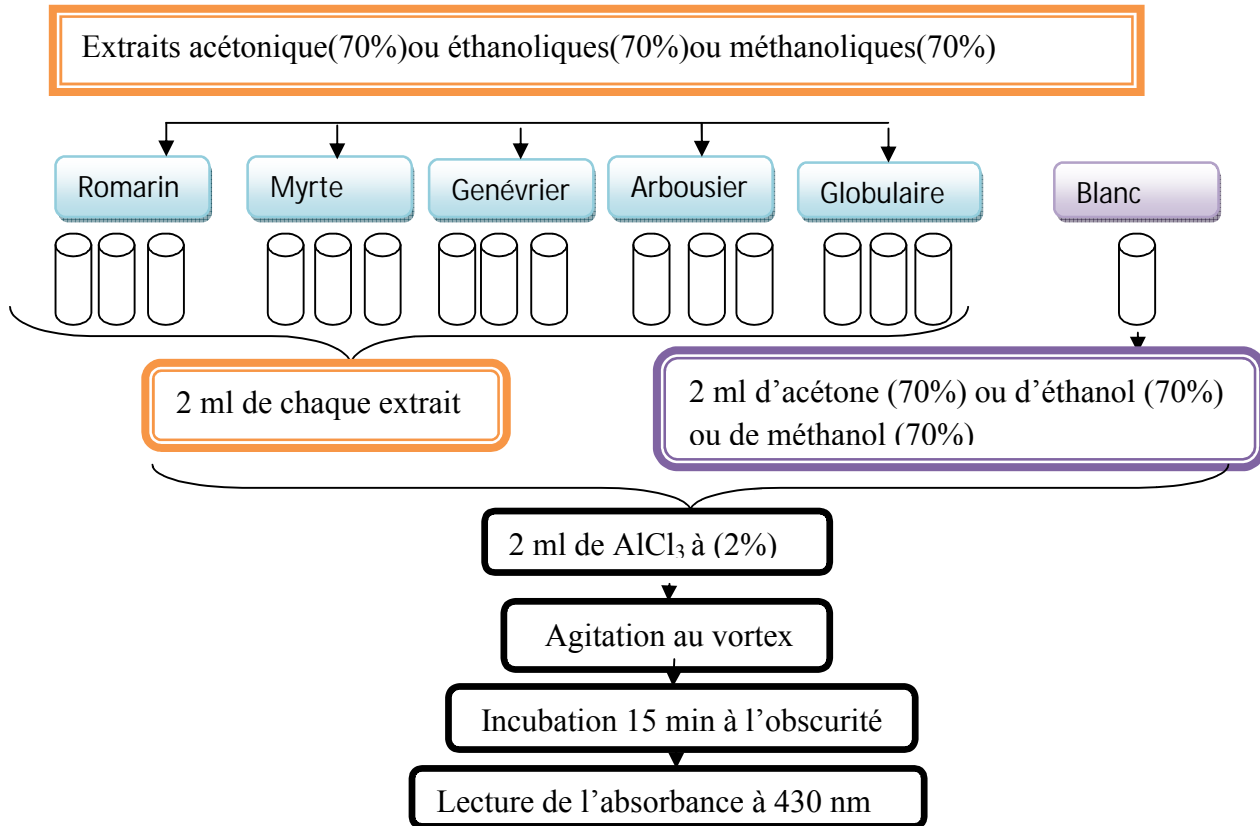


Figure 18 : Protocole de dosage des flavonoïdes (Lamaison et Carnet, 1990)

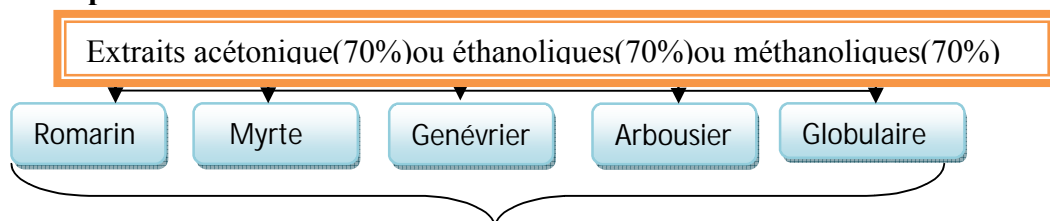
Les résultats sont rapportés à une courbe d'étalonnage (annexe 02) avec la quercétine comme standard.

V-2-2-3-Dosage des phénols polymérisés et des phénols simples non attachés à la protéine

Principe

L'utilisation de la BSA permet de précipiter les tanins contenus dans l'extrait en formant un complexe avec eux. La mise en évidence des tanins se fait par leur couplage à l'ion ferrique dans une solution alcaline contenant le détergent SDS donnant une couleur violacée (Scehovic, 1990).

Mode opératoire



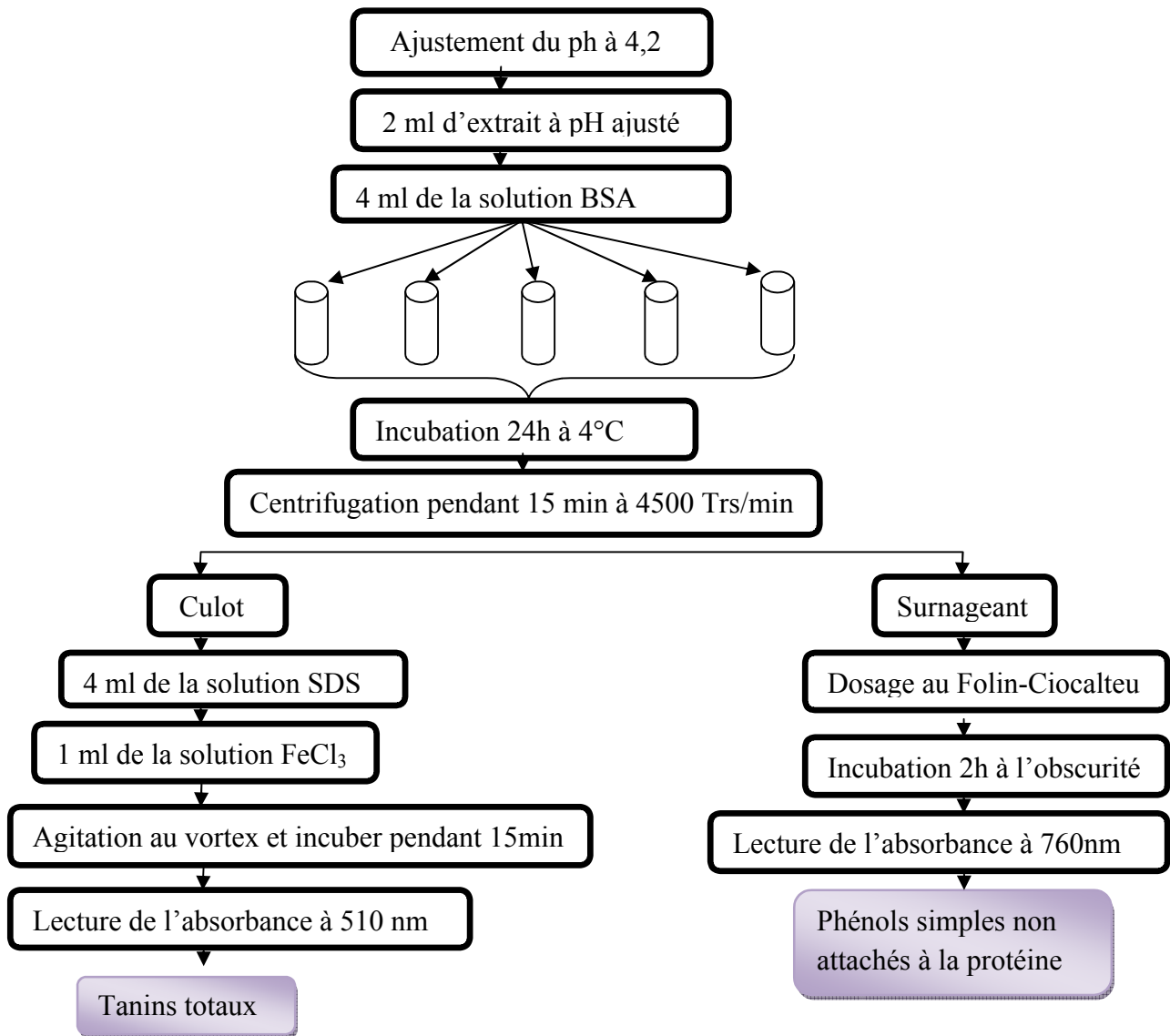


Figure 19 : Protocole de dosage des phénols polymérisés et des phénols simples non attachés à la protéine
(Hagerman et Butler, 1978)

Les résultats sont rapportés à une courbe d'étalonnage (Annexe 03) avec de l'acide tannique comme standard.

V-2-3-Détermination de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante a été évaluée par deux méthodes :

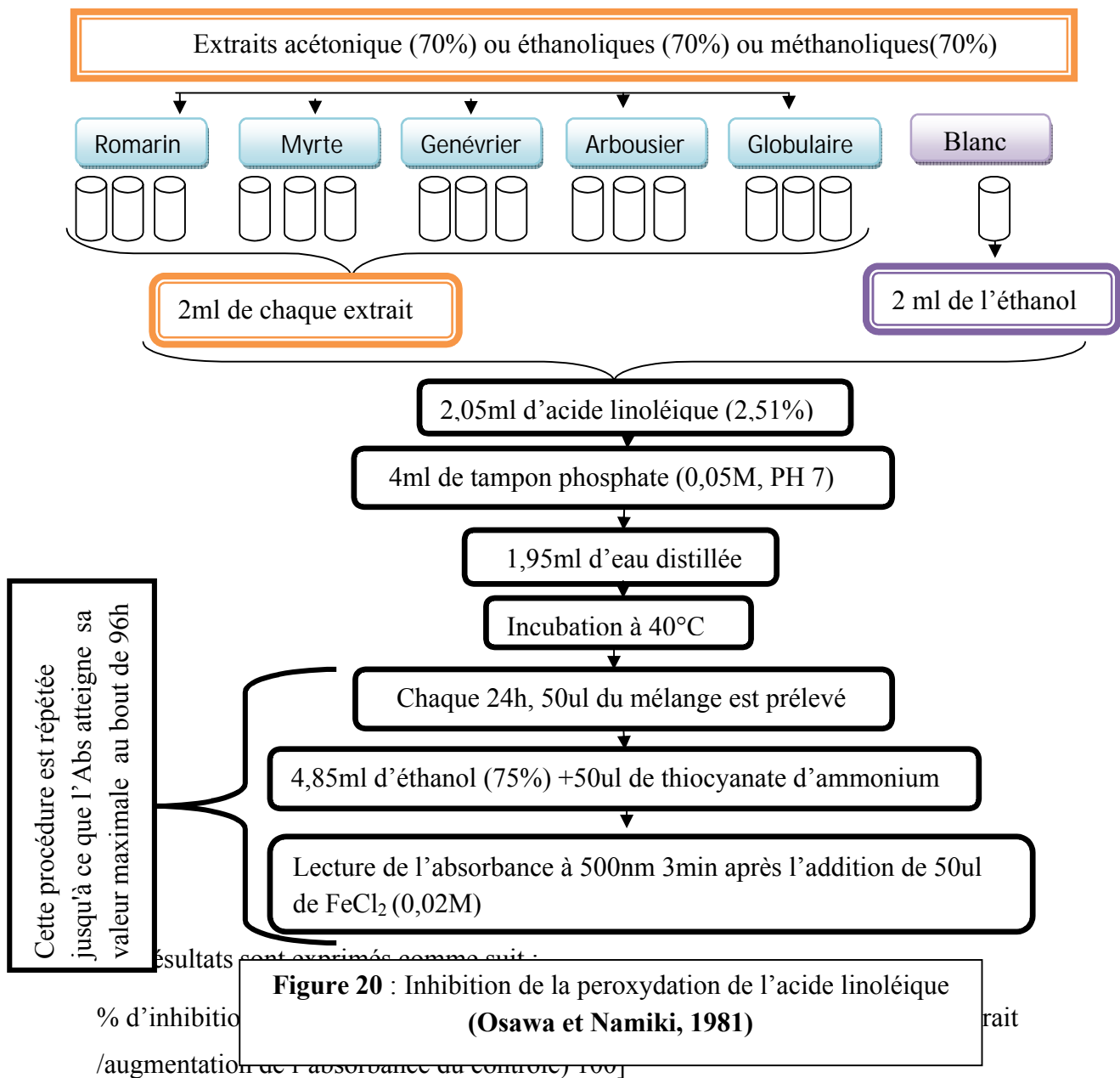
- L'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique (Figure 21) selon **Osawa et Namiki (1981)**.
- L'activité antiradicalaire (Figure 21) rapportée par **Turkmen et al. (2006)**.

