

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire et Moléculaire

N° d'ordre : 69/Mag/2013

N° de série : 01/Bioc/2013

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

Magister

Option : Biologie appliquée

Thème :

**Etude comparative du contenu phénolique et
du pouvoir antioxydant de quelques plantes
médicinales et des céréales alimentaires.**

Présenté par : M^{elle} Khelfallah Amina

Devant le jury:

M ^f BENLARIBI M.	Président	Pr. Uni. Constantine 1
M ^f MERGHEM R.	Directeur de thèse	Pr. Uni. Constantine 1
M ^f NAAMOUNE H.	Examineur	Pr. INATAA
M ^f KHELIFI D.	Examineur	Pr. Uni. Constantine 1

Année universitaire : 2012-2013

ABBREVIATIONS

ACN	: Acétonitril
AcOEt	: Acétate d'éthyl
AIA	: Acide B-indoyl acétique
AlCl₃	: Chlorure d'aluminium
APGI	: Acide gras poly insaturé
BHA	: Hydroxyanisolbutyle
BHT	: Butylhydroxytoluène
Cat	: Catalase
CCM	: Chromatographie sur couche mince
CH₃	: Groupe méthyl
CHI	: Chalcone isomérase
DAD	: Détecteur à barrette de diode
DPPH	: 1,1-diphényl 2- picrylhydrazyl
EC₅₀	: Concentration efficace à 50%
ERO/ROS	: Espèces réactives oxygénées (Reactive oxygen species)
GPX's	: Glutathion peroxydase
H₃BO₃	: Acide borique
HCOOH	: Acide formique
HPLC	: Chromatographie liquide à haute performance/pression
IG	: index glycémique
INATAA	: Institut de la nutrition de l'alimentation et des technologies agroalimentaires
L.N.T.A.	: Laboratoire de recherche en Nutrition et Technologie Alimentaire
LDL	: lipoprotéine de faible densité
MEC	: Methyl éthyl cétone
MeOH	: Méthanol
MPO	: myéloperoxydase

MS : spectrométrie de masse

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium

NAD (P) H, H⁺/NADP⁺ : Nicotinamide adénine di nucléotide réduit/ oxydé

NaOAc : Acétate de sodium

Neu : Ethyl aminoester de l'acide diphényl borique

NOX : NADPH oxydase

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PNT : Parc national de Taza

Rf : rapport frontale

RMN : résonance magnétique nucléaire

RO₂[°] : radical pyroxyde

SAU : superficie agricole utile

SO₂ : dioxyde de soufre

SOD : Superoxyde dismutase

TBHQ : Tert-butylhydroquinone

T_r : Temps de rétention

UV : Ultra-violet

Sommaire

Introduction.....1

Première partie : Etude Bibliographique

Chapitre 01 : Les composés phénoliques

1- Définition et Caractéristiques.....	4
2- Biosynthèse.....	4
3- Principales classes	6
4- Localisation des composés phénoliques.....	13
5- Rôles et propriétés des composés phénoliques.....	14

Chapitre 02 : Stress oxydant-Antioxydants

1-Le Stress oxydant	16
1-1-Généralités.....	16
1-2-Définition.....	17
1-3-Les radicaux libres	17
1-4-Implications pathologiques du stress oxydant.....	21
2-Les antioxydants alimentaires	21
2-1-Mécanismes d'action des antioxydants	22
2-2-Les composés phénoliques en tant qu'agents antioxydants	24

Chapitre 03 : Les céréales alimentaires

1- Présentation	26
2- Classification	26
3- Le grain d'une céréale	27
4- Le son de céréales	29
5- Le germe de céréales	34
6- Les effets santé attribués aux grains entiers	36

Chapitre 04 : Les plantes médicinales

1- Notions générales	38
2- La famille des Lamiacées	38
3- Description des plantes étudiées	40

Deuxième partie: Matériel et Méthodes

1- Matériels végétales	47
2- Analyse phytochimique	52
2-1- Préparation des extraits	52
2-2- Aspect quantitatif	54
2-2-1-Dosage des composés phénoliques totaux.....	54
2-2-2-Dosage des flavonoïdes totaux.....	55
2-3- Aspect qualitatif	56
2-3-1-La chromatographie sur couche mince (CCM) analytique.....	56
2-3-2-La chromatographie sur couche mince bidimensionnelle (2D-TLC).....	60
2-3-3-La spectrophotométrie UV- Visible.....	62
2-4- La chromatographie Liquide à haute performance (CLHP).....	71
3- Le pouvoir antioxydant « test au DPPH° »	73
3-1- Principe.....	73
3-2- Mode opératoire.....	74

Troisième partie : Résultats et interprétations

3-1- Résultats et interprétation de la partie des céréales alimentaires

1- Les céréales alimentaires	76
2- Analyse phytochimique	76
2-1- Préparation des extraits	76
2-2- Aspect quantitatif	77
2-2-1- Dosage des composés phénoliques totaux	77
2-2-2- Dosage des flavonoïdes totaux.....	79
2-2-3- Corrélation entre le contenu phénolique-flavonoïdes	81
2-3- Aspect qualitatif.....	82
2-3-1-Diagnostic sur chromatographie analytique sur couche mince.....	82
2-3-2-L'analyse spectrale des molécules isolées	84
2-4- Analyse par HPLC-DAD.....	88

3- Le pouvoir antioxydant « test au DPPH° »	97
3-1- Le pouvoir antioxydant des antioxydants de référence	97
3-2- Le pouvoir antioxydant des extraits de céréales alimentaires.....	98
3-3- Relation contenu phénolique-pouvoir antioxydant.....	101
3-2- Résultats et interprétation de la partie des plantes médicinales	
1- Les plantes médicinales	103
2- Analyse phytochimique	103
2-1- Préparation des extraits	103
2-2- Aspect quantitatif	103
2-2-1- Dosage des composés phénoliques totaux	103
2-2-2- Dosage des flavonoïdes totaux.....	105
2-3- Aspect qualitatif	107
2-3-1- CCM analytique.....	107
2-3-2- CCM bidimensionnelle.....	113
3- Le pouvoir antioxydant « test au DPPH° »	122
1- Le pouvoir antioxydant des deux espèces d'Origan	122
2- Le pouvoir antioxydant de <i>C. grandiflora</i> et de <i>T. numidicus</i>	123
3- Relation contenu phénolique-pouvoir antioxydant.....	125
3-3- Discussion générale	126
Conclusion générale et perspectives	132
Références bibliographiques	134
Annexes	

Introduction

Depuis la nuit des temps, la première préoccupation de l'homme fut de satisfaire ses besoins alimentaires, puis il dut lutter contre les maladies ou le mal être qui touchait son corps et son esprit. Face à la maladie, il a cherché dans son environnement entre autres les plantes qui pourraient le soulager. Par l'intuition, l'observation, l'expérimentation sur eux-mêmes ou sur des animaux, les hommes sélectionnèrent les végétaux utiles, ceux qui nourrissent, ceux qui soignent, ceux qui empoisonnent ou tuent et ceux qui peuvent être utile à la chasse ou à la guerre.

Hippocrate (460-370 avant J.C.) souvent appelé « le père de la médecine » disait : « Que ta nourriture soit ta médecine et ta médecine, ta nourriture. ». Aujourd'hui, la relation entre la nourriture et les médicaments se rapproche. Ainsi, le terme « nutraceutique » mentionné il y'a 20ans pour décrire une union entre la nutrition et la pharmacie, les deux principaux contributeurs au bien être de l'homme.

C'est d'abord vers les plantes toxiques, dont on avait pu constater l'activité sur les êtres vivants, que ce sont orientées les premières recherches chimiques. C'est la découverte de la morphine en 1804, extraite du pavot à opium, qui est toujours aujourd'hui le médicament de référence contre la douleur. Depuis la recherche a fait d'énormes progrès avec des outils de plus en plus performants pour identifier les molécules actives.

Actuellement, l'analyse des aliments est un domaine très vaste et très répandu. Il existe de nombreux laboratoires, tant dans la recherche, dans l'industrie que dans des agences réglementaires spécialisés dans celui-ci. En (2011), environ 6000 articles et seulement dans les premiers mois de (2012), environ 20 livres ont été publiés et directement liés à l'analyse des aliments, deux d'entre eux en particulier relié à l'analyse par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et la spectrométrie de masse (MS) (Stefano V.D. et *al.*, 2012).

D'après Merghem R. (2011), les plantes sont une précieuse source de nombreuses molécules. Ces végétaux synthétisent à côté des macronutriments, minéraux, vitamines, des phytonutriments ou phytoconstituants. Ces phytonutriments ont parfois des activités biologiques d'intérêt pour l'homme, pharmacologiques (plantes médicinales) ou nutritionnelles (aliments). Les substances bioactives végétales qui, aujourd'hui, intéressent le monde médical, l'industrie pharmaceutique mais aussi l'industrie alimentaire appartiennent essentiellement au groupe des « *composés phénoliques* ».

Les composés phénoliques ont suscité ces dernières années un vif intérêt due la reconnaissance de leurs propriétés antioxydantes et ainsi leurs implications probables dans la prévention des diverses pathologies associées au stress oxydant.

Ces composés marquent de manière originale, une famille, un genre ou une espèce de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique. Chez les végétaux, ils sont soumis à d'importantes variations quantitatives et qualitatives, ce qui témoigne d'une dynamique biochimique incontestable. Ils interviennent dans des processus vitaux les plus divers d'où l'importance croissante des études consacrées à ces composés.

Sur le plan phytochimique, ce n'est qu'à partir des années 80 que des équipes Algériennes se sont intéressé à ce genre de travaux. Les départements de Biologie et de Chimie de l'Université de Constantine ont été les pionniers dans ce domaine. Plusieurs travaux de recherche ont fait l'objet de mémoires de thèse de Magister et de plusieurs publications et communications nationales et internationales (Merghem R., 2000, Treki A., 2009 ; Benkiniouar R., 2007).

Le présent travail a fait l'objet d'une comparaison entre quelques plantes alimentaires et d'autres médicinales appartenant l'une à la famille des céréales et l'autre à la famille des Lamiacées sélectionnées selon deux marqueurs biologiques (leurs contenus phénoliques et leurs activités antiradicalaires), retenues d'après les travaux réalisés dans le Laboratoire de Biologie Micromoléculaire et Phytochimie (Bellebcir L., 2008, Treki A., 2009, Zeghad N., 2009, Madi A., 2010).

Nos objectifs sont :

- Ø Dévoiler d'autres intérêts autres que nutritionnels particulièrement pharmacologiques aux aliments connus par leur consommation élevée (cas des céréales alimentaires).
- Ø Trouver une nouvelle source de composés phénoliques peu couteuse ou résiduelle comme celles des industries agro-alimentaires (exemple les sons et les germes des céréales). Ces résidus peuvent s'intégrer dans des aliments connus : « aliments nutra-ceutiques ».
- Ø L'investigation phytochimique de quelques plantes médicinales connues pour leur endémisme à la flore d'Algérie peu ou pas encore ayant fait l'objet de ce type de travaux.

Notre étude se divise en trois grandes parties :

La première partie est consacrée aux dernières actualités bibliographiques, et est répartie en quatre chapitres. Le premier vise l'étude des composés phénoliques, leurs biosynthèses, leurs principales classes, ainsi que leurs rôles et propriétés biologiques. Le deuxième décrit le stress oxydant, définit les principales sources de radicaux libres et leurs implications physiologiques et pathologiques suivi par la détermination des principaux antioxydants notamment leurs mécanismes d'actions. Le troisième et le quatrième chapitre décrivent les matériels d'études particulièrement la structure et la composition chimique des sons et des germes des céréales et leurs bienfaits sur la santé et les principaux genres étudiés de la famille des Lamiacée : *Origanum*, *Thymus* et *Calamintha*.

La deuxième partie traite les méthodes appliquées à savoir :

- ✓ Le choix du matériel d'étude et leurs récoltes.
- ✓ L'extraction, purification et fractionnement des composés phénoliques.
- ✓ Différentes techniques de dosage (Folin-Ciocalteu et la méthode de tri-chlorure d'aluminium) et de diagnostic (CCM et CCM bidi-mentionnelle).
- ✓ Isolement et purification des molécules flavoniques par les techniques chromatographiques préparative et la chromatographie sur colonne.
- ✓ Analyses par la chromatographie liquide à haute performance.
- ✓ Test au radical de DPPH°.

La troisième partie présentera les résultats obtenus et leurs interprétations dans deux sections : l'une pour les céréales alimentaires et l'autre pour les plantes médicinales, suivie par une comparaison et discussion entre elles.

Une conclusion et éventuellement quelques perspectives achèveront notre modeste étude.

Première partie :
Revue Bibliographique

Chapitre 01 :
Les composés phénoliques

1- Définition et caractéristiques

Largement distribué dans le règne végétal et abondant dans nos régimes alimentaires, « les composés phénoliques » sont aujourd'hui les composés phyto-chimiques les plus étudiés (Knežević S.V. et al., 2012). D'après Hurtado-Fernandez E. et al. (2010) beaucoup de travaux ont été présentés par la communauté scientifique, qui se concentre sur:

- Ø La structure chimique des phénols antioxydants dans les différents aliments végétaux, des plantes aromatiques et des matières végétales les plus diverses.
- Ø Le rôle probable des composés phénoliques dans la prévention de diverses maladies associées aux stress oxydatifs telles que les maladies cardiovasculaires et neuro-dégénératives et le cancer.
- Ø La capacité de certaines catégories de composés phénoliques particulièrement les flavonoïdes pour se lier aux protéines.
- Ø La stabilisation des huiles comestibles, la protection de la formation de flaveurs et la stabilisation de saveurs.
- Ø Préparation de compléments alimentaires.

Plus de 8000 composés naturels appartiennent à cette famille et le nombre ne cessent de croître (Ignat I. et al., 2011), ils ont en commun un noyau benzénique portant au moins un groupement hydroxyle. Ils comprennent essentiellement les phénols simples, les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les lignanes et lignines. Ils peuvent être conjugués avec plusieurs résidus sucrés liés ou ils peuvent également être liés avec d'autres composés chimiques, tels que des acides carboxyliques, des amines ou des lipides ou avec d'autres phénols existants (Martin S., Andrantsitohaina R., 2002).

2- Biosynthèse

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires et sont synthétisés, par des plantes au cours de leur développement normal, en réponse à des infections, des blessures, des rayons ultra-violet (UV) et des insectes. Ces composés phytochimiques provenant de la phénylalanine et la tyrosine sont ubiquitaires dans les plantes (Pereira Nunes X. et al., 2012) (Figure 01).

Les polyphénols sont synthétisés à partir de deux voies biosynthétiques :

- ü **Celle de l'acide shikimique**, qui conduit après transamination et désamination, aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples ;

ü Celle issue de l'acétate/malonate, qui conduit à des polys β -coesters (poly-acétates) de longueur variable menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les dihydroxy 1,8-anthraquinone ou les naphthoquinones.

De plus, la diversité structurale des composés polyphénoliques, due à cette double origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée de deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, « les flavonoïdes » (Martin S., Andrantsitohaina R., 2002).

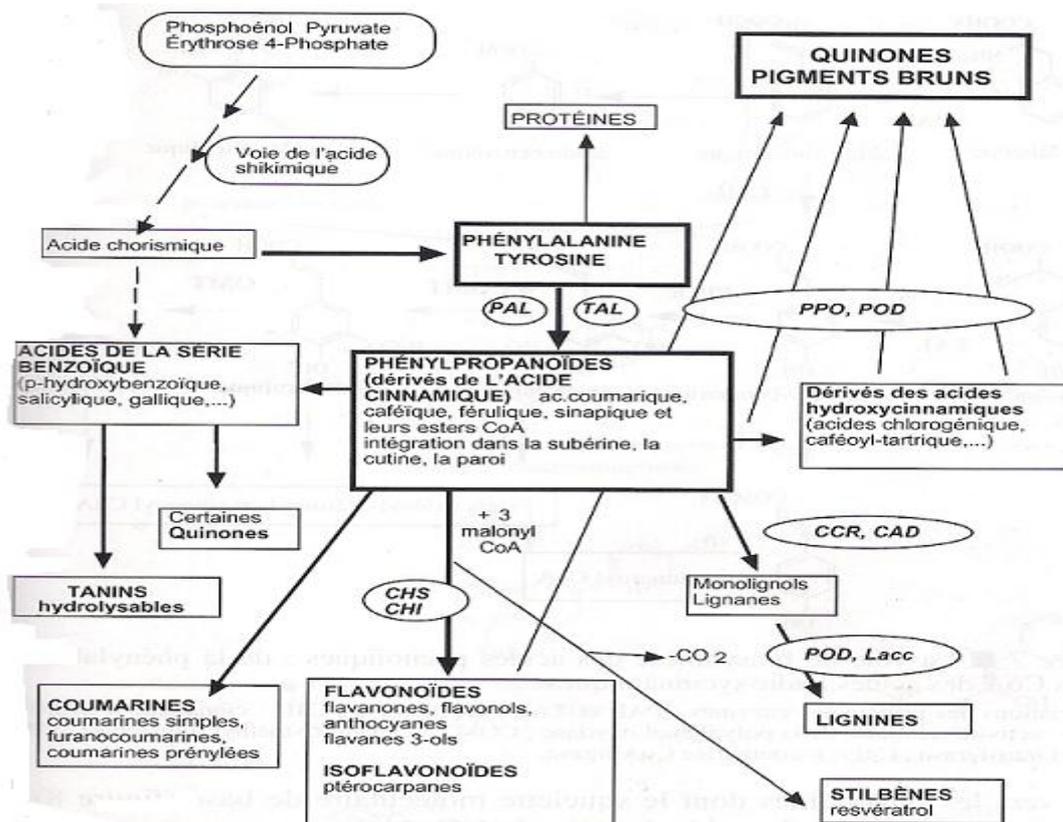


Figure 01 : Les grandes lignes de la biosynthèse des principaux groupes de composés phénoliques (Macheix et al., 2006)

Abréviation des principales enzymes : **PAL** : phénylalanine ammonialyase ; **TAL** : tyrosine ammonialyase ; **CCR** : cinnamate CoA réductase ; **CAD** : cinnamyl alcool déshydrogénase ; **CHS** : chalcone synthase ; **CHI** : chalcone flavanone isomérase ; **PPO** : polyphénoloxydases ; **Lacc** : laccases

3- Principales classes

3-1- Les acides phénoliques

Le terme acide- phynol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et hydroxyl phénolique (Bruneton J., 1999). La pratique courante en phytochimie consiste à réserver ce terme aux dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique (Figure 02 et 03). Les acides hydroxy benzoïques et hydroxycinnamiques existent rarement sous forme libres, mais sont généralement trouvés sous formes conjuguées d'esters et de glycosides (Hager T. et Howard L., 2009).

Les acides phénoliques participent directement aux réactions de stress environnementaux, comme les attaques par les ravageurs et contribuent au processus de guérison de la plante par la lignification des tissus endommagés (Manach et al., 2004).

3-1-1-Les acides hydroxybenzoïques

La concentration de l'acide hydroxy benzoïque est généralement très faible chez les végétaux comestibles. Ces dérivés sont assez rares dans l'alimentation humaine par contre ceux d'acides hydroxy-cinnamiques tels que les acides p-coumariques, férulique et sinnapique sont très présents (Macheix J.J. et al., 2006).

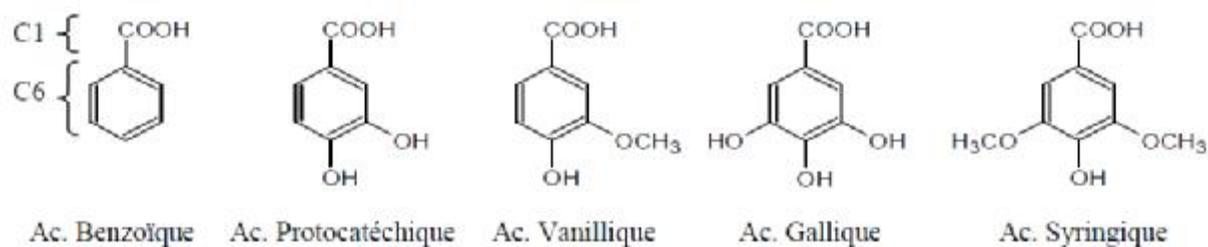
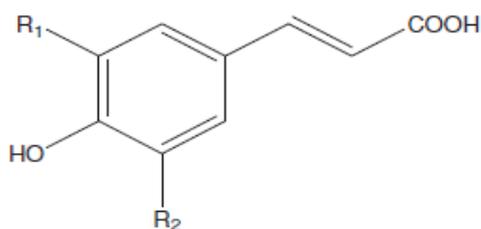


Figure 02 : Quelques exemples d'acides phénols dérivés de l'acide benzoïque (C₆-C₁) (Bruneton J., 1999)

3-1-2-Les acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base (C₆-C₃) dérive de celle de l'acide cinnamique (Figure 03). Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires (par méthylation chez les acides féruliques ou sinapique) sont un des éléments important de la réactivité chimique de ces molécules (Macheix J.J. et al., 2006).



$R_1=H, R_2=H$: acide p-coumarique

$R_1= H, R_2= OH$: acide caféique

$R_1= H, R_2= OCH_3$: acide férulique

$R_1= OCH_3, R_2=OCH_3$: acide sinapique

Figure 03 : Quelques exemples d'acides phénols dérivés de l'acide cinnamique (C₆-C₃) (Huang W.Y. et al., 2010)

3-2-Les flavonoïdes

3-2-1- Définition et historique

Le terme *flavonoïde* est dérivé du mot « Flavus » en latin, qui signifie jaune (Prochazkova D. et al., 2011). En 1937, Albert Szent-Györgyi reçoit le prix Nobel de physiologie et de médecine pour ses découvertes dans le domaine des processus de combustion biologique, notamment concernant la vitamine C et la catalyse de l'acide fumarique (Szent-Györgyi A., 1965). C'est en s'intéressant au transfert d'énergie dans les plantes (métabolisme des carbohydrates) et aux processus d'oxydation qu'il découvre une nouvelle classe de composés, les vitamines P.

Il travaille sur l'oxydation de la vitamine C et s'intéresse au rôle de l'enzyme peroxydase. Il démontre qu'une classe de composés polyphénoliques hydrosolubles (flavone, flavonol, et flavanone) provenant essentiellement des pigments des plantes, intervient dans l'oxydation de l'acide ascorbique. La peroxydase transforme ces phénols en quinones, lesquels oxydent ensuite la vitamine C. Il détecte une grande concentration de ces composés dans le paprika et s'attache à expliquer leurs propriétés biologiques, notamment pour mieux comprendre leur rôle (en synergie avec la vitamine C) dans la guérison du scorbut. Il en conclut que ces polyphénols agissent sur la protection des vaisseaux sanguins, en faisant varier leur perméabilité et leur résistance. Il montre que certains membres de la famille des flavonoïdes possèdent des propriétés similaires aux vitamines, et les nomment alors vitamines P (Rusznayak I.; Szent-Györgyi A., 1936).

À l'heure actuelle, cette notation a été abandonnée puisqu'elle ne correspond pas à la définition classique des vitamines.

3-2-2- Les composés flavonoïdiques

Les flavonoïdes constituent le plus grand groupe de composés phénoliques, avec plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (Knežević S.V. et al., 2012).

Les flavonoïdes sont souvent rencontrés dans les légumes feuilles (salade, Chou, épinard, etc.) ainsi que dans les téguments externes des fruits (Chebil L., 2006). Ils sont présents également dans plusieurs plantes médicinales. Les travaux relatifs, aux flavonoïdes se sont multipliés depuis la découverte du « French paradox », correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez des populations méditerranéennes associant une consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées (Prochazkova D. et al., 2011).

3-2-3- Structure et origine des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés de faible poids moléculaire, ils ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, présentent le même élément structural de base à savoir l'enchaînement 2-phénylchromane ; ils sont constitués de quinze atomes de carbone (C₆-C₃-C₆), essentiellement, la structure se compose de deux cycles aromatiques A et B, reliés par un pont de trois carbones, le plus souvent sous forme d'un hétérocycle C (Ignat I., 2011) (Figure 04).

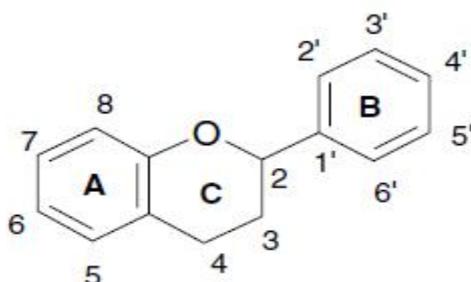


Figure 04 : Structure générale d'un flavonoïde (Balasundram N. et al., 2006).

Ils peuvent être regroupés en une douzaine de classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central (Bruneton J., 2009) : flavone, flavonol, flavanol, anthocyane, aurone...

Le cycle aromatique A est dérivé de la voie acétate/malonate, tandis que le cycle B est dérivé de la phénylalanine par la voie de shikimate sous l'intervention de la chalcone synthase (CHS) (Merghem R., 2000). Dans les conditions physiologiques normales, la

chalcone tend à s'isomériser spontanément en flavanone, en fait la cyclisation de la chalcone est catalysée par une enzyme, la chalcone isomérase (CHI) qui induit une fermeture de cycle conduisant à une flavanone constituant le squelette de base des flavonoïdes.

Plusieurs enzymes (synthase, réductase, hydroxylase) contribuent à l'apparition des différentes classes de flavonoïdes, et dans chaque classe, les molécules sont ensuite diversifiées par hydroxylation (flavonoïdes 3'-hydroxylase, flavonoïde 3', 5'-hydroxylase), méthylation (O-méthyltransférase), glycosylation (rhamnosyl transférase, flavonoïde glycosyl transférase), acylation (acyl CoA transférase) ou polymérisation (Merghem R., 2000). La Figure 05 ci-dessous présente les voies de biosynthèse des flavonoïdes adaptées selon Winkel-Shirley B. (2002).

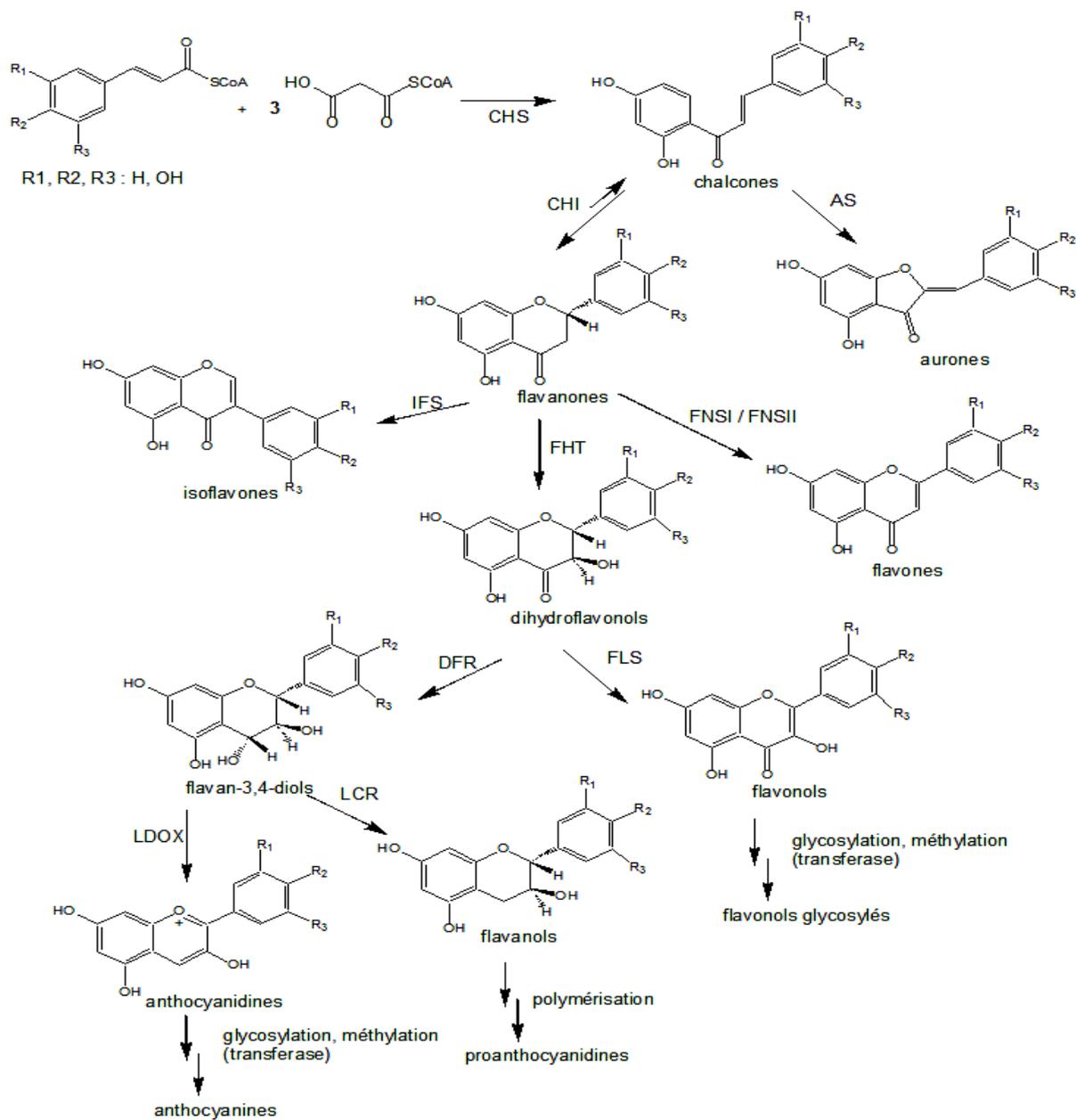
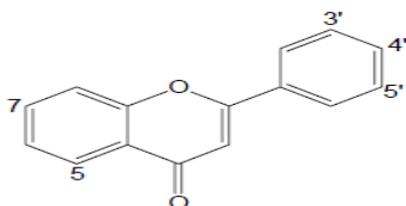


Figure 05 : Voies de biosynthèse des flavonoïdes adaptées de Winkel-Shirley B.(2002)

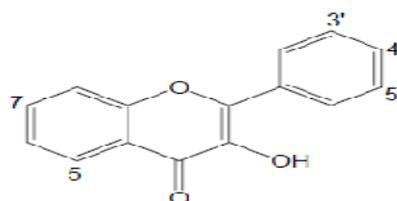
AS : aurone synthase, CHI : chalcone isomérase, CHS : chalcone synthase, DFR : dihydroflavonol 4-réductase , FHT : flavanone 3-hydroxylase, FLS : flavonol synthase, FNSI/FNSII : flavone synthase, IFS : isoflavone synthase, LDOX : leucoanthocyanidin dioxygénase, LCR : leucoanthocyanidin réductase

3-2-4- Principales classes de flavonoïdes

1- Flavones et flavonols



Flavones



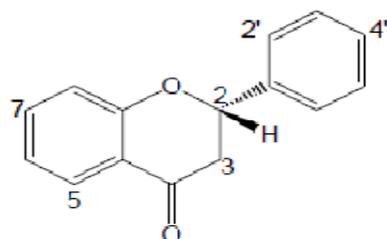
Flavonols

Flavonoïdes	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Apigénine	OH		OH		OH	
Chrysin			OH			
lutéoline	OH		OH	OH	OH	

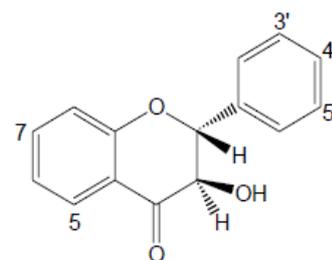
Flavonoïdes	Substitution				
	5	7	3'	4'	5'
Kaempférole	OH	OH		OH	
Myricétine	OH	OH	OH	OH	OH
Quercitine	OH	OH	OH	OH	

Les flavones et flavonols (quelques exemples se trouvent dans les tableaux ci-dessus) sont les composés flavonoïdiques les plus répandus ; en 2004, on dénombrait plus de 1100 génines de structure connue (530 flavones et 600 flavonols), et environ 1400 hétérosides de flavonols et 700 hétérosides de flavones (Bruneton J., 2009). Les flavonols diffèrent des flavones par la présence d'un groupement hydroxyle en C₃. Chez les flavonols, la position 3 de l'hétérocycle est toujours glycosylée, ainsi que fréquemment la position 7 du cycle A mais jamais la position 5 (Macheix J.J. et *al.*, 2006). La teneur des flavonols est plus élevée dans la peau des fruits puisque la lumière en stimule la biosynthèse.

2- Flavanones et dihydroflavonols



Flavanones



Dihydroflavanones

Flavonoïdes	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Eriodictyol	OH		OH	OH	OH	
Hesperidine	OH		OH	OH	OMe	
Naringénine	OH		OH		OH	

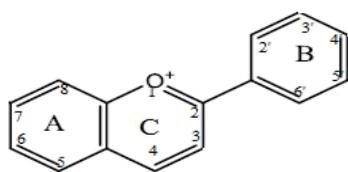
Flavonoïdes	Substitution				
	5	7	3'	4'	5'
Taxifoline	OH		OH	OH	OH
Fusetine			OH	OH	OH

Les flavanones et dihydroflavonols (quelques exemples sont donnés dans les tableaux ci-dessus) sont caractérisés par l'absence de la double liaison entre le C₂ et C₃. Les dihydroflavonols se différencient des flavanones par la présence d'un groupement hydroxyle en position 3 (Bruneton J., 2009 ; Chosson *et al.*, 1998). Les flavanones se retrouvent surtout dans les agrumes et les tomates. La menthe constitue également une source abondante (Benbrook CM., 2005 ; Ignat I., 2011).

3- Les anthocyanes

Les anthocyanes (du grec *anthos*, fleur et *kuanos*, bleu violet) sont des pigments hydrosolubles responsables des couleurs bleu, mauve, rouge ou rose de certaines parties végétales (fleurs, fruits, feuilles, racines,...) (Valls J. *et al.*, 2009).

Les anthocyanines (Figure 06) sont des flavonoïdes porteurs d'une charge positive sur l'oxygène de l'hétérocycle C. Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature et la position des oses liés à la molécule. L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment.



Anthocyane Couleur	Substitution					
	3	5	7	3'	4'	5'
Delphinidine (bleue- violette)	OH	OH	OH	OH	OH	OH
Cyanidine (rouge)	OH	OH	OH	OH	OH	
Pelargonidine (Orange-rouge)	OH	OH	OH		OH	
Malvidin (Mauve)	OH	OH	OH	OMe	OH	OMe

Figure 06 : Structure du noyau flavylum ou 2- phénylbenzopyrylium (Knežević S.V. *et al.*, 2012)

3-3-Les tannins

Les tannins sont des composés polyphénoliques, solubles dans l'eau, dont les masses molaires se situent entre 500 et 3000. Ils présentent les réactions caractéristiques des phénols en général, ils sont capables de précipiter les alcaloïdes, la gélatine, et les autres protéines (Merghem R., 2009 ; Stevanovic, 2005). Cette réactivité avec les protéines est à l'origine des propriétés tannantes qu'ils exercent sur le collagène de la peau au cours de la transformation de la peau en cuir, la rendant imputrescible et moins perméable à l'eau.

D'après leurs structures et leurs propriétés, deux types de tannins sont distingués: les tannins hydrolysables et les tannins condensés (Figure 07).

Les tanins hydrolysables sont des dérivés de l'acide gallique ; ce dernier est estérifié à un polyol. Tandis que les tanins condensés (ou proanthocyanidines) sont des oligomères hétérogènes dont la structure est liée aux flavan 3-ols et flavan 3,4- diols, les unités de monomères sont principalement liées par des liaisons C-C entre les carbones 4-6 ou 4-8 (proanthocyanidine type B). Les tanins condensés sont distingués en procyanidine (dérivé de catéchine, épicatechine et leurs esters galliques) et en prodelpinidines (dérivés de gallocatéchine, épigallocatéchine et leurs esters galliques) (valls J. et *al.*, 2009 ; Ignat I et *al.*, 2011).

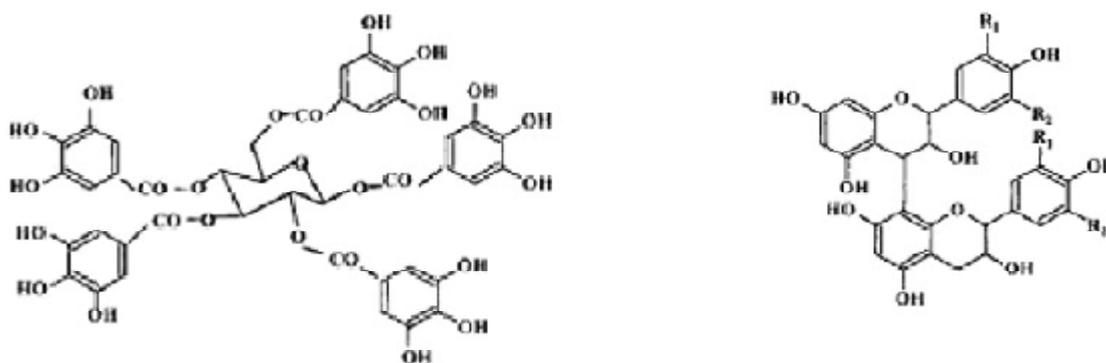


Figure 07 : Exemple d'un tannin hydrolysable (pentagalloylglucose à gauche) et un autre condensé (proanthocyanidine R1, R2 = H, OH à droite) (Ignat I et *al.*, 2011)

4- Localisation des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont omniprésents dans les végétaux, mais leur répartition au niveau tissulaire, cellulaire et subcellulaire n'est pas uniforme. Les composés phénoliques solubles sont présents dans les vacuoles tandis que celles insolubles se trouvent au niveau des parois cellulaires. Ces dernières sont plus ou moins riches en polyphénols selon la localisation de la cellule : les parties charnues du fruit en sont pauvres (les polyphénols sont alors

principalement contenus dans la vacuole), contrairement aux cellules dont la paroi a atteint le stade supérieur de rigidité (cellules de la peau et des pépins, épicarpes des grains de blé) (Knežević S.V. et *al.*, 2012 ; Macheix et *al.*, 1990).

5-Rôles et propriétés des composés phénoliques

5-1-Chez les végétaux

Les composés phénoliques participent à deux principaux processus de l'activité des plantes : la photosynthèse et la respiration. De plus, ils interviennent dans d'autres processus tels que : la croissance, la germination, la morphogénèse des tiges et dans le processus de lignification. On sait que les polyphénols agissent sur les auxines et les enzymes responsables de leur destruction catabolique, en particulier l'AIA (Acide B-indoyl acétique) oxydase, enzyme ayant un rôle dans la dégradation de l'auxine (Merghem R., 2009).

Les composés phénoliques jouent un rôle important dans l'interaction de la plante avec son environnement, en particulier contre les radiations UV, les attaques microbiennes... (Moheb A. et *al.*, 2011). Les flavonoïdes sont reconnus par les pollinisateurs, par exemple les insectes, les oiseaux et les animaux, ainsi, l'une des propriétés majeures de ces composés est de contribuer à la couleur des plantes et notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction. On peut noter que certains flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries (Havsteen B.H., 2002).

5-2-Dans l'aliment

Dans les aliments, les composés phénoliques peuvent contribuer à l'amertume (principalement les flavanones), l'astringence, la couleur, la flaveur, l'odeur et la stabilité de l'oxydation de l'aliment (Shahidi F. et Naczki M., 2004).

5-3-Chez l'homme

La consommation d'aliments riches en polyphénols réduit l'incidence de nombreuses pathologies, telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, les diabètes (Hanhineva K., 2010). Cela peut être expliqué par le fait que ces composés ont la capacité de modifier de nombreux facteurs impliqués dans la genèse de ces maladies.

Les polyphénols sont en effet :

- Capables d'abaisser la pression artérielle chez le rat, d'empêcher l'oxydation des LDL (lipoprotéines de faible densité), d'inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, d'empêcher l'agrégation plaquettaire et de stabiliser les cellules immunitaires (Martin S., Andrantsitohaina R., 2002).
- Ils ont été décrits comme étant des antioxydants, des anti- agrégants plaquettaires, des anti-inflammatoires, des anti-allergènes, des anti-thrombotiques et des antitumoraux (Hanhineva K., 2010) (Figure 08).
- Ils ont été décrits comme neuroprotecteurs, antiviral, chimio préventive et plus de preuves indiquent que les polyphénols ont une influence sur le métabolisme lipidique et glucidique (Hanhineva K., 2010).

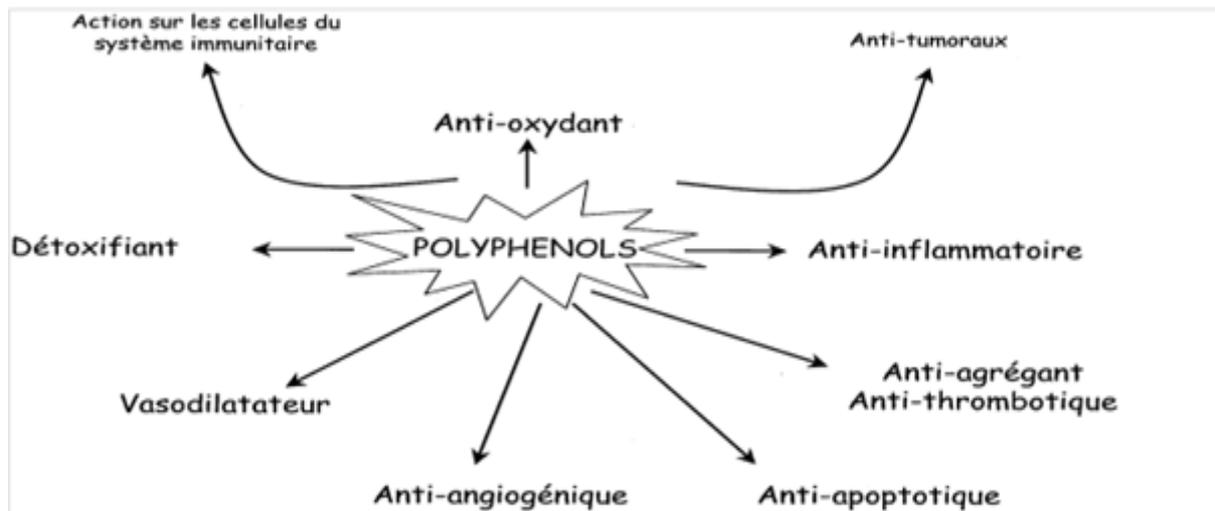


Figure 08 : Effets biologiques des polyphénols (Martin S., Andrantsitohaina R., 2002)

Chapitre 02 :

Stress oxydant-antioxydant

1- Le stress oxydant

1-1- Généralités

L'oxygène (O_2) est une molécule indispensable à la vie (Pincemail J. et *al.*, 2002). Il est essentiel pour le métabolisme aérobie en tant qu'accepteur final des électrons de la chaîne respiratoire. Cette réaction est associée à la production de 38 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) à haut potentiel énergétique. Les processus de réduction de l'oxygène en eau n'est toutefois pas parfaits car 2 à 3 % de l'oxygène sont transformés en espèces réactives de l'oxygène (ERO) particulièrement réactionnelles (Koppenol W.H., 2001).