V-2-3-1-Inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique

Principe

Elle évalue le taux de peroxydes présents dans le milieu réactionnel par le FeCl_2 et le thiocyanate d'ammonium. Durant l'oxydation de l'acide linoléique il ya formation du peroxyde qui à son tour assure l'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} (rouge brique). Ce dernier se lie avec le thiocyanate d'ammonium pour former un complexe ayant un maximum d'absorbance à 500 à nm (Osawa et Namiki, 1981).

Mode opératoire



V-2-3-2- Mesure de l'activité antiradicalaire contre le DPPH

Principe

Elle permet d'exprimer la capacité à piéger le radical libre (DPPH). Les antioxydants présents dans les extraits des plantes peuvent donner un hydrogène en réduisant le DPPH (**Mohammedi, 2006**).

La solution méthanolique de DPPH présente une coloration violette sombre ; en présence d'un antioxydant (Figure 21), la forme réduite de DPPH-H confère à la solution une coloration jaune et par conséquent une diminution de l'absorbance (**Zaghad, 2009**).

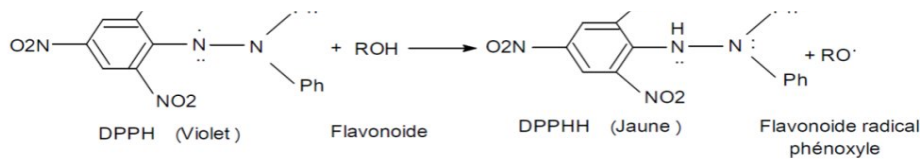


Figure 21 : Piégeage de DPPH par les flavonoïdes
(Zaghad, 2009)

Mode opératoire

L'activité antiradicalaire contre le radical DPPH est évaluée selon le protocole de **Turkmen *et al.* (2006)**.

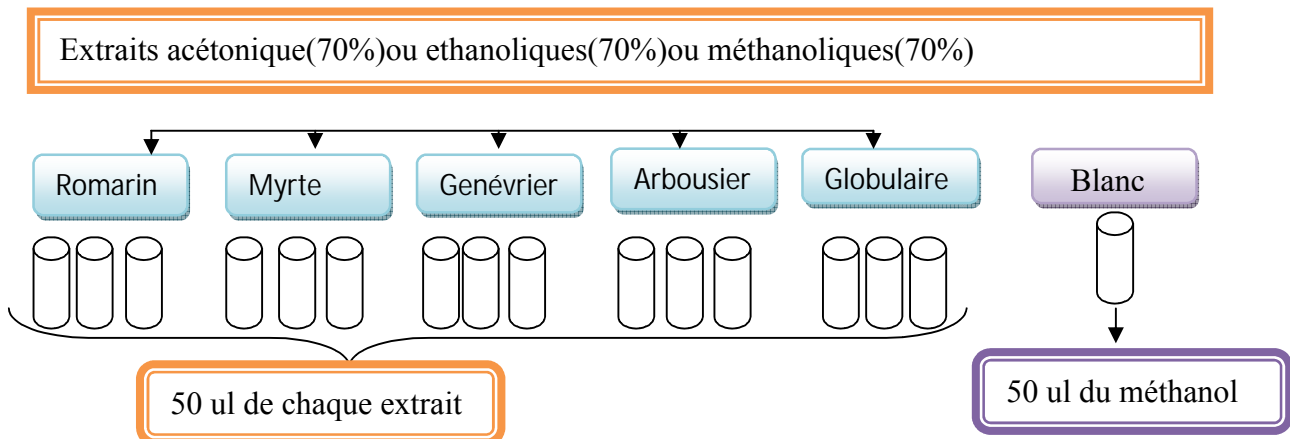
Cette activité est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH selon la formule :

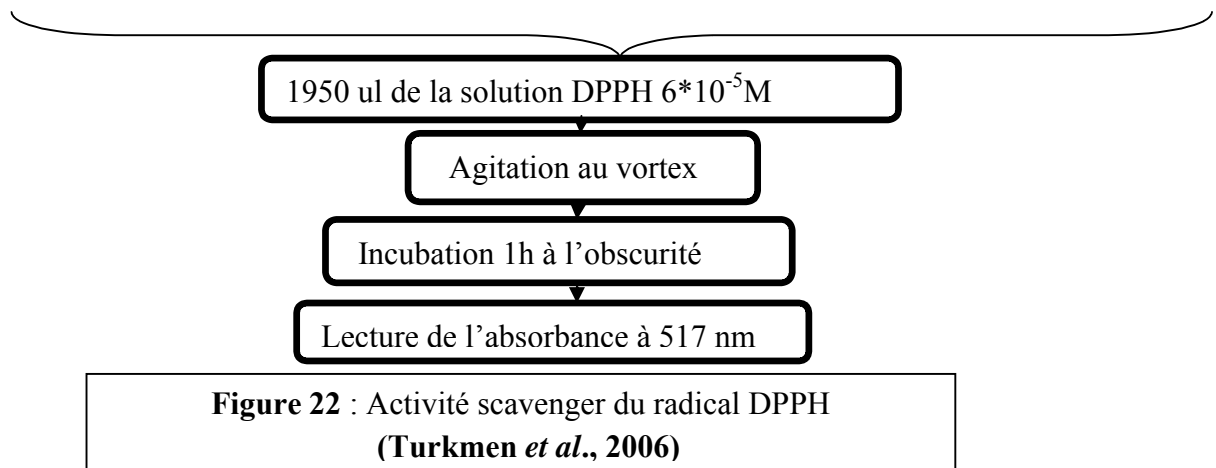
$$AA (\%) = (\text{Abs contrôle} - \text{Abs test}) / \text{Abs contrôle} * 100$$

AA (%) : Activité antiradicalaire (%)

Abs contrôle : Absorbance de la solution de DPPH

Abs test : Absorbance de la solution de DPPH plus l'extrait.





V-2-4- Analyse statistique

Toutes les déterminations ont été réalisées en triple. Les résultats ont fait l'objet d'une analyse statistique (ANOVA et comparaison des moyennes) au moyen du logiciel STATISTIX7. Ces résultats sont considérés significatifs à $P < 0,05$.

Chapitre VI

Résultats et discussions

VI-1-Résultats

VI-1-1-Teneurs en phénols totaux (solubles et attachés à la paroi)

La teneur en phénols totaux solubles (Figure 23) varie en fonction du solvant utilisé ($P < 0,05$) et du substrat végétal. Des différences significatives de teneurs sont relevées.

Pour les extraits à l'acétone, le myrte est le substrat le plus riche ($p < 0,05$) en phénols totaux solubles (176,02 mg EAG/g) suivi du l'arbousier (130,67 mg EAG/ g) puis du globulaire (94,93mg EAG/g) ; le romarin et le genévrier enregistrent les teneurs en phénols totaux solubles les plus faibles (42,55 et 29,59 mg EAG/ g respectivement).

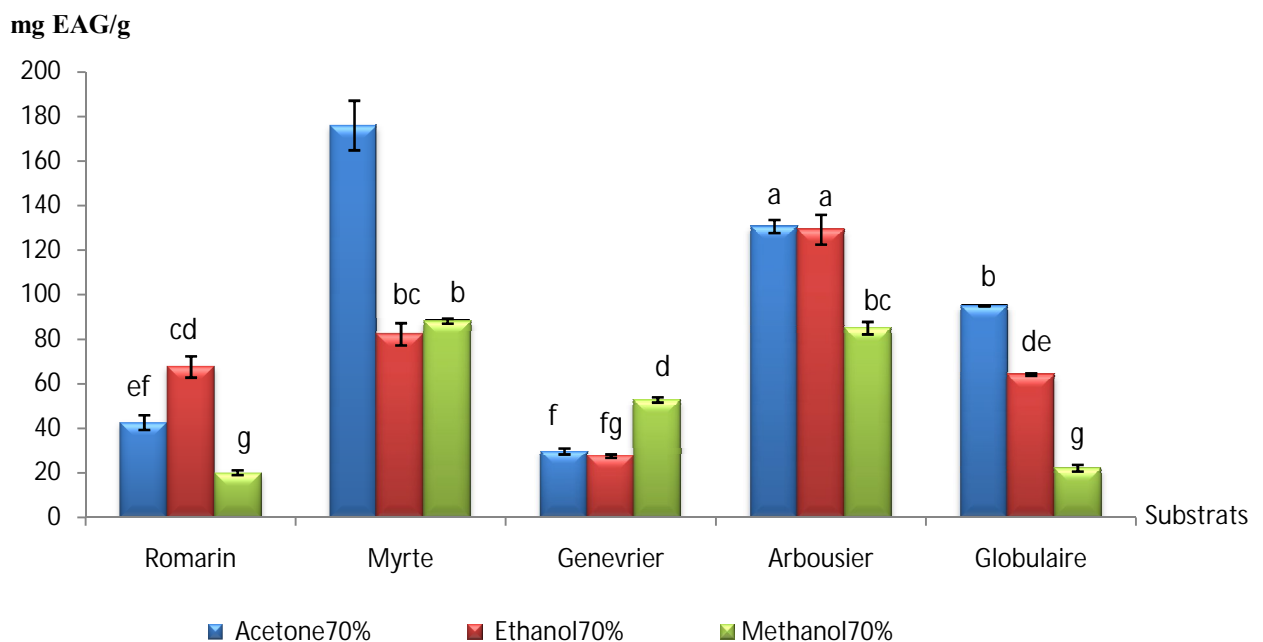


Figure 23 : Teneurs en polyphénols totaux solubles des feuilles des plantes (en mgEAG/g)

Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$)

La plus grande teneur ($p < 0,05$) en phénols totaux solubles pour les extraits à l'éthanol est notée chez l'arbousier (129,18 mg EAG/ g) suivi du myrte (82,23 mg EAG/ g) puis du globulaire et du romarin (64,16 et 67,54mg EAG/ g respectivement). Les deux derniers ne présentent pas de différences significatives entre eux ($p > 0,05$).