Cette production physiologique d'ERO est régulée par des systèmes de défense composés d'enzymes (superoxyde dismutase (SODs), catalase, glutathion peroxydase (GPx's) (Morel Y., Barouki R., 1998 ; Delattre J. et *al.*, 2005), et de molécules antioxydantes de petite taille (caroténoïdes, vitamines, glutathion...) et de protéines telles que la transferrine (Coyle P. et *al.*, 2002). Dans un premier temps, la cellule ne modifie pas ses propriétés biologiques. Si les ERO continuent à s'accumuler, une adaptation plus consistante de la cellule est nécessaire avec l'induction de gènes codant des enzymes anti- oxydantes et des enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN (Adénosine désoxy-nucléotide) et des protéines. On observe aussi une répression des systèmes susceptibles de libérer des ERO, notamment la chaîne respiratoire (Barouki R., Morel Y., 2001). A un stade ultime, la cellule peut suivre la voie de l'apoptose ou de la nécrose (Figure 09).

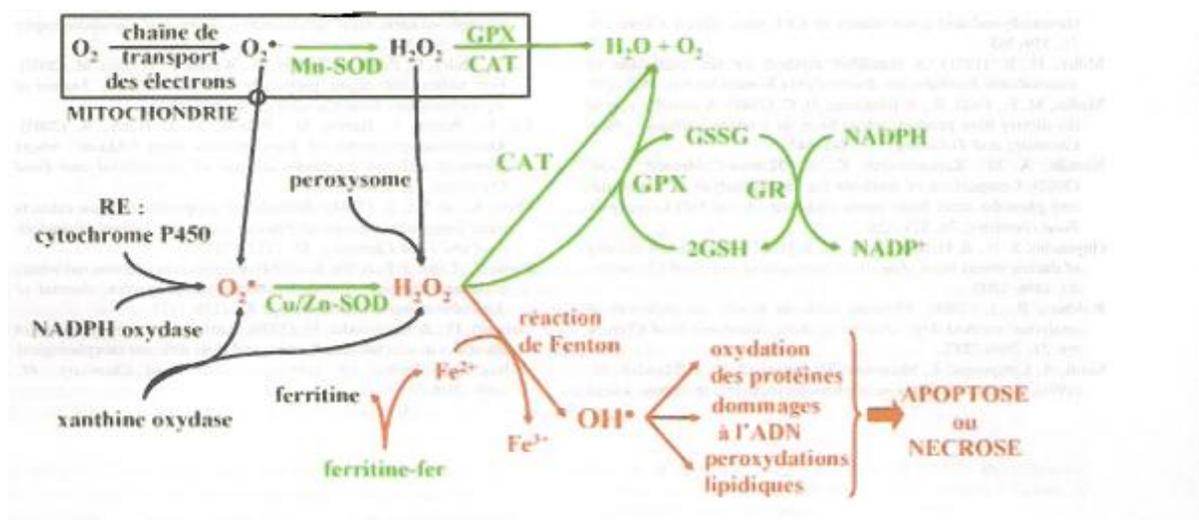


Figure 09 : Schéma représentant les sources de ROS et les systèmes de détoxification de la cellule (Morel C., 2007)

Les ROS sont produites par des mécanismes cellulaires très divers (en noir). La cellule possède des systèmes enzymatiques qui permettent la transformation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (en vert) tel que Mn- et Cu/Zn-SOD : superoxyde dismutase dépendante du manganèse (dans les mitochondries) ou du cuivre et du zinc (dans le cytoplasme). En présence de fer libre intracellulaire, le radical hydroxyle (OH°) est produit à partir de H_2O_2 et peut oxyder les constituants de la cellule (en rouge).

1-2-Définition

Le stress oxydant est communément défini comme un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités anti-oxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire (Barouki R., 2006). Il semble que la vraie origine d'un stress oxydant ne soit pas la génération d'ERO elle-même, mais le déséquilibre spatiotemporel entre la production d'ERO et leur élimination. L'équilibre peut être rompu lorsque la production est trop importante ou lorsque les systèmes de détoxification sont trop peu présents ou mal localisés (Morel C., 2007).

1-3-Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des molécules ou atomes qui possèdent un ou plusieurs électron (s) libre (s), non apparié (s) sur leur couche externe (Asmus KD., Bonifacic M., 2000). Les radicaux libres ont tendance à revenir immédiatement à un état stable en donnant un électron ou en prenant une à une autre molécule : ils peuvent donc être réducteurs ou oxydants (un temps de demi-vie extrêmement court : de nano (10^{-9})- à la milliseconde) (Koechlin-Ramonatxo C., 2006).

Des exemples des radicaux libres dérivés d'oxygène (ROS) sont : anions superoxydes ($O_2^{\circ-}$), radical hydroxyle (OH°), peroxyde (RO_2°), alkoxyde (RO°), et hydroperoxyde (HO_2°). L'oxyde nitrique et dioxyde de nitrogène (NO_2°), sont deux types radicalaires dérivés d'azote (RNS). Les radicaux libres dérivés d'oxygène et d'azote peuvent être converti en d'autres espèces réactives non-radicalaires tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), acide hypochloreux (HOCl) (Favier A., 2003).

1-3-1- Principales sources

La source principale des ERO dans les cellules de mammifères est d'origine enzymatique, et une des plus grandes sources endogènes de production de radicaux libres est la mitochondrie (Finaud J. et *al.*, 2006), en effet neuf enzymes mitochondriales sont responsables d'une production de ROS parmi lesquelles : monoamine oxydase (MAO), cytochrome b5 réductase, complexe I et III, succinate déshydrogénase, glycérophosphate

déshydrogénase mais leur capacité à la production des ROS varie en fonction des tissus et des espèces (Andreyev *et al.*, 2005).

De plus, les peroxysomes, les microsomes les macrophages sont d'importantes sources de production de radicaux libres (Zou Y. *et al.*, 2008). Par un système NADPH- oxydase capable de produire des anions superoxydes (O_2°) (Finaud J. *et al.*, 2006). Parmi les facteurs endogènes, on retrouve également le stress psychologique, l'inflammation (infection, maladies chroniques) (Moller P. *et al.*, 1996). L'obésité est aussi une condition favorisant la production de radicaux libres, les responsables étant l'inflammation chronique, l'hyperglycémie, l'hyperleptinémie et des défenses antioxydantes inadéquates.

Les facteurs exogènes associés à une production accrue et/ou à une diminution de l'élimination des radicaux libres sont également très variés, parmi ces facteurs, on retrouve :

- Ø L'alimentation : antibiotiques, alcool, aliments riche en protéines et/ou en lipides et/ou à indice glycémique (IG) élevé, faible consommation d'antioxydant (Hu Y. *et al.*, 2006).
- Ø Le dioxyde de carbone (CO_2) atmosphérique (Bentes de Souza AM. *et al.*, 2004).
- Ø Les polluants : fumée de cigarette, pollution atmosphérique (dioxyde de soufre et d'azote (SO_2 , NO_2) les hydrocarbures) (Valko M. *et al.*, 2005), les métaux lourds ayant une grande affinité avec les groupements sulfohydriques (-SH), ils inactivent facilement les antioxydants contenant du soufre (Houston M.C., 2007).

1-3-2- Rôles biologiques des radicaux libres

Les radicaux libres peuvent jouer un rôle bénéfique pour la santé des organismes. Par exemple, les ROS exercent des actions critiques comme signaux de transduction, dans la transcription des gènes et régulation de l'activité de la guanylate cyclase soluble de la cellule (Fang Y.Z. *et al.*, 2002).

Les ERO peuvent avoir des effets opposés, en fonction de leur lieu de formation et des quantités produites (Delattre J. *et al.*, 2003).Le monoxyde d'azote (NO°) est un exemple classique, il joue un rôle majeur dans la neurotransmission, régulation de la pression sanguine, en activant la guanylate cyclase cytosolique, régulation immunitaire (Valko M. *et al.*, 2007), mais à forte concentration, le NO° devient délétère pour les cellules notamment en réagissant avec le O_2° pour former un puissant oxydant le peroxyde d'azote ($ONOO^{\circ}$) (Densiov E.T. Afanas ' ev I.B., 2005).

- *Dommmages oxydatifs à l'ADN*

Les ERO constituent la plus importante source endogène de dommages à l'ADN. Elles peuvent lui induire de nombreuses modifications covalentes telles que des lésions aux bases nucléotidiques (purines et pyrimidines), des cassures simples brin ou doubles brin de la chaîne oligonucléotidique, ou des pontages avec des résidus protéiques (Wang Y., 2008). Ces modifications peuvent avoir de graves conséquences sur la réplication du génome. Les niveaux élevés de ces lésions ont été enregistrées dans plusieurs types tumorales et sont grandement impliquées dans tous les étapes de cancérogenèse (Trachootham D. et *al.*, 2009).

- *Dommmages oxydatifs aux lipides*

Alors que l'oxydation des lipides représente l'utilisation du substrat énergétique, la peroxydation lipidique est la dégradation du contenu lipidique membranaire, c'est ainsi qu'une altération de leur fonctionnalité aura lieu (modification de leur perméabilité, de leur fluidité, perte d'activité d'enzymes, de récepteurs...).

Les lipoprotéines telles que les LDL (lipoprotéine de faible densité), riche en cholestérol et en phospholipides sont également des cibles privilégiées de la peroxydation lipidique. Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont la cible privilégiée des ERO en raison de leurs hydrogènes bis-allyliques oxydables. Comme ces derniers sont les lipides majeurs des membranes cellulaires et les lipoprotéines, on comprend leurs vulnérabilités particulières.

La peroxydation lipidique se déroule en trois phases suivantes (illustré dans la Figure 10).

a) L'initiation

Consiste à l'arrachement par le radical libre d'un atome d'hydrogène d'un groupement méthylène (-CH₂-) surtout s'il est adjacent à deux doubles liaisons, en présence d'O₂ le radical carboné est transformé en radical peroxyloxy RO₂[°].

b) La propagation

Le radical RO₂[°] enlève un hydrogène à un nouvel AGPI voisin qui à son tour produira un radical R[°] puis un radical RO₂[°], une réaction en chaîne s'installe.

c) La terminaison

Cette phase consiste à former des composés stables issus de la rencontre entre deux espèces radicalaires ou le plus souvent par la réaction d'un radical avec une molécule antioxydante dite « Briseur de chaîne » (Kohen R. et Nyska A., 2002). En présence des métaux de transition, les hydroperoxydes formés peuvent subir un clivage au niveau des

liaisons C-C pour donner naissance à divers produits de décompositions : le malondialdéhyde (MDA), le 4-hydroxynonéanal représentant les produits les plus toxiques de la peroxydation lipidique (Lehucher-Michel M.P., 2001).

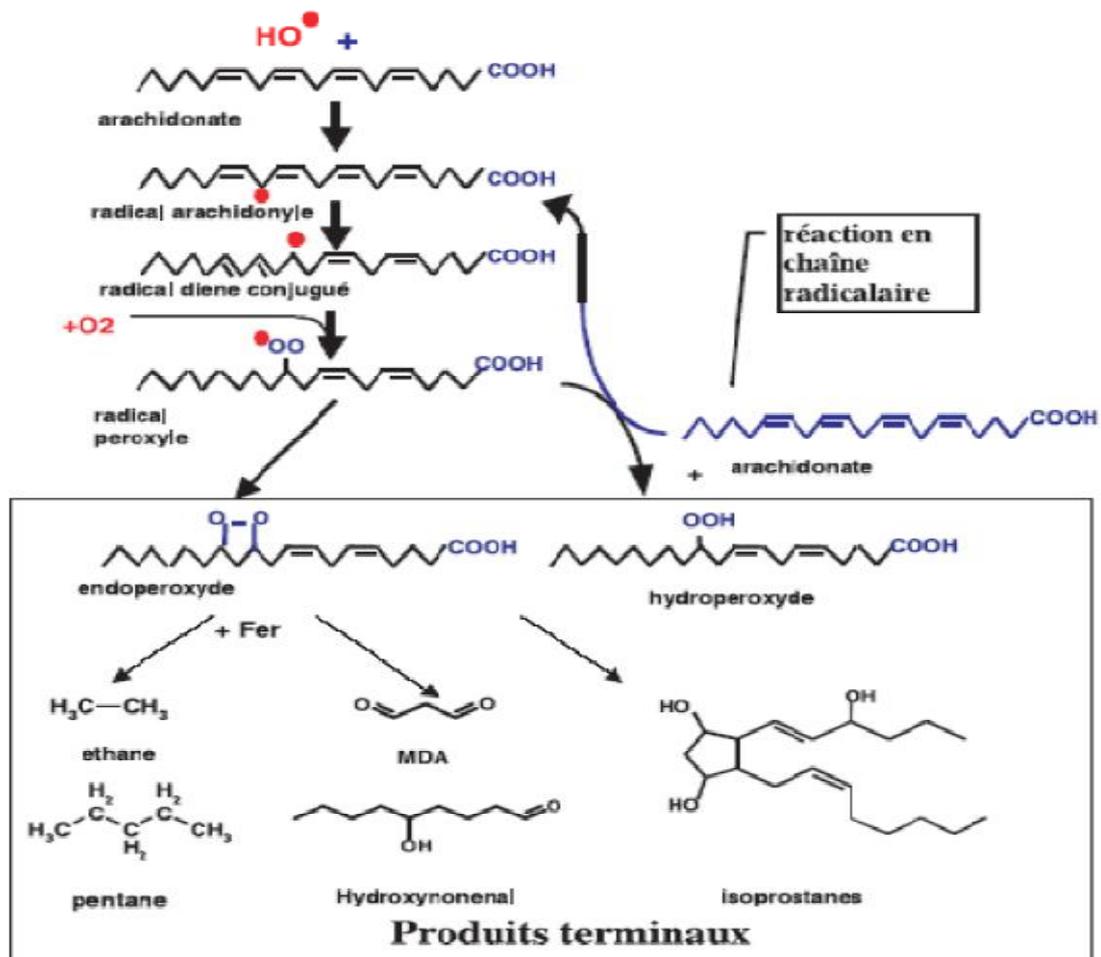


Figure 10 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (D'après Favier A., 2003)

- *Domages oxydatifs aux protéines*

Tout comme les lipides, les protéines peuvent également être la cible de réactions radicalaires ou oxydatives et subir des modifications sous l'action des ERO et ERN. Ces réactions d'oxydation sont fréquemment influencées par les cations métalliques comme le cuivre et le fer (Servais S., 2004). Les protéines atteintes peuvent se fragmenter ou se dénaturer avec l'altération de leurs structures primaires et secondaires. On peut observer une oxydation des chaînes latérales des acides aminés notamment de la cystéine et de la méthionine, avec formation de ponts disulfures (Stadtman E.R., 1993).

1-4- Implications pathologiques du stress oxydant

De nombreuses études, tant épidémiologiques que cliniques, indiquent que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies humaines différentes (Pincemail J. *et al.*, 2002) allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, neurodégénératives et le diabète. Le rôle du stress oxydant a été également évoqué même dans des processus physiologiques tel que le vieillissement (Lehucher-Michel M.P. *et al.*, 2001; Valko M. *et al.*, 2007).

1-4-1- Stress oxydant et cancer

La carcinogénéité du stress oxydant est principalement attribuée à la génotoxicité des ROS dans les différents processus cellulaires (Lee K.W. Lee H.J., 2006). Les cellules cancéreuses sont connues par leur métabolisme actif et sous une élévation d'un stress oxydatif, vraisemblablement associé avec une prolifération cellulaire incontrôlée et dysfonction de la régulation métabolique.

1-4-2- Stress oxydant et l'athérosclérose

C'est l'oxydation de certaines lipoprotéines qui est aujourd'hui considérée comme une étape importante de l'athérogenèse. En effet, les LDL oxydées ne sont pas reconnues par les récepteurs habituels (récepteur cellulaire B/E) et sont alors catabolisées par d'autres voies. Elles vont s'accumuler dans les cellules spumeuses (macrophage gonflé de LDLox) observées au stade initial de la formation de la plaque d'athérome qui implique automatiquement une réduction du diamètre de vaisseau (Belkheiri N., 2010).

2 -Les antioxydants alimentaires

L'alimentation apporte une grande variété d'antioxydants jouant un rôle important comme facteur protecteur de la santé. Des preuves scientifiques suggèrent que les antioxydants réduisent les risques de maladies chroniques, telles que les maladies cardiovasculaires, certains cancers ou les diabètes type 2 (Scalbert A. *et al.*, 2005). Ainsi l'apport de composés à activité antioxydante dans les aliments n'a plus pour seul objectif de préserver les qualités sensorielles du produit, mais également de renforcer sa valeur nutritionnelle.

Les antioxydants synthétiques sont utilisés depuis de nombreuses années. Mais, récemment beaucoup d'études ont porté sur la toxicité élevée des antioxydants synthétiques utilisés dans l'industrie alimentaire, comme, par exemple, le butylhydroxytolène (BHT),

l'hydroxyanisole butyle (BHA), le tert-butylhydroquinone (TBHQ) (Riebeiro M.A. et al., 2001 ; Marongiu B. et al., 2004).

Un antioxydant peut être défini comme une substance qui, lorsqu'elle est présente à des concentrations faibles comparées à celle d'un substrat oxydable, empêche ou retarde de manière significative une oxydation du substrat (Prior R.L. et Cao G., 1999 ; Halliwell B., 2008). Ils ont été classés en trois groupes en fonction de leurs natures biochimiques et leurs origines alimentaires, à savoir les vitamines, les minéraux et oligo-éléments, et les phytochimiques. Ces derniers sont ceux qui nous intéressent et qui appartiennent à la classe des composés phénoliques

2-1- Mécanismes d'action des antioxydants

Du point de vue de leur fonction mécanistique, les antioxydants peuvent être classés en :

Antioxydants de prévention, antioxydants scavenger et antioxydants de novo et de réparation

2-1-1-Les antioxydants de prévention

Ils agissent comme première ligne de défense dans la cellule (Figure 11), en évitant la formation des ROS et RNS comme, par exemple, réduisant le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes lipidiques en eau et hydroxydes lipidiques respectivement. Outre, en séquestrant les ions métalliques comme le cuivre et le fer (Niki E., 2010).

2-1-2-Les antioxydants scavenger

Les antioxydants scavenger éliminent rapidement les radicaux libres avant que ces derniers attaquent les molécules biologiques. La SOD convertit le superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Les composés phénoliques et les amines phénoliques agissent principalement comme des antioxydants scavenger des radicaux libres.

2-1-3-Les antioxydants de novo et de réparation

Ce sont principalement les enzymes qui agissent comme troisième ligne de défense, en réparant les dommages, nettoyant les déchets et reconstituant les fonctions perdues. (Berger M.M., 2006). La quatrième ligne de défense est représentée par la fonction adaptative par laquelle des antioxydants appropriés sont générés au bon moment, et transférés à la bonne position avec des convenables concentrations (Niki E., 2010).

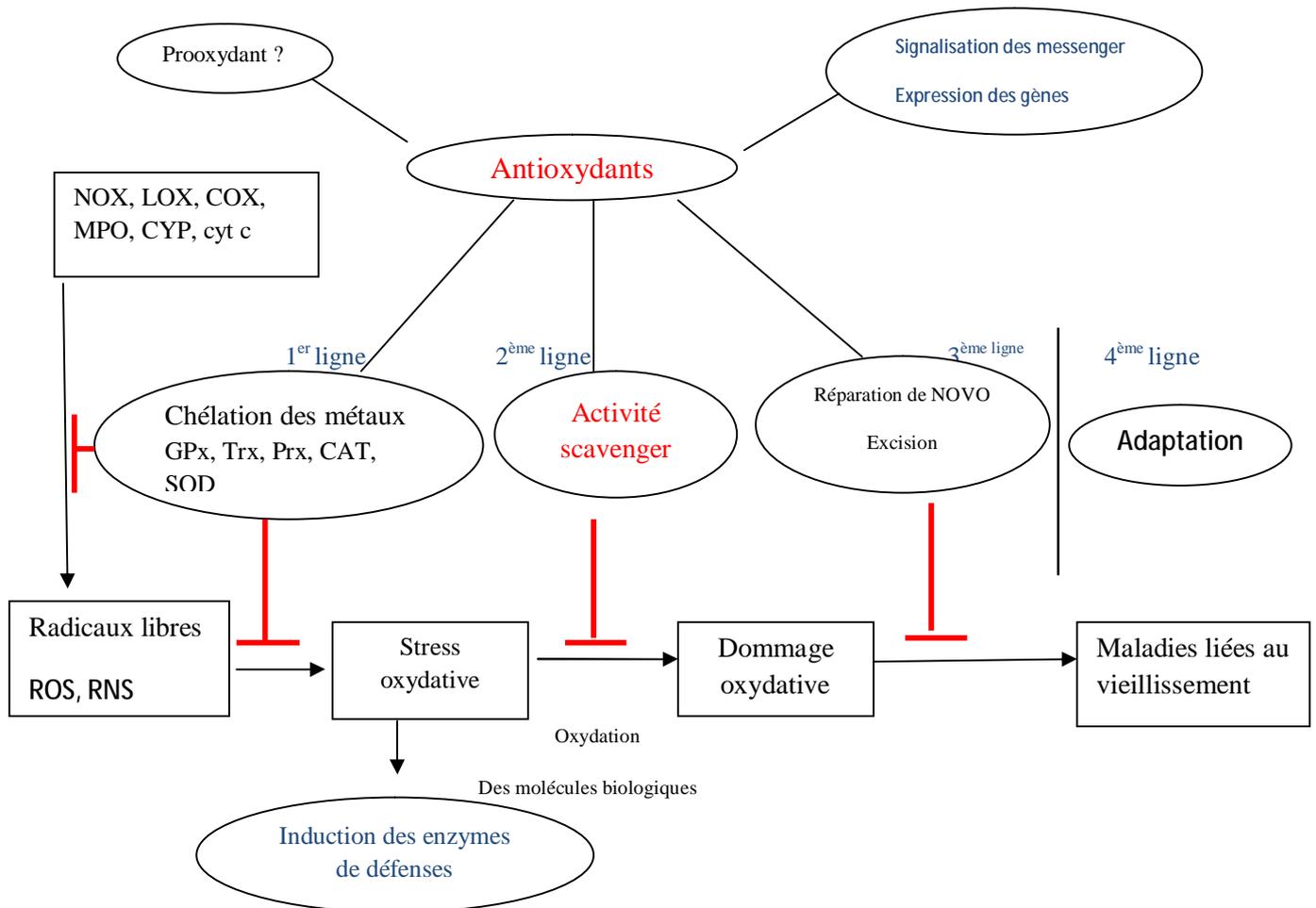


Figure 11 : Réseau de défense (in vivo) contre le stress oxydant selon Niki E., 2010.

COX : Cytochrome C oxydase ; **CYP :** enzyme cytochrome P450 ; **NOX :** NADPH oxydase ; **LOX :** lipoxygénase ; **GPx :** glutathion peroxydase ; **MPO :** myéloperoxydase ; **Trx :** thiorédoxine ; **Prx :** peroxyrédoxine ;

2-2-Les composés phénoliques en tant qu'agents antioxydants

Les composés phénoliques typiques possédant une activité antioxydante appartiennent à deux principales classes qui sont : les acides phénoliques et les flavonoïdes (Wojdylo A. et *al.*, 2007).

2-2-1-Les Acides phénoliques

Les acides hydroxycinnamiques ont une activité antioxydante plus élevée par rapport à leur correspondant d'acides hydroxybenzoïques. La plus grande activité antioxydante des dérivés hydroxycinnamiques est liée à la présence d'une chaîne propionique latérale à la place d'une fonction carboxylique, de plus la double liaison peut stabiliser le radical phénoxy en augmentant leur activité antioxydante.

2-2-2-Les flavonoïdes

Plusieurs modes d'action de l'activité antioxydante des flavonoïdes ont été décrits :

Ø Activité scavenger

Trois mécanismes proposés par lesquels les antioxydants phénoliques peuvent jouer leurs activités scavenger :

- § Le premier mécanisme inclut le transfert direct d'atome d'hydrogène à partir de l'antioxydant.
- § Le deuxième mécanisme concerne le transfert d'un seul électron à partir de l'antioxydant au radical conduisant indirectement à l'abstraction d'atome d'hydrogène.
- § Le troisième mécanisme a été conditionné séquentiellement par le transfert d'électron –perte de proton

Ces trois mécanismes peuvent avoir lieu en parallèle mais avec des vitesses différentes (Mohajeri A. et Asemani S.S., 2009).

Ø Chélation des métaux de transition

Le pouvoir antioxydant des composés phénoliques peut s'exercer par la complexation des métaux de transition (exemple : le cuivre et le fer). En effet, ces derniers accélèrent la formation des ROS. Pour les flavonoïdes, les deux points d'attache des ions de transition sont le groupe O-diphénolique dans la position 3', 4' di hydroxy du cycle B (Figure 12 a), et entre la fonction 4 cétone et l'hydroxyle 3 (Figure 12 b) ou la fonction cétone et l'hydroxyle 5 du cycle A (Figure 12 C) (Laguerre M. et *al.*, 2007).

(Figure 12 a), et entre la fonction 4 cétone et l'hydroxyle 3 (Figure 12 b) ou la fonction cétone et l'hydroxyle 5 du cycle A (Figure 12 C) (Laguerre M. et *al.*, 2007).

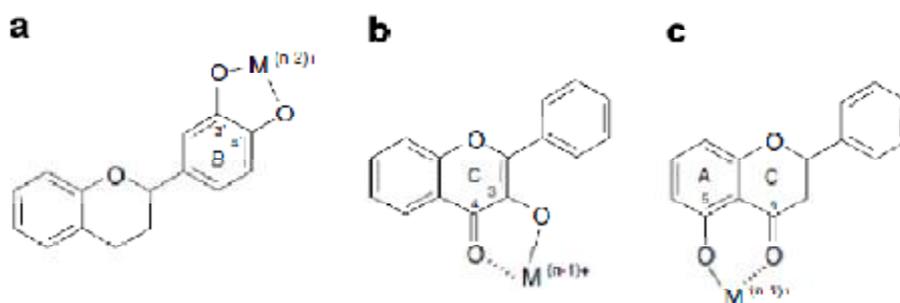


Figure 12 : La complexation métallique par les flavonoïdes

Ø L'activité inhibitrice d'enzymes

Les flavonoïdes sont connus par leur pouvoir d'inhibition d'enzyme dont, en particulier, les oxydo-réductases qui font intervenir au cours de leur cycle catalytique des espèces radicalaires (lipoxygénase, cyclo-oxygénase, monooxygénase, xanthine oxydase, phospholipase A₂, protéine kinase) (Ghedira k., 2005).

Le Tableau 01 résume quelques facteurs structuraux qui peuvent améliorer le pouvoir antioxydant des flavonoïdes.

Tableau 01 : Effet de la structure sur l'activité antioxydante des flavonoïdes (Sghaier M.B et al., 2011).

Activité	Facteurs améliorant le pouvoir antioxydant
Anti-radicalaire	<ul style="list-style-type: none">• Le nombre de groupements OH disponibles.• La double liaison C₂-C₃ et un seul OH en position 4'.• Une fonction catéchol sur le cycle B.• La présence du C₄'-OH.• La méthylation a des effets variables.
Complexations métallique	<ul style="list-style-type: none">• La fonction carbonyle en C₄ et de groupe hydroxyle en C₅ et/ou C₃.• La présence d'une partie catéchol.• La présence d'un sucre a peu d'effet.
Inhibition de la peroxydation des lipides	<ul style="list-style-type: none">• La présence d'une fonction catéchol.• Le groupement carbonyle en position 4 du cycle C.• La présence de groupement hydroxyle en position C₅, C₇, C₃', C₄', C₃

Chapitre 03 :
Les céréales alimentaires

1- Présentation

La famille des graminées (ou poacées) est une des familles végétales les plus importantes au monde, d'une part par son importance numérique (635 genres et plus de 9000 espèces), d'autre part par son caractère cosmopolite, mais aussi du fait qu'elle occupe une place de premier rang dans l'agriculture (Pierrel R., 2005). Elles comprennent l'avoine, le blé, le maïs, le millet, l'orge, le riz, le seigle et le sorgho.

La production mondiale totale de céréales (2187,7 millions tonnes (Mt) pour la campagne 2010-2011) (Burney Ph., 2011) est aujourd'hui devenue un enjeu important pour nourrir l'humanité. Les deux géants producteurs dans le monde sont la Chine et les Etats-Unis, avec chacun une récolte de l'ordre de 400 Mt ou 20% du total mondial (Burney Ph., 2011).

En Algérie, la production des céréales occupe environ 80% de la superficie agricole utile (SAU) du pays. La superficie emblavée annuellement en céréales se situe entre 3 et 3,5 million d'hectares (ha). Les céréales et leurs dérivés constituent l'épine dorsale du système alimentaire algérien, et elles fournissent plus de 60% de l'apport calorique de la ration alimentaire (Djermoun A., 2009).

2- Classification

La Figure 13 ci-dessous représente la phylogénie de la famille des graminées (Belitz H.D. et al., 2009).

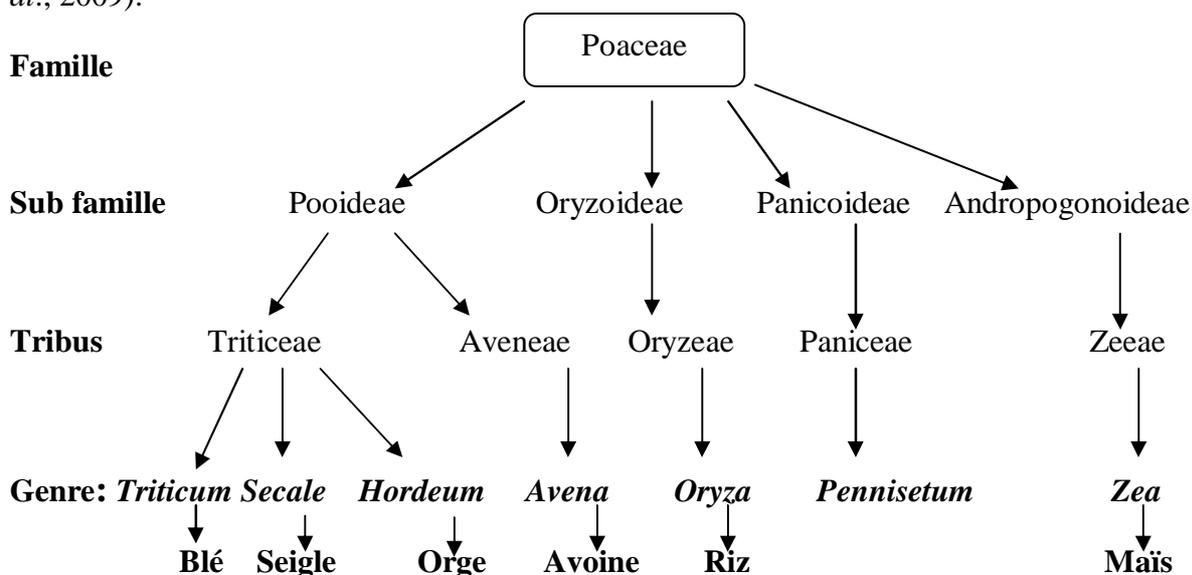


Figure 13: Classification botanique des principaux genres de la famille des céréales

3- Le grain d'une céréale

3-1- Structure

Le grain de céréale est un fruit à graine unique appelé caryopse. La face dorsale comporte un pôle apical où se trouve une « brosse » (Zeitoun R., 2011), et sur sa face ventrale, il est traversé d'un sillon qui longe la longueur du grain.

L'anatomie des céréales se ressemble (Figure 14) (Doumandji A. et *al.*, 2003). Ils sont composés de deux tissus zygotiques, à savoir l'embryon ou germe sur le pôle basal et l'endosperme, qui sont incorporés dans le tégument de la graine. L'endosperme se distingue également au cours du développement, donnant naissance à une couche externe de cellules d'aleurones entourant l'albumen (vitreux ou farineux) et joue un rôle clé dans la germination, à la mobilisation des composés de réserve stockés dans l'endosperme (Barthole G. et *al.*, 2011).

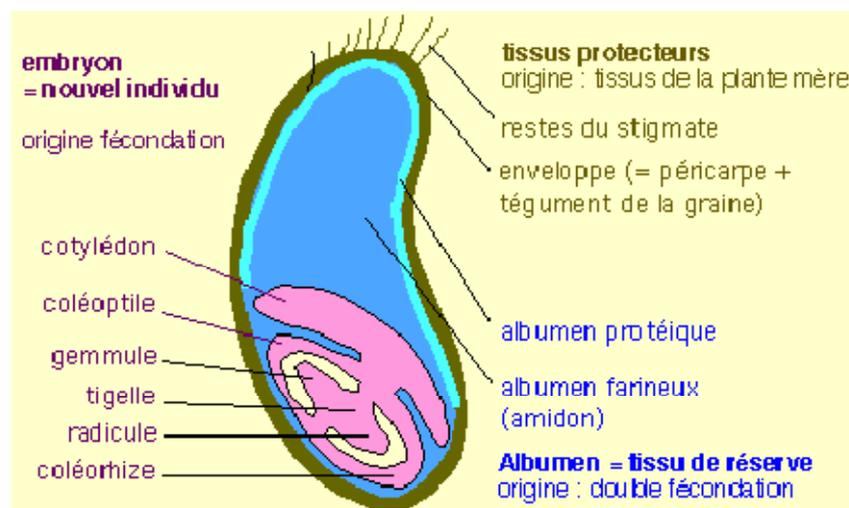


Figure 14 : Structure d'un grain de blé (Zahid A., 2010)

3-2- Caractéristiques nutritionnelles

Le grain de céréale est un réservoir de nutriments essentiels à l'alimentation humaine (Kumar P., 2011). Ils ont en commun sur le poids sec une teneur significative en protéines (10% à 12%), une forte teneur en glucides, amidon essentiellement dont la teneur est environ 70%, une teneur faible mais variable, en lipides, les plus riches étant l'avoine avec prédominance d'acides gras polyinsaturés (AGPI). Brutes non raffinées, les céréales sont des sources importantes de fibres (8%). Ces fibres sont multiples : lignine, celluloses, hémicelluloses telles que β - glucanes de l'avoine et d'orge (Schlienger J.L., 2011).

3-3- Quelques applications

La notion d' « aliment fonctionnel » ou « nutraceutique » est très récente. Elle est le fruit de l'évolution de notre société vers une alimentation ne devant plus seulement répondre à des exigences purement nutritionnelles ou organoleptiques, mais devant également posséder un potentiel bénéfique pour la santé. Un aliment est dit « fonctionnel » est un aliment qui procure des avantages au-delà de ses atouts nutritifs lorsqu'il est consommé dans le cadre d'un régime alimentaire normale, améliorant l'état de bien être des individus, ou réduisant le risque d'une maladie. Les « nutraceutiques » sont des extraits contenant des composants biologiquement actifs fournis dans une forme autre que la nourriture (Laparra J.M., Sanz Y., 2010).

Les céréales englobent une multitude de produits susceptibles d'être des ingrédients fonctionnels. Un certain nombre d'applications sur les céréales sont réputés à avoir des qualités propres aux aliments fonctionnels par exemple (Charalampopoulos D. et *al.*, 2002) :

- Ø En tant que substrat fermentescible pour la croissance des microorganismes probiotiques, en particulier de lactobacilles et les bifidobactéries.
- Ø Comme prébiotiques en raison de leur teneur en glucides non digestibles spécifiques.
- Ø Comme matériaux d'encapsulation pour les probiotiques afin d'améliorer leur stabilité.

Le Tableau 02 ci-dessous résume quelques applications (alimentaires et non alimentaires) attribuées aux grains de céréales.

Tableau 02 : Quelques applications des différents constituants de grains de céréales (Pecquet C et Laurière M., 2003 ; Novak M.H., 2004)

Constituants de la graine	Forme	Applications alimentaires	Applications non alimentaires
Farine (80%)		Pains, biscuits, pâtes...	
Amidon (70%)	Natif Modifié	fécule épaississant, glucose, sirop	Enrobage, fermentation (éthanol, carburants) Plastique...
Son (7%)		Fibres	Agent d'imagerie, antidote pour l'empoisonnement au plomb
Germe (3%)		Huile	Cosmétique, enzymes, lectines...
Gluten (10%)	Natif dénaturé	Additif en panification Ingrédient liant, Alimentation animale	

4- Le son des céréales

4-1-Définition et caractéristiques

Le son est un co-produit de la minoterie, il représente avec la farine et le germe l'une des trois fractions de la mouture. Il sert à la protection physique ou chimique pour l'endosperme et le germe.

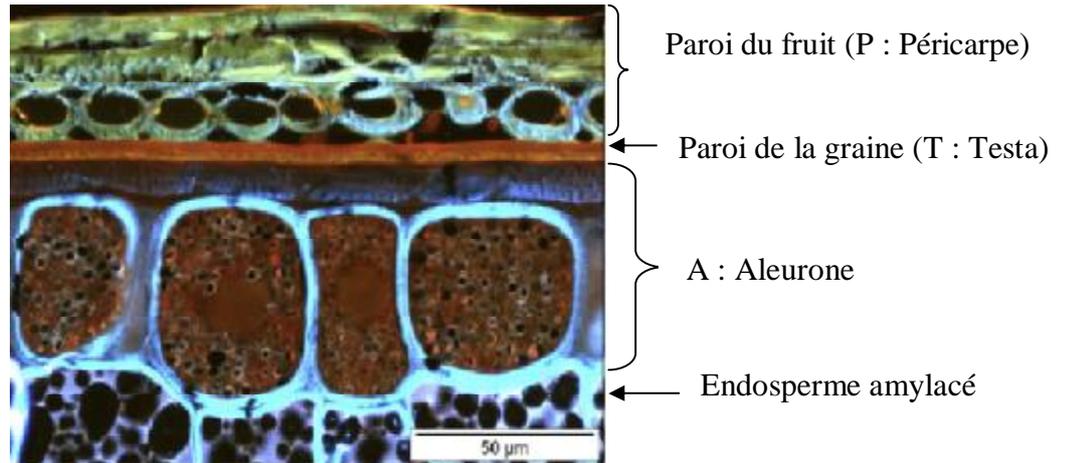


Figure 15 : Micrographie du son de blé (Poutanen K., 2012)

La section a été colorée avec Acide Fuchsin et Calcofluor : Protéine (en rouge) ; parois cellulaires (en bleu) ; parois cellulaires lignifiées (en orange)

P : péricarpe (cellules vides, poreux et fibreux) ; T : Testa (couche hydrophobe) ; A : aleurone (Cellules riches en protéines, lipides et minéraux).

D'un point de vue histologique, le son est un empilement de couches cellulaires très différentes botaniquement, cytologiquement et biochimiquement (Figure 15).

De l'extérieur à l'intérieur, il comprend le tégument du fruit, le manteau de la graine et la couche d'aleurone.

- ▼ **Péricarpe** : il provient des cellules de l'ovaire, il est constitué du péricarpe externe, du péricarpe interne et des cellules tubulaires en parallèle. Le péricarpe est transparent et facile à séparer. La composition et la structure du péricarpe est très complexe (Peyron et *al.*, 2002). La couche intermédiaire est brune et possède davantage de lignine, ce qui lui confère une propriété plastique supérieure aux autres couches (Antoine et *al.*, 2003). Les péricarpes ont un rôle de protection mécanique et de résistance aux agents pathogènes.

- ▼ **Testa** : est un assemblage pluristratifié décrit comme un ciment très hydrophobe de composition biochimique complexe. A l'intérieur de la testa, une ou deux couches de cellules très compressées riches en lipides, incrustations phénoliques et pigmentaires. La testa joue un rôle important dans la circulation de l'eau entre la partie externe et la graine et participe au contrôle de la maturation et la germination de la graine.

- ▼ **Couche d'aleurone** : également appelée assise protéique, constitue 6-7% du poids du grain et contient des cellules riches en protéines, autres que celles du gluten. C'est la seule couche de cellules vivantes du son. Ses rôles physiologiques sont nombreux parmi lesquels elle assure à la fois un rôle nourricier via le stockage de métabolites et synthèse d'enzymes d'hydrolyse des réserves et un rôle de protection grâce à sa structure pariétale résistante. La couche à aleurone est un tissu complexe qui renferme des concentrations importantes de molécules d'intérêts nutritionnels soit 40% des minéraux (Antoine et *al.*, 2003) et 20% des protéines du son (Pomeranz Y., 1988).

4-2-La composition chimique du son

La répartition des composants du son dans les différentes couches se traduit par une grande hétérogénéité qualitative et quantitative. Outre les nombreuses espèces et variétés de blé, et les divers procédés de mouture, la composition chimique est aussi fonction de la taille de l'amande, de la maturité de la plante, de la taille du germe, de l'épaisseur des couches externes, de la durée de stockage (Zitterman A., 2003 ; Zeitoun R., 2011).

L'ensemble des polysaccharides pariétaux : hémicelluloses et cellulose constituent plus de 50% du son (Reis D., et *al.*, 2006). Les protéines proviennent majoritairement de la couche d'aleurone. (Zeitoun R., 2011). Il arrive cependant que le son renferme aussi des fragments de la couche la plus externe de l'albumen amylicé. Même si la mouture est bien conduite, des grains d'amidon restent accrochés sur les différentes particules du son (Reis D. et *al.*, 2006).

4-2-1- Les fibres alimentaires

4-2-1-1-Définition

On appelle « Fibre alimentaire » les parties comestibles des plantes riches en polysaccharides résistantes à la digestion et à l'absorption dans l'intestin humain mais qui sont totalement ou partiellement fermentées dans le côlon. Cette définition inclut les polysaccharides, les oligosaccharides, la lignine et les substances végétales associées.

Marie E.S. (2005) a distingué deux types de fibres alimentaires :

- Des fibres solubles dans l'eau telles que les pectines, les mucilages et β -glucane.
- Des fibres insolubles telles que la cellulose, les hémicelluloses et la lignine.