Le genévrier affiche la plus faible teneur ($p > 0,05$) en phénols totaux solubles (27,53 mg EAG/g).

Le myrte et l'arbousier extraits par le méthanol sont les substrats les plus riches en PTS (88,15 et 85,01 mg EAG/ g respectivement ; DNS à $P > 0,05$). Les faibles teneurs en PTS sont enregistrées pour le globulaire et le romarin (22,07 et 20,11 mg EAG/ g respectivement).

La mise en évidence de phénols attachés à la paroi cellulaire (figure 24) montre qu'aucun des solvants n'a pu extraire la totalité des phénols présents dans les feuilles des plantes utilisées.

Nos données analytiques montrent que la fraction en phénols attachés à la paroi est plus faible après extraction à l'acétone (8,5 à 29,6 mg EAG /g contre 22,5 à 29,68 mg EAG/g pour l'éthanol et 25,4 à 64,7 mg EAG /g pour le méthanol).

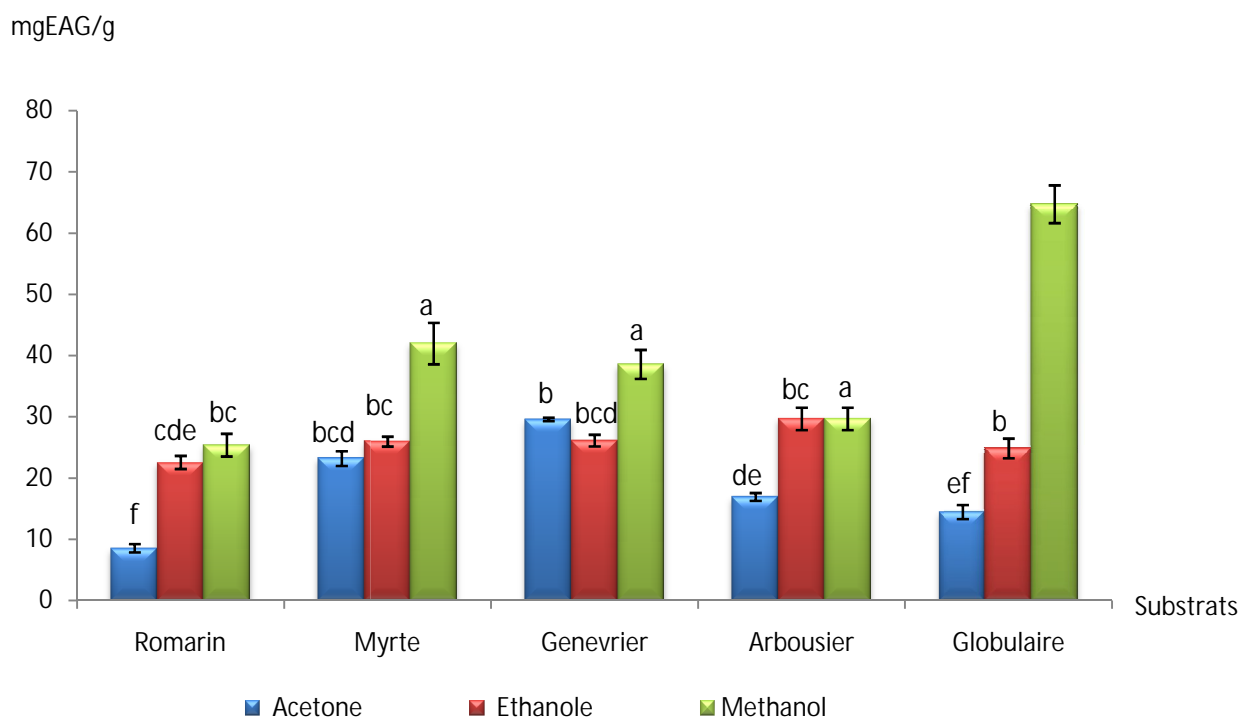


Figure 24: Teneurs en acides phénoliques attachés à la paroi cellulaire des feuilles de plantes (en mg EAG/ g d'échantillon)

Les valeurs suivies la même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles $p > 0.05$

Comparé aux autres plantes et pour un même solvant, le romarin présente les plus faibles teneurs en phénols attachés à la paroi (8,5 pour l'extrait acétonique à 25,4 mg EAG /g pour l'extrait méthanolique).

Les analyses statistiques montrent que la teneur en acides phénoliques (figure 24) varie en fonction du solvant utilisé et du substrat végétal.

La comparaison des moyennes classe les différents extraits en 7 groupes homogènes (annexe 04)

La figure (25) montre qu'à l'opposé du méthanol, l'acétone solubilise une plus forte proportion de phénols des feuilles du myrte (88,34 %), de l'arbousier (88,52%), du globulaire (86,76%) et du romarin (83,22%).

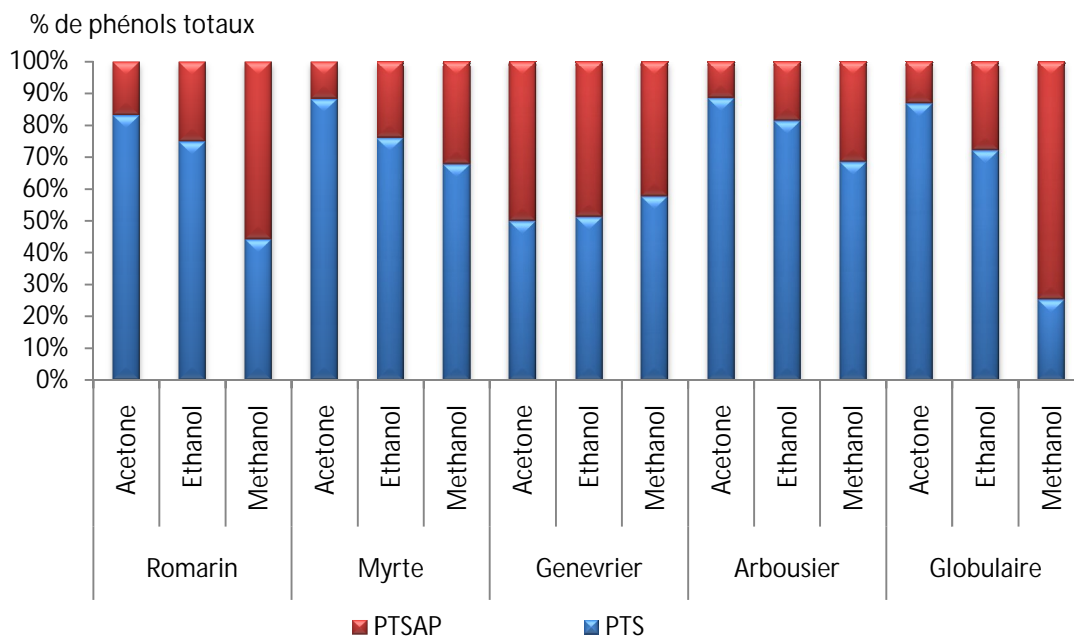


Figure 25: Proportion en phénols totaux solubles et phénols attachés à la paroi des feuilles de plantes (en % de phénols totaux)

VI-1-2-Teneurs en flavonoïdes

D'après les résultats analytiques qui sont traduits sous forme d'histogramme on constate que la teneur en flavonoïdes dépend du solvant utilisé et du substrat végétal auquel il est appliqué (figure 26).

L'éthanol s'avère le solvant le plus efficace pour l'extraction des flavonoïdes lorsqu'il est appliqué au romarin, genévrier et globulaire; pour les autres plantes (myrte et arbousier) l'acétone est meilleur extracteur des flavonoïdes.

Pour le même solvant (l'acétone), l'extrait de l'arbousier est le plus riche ($p < 0,05$) en flavonoïdes (4,65mg EQ/g); il est suivi du myrte (4,41mg EQ/g), puis du globulaire et genévrier (2,35 et 0,99 mg EQ/g respectivement). La faible teneur est notée pour le romarin. ($p < 0,05$) (0,55 mg EQ /g).

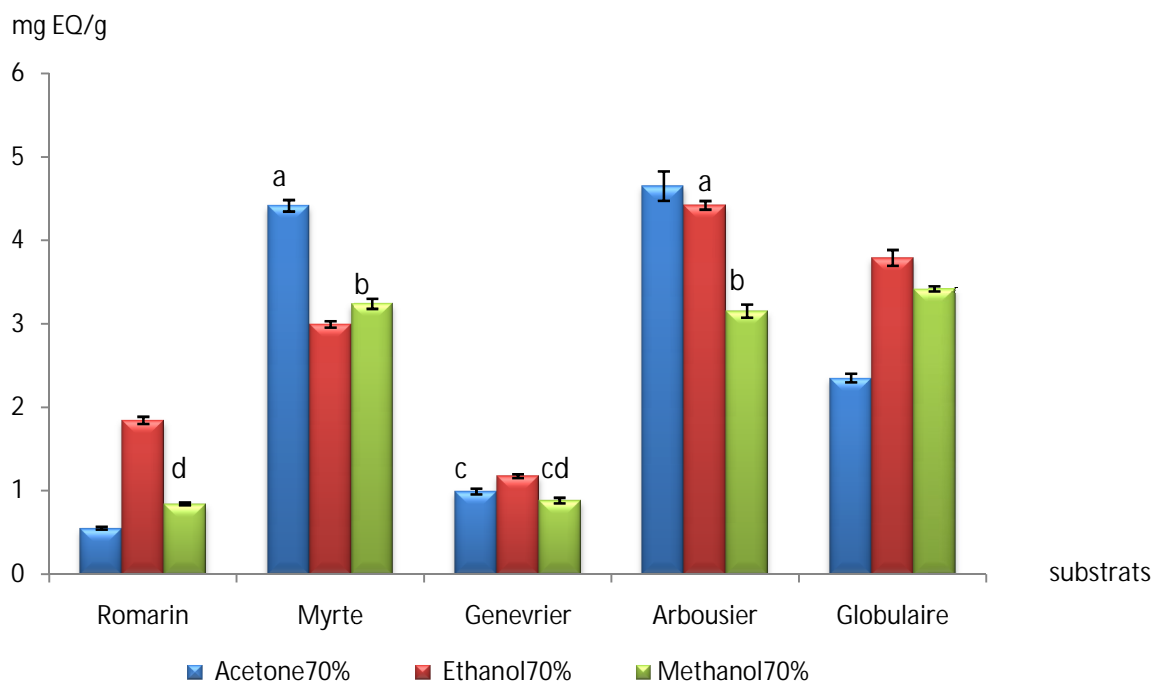


Figure 26 : Teneurs en flavonoïdes des feuilles de plantes (en mg EQ/g d'échantillon)
 Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$)

Pour les extraits éthanoliques, la plus forte teneur en flavonoïdes est enregistrée pour l'arbousier ($p < 0,05$) (4,42 mg EQ/g). Le globulaire et le myrte suivent avec 3,79 et 2,99 mg EQ/g respectivement. Les plus faibles teneurs en flavonoïdes sont notées pour le romarin (1,84 mg EQ/g) et le genévrier (1,17 mg EQ/g).

Pour les extraits à méthanol le globulaire est le substrat végétal contenant la teneur la plus importante en flavonoïdes ($p < 0,05$) (3,32 mg EQ/g) suivi du myrte et de l'arbousier (3,24 et 3,15 mg EQ/g respectivement) ; ces derniers ne présentent pas de DS entre eux ($p > 0,05$). Les faibles teneurs sont observées chez le genévrier et le romarin (0,88 et 0,84 mg EQ/g respectivement).

VI-1-3-Teneurs en phénols polymérisés

D'après les résultats obtenus dans la figure 27, la teneur en phénols polymérisés varie en fonction du solvant utilisé et du substrat végétal auquel il est appliqué.

Le dosage des phénols polymérisés indique que l'extrait de l'arbousier par le méthanol est le plus riche ($p < 0,05$) en ces composés (13,75 mg EAT/g) ; il est suivi du myrte (12,66 mg EAT/g) puis du genévrier et globulaire (4,66 et 4,78 mg EAT/g respectivement). La faible teneur est enregistrée chez le romarin (2,26 mg EAT/g).

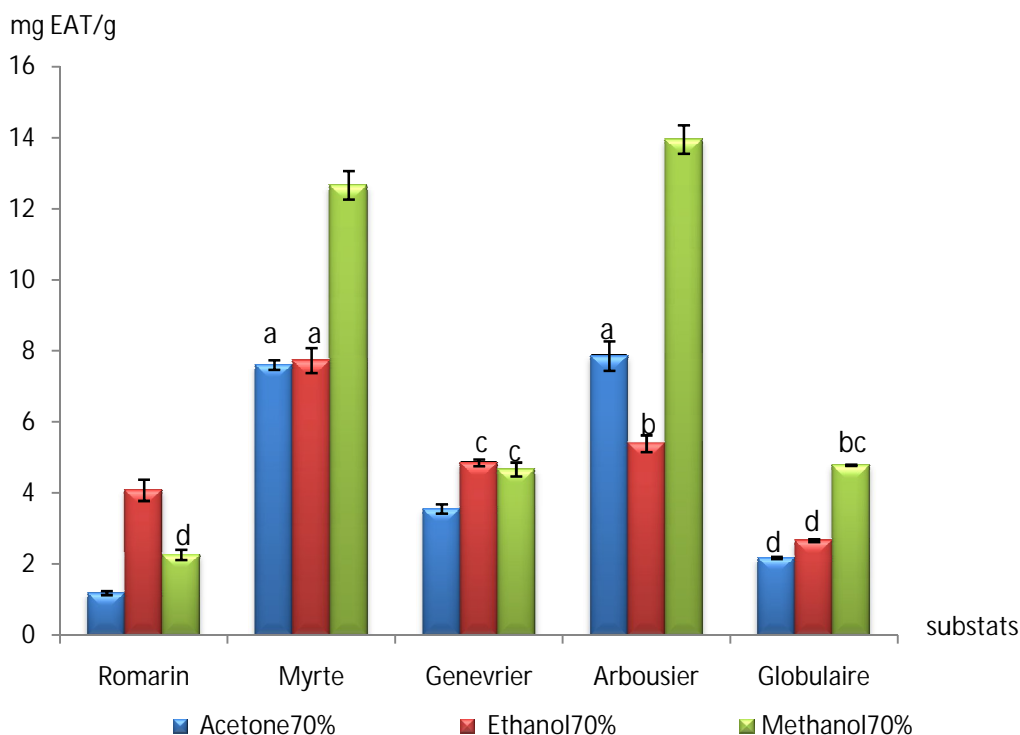


Figure 27 : Teneurs en phénols polymérisés des feuilles des plantes (en mg EAT/g)
 Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ($P > 0,05$)

Le myrte lorsqu'il est extrait par l'éthanol affiche la plus grande teneur ($p < 0,05$) en phénols polymérisés (7,73 mg EAT/g) suivi de l'arbousier (5,39 mg EAT/g) puis du genévrier (4,85 et 0,07 mg EAT/g). Le romarin (4,08 mg EAT/g) et le globulaire (2,66 mg EAT/g) sont les substrats les plus pauvres en phénols polymérisés.

Appliqué sur le myrte et l'arbousier, l'acétone permet d'extraire les mêmes teneurs en PP (7,60 et 7,86 mg EAT/g respectivement) ; elles sont comparables ($p > 0,05$) à celles affichées chez le myrte lorsqu'il est extrait par l'éthanol (7,7 mg EAT/g).

Le méthanol s'avère le solvant le plus efficace pour l'extraction des phénols polymérisés lorsqu'il est appliqué sur le myrte et l'arbousier. Il a le même pouvoir d'extraction des phénols polymérisés que l'éthanol lorsqu'il est appliqué sur le genévrier.

L'aptitude des phénols totaux solubilisés (figure 28) par les différents solvants varie d'une plante à une autre.

A l'exception du genévrier et myrte, les extraits à l'acétone des autres plantes affichent une plus forte affinité aux protéines (87 à 98%). Dans une moindre mesure le même comportement est noté pour les extraits à l'éthanol : 66% pour genévrier et 76,2% pour le globulaire ; les extraits de myrte, romarin et arbousier sont intermédiaires entre les deux (71,5 à 74,8 respectivement).

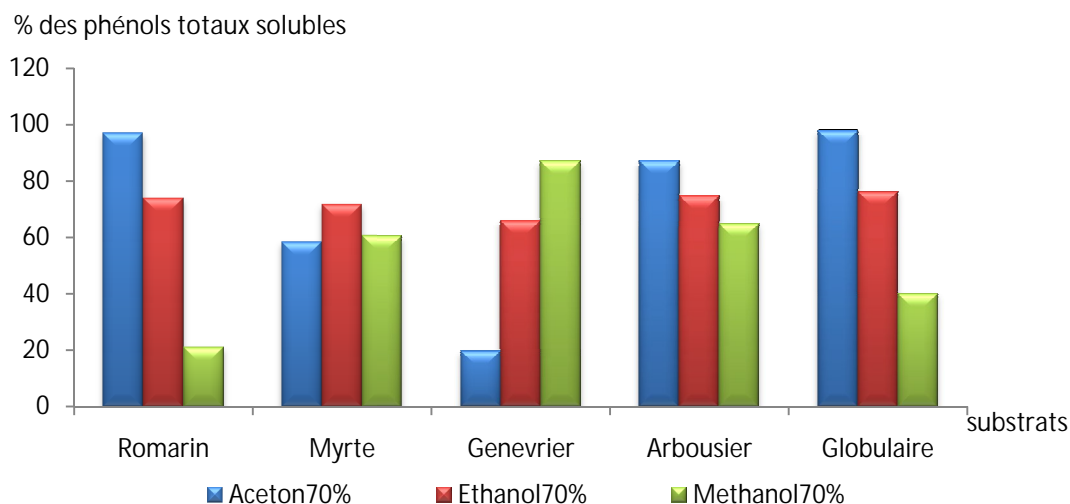


Figure 28: Proportion en phénols attachés à la protéine des feuilles des plantes (en % des phénols totaux solubles)

Les extraits aux méthanol affichent une différence de comportement en présence de BSA ; pour le genévrier, nous observons que 87,1% des PTS se lie à la protéine ; cette aptitude diminue pour atteindre 60 et 64% (myrte et arbousier respectivement) et 40% pour le globulaire.

C'est l'extrait au méthanol de romarin qui se lie le moins à la BSA (21,26%).

VI-1-4-Inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique

L'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique (figure 29) varie fortement (51,77 à 96,6 %) d'un extrait à un autre.

Quelque soit le solvant utilisé, ce sont les extraits de globulaire qui inhibent le plus la peroxydation (90,7 à 96,6 %). Nous notons que les extraits acétoniques des différentes plantes présentent la plus faible activité comparativement aux extraits à éthanol et méthanol correspondants. Selon nos résultats, le classement des extraits à l'acétone s'établit comme suit :

Globulaire \geq Genévrier > Myrte \geq Arbousier > Romarin.

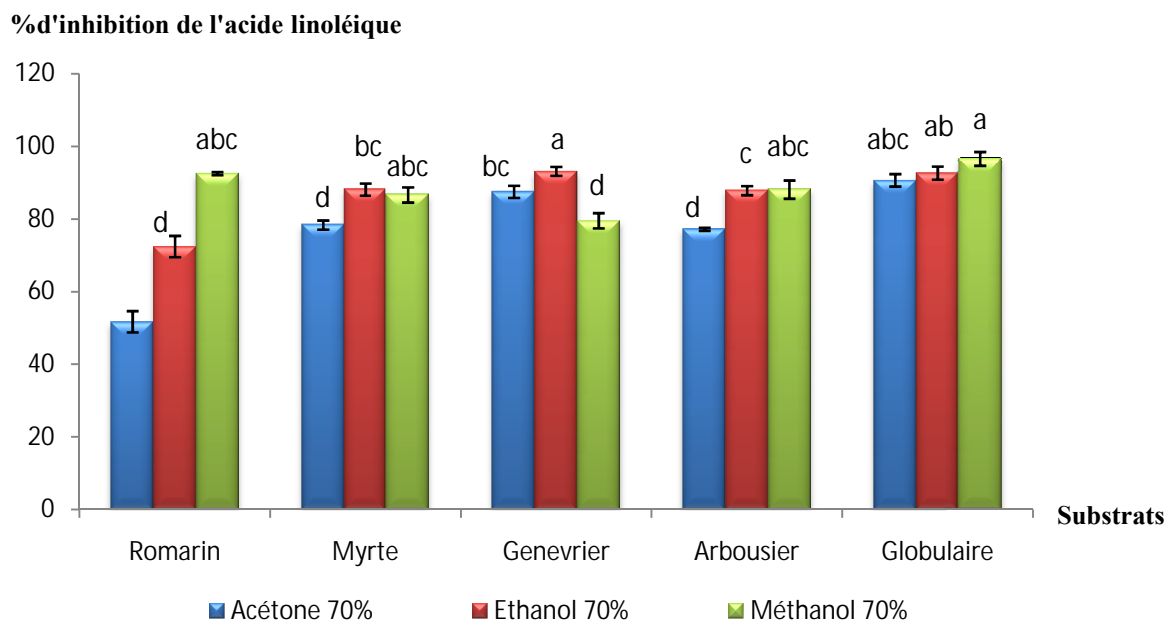


Figure 29 : Inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique

Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes

La substitution de l'acétone par l'éthanol s'accompagne d'une amélioration systématique de cette activité inhibitrice. La plus forte augmentation est relevée pour le romarin (40 %) contre 2,18 % pour le globulaire ; le genévrier, le myrte et l'arbousier sont intermédiaires avec des améliorations respectives de 6,5, 12,4, 13,8 %.

Le même phénomène est observé lorsque le méthanol est utilisé. L'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique s'établi entre 79,6 et 96,64 % , avec une amélioration de 6,5 % (globulaire) et 78,8 % (romarin) par rapport à l'acétone.

VI-1-5-Activité antiradicalaire des extraits de plantes

La figure (30) montre une grande variabilité d'activité antiradicalaire des différents extraits des plantes testés.

Globalement, les extraits de myrte manifestent une grande activité que les extraits correspondant des autres plantes.

Lorsque l'acétone est substituée de méthanol, nous observons une variation de la réponse qui dépend de la plante utilisé : pour le romarin, l'arbousier et le globulaire nous notons des améliorations de l'inhibition de DPPH de 1,59, 3,43 et 2,02 % alors que pour le genévrier nous notons une baisse de 1,7 % ; l'activité de myrte est maintenue constante.