4-2-1-2-Fibres alimentaires-Antioxydants

La moitié antioxydante détermine fondamentalement la structure des fibres alimentaires et par conséquent leurs propriétés physiques (Vitaglione P., 2008). Des proportions élevées des férulates sont localisées principalement dans le son des céréales, en se liant par des liaisons esters sur la fonction alcool primaire du carbone 5 d'arabinose (Figure 16) (Bunzel et al., 2001).

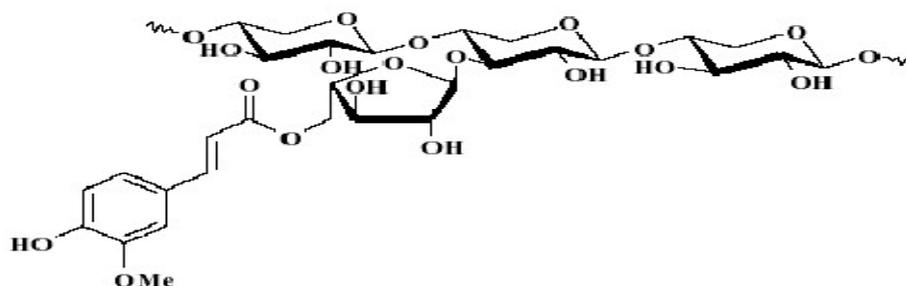


Figure 16 : Liaison de l'acide férulique aux arabinoxyanes (d'après Bunzel et al., 2002 ; Bunzel et al., 2004)

Les résidus férolyl subissent des réactions de couplage radicalaire dont résulte un cross-linking entre les polysaccharides, entre polysaccharides et lignine (Ralph et al., 1998) (Figure 17) et, probablement, entre polysaccharides et protéines (Piber et Koehler, 2005). Le cross-linking des polysaccharides influence les paramètres physiques des fibres alimentaires déterminant leurs réticulations, leurs poids moléculaires et leurs solubilités dans l'eau (Vitaglione P. et al., 2008) ainsi, il contribue à l'intégrité structurale de la paroi cellulaire, diminuant leur extensibilité (Sanchez et al., 1996), limitent la dégradation enzymatique (Grabber et al., 1998) et aussi la dégradation microbienne des fibres notamment lors de la fermentation microbienne dans le côlon (Nacz M., Shahidi F., 2006).

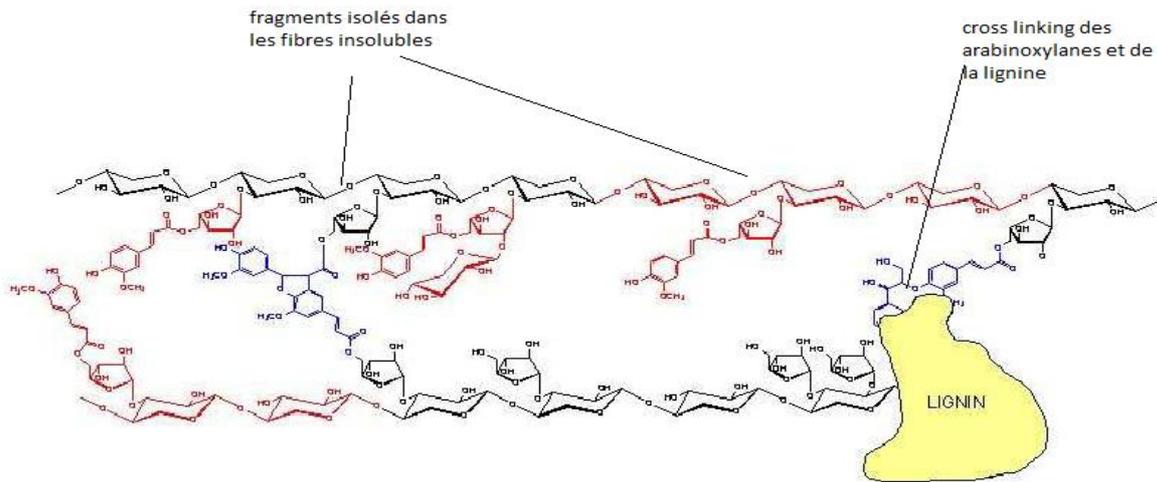


Figure 17 : Modèle structural de l'interconnexion des arabinoxylanes du seigle (d'après Bunzel et al., 2002 ; Bunzel et al., 2004)

Parmi les déhydrodimères qui ont été détectées fréquemment dans les fibres alimentaires des céréales : les dimères 5-5 et 8-8 (Figure 18) (Schooneveld bergmans et al., 1999).

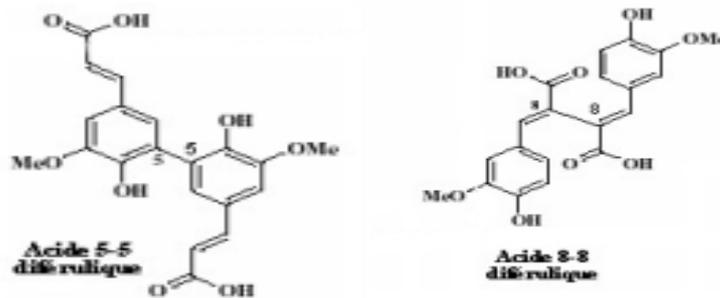


Figure 18 : Structure chimique des acides diféruliques des fibres (d'après Bunzel et al., 2001 ; Bunzel et al., 2003)

Les formes monomériques et dimériques d'acide férulique et *p*-coumarique pourraient servir de sites de nucléation pour le développement de la lignine au cours des stades ultérieurs du développement de la paroi (Zeitoun R., 2011).

4-2-1-3-Effets biologiques des fibres alimentaires

Les effets biologiques possibles dépendent pour une grande part de la richesse relative en fibres solubles ou insolubles dans l'eau (Bruneton J., 2009). On peut distinguer trois groupes d'effets pour les fibres alimentaires : l'action sur le transit intestinal, celle suspectée sur la fréquence des cancers colorectaux et les actions métaboliques sur la cholestérolémie et sur la glycémie (Bruneton J., 2009).

- **Action sur le transit intestinal**

L'effet est double, d'abord un effet sur la masse des selles qui est augmentée dans des proportions souvent importantes (de 127% après ingestion de 20g de son de blé), cette action est dû aux fibres insolubles, car elles résistent à la digestion et à la fermentation, elles retiennent l'eau et elles fermentent en partie, ce qui augmente la masse bactérienne (Bruneton J., 2009 ; Neve J. et Pincemail J., 2008). L'autre effet des fibres alimentaires porte sur la durée du transit qui est normalisée aux alentours de 48heures (h) (Bruneton J., 2009).

- **Prévention contre le cancer colorectal**

Les fibres insolubles modifient non seulement la concentration intestinale des acides biliaires, mais aussi leur métabolisme. Les fibres insolubles, qui sont fermentées partiellement et lentement, produisent des acides gras volatils qui abaissent le pH tout le long du côlon, sont protecteur (Cao L. et al., 2011 ; Neve J. et Pincemail J., 2008 ; Bruneton J., 2002). Parmi ces acides gras volatils, l'acide butyrique. C'est le substrat préférentiel des cellules épithéliales différenciées du côlon. Pour les cellules tumorales, en revanche, le butyrate bloque la prolifération in vitro, favorise la différenciation et/ou la mort cellulaire (apoptose) (Lamri-senhadj M., 2011 ; Neve J. et Pincemail J., 2008).

- **Action métabolique : hypocholestérolémie et glycémie**

Les fibres solubles (exemple le son d'avoine) ont un effet gélifiant, ralentissant la vidange gastrique et l'absorption du glucose et du cholestérol. De plus, le gel que forment les fibres solubles dans l'estomac ralentit l'accès des enzymes aux glucides. Il en résulte une réduction de l'ampleur des pics sanguins de glucose et d'insuline (abaissement de l'index glycémique des aliments). Ceci semble éviter ou retarder l'apparition du syndrome de résistance à l'insuline, et éventuellement le diabète non insulino-dépendant (Figure 20) (Neve J. et Pincemail J., 2008).

5-Germe de céréale

5-1- Définition

Défini par les nutritionnistes comme étant « *La maison du trésor des nutriments naturels et source de vie de l'humanité* ». Le germe de blé, un co- produit de la minoterie, est le composant de la graine le plus important pour assurer la survie de l'espèce comme il est capable de se développer en une future plante (Evers T. et Millart S., 2002. Zhu K et Zhou H., 2005).

5-2- Quelques caractéristiques

Le germe de blé contient 27-30% de protéines, 8-11% des lipides (principalement insaturés), 15-20% des sucres (principalement saccharose et raffinose), 4-5% des minéraux et 8-10% de cellulose et d'hémicellulose (Zhu K et Zhou H., 2005). Les protéines de germe de blé ont été classées avec des protéines animales de haute qualité, et sont riches en acides aminés essentiels (lysine, méthionine, thréonine) et dans lequel de nombreuses céréales sont déficients. Par conséquent, le germe de blé est un complément alimentaire potentiellement nutritif (Arshad M.U et *al.*, 2007). Les produits alimentaires communs produits avec l'addition du germe de blé sont : le pain, gâteaux, biscuits, aliments pour bébés et les produits de viande. Le germe de blé peut aussi remplacer le cacao dans certains produits de confiserie (Ibanoglu E., 2002).

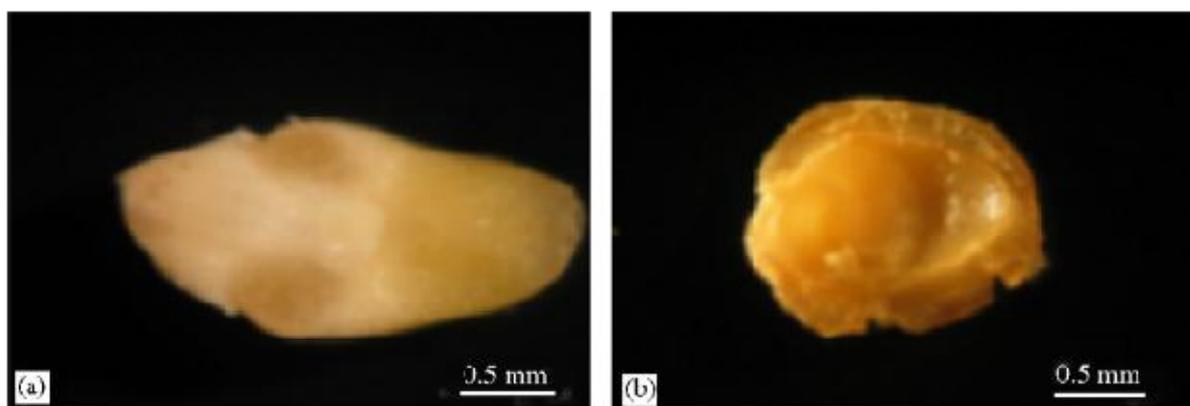
Le seul inconvénient de l'utilisation extensive de germe de blé a été sa faible stabilité au stockage, en raison de la présence de grande quantité de graisses et des enzymes hydrolytiques (lipase, lipoxégénase), qui rendent le produit très sensible au rancissement. C'est pourquoi, et selon les demandes des boulangeries, les minoteries cherchent à extraire le maximum de l'endosperme de la graine avec la plus basse contamination par les germes. Par conséquent, le dépôt annuel mondial de germe de blé est estimé à environ 25000.000 tonnes (FAOSTAT, 2008). La consommation humaine du germe de blé est très limitée, puisque la majeure partie de celui-ci est utilisée pour l'alimentation animale et à d'autres fins (Rizzello C.G et *al.*, 2010).

Récemment, plusieurs méthodes ont été développées pour améliorer la stabilité et donc la durée de vie de germe de blé. Actuellement, le germe de blé est le plus souvent traité à la chaleur avant d'être ajouté aux produits alimentaires pour développer la couleur et la saveur pour des applications spécifiques alimentaires. Le germe de blé peut être traité par la chaleur en utilisant la torréfaction, chauffage micro- ondes, autoclavage ou étuve. Le traitement

thermique est également utile pour améliorer la durée de vie du germe de blé en désactivant les enzymes (Ibanoglu E., 2002).

5-3- Composition structurale

Le germe de blé est composé de deux parties : l'axe embryonnaire et le scutellum (Figure 19). L'épiblaste a une mineure importance. Lors de la germination, l'axe embryonnaire se développe en un semis, et le scutellum le nourrit.



a) axe embryonnaire ; b) : scutellum vue par ESEM (microscope électronique à balayage environnemental).

Figure 19 : Composition structurale de germe de céréale (Barron C., Surget A. et Rouau X., 2007).

L'axe embryonnaire

L'axe embryonnaire est composé d'une tige (plumule) et une racine primaire orientée vers la base. La tige est constituée d'un apex, de diverses feuilles embryonnaires et d'une gaine protectrice appelée : coléoptile. La racine primaire et les deux poils des racines secondaires latérales sont protégées par une gaine connue sous le nom : coléorhize. L'axe embryonnaire est le siège des activités vitales de la graine, contient du saccharose, principale substrat respiratoire, ainsi que des lipides et des protéines de structure (Guiga W., 2006).

Le scutellum

Son nom dérive de sa forme en boucle (Figure 19), le scutellum est la partie du germe qui est fixée sur le coté de l'axe embryonnaire plus proche de l'endosperme. Le scutellum est considéré comme homologue à un cotylédon, et est constitué principalement de cellules non spécialisées (parenchyme). En plus du noyau et de cytoplasme, les cellules parenchymateuses contiennent une quantité considérable de protéines, de lipides, et une petite quantité d'amidon.

Le scutellum a une fonction de sécrétion et permet la diffusion des enzymes hydrolytiques de l'embryon vers l'endosperme (Guiga W., 2006). De plus, le scutellum fournit la nourriture, qui a été stockée dans l'endosperme durant la maturation, et devient un organe de digestion et de transport d'aliment à partir de l'endosperme pour permettre la croissance de l'axe embryonnaire.

6- Les effets santé attribués aux grains entiers

De nombreuses études épidémiologiques ont été conduites sur les personnes consommant des produits à base de grains entiers. Elles révèlent un effet significatif sur la réduction de l'index glycémique (basé sur la mesure du taux de sucre dans le sang), l'obésité, les diabètes de type 2, les risques cardiovasculaires et certains cancers (Verma B et *al.*, 2009 ; Yuan X et *al.*, 2005 ; Dinelli G. et *al.*, 2009 ; Vitaglione P. et *al.*, 2008). Ces effets bénéfiques à la santé ont été attribués aux fibres alimentaires et/ou les composés bioactives associés tels que les antioxydants (caroténoïdes, acides phénoliques...), au donneur des groupements méthyles, les traces minéraux) (Björck I. et *al.*, 2012).

Le son et le germe des céréales sont les composantes majeures de la consommation des grains entiers et sont largement acceptés comme des éléments importants de faible index glycémique (IG). Les composés inhibiteurs de l' α -glucosidase (empêchant l'hyperglycémie post prandiale) de germe de blé ont été identifiés comme les acides phosphatidiques, le 1,2-dilinoéoyl glycéro 3-phosphate et le 1-palmitoyl-2-linoléoyl-3-phosphate (Liu L. et *al.*, 2011). De plus, des études ont démontré que les produits d'avoine et d'orge ont atténué la glycémie post prandiale, le taux du cholestérol sanguin dû à leurs teneurs en β -glucane (fibres solubles), conduisant alors à la perte du poids en augmentant la satiété, et par conséquent contrôlant l'incidence des maladies cardiovasculaires et les diabètes type 2 (Figure 20) (Baik B.K. et Ullrich S.E., 2008).

Le son de blé a été largement reconnu comme un agent préventif contre le cancer, bien que le mécanisme de la protection ne soit pas entièrement compris. Les extraits de son de blé ont été examinés contre la croissance de l'adénocarcinome des cellules de la prostate humaine (PC3). Les fractions contenant des acides gras insaturés libres, et les alkylrésocinolols (lipides phénoliques) exercent une haute activité cytotoxique (Liu L. et *al.*, 2012 ; Kumar P. et *al.*, 2011).

Les céréales à grains entiers sont une source riche de bétaine et la choline (Fardet A. et *al.*, 2008). La bétaine est un donneur de méthyle à l'homocystéine, ce qui permet sa conversion en méthionine (Fardet A. et *al.*, 2008 ; Björck I. et *al.*, 2012) sachant que

l'homocystéine est un facteur de risque cardiovasculaire et peut conduire au stress oxydatif. La choline, en tant que précurseur de la bétaine est également impliquée dans les défenses antioxydantes de l'organisme (Fardet A. *et al.*, 2008). La Figure 20 ci-dessous démontre les mécanismes probables dont la prise de grains entiers protège contre les maladies chroniques.

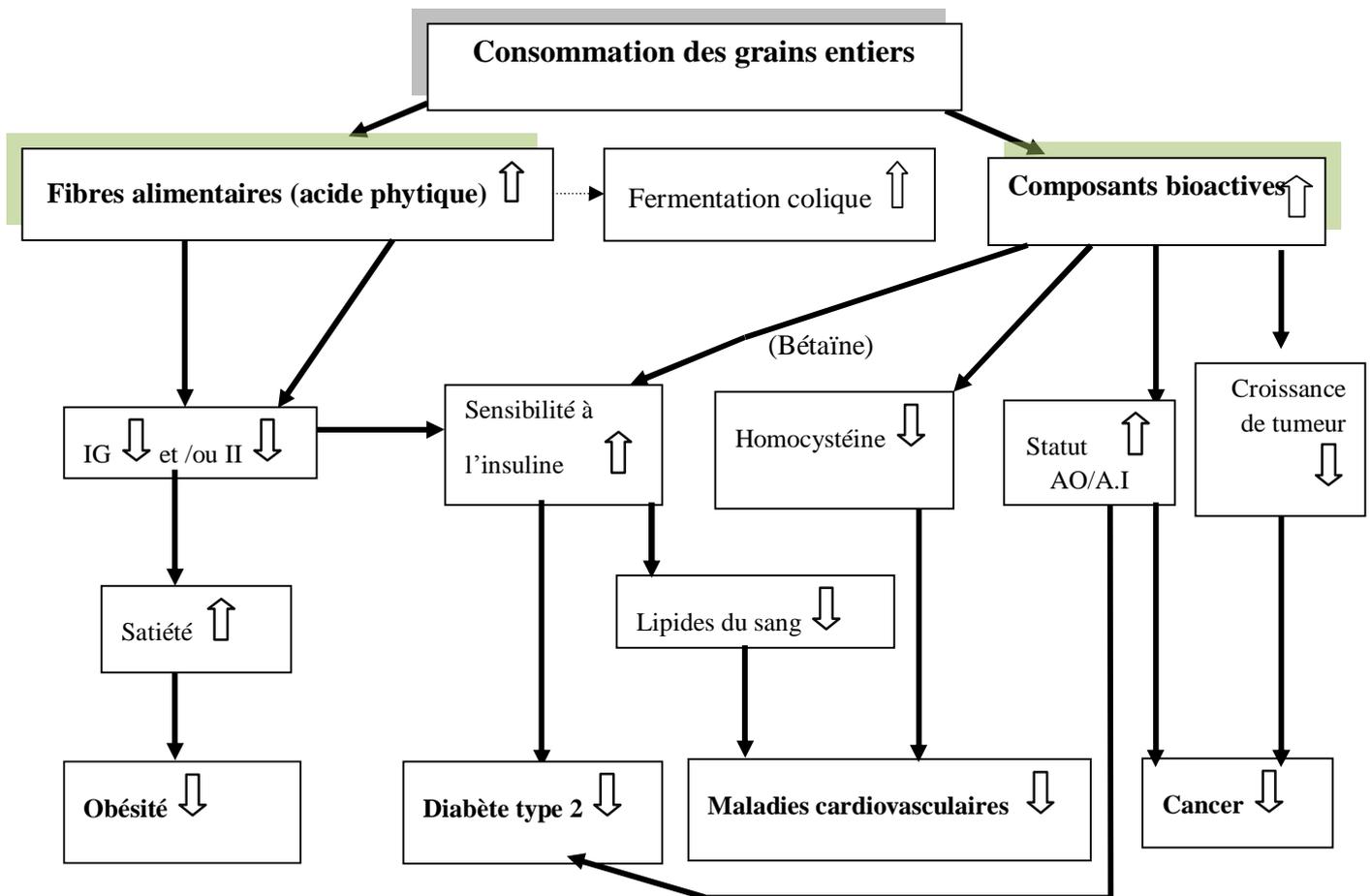


Figure 20 : Effets de la consommation des grains entiers sur les différents paramètres physiologiques et pathologiques (Björck I. *et al.*, 2012)

AO : antioxydant ; A.A : anti inflammatoire ; IG : index glycémique ; I.I : Index Insulinémique

↑ : Augmentation ; ↓ : diminution

Chapitre 04 :
Les plantes Médicinales

1- Notions générales

1-1- Plante médicinale

Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), ce sont toutes les plantes qui contiennent une ou des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles (Sofowora A., 2010).

Une plante médicinale peut être considérée comme un médicament car elle répond à la définition du médicament : « est considérée comme médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques ».

1-2- Plante nutritive et curative

L'homme est habitué à consommer et digérer différents espèces de plantes qui sont bien souvent appréciées pour leurs qualités aussi médicales que nutritives. La ligne de démarcation entre les propriétés nutritives et les propriétés curatives n'est pas toujours très nette. Le citron, la papaye, l'oignon et l'avoine sont ils des aliments ou des médicaments ? En réalité ils sont les deux à la fois. Le citron (*Citrus limon*) prévient les infections ; la papaye (*Carica papaya*) est parfois utilisée comme vermifuge ; l'oignon (*Allium cepa*) prévient les affections des branches ; l'avoine (*Avena sativa*) augmente l'énergie. De fait, la phytothérapie prend tout son sens lorsque la frontière entre aliments et médicaments disparaît.

2- La famille des Lamiaceae

La famille des Lamiacées (Lamiaceae) ou Labiées est une importante famille de plantes dicotylédones qui comprend environ 240 genres, pour un nombre d'espèces estimé environ 7200, répartis dans le monde entier, mais surtout dans la région méditerranéenne. Elles sont réparties en sept sous famille (Ajugoideae Kostel., Lamioideae Harley, Nepetoideae (Dumort.) Luer., Prostantheroideae Luer., Scutellarioideae (Dumort.) Caruel, Symphorematoideae Briq. And Viticoideae Briq.) (Brauchler C., et al., 2010 ; Pedersen J.A., 2000).

Ce sont le plus souvent des plantes herbacées, des arbustes et rarement des arbres ou lianes, producteurs d'huiles essentielles, largement répartis dans tout type de milieux. La forme de lèvre de la fleur et la présence d'huiles essentielles signent cette famille. Pour la

plupart des genres, la section carrée de la tige et des feuilles opposées sont aussi des caractéristiques. De nombreuses espèces de cette famille sont des plantes mellifères.

Les plantes de cette famille sont rarement ligneuses, souvent velues. Les feuilles sont décussées (déposées en paire se croisant d'un nœud à l'autre), dépourvue de stipule, à limbe généralement denté. Inflorescence en cymes axillaires ou contractées simulant souvent des verticilles, ou condensées au sommet des tiges et simulant des épis. Fleurs pentamères en générale hermaphrodites. Calice à cinq divisions. Corolle en général bilabée longuement tubuleuse parfois à 4-5 lobes sub-égaux ou à une seule lèvre. Lèvre inférieure trilobée, la supérieure bilobée. En générale à 4 étamines, la cinquième nulle ou très réduite. Ovaire supère à carpelles originellement bi-ovulés ensuite uniovulés par la constitution d'une fausse cloison. Fruit constitué par 4 akènes plus ou moins soudés par leur face interne et diversement ornés (Quezel P. et Santa S., 1962).

2-1-Classification botanique

La systématique des espèces étudiées (Quezel P. et Santa S., 1962) est :

Règne	: végétale
Sous règne	: Plantes vasculaire
Ensemble	: Eucaryote
Embranchement	: Spermaphytes
Sous embranchement	: Angiosperme
Classe	: Dicotylédones
Sous classe	: Gamopétales
Ordre	: Lamiales
Famille	: Labiées
Sous famille	: Nepetoideae

2-2-Les composés phénoliques rapportés à la famille des Lamiacées

Les composés phénoliques de la famille des labiées ont été déjà décrits et identifiés. Plus de 400 flavonoïdes ont été identifiés dans cette famille (Regnault-Roger C. et *al.*, 2004).

Parmi les caractéristiques des composés phénoliques de la famille des lamiacées est la présence des flavones (sous forme aglycone et/ ou glycosylé) significativement plus élevés

que les flavonols (Benkineouar R., 2007 ; Skoula M., et *al.*, 2008 ; Regnault-Roger C. et *al.*, 2004), par contre, les flavanones occupent la deuxième place et ceci inclut des flavonoïdes monosubstitués en 6 et di substitués en 6,8 qui sont rare ailleurs (Skoula M. et *al.*, 2008). L'histogramme ci-dessous (Figure 21) démontre le pourcentage de la répartition de différentes classes de flavonoïdes selon Benkineouar R. (2007).

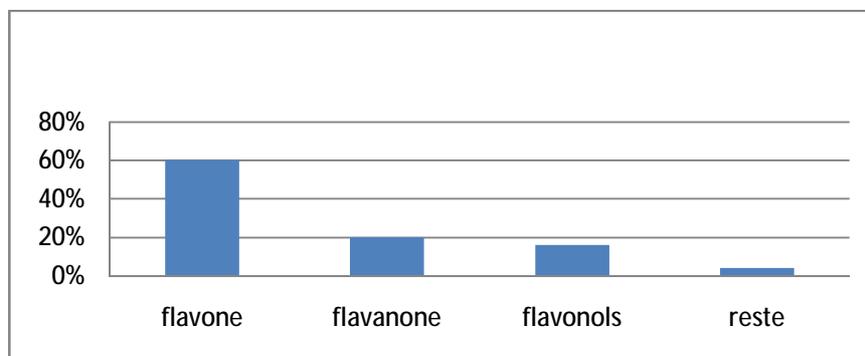


Figure 21 : Distribution des flavonoïdes dans les Labiées (Benkineouar R., 2007)

Outre, l'acide rosmarinique (un dérivé des acides cinnamiques) est de loin l'acide phénolique le plus représentatif de la famille des labiées (Merghem R., 2009 ; Regnault-Roger C. et *al.*, 2004).

3- Description des plantes étudiées

3-1-Le genre *Origanum*

Le nom « *Origanum* » vient du grec « Oros »= montagne, et « Ganos »= joie, l'origan est donc considéré comme la joie ou l'ornement des montagnes (Wilson M., 2006). Dans le genre « *Origanum* », Ietswart (1980), basé sur des critères morphologiques, a reconnu 3 groupes, 10 sections (Skoula M. et *al.*, 2008), 43 espèces, six sous espèces et 18 hybrides. Les membres de ce genre sont principalement distribués le long de la région méditerranéenne avec plus de 80% dans l'Est méditerranéen (Skoula M. et *al.*, 2008).

3-1-1-Description morphologique

L'Origan est une plante herbacée, vivace, aromatique, à tige érigée, dressée, grêle à section carrée, à arêtes saillantes, souvent rougeâtre de 20 à 80 cm de haut. Les feuilles ovales, pétiolées à bord peu denté, sont opposées et de grandeurs variables, les inférieures étant plus grandes. Les fleurs sont groupées en panicules très denses sur les rameaux ce qui constitue un cas unique chez les labiées. Calice tubuleux à 5 dents courtes bilabié ou non.

Corolle blanche ou rosée, à lèvre supérieure émarginée et à lèvre inférieure trilobée, 4 étamines divergentes (Quezel P. et Santa S., 1962).

La détermination de différentes espèces d'Origan est assez délicate. Les espèces courantes, plus ou moins commune dans le Tell sont :

- Ø *Origanum vulgare ssp. Glandulosum (Desf) Ietswaart* appelée « Origan algérien » est endémique à l'Algérie et à Tunisie (Krim S. et al., 2008).
- Ø *Origanum hirtum Batt* : espèce du nord africaine.
- Ø *Origanum compactum Benth* : espèce d'ouest algérien.
- Ø *Origanum floribundum Munby* : espèce endémique à l'Algérie et protégée par la loi (phase A., 2006-2010)

3-1-2-Propriétés thérapeutiques

En Algérie, l'*Origanum glandulosum* est un arbuste aromatique appelée « Zaater » qui est utilisé principalement comme plante médicinale contre la toux, la coqueluche, la fièvre et la bronchite (Bendahou M. et al., 2008). En médecine populaire, l'Origan est utilisé pour soigner les rhumes, et les troubles digestives. Le Dr. Leclerc H. lui reconnaît un réel pouvoir thérapeutique, dans le traitement de la toux et de la coqueluche. Aussi, préférerait-il les Origan nord africains qu'il tenait plus actifs.

Les activités biologiques d'Origan sont : antiseptique, antispasmodique, antitussif, apéritif, aromatique, carminatif, calmant, digestif, emménagogue, expectorant, stomachique, tonique (Baba-Aissa F., 1999).

3-2-Le genre Thymus

3-2-1- Présentation et description

Thymus est un vaste genre divisé en huit sections, comprenant environ 215 espèces particulièrement répandus dans la région méditerranéenne. Dans la flore algérienne ce genre est représenté par 11 espèces qui ne se prêtent pas aisément à la détermination, en raison de leur variabilité et de leur tendance à s'hybrider facilement, parmi lesquelles : *T. numidicus Poiret*. (Hazzit M. et al., 2009) localement connu « zaitra ».

T. numidicus Poiret, un membre de la famille des Labiées, est une plante aromatique/médicinale d'une importance économique croissante en Amérique du Nord, en Europe, en Afrique du Nord et en Asie. Comme beaucoup de labiées elles sont connues par leurs huiles essentielles (H.E.) aromatiques (Golmakani M.T. et Rezaei K., 2008).

Nombreux sont les auteurs qui ont étudié les espèces appartenant à ce genre (Gilly G., 2005 ; Bouguet G., 2009), l'influence des conditions environnementales sur le modèle de composants d'huiles essentielles et des composés phénoliques a été étudié. Des facteurs environnementaux abiotiques (conditions de températures, l'humidité, pédologiques, climatiques et l'altitude...) ainsi que des effets biotiques (perturbations d'origine humaines, herbivores...) ont été prouvés pour influencer à la fois l'H.E. et de polyphénols de genre « *Thymus* » (Bouguet G., 2009).

3-2-2- Description morphologique

C'est un sous arbrisseau vivace, aromatique, à tiges ligneuses dressées, quadrangulaire, fortement ramifiées, atteignant rarement plus de 30cm de hauteur et possédant de petites feuilles linéaires ou elliptiques, opposées, sessiles ou courtement pétiolées. Les fleurs sont réunies en grappes à l'extrémité des rameaux, situées à l'aisselle de bractées en forme de feuilles, simulant des verticilles ; la corolle est rose pale, très rarement blanche, avec lèvre supérieur entière et lèvre inférieur trilobé (Bianchini F. et Corbetta F., 1975 ; Wichtl M. et Anton R., 1999 ; Baba Aissa F., 1999).

3-2-3- Origine et distribution

Spontanées sur les terrains sec et ensoleillés de la Provence, de nombreuses sous espèces et variétés se sont multipliées en Europe centrale et du sud, dans les Balkans et le Caucase. La plante est cultivée en Afrique Orientale, Inde, Turquie, Maroc et en Amérique du Nord (Wichtl M. et Anton R., 1999). En Algérie, elle est commune dans les régions montagneuses et les bords de la mer, ou l'on rencontre aussi de la même famille le serpolet, (*Thymus serpyllum*) et *Thymus algériensis* (Delille L., 2007). Les thyms résistent bien à la sécheresse d'été et à des températures de -10°C. S'il y'a repos de végétation en été le feuillage est persistant. Remarquable que, suivant l'altitude, la plante fleurit en jour long ou en jour court (Gilly G., 2005).

3-2-4- Propriétés thérapeutiques

Les usages médicaux et non médicaux de différentes espèces de *Thymus* sont bien connus. Le thym est couramment utilisé comme herbe culinaire. Sa drogue et l'huile essentielle sont officielles dans plusieurs pharmacopées (exemple la 6^{ème} de la pharmacopée Européenne) (Borbala B et al., 2010) ; par exemple, le thym fait partie de nombreuses spécialités antitussives (Expectral^R, Pertussin et Thymipin). De plus de nombreux

médicaments par voie interne et externe (sirop, gouttes, bains et frictions) renferment de l'huile essentielle de thym (Wichtl M. et Anton R., 1999).

La plante est rapportée pour avoir un large éventail d'activités biologiques, tels que carminative, antispasmodique, expectorant, antitussif, anti microbienne, vermifuge, antioxydante et antifongique (El-Nekeety A.A. et *al.*, 2011 ; Borbala B et *al.*, 2010 ; Golmakani M.T.et Rezaei K., 2008 ; Baba Aissa F., 1999). El-Nekeety A.A. et *al.* (2011) ont montré que les huiles essentielles de thym ont une activité antioxydante potentielle et un effet protecteur contre la toxicité des aflatoxines (dose dépendante).

Il est également utilisé dans la médecine populaire pour le traitement d'une variété de maladies gastro-intestinales et notamment des troubles broncho-pulmonaire.

Le thym ou l'origan ont été couramment utilisés dans les aliments principalement pour le gout, l'arôme et à la préservation. Depuis les anciens Grecs, les Egyptiens, et les Romains les parties feuillues sont souvent ajoutées aux produits de viandes, de poissons et de la nourriture (El-Nekeety A.A. et *al.*, 2011).

Les composés phénoliques rapportés du genre *Origanum* et de *Thymus* sont présentés dans le Tableau 03 suivant :

Tableau 03 : Les composés phénoliques communs et distingués du genre *Origanum* et *Thymus*

Classe	Composés	Références
Composés phénoliques communs		
Acides phénolique	A.rosmarinique A.caféique	D'après une comparaison de plusieurs auteurs
Flavones	Lutéoline (5,7, 3', 4' tétraOH) Apigénine (5, 7, 4'-tri OH) Thymonine (5, 6, 4'-tri OH -7, 8, 3' tri – OCH ₃ flavone)	
Flavanones	Eryodictyol (5, 7, 3', 4'- tétra OH)	
Flavonols	Quercétine (5, 7, 3', 4' tetra OH)	
Composés phénoliques du genre <i>Thymus</i>		
Flavones	Scutellarein (5, 6, 7, 4' tétra OH flavone) Vicenin-2 (6, 8, di C-glucoside d'apigénine) Cirsilinéol (5,4'-di OH- 6, 7, 3'-tri-OCH ₃ flavone) 8-méthoxy cirsilinéol Cirsimaritine (5,4' di-OH, 6,7 di-OCH ₃ - flavone)	Nickavar B., Esbati N., 2012 Regnault-Roger C. et al., 2004 Morimitsu et al., 1995 ; Harraguchi H. et al., 1996 Adzet et al., 1988 ; Morimitsu et al., 1995 ; Harraguchi H. et al., 1996 ; Broucke V.D., 1982 Regnault-Roger C. et al., 2004

	5,4'-di OH-6,7, 8, 3'-tétr-OCH ₃ flavone	Broucke V.D., 1982
Composés phénoliques du genre <i>Origanum</i>		
Flavones	5,7- Di-OH (chrysin) 5,6- Di-OH-7-OCH ₃ (negletein) 5-OH-6,7- di-OCH ₃ (mosloflavone) 5,7, 4'-Tri-OH-3'-OCH ₃ (chrysoeriol) 5,7, 3'-Tri-OH-4'-OCH ₃ (diosmétine)	Mirovich, 1987 ; Skoula M. et <i>al.</i> , 2008 ; Zheng et <i>al.</i> , 1997 Koukoulista et <i>al.</i> , 2006 ; Skoula M. et <i>al.</i> , 2008
Flavanone	5,7, 4'-Tri-OH flavanone (naringénine)	Antonescu et <i>al.</i> , 1983 ;
Flavonols	3,5, 7-Tri- OH flavone (galangine) 3,5, 7, 4'-Tétra- OH flavone (Kaempférol) 5-OH -3,7, 3', 4'-tétr-OCH ₃ (rétusine)	Kanazawa et <i>al.</i> , 1995 Gil-Munoz, 1993 ; Skoula M. et <i>al.</i> , 2008 ; Antonescu et <i>al.</i> , 1983
Dihydroflavonols	3, 5, 7, 4'- tétra OH flavanone (dihydro-kaempférol) 3,5, 7,3',4'- tenta OH- flavanone taxifolin	Skoula M. et <i>al.</i> , 2008

3-3- *Le genre Calamintha*

Le genre *Calamintha* est dérivé du grec « Kalos »= beau, et « mintha »= la menthe, faisant allusion à la similitude de la plante à la menthe (Anisko T., 2008).

La première étude taxonomique du « *Calamintha* » était réalisée par Boissier (1879). L'auteur a reconnu trois sous sections et comprend neuf espèces (Alan S. et *al.*, 2007) aromatiques, originaires de l'Eurasie et l'Amérique du Nord (Ernest S., 2006).

Récemment, Galland et al. ont mentionné une sous espèce comme étant présente en Afrique du Nord (Rif et Atlas moyen) sous le nom *Calamintha grandiflora* (L.) Moench *subsp. Baborensis* (Bali) Galland ; les plantes nord africaines présentaient la même allure que

celles d'Europe mais seraient plus réduites, c'est-à-dire avec des feuilles, calice et corolle un peu plus courts (El-Kalamouni C., 2010 ; Grijalbo R.P. et *al.*, 1993).

Utilisée en infusion comme tisane, le Thé d'Aubrac est la plante la plus rare parmi les plantes sélectionnées, *Calamintha grandiflora* (L.) Moench (Syn. *Satureja grandiflora* (L.) Scheele) voir les synonymes *Mélissa grandiflora* L., *Thymus grandiflorus scop.*, *Calamintha mariae*, le Thé d'Aubrac est une plante connue dans la région d'Aubrac au massif central en France. Elle appartient à la famille des Labiées, de taille (20-60 cm) et d'une odeur forte et pénétrante particulièrement en Juillet.

3-3-1-Description morphologique

Plante herbacée de 20-50cm de hauteur, annuelle ou bisannuelle. Les feuilles sont pétiolées, à limbe ovale, de 3-5cm de longueur et de 2cm de large, à bords dentelés et à nervation pennée. Inflorescence est en cyme bipare, la fleur bisexuée, épigyne, à corolle bilabiée à base tubulaire, purpurine ou blanches tachetées de rose pédicellées, à deux lèvres, hispides. Gynécée à style long lisse surmonté d'un stigmate bifide, tétracarpellés, uniovulés à ovule anatropé. Le fruit est un tétramère à surface granulée (Aribi I., 2011).

3-3-2- Distribution géographique

Sur le terrain, cette plante montre une préférence pour les forêts ombragées et fraîches des étages montagnards, surtout hêtraies (El- Kalamouni C., 2010).

3-3-3- Composition chimique

Une étude sur les flavonoïdes de cette espèce menée par Benkiniour R., (2009) a révélé la présence de six flavonoïdes qui sont identifiées par une co-chromatographie (rapport frontale (Rf) et fluorescence) et par des analyses spectrales UV-Visible et résonance magnétique nucléaire (RMN) :

Apigénine, lutéoline, 5-desméthysinensetin (5-hydroxy, 6,7, 3',4' tétraméthoxyflavone), xanthomicrol (5,4' dihydroxy, 6,7, 8-triméthoxyflavone), quercétine 3-glucoside, 5,3',4'-OH-6, 7, 8-O méthylflavone.

Une autre étude plus récente effectuée par Dobravalskyte D. et son équipe (2012) ont identifié deux autres molécules phénoliques, qui sont : l'acide rosmarinique et l'acide salvialonique C.

3-3-4- Utilisation en médecine traditionnelle

Elle est très utilisée, pour en enfants ou adultes des deux sexes, elle possède plusieurs modes d'emploi, en infusion ou en macération ainsi qu'en poudre comme un anti-diarrhéique

et les brûlures de l'estomac ainsi que les problèmes de côlon et les gastrites en générale (Aribi I., 2011).

Deuxième partie :
Matériel et Méthodes

Le présent travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Biologie Micromoléculaire et Phytochimie (Université de Constantine), dirigé par le Pr. Merghem R.

1- Matériels végétales

1-1-Choix du matériel d'étude

La sélection du matériel d'étude est la première étape dans une investigation phytochimique. Quelques critères qui peuvent orienter un phytochimiste pour son choix:

- Ø Le chercheur sera souvent tenté de s'intéresser aux espèces qui n'ont pas, ou très peu été étudiées.
- Ø Plantes endémiques, car ces dernières doivent certainement posséder des caractéristiques évolutives particulières et donc pouvoir fournir des substances chimiques nouvelles.
- Ø Plantes qui ont une grande importance économique et/ou nutritionnelle comme celles de la famille des légumineuses, des labiées et céréales ...

1-2-Récolte des plantes

- Céréales alimentaires

Ce sont le son et le germe des céréales : les fractions de la mouture et co- produits de la minoterie qui ont été éliminés lors d'obtention de la farine et de la semoule.

La sélection a été faite après une étude préliminaire sur cinq types d'échantillons : l'ensemble son plus germe de blé, le son d'avoine, le son d'orge, le son de blé commercial et la farine d'orge. Des résultats préliminaires (l'intensité de la couleur des extraits, le tirage des spectres des phases des différents extraits), nous laissent opter à continuer nos travaux sur trois types échantillons (Figure 22) :

- 1- L'ensemble son plus germe de blé (1kg),
- 2- La farine de son plus germe de blé traité à la chaleur (1kg).
- 3- Le son d'orge (300g)

Les deux premiers échantillons ont été fournis par le Laboratoire de recherche en Nutrition et Technologie Alimentaire (L.N.T.A.) d'I.N.A.T.A.A (Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro Alimentaires de Constantine) et qui ont été utilisés telles qu'elles. Le son d'orge obtenu après la mouture de 2600g de grains d'orge, nous permet de récolter 375g de son (environ 14% de rendement).

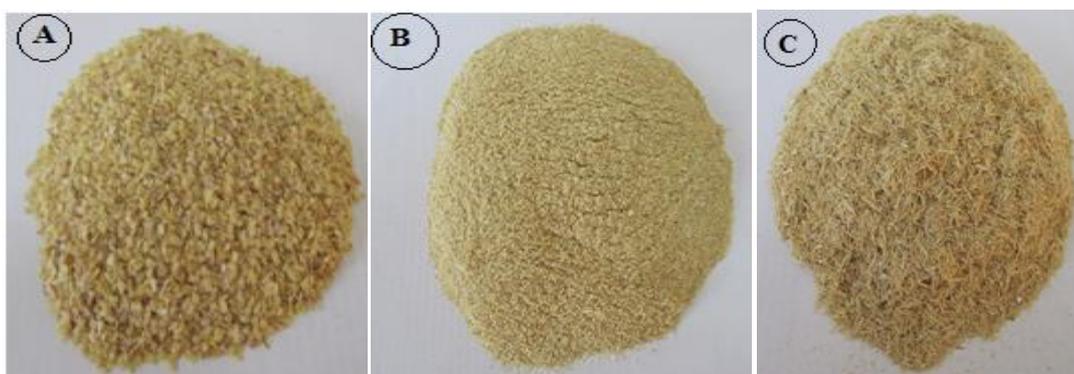


Figure 22 : Photo des trois échantillons de céréales de l'étude : le son plus germe de blé (A), farine de son plus germe de blé traité à la chaleur (B), et le son d'orge (C).

- Les Plantes médicinales

Les plantes ont été récoltées en mois de Juillet (2012) en période de floraison, de deux stations de la wilaya de Jijel (Algérie) :

- 1- *Origanum vulgare Desf* : région d'Ouled Askeur.
- 2- *Origanum floribundum Munby*: Chréa (Parc National de Taza : P.N.T.)
- 3- *Thymus numidicus Poiret* : région d'Ouled Askeur.
- 4- *Calamintha grandiflora (L.)*: forêt Aftis (P.N.T) (Ziamma Mansouriah).

Après nettoyage, les plantes (Tableau 04, Figure 23) ont été séchées à température ambiante et à l'abri de la lumière, puis broyé en fine poudre avec un mortier.

Tableau 04 : Les plantes médicinales sélectionnées, site de récolte, leur statut national, partie utilisée et leur masse respective

Nom scientifique	Région de récolte	Statut national /endémisme	Partie utilisée	Masse de la matière en (gr)
<i>Origanum vulgare Desf.</i>	Ouled Askeur	Endémique à Algérie, Tunisie	Feuilles Fleurs	30
<i>Origanum floribundum Munby</i>	Chréa (P.N.T.)	Rare/ endémique à l'Algérie	Feuilles Fleurs	10
<i>Calamintha grandiflora Moench</i>	Aftis (P.N.T.)	Commun	Feuilles	30
<i>Thymus numidicus Poiret</i>	Ouled Askeur	Endémique à l'Algérie	Feuilles Fleurs	20



Photo *Thymus numidicus* après la récolte



Photo : *Calaminta grandiflora* prise de son site d'origine (Aftis)



Photo d'*Origanum floribundum* prise de son Site d'origine (Chr ea de P.N.T.)



Photo d'*Origanum vulgare* (Ouled Askeur) après séchage

Figure 23 : Photo des plantes médicinales sélectionnées.

La Figure 24 suivante montre la répartition des forêts de la wilaya de Jijel et les stations de récolte des plantes de l'étude.

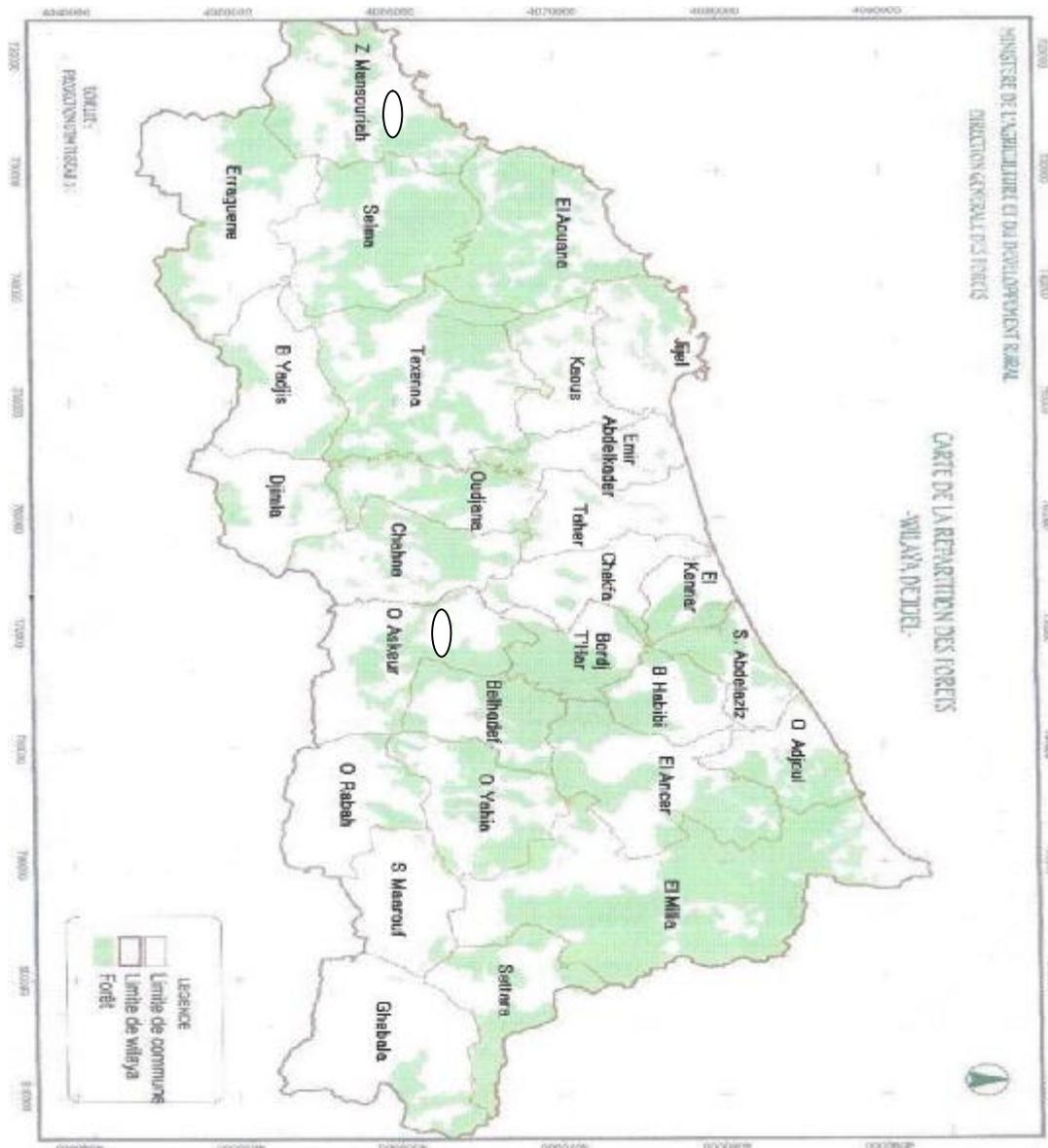


Figure 24 : Carte de la répartition des forêts (en vert) de la wilaya de Jijel et site de récolte des plantes médicinales. ○ Indique le site de récolte

Le parc National de Taza (Figure 25) a été classé Réserve de Biosphère par l'UNESCO en Octobre (2004), au niveau desquels on dénombre plusieurs espèces protégées par la loi (Phase A., 2010). 435 espèces végétales ont été inventoriées dans le parc (sur environ 3139 espèces que compte le pays) en sus de 135 champignons et 147 plantes médicinales (Site officiel de la Wilaya de Jijel).

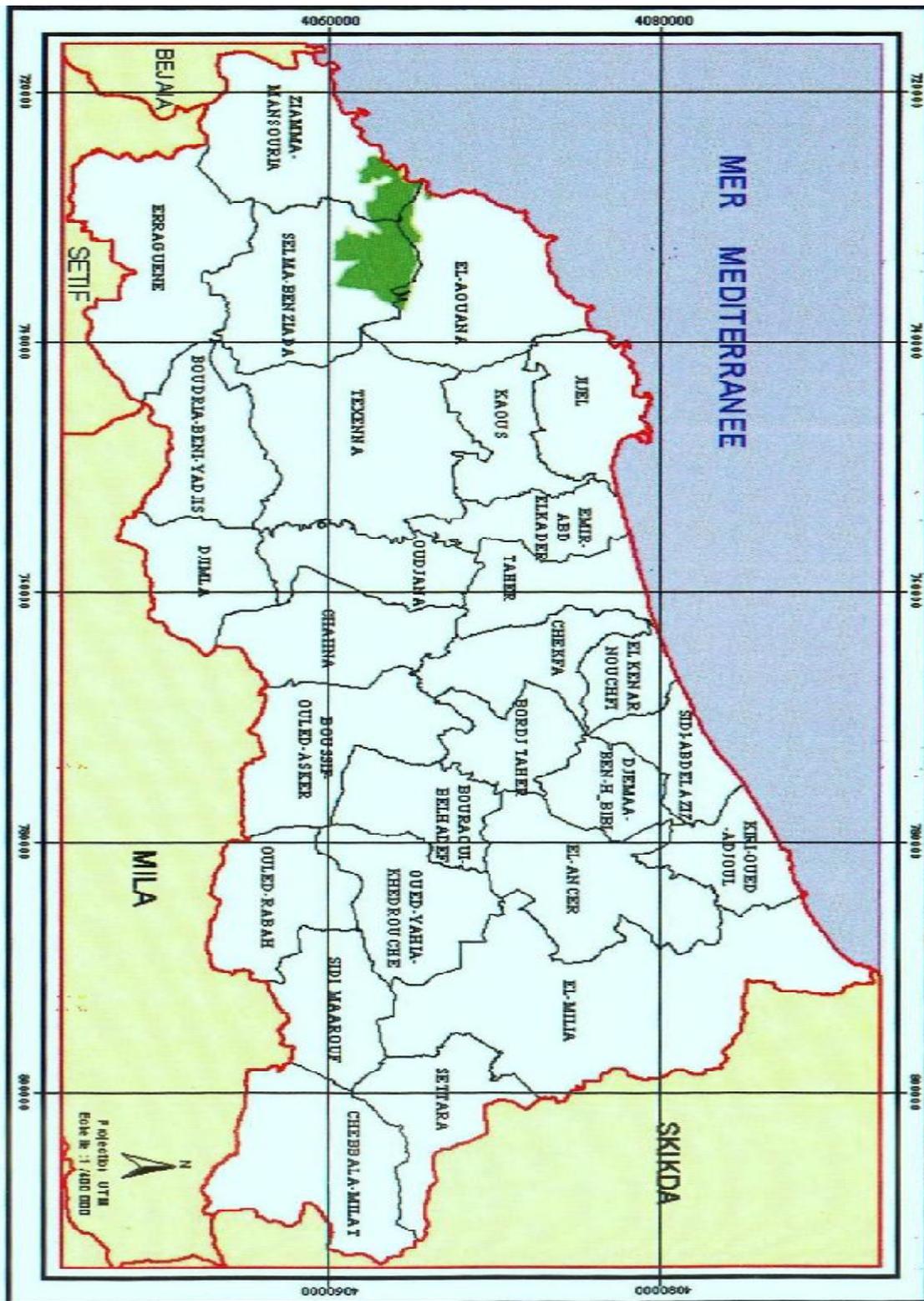


Figure 25 : Carte géographique montrant la situation générale du Parc national de Taza –Jijel-

2- Analyse phytochimique

2-1-Préparation des extraits

L'extraction des composés phénoliques des échantillons de céréales alimentaires et de plantes médicinales sélectionnées, a été réalisée par macération. Elle est basée sur le degré de la solubilité des composés phénoliques dans les solvants organiques. Elle comprend deux grandes étapes : la première phase est une extraction solide- liquide, basée sur la solubilisation des composés phénoliques dans le solvant et leur transfert vers ce dernier et la seconde est une extraction liquide- liquide. Cette dernière consiste au transfert sélectif de solutés présents initialement dans un solvant (phase aqueuse dans notre cas) vers un autre solvant non miscible.

Les solvants utilisés sont l'éthanol à 70% (2 fois) et l'acétone à 70% (1 fois) (pour l'ensemble son plus germe de blé). Le son d'orge a été traité uniquement par l'acétone à 70% (3fois).

Quant aux plantes médicinales, l'extraction a été faite par l'éthanol à 70% (3fois).

Le rapport solvant/matériel végétal était de (10/1 : ml/g) (Marston et Hotsmann, 2006). Cette macération se fait en trois jours successifs avec renouvellement du solvant chaque 24 heures. Ceci pour permettre une meilleure extraction des composés phénoliques.

Après filtration, les filtrats sont soumis à une évaporation à basse pression à 70°C (Rotavapor[®], Büchi B490) pour éliminer le maximum de solvant et de concentrer l'extrait. Ce dernier est laissé au réfrigérateur pendant 24heures, afin de décanter les cires, les boues, les lipides risquant de gêner la suite des opérations. La phase limpide a ensuite subit un lavage par l'éther de pétrole (v/v) (l'opération est répétée 3fois) pour se débarrasser encore des cires, des lipides et de la chlorophylle (cas des plantes médicinales) (Figure 26).

Après lavage, un volume de 10 ml d'extrait hydroalcoolique de chaque échantillon testé est récupéré et a subit une autre fois une évaporation à sec et a été solubilisé dans le méthanol pour nous donner l'extrait brut ou Totum.

Afin de séparer les composés phénoliques en fractions (Kebièche M. et *al.*, 2011) aglycones, monoglycosides et di-tri-glycosides, la phase aqueuse est mélangée avec :

- 1- L'éther diéthylique (v/v) : qui permet de soutirer les composés phénoliques simples, les flavonoïdes aglycones, et les aglycones méthoxylés.
- 2- L'acétate d'éthyle (AcOEt) (v/v) : pour les flavonoïdes aglycones mais surtout les monoglycosides.

- 3- Butanone ou méthyl éthyl cétone (MEC) (v/v) : pour récupérer notamment les flavonoïdes C-glycosylés, tanins monomériques, dimériques et trimériques.
- 4- La phase aqueuse (H₂O) finale : contient surtout les flavonoïdes glycosylés plus polaires.

Les différentes partitions entre solvants ou affrontements, se font dans des ampoules à décanter. La phase aqueuse et le solvant (v/v) sont mélangés énergétiquement en laissant sortir à chaque fois les gaz produits. Après un repos d'une heure et demi, on récupère séparément la phase eau et le solvant utilisé chargé de ses composés spécifiques. A l'exception de la fraction éther diéthylique qui s'évapore à l'air libre, les trois autres fractions récoltées sont concentrées par évaporation à basse pression à 70°C.

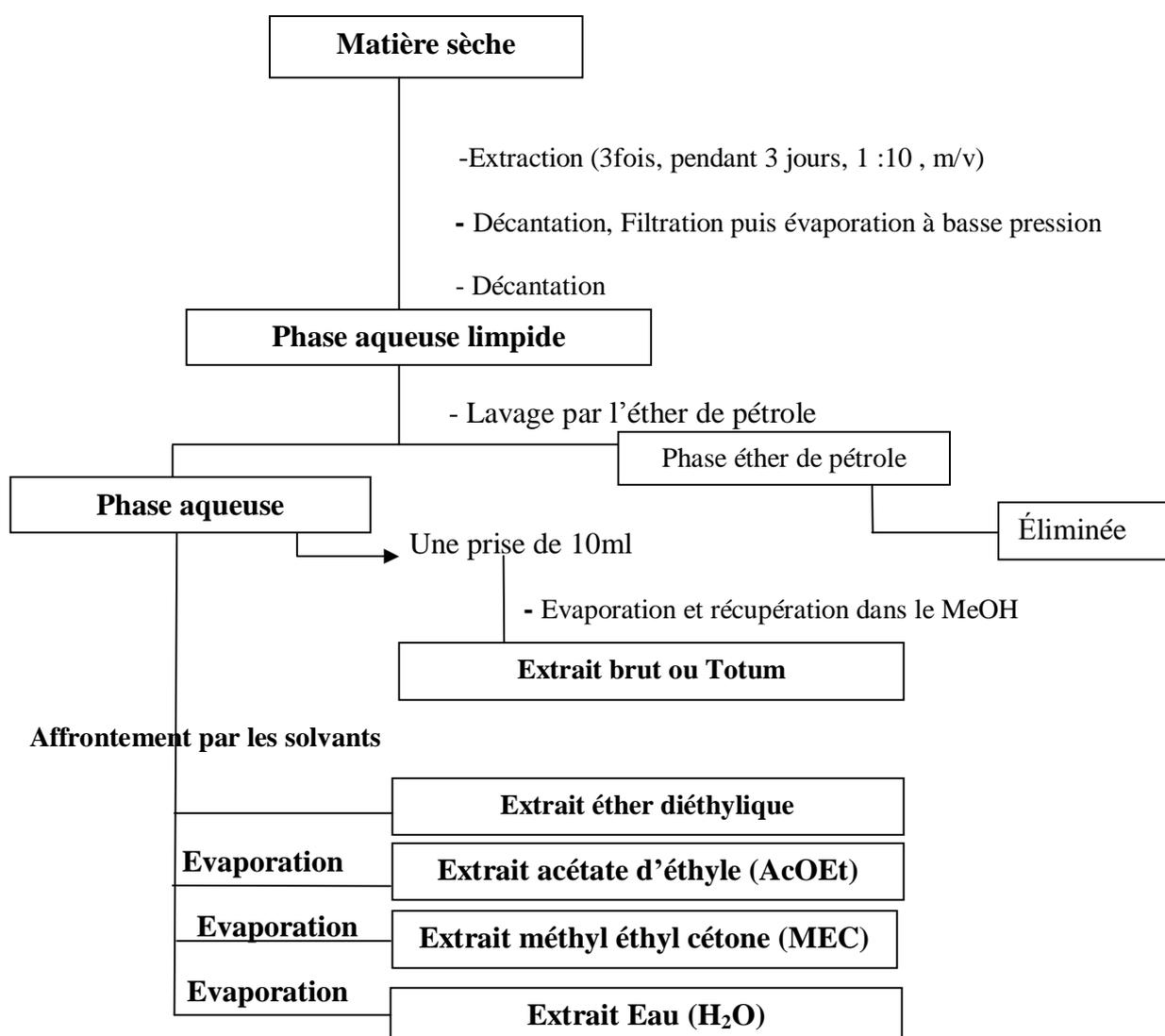


Figure 26 : Protocole d'extraction des composés phénoliques

2-2-Aspect quantitatif

2-2-1-Dosage des composés phénoliques totaux

Le contenu phénolique total des extraits a été estimé par une méthode spectrophotométrique avec le réactif de « Folin-Ciocalteu ». Le dosage des polyphénols totaux par ce réactif a été décrit par Singleton et Rossi, 1965.

Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène. La Figure 27 démontre le principe de la réaction de l'acide gallique avec le molybdène.

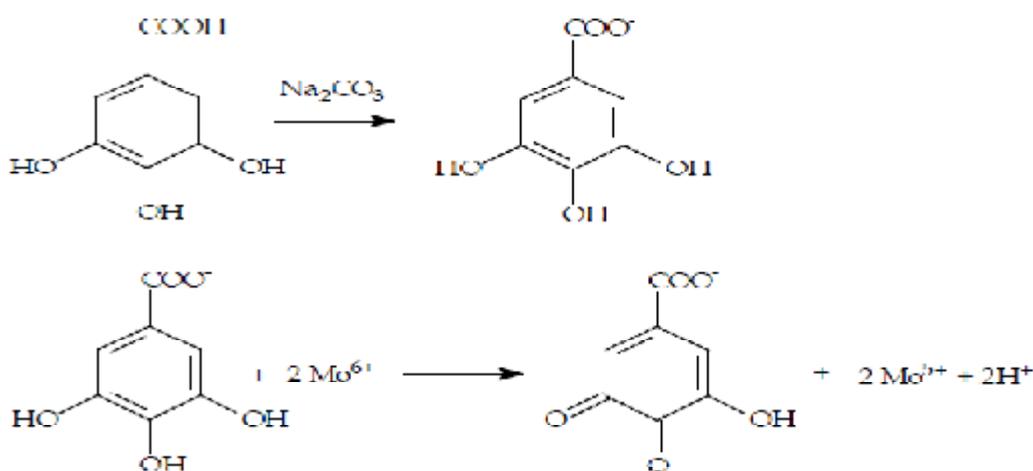


Figure 27 : Principe d'action de réactif de Folin-Ciocalteu avec l'acide gallique (adaptée à partir Oliveira et al., 2009).

La coloration produite, dont l'absorption maximum est compris entre 725 et 765 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Boizot N., Charpentier J.P., 2006).

Le dosage quantitatif a été réalisé selon la méthode de Zhu K.X. (2011) (Figure 28). Un millilitre (1ml) d'extrait préparé dans l'eau distillée (à une concentration de 1mg/ml pour les céréales alimentaires (Zhu K.X. et al. 2011) et 0,4mg/ml pour les plantes médicinales (Nickavar B. et Esbati N., 2012) a été mélangé avec 5 ml de réactif de Folin- Ciocalteu fraîchement préparé (dilué 10 fois). Après 10 minutes, 2 ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3) (75mg/ml) est ajouté au mélange réactionnel. Après 30 min d'incubation, l'absorbance est mesuré à 765nm avec un spectrophotomètre UV. Visible type Shimatzu 1601.

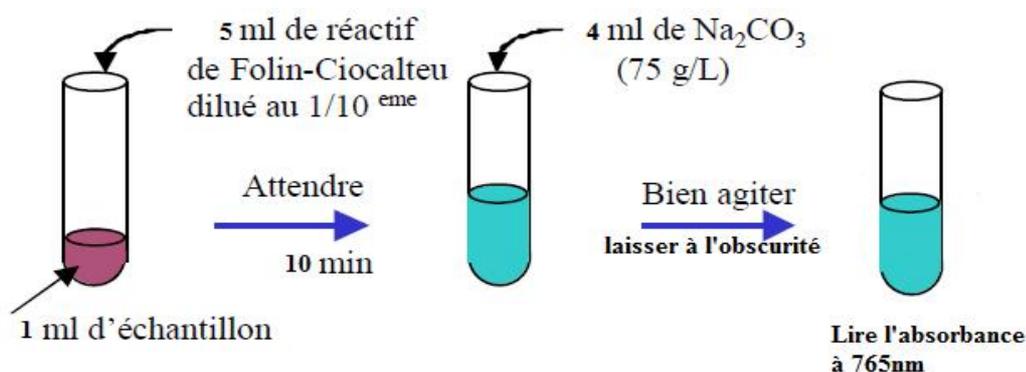


Figure 28 : Protocole suivi pour le dosage des composés phénoliques selon (Zhu et al., 2011)

La concentration des polyphénols totaux a été calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec de l'acide gallique (0-200 μ g/ml) et est exprimée en milligramme (mg) d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg d'EAG/g d'extrait)

Le contenu phénolique total (CPTs) est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{CPTs (mg/g)} = \frac{\text{CxV}}{\text{M}} \quad (\text{Nickavar B., Esbati N., 2012})$$

Où C, V, M sont la concentration de l'acide gallique établit à partir de la courbe d'étalonnage (μ g/ml), le volume de l'extrait (ml) et le poids de l'extrait (mg), respectivement.

2-2-2-Dosage des flavonoïdes totaux

Le contenu flavonoïdique total des extraits est mesuré par une méthode colorimétrique en utilisant le réactif de chlorure d'aluminium (AlCl_3). Ce réactif forme un complexe flavonoïdes- aluminium ayant un maximum d'absorption à 430nm (Djeridane A. et *al.*, 2006).

1ml de l'échantillon préparé dans le méthanol avec une concentration de 1mg/ml (cas des extraits de céréales alimentaires) et à 0,4mg/ml (Nickavar B., Esbati N., 2012) pour les plantes médicinales, est mélangé avec 1ml d'une solution méthanolique de chlorure d'aluminium (2%). Après 15min d'incubation, l'absorbance est mesurée à 430nm par un spectrophotomètre.

Les résultats sont calculés à partir d'une courbe d'étalonnage établit avec de la quercétine et exprimé en mg d'équivalent de la quercétine par g de l'extrait selon l'équation suivante :

$$\text{CFTs (mg/g)} = \frac{\text{C} \times \text{V}}{\text{M}} \text{ (Nickavar B., Esbati N., 2012)}$$

Où C, V, M sont la concentration de la quercétine établit à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml), le volume de l'extrait (ml), et le poids de l'extrait (g), respectivement.

2-3-Aspect qualitatif

2-3-1- La chromatographie sur couche mince (CCM) analytique

Mise au point fortuitement en (1938) par Ismailor et Shraiber qui ont constaté à la suite de la rupture de la colonne chromatographique que la séparation des composés se poursuivait à plat sur la paillasse du laboratoire. Actuellement, elle est réalisée sur une plaque en verre ou aluminium recouverte d'une fine couche de phase stationnaire.

La CCM devient la méthode de choix pour des séries d'analyses simples et peu coûteuses (Marston A. et Hostemann K., 2006). Elle est utile pour un dépistage d'extraits de plantes pour les substances phénoliques avant l'analyse détaillée par des techniques instrumentales telles que l'HPLC, l'MS, spectrophotomètre, en particulier parce que de nombreux échantillons peuvent être analysés simultanément (Knežević S.V. et *al.*, 2012).

2-3-1-1- Principe

La CCM est une technique de séparation des constituants d'un mélange complexe par entraînement à l'aide d'une phase mobile (solvant (s)) le long d'une phase stationnaire (gel de polyamide, gel de silice, alumine) maintenue sur une plaque en verre ou en plastique rigide, en se basant sur les phénomènes d'adsorption et de partage. La révélation se fait sous contrôle UV ou à la suite de pulvérisation de réactifs spécifiques pour les composés recherchés.

2-3-1-2- Mode opératoire

- Préparation des plaques

Les plaques (en verre) de 10x20 cm et 20x20cm ont été utilisées, placées l'une à côté de l'autre sur le support chromatographique, dégraissées au méthanol. L'étape suivante consiste à préparer le gel de polyamide DC6 (10g) dans 55ml d'éthanol (pour préparer 10 plaques), le mélange est versé immédiatement dans l'étaleur qui a été déjà placé à l'extrémité des plaques. Etaler uniformément à vitesse constante. Enfin, laisser les plaques jusqu'à leur séchage à l'air libre (à peu près une journée).

- *Choix de la phase mobile*

Lors du choix de la phase mobile pour le développement des plaques de CCM, il est important de s'assurer que le solvant ne réagit pas chimiquement avec les substances du mélange à analyser (Mendham et *al.*, 2006).

Après plusieurs essais le système solvant qui montre une bonne séparation des molécules a été retenu :

Ø Pour les extraits bruts et les autres fractions de céréales alimentaires :

Le système : Toluène/MeOH/MEC/Butanol (30 :20 :15 :0,3 ; v/v/v/v)

Ø Pour les extraits bruts et les autres fractions de plantes médicinales :

Le Système : MEC/MeOH/Ethanol/Ether de pétrole (40/30/30/10)

Ø Pour les phases eau des plantes médicinales :

Le système : H₂O/Butanol/EtOH/HCOOH (50/20/25/2 ; v/v/v/v).

- *Dépôts*

Le dépôt des échantillons à séparer est l'étape la plus délicate. Il s'effectue à l'aide d'un capillaire. On dépose de façon perpendiculaire quelques microlitres d'échantillon (Figure 29) et on sèche (pour éviter la diffusion de la tache) et évaporer le solvant. On répète l'opération plusieurs fois.

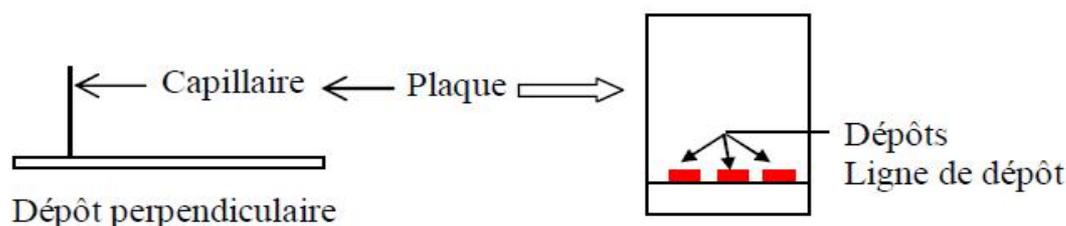


Figure 29 : Méthode de dépôts lors d'une CCM analytique.

- *Développement des plaques*

On place la plaque dans la cuve saturée en vapeur de solvants à l'avance et contenant l'éluant. Le solvant monte par capillarité, et les différents constituants de l'échantillon déposé migrent avec des vitesses différentes. Dans le cas idéal on obtient autant de tâches que les constituants sur le trajet de migration de solvant (Figure 30). Lorsqu'il arrive presque en haut de la plaque on sort celle-ci de la cuve et on laisse l'éluant s'évaporer. La durée de développement dépend de la phase mobile, de la taille de la plaque et de la température.

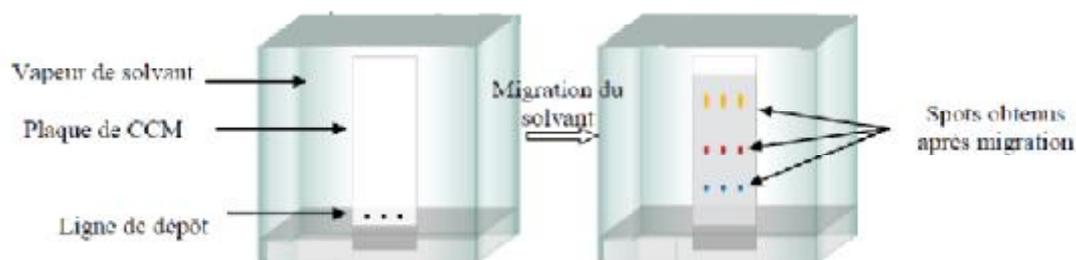


Figure 30: Migration des constituants de l'extrait lors d'une CCM analytique

- **Révélation (Visualisation des tâches) :**

Après le développement et l'évaporation du solvant de migration les tâches sont visualisées :

- Ø A l'œil nu
- Ø Sous l'UV à 365nm
- Ø Avant et après pulvérisation du Réactif de Neu .

ü Réactif de Neu

Le réactif de Neu ($C_{14}H_{16}BNO$) ou 2-aminoéthyl diphenyl borate (Naturstoff reagent A) (Figure 31) est un colorant fluorescent utilisé en chromatographie sur couche mince, en l'histologie végétale et dans la culture cellulaire pour améliorer et amplifier l'auto-fluorescence des polyphénols particulièrement ceux des flavonoïdes (Grünz G. et *al.*, 2010). En fonction de la substitution avec des groupes hydroxyles sur le cycle B et C, les flavonoïdes et le réactif Naturstoff forme un chélate avec une fluorescence caractéristique.

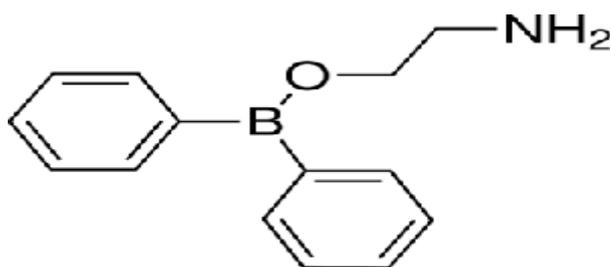


Figure 31 : Structure de 2-aminoéthyl diphenyl borate (réactif de Neu) (Grünz G. et *al.*, 2010)

ü Mode opératoire

Vaporiser une solution méthanolique du réactif de Neu 1% sur les plaques de CCM. Les flavonoïdes apparaissent sous forme de tâches fluorescentes. Selon la couleur obtenue nous avons identifié le type de flavonoïde (Stahl E., 1969)

- Ø Les dérivés d'apigénine présentent une couleur fluorescente sous UV jaune-verdâtre et après 24 heures, leurs couleurs à la lumière visible virent au rouge- brun.
- Ø Les dérivés de lutéoline présentent une couleur fluorescente sous UV jaune.
- Ø Les dérivés de kaempférol présentent une fluorescence sous UV jaune verdâtre plus intense que celle des dérivés d'apigénine.
- Ø Les dérivés de quercétol présentent une couleur fluorescente sous UV orange intense.

2-3-1-3-Appliquatiions

Parmi les multiples applications que possède la CCM, on s'intéresse dans cette étude aux qualitatives. La fluorescence sous lumière UV ainsi que la valeur du R_f (rapport frontal) accessible immédiatement à l'examen du chromatogramme apportent des informations sur la structure du composé flavonique.

- Relation fluorescence-structure

L'examen en lumière ultraviolet est certainement le procédé le plus utilisé pour la détermination de la structure (Lahouel M., 2005). Il fournit des informations très importantes sur la configuration structurale mais aussi les substituants sur les squelettes des molécules isolées. Le Tableau 05 ci-dessous montre les relations existantes entre la structure d'un composé flavonique et sa fluorescence sous UV.

Tableau 05 : Détermination de la structure des flavonoïdes par l'interprétation de leurs fluorescences (Lahouel M., 2005).

Spot coloré	Type de flavonoïdes
Noir	Flavonols 5,6,7 tri- OH libres Flavonols 5,7,8 tri- OH libres
Brun-noir	3-OH absent ou 3- OH substitué
violet	Flavones 5- OH et 4'- OH Flavones 3-OR et 5-OH, 4'-OH Flavones 6- ou 8-OH Chalcones, isoflavone, dihydroflavonols, flavonones
Bleu-clair (fluorescent)	Flavones sans 5-OH libres Flavonols sans 5-OH libre avec 3- OH substitué

Jaune terne, jaune, fluorescence orangée	Flavonols 3-OH libre avec ou sans 5- OH libre
Jaune vert brillant	5-OH libre ou 5-OH substitué
Jaune fluorescent	Flavonols avec 3-OH libre, aurone, chalcone, flavanones
Jaune pâle	dihydroflavonols

- *Relation Rf- structure*

Le facteur de rétention (Rf) apporte aussi des informations sur la structure des polyphénols. Le facteur de rétention est calculé d'après la relation suivante :

$$Rf = \frac{\text{Distance entre la ligne de base et la tache du produit}}{\text{Distance entre la ligne de base et le front de solvant}}$$

Sachant que la valeur du Rf n'est pas une constante physique du corps, car elle est influencée par plusieurs facteurs, tels que la nature du solvant, la technique employée, la température ainsi les différents substituants et leurs positions sur le squelette flavonique (Tableau6).

Tableau 06: Relation entre Rf- Structure flavonique (Akroum S., 2011)

Structure flavonique	Rf
Augmentation des OH	Diminution du Rf dans un solvant lipophile
Glycosylation	Rf augmente dans un solvant aqueue Rf diminue dans un solvant alcoolique
Hydroxyles méthylés	Rf augmente dans un solvant alcoolique
Méthylation d'un OH en C5	Rf diminue dans un solvant alcoolique
Hétérosides de flavones avec 3- OH libre	Rf nul dans l'eau

2-3-2-La chromatographie sur couche mince bidimensionnelle (2D-TLC)

2-3-2-1-Principe

Dans cette technique, la séparation est réalisée sur une plaque carrée (20x20). On dépose la tache du mélange des solutés à proximité d'un coin de la plaque et l'on développe d'abord le chromatogramme par un premier mélange de solvants. Cette opération terminée on retire le chromatogramme de la chambre de développement, on le sèche et on le tourne de 90°, de telle façon que la ligne des taches séparées devient la nouvelle ligne de dépôt. On

effectue alors un nouveau développement du chromatogramme par un second mélange de solvants. On réalise ainsi une bonne séparation sur toute la surface carée de la plaque chromatographique (Figure 32).

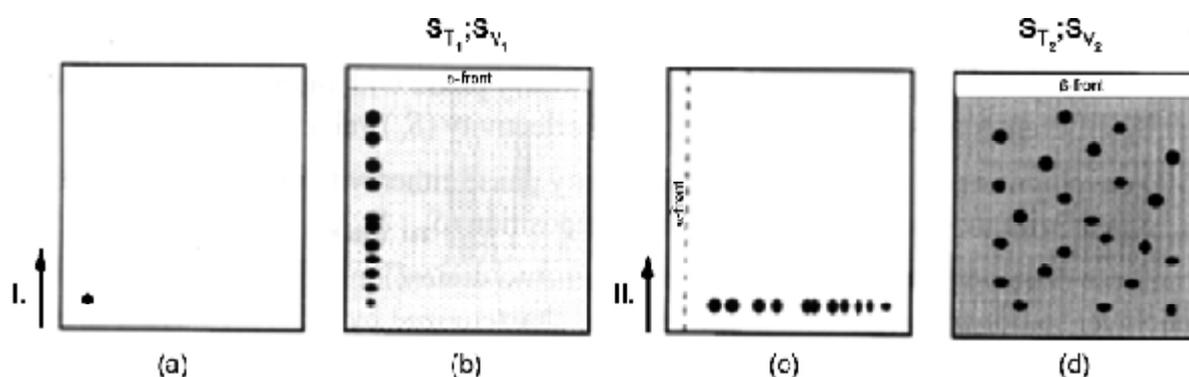


Figure 32 : Représentation schématique globale de la chromatographie bidimensionnelle sur un adsorbant

-(a) Echantillon au coin d'une plaque de chromatographie -(b) Développement de la plaque dans la première direction avec le premier éluant -(c) séchage de la plaque

-(d) Développement de la plaque dans la deuxième direction perpendiculaire à la première avec le deuxième éluant (Ciesla L., Hajnos M.W., 2009)

2-3-2-2-Mode opératoire

Ce type de chromatographie est réalisé sur plaque de 20x20 de polyamide DC6 confectionnées au laboratoire. Les extraits concernés sont : l'extrait éther diéthylique, acétate d'éthyle, MEC pour chaque plante médicinale étudiée. On garde les mêmes systèmes de migration lors de la CCM analytique des plantes médicinales :

1^{ère} dimension : MEC/ETOH/MeOH/éther de pétrole (40/30/30/10 ; v/v/v/v)

2^{ème} dimension : H2O/Butanol/ETOH/acide formique (50/20/25/2 ; v/v/v/v)

Le premier solvant assure une dispersion en fonction de la nature de l'aglycone (nombre d'hydroxyle et nombre de méthoxyle) alors que le deuxième assure une dispersion en fonction du mode de conjugaison (nombre, position et nature des sucres).

L'un des avantages importants de la CCM bidimensionnelle est la bonne séparation de composés de substances très proches. Les multiples systèmes de détection permettent l'analyse de large gamme de composés ainsi des résultats visuels peuvent être facilement observés (Mendham et al., 2006).

2-3-3-La spectrophotométrie UV- Visible

2-3-3-1- Notions de base

Rappelons que les molécules qui présentent un spectre d'absorption UV/Visible sont celles qui absorbent des photons dont l'énergie correspond à des longueurs d'ondes se situant dans l'intervalle 190nm-800nm. Cette absorption correspond à une interaction des photons avec les électrons des couches externes des atomes ou des molécules ; les électrons passent alors d'un état fondamental à un état excité (Gavrilovic M. et *al.*, 1996).

2-3-3-2-Paramètres importants d'un spectre UV/Visible

Deux types de paramètres sont importants en spectroscopie UV/Visible : les longueurs d'ondes des maxima d'absorption (λ_{\max}) et les épaulements et l'intensité de leurs absorptions sont mesurées le plus souvent par la valeur de leur coefficient d'extinction molaire (ϵ) accessible par la mesure de l'absorbance (loi de Beer Lambert) (Burgot G., Burgot J.L., 2006)

En analyse structurale, l'ensemble du spectre est étudié et les deux types de paramètres ci-dessus sont utilisés pour identifier des groupements d'atomes voire d'identifier dans les cas les plus favorables la molécule.

En analyse quantitative, on choisit la longueur d'onde de préférence celle où l'espèce absorbe le plus et d'après la mesure de l'absorption on en déduit la concentration de la substance puisque la première est fonction de la seconde.

- Spectre UV/Visible et structure moléculaire

Ø Groupement chromophore

La présence de bande est liée à l'existence d'absorption UV/Visible de certains groupements fonctionnels dits « groupements chromophores » dans la molécule. Ils sont caractérisés par la présence constante dans leurs structures de liaisons multiples (Tableau 07).

Tableau 07 : Maximum de longueur d'onde (λ_{\max}) de quelques groupements fonctionnels

Chromophore	Exemple	Maximum de longueur d'onde (λ_{\max})
C=O aldéhyde	Acétaldéhyde	290
C=O cétone	Acétone	279
COOH	Acide acétique	208
COOR	Acétate d'éthyle	211

Aromatique	Benzène	255
------------	---------	-----

Ø Conjugaison

Le Tableau 07 montre qu'un seul chromophore n'amène pas obligatoirement l'apparition de bandes dans le visible voire dans l'UV proche. Lorsque dans une même molécule coexistent deux chromophores isolés, on constate que les caractéristiques d'absorption participent par un simple effet d'additivité (Gavrilovic M et *al.*, 1996).

Ø Quelques applications qualitatives de la spectrophotométrie sur les composés phénoliques

L'action des flavonoïdes dans les plantes résulte en partie de leur effet filtre et de leur forte absorption dans le domaine UV. Dans le méthanol neutre, les composés flavonoïdiques absorbent dans deux régions différentes du spectre ultra-violet entre 300 et 385 (Bande I), et entre 250 et 280 (Bande II) (Figure 33).

- ✓ La Bande I correspond à l'absorption du système cinnamoyle qui fait intervenir la conjugaison du groupement CO de l'hétérocycle central avec le noyau B.
- ✓ La bande II est associée à l'absorption du système benzoyle du noyau A, cette bande permet de connaître le nombre de substituant du noyau A (Lahouel M. et *al.*, 2004).

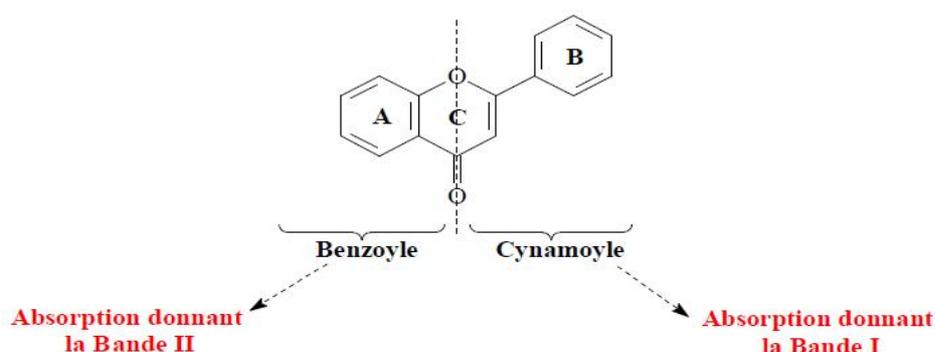


Figure 33 : Spectre d'absorption d'un flavonoïde

Suivant le nombre de doubles liaisons conjuguées sur la structure des flavonoïdes, ces bandes seront plus ou moins intenses. Il est ainsi facile de faire la différence entre des molécules aglycones à cycle C ouvert (chalcone, aurone) qui ont une bande II très réduite et les autres flavonoïdes à cycle C fermé qui possèdent une bande II beaucoup plus intense. Par contre, les isoflavones et les flavanones possèdent une bande I qui est généralement réduite à

un épaulement (Figure 34). Le Tableau 08 montre les principales classes de flavonoïdes et leur spectre d'absorption UV-visible.