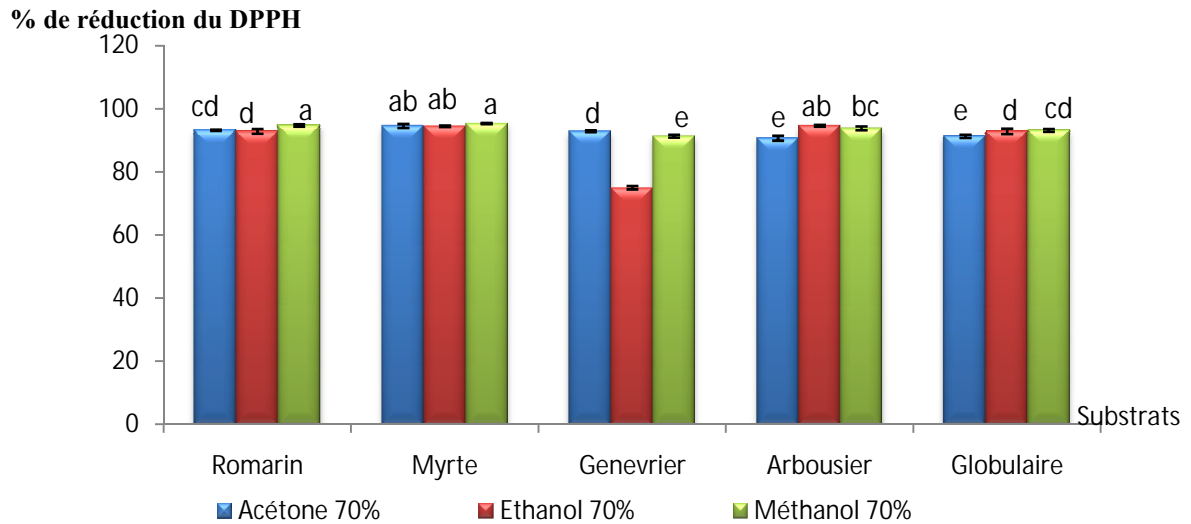


Figure 30 : Activité antiradicalaire des extraits des feuilles de plantes (en % de réduction des feuilles des plantes)

Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles $p > 0.05$

Dans le cas de l'utilisation de l'éthanol à la place de l'acétone seuls les activités de trois plantes sont modifiées : une augmentation de 4,35 et 1,65% respectivement pour l'arbousier et globulaire alors que l'activité de l'extrait de genévrier diminue de 23,84 %.

VI-2- Discussion générale

De nombreux auteurs attribuent diverses propriétés biologiques des plantes à leurs métabolites secondaires particulièrement les composés phénoliques. La mise en évidence de tels composés (phénols totaux, flavonoïdes, tanins) dans les feuilles des plantes étudiées est en accord avec les données de nombreux auteurs (**Oliveira *et al.*, 2009 ; Trabelsi *et al.*, 2010 ; Tuberoso *et al.*, 2010**) travaillant sur différentes plantes.

Nos données analytiques montrent que les teneurs varient de 20,11 à 176,06 mg EAG/g pour les phénols totaux solubles, de 0,55 à 4,65 mg EQ/g pour les flavonoïdes et de 1,18 à 13,95 mg EAT/g pour les tanins. Une comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature est difficile en raison de l'influence de divers facteurs propres à la plante (les facteurs génétiques liés au cultivar, le degré de maturation et l'âge des feuilles ...), les conditions climatiques et environnementales (site de croissance, température...) et des méthodes d'extraction et de dosages (type de solvant et sa concentration, méthodes et température d'extraction, temps et nombre d'étapes de macération...) des composés phénoliques (**Makkar, 2003; Nazck et Shahidi, 2004**).

Globalement, nos données analytiques de dosage des composés phénoliques s'intègrent dans l'intervalle des données rapportées par la bibliographie (**Gardeli *et al.*, 2007; Aidi Wannes *et al.*, 2010 ; Tuberoso *et al.*, 2010**) pour les plantes étudiées.

Nous avons observé que l'acétone/eau est plus efficace que l'éthanol/eau et le méthanol/eau avec des différences allant de 25,77 à 88,58 % pour les phénols totaux solubles, de 4,94 à 88,17% pour les flavonoïdes et de 9,24 à 91,54% pour les tanins.

Des résultats similaires sont rapportés par **Tabart *et al.* (2007)** dans le cas des feuilles de raisins noirs ; **Zaidi *et al.* (2009)** et **Alarcón Flores *et al.* (2012)** dans le cas de l'olivier ; **Turkmen *et al.* (2006)**; **Wijekoon *et al.* (2011)** ; **Spignoni *et al.* (2007)** travaillant sur le thé noir et vert, *Etilingera elatior* et les raisins confirment cette variabilité de teneurs des extraits en fonction du solvant utilisé.

Selon **Tabart *et al.* (2007)**, le choix du solvant affecte la quantité et le taux des polyphénols extraits grâce à la polarité du solvant et la solubilité des composés phénoliques dans ce dernier. Le méthanol 70% est le meilleur solvant pour extraire les catéchines alors que l'acétone 70% est meilleure pour extraire les procyanidines et les phénols attachés aux protéines puisque il dégrade le complexe polyphénols-protéines. Le méthanol par sa polarité est plus efficace pour extraire les phénols attachés à la matrice fibreuse.

La présence de phénols attachés à la protéine est mise en évidence dans le présent travail ; ces derniers sont libérés après traitement à la soude.

Nous avons observé que chacun des quinze extraits de plantes exerce une activité antioxydante mesurée par l'inhibition de l'acide linoléique et l'activité antiradicalaire. Cette dernière contre le radical DPPH varie de 75,11 à 95,41% ; l'activité inhibitrice de la peroxydation de l'acide linoléique varie de 51,77% (romarin) à 96,64 % (globulaire). Nos résultats sont en accord avec les données de nombreux auteurs (**Yesil-Celiktas et al., 2007 ; Brétta et al., 2011**) travaillant sur divers extraits de plantes .

Djeridane et al. (2006) et **Popovici et al. (2009)** attribuent cette activité aux composés phénoliques des plantes et à leurs propriétés redox qui agissent comme réducteurs, donneurs d'hydrogène et trompeur de l'O₂ singulet.

Selon **Pabuccuoglu et al. (2003)** les polyphénols, les tanins et les flavonoïdes ont une action antiradicalaire due à leurs groupements phénoliques hydroxyles. **Madi (2010)** affirment que l'activité antioxydante dépend essentiellement de nombre de groupement hydroxyle, leur position, et les radicaux liés au squelette moléculaire. Les différences d'activités antioxydant relevées dans notre cas seraient liées aux différences de composition (qualitatives et quantitatives) de nos extraits.

Conclusion

Le dosage des composés phénoliques dans nos extraits a révélé des teneurs élevées en phénols totaux solubles pour le Myrte acétonique (176,02 mg EAG /g) ; en flavonoïdes pour l'arbousier (4,65 et 4,42 mg EQ/g pour l'extrait acétonique et éthanolique respectivement) ; le dosage des phénols polymérisés a montré que l'arbousier à méthanol est le substrat végétal le plus riche (13,95 mg EAT /g)

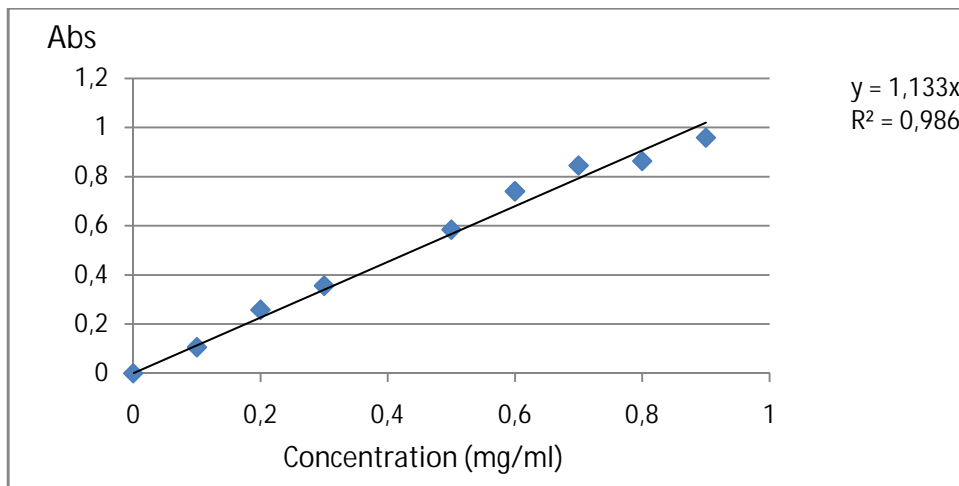
L'étude de l'activité antiradicalaire contre le radical DPPH et l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique ont confirmé les propriétés antioxydantes des plantes étudiées ; les activités antiradicalaires sont supérieures à 91% pour tous les extraits à l'exception de genévrier à l'éthanol (75,11%) ; le pourcentage d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique est en faveur des extraits de globulaire.

L'ensemble des résultats obtenus ne constitue qu'une première étape dans la recherche des substances biologiquement actives. Des essais complémentaires et approfondis sont nécessaires pour confirmer les performances mises en évidence :

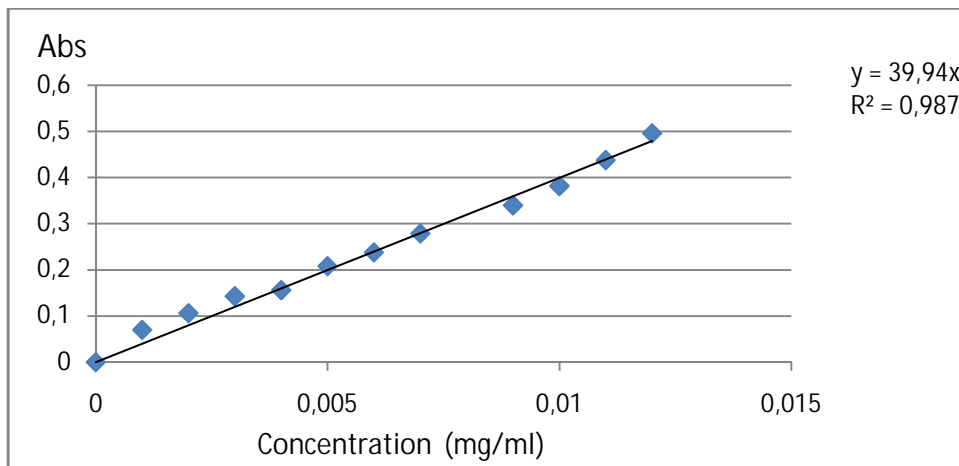
- ✓ L'utilisation de techniques plus performantes (HPLC, RMN...) pour identifier les molécules de ces plantes ;
- ✓ L'extraction et le dosage d'autres métabolites secondaires tels que les alcaloïdes et les huiles essentielles ;
- ✓ Développer d'autres tests (antioxydants, antimicrobiens...) ;
- ✓ Purification des extraits et identification des molécules actives ;
- ✓ Il est aussi important de suivre cette études par des applications *in vivo* afin d'évaluer l'effet des ces plantes sur l'organisme vivant.

Annexes

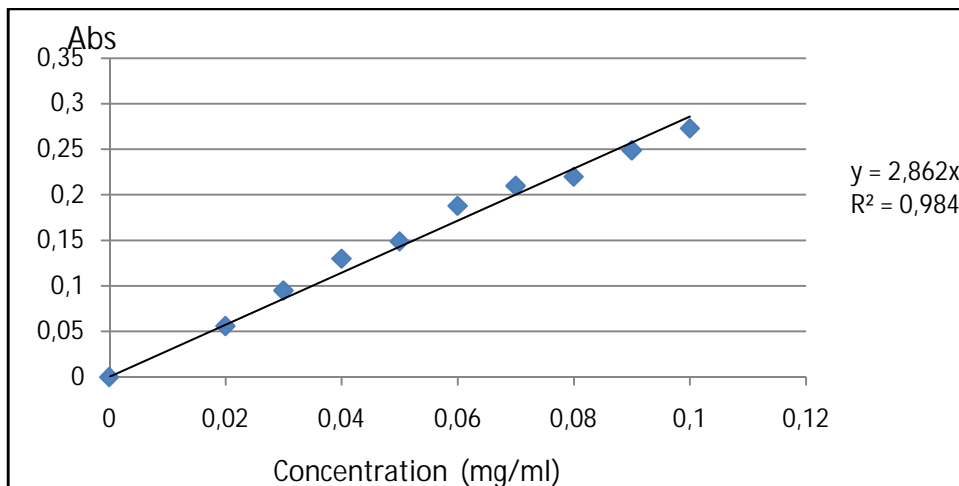
Annexe 01 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique



Annexe 02 : Courbe d'étalonnage de la quercetine



Annexe 03 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique



Annexe 04 : Tableau de comparaison des moyennes des PSAP

Plantes	moy	Groupe homogène
p015	62.092	I
p012	41.980	.. I
p013	38.594	.. I
p014	35.738	.. I
p003	28.211 I
p010	27.199 I
p011	26.515 II
p007	25.984 II
p009	25.013 II
p008	24.036 III
p002	23.214 III
p006	19.609 III
p004	16.946 II
p005	14.478 II
p001	8.2083 I

P001: Romarin acétonique
 P002: Myrte acétonique
 P003: Genévrier acétonique
 P004: Arbousier acétonique
 P005: Globulaire acétonique
 P006: Romarin éthanolique
 P007: Myrte éthanolique
 P008: Genévrier éthanolique
 P009: Arbousier éthanolique
 P010: Globulaire éthanolique
 P011: Romarin méthanolique
 P012: Myrte méthanolique
 P013: Genevriier méthanolique
 P014: Arbousier méthanolique
 P015: Globulaire méthanolique

Annexe 05 : Préparation des réactifs et solutions utilisées

- 1) **Acétone 70%** : 70 ml d'acétone + 30 ml d'eau distillée
- 2) **Ethanol 70%** : 70 ml d'éthanol + 30 ml d'eau distillée
- 3) **Méthanol 70%** : 70 ml de méthanol + 30 ml d'eau distillée
- 4) **Hydroxyde de sodium NaOH (1N)** : 2g NaOH dans 50 ml d'eau distillée
- 5) **Folin ciocalteu** (solution préparée)
- 6) **Carbonate de sodium Na₂CO₃ (20%)** : 30g de Na₂CO₃ dans 150 ml d'eau distillée
- 7) **Chlorure d'aluminium AlCl₃ (2%)** : 2g d'AlCl₃ dans 100 ml de methanol pur
- 8) **Acide chlorhydrique HCl (1N)** : 8,29 ml d'HCl à 37% ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée
- 9) **BSA (Serum Albumine Bovine)**
 - Tampon acétate à pH 5
 - ❖ 11,55 ml d'acide acétique dans 1000 ml d'eau distillée
 - ❖ 27,2 g d'acétate de sodium dans 1000 ml d'eau distillée

De ces deux solutions, prendre 14,8 ml de la solution acide acétique + 35,2 ml d'acétate de sodium et ajuster à 100 ml avec de l'eau distillée

- La solution BSA : 100 mg de BSA dans 100 ml de tampon acétate à pH 5

10) SDS/TEA

- 50 ml de TEA, 10g SDS et ajuster à 11 d'eau distillée
- 11) **FeCl₃ (0,1%)** : 100 mg de FeCl₃ dans 100 ml d'eau distillée
 - 12) **Tampon phosphate (0,05M- pH 7)** : 0.68g de KH₂PO₄ dans 100 ml d'eau distillée. 0.87 g de K₂HPO₄ dans 100 ml d'eau distillée ; ajuster la solution acide avec la solution basique jusqu'à l'obtention d'un pH 7
 - 13) **Solution DPPH** : 2.4 mg de DPPH dans 100ml du méthanol pure
 - 14) **Solution d'acide linoléique** : 2,51ml d'acide linoléique sont ajustés à 100ml avec de l'éthanol pur.
 - 15) **Solution de Chloride ferrique (FeCl₂)** : dissoudre 253.6 mg de FeCl₂ dans 100 ml l'HCl à 3,5%.
 - 16) **Solution de Thiocyanate d'ammonium** : 30g de poudre de Thiocyanate d'ammonium sont dissout dans 100ml d'eau distillée.

Références bibliographiques

A

1. **Abu-Reidah I-M., Arráez-Román D., Quirantes-Piné R., Fernández-Arroyo S., Segura-Carretero A. et Fernández-Gutiérrez A. (2012).** HPLC–ESI-Q-TOF-MS for a comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in cucumber whole fruit extract. *Food Research International*. 46:108–117.
2. **Abutbul S., Golan-Goldhirsh A., Barazani O et Zilberg D. (2004).** Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis sp*). *Aquaculture*. 238: 97–105.
3. **Afkir S., Benoit N-T., Aziz M., Zoheir J., Cuisinaud G., Bnouham M., Mekhfi H., Legssyer A., Lahlou S. et Ziyat A. (2008).** *Arbutus unedo* prevents cardiovascular and morphological alterations in L-NAME-induced hypertensive rats Part I: Cardiovascular and renal hemodynamic effects of *Arbutus unedo* in L-NAME-induced hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 116: 288–295.
4. **Agostinho P., Duarte C-B. et Oliveira C-R. (1996).** Intracellular free Na⁺ concentration increases in cultured retinal cells under oxidative stress conditions. *Neuroscience Research*. 25: 343-351
5. **Aidi Wannes W., Mhamdi B. et Marzouk B. (2009).** Variations in essential oil and fatty acid composition during *Myrtus communis* var. *italica* fruit maturation. *Food Chemistry*. 112: 621–626.
6. **Aidi Wannes W., Mhamdi B., Sriti J., Ben Jemia M., Ouchikh O., Hamdaoui G., Kchouk M-E. et Marzouk B. (2010).** Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology*. 48:1362–1370.
7. **Alarcon Flores M-I. , Romero-Gonzalez R., Frenich A-G. et Martinez J-L. (2012).** Analysis of phenolic compounds in olive oil by solid-phase extraction and ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*.134: 2465–2472.
8. **Almajano M-P., Carbo R., Lopez Jiménez J-A. et Gordon M-H. (2008).** Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusion. *Food chemistry*. 108: 55-63.
9. **Alzoubi K- H., Khabour O- F., Abu Rashid B., Damaj I- M. et Salah H-A. (2012).** The neuroprotective effect of vitamin E on chronic sleep deprivation-induced memory impairment: The role of oxidative stress. *Behavioural Brain Research*. 226: 205- 210.

10. **Andres A., Donovan S-M. et Kuhlenschmidt M-S. (2009).** Soy isoflavones and virus infections. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 20: 563–569.
11. **Aslam S-N., Stevenson P-C., Kokuben T, et Hall D-R. (2009).** Antibacterial and antifungal activity of cicerfuran and related 2-benzofurans and stilbens. *Microbiological research*. 164: 191-195.
12. **Atoui A.K., Mansouri A., Boskou G. et Kefalas P. (2005).** Tea and herbal infusion: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food chemistry*. 89: 27-36.
13. **Aydın C. et Özcan M-M. (2007).** Determination of nutritional and physical properties of myrtle (*Myrtus communis L.*) fruits growing wild in Turkey. *Journal of Food Engineering*. 79: 453–458.

B

- 14. Balasundram N., Sundram K. et Samman S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99: 191–203.
- 15. Barboni T., Venturini N., Paolini J., Desjobert J-M., Chiaramonti N. et Costa J. (2010).** Characterisation of volatiles and polyphenols for quality assessment of alcoholic beverages prepared from Corsican *Myrtus communis* berries. *Food Chemistry*. 122: 1304–1312.
- 16. Bast A. et Haenen G-R-M-M. (2002).** The toxicity of antioxidants and their metabolites. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 11: 251-258.
- 17. Ben amour B. (2008).** Maitrise de l’aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d’extraction de principes actifs ; texturation par Détente Instantanée Controlée DIC : Doctorat, opération : Génie des procédés industriels. La Rochelle : Université de la Rochelle.187p.
- 18. Beretta G., Artali R., Maffei Facino R. et Gelmini F. (2011).** An analytical and theoretical approach for the profiling of the antioxidant activity of essential oils: The case of *Rosmarinus officinalis L.* *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 55: 1255-1264.
- 19. Blouin J., Lorca L., Montreau F-R. et Dufour J-H. (1998).** Etude des conditions optimales pour la détermination des composées phénoliques totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu In : *Connaissance de la vigne et du vin*. 6 : 405-413
- 20. Boudet AM. (2007).** Evolution and current status of research in phenolic compound. *Phytochemistry Review*. 68: 2722-2735.

21. **Bourgoud F., Gravot A., Milesie S. et Gontier E. (2001).** Production of plant secondary metabolite: a historical perspective. *Plant science*. 161: 839-851.
22. **Boutiti A. (2005).** Etude phyto chimique de l'espece *Globularia alypum L.* Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de magister en sciences domaine: chimie organique option: Phytochimie. Université Mentouri Constantine. 83.
23. **Box H-C., Dawidzik J-B. et Budzinski E-E. (2001).** Free radical-induced double lesions in DNA. *Free Radical Biology & Medicine*. 31. 7: 856–868.
24. **Bruneton J. (1999).** Phytochimie, plantes médicinales, pharmacognosie. 3eme éd. Tec et Doc Lavoisier. Paris. P 484-487.
25. **Bruneton J. (2009).** Phytochimie, plantes médicinales, pharmacognosie. 4eme éd. Tec et Dec Lavoisier. Paris. P 487-49.

C

26. **Carrasco-Pancorbo A., Cerretani L., Bendini A., Segura-Carretero A., Gallina-Toschi T. et Fernandez-Gutiérrez A. (2005).** Analytical determination of polyphenols in olive oils. *J. Sep. Sci.* 28: 837-858.
27. **Castellanos I. et Espinosa-Garcia F-G. (1997).** Plant secondary metabolite diversity as a resistance trait against insects: a test with *Sitophilus Granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and seed secondary metabolites. *Biochemical Systematics and ecology*. 25.7: 591-602.
28. **Celikel G., Demirsoy L. et Demirsoy H. (2008).** The strawberry tree (*Arbutus unedo L.*) selection in Turkey. *Scientia Horticulturae*. 118: 115–119.
29. **Cesarini J-P. (2004).** Le Sélénium: actualité. 2em éd. John Libbey eurotext. 145p.
30. **Cherubini A., Ruggiero C., Polidori M-C. et Mecocci P. (2005).** Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology & Medicine*. 39: 841– 852. .