Tableau 08 : Les principales caractéristiques des spectres UV-visible des flavonoïdes (Markham, 1982)

Bande II (nm)	Bande I (nm)	Types de flavonoïdes
250-280	304-350	Flavones
250-280	352-385	Flavonols
250-280	328-357	Flavonols substitué en 3
275-295	300-330	Flavanones et dihydroflavanol
270-280		Flavanols
230-270	340-390	Chalcone
230-270	380-430	Aurone
270-280	465-560	Anthocyane
245-275	310-330	Isoflavone

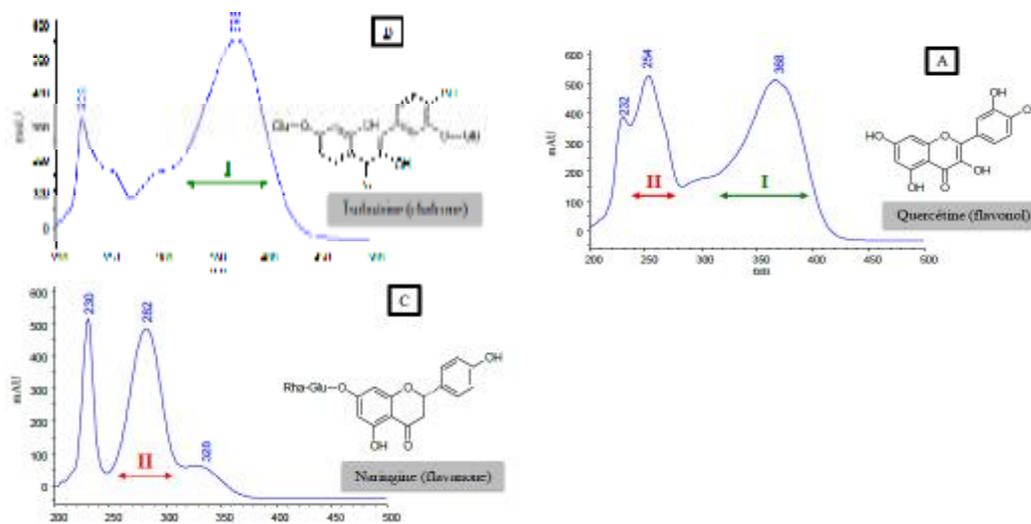


Figure 34 : Spectres UV-vis de la quercétine (flavonols) (A), de l'isobutrine (chalcone) (B) et de la naringine (flavanone) (C) enregistrés entre 200 et 500nm (Michel M., 2011)

Cependant, plusieurs facteurs peuvent affecter le spectre d'absorption des flavonoïdes. L'augmentation du nombre d'hydroxyle sur la partie aglycone provoque un déplacement bathochrome des bandes d'absorption vers les plus grandes valeurs (Tableau 09).

En absence d'hydroxyle en position 3, cas des flavones, la longueur d'onde de la bande I est plus courte de 20 à 30 nm. La méthylation comme la glycosylation, en particulier sur les hydroxyles en position 3, 5, 7, 4' provoquent un déplacement hypsochrome vers les longueurs d'ondes plus courtes. Toutefois, la nature du sucre n'a généralement pas d'effet.

Tableau 09 : Relation entre l'arrangement des groupements hydroxyles et le maximum d'absorption (Rice-Evans C.A. et al., 1996)

Flavonoïdes	Arrangement du OH	Position des bandes
Flavonols		
Kaempferol	3, 5, 7, 4'	367 nm
Quercétine	3, 5, 7, 3', 4'	371 nm
Myricétine	3, 5, 7, 3', 4', 5'	374nm
Flavones		
Chrysin	5, 7	313nm
Apéginine	5, 7, 4'	337nm
Flavanones		
Naringinine	5, 7, 4'	289 (326sh) nm
Taxifolin	3, 5, 7, 3', 4'	290 (327sh) nm

De plus, l'ajout de réactifs tels que la soude (NaOH), l'acétate de sodium, l'acide borique, l'acide chlorhydrique provoquent les différents effets (bathochromique /hypsochromique ; hyperchromique/hypochromique) indiqués dans la Figure 35:

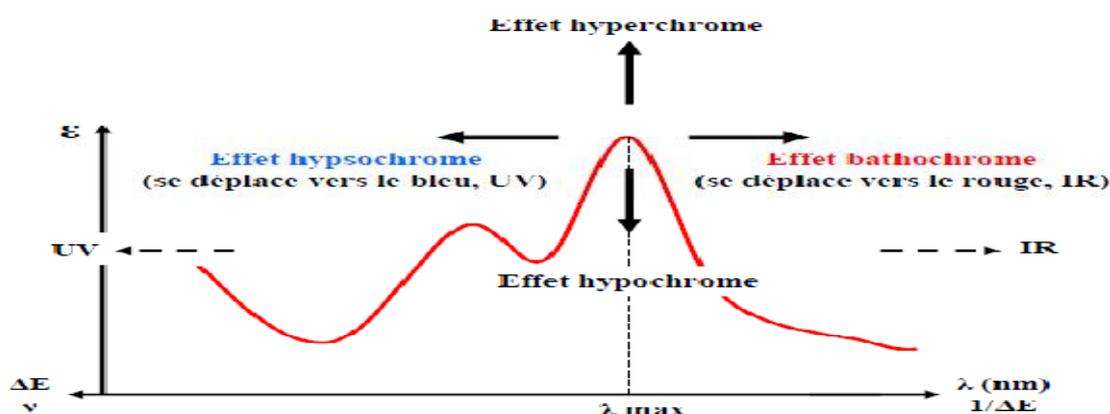


Figure 35 : Les différents déplacements possibles en présence des différents réactifs.

2-3-3-3-Séparation et identification structurale

Les méthodes chromatographiques appliquées pour faire la séparation des molécules flavoniques (sous leur forme native) sont de deux types :

- 1- La chromatographie préparative sur couche mince : cas des extraits de céréales alimentaires.
- 2- La chromatographie liquide sur colonne ouverte : appliquée pour les plantes médicinales.

Le choix de ces méthodes est basé sur la disponibilité des réactifs nécessaires.

2-3-3-3-1-Séparation et purification

- Chromatographie préparative sur couche mince (CCM préparative)

Cette méthode permet de séparer de manière très satisfaisante des quantités de substances inférieures à 1gr. Elle s'est faite sur les plaques en verre de 20x20 cm recouvertes par le gel de polyamide DC6, et la migration s'est faite sur le système solvant : Tol/MeOH/MEC/Butanol (30 :20 :15 :0,3 ; v/v/v/v).

L'échantillon à séparer est déposée non plus sous forme de tache, mais un trait épais continu obtenu par plusieurs dépôts successifs (Figure 36) .

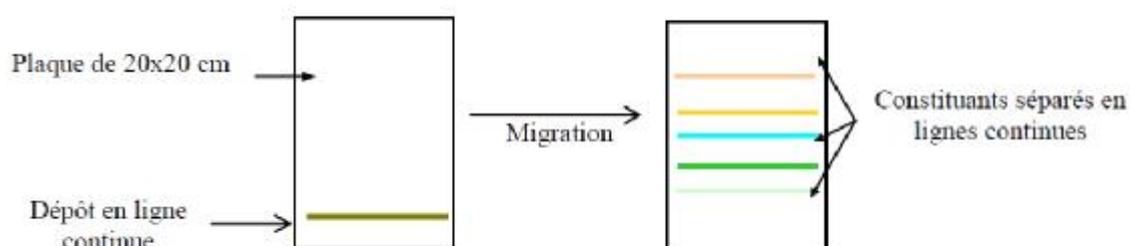


Figure 36 : Dépôt lors d'une CCM préparative

Les différentes bandes résultantes présentes sur le chromatogramme ont été délimitées sous lumière de Wood à 365nm dans une chambre noire, et cela selon leur fluorescence. Les valeurs des Rf ainsi que la fluorescence des bandes ont été enregistrées.

Les différentes bandes ainsi délimités sont ensuite grattées et dissoutes dans le méthanol afin de séparer les molécules de gel. La filtration des solutions obtenues s'est faite dans des seringues reliées à des filtres ayant des diamètres de 25µm. Ces dispositifs permettent de retenir le gel en laissant passer le méthanol chargé de polyphénols (Figure 37).

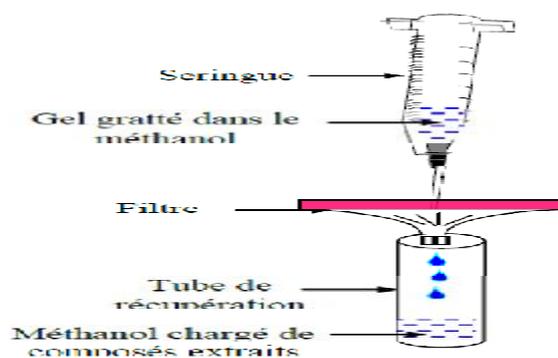


Figure 37 : Système de filtration

- **Chromatographie liquide sur colonne ouverte**

- **Principe**

Alors que les autres méthodes chromatographiques sont habituellement employées pour l'analyse et la séparation de très faibles quantités de produits, la chromatographie sur colonne peut être une méthode préparative ; elle permet, en effet, la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre plusieurs grammes. Elle présente cependant plusieurs inconvénients :

- Ø De grande quantité de solvant sont nécessaires à l'élution.
- Ø La durée de l'élution est généralement très grande.
- Ø La détection des composés exige une attention constante.

La chromatographie d'adsorption sur colonne est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire comme le gel de silice, la cellulose ou le polyamide, et une phase mobile constituée par divers systèmes de solvants comme éluant. La séparation est basée sur une différence de vitesse d'entraînement des composés chimiques vers le bas de la colonne.

- **Mode opératoire**

Une colonne en verre équipée d'un verre fritté et d'un robinet a été remplie avec du polyamide SC6 (dont la masse est d'environ 70g), la grosseur des grains est de (0,05-0,16mm) préalablement saturée dans le toluène (pendant une nuit).

L'extrait acétate d'éthyle (de *Calamintha grandiflora*) dissout dans le MeOH est mélangé à une petite quantité de gel de polyamide (pour colonne), l'ensemble est séché à l'air libre jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Cette dernière, est déposée très doucement à l'aide d'une pipette (délicatement de façon à ne pas déformer la surface de la phase stationnaire pendant cette opération).

La progression des substances dans la colonne est suivie sous lumière UV qui indique le parcours des molécules en fonction de leur couleur.

Le nombre de fraction pour chaque gradient est en moyenne de 4, et le volume de la fraction est de 100ml pour chaque gradient de concentration du mélange utilisé. Les fractions collectées sont évaporées à sec et récupérées dans le MeOH, afin de poursuivre l'analyse par chromatographie sur couche mince (Merghem R., 1995). Seules les fractions qui présentent un seul spot sont choisies pour l'analyse spectrale.

2-3-3-3-2-Analyse structurale des composés phénoliques « série spectrale »

Les molécules isolées ont été analysées par mesure de leur spectre d'absorption UV-Vis dans le MeOH, ainsi que leur déplacement bathochromique, hypsochromique, hyperchromique, suite à l'addition des réactifs spécifiques (Voin B., 1983).

Cette méthode est sensible car elle n'exige que peu de produit pour déterminer la nature des substituants sur le squelette flavonique de base.

Ø Spectre en présence de la soude

La soude (NaOH), base forte, ionise tous les hydroxyles phénoliques du squelette flavonique. Il en résulte un effet bathochrome général, plus marqué sur la bande I que sur la bande II. Ce réactif est utilisé principalement pour nous renseigner sur 3 positions de la molécule : 3, 4' et 7 (Bensegueni A., 1989).

Ø Spectre en présence d'acétate de sodium

L'acétate de sodium anhydre (NaOAc), est une base faible qui provoque l'ionisation des hydroxyles phénoliques les plus acides de la molécule, c'est-à-dire 3, 7 et 4'.

Ce réactif est utilisé essentiellement pour détecter la présence d'un hydroxyle libre ou substitué en position 7, lequel se manifeste sur la bande II du spectre enregistré. Il peut également nous renseigner sur la présence de dihydroxyle en 6,7 ou en 7, 8.

Ø Spectre en présence d'NaOAc et H₃BO₃

L'acide borique (H₃BO₃) en présence d'acétate de sodium chélate les hydroxyles phénoliques en position 3' et 4' sur la molécule, et de ce fait permet de nous renseigner sur la présence ou l'absence d'un système orthodihydroxylé sur le noyau latéral B.

Ø Spectre en présence de AlCl_3 et AlCl_3 plus HCl

La présence du chlorure d'aluminium (AlCl_3) dans la solution méthanolique mène à la formation de complexes entre les hydroxyles ortho du flavonoïde d'une part et les hydroxyles des positions 3 et 5 et la fonction carbonyle d'autre part. La formation de ces complexes se traduit par un effet bathochrome de la bande I par rapport au spectre pris dans le MeOH. Les complexes formés entre AlCl_3 et les groupes ortho- dihydroxyles des noyaux aromatiques A et B sont instables et se décomposent en présence d' HCl (Jurd L. et Horowitz R., 1962). Par contre, ceux formés entre AlCl_3 et les hydroxyles 5-OH ou 3-OH et la fonction carbonyle sont stables. Ces effets se manifestent sur le spectre UV par un déplacement hypsochrome de la bande I par rapport au spectre après addition de AlCl_3 et déplacement bathochrome moins important par rapport au spectre dans le MeOH.

Ø Mode opératoire

D'un point de vue pratique, tous les spectres ont été enregistrés sur un spectrophotomètre UV. /Visible modèle SHIMATZU, selon les consignes de Mabry et al. (1970), Markham K.R. (1981) et Mears et Mabry (1972). Le protocole est schématisé dans la Figure 38 et l'interprétation des résultats dans le Tableau 10:

✓ Première série :

- Solution méthanolique de densité optique voisine de 1 au maximum d'absorption.
- Addition à la cuve précédente d'une goutte d'une solution aqueuse de soude (NaOH) normale (N) ou N/10.
- Enregistrement du spectre instantanément, puis après 5min

✓ Deuxième série :

- Solution méthanolique.
- Addition d'acétate de sodium anhydre (AcONa) jusqu'à saturation (en moyenne 100mg).
- Addition d'une goutte d'une solution aqueuse d'acide borique (H_3BO_3) à 5%.

✓ Troisième série :

- Solution méthanolique
- Addition de 3 gouttes d'une solution méthanolique de chlorure d'aluminium (AlCl_3) 5% fraîchement préparée.
- Addition d'une goutte d'acide chlorhydrique (HCl) 50% ou normale.

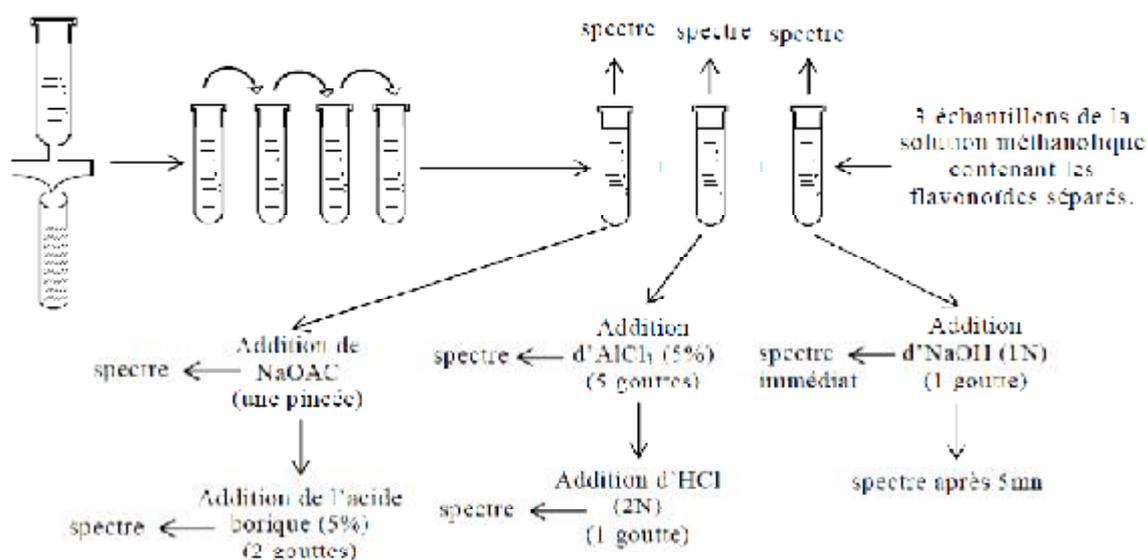


Figure 38 : Protocole de la série spectrale

Tableau 10 : Principales caractéristiques spectrales UV-Visible des flavonoïdes en présence des différents réactifs (Markham K.R., 1982).

Réactif	Déplacement en nm		Interprétation
	Bande I	Bande II	
MeOH	310-350	250-280	Flavones
	330-360	250-280	Flavonols (3 OH substitué)
	350-380	250-280	Flavonols (3OH libre)
NaOH	+45 à +60 de BI avec stabilité d'intensité		4'-OH
	+50 à 60 nm avec diminution d'intensité		3', 4' di OH
	Faible déplacement avec diminution d'intensité		4'-OMe
	Absence de pic entre 320-335		7-OR
	Apparition d'un pic entre BI et BII		7-OH
	Transformation de BI en une inflexion		5-OH libre
AlCl ₃	+20 à 45		5-OH
	+60		3-OH
AlCl ₃ +HCl /AlCl ₃	-30 à 45		3', 4'- di- OH
	-10		3', 4' -OH, OMe

	-20	3', 4', 5'- tri OH
AlCl₃+HCl/ MeOH	+17 à 55	5-OH
NaOAc/MeOH	+20 à 80 Déplacement très faible Diminution d'intensité avec le temps Spectre se décompose avec le temps	7-OH 7-OR 6,7 ; 7,8 ou 3', 4'- di OH 5, 6, 7 ; 5, 7, 8 ou 3, 3', 4'- tri- OH
NaOAc+H₃BO₃/MeOH	+12 à 36 +5 à 10	3', 4'- di OH 6, 7 ou 7, 8- di OH

2-4- La chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP)

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) est, de très loin, la technique la plus populaire, et la plus performante pour l'analyse des composés phénoliques que ce soit à des fins qualitatifs ou quantitatifs (Macheix J.J., et al., 2006). Depuis son introduction en 1971, la CLHP est utilisée pour la séparation de toutes les classes de composés phénoliques et des centaines d'applications ont été publiées. L'amélioration de l'instrumentation, les matériaux d'emballage, et la technologie des colonnes sont mises en place tout le temps, ce qui rend la technique de plus en plus attrayante (Marston A. and Hostettmann k., 2006).

2-4-1- Principe

La méthode de séparation utilisée fait appel aux mêmes éléments de base que ceux employés pour la chromatographie classique sur colonne, soit un ou plusieurs solvants et une colonne remplie avec une phase stationnaire, mais avec un appareillage plus sophistiqué. La grande différence par rapport à la chromatographie classique réside dans la durée d'élution. Cette vitesse est obtenue par l'application d'une pression élevée grâce à une pompe qui maintient constant le débit de l'éluant, elle se distingue également de la chromatographie classique par l'utilisation d'un détecteur dont le message est enregistré. La Figure 39 présente le système d'appareillage de CLHP essentiel.



Figure 39 : Principaux constituants d'un appareil HPLC

Les séparations sont basées sur les polarités respectives des phases stationnaires utilisées, du solvant d'éluion et des composés phénoliques concernés.

Le degré initial de purification de l'extrait végétal, les conditions chromatographiques elles mêmes et le type de détection utilisé en sortie de la colonne orientent fréquemment une analyse CLHP vers une classe de composés phénoliques (acides phénoliques, flavonols, anthocyanes, coumarines...).

Nos analyses HPLC ont été réalisées par le groupe *THERMO FICHER SCIENTIFIC* (Suisse). Elles concernent quelques extraits de céréales alimentaires (extrait éther, acétate d'éthyl), MEC et H₂O de l'ensemble son plus germe de blé.

Ø Les instruments utilisés

Chromatographie Liquide : UltiMate 3000

Pompe : DGP-3600RS

Injecteur automatique : WPS-3000SD

Four : TCC-3000SD

Détecteur : DAD-3000RS

Données sur le système chromatographique : Thermo Scientific™ Dionex™

Chromeleon™7. SR1

Ø Les conditions analytiques

- **Colonne :** Acclaim 120 C18, 3µm, 2.1x150mm P/N 059130
- **Eluant :** A : eau+ 0.1% d'acide acétique (v/v)

B : Acétonitrile

- **Débit** : 0.35mL/min
- **Pression du Système** : <215 bar
- **Détection** : UV
- **Longueurs d'onde** : 280, 326 et 340nm
- **Température** : 30°C
- **Le volume d'injection** : 0.5µL
- **Mode gradient** : A : eau +0,1% acide acétique (v/v)

B : Acétonitril

Le Tableau 11 résume le système solvant (type gradient) qui a été suivi :

Tableau 11 : Le système solvant (mode gradient) appliqué pour les analyses HPLC

Temps (min)	A (eau+0.1% acide acétique (v/v) (%))	B (Acétonitril) (%)
0.0	95	5
0.1	95	5
10.2	78	22
17.4	45	55
19.2	10	90
19.3	95	5
24.0	95	5

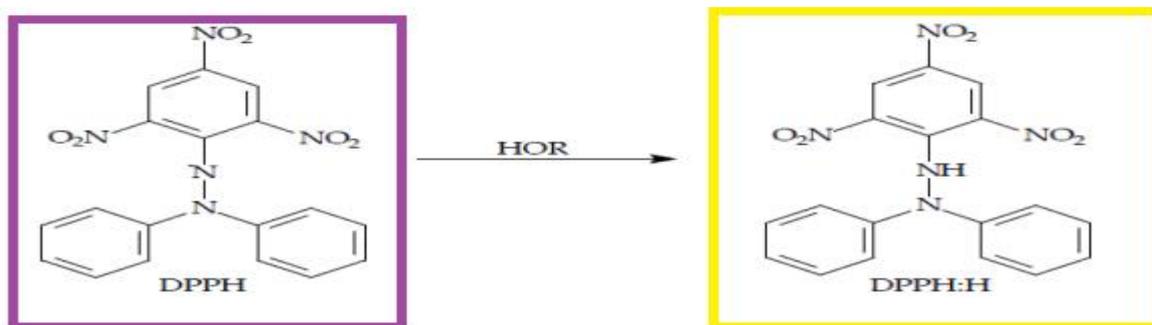
- **L'enregistreur** : Le logiciel Chromeleon 7, après programmation des paramètres d'acquisition, d'intégration et de calculs, gère l'acquisition de chromatogrammes, détecte et intègre les pics, effectue des calculs et sort pour chaque chromatogramme un rapport d'analyse comprenant le numéro et le temps de rétention (Tr).

3- Le pouvoir antioxydant « test au DPPH° »

La méthode de DPPH° a d'abord été décrite par Blois en 1958, et a ensuite été largement modifiée par de nombreux chercheurs (Pereira Nunes X et *al.*, 2012). Le DPPH° (1,1-diphényl -2- picrylhydrazyle) (C₁₈H₁₂N₅O₆; M= 394,33g/mole) est un radical libre stable, de couleur violette (Figure 40) qui réagit avec des composés qui peuvent donner un atome d'hydrogène, mais il est sensible à la lumière, à l'oxygène, au pH et à la nature du solvant utilisé (Schever R. et Godoy H. T., 2009).

3-1- Principe

Cette méthode est basée sur le principe que le DPPH° accepte un atome d'hydrogène (H) à partir d'une molécule scavenger par exemple un antioxydant, résultant une réduction du DPPH° en DPPH₂, un changement de la couleur (violette) en jaune, avec une diminution concomitante de l'absorbance à 515nm (Mishra K. et *al.*, 2012). Le degré de changement de la couleur est proportionnel à la concentration et à la puissance des antioxydants. L'activité antioxydante est ensuite mesurée par la diminution de l'absorbance à 515nm. Une grande diminution de l'absorbance du mélange réactionnel indique une activité significative du balayage du composé à l'essai (Pereira Nunes X., 2012).



1,1-diphényl 2- picrylhydrazyl (violet)

1,1-diphényl 2- picrylhydrazine (jaune)

Figure 40 : Forme libre et réduite du DPPH° (Pereira Nunes X., 2012)

3-2-Mode opératoire

- Préparation de la solution mère du DPPH°

Le DPPH est solubilisé dans le méthanol absolu (Mishra K. et *al.*, 2012) pour en avoir une solution de 0,1millimolaire (mM) (Zhu K.X., et *al.*, 2011).

- Préparation des solutions mères d'extrait à testé

Chaque échantillon avec son extrait brut et ses quatre fractions (éther diéthylique, acétate d'éthyle, MEC et eau) ont été préparés dans l'éthanol à 70% de telle façon à obtenir une concentration de 4mg/ml (cas des céréales alimentaires) (Karamac M. et *al.*, 2002) ou à 1mg/ml (cas de plantes médicinales). Cette dernière a été choisie d'après des essais préliminaires. Chaque solution mère a ensuite subi une série de dilution pour obtenir une gamme de concentration allant de (2- 0,125) mg/ml (cas des céréales) ou 0,5 à 0,0062 mg/ml (cas des plantes médicinales).

- *Méthodologie*

La méthode de Brand-Williams et *al.* (1995) a été suivie pour la réalisation de notre test. La méthode consiste à faire mélanger 0,1 ml de chaque extrait à tester avec 3,9 ml de la solution de DPPH°, le mélange est agité vigoureusement pendant quelques secondes. Celui-ci est laissé à l'obscurité pendant 30min. La mesure d'absorbance a été effectuée à 515nm en utilisant un spectrophotomètre type SHIMADZU UV-Visible (1601) contre le blanc correspondant.

Le contrôle positif est représenté par des solutions d'antioxydants standards : l'acide gallique, l'acide tannique et la quercétine dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons testés.

- *Expression des résultats*

Plusieurs paramètres peuvent être pris en compte pour faire la détermination de l'activité anti-radicalaire entre autre est de calculer la concentration efficace (EC₅₀ « efficient concentration »).

Ø **La concentration efficace (EC₅₀ « efficient concentration »)**

Pour obtenir la concentration efficace (EC₅₀) qui réduit la concentration initiale de DPPH° de 50%, les résultats sont exprimés en pourcentage (%) d'inhibition selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{Abs}_{t=0} - \text{Abs}_{t=30}}{\text{Abs}_{t=0}} \text{ (Mishra K. et al., 2012)}$$

Abs_{t=0} et Abs_{t=30min} correspondent à l'absorbance à 515nm du radical de DPPH° en absence et en présence de l'antioxydant respectivement.

La valeur EC₅₀ a été définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH°. Ou encore la concentration de l'échantillon exigée pour donner une diminution de 50% de la solution contrôle constituée de méthanol et de DPPH°. L'EC₅₀ a été calculée par la régression linéaire où l'abscisse est représentée par la concentration des composés testés et l'ordonnée par l'activité antioxydante en %.

Troisième Partie :
Résultats et Interprétations

Chapitre 1 :
Résultats et interprétation de la
partie des céréales alimentaires

1- Les céréales alimentaires

Ces dernières années, les recherches scientifiques ont été focalisées sur l'extraction des composés phénoliques à partir de nouvelles sources végétales peu coûteuses ou résiduelles des industries agro-alimentaires. Le résultat de plusieurs études (Ivanisova E. *et al.*, 2012 ; Vitaglione P. *et al.*, 2008 ; Liyana- Pathirana C.M., Shahidi F., 2007) confirme que les composés phytochimiques (composés phénoliques, vitamines, caroténoïdes, minéraux) d'intérêts bénéfiques à la santé des consommateurs se trouvent principalement dans le son et le germe des céréales. Les sous produits des minoteries de grains de céréales (son et germe de blé et le son d'orge) ont été ainsi choisis.

2- Analyse phytochimique

2-1- Préparation des extraits

L'extraction est une étape très importante dans l'isolement, l'identification et l'utilisation des composés phénoliques (Ignat I. *et al.*, 2011). Les méthodes d'extraction dépendent aussi bien du matériel végétal que des molécules recherchées. L'optimisation d'une procédure d'extraction des métabolites d'un organe donné est une démarche fondamentale, en effet, si un composé n'est pas extrait de l'échantillon, il ne pourra bien évidemment pas être identifié et dosé.

L'extraction par les solvants spécifiques à la température ambiante (macération) est la méthode la plus perfectionnée au niveau de notre laboratoire. Le choix du système solvant est en fonction de la polarité des composés d'intérêts, de la polarité des composés indésirables, du cout global et de la sécurité du manipulateur (Wang Y. *et al.*, 2008).

La préparation des extraits de céréales alimentaires a été faite par l'utilisation de deux types de solvants : l'éthanol et l'acétone à 70%. En effet, si on prend en considération la nature pariétale des sons de blé et en moindre partie le germe de blé, on a préféré l'utilisation d'éthanol suivi par l'acétone à 70%. En effet, l'acétone est un solvant plus puissant que les solvants hydro alcooliques pour l'extraction des composés phénoliques de poids moléculaires élevés. Concernant le son d'orge, l'acétone à 70% a été choisie. En effet, plusieurs références indiquent que l'acétone est le meilleur solvant pour faire l'extraction des composés phénoliques d'orge (Liu Q. et Yao H., 2007). Sachant que la solubilité des composés phénoliques est régie par le type de solvant (polarité) utilisé, le degré de polymérisation des composés phénoliques, ainsi que l'interaction avec les autres constituants et la formation des complexes insolubles (Nacz M. et Shahidi F., 2004).

L'étape suivante est le fractionnement (ou partition) par plusieurs solvants spécifiques de polarité croissante qui a pour but de simplifier un extrait brut en séparant ses molécules en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, c'est l'une des étapes clés qui va permettre de réduire la complexité du matériel de départ et donc faciliter l'identification des molécules actives. A la fin, un extrait brut, et quatre fractions successivement : éther diéthylique, acétate d'éthyle (AcOEt), méthyle éthyle cétone (MEC) et aqueuse (H₂O) ont été collectées pour chaque résidu testé qui vont subir les différents dosages, les évaluations et les déterminations structurales.

2-2- Aspect quantitatif

2-2-1- Dosage des composés phénoliques totaux

Les céréales alimentaires sont une source importante en composés bioactives dont les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes...), qui peuvent être le majeur contributeur à l'activité antioxydante, particulièrement des grains de céréales. Pour cette raison, le contenu phénolique de nos extraits de l'ensemble son plus germe de blé (pour les types) et celle de son d'orge, a été estimé.

Le contenu phénolique a été déterminé via le test de Folin-Ciocalteu et selon la méthode de Zhu K.X. (2011). D'après Huang et *al.* (2005), le test de Folin-Ciocalteu a été choisi pour doser les composés phénoliques pour les raisons suivantes :

- Ø C'est une méthode qui satisfait les critères de faisabilité et de reproductibilité.
- Ø La disponibilité du réactif de Folin-Ciocalteu.
- Ø La méthode est bien standardisée.
- Ø La grande longueur d'onde (765nm) d'absorption du chromophore permet de minimiser les interférences avec la matrice d'échantillon qui est souvent colorée.
- Ø C'est un test largement pratiqué dans les laboratoires de recherche des antioxydants alimentaires à travers le monde.

Le contenu phénolique total de nos extraits a été estimé à partir de la courbe d'étalonnage ($y=0,0114x+0,1606$, $R^2=0,9986$, y est l'absorbance ; x est la concentration de la solution d'acide gallique, $\mu\text{g/ml}$) (Annexe1), nos résultats ont été exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg d'EAG/g) (Tableau 12, Figure 41).

Tableau 12 : Le contenu phénolique des trois échantillons de céréales alimentaires

Extrait	Son plus germe de blé	Son plus germe de blé traité à la chaleur	Son d'orge
Brut	18,1±4,09	22,18±1,66	47±0,43
Ether	16,26±2,46	9,026±0,43	35,03±3,35
AcOEt	42,578±1,36	42,35±0,68	88,45±8,55
MEC	38,41±1,14	29,113±0,55	96,96±8,18
H ₂ O	13,76±1,79	23,26±3,19	41,91±2,29

Les valeurs représentent la moyenne de 2 à 3 mesures±Ecartype

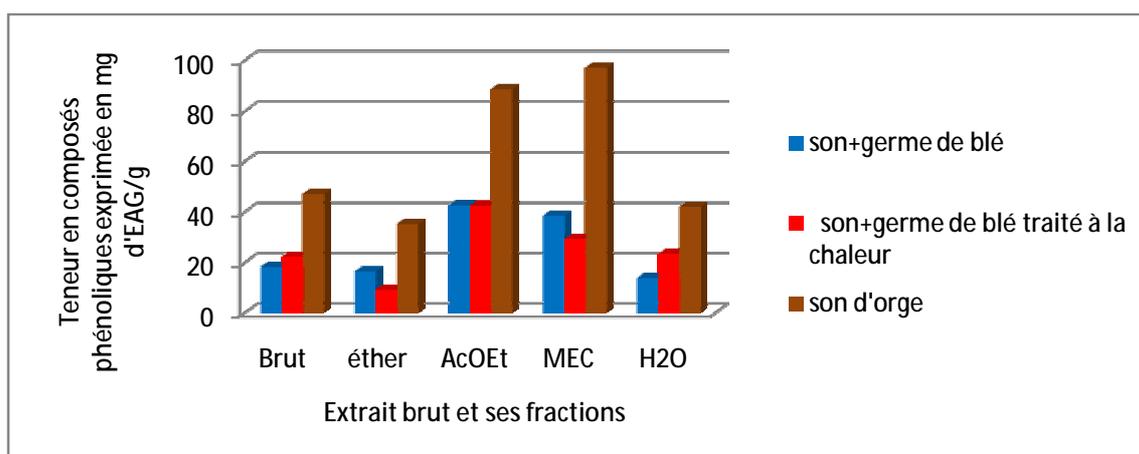


Figure 41 : Histogramme du contenu phénolique des trois échantillons de céréales alimentaires

D'après la Figure 41 et le Tableau 12, nous notons que la teneur en composés phénoliques totaux varie d'un échantillon de céréale alimentaire à un autre et d'un extrait d'une phase à une autre. Cette variation peut être expliquée dans les différences qui existent dans la composition chimique entre les tissus des végétaux.

Le son d'orge a été marqué par ses teneurs les plus élevées par rapport aux extraits de son et germe de blé (pour les deux types). L'extrait AcOEt et MEC du son d'orge sont les plus riches avec des teneurs respectives de 88,45±8,55 et 96,96±8,18 mg d'EAG/g d'extrait sec. Les extraits AcOEt et MEC de son et de germe de blé (pour les deux types) viennent par la suite avec des teneurs allant de 29,113±0,55 à 42,578±1,36 mg d'EAG/g d'extrait sec respectivement pour l'extrait MEC de son et de germe de blé traité à la chaleur et l'extrait AcOEt de son et de germe de blé. L'extrait éther de la farine de son et de germe de blé traité à la chaleur a une teneur plus faible en composés phénoliques : 9,026±0,43mg d'EAG/g d'extrait.

Par rapport aux extraits bruts, on peut classer ces trois échantillons de céréales alimentaires selon leur teneur en phénols totaux décroissant : le son d'orge est supérieur au son et germe de blé traité à la chaleur et presque égal au son et germe de blé. Ce classement est en accord avec les résultats de plusieurs chercheurs, dans lesquels l'orge est classé en premier dans leur teneur en composés phénoliques (Ivanisova E. et *al.*, 2012 ; Amarowicz R. et *al.*, 2007).

La teneur de l'extrait global de l'ensemble son et germe de blé et celle de la farine de son et germe de blé traité à la chaleur est proche à celle d'El Bedawey A.A. et *al.* (2010) : 18,5±0,66 mg d'acide tannique/g d'extrait sec et Kosinska A. et Karamac M. (2006) : 17,3 mg équivalent d'acide férulique/g d'extrait sec, et aussi à celle de Zhu K.X. et *al.* (2011) : 16,75±0,28 mg d'EAG/g d'extrait éthanolique (70%). Mais assez loin de celle de Karamac M. et *al.* (2002) : 7,6 mg équivalent catechin/g d'extrait et Ivanisova E. et ses collaborateurs (2012) qui ont trouvé une teneur élevée en composés phénoliques des extraits méthanoliques (80%) de germe de blé qui se situe entre 159,1±2.6 (en 2009) et 130,7±3.2 (en 2010) mg EAG/g d'extrait sec.

A propos du son d'orge, la teneur de l'extrait MEC de la présente étude est très proche à celle obtenu par Amarowicz R. et son équipe en (2007) : une concentration de 92mg d'équivalent de catéchin/g d'extrait. Par contre Ivanisova E. et *al.* (2012) ont obtenu un contenu phénolique de 291,7 et 232,9 mg d'EAG/g d'extrait de son d'orge respectivement en (2009) et (2010) qui sont très élevés par rapport à nos résultats.

2-2-2- Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de tri- chlorure d'aluminium (AlCl₃) suivant le protocole de Djeridane A. (2006). La quercétine a été utilisée comme standard et les valeurs ont été calculées selon la courbe d'étalonnage ($y=0,0123x+0,0453$; $R^2= 0,9891$; x est l'absorbance ; y est la concentration de la solution de la quercétine, µg/ml) (Annexe 1) et est exprimées en mg d'équivalent de quercétine /g d'extrait (mg d'EQ/g).

Tableau 13 : Le contenu en flavonoïdes des trois échantillons de céréales alimentaires

Extrait	Son plus germe de blé	Farine de son plus germe de blé	Son d'orge
Brut	13,06±1,61	9,36±1,32	24,27±3,1
éther	11,31±0,28	4,48±0,28	21,43±1,03
AcOEt	48±3,35	29,4±1,61	34,68±2,87
MEC	59,48±1,48	33,02±1,89	35,78±0,4
H₂O	8,67±0,11	8,91±1,26	18,58±0,45

Les valeurs représentent la moyenne de 2 à 3 mesures \pm Ecartype

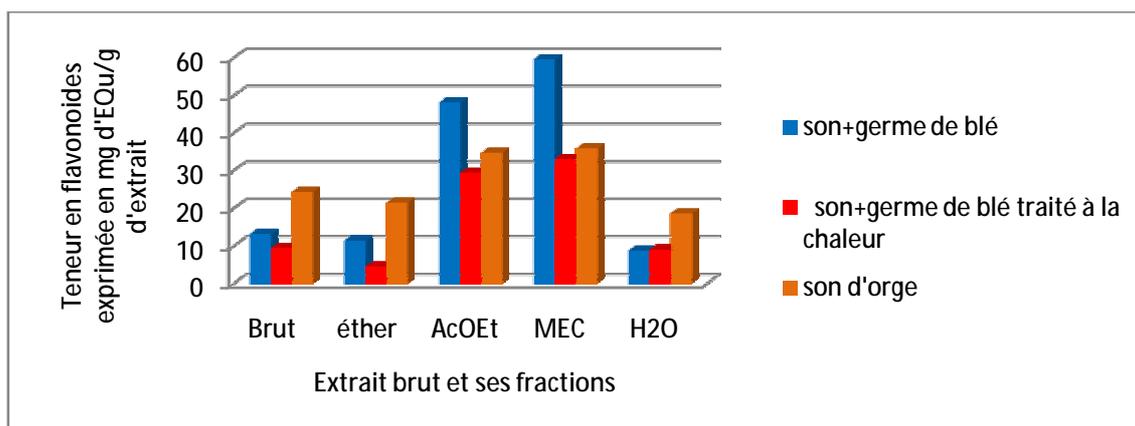


Figure 42 : Histogramme du contenu en flavonoïdes des trois échantillons de céréales alimentaires.

D'après l'histogramme (Figure 42) et le Tableau 13, le contenu en flavonoïdes est différent en fonction de la nature de l'échantillon et du solvant d'extraction. L'échantillon du son et germe de blé (Extrait AcOEt et MEC) a été marqué par le contenu élevé en flavonoïdes : $48 \pm 3,35$ et $59,48 \pm 1,48$ mg d'EQ/g d'extrait, ces teneurs sont plus élevées par rapport à leurs teneurs en composés phénoliques. Les extraits MEC de la farine son et germe de blé et de son d'orge ont des teneurs presque identiques $33,02 \pm 1,89$ et $35,78 \pm 0,4$ mg d'EQ/g respectivement. La teneur la plus faible est enregistrée pour l'extrait éther de la farine de son et germe de blé : $4,48 \pm 0,28$ mg d'EQ/g d'extrait. Les teneurs des extraits eau de son et germe de blé (pour les deux types) sont presque identiques : $8,67 \pm 0,11$ et $8,91 \pm 1,26$ mg d'EQ/g d'extrait sec respectivement pour la phase aqueuse de son et germe de blé et son et germe de blé traité à la chaleur.

El Bedawey A.A. et *al.* (2010) ont trouvés une teneur de $1,14 \pm 0,23$ mg d'EQ/g d'extrait de germe de blé, alors que Ivanisova E. et son équipe (2012) ont rapporté une teneur de $0,93 \pm 0,15$ mg d'EQ/g de germe de blé (en 2009) et $1,11 \pm 0,02$ mg d'EQ/g (en 2010) ; et pour le son d'orge : $2,14 \pm 0,07$ mg d'EQ/g d'extrait (en 2009) et $2,35 \pm 0,05$ mg d'EQ/g d'extrait (en 2010).

Cette différence entre nos résultats et celles de la littérature sur le contenu phénolique et particulièrement en flavonoïdes trouvent ses originalités dans :

- L'association du contenu phénolique total et en particulier à celle des flavonoïdes avec le génotype de la graine (Vaher M. et *al.*, 2010 ; Verma B. et *al.*, 2009 ; Stalikas C.D., 2007).

- L'influence des conditions environnementales (climat, rayon UV.) dans l'expression du phénotype phénolique (Moore et *al.*, 2006).
- Vaher et son équipe (2010) ont prouvés l'influence des conditions de la croissance sur la biosynthèse et l'accumulation des composés phénoliques dans les céréales.