D

31. **De Mejia E-G., Songa Y-S., Hecka C-I. et Ramirez-Mares M-V. (2010).** Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. *Journal of functional foods*. 2: 23 –34.
32. **Deaton C-M. et Marlin D-J. (2003).** Exercise-Associated Oxidative Stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*. Vol 2. 3: 278-291.

33. **Demoffarts B., Kirschvink N., Pincemail J. et Lekeux P. (2005).** Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. *Annales de médecine vétérinaire*. 149: 1-9.
34. **Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P. et Vidal N. (2006).** Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*. 97: 654–660.
35. **Dorninburg H. et Knorr D. (1995).** Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme and microbial technology*. 17: 674-684.
36. **Duenas M., Hernández T. et Estrella I. (2006).** Changes in the content of bioactive polyphenolic compounds of lentils by the action of exogenous enzymes. Effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry* .101: 90–97.

E

37. **Es-Safi N-E., Kollmann A., Khlif S. et Ducrot P-H. (2007).** Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum* L. structure–activity relationship. *LWT*. 40 : 1246–1252.

F

38. **Falleh H., Ksouri R., Medini F., Guyot S., Abdelly C. et Magné C. (2011).** Antioxidant activity and phenolic composition of the medicinal and edible halophyte *Mesembryanthemum edule* L. *Industrial Crops and Products*. 34: 1066–1071.
39. **Fardet A., Rock E. et Rémésy C. (2008).** Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected *in vivo*. *Journal of Cereal Science*. 48: 258-276.
40. **Fiorentino A., Castaldi S., Abrosca B., Natale A., Carfora A., Messere A. et Monaco P. (2007).** Polyphenols from the hydroalcoholic extract of *Arbutus unedo* living in a monospecific Mediterranean woodland. *Biochemical Systematics and Ecology*. 35: 809-811.
41. **Fliegmann J., Furtwängler K., Malterer G., Cantarello C., Schüler G., Ebel J. et Mithöfer A. (2010).** Flavone synthase II (CYP93B16) from soybean (*Glycine max* L.). *Phytochemistry*. 71: 508–514.

42. **Fotti M. et Ruberto G. (2001)**. Kinetic solvent effects on phenolic antioxidants determined by spectrophotometric measurements. *J.agric.Food Chemistry*. 49: 342-348.
43. **Freitas V., Carvalho E. et Mateus N. (2003)**. Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. *Food chemistry*. 81: 503-509.
44. **Fu L., Xu B-T., Xu X-R., Gan R-Y., Zhang Y., Xia E-Q. et Li H-B. (2011)**. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*. 129: 345–350.

G

45. **Garcia D., Zamora R, Hodar J-A. et Gomez J-M. (1999)**. Age structure of *Juniperus communis* L. in the Iberian peninsula: Conservation of remnant populations in Mediterranean mountains. *Biological Conservation*. 87: 215-220.
46. **Gardeli C., Papageorgiou V., Mallouchos A.,Theodosis K. et Komaitis M.(2007)**. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry*. 107: 1120–1130.
47. **Gaté L., Paul J., Nguyen Bal G., Tew K-D. et Tapierol H. (1999)**. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed & Pharmacother*. 53: 169-80.
48. **Ghasemnezhad M., Sherafati M. et Payvast G-A.(2011)**. Variation in phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity of five coloured bell pepper (*Capsicum annum*) fruits at two different harvest times. *Journal of functional foods*. 3: 44 –49.
49. **Gonzalez-Trujano M-E., Pena E-I., Martinez A-L., Moreno J., Guevara-Fefer P., D'eciga-Campos M. et Lopez-Muno F-J. (2007)** : Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*. 111: 476–482.
50. **Goodwin P-H., Hsiang T. et Ericson L. (2000)**. A comparison of stilbene and chalcone synthases including a new stilbene synthase gene from *Vitis riparia* cv. Gloire de Montpellier. *Plant Science*. 151: 1-8.

51. **Gordiena A-Y., Graya A-I., Franzblaub S-G. et Seidel V. (2009).** Antimycobacterial terpenoids from *Juniperus communis L.* (Cupressaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 126 : 500–505.
52. **Gouttebel M-C., Zhang G-H., Saingra B. et Joyeux H. (1996).** Role protecteur d'un apport oral de sélénium et de vitamine E vis-à-vis de la cardiotoxicité induite par les anthracyclines chez le rat. *Nutr. Clin. Métabol.* 10 : 69-76.
53. **Guignard J .L. (1979).** Abrégé de biochimie végétale. 2^e édition.Masson. P173-231.

H

54. **Hagerman A-E. et Butler L-G. (1978).** Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *J agric Food Chem.* 26: 809-812.
55. **Hale A-L. (2003).** Screening potato Gendypes for Antioxidant Activity. Identification of the Responsible Compounds, and Differentiating Russet Norkotah Strains Using Aflp and Microsatellite Marker Analysis. Office of Graduate Studies of Texas M University. Genetics. 260.

56. **Hayder N., Abdelwahed A., Kilani S., Ben Ammar R., Mahmoud A., Ghedira K. et Chekir-Ghedira L. (2004).** Anti-genotoxic and free-radical scavenging activities of extracts from (Tunisian) *Myrtus communis*. *Mutation Research*. 564: 89–95.
57. **Hayouni E-A., Abedrabba M., Bouix M. et Hamdi M. (2007).** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera L.* and *Juniperus phoenicea L.* fruit extracts. *Food Chemistry*. 105: 1126–1134.
58. **Heim K-E., Tagliaferro A- R. et Bobilya D-J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 13: 572–584.
59. **Heo H-J., Kim Y-J., Chung D. et Kim D-O. (2006).** Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chemistry*. 104: 87–92.
60. **Huang D., Ou B. et Prior R-L. (2005).** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 53: 1841-1856.

61. **Hurtado-Fernandez E., Gomez-Romero M., Carrasco-Pancorbo A. et Fernandez-Gutierrez A. (2010).** Application and potential of capillary

electro separation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 53: 1130–1160.

I

62. **Iserin P. (2001)**. Encyclopédie des plantes médicinales: identification, préparation, soins. Edition Larousse. 335P.

J

63. **Jayaprakasha G-K., Negi P-S. et Jena B-S. (2006)**. Antioxidative and antimutagenic activities of the extracts from the rinds of *Garcinia pedunculata*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 7: 246–250.
64. **Jeyaramraja P-R., Meenakshi S-N., Kumar R-S., Joshi S-D. et Ramasubramanian B. (2005)**. Water deficit induced oxidative damage in tea (*Camellia sinensis*) plants. *Journal of Plant Physiology*. 162: 413- 421.
65. **Jolivet C., Guillet B., Karroum M., Andreux F., Bernoux M. et Arrouays D. (2001)**. Les phenols de la lignine et le C¹³, traceurs de l'origine des matieres organiques du sol. *Earth and Planetary sciences*. 333 : 651-657.

K

66. **Kamatou G-P-P., Van Zyl R-L., Van Vuuren S-F., Figueiredo A-C., Barroso J-G., Pedro L-G. et Viljoen A-M. (2008)**. Seasonal variation in essential oil composition, oil toxicity and the biological activity of solvent extracts of three south Africa *Salvia* species. *South African Journal of Botany*. 74: 230-237.
67. **Katz H., Ziv O., Venkatachalam R., Sholomo E., Halevy A-H. et WEISS D. (2003)**. promotion of *Glodularia sarcophylla* flowering by uniconazol, an inhibitor of gibberellin biosynthesis. *scientia Horticulturae*. 98: 423-431.

L

68. **Lamaison J-L. et Carnet A. (1990)**. Teneurs en principaux flavonoides des fleurs et des feuilles de *Crataegus monogyna jacq*, et de *Crataegus lavigata* (poiret) D. C en fonction de la végétation Plants. *Med phytother*. 1-25.
69. **Lapornik B., Prosek M. et Wandra A. (2005)**. Comparaison of extracts prepared from plant by product using different solvant and extraction time. *Journal of food engineering*. 2: 214-222.
70. **Lee Y-T. (2011)**. Structure activity relationship analysis of phenolic acid phenethyl esters on oral and human breast cancers: The grey approach. *Computers in Biology and Medicine*. 41: 506–511.

71. **Li H., Deng Z., Wu T., Liu R., Loewen S. et Tsao R. (2011).** Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chemistry*. 130: 928–936.
72. **Luthria D-L., Biswas R. et Savithiry N. (2007).** Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. *Food Chemistry*. 105: 325–333.

M

73. **Macheix J-J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C-H. (2005).** les composés phénoliques des végétaux: presse polytechniques et universitaires de Romandes. 192p.
74. **Madi A. (2010).** Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Magister. Option : Biotechnologie végétale, Université Mentouri (Constantine). 107.
75. **Makkar H-P-S. (2003).** Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*. 49: 241-256.
76. **Maksimovic Z., Malencic N-D. et Kovacevic N. (2005).** Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource Technology*. 96: 873-877.
77. **Mansouri N., Satrani B., Ghanmi M., El-Ghadraoui L., Guedira A. et Aafi A. (2011).** Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Juniperus communis* du Maroc. *Bulletin de la société royale des sciences de Liège*. Vol 80. 458-805.
78. **Marc F-R., Davin A., Deglene B-L. et Ferrand C. (2004).** Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *M/S médecine sciences*. 20: 458-463.
79. **Martin S et Andrintsitohainia R. (2002).** Mécanisme de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Journal Annale de cardiologie*. 51: 304-315.
80. **Mendes L., Freitas V., Baptista P. et Carvalho M. (2011).** Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food and Chemical Toxicology*. 49: 2285–2291.
81. **Messaoud C., Béjaoui A. et Boussaid M. (2011).** Fruit color, chemical and genetic diversity and structure of *Myrtus communis* L. var. *italica* Mill. morph populations. *Biochemical Systematics and Ecology*. 39: 570–580.

82. **Miwa K. et Fujita M. (2008).** Increased oxidative stress suggested by low serum vitamin E concentrations in patients with chronic fatigue syndrome. *Food Chemistry*. 238-239.
83. **Mohammedi Z. (2006).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de magistère en biologie option : Produits naturels, Activité biologique et synthèse. Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen. 105P.
84. **Montoro P., Tuberoso Carlo I-G., Piacente S., Perrone A., De Feo V., Cabras P. et Pizza C. (2006).** Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 1614–1619.

N

85. **Nair V-D., Panneerselvam R. et Gopi R. (2012).** Studies on methanolic extract of *Rauvolfia* species from Southern Western Ghats of India – *In vitro* antioxidant properties, characterisation of nutrients and phytochemicals. *Industrial Crops and Products*. 39: 17– 25.
86. **Nazck Y. et Shahidi F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography*. 1054: 95-111.

O

87. **Oliveira I., Coelho V., Baltasar R., Pereira J-A. et Baptista P. (2009).** Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. *Food and Chemical Toxicology*. 47: 1507–1511.
88. **Oliveira I., Baptista P., Malheiro R., Casal S., Bento A. et Pereira J-A. (2011).** Influence of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity. *Food Research International*. 44:1401–1407.
89. **Osawa T et Namiki M. (1981).** A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of eucalyptus leaves. *Agricultural and biological chemistry*. 45: 735-739.