2-2-3- Corrélation entre le contenu phénolique –flavonoïdes

Les courbes ci-dessous représentent la corrélation entre le contenu phénolique (en abscisse) et le contenu en flavonoïdes (en ordonné) (Figure 43). Une corrélation linéaire et fortement significative a été trouvée pour les trois échantillons. Une corrélation de 91% pour les extraits de son plus germe de blé (A), 66% pour les extraits de son plus germe de blé traité à la chaleur (B) et 94% pour celles de son d'orge (C).

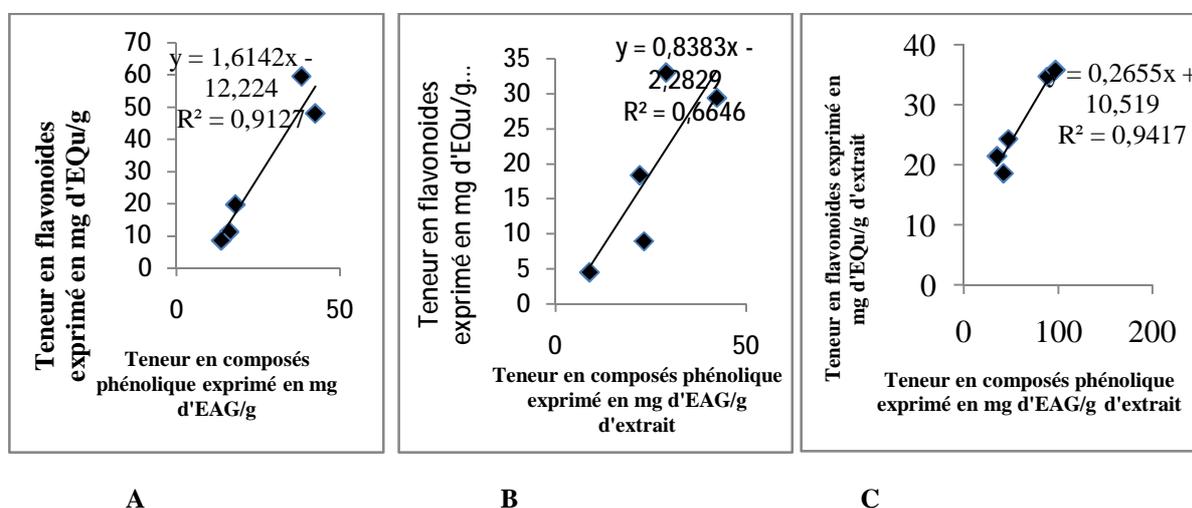


Figure 43: Corrélation contenu phénolique-flavonoïdes des différents extraits de céréales alimentaires (A : pour le Son plus germe de blé, B : farine de son plus germe de blé traité à la chaleur, C : le son d'orge).

Ceci confirme que les flavonoïdes représentent effectivement les composés majoritaires des polyphénols.

2-3- Aspect qualitatif

2-3-1-Diagnostic sur chromatographie analytique sur couche mince

La CCM analytique est une méthode simple, couramment utilisée dans les laboratoires de phytochimie pour la séparation et l'identification rapide des constituants d'un extrait donné avant l'analyse détaillée par d'autres techniques instrumentales.

Les plaques de CCM utilisées sont des plaques de verre constituées de gel de polyamide DC6. La chromatographie sur polyamide des phénols est basée sur la formation réversible de

liaisons hydrogène de différentes intensités entre d'une part les groupes amides du polyamide et d'autre part l'échantillon et l'éluant. Les éluants qui conviennent le mieux sont ceux qui réussissent à rompre les liaisons hydrogène entre le substrat et l'adsorbant.

Des difficultés ont été trouvées pour atteindre une séparation satisfaisante à l'analyse des constituants du dépôt. Plusieurs systèmes solvants ont été essayés et le meilleur a été gardé : Tol/MeOH/MEC/Butanol (30 :20 :15 :0,3 ; v/v/v/v).

Ø *L'analyse chromatographique des extraits de son plus germe de blé*

La Figure 44 présente les chromatogrammes CCM résultants de l'analyse des cinq extraits (éther diéthylique (E), acétate d'éthyle (A), MEC (M), eau (H₂O) et le totum (T)) de l'ensemble son et germe de blé (pour les deux types). La révélation a été faite dans une chambre noire sous UV à 365 nm avant et après révélation au réactif de Neu.

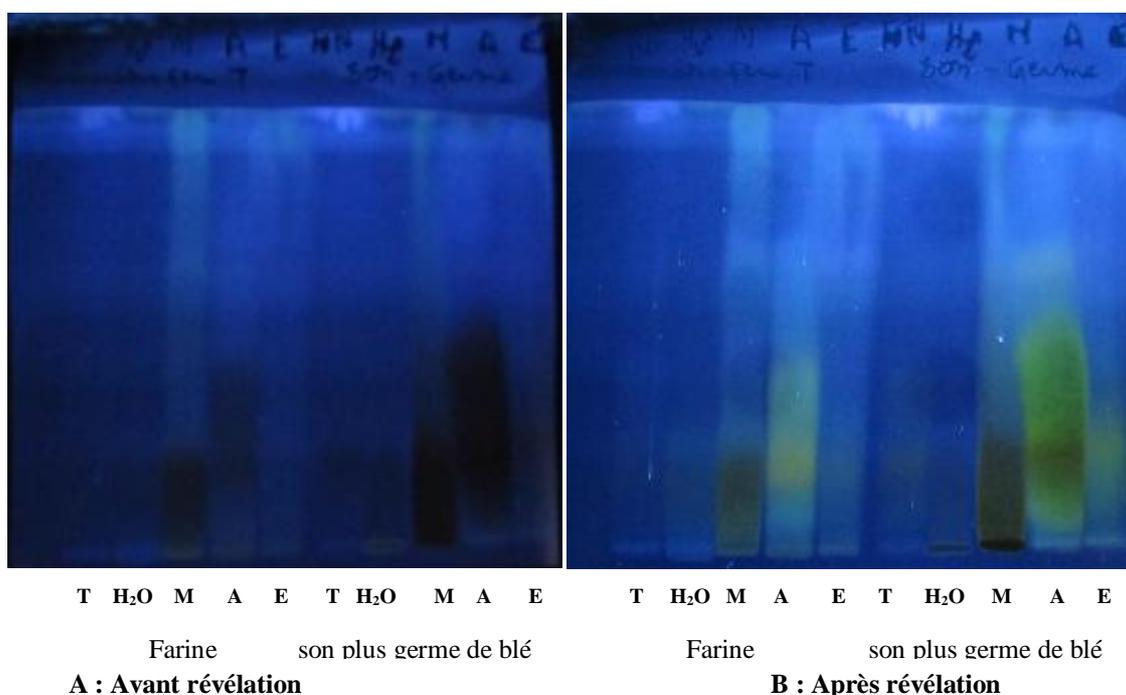


Figure 44 : chromatogrammes résultants de l'analyse des différents extraits de l'ensemble son plus germe de blé par chromatographie sur gel de polyamide DC6 développés dans le système solvant Tol/MeOH/MEC/Butanol (30 :20 :15 :0,3 ; v/v/v/v)

Nos extraits du son plus germe de blé (pour les deux types) analysés par la CCM présentent (sous UV à 365nm, avant révélation) des taches sombres, de couleur violette-noir, ce qui dévoile la richesse de nos extraits en composés phénoliques et particulièrement en flavonoïdes. La couleur violette-sombre nous permet de supposer (d'après Lahouel M., 2005) que ce sont principalement des flavones. Après la pulvérisation du réactif de Neu, nos

molécules réagissent positivement au réactif, par le virage de la couleur au jaune (cas de l'extrait AcOEt) et au jaune marron pour le cas de l'extrait MEC (sous UV) et apparaît rouge à l'œil nu, donc on est sûrement devant des flavonoïdes et probablement en dérivés d'apigénines.

Cette richesse est plus marquée pour les extraits d'AcOEt et MEC de son et germe de blé. Cette constatation est en accord avec les résultats du dosage quantitatif (Folin-Ciocalteu et AlCl_3), dans lesquels ces deux extraits (AcOEt et MEC) sont ceux qui présentent les teneurs les plus élevées. Mais la séparation n'a pas donné de spots bien distingués, témoignant la complexité de nos molécules.

Ø *L'analyse chromatographique (CCM) des extraits de son d'orge*

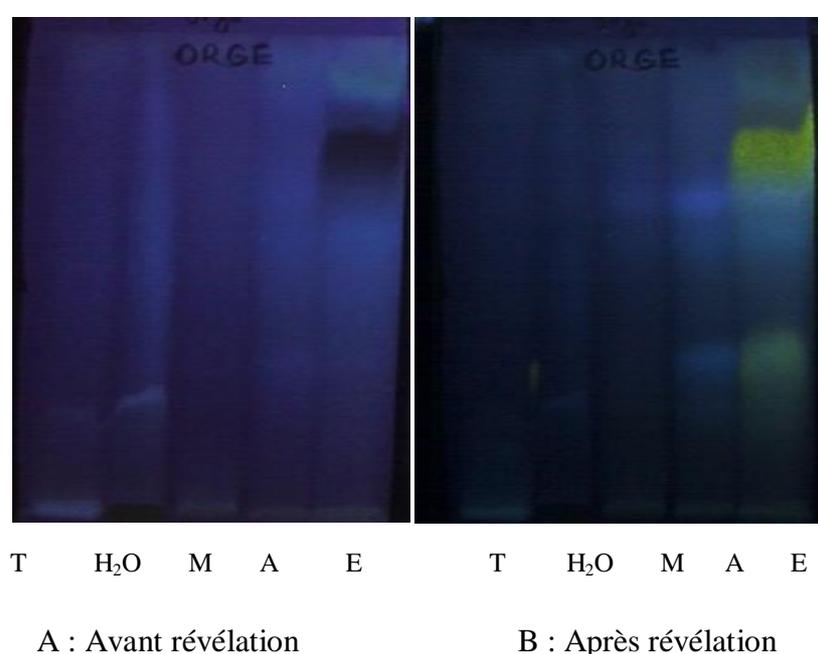


Figure 45 : chromatogrammes résultants de l'analyse des différents extraits de son d'orge par chromatographie sur gel de polyamide DC6 développé dans le système solvant Tol/MeOH/MEC/Butanol (30 :20 :15 :0,3 ; v/v/v/v).

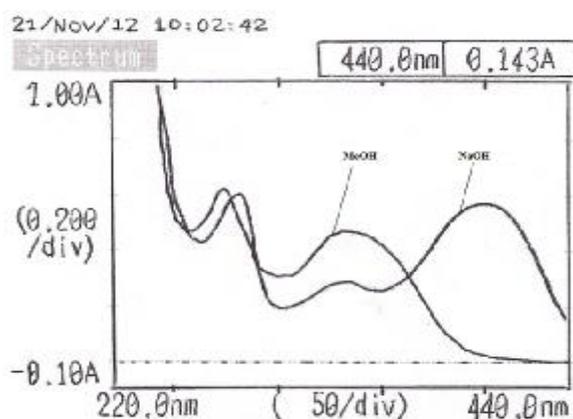
Le chromatogramme CCM d'analyse des extraits de son d'orge montré dans la Figure 45, on constate que l'extrait éther diéthylique est le plus riche en composés phénoliques (trois spots) suivi par la phase acétate (avec deux spots). L'extrait MEC et H₂O ne donne qu'un seul spot. Ces spots ont été confirmé leur nature flavonoïdique suite à leur réaction positive avec le réactif de Neu.

2-3-2- L'analyse spectrale des molécules isolées

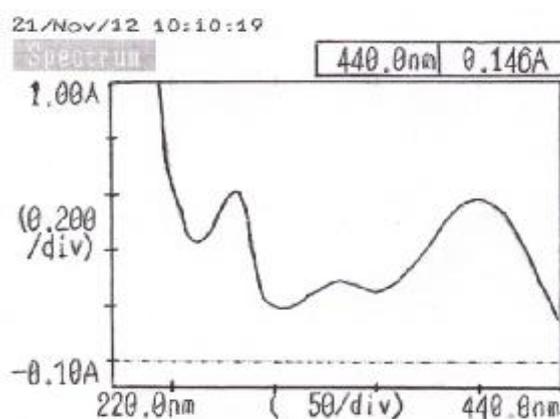
La CCM préparative sur gel de polyamide DC6 développée dans le système Tol/MeOH/MEC/Butanol (30 :20 :15 :0,3 ; v/v/v/v) a permis d'isoler 4 molécules (2 à partir de la phase MEC, une de la phase acétate, et la dernière de la phase eau). Après leurs purifications par le gel de Sephadex LH20, ils ont été subit une série d'analyse en utilisant divers réactifs de déplacements chimiques. Nous présenteront ici l'interprétation complète d'une seule molécule (spectre UV est dans la Figure 46), pour les autres voir l'Annexe 2.

2-3-2-1- Spectre UV de la Molécule 1

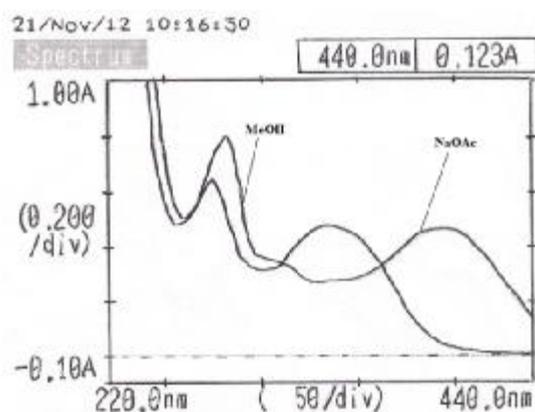
- **Molécule1 : Dépôt de la phase MEC : ($R_f=0$; couleur violette)**



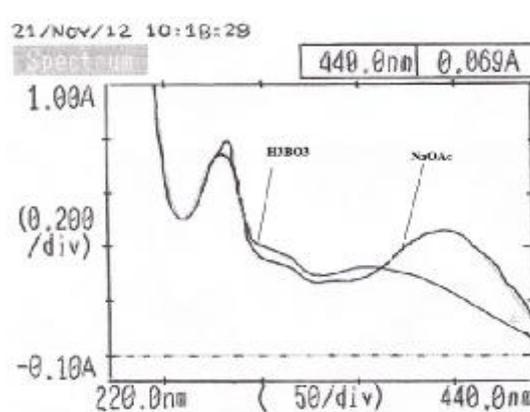
Spectre MeOH et après l'ajout de NaOH



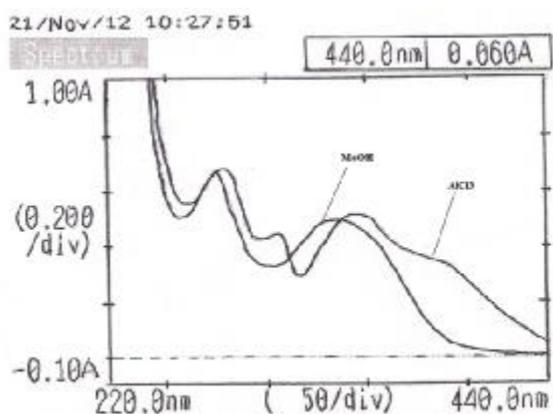
Après 5min d'ajout de NaOH



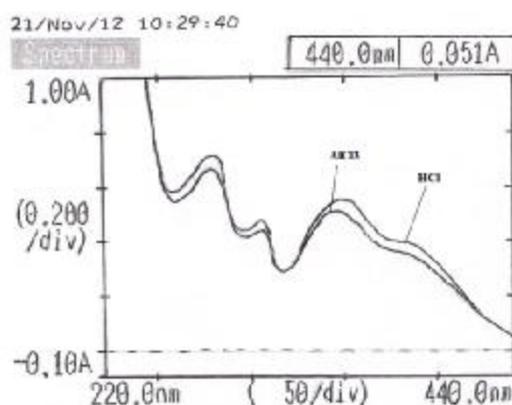
Spectre MeOH et après l'ajout d'NaOAc



Spectre NaOAc et après l'ajout d'H₃BO₃



Spectre MeOH et après l'ajout de AlCl₃



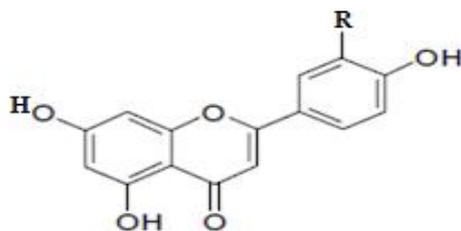
Spectre AlCl₃ et après l'ajout d'HCl

Figure 46 : Analyse spectrale du dépôt MEC de son plus germe de blé

Tableau 14 : Interprétation des déplacements observés par analyse spectrophotométrique UV de la molécule 01 (dépôt MEC) d'après Markham K.R. (1982)

Réactif de déplacement	Bande I (nm)	Bande II (nm)	Interprétation
MeOH	333	274	Flavone
NaOH (base forte)	399 344 (+66nm)	282	4' OH OH libre en 7
AlCl ₃	345	278	Pas de système ortho di OH (3', 4')
AlCl ₃ /Hcl	348 306 (+15nm/ MeOH)	278	
NaOAc (base faible)	393 (+60nm /MeOH)	282	OH-7 libre (confirmation)
NaOAc/H ₃ BO ₃	358 (+26nm)	281	Ortho di-OH 3', 4'?

La Figure 46 et le Tableau 14 nous permettent de mettre une première hypothèse sur la structure de la molécule 1 : une flavone possédant des groupes OH libres en 7, 4'. Le système ortho di OH en 3' et 4' n'est pas confirmé présent grâce à des contradictions entre les résultats des séries. Ceci peut être dû à une mauvaise séparation qui résulte de la complexité de nos molécules et de la présence de nouvelles molécules dont l'interprétation est encore en discussion. Il est important d'utiliser d'autres méthodes d'identification telles que l'RMN, MS pour déterminer la structure exacte de la molécule.



La structure proposée de la molécule 1 : Dérivé d'apigénine ou lutéoline

L'identification des trois autres molécules a été suivie comme le modèle précédent (Annexe 02).

Le Tableau 15 résume les structures proposées de toutes les molécules isolées.

Tableau 15 : Récapitulation de la structure des molécules isolées à partir des céréales alimentaires

Molécule	Phase	Rf	Couleur	Structure	Nom
1	MEC	Dépôt (0)	violet		Dérivé d'apigénine ou de lutéoline
2	MEC	0,6	Violet-noir		Dérivé d'apigénine ou de lutéoline
3	Acétate	0,9	Violet noir		Dérivé d'apigénine
4	Eau	0,7	Violet-noir		Dérivé d'apigénine ou de lutéoline

Les résultats du Tableau 15 montrent que ce sont tous des dérivés de flavone qu'on a pu isoler, mais l'identification de leurs structures exactes demande d'autres techniques instrumentales plus affirmatives (exemple MS).

2-4- Analyse par HPLC-DAD

Nos analyses en HPLC-DAD ont été optimisées par deux docteurs du groupe Thermo Fisher Scientific (Suisse) : le docteur Desbiolles C. (chimiste) et le docteur Marti N. (pour confirmation) et nous le remercions pour leur contribution. Les composés phénoliques de céréales ont principalement été séparés par HPLC-DAD (Verma B., 2009 ; El.Bedawey et *al.*, 2010 ; De Vasconcelos M.C.B.M. et *al.* 2013) . Les phases stationnaires habituellement employées pour la séparation de composés phénoliques sont les colonnes de silice greffées avec des chaînes C18 (Robards, K. et Antolovich, M., 1997). La séparation peut être réalisée en mode isocratique ou en mode gradient d'élution, toutefois la vaste gamme de polarité de ces molécules nécessite souvent de travailler en gradient d'élution pour éviter les co-élutions et pour éluer l'ensemble des composés. Les systèmes solvant sont alors composés d'eau (H₂O) et d'un modificateur organique le méthanol (MeOH) ou l'acétonitrile (ACN). La phase mobile est souvent acidifiée à un pH situé entre 2 et 4, afin d'éviter l'ionisation des nombreux groupes hydroxyles des composés phénoliques pendant l'analyse, ce qui améliore en même temps la résolution et la reproductibilité (Misan A.C. et *al.*, 2011; Stalikas C.D., 2007 ; Marston A and Hostettmann k., 2006).

Nos analyses ont été effectuées pour quatre extraits de céréales : les extraits (éther diéthylique, acétate d'éthyle (AcOEt), MEC, eau) de son et germe de blé, la quercétine a été utilisée comme un composé phénolique témoin, avec pour objectif de visualiser un maximum de molécules extraites aux longueurs d'ondes caractéristiques des composés phénoliques : 280, 326, 340 nm. La méthode développée est un gradient constitué d'eau acidifié et d'acétonitril (ACN). Ce dernier (ACN) induit une perte de charge inférieure et une durée d'analyse plus courte par rapport au méthanol. En raison de sa meilleure force d'élution et de sa plus faible viscosité, l'ACN a été sélectionné pour poursuivre le développement (Michel T., 2011). La séparation a été réalisée à 0,35ml/min pendant 24min à 30°C sur une colonne Acclaim 120 C18, 3µm, 2.1x150mm P/N 059130.

La détection UV-vis est le mode de détection couplé à la chromatographie liquide qui est de loin le plus utilisé aujourd'hui pour l'analyse des produits naturels possédant un ou

plusieurs chromophores. Les détecteurs UV-vis les plus communément utilisés sont des détecteurs à barrette de diode (DAD, Diode Array Detector) qui permettent de suivre une analyse à plusieurs longueurs d'ondes simultanément, et d'enregistrer les spectres d'absorption de chaque composé élué par la phase mobile (Merghem R., 2004 ; Misan A.C. et *al.*, 2011). De plus, il s'avère que cette méthode de détection est rapide, reproductible, sensible et non destructive. Les composés phénoliques possédant tous un chromophore, leur analyse en ligne par HPLC-DAD permet donc d'obtenir des informations structurales et ainsi de réaliser un premier criblage des extraits bruts et /ou fractions (De Rijke E. et *al.*, 2006 ; Hostettmann K. and Wolfender J.L., 2001).

2-4-1-Chromatogramme HPLC des étalons

La Figure 47 montre le chromatogramme de la quercétine, qui a été utilisée comme témoin de cette analyse. Les analyses ont été suivies à trois longueurs d'ondes différentes, 280 (marqué en noir sur le chromatogramme), 326nm (en rose), 340 nm (en vert). L'identification des composés phénoliques contenus dans les extraits se fait par comparaison des temps de rétention (Tr) et les données spectrales UV-Visible de chaque pic élué.

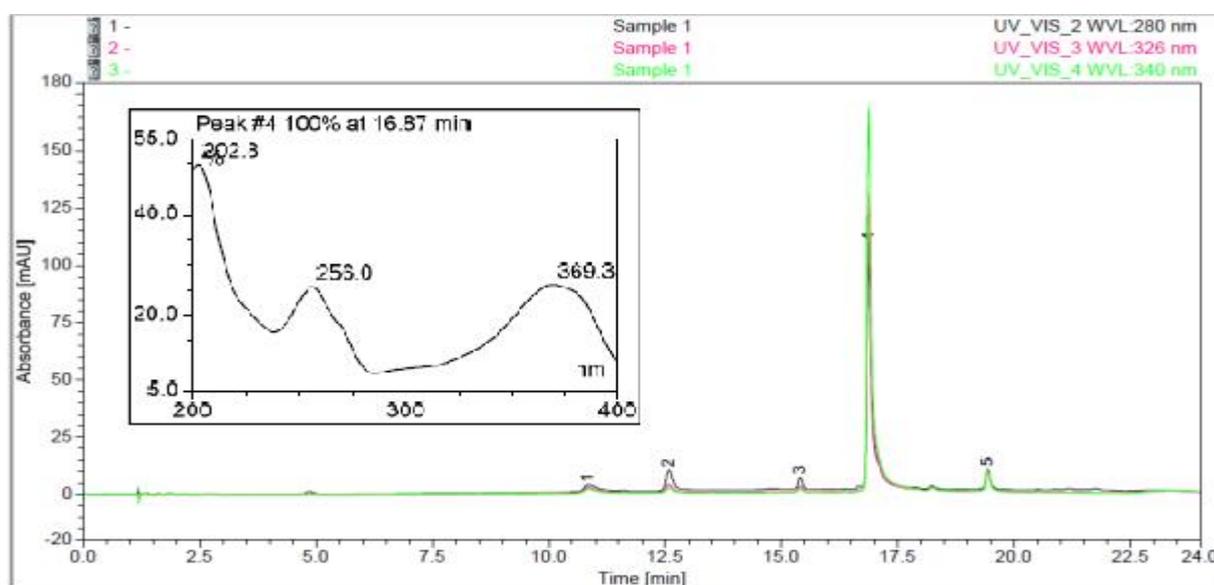


Figure 47 : Profil du chromatogramme HPLC de la quercétine (pic 4) et leur spectre UV.

D'après la Figure 47, la quercétine a un temps de rétention (Tr) égal à 16,87min et un spectre d'absorption UV caractéristique des flavonols avec deux bandes maximales : la bande I à 369nm et la bande II à 258nm.

2-4-2-Chromatogramme HPLC des extraits

Les profils chromatographiques de différents extraits (éther diéthylique, acétate d'éthyle, MEC et eau) de l'ensemble son plus germe de blé sont représentés au niveau des Figures 48a, 49a, 50a, 51a et les spectres UV-visible respectifs de chaque pic résultant sont donnés dans les Figures 48b, 49b, 50b, 51b ; tandis que les résultats des analyses qualitatives sont rassemblés dans le Tableau 16.

On peut observer une bonne résolution (efficacité) et séparation des différents pics résultants dans les profils chromatographiques. Il faut signaler que chaque pic correspond à une molécule, et celle qui présente une forte absorption correspond aux molécules majeures (signalées en gras dans le Tableau 16).

Ainsi, huit pics ont été détectés pour la phase éther diéthylique dont les trois premiers plus le pic 6 ont une réponse à 280 nm. Leurs spectres UV montrent une seule bande avec un maximal d'absorption à l'environ de 260nm. Ces derniers peuvent correspondre aux composés phénoliques simples tels que des dérivés d'acide cinnamiques. Les pics 4, 5, 7 et 8 ont une forte absorption à 340nm.

Les phases acétate d'éthyle et MEC ont présenté neuf pics (pour chacune) dont six pics et sept pics respectivement pour la phase acétate et MEC ont été détecté à 340nm. La phase eau a montré dix pics dont les cinq derniers (les pics 6, 7, 8, 9, 10) ont une forte absorption à 340nm.

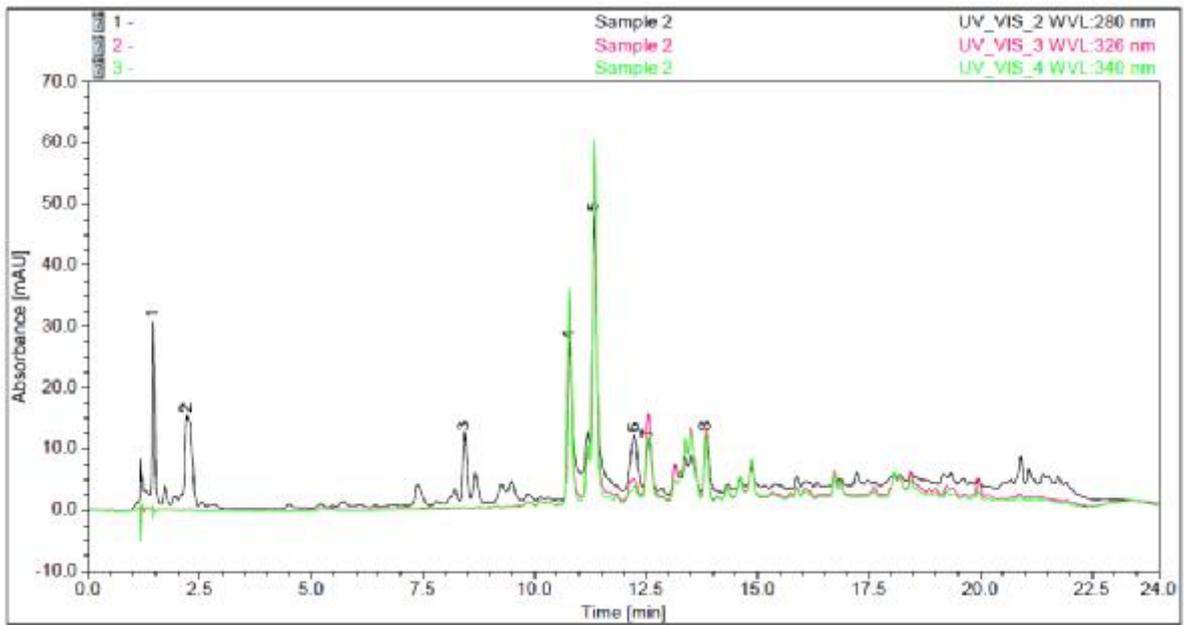


Figure 48 a : Profil du chromatogramme HPLC de la phase éther de l'ensemble son plus germe de blé

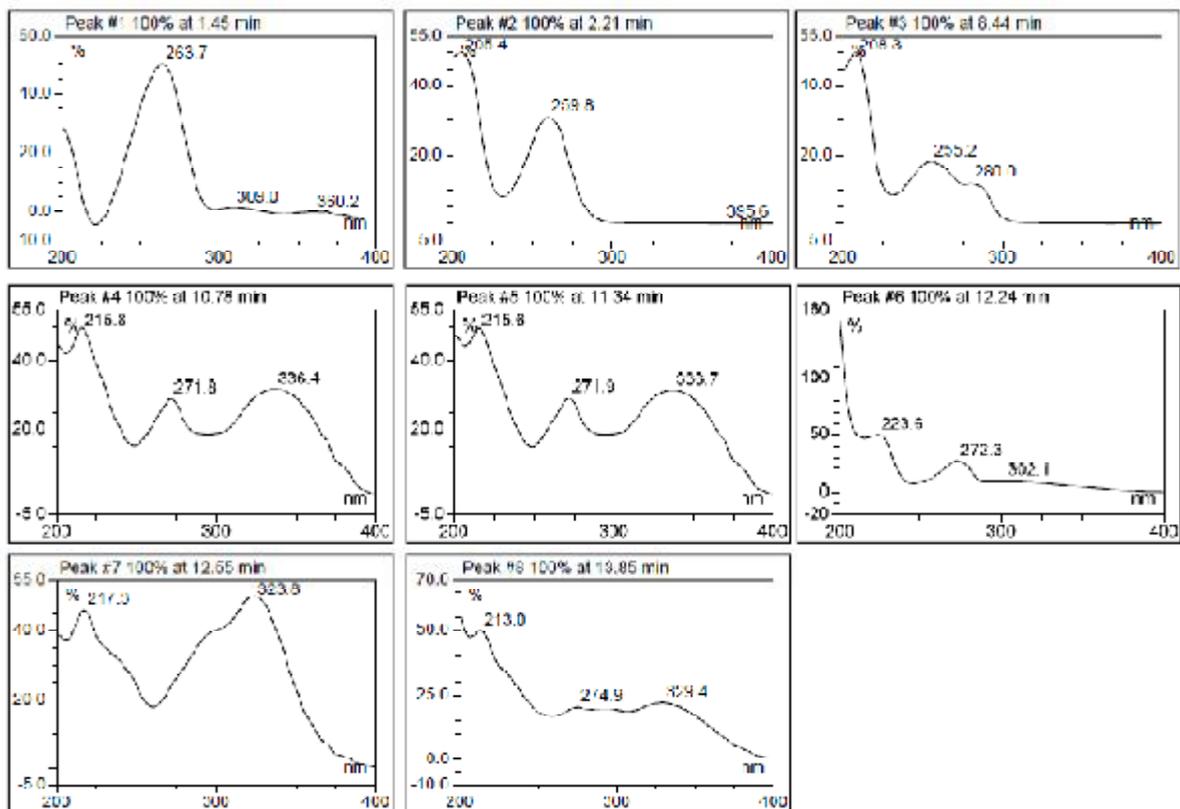


Figure 48 b : Spectres UV des pics élués à partir de la phase éther diéthylique de l'ensemble son plus germe de blé

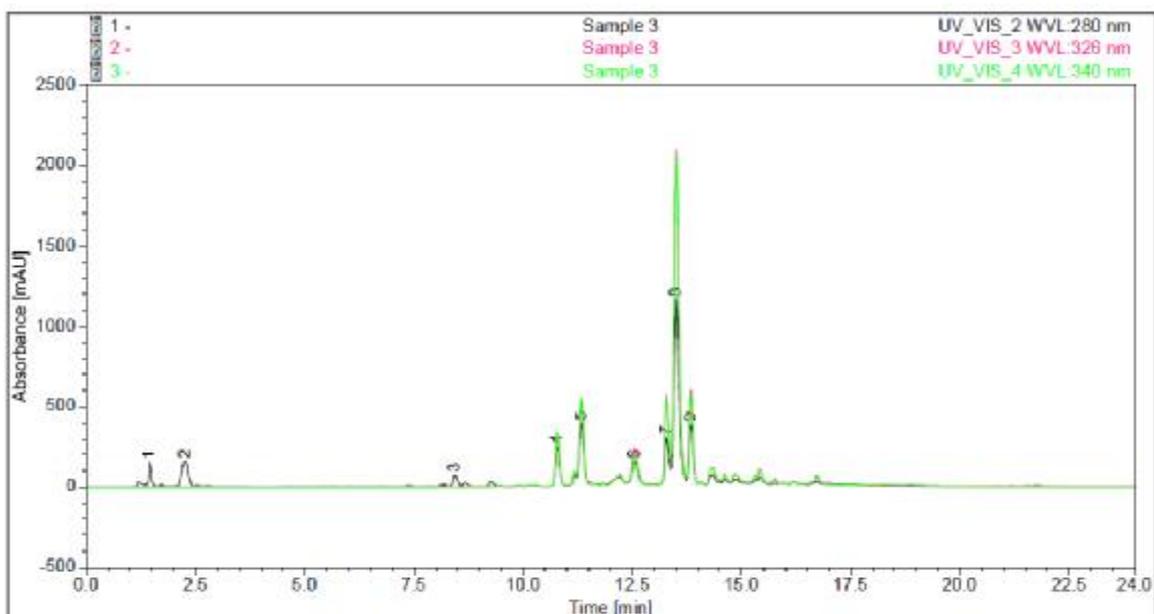


Figure 49 a : Profil du chromatogramme HPLC de la phase acétate de l'ensemble son plus germe de blé

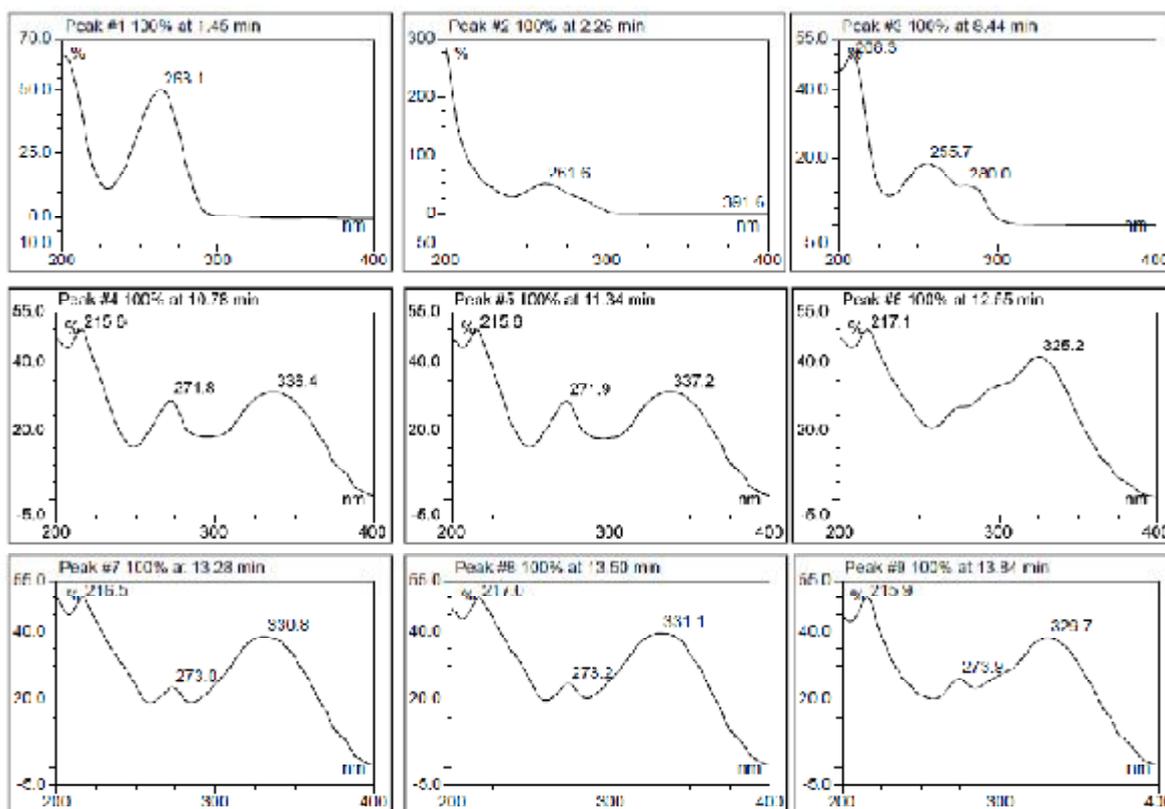


Figure 49 b : Spectres UV des pics élués de la phase acétate d'éthyle de l'ensemble son plus germe de blé

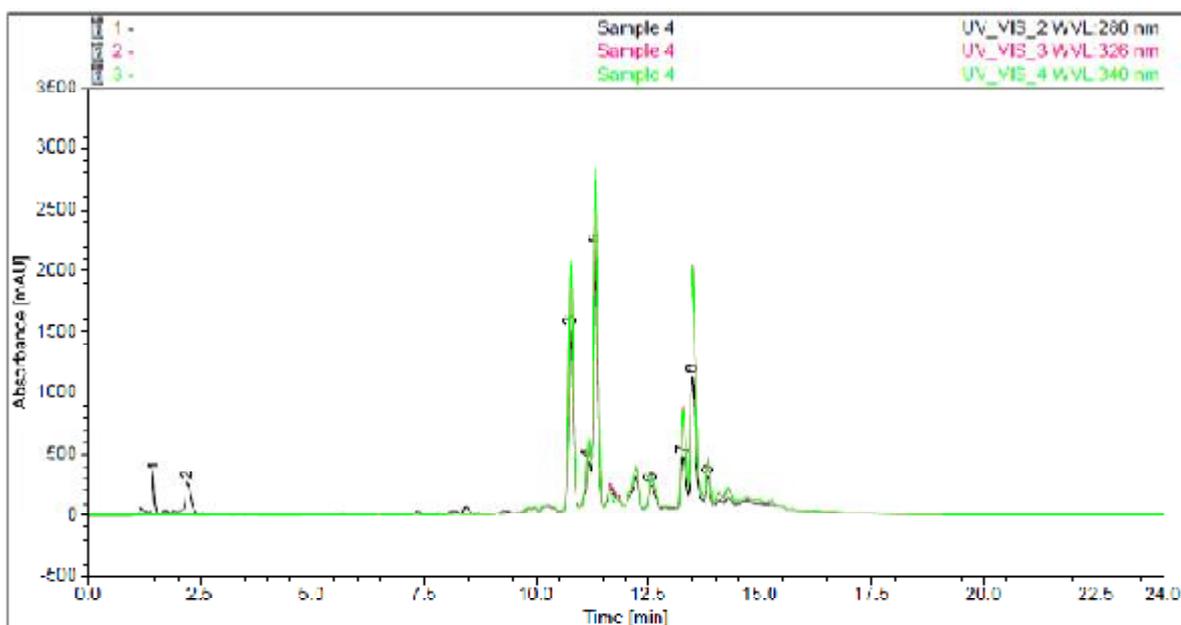


Figure 50 a : Profil du chromatogramme HPLC de la phase MEC de l'ensemble son plus germe de blé

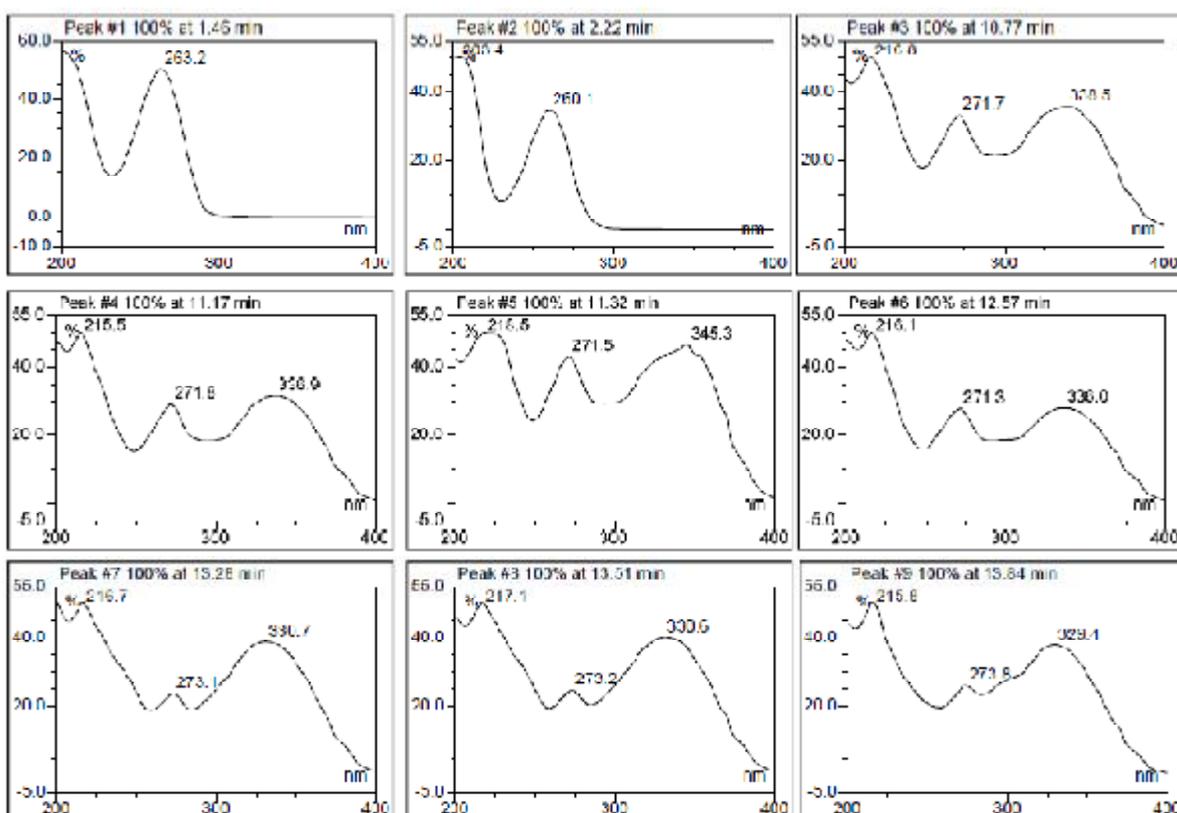


Figure 50 b : Spectres UV des pics élués de la phase MEC de l'ensemble son plus germe de blé

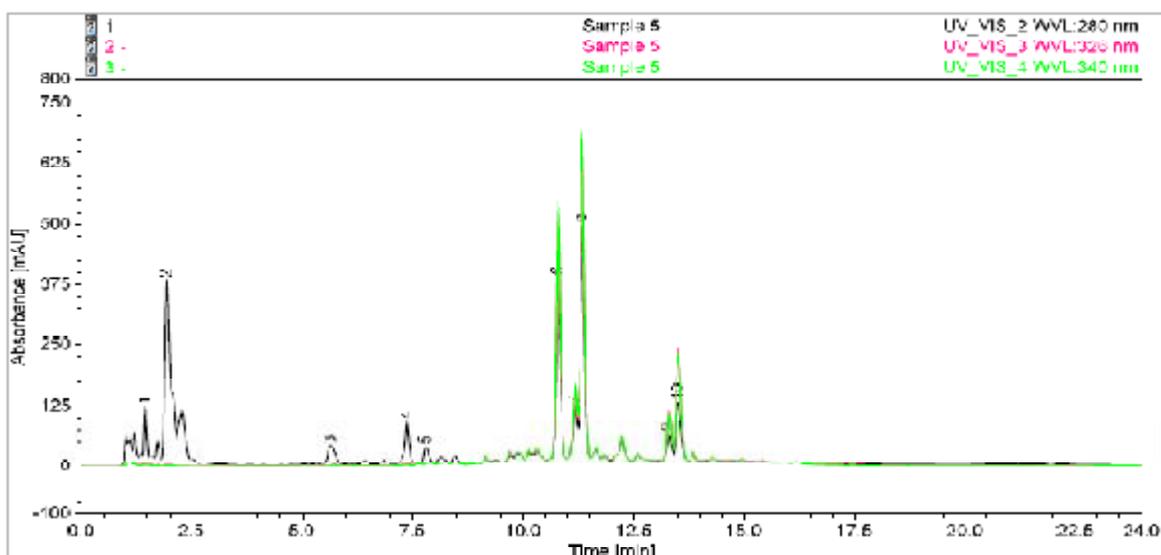


Figure 51 a : Profil du chromatogramme HPLC de la phase eau de l'ensemble son plus germe de blé

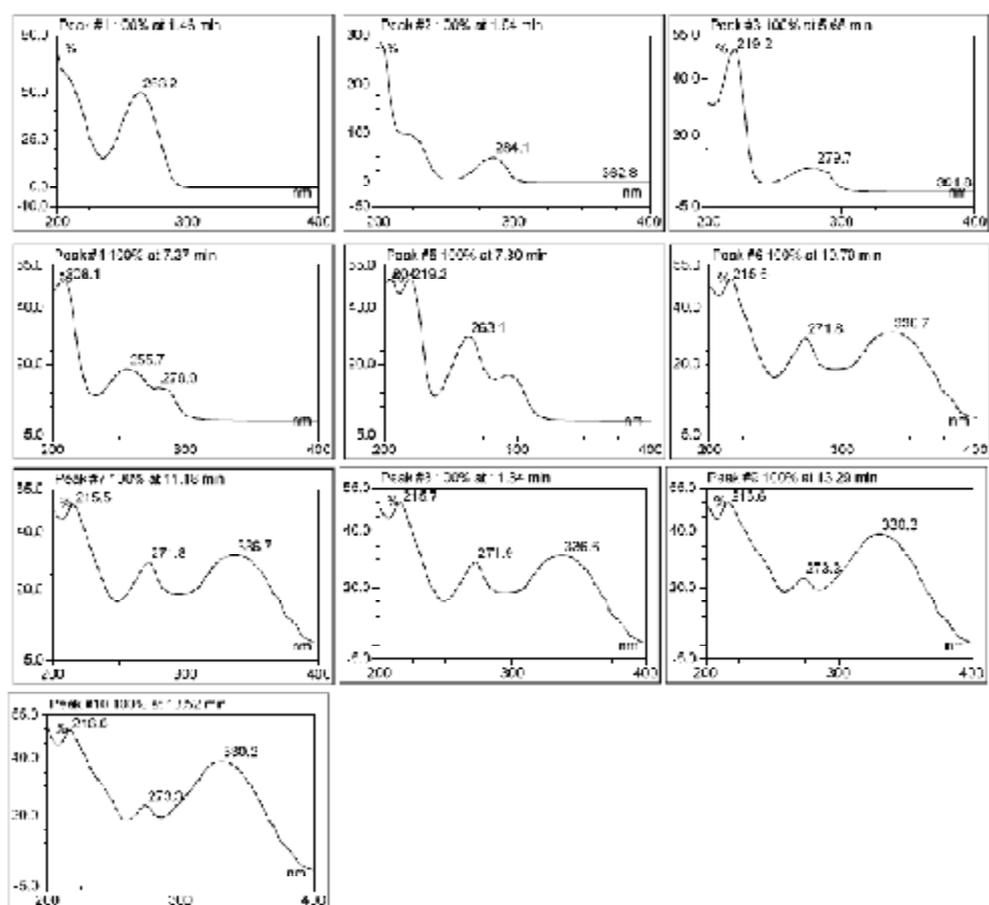


Figure 51 b : Spectres UV des pics élués de la phase eau de l'ensemble son plus germe de blé

Tableau 16 : L'interprétation des résultats lors de l'analyse en HPLC-DAD des différents extraits de son plus germe de blé non traité à la chaleur

Tr (min)	Ether		Acétate		MEC		H2O		Groupe phénolique
	BII	BI	BII	BI	BII	BI	BII	BI	
1.45	263.7		263.1						Dérivés d'acide benzoïque ^a
1.46					263.2		263.2		Dérivés d'acide benzoïque ^a
1.94							284.1		Dérivés d'acide cinnamique ^a
2.22					260.1				
2.21	259.8								
2.26			261.6						Dérivés d'acide benzoïque ^a
5.65							279.7		
7.37							255.7 279.9		
7.8							263.1		Dérivés d'acide benzoïque ^a
8.44	255,2	280	255.7sh	280.0					
10.77					271.7	338.5			Dérivés de flavones
10.78	271.8	336.4	271.8	336.4					Dérivés de flavones
10.79							271.8	336.7	Dérivés de flavones
11.17					271.8	336.9			Dérivés de flavones
11.18							271.8	336.7	Dérivés de flavones
11.32					271.5	345.3			
11.34	271.9	336.7	271.9	337.2			271.9	336.6	Dérivés de flavones ^b
12.24	272.3	302.1							Dérivés de flavones ^b
12.55	323.8		300sh	325.2					Dérivés de flavones ^b
12.57					271.3	336.0			Dérivés de flavones ^b
13.28			273.0	330.8	273.1	330.7			Dérivés de flavones ^b
13.29							273.3	330.3	Dérivés de flavones ^b
13.5			273.2	331.1					Dérivés de flavones ^b
13.51					273.2	330.6			Dérivés de flavones ^b
13.52							273.3	330.2	Dérivés de flavones ^b
13.84			273.9	329.7	273.8	329.4			Dérivés de flavones ^b
13.85	274.9	329.4							Dérivés de flavones ^b
16.87									Quercétine (étalon)

^aChirinos R. et al., 2008 ; ^bChirinos et al., 2009

Ø Interprétation des résultats

A la lumière de ces résultats, et à partir de la comparaison des temps de rétention de nos différents pics élués avec de la quercétine, on peut dire que cette dernière est absente dans nos différents extraits analysés de l'ensemble son plus germe de blé. Cependant, une étude récente menée par De Vasconcelos M.C.B.M. et *al.* (2013) ont signalé la présence de la quercétine (flavonol) dans leurs extraits de germe de blé lors d'une analyse en HPLC-fluorescence. De plus, d'autres recherches ont aussi identifiées la quercétine mais au niveau des feuilles de céréales. En effet, la synthèse de ce type de métabolites secondaires est en relation avec l'exposition aux rayons UV (Zagoskina N.V. et *al.*, 2005).

Les différents pics dans les différents profils chromatographiques peuvent être classés en trois groupes phénoliques qui sont : dérivés d'acides benzoïques, celles d'acides cinnamiques et des dérivés de flavones (ces derniers semblent être majoritaires), tout cela est basé sur la comparaison des spectres d'absorption de différents pics élués avec celles de la bibliographie.

3-Le pouvoir antioxydant « test au DPPH° »

Le pouvoir antioxydant de nos différents extraits testés a été estimé par la méthode de DPPH° ; en effet c'est celle qui est utilisée dans le monde entier (Scherver R. et Godoy H. T., 2009) et la plus populaire pour le dépistage de l'activité antiradicalaire d'un composé unique ou un mélange de composés. Cette méthode est considérée, à partir d'un point de vue méthodologique, l'une des plus faciles, plus précise et productive de l'activité antioxydante des jus des fruits, des extraits de plantes, et des composés purs comme les flavonoïdes (Pereira Nunes X., et al., 2012).

Nos résultats ont été exprimés par le calcul de la concentration efficace (EC₅₀ « efficient concentration », ce paramètre a été introduit apparemment par Brand- Williams et ses collègues, et a été utilisé par la suite par plusieurs chercheurs pour présenter leurs résultats (Molyneux P., 2004). La valeur EC₅₀, la concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50% du DPPH° radicalaire a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibitions calculées en fonctions de six concentrations différentes d'échantillons préparés et est exprimé en mg/ml. La mesure d'EC₅₀ est utile pour comparer les résultats non seulement entre une référence mais aussi entre les échantillons testés.

3-1- Le pouvoir antioxydant des antioxydants de référence

A titre comparative, trois antioxydants de références sont utilisés : l'acide gallique, l'acide tannique et la quercétine. Leur activité antioxydante a été démontrée dans la Figure 52 et le Tableau 17

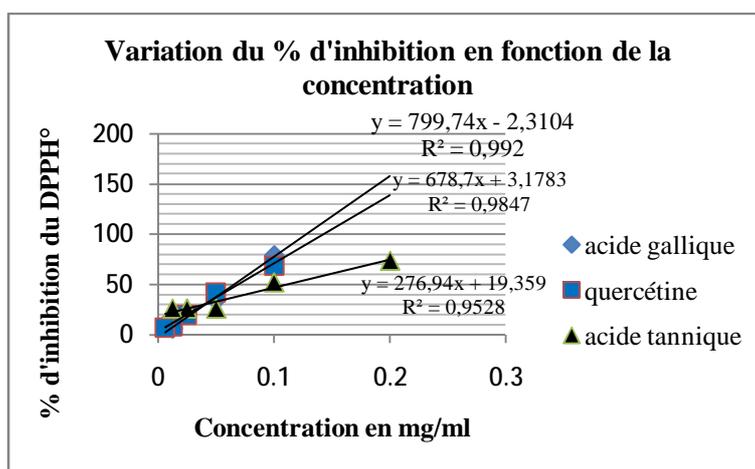


Figure 52: L'estimation de l'EC₅₀ des antioxydants de références

Tableau 17 : Le pouvoir antioxydant (exprimé par EC₅₀ (en mg/ml)) des antioxydants de références testés

L'antioxydant de référence	EC ₅₀ (en mg/ml)
Acide gallique	0,065±0,0056
Quercétine	0,068±0,0056
Acide tannique	0,114±0,007

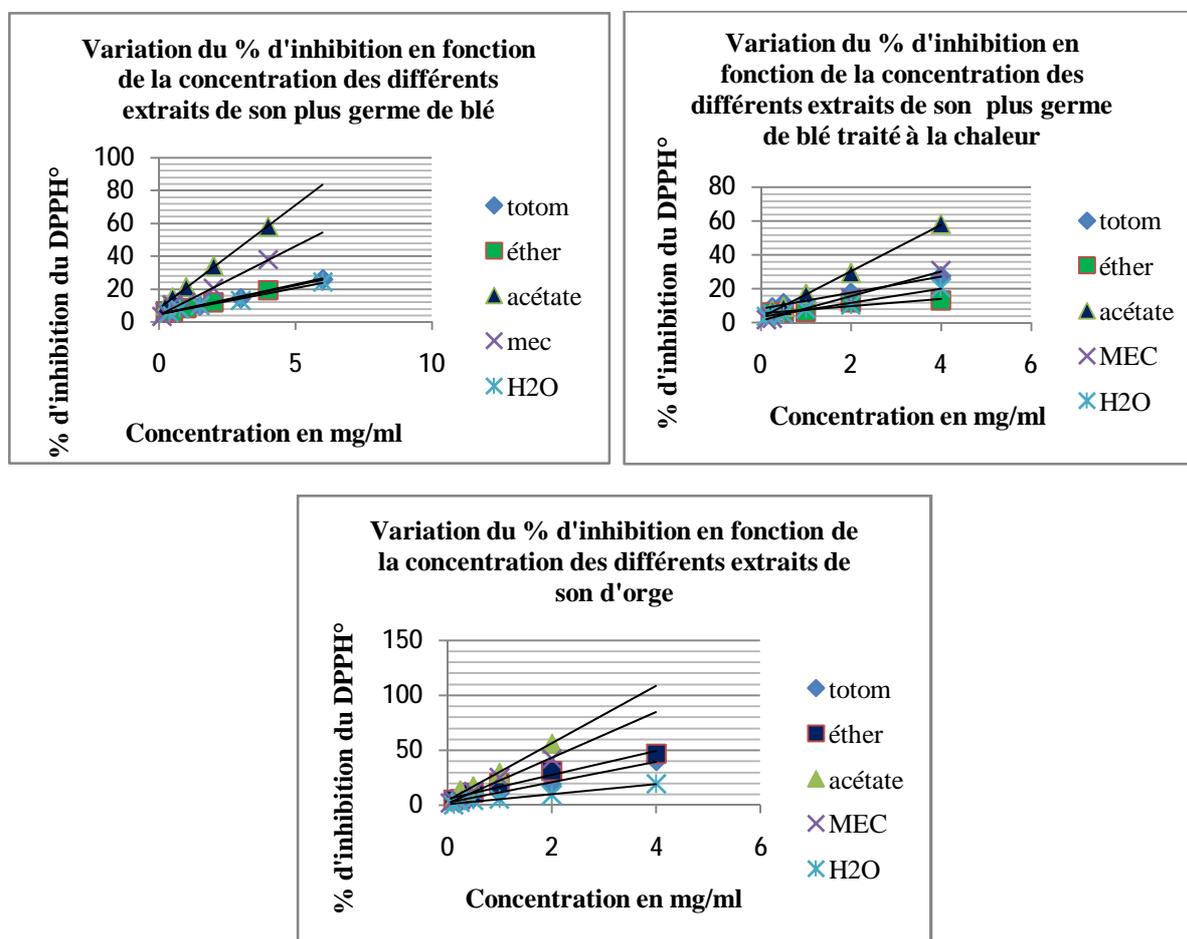
Les valeurs d'EC₅₀ des antioxydants de références testés se sont avérées 0,065, 0,068 et 0,11mg/ml pour l'acide gallique, quercétine et l'acide tannique respectivement (Tableau 17). Etant donné que la valeur d'EC₅₀ est inversement proportionnelle au pouvoir antioxydant d'une substance pure ou d'un mélange de substances, le classement de nos antioxydants testés selon leurs pouvoirs antioxydants décroissant est : acide gallique est supérieur à la quercétine, supérieur à l'acide tannique.

La concentration efficace de l'acide gallique est très proche de celle obtenue par Mishra et al. (2012) : 0,07 et par Brand-Williams et al. (1995) : 0,08 mais assez loin de celle obtenue par Popovici C. et al. (2009) : 0,03. Pour l'acide tannique, Popovici C. et al. (2009) ont obtenu un EC₅₀ égale à 0,08 très proche de nos résultats : 0,11mg/ml.

Dans la présente étude l'acide gallique et la quercétine montrent un pouvoir antioxydant presque identique. Cela est conforme à la littérature, ainsi Villano D. et al. (2007) ont obtenu des valeurs égales à $5,1 \times 10^{-6}$ et $5,5 \times 10^{-6}$ M représentant l'EC₅₀ de l'acide gallique et celle de la quercétine respectivement. L'activité antioxydante la plus élevée de l'acide gallique (groupement 3, 4, 5 tri -OH sur le cycle aromatique) peut être attribuée à sa plus forte polarité par rapport aux flavonoïdes (Popovici C. et al., 2009).

3-2-Le pouvoir antioxydant des différents extraits de céréales alimentaires

Les graphes (Figure 53) représentent les courbes de régression entre le pouvoir antioxydant (exprimé par le pourcentage d'inhibition du DPPH°) en fonction de la concentration de l'échantillon testé.



Les équations de régression des courbes (de chaque extrait) ont été données dans l'Annexe 4

Figure 53 : L'estimation de l'EC₅₀ des différents extraits de céréales alimentaires

Tableau 18 : Le pouvoir antioxydant (exprimé en EC₅₀) des différents extraits céréales alimentaires

Extrait Echantillon	Son plus germe de blé (EC ₅₀ exprimé en mg/ml)	Farine de son plus germe de blé (EC ₅₀ exprimé en mg/ml)	Son d'orge (EC ₅₀ exprimé en mg/ml)
Totum	13,02±0,25	8,7±0,26	5,16±0,73
Ether diéthylique	12,64±0,56	21,33±1,46	4,04±0,57
AcOEt	3,2±0,22	3,505±0,78	1,77±0,22
MEC	5,53±0,26	6,755±0,92	2,32±0,17
H ₂ O	14,25±0,32	11,13±0,07	10,81±0,46

Les valeurs représentent la moyenne de deux essais± Ecartype

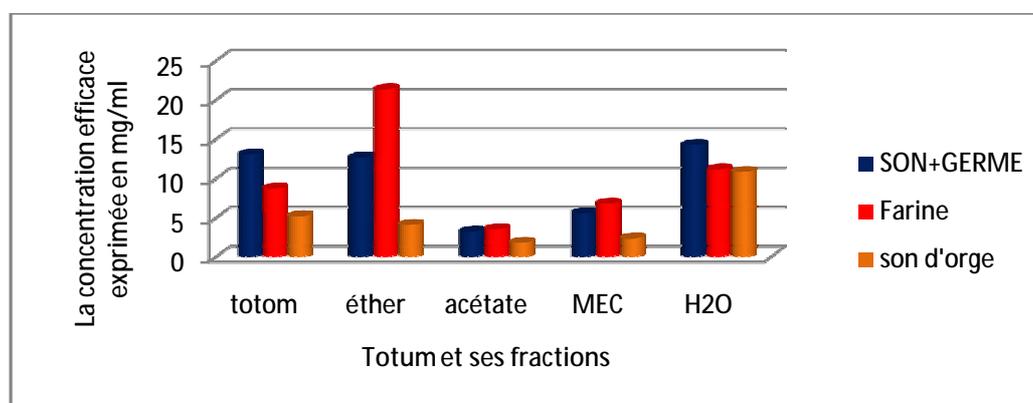


Figure 54 : Histogramme comparatif du pouvoir antioxydant des différents extraits des trois échantillons de céréales alimentaires

L'histogramme (Figure 54) et le Tableau 18 révèlent que les différents extraits de son plus germe de blé (traité ou non à la chaleur) et celles de son d'orge agissent comme de bons antioxydants. Les extraits AcOEt et MEC de ces trois échantillons sont les plus puissants, puisqu'ils agissent à de faibles doses, et qui sont plus marqués pour celles de son d'orge : 1,77±0,22 mg/ml et 2,32±0,17mg/ml respectivement pour l'extrait AcOEt et MEC.

La comparaison du pouvoir antioxydant de nos extraits entre eux révèle que celui du son d'orge est le plus active. Ceci est en accord avec les résultats de plusieurs chercheurs (Ivanisova E et *al.*, 2012 ; et Ragaee et *al.*, 2006 ; Sharma et *al.*, 2012) dans lequel, l'orge présente un pouvoir antioxydant plus élevé que celui du blé. Ce résultat est en accord avec les teneurs qu'on a obtenu (en composés phénoliques) les plus élevées du son d'orge par rapport aux extraits de son et germe de blé. Selon Dvorakova M. (2008), ce sont les proanthocyanidines (dimères et trimères de tanins) qui contribuent majoritairement à

l'activité antioxydante de l'orge. Tous nos extraits testés sont moins actifs, que les antioxydants standards ; l'acide gallique et la quercétine qui sont 47 fois plus actifs, l'acide tannique est 35 fois plus actifs que l'extrait AcOEt de son plus germe de blé. En comparaison avec l'extrait AcOEt de son d'orge, l'acide gallique et la quercétine sont 26 fois plus actifs, et 16 fois moins actif par rapport à l'acide tannique.

D'après Zhu K.X. (2011), peu d'études systématiques ont été basées sur les antioxydants de germe de blé. De plus, les composés phénoliques du germe de blé sont moins traités en termes de leurs teneurs et de leurs contributions à l'activité antioxydante. Les résultats de ce même hauteur montrent une concentration inhibitrice de l'extrait éthanolique de germe de blé égale à 0,424 mg/ml, cette valeur s'avère très faible par rapport à nos résultats. Toutefois il est important de noter que l'utilisation des protocoles de mesures différentes et de différents indices d'évaluation de l'activité antioxydante réduit la fiabilité de la comparaison des valeurs (Popovici C., et al., 2009).

3-3-Relation contenu phénolique- pouvoir antioxydant

Les résultats des analyses de corrélation entre le contenu phénolique et le pouvoir antioxydant (exprimé dans la présente étude par l'inverse de la concentration efficace ($1/EC_{50}$)), sont représentés dans les Figures 55, 56 et 57.

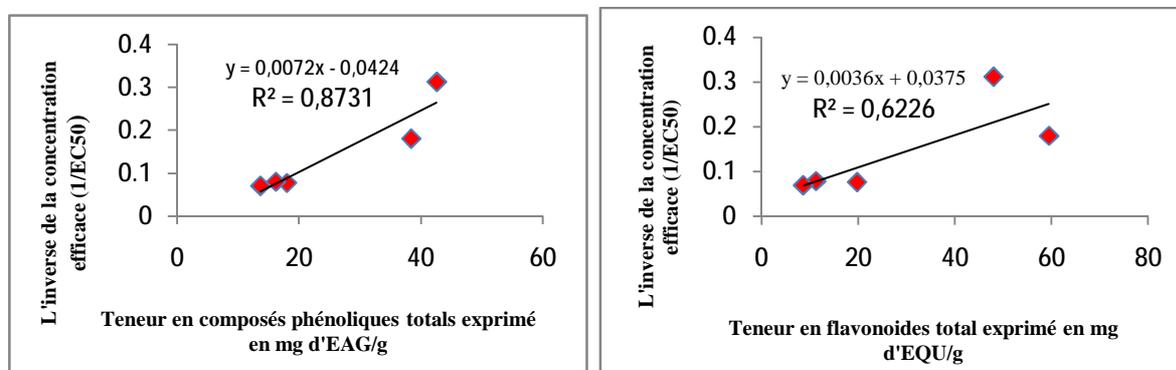


Figure 55 : Corrélation entre le contenu en composés phénoliques (à droite) et en flavonoïdes, et le pouvoir antioxydant de l'ensemble son plus germe de blé

Une corrélation de 87% et 62% respectivement entre le contenu en composés phénoliques totaux, flavonoïdes et le pouvoir antioxydant pour les cinq extraits de l'ensemble de son et germe de blé.

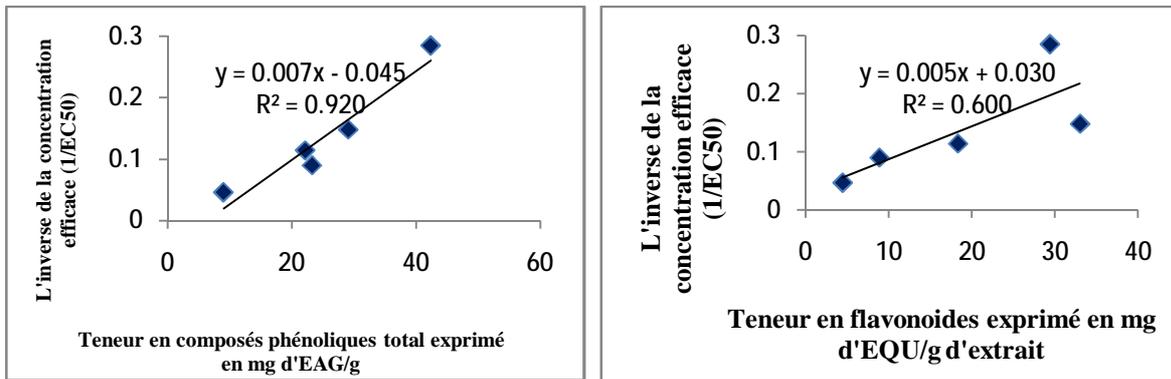


Figure 56 : Corrélation entre le contenu en composés phénoliques (à droite) et en flavonoïdes, et le pouvoir antioxydant de la farine de l'ensemble son plus germe de blé traité à la chaleur

Une corrélation de 92% et 60% respectivement entre le contenu en composés phénoliques totaux, flavonoïdes et le pouvoir antioxydant pour les cinq extraits de l'ensemble son et germe de blé traité à la chaleur.

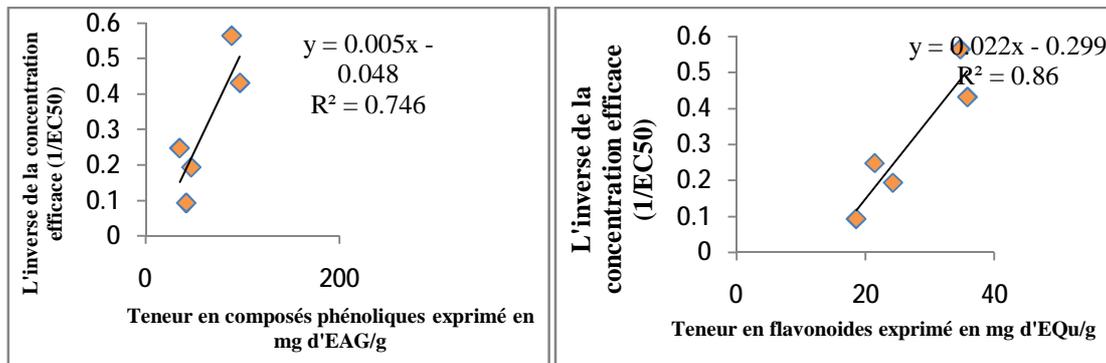


Figure 57 : Corrélation entre le contenu en composés phénoliques (à droite) et en flavonoïdes et le pouvoir antioxydant du son d'orge

Pour celles des extraits de son d'orge, une corrélation de 74% et 86% respectivement pour le contenu en composés phénoliques, flavonoïdes et le pouvoir antioxydant a été trouvé.

Cette forte corrélation est en accord avec plusieurs résultats de chercheurs qui ont rapporté une corrélation positive entre le contenu phénolique total et l'activité antioxydante des céréales (Donkor O.N. et *al.*, 2012; Vaher M. et *al.*, 2010 ; Beta et *al.*, 2005 ; Verma et *al.*, 2009). La corrélation positive de la présente étude confirme que les composés phénoliques et particulièrement les flavonoïdes, sont les majeurs contributeurs à l'activité antioxydante des différents extraits de céréales alimentaires. En d'autre terme, les extraits qui possèdent un contenu phénolique élevé exercent un pouvoir antioxydant important (la valeur d'EC₅₀ est faible).

Chapitre 2 :
Résultats et interprétation de la
partie des plantes médicinales

1- Les plantes médicinales

L'*Origanum vulgare*, *Thymus numidicus* (O. Askeur), *Origanum floribundum* de la région du Chréa (PNT.) et *Calamintha grandiflora* (for ts Aftis ; PNT), toutes récoltées dans la wilaya de Jijel (Tableau 4).

2- Analyse phytochimique

2-1- Préparation des extraits

La préparation des extraits de plantes médicinales a été effectuée par macération. Le solvant d'extraction qui a été utilisé est l'éthanol à 70%, parce qu'il est moins toxique que le méthanol et peut être facilement récupéré sous pression réduite (Dobravalskyte D. et al., 2012). Chaque extrait global a subi par la suite une série d'affrontement successivement par l'éther diéthylique, acétate d'éthyle (AcOEt) et butanone (MEC) et la phase aqueuse est la résiduelle.

2-2-Aspect quantitatif

2-2-1- Dosage des composés phénoliques totaux

Les plantes aromatiques sont riches en composés phénoliques, principales substances qui agissent comme des antioxydants. Pour cette raison, il a été jugé important d'établir la teneur en composés phénoliques dans les extraits d'*Origan* (pour les deux espèces), de *C. grandiflora* et de *T. numidicus*.

Le dosage a été déterminé via le test de Folin-Ciocalteu et selon la même méthode qui a été appliquée pour les céréales alimentaires (méthode de Zhu K.X., 2011). Le contenu phénolique total de nos extraits a été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage ($y = 0,0114x + 0,1606$, $R^2 = 0,9986$, y est l'absorbance ; x est la concentration de la solution d'acide gallique, $\mu\text{g/ml}$) (Annexe 01), les résultats ont été exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg d'EAG/g d'extrait) Tableau 19, Figure 58.

Tableau 19 : Résultats de la teneur en composés phénoliques des quatre plantes médicinales (Les valeurs représentent la moyenne de 2 ou 3 mesures \pm Ecartype)

Extrait	<i>O. vulgare</i>	<i>O. floribundum</i>	<i>C. grandiflora</i>	<i>T. numidicus</i>
Extrait brut	204,57 \pm 6,97	202,82 \pm 0,15	115,65 \pm 0,92	152,27 \pm 4,03
Ether	302,6 \pm 2,32	62,36 \pm 6,51	213,46 \pm 7,12	38,46 \pm 5,26
AcOEt	300,19 \pm 9,14	129,89 \pm 5,26	197,22 \pm 26,37	149,3 \pm 15,66
MEC	374,97 \pm 6,66	349,75 \pm 12,56	231,21 \pm 2,48	219,81 \pm 15,5
H ₂ O	193,39 \pm 0,45	221,35 \pm 13,33	101,62 \pm 5,27	146,79 \pm 3,1

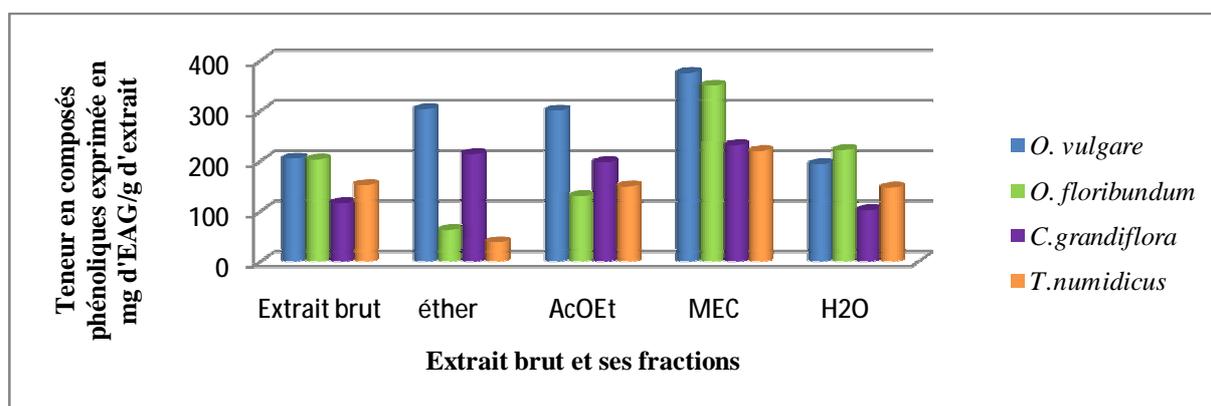


Figure 58 : Histogramme du contenu phénolique total des extraits des quatre plantes médicinales.

D'après le Tableau 19 et la Figure 58, le contenu phénolique total varie d'une plante à une autre, et d'un extrait à un autre. Les extraits MEC des deux espèces d'*Origan* ont été marqués par leurs teneurs les plus élevées : $374,97 \pm 6,66$ et $349,75 \pm 12,56$ mg d'EAG/g d'extrait respectivement pour *O. vulgare* et *O. floribundum*. Les extraits éther et AcOEt d'*O. vulgare* viennent par la suite avec des teneurs de $302,6 \pm 2,32$ et $300,19 \pm 9,14$ mg d'EAG/g respectivement. Les teneurs les plus basses ont été obtenues avec les extraits éther d'*O. floribundum* et de *T. numidicus*.

A l'exception des extraits éther et AcOEt des deux espèces d'*Origan*, les autres extraits (brut, MEC, eau) montrent des teneurs presque identiques. Cela peut être dû à l'appartenance de ces deux plantes au même genre de la famille des Lamiacées.

Le contenu phénolique d'extrait méthanolique d'*Origanum vulgare* (186 mg/g d'extrait) obtenu par Skerget et al. (2005) est similaire à nos extraits bruts d'*Origan*.

La teneur d'extrait brut de *T. numidicus* est proche à celle de Barros L. (2010) : $165,29 \pm 1,11 \text{ mg d'EAG/g}$ d'extrait ; mais assez loin des valeurs de Nickavar B. et Esbati N. (2012) : $295,57 \pm 1,91$ à $337 \pm 8,31$ mg d'équivalent de la rutine/g d'extrait.

A propos de *C. grandiflora*, la composition chimique reste mystérieuse et n'a pas fait l'objet d'études phytochimiques sur son contenu phénolique et son activité antioxydante (Dobravalskyte D. et al., 2012). Cet auteur a obtenu un contenu phénolique entre $28,0 \text{ mg/g}$ (pour l'extrait acétonique) et $82,8 \text{ mg/g}$ dans l'extrait éthanolique des résidus de la plante qui ont subi préalablement une hydrodistillation.

La teneur en composés phénoliques des extraits bruts des quatre plantes médicinales les classe en ordre décroissant: *Origanum vulgare* est presque égal à l'*Origanum floribundum*

supérieur à *Thymus numidicus* supérieur à *Calamintha grandiflora*. Cependant, Wojdylo A. et al., (2007) a classé le *Thymus* en premier lieu dans sa teneur en composés phénoliques suivi par l'*Origan*.

A la lumière de nos résultats et celles de la littérature, il est difficile de déterminer l'origine de ces disparités, ils peuvent être dues à des différences dans l'organe végétale testé (feuilles, tige, fleurs et leurs combinaisons), dans l'état physiologique à la récolte, dans les méthodes d'analyse, ainsi que les différences génotypiques et géographique des herbes (Perez M.B. et al., 2011). De plus, la faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu est l'inconvénient principal de la méthode colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques mais aussi à certains sucres et protéines.

2-2-2- Dosage des flavonoïdes totaux

La raison principale pour laquelle on a choisi cette classe de polyphénols, réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 6000 composés déjà décrits (Knežević S.V. et al., 2012).

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de tri- chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) et selon le protocole de Djeridane A. (2006). La quercétine a été utilisée comme standard et les valeurs ont été calculées selon la courbe d'étalonnage ($y=0.0123x+0.0453$; $R^2= 0.9891$; y est l'absorbance ; x est la concentration de la solution de la quercétine, $\mu g/ml$) (Annexe 1) et est exprimés en mg d'équivalent de quercétine (EQu)/g d'extrait (Tableau 20, Figure 59).

Tableau 20 : Résultats de la teneur en Flavonoïdes des quatre plantes médicinales

Extrait	<i>O. vulgare</i>	<i>O. floribundum</i>	<i>C. grandiflora</i>	<i>T. numidicus</i>
brut	71,78±0,71	85,19±0,43	109,89±3,7	119,75±10,76
éther	106,03±2	193,94±7,9	385,7±2,01	168,22±18,39
AcOEt	77,88±3,01	74,12±14,16	321,27±15,8	168,83±11,2
MEC	82,96±1,58	69,75±6,75	142,31±3,01	173,61±9,92
H₂O	64,56±1,43	62,63±7,33	43,43±1,14	127,06±8,47

Les valeurs représentent la moyenne de 2ou 3 valeurs± Ecartype.

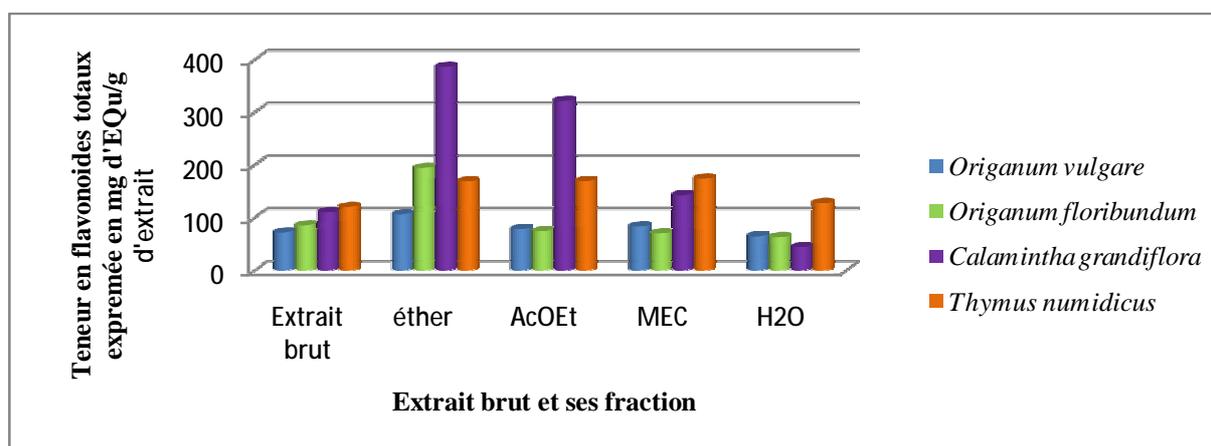


Figure 59 : Histogramme du contenu en flavonoïdes des quatre plantes médicinales

D'après la Figure 59 et le Tableau 20, le contenu en flavonoïdes varie selon la plante étudiée et selon son extrait. Le contenu le plus élevé a été marqué pour les extraits éther et AcOEt de *C. grandiflora* qui atteignent une teneur de $385,7 \pm 2,01$ et $321,27 \pm 15,8$ mg d'EQ/g d'extrait (plus élevé par rapport à leur teneur en composés phénoliques totaux). L'extrait éther d'*O. floribundum* montre aussi leur richesse en flavonoïdes par rapport à leur teneur en composés phénoliques : $193,94 \pm 7,9$ mg d'EQ/g d'extrait. Les extraits éther, acétate et MEC du *T. numidicus* présentent des teneurs presque identiques de $168,22 \pm 18,39$, $168,83 \pm 11,2$ et $173,61 \pm 9,92$ mg d'EQ/g d'extrait respectivement. L'extrait le moins riche est enregistré pour l'extrait H₂O de *C. grandiflora* qui présente une teneur de $43,43 \pm 1,14$ mg d'EQ/g d'extrait.

Comme dans le cas de la teneur en composés phénoliques, la teneur en flavonoïdes des deux espèces d'Origan (*O. vulgare* et *O. floribundum*) montre une similitude remarquable (sauf pour l'extrait éther) car ces deux plantes appartiennent au même genre de la famille des Lamiacées.

Le contenu en flavonoïdes des extraits méthanolique d'*O. vulgare* obtenu par Barros L. et al., (2010) ($224,15 \pm 0,96$ mg d'équivalent de catéchine/g d'extrait) est très loin de nos résultats. Cette différence trouve probablement son explication dans la différence du standard utilisé pour le dosage des flavonoïdes.

D'après leurs extraits bruts on peut classer ces quatre plantes médicinales selon leur teneur en flavonoïdes décroissant : *Thymus numidicus* est supérieur à *Calamintha grandiflora* supérieur à *Origanum floribundum* presque identique à l'*Origanum vulgare*.

2-3- Aspect qualitatif

2-3-1-CCM analytique

Les plaques de CCM utilisées sont des plaques de verre constituées de gel de polyamide DC6. La migration s'est faite dans les systèmes solvants suivants : MEC/MeOH/EtOH/éther de pétrole (40/30/30/10 ; v/v/v/v) pour toutes les phases (éther diéthylique, acétate d'éthyl, MEC, H₂O et totum). Ce système solvant a permis une bonne séparation des constituants du dépôt et une très bonne visibilité des spots sous lampe UV à 365nm (avant et après la pulvérisation du réactif de Neu) (Figure 60 et 61) sauf pour la phase H₂O et celle du totum. La phase aqueuse a été reprise par un autre système plus polaire : H₂O/Butanol/EtOH/HCOOH (50/20/25/2 ; v/v/v/v) (Figure 62). Quant au totum, cette mauvaise séparation peut être expliquée par la complexité du dépôt et par conséquent nous remarquons l'importance de l'affrontement des composés phénoliques.