P

90. **Pabuccuoglu A., Kivcak B., Bas M. et Mert T. (2003).** Antioxydant activity of *Arbutus unedo* leaves. *Fitoterapia*. 74: 597-599.
91. **Park E-J. et Jhon D-Y. (2009).** The antioxidant, angiotensin converting enzyme inhibition activity, and phenolic compounds of bamboo shoot extracts. *LWT - Food Science and Technology*. 43: 655–659.

92. **Parrilla-Taylor D-P. et Zenteno-Savín T. (2011)** Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation. *Aquaculture*. 318: 379-383.
93. **Poortmans J- R et Boisseau N. (2003)**. Stress et exercices. In << Biochimie des activités physiques>>. 2em éd. De Boeck Supérieur. 416-417.
94. **Popovici C., Saykova I. et Tylkowski B. (2009)**. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*. 4: 25-39.
95. **Poston L, et Raijmakers M-T-M. (2004)**. Trophoblast Oxidative Stress, Antioxidants and Pregnancy Outcome. 18: 72-78.
96. **Powers S-K., Bradley W-N. et Hudson M-B. (2011)**. Exercise-induced oxidative stress in humans: Cause and consequences. *Free Radical Biology & Medicine*. 51: 942–950.
97. **Prakash A-S., Pereira T-N., Reilly P-E-B. et Seawright A-A. (1999)**. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mutation research*. 443: 53-67.
98. **Prescott L., Harley J. and Klein D-A. (2003)**. Microbiologie. 2em éd. Edition de Boeck: 145-146.

R

99. **Rackova L., Firakova S., Kostalova D. Stefek M. (2005)**. Oxidation of liposomal membrane suppressed by flavonoids: Quantitative structure–activity relationship. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 13: 6477–6484.
100. **Ranalli A., Contento S., Lucera L., Difebo M., Archegiant D. et Fonzo A. (2006)**. Factor affecting the content of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europaea L.*). *J. Agri. Food chem*. 54: 438-448.
101. **Ratnam D-V., Ankola D-D., Bhardwaj V., Sahana D-K. et Ravi-Kumar M-N-V. (2006)**. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*. 113: 189–207.
102. **Ribèreau-Gayon. (1968)**. Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod. Paris. 254P.
103. **Richter G. (1993)**. Métabolismes des végétaux <<physiologie et biochimie>>. Edition presse polytechniques et universitaires de Romandes: 317-339.
104. **Rocha-Guzman N-E., Herzog A., Gonzalez-Laredo R-F., Ibarra-Perez F-J., Zambrano-Galvan G. et Gallegos-Infante J-A. (2007)**. Antioxidant and

antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*). *Food Chemistry*. 103: 521–527.

105. **Rodríguez Vaquero M-J., María R., Alberto M-R. et Manca de Nadra M-C. (2006).** Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 18: 587–593.

S

106. **Sarni-Manchado P. et Cheynier V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. 8 ed. Tec et Doc. 398P.
107. **Scehovic J. (1990).** Tannins et autres polymères phénoliques dans les plantes de prairies: détermination de leur teneur et leur activité biologique. *Revue Suisse Agri.* 22 : 179-184.
108. **Serazedinova L., Oldach K-H. et Lorz H. (2005).** Expression of transgenic stilbene synthase in wheat causes the accumulation of unknown stilbene derivatives with antifungal activity. *Journal of plant physiology*. 161: 985-1002.
109. **Shi C., Xu M-J., Bayer M., Deng Z-W., Kubbutat M- H-G., Waejen W., Proksch P. et Lin W-H. (2009).** Phenolic compounds and their anti-oxidative properties and protein kinase inhibition from the Chinese mangrove plant *Laguncularia racemosa*. *Phytochemistry*. 71: 435–442.
110. **Shikanga E-A., Combrinck S. et Regnier T. (2010).** South African Lippia herbal infusions: Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities. *South African Journal of Botany*. 76: 567–571.
111. **Siddhuraju P. et Manian S. (2007).** The antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of dietary phenolic extracts from horse gram (*Macrotyloma uniflorum*) seeds. *Food Chemistry*. 105: 950–958.
112. **Singleton V-L., Orthofer R. et Lamuela-Raven Tos R-M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent. *Methods enzymol*. 299: 195-199.
113. **Soufleros E-H., Mygdalia S-A. et Natskoulis P. (2005).** Production process and characterization of the traditional Greek fruit distillate ‘Koumaro’ by aromatic and mineral composition. *J. Food Compos. Anal.* 18: 699-716.

114. **Spignone G., Tramelli L. et De Faveri D-M. (2007).** Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*. 81: 200–208.
115. **Sreerama Y-N., Sashikala V-B. et Pratapa V-M. (2012).** Phenolic compounds in cowpea and horse gram flours in comparison to chickpea flour: Evaluation of their antioxidant and enzyme inhibitory properties associated with hyperglycemia and hypertension. *Food Chemistry*. 133: 156–162.
116. **Sun B., Ribes A-M., Leandro M-C., Belchior A-P. et Spranger M-I. (2006).** Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids of wine and variation during wine maturation. *Analytica Chimica Acta*. 563: 382-390.
117. **Sun L., Zhang J., Lu X., Zhang L. et Zhang Y. (2011).** Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki L.*) leaves. *Food and Chemical Toxicology*. 49 : 2689–2696.

T

118. **Tabart J., Kevers C., Sipel A., Pincemail J., Defraigne J-O. et Dommes J. (2007).** Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage. *Food Chemistry*. 105: 1268–1275.
119. **Taleb-Dida N., Krouf D. et Bouchenak M. (2011).** *Globularia alypum* aqueous extract decreases hypertriglyceridemia and ameliorates oxidative status of the muscle, kidney, and heart in rats fed a high-fructose diet. *Nutrition Research*. 31: 488–495.
120. **Tamimi R-M., Lagion P., Adami H-O. et Trichopoulos D. (2002).** Prospects of chemoprevention of cancer. *Journal of International Medicine*. 215: 286-300.
121. **Tanguy S., Boucher F-R., Mafroy B. et Delleiris J-G. (1996).** Free radicals in reperfusion-induced arrhythmias: study with euk 8, a novel nonprotein catalytic antioxidant. *Free Radical Biology & Medicine*. 21. 7: 945-954.
122. **Terashima N., Awano T., Takabe K, et Yoshida M. (2004).** Formation of macromolecular lignin in ginkgo xylem cell walls as observed by field emission scanning electron microscopy. *C.R. Biologies*. 327: 903-910.
123. **Therriault M., Caillet S., Kermasha S. et Lacroix M. (2006).** Antioxidant, antiradical and antimutagenic activities of phenolic compounds present in maple products. *Food Chemistry*. 98: 490–50.

124. **Thomas R-H., Bernardis M-A., Drake E-E. et Guglielmo C-G. (2010).** Changes in the antioxidant activities of seven herb- and spice-based marinating sauces after cooking. *Journal of Food Composition and Analysis*. 23: 244–252.
125. **Trabelsi N., Megdiche W., Ksouri R., Falleh H., Oueslati S., Bourgou S., Hajlaoui H. et Abdely C. (2010).** Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT - Food Science and Technology*. 43: 632–639.
126. **Tuberoso C -I-G., Rosa A., Bifulco E., Melis M-P., Atzeri A., Pirisi F-M . et Dessì M. (2010).** Chemical composition and antioxidant activities of *Myrtus communis* L.berries extracts. *Food Chemistry*. 123: 1242–1251.
127. **Turkmen N., Sari F. et Sedat Velioglu Y. (2006).** Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and folin-ciocalteu method. Ankara University faculty of Engineering. *Food chemistry*. Volume 99. 4: 835-841.

V

128. **Valls J., Millán S., Martí M-P., Borràs E. et Arola L. (2009).** Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of Chromatography A*. 1216: 7143–7172.
129. **Vannucchi C-I., Jordao A-A. et Vannucchi H. (2007).** Antioxidant compounds and oxidative stress in female dogs during pregnancy. *Research in Veterinary Science*. 83: 188-193.

W

130. **Wijekoon M-M-J-O., Bhat R. et Alias K. (2011).** Effect of extraction solvents on the phenolic compounds and antioxidant activities of bunga kantan (*Etlingera elatior* Jack.) inflorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24: 615–619.
131. **Wills R-B-H. et Morgan M. (2000).** Herbal products :active constituents, modes of action and quality of control. *Nutrition Research Reviews*.13: 47-77.

X

132. **Xanthopoulou M-N., Fragopoulou E., Kalathara K., Nomikos T., Karantonis H-C. et Antonopoulou A. (2009).** Antioxidant and anti-inflammatory activity of red and white wine extracts. *Food Chemistry*. 120: 665–672.

Y

133. **Yesil-Celiktasa O., Nartopb P., Gurelb A., Bedirb E. et Vardar-Sukanb F. (2007).** Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from *Rosmarinus officinalis*'calli. *Journal of Plant Physiology*. 164: 1536 - 1542.

Z

134. **Zadernowski R., Czaplicki S. et Naczk M. (2009).** Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (*Garcinia mangostana*). *Food Chemistry*. 112: 685–689.
135. **Zaidi F., Hassissene N., Allouache H., Kichou M., Ourdani S., Rezki K., Bellal M-M., Grongnet J-F. et Youyou A. (2009).** Les composés phénoliques, facteur limitant du grignon d'olive chez les ruminants. *Revue Méd. Vét.* 160: 67-73.
136. **Zaghad N. (2009).** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinale d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antimicrobienne. magister en biologie végétale et écologie : biotechnologie végétale. Constantine. université Mentouri. 72 p.
137. **Zegura B., Dobnik D., Hojnik N-M. et Filipic M. (2011).** Antioxidant and antigenotoxic effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) extracts in *Salmonella typhimurium* TA98 and HepG2 cells. *Environmental toxicology and pharmacology*. 32: 296–305.

Résumé :

Dans le rapport que nous avons élaboré; la recherche à été principalement orientée sur l'étude de cinq plantes locales (*Rosmarinus officinalis*, *Myrtus communis*, *Juniperus communis*, *Arbutus unedo* et *Globularia alypum*). L'objectif recherché est l'extraction des composés phénoliques en utilisant trois solvants (**acétone 70%**, **éthanol 70%**, **méthanol 70%**) ; ce qui nous donne d'une part un état comparatif des teneurs en **composés phénoliques** des extraits des feuilles des cinq plantes et d'autre part entre les trois solvants, ainsi que l'évaluation de leurs **activités antioxydantes** (**activité antiradicalaire « radical DPPH », Inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique**).

L'extrait du *Myrtus communis* à l'acétone se caractérise par la plus grande teneur en phénols totaux solubles (176.02 mg EAG/ g), la plus faible teneur a été obtenue pour les extraits méthanoliques du *Rosmarinus officinalis* et du *Globularia alypum* (20,11, 22,07 mg EAG/g) ainsi que l'extrait éthanolique du *Juniperus communis* (27,53 mg EAG/ g).

L'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique varie fortement (51,77 à 96,6%) d'un extrait à un autre, la plus faible est enregistrée chez *Rosmarinus officinalis* (51,77%) extraits à l'acétone. Concernant l'activité antiradicalaire, globalement c'est les extraits du *Myrtus communis* qui manifestent une grande activité que l'extrait correspondant des autres plantes.

Mots clés : *Rosmarinus officinalis*, *Myrtus communis*, *Juniperus communis*, *Arbutus unedo* et *Globularia alypum*, acetone 70%, éthanol 70%, méthanol 70%, composés phénoliques, activité antioxydante, radical DPPH, peroxydation de l'acide linoléique.