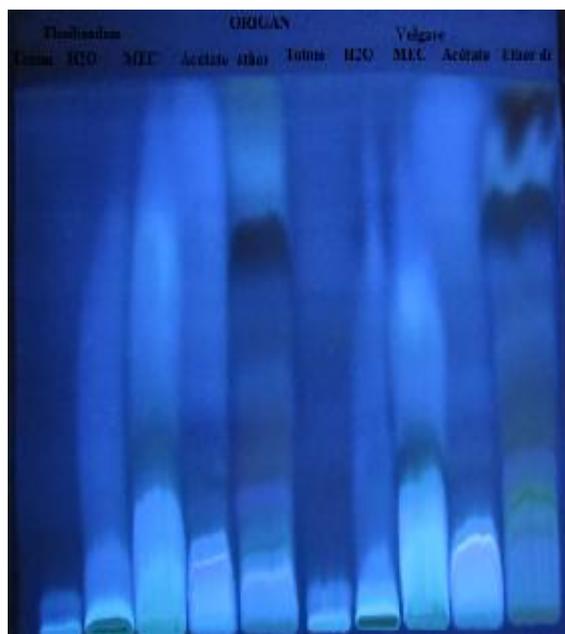
Ø Chromatogramme de la CCM analytique des deux espèces d'*Origanum*



T H₂O M A E T H₂O M A E

O. floribundum *O. vulgare*

A : visible (avant révélation)



T H₂O M A E T H₂O M A E

O. floribundum *O. vulgare*

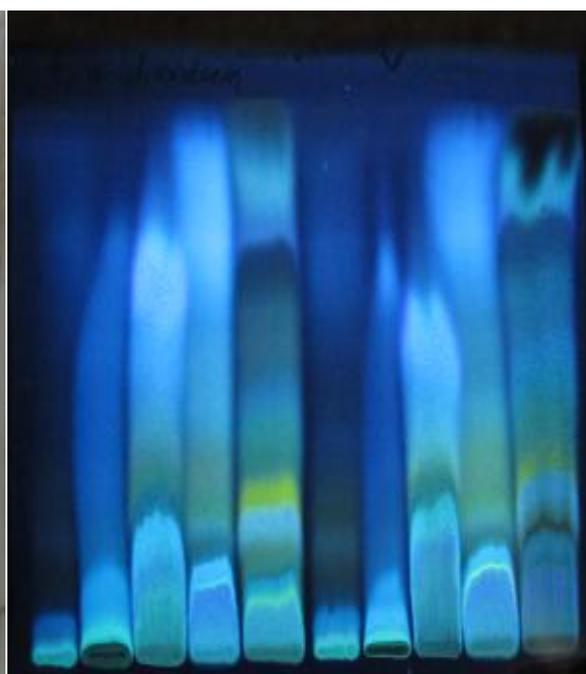
B : sous UV (avant révélation)



T H₂O M A E T H₂O M A E

O. floribundum *O. vulgare*

C : visible après révélation



T H₂O M A E T H₂O M A E

O. floribundum *O. vulgare*

D : sous UV après révélation

Figure 60 : chromatogrammes résultants de l'analyse des différents extraits (E : éther, A : acétate, M : MEC, H₂O : eau, T : Totum) d'*Origanum vulgare* (à droite) et ceux d'*Origanum floribundum* (à gauche) par chromatographie sur gel de polyamide DC6 développés dans le système solvant MEC/MeOH/EtOH/éther de pétrole (40/30/30/10 ; v/v/v/v)

Les chromatogrammes d'analyse des différents extraits des deux espèces d'*Origanum* (Figure 60) montrent l'importante présence de divers types de flavonoïdes par l'apparition des taches de différentes couleurs qui leurs sont caractéristiques. Ces taches ont des différents Rf. Le réactif de Neu les révèle en jaune, jaune vert, noir, violet, bleu. Ce qui correspond aux différentes structures moléculaires de type flavonoidiques.

Les extraits éther diéthylique des deux espèces d'Origan ont une constitution flavonique la plus importante avec 13 spots observés. L'extrait acétate d'éthyle montre 6 spots et la phase MEC 7 spots bien distincts, ce qui peut être due à la richesse de ces deux plantes principalement en aglycones et aglycones méthoxylés, puis aux flavonoïdes di-glycosylés et monoglycosides.

Les résultats de l'étude n'indiquent qu'aucune différence significative n'est observée relativement à la composition qualitative des flavonoïdes entre les extraits d'*O. vulgare* et *O. floribundum* (Figure 60). Nos résultats s'expliquent par l'appartenance de ces deux espèces dans le même genre, qui a été établie par Ietswaart en 1980. Ceci confirme ainsi le rôle des composés phénoliques et particulièrement des flavonoïdes dans la classification chimique des végétaux.

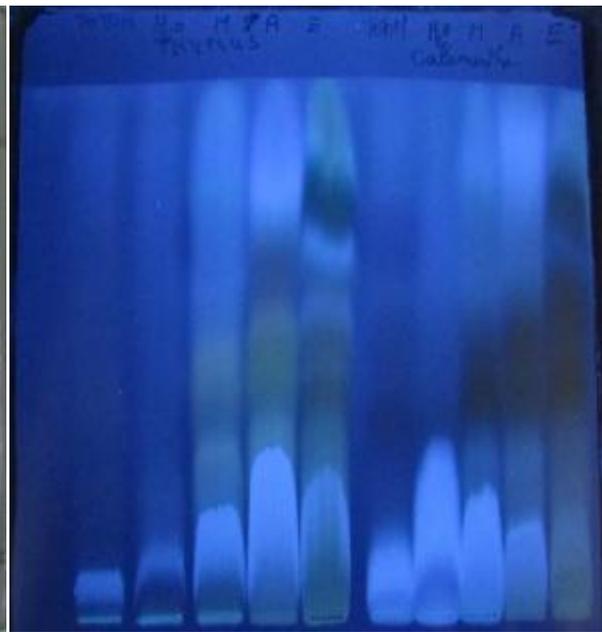
Ø Chromatogrammes de la CCM analytique de *C. grandiflora* et *T. numidicus*

Comme ceux des extraits des deux espèces d'*Origanum*, les extraits de *C. grandiflora* et ceux de *T. numidicus* montrent une bonne séparation de très bonne visibilité des spots dans le système solvant MEC/MeOH/EtOH/éther de pétrole (40/30/30/10 ; v/v/v/v). Le chromatogramme résultant (Figure 61) montre diverses couleurs sous UV à 365 nm : violet, noir, bleu, jaune. Ces différentes couleurs seront modifiées après la pulvérisation du réactif de Neu : les plus remarquables est le virage de la couleur noire au jaune fluorescent ; le violet vers l'orange. Ces dernières ont été observées sous UV à 365 nm et aussi à l'œil nu. Ceci confirme la richesse de nos extraits en flavonoïdes et particulièrement en flavones et flavonols. En effet, plusieurs études indiquent que les plantes appartenant à la famille des Lamiacées sont riches de tels types de molécules (Merghem R., 1995 ; Benkiniouar R., 2007).



T H₂O M A E T H₂O M A E
Thymus numidicus *Calamintha grandiflora*

A : visible (avant révélation)



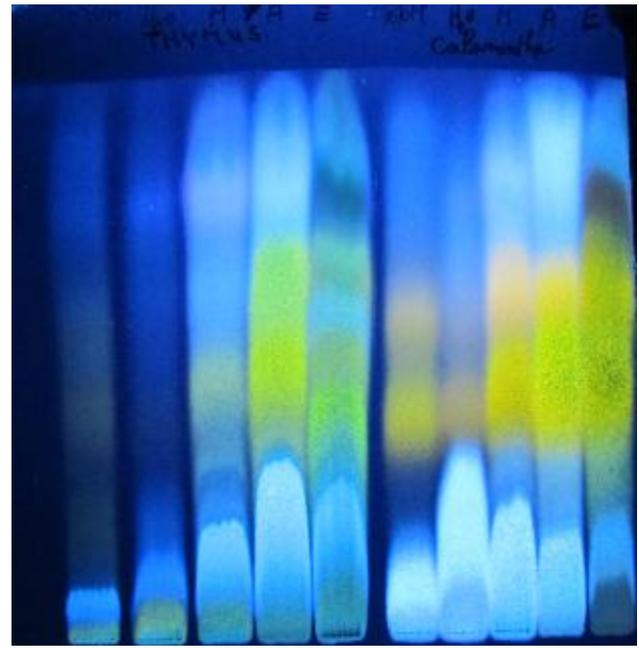
T H₂O M A E T H₂O M A E
Thymus numidicus *Calamintha grandiflora*

B : sous UV à 365nm (avant révélation)



T H₂O M A E T H₂O M A E
Thymus numidicus *Calamintha grandiflora*

C : Visible et Après révélation au réactif de Neu



T H₂O M A E T H₂O M A E
Thymus numidicus *Calamintha grandiflora*

D : Sous UV et après révélation au réactif de Neu

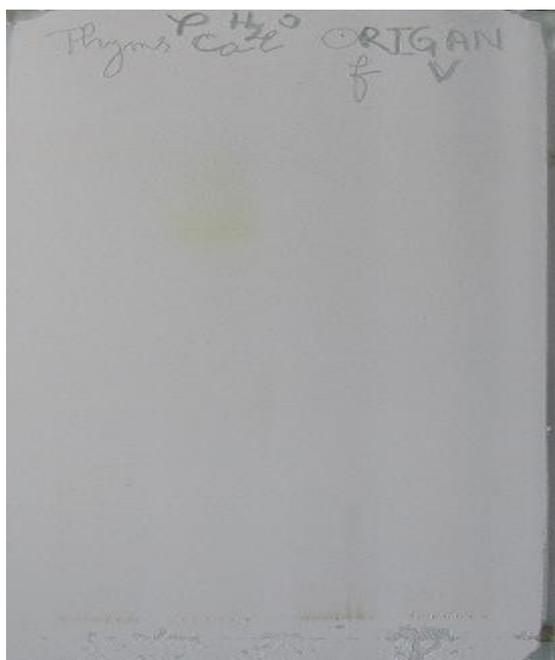
Figure 61 : chromatogrammes résultants de l'analyse des différents extraits (E : éther, A : acétate, M : MEC, H₂O : eau, T : totum) de *Calamintha grandiflora* (à droite) et ceux de *Thymus numidicus* (à gauche) par chromatographie sur gel de polyamide DC6 développé dans le système solvant MEC/MeOH/EtOH/éther de pétrole (40/30/30/10 ; v/v/v/v)

Ø Analyse des phases eau des quatre plantes médicinales

Les phases eau des quatre plantes étudiées sont développées ensemble (une autre plaque de 10X20) dans un autre système solvant : H₂O/Butanol/EtOH/HCOOH (50/20/25/2 ; v/v/v/v) ; ce dernier a donné une bonne séparation des constituants et confirme que les phases aqueuses contiennent principalement de glycosides (Figure 62).

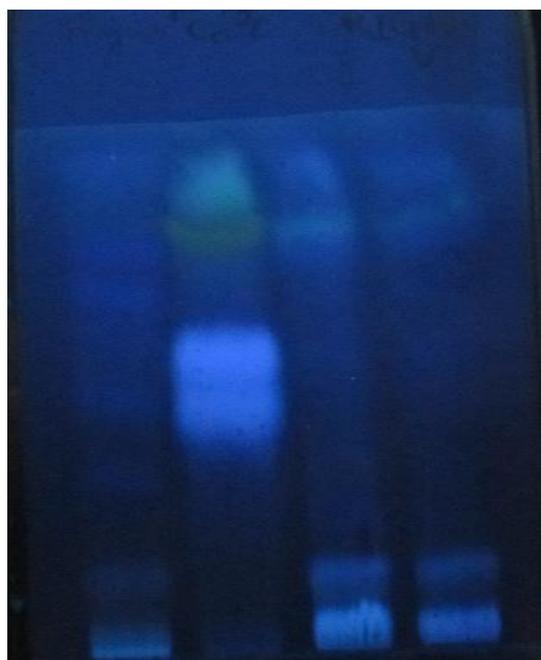
Le chromatogramme (Figure 62) montrent que les molécules des extraits d'eau présentent de différents R_f dont les plus élevés peuvent correspondre à des flavonoïdes les plus glycosylés (les plus polaires).

On peut déduire qu'à partir de ce chromatogramme, que les deux espèces d'*Origanum* : l'*Origanum vulgare* et l'*Origanum floribundum* ont une constitution flavonique homogène, témoignant encore l'importance des composés phénoliques dans la chimiotaxonomie des végétaux.



Thy Cala O.fl O.vg

A : visible avant révélation



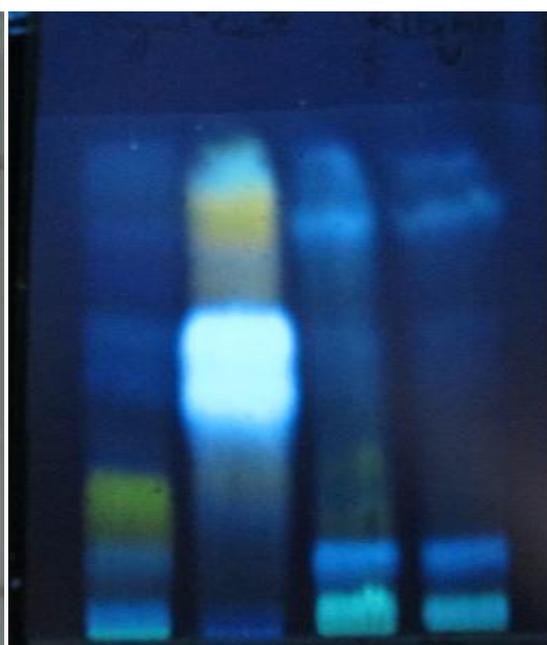
Thy Cala O.fl O.vg

B : sous UV à 365nm avant révélation



Thy Cala O.fl O.vg

C : visible après révélation



Thy Cala O.fl O.vg

D : sous UV à 365nm après révélation

Figure 62 : chromatogrammes résultants de l'analyse des extraits aqueux d'O. vg (*O. vulgare*) O. fl (*O. floribundum*), Cala (*Calamintha grandiflora*), Thy (*Thymus numidicus*) par chromatographie sur gel de polyamide DC6 développée dans le système solvant H₂O/Butanol/EtOH/HCOOH (50/20/25/2 ; v/v/v/v)

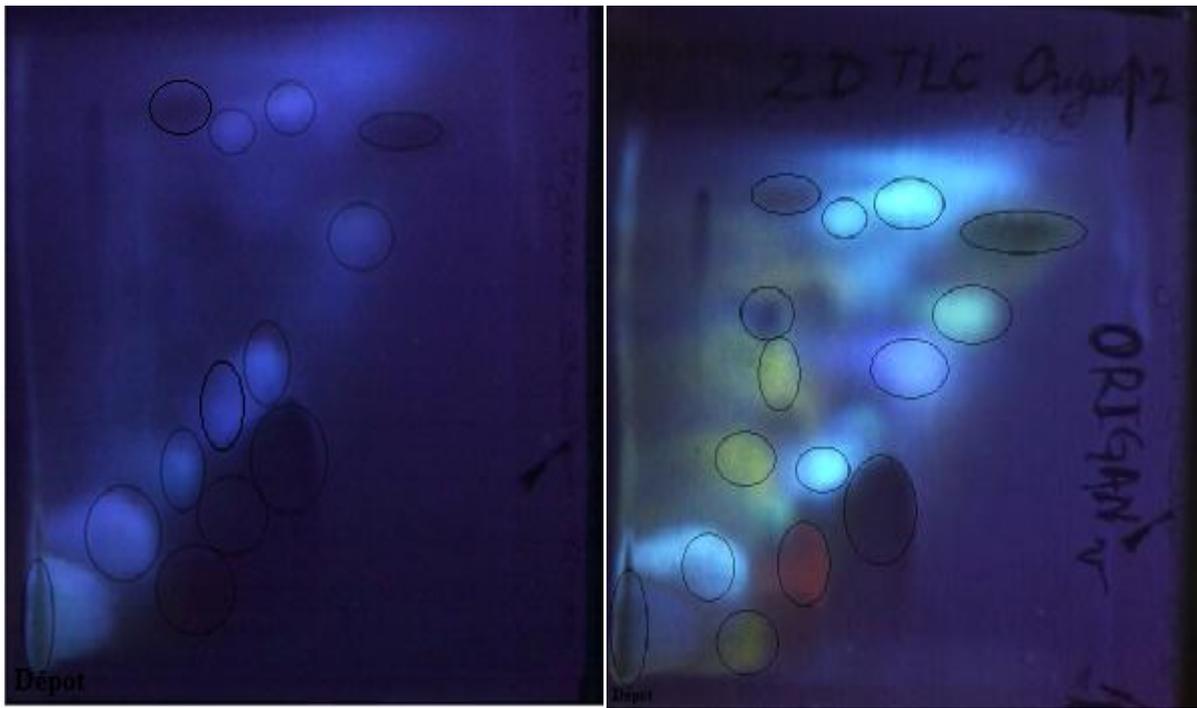
2-3-2- CCM bidimensionnelle (2D-TLC)

L'analyse par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince répond à un double objectif : d'une part avoir un maximum d'empreintes flavoniques des extraits de plantes médicinales testées et d'autre par faire une étude comparative entre les cartogrammes résultants. Quatre plaques de polyamide de (20X20) ont été utilisées (une pour chaque plante), le dépôt se fait sur le bas droit de la plaque sur une longueur de 1cm. Les extraits éther, acétate et MEC (de chaque plante médicinale) sont ceux qui ont été déposés.

La séparation a été réalisée en deux dimensions : la première avec le système : MEC/ETOH/MeOH/éther de pétrole (40/30/30/10 ; v/v/v/v) entraînant les aglycones et la deuxième avec le système : H₂O/Butanol/ETOH/acide formique (50/20/25/2 ; v/v/v/v) entraînant les glycosides. La révélation a été faite sous UV à 365nm avant et après la pulvérisation du réactif de Neu.

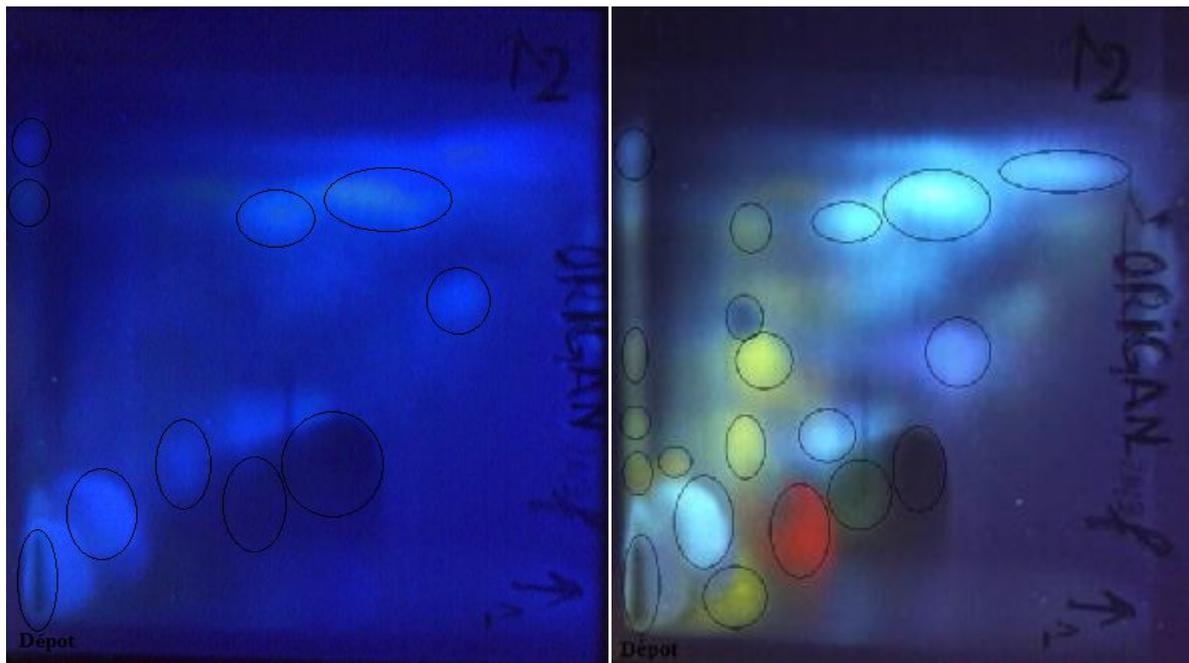
Ce deuxième diagnostic de nos extraits de plantes médicinales a permis de visualiser leur chimisme phénolique. En effet, la chromatographie bidimensionnelle est utile pour résoudre les problèmes analytiques rencontrés lors de la séparation des composés les plus complexes. Cette méthode de détection montre une bonne séparation de nos molécules repérées dans les chromatogrammes sous forme de cercle. Nos chromatogrammes (Figure 63 et 64) montrent la richesse de nos extraits en composés phénoliques et particulièrement en flavonoïdes. Elle permet de visualiser presque une vingtaine de taches pour les extraits d'*Origanum floribundum*, dix sept pour les extraits de *Thymus numidicus*. Le cartogramme de *Calamintha grandiflora* montre des taches jaune et bleu vert et une seule tache orange. Quelques taches au niveau du cartogramme d'*O. floribundum* (en jaune et en violet) et d'autres dans le cartogramme de *Thymus numidicus* (en jaune) migrent uniquement en dimension aqueuse et correspondent probablement à des glycosides complexes (diglycosides, triglycosides, C- glycosides).

Les flavonoïdes sont fluorescents comme d'autres métabolites secondaires sous UV 365nm. Les taches jaune correspondent aux flavonols et/ou aurones ; les flavones méthylés sont bleu ou pourpre. Après la pulvérisation du réactif de Neu, les couleurs rouge (sous UV et visible), jaune, jaune verdâtre ou même orange ont été visualisées dans les cartogrammes et qui correspondent respectivement aux dérivés d'apigénine, de lutéoline, celles de kaempférol et de quercétol.



A-1

A-2

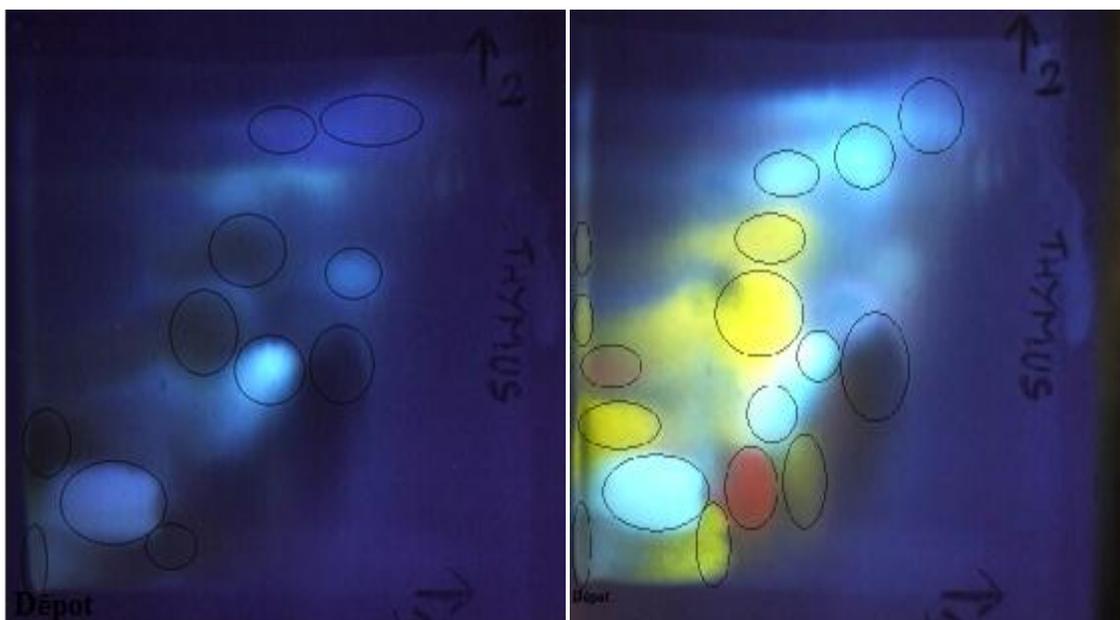


B-1

B-2

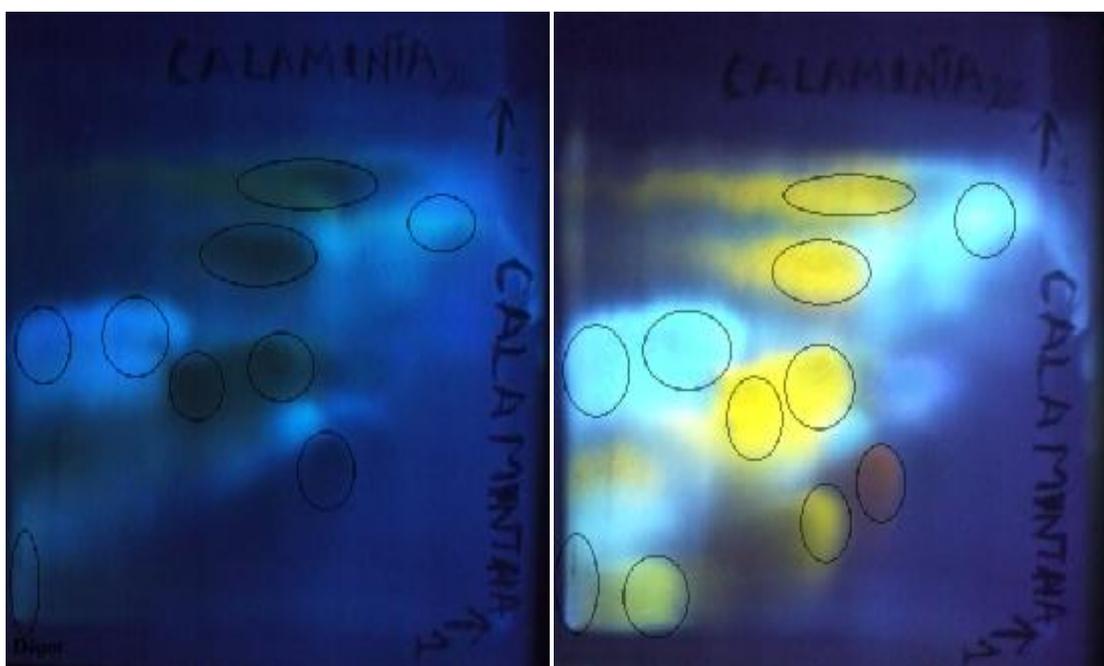
Figure 63 : Diagnostic sur chromatographie bidimensionnelle sur couches minces des extraits d'*Origanum vulgare* sous UV à 365nm (A-1 : avant révélation ; A-2 : après révélation au réactif de Neu) et ceux d'*Origanum floribundum* sous UV à 365nm (B-1 : avant révélation ; B-2 : après révélation au réactif de Neu)

→ 1 : première dimension ; ↑ 2 : deuxième dimension



C-1

C-2



D-1

D-2

Figure 64: Diagnostic sur chromatographie bidimensionnelle sur couche mince des extraits de *Thymus numidicus* sous UV à 365nm (C-1 : avant révélation ; C-2 : après révélation au réactif de Neu) et ceux de *Calamintha grandiflora* sous UV à 365nm (D-1 : avant révélation ; D-2 : après révélation au réactif de Neu).

→ 1 : première dimension ;

↑ 2 : deuxième dimension

La comparaison entre nos chromatogrammes des quatre plantes médicinales révèle la présence des taches identiques et d'autres différentes. Des taches de couleur rouge, violette, noire et aussi quelques taches jaune sont communes pour le cartogramme d'*O. vulgare* et d'*O. floribundum*, et celle de *Thymus numidicus*. En plus, une tache jaune verdâtre se trouve au niveau des quatre chromatogrammes et qui a migré uniquement en première dimension, elle semble être un aglycone. Ces résultats sont valables dans la mesure où ce type de composés de métabolites secondaires participe à la « chimiotaxonomie ». Il est d'ailleurs intéressant de constater que les systèmes de classification morphologiques sont souvent confirmés par l'étude chimiotaxonomique. Sachant qu'il existe des races flavoniques qui correspondent aux cercles taxonomiques reconnue et d'autres qui ne correspondent pas à ce cercle (Bruce A.B., 1987).

Les travaux de Merghem R. et ses collaborateurs en 1995 ont été menés sur le *Thymus hirtus*, permettent d'identifier cinq dérivés de flavonoïdes de type flavone (apigénine et lutéoline) et de flavonol (quercétine et kaempférol). Benkiniouar R. et son équipe (2010) ont identifié cinq aglycones à partir du *Thymus numidicus* qui sont : apigénine, lutéoline, xanthomicrol (5,4' di-OH, 6, 7,8-triméthoxy-flavone), sideritoflavone (5,3',4' trihydroxy-6,7, 8 triméthoxyflavone) et 5-desméthylsinensetin (5-OH- 6,7, 3',4' tétra-méthoxyflavone).

Les travaux de Skoula M. et son équipe (2008) ont été réalisés sur plusieurs espèces d'*Origanum* parmi lesquelles l'*O. vulgare* et *O. floribundum* d'origine algérienne. Ils ont effectués une analyse par l'HPLC, l'MS et l'RMN, leurs résultats montrent neuf (9) composés flavonoidiques communs parmi lesquels (apigénine, naringénine, ériodictyol, taxifolin...) mais ayant des concentrations différentes entre eux. De plus, l'*O. floribundum* se distingue d'*O. vulgare* par la présence d'un autre composé : 5,6- dihydroxy-7, 8, 4'-triméthoxyflavone (pebrellin).

2-3-3-Séparation et identification structurale

2-3-3-1- Séparation et purification des flavonoïdes

Les fractions collectées à partir de la chromatographie sur colonne (Tableau 21), sont évaporées à sec et récupérées dans le méthanol et analysées. Leurs spectres d'absorption ont été enregistrés suivi par le diagnostic de la CCM analytique (Figure 65, Tableau 22) pour ceux qui donne un spectre caractéristique. La révélation à été faite sous UV à 365nm après pulvérisation du réactif de Neu.

Tableau 21 : Mode de fractionnement sur colonne des produits à analysés

Solvant d'éluion Toluène %- Ethanol%	Nombre de fraction
100-0	4
80-20	4
60-40	4
50-50	4
0-100	3
Acétone 100%	4



F4

F2 F1

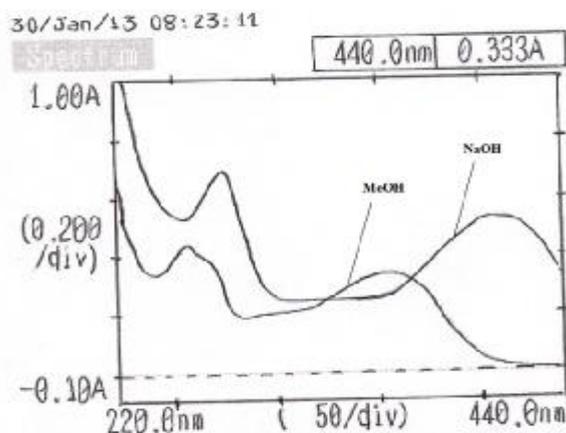
Figure 65 : Chromatogramme d'analyse des fractions lors de la CCM analytique développé dans le système solvant MEC/MeOH/EtOH/éther de pétrole (40/30/30/10 ; v/v/v/v) (F1 : fraction 1 100% éthanol, F2 : fraction 2 100% éthanol, F4 : fraction 4 60% toluène)

Tableau 22 : Interprétation du chromatogramme du CCM analytique des différentes fractions de la phase acétate d'éthyle de *Calamintha grandiflora*

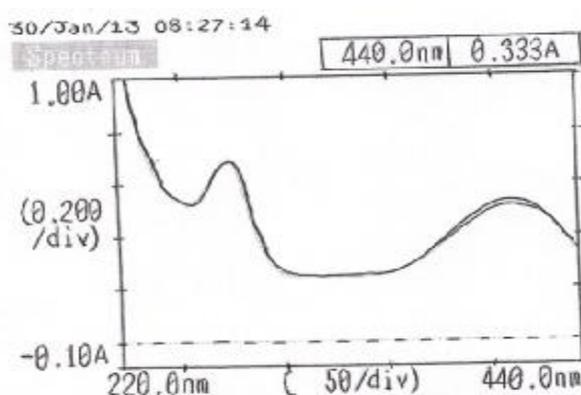
Fraction	Nombre de molécule	RF	Couleur sous UV-NA	Fraction	Nombre de molécule	Rf	Couleur
1 : 100% éthanol	1	0,59	Jaune orangée	2 : 60% Toluène	1	0,9	Bleu
2 : 100% éthanol	1	0,59	Jaune	2 : 80% Toluène	2	0,59	Jaune fluorescent
						0,76	Bleu
3 : 50% éthanol	3	0,59	Jaune	1 : 80% Toluène	1	0,77	Bleu
		0,70	Orangée	4 : 60% Toluène	1	0,35	Jaune
		0,85	Bleu				
4 : 50 % éthanol	2	0,64	Jaune fluorescent				
		0,82	Orangée				

2-3-3-2- analyse structurale des molécules isolées

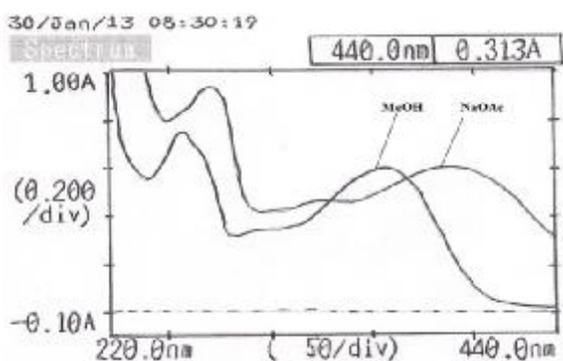
Ø Identification structurale de la fraction 1 dans 100% EtOH



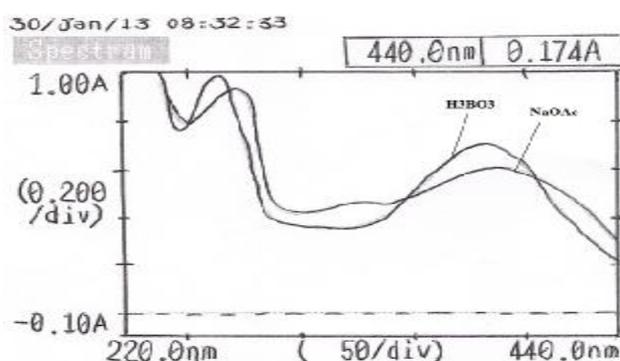
Spectre MeOH et après l'ajout de NaOH



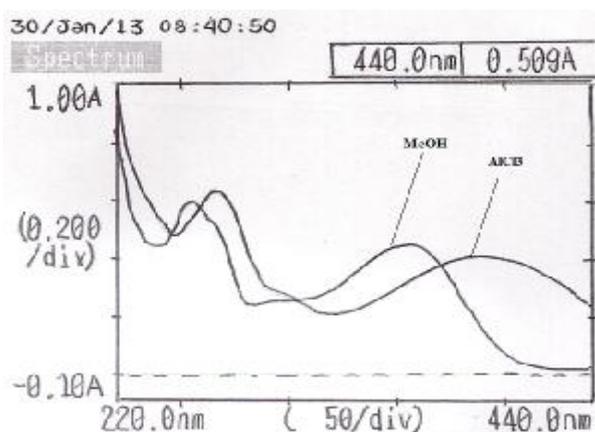
Après 5 min d'ajout de NaOH



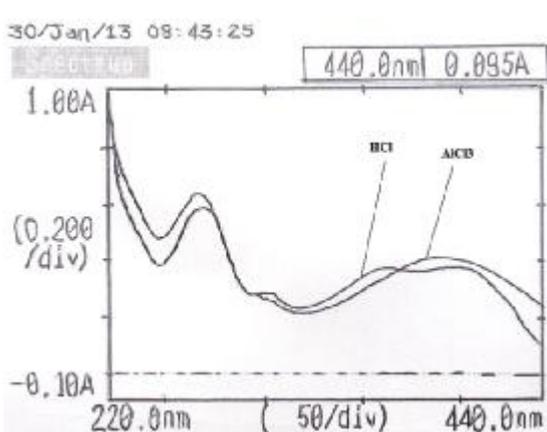
Spectre MeOH et après l'ajout de NaOAc



Spectre NaOAc et après l'ajout de H₃BO₃



Spectre MeOH et après l'ajout de AlCl₃



Spectre AlCl₃ et après l'ajout de HCl

Figure 66: Analyse spectrale de la fraction 1 (100% éthanol)

Tableau 23 : Interprétation des déplacements observés par analyse spectrophotométrique UV de la fraction 1 (100% EtOH) d'après Markham K.R. (1982)

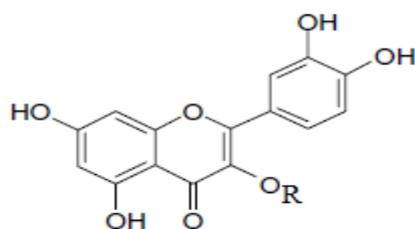
Réactif de déplacement	Bande I (nm)	Bande II (nm)	Interprétation
MeOH	356.5	257	Flavonol avec OH-3 substitué
NaOH (base forte)	409.0 (+52,5nm)	265	OH-4'
AlCl ₃	391 (+34,5nm)	265	OH-5
AlCl ₃ /HCl	397,5 364	299,0 269,0	
NaOAc (base faible)	387.5 (+31nm)	326,0 270,0	OH-7
NaOAc/H ₃ BO ₃	382,5 (+26nm)	263,5	Ortho di-OH 3', 4'

Cette fraction se présente sous forme d'une bande violette sombre sous UV et jaune orangée après révélation au réactif de Neu (Rf=0,59) (Figure 65) et son spectre UV est caractéristique d'un flavonol à 3 OH substitué avec des maxima à 256 et 355 nm (Markham K.R., 1982). L'ajout de réactif NaOH conduit à un déplacement bathochrome (+52,5nm) avec augmentation de l'intensité, ce qui prouve qu'il y'a un OH libre en 4' (Tableau 22).

L'effet bathochrome de la bande II (+34,5nm par rapport à celui enregistré dans le méthanol) suite à l'ajout d'AlCl₃ est en faveur d'un hydroxyle (OH) libre en 5. Cet effet est confirmé par le déplacement bathochrome (+41nm) de la bande II enregistré à la présence d'AlCl₃ plus HCl par rapport à celui enregistré dans le méthanol.

L'effet bathochrome de la bande II (+31nm) après l'addition d'NaOAc par rapport à celui enregistré dans le MeOH est en faveur d'un hydroxyle libre en 7. Un système ortho di-OH en 3' et 4' est confirmé si on compare le spectre en présence d'NaOAc et l'acide borique avec celui qui est tiré dans le méthanol (+ 26nm).

Les observations ci-dessus (Figure 66 ; Tableau 24) nous permettent de mettre une première hypothèse structurale de la fraction 1 (100% EtOH)



Structure proposée de la fraction 1 (100% dans l'EtOH) : 3 glycosyl de quercétine

Les travaux de Benkiniouar R., (2009) ont confirmé la présence de la quercétine -3- glucosyl par les différentes techniques spectrométriques.

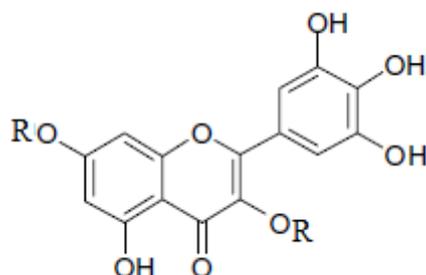
Ø Identification structurale de la fraction 2 (100% EtOH) :

Les spectres UV ont été tirés de la même manière que la précédente (Annexe 3)

Tableau 24 : Interprétation des déplacements observés par analyse spectrophotométrique UV de la fraction 2 (100% EtOH) d'après Markham K.R. (1982).

Réactif de déplacement	Bande I (nm)	Bande II (nm)	Interprétation
MeOH	345,0	253	Flavonol avec OH-3 substitué
NaOH (base forte)	403.0 (+58nm)	274	OH-4' ; OR-7
AlCl ₃	371,5 (+34,5nm)	265,5	OH-5 3',4', 5' tri-OH
AlCl ₃ /HCl	352,5	298,5 269,0	
NaOAc (base faible)	344	270,0	OR-7 confirmation
NaOAc/H ₃ BO ₃	371,5 (+26nm)	261	Ortho di-OH 3', 4'

D'après ces données, on suppose la structure suivante:



Structure proposée de la fraction 2 dans 100% éthanol (di- glycosyl de myricétine)

Ø

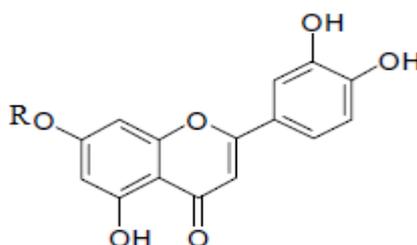
Ø Identification structurale de la fraction 4 (60% toluène)

Les spectres UV de cette molécule sont donnés dans l'Annexe 3. Le Tableau 26 résume les données spectrales :

Tableau 25 : Interprétation des déplacements observés par analyse spectrophotométrique UV de la fraction 4 (60%Toluène) d'après Markham K.R. (1982)

Réactif de déplacement	Bande I (nm)	Bande II (nm)	Interprétation
MeOH	329,0	289	Flavone
NaOH (base forte)	374,0 (+45nm)	305	OH-4' ; OR-7
AlCl ₃	356,0 (+27nm)	265,5	OH-5 3',4' di -OH
AlCl ₃ /HCl	301, 0 (-28nm)	-	
NaOAc (base faible)	328,0	288,0	OR-7 confirmation
NaOAc/H ₃ BO ₃	347,0 (+18nm)	-	Ortho di-OH 3', 4'confirmation

D'après ces données, on suppose la structure suivante

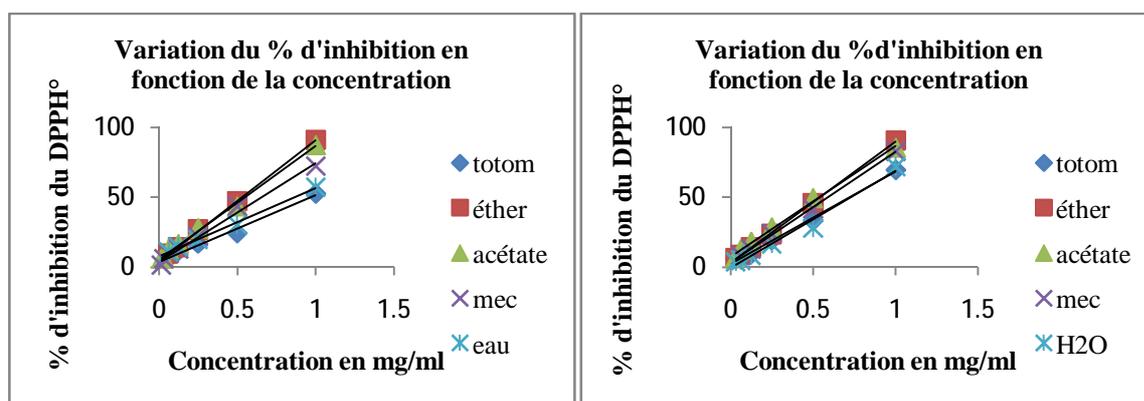


Lutéoline 7-O glycosyl

3- Le pouvoir antioxydant « test au DPPH° »

3-1-Le pouvoir antioxydant des deux espèces d'Origan

Les courbes de régression (Figure 67) et l'histogramme (Figure 68) et leurs résultats sont annotés dans le Tableau 26



Les équations de régression des courbes (de chaque extrait) ont été données dans l'Annexe 4

Figure 67 : L'estimation de l'EC₅₀ de l'extrait brut et de ses fractions d'*Origanum vulgare* (à droite) et d'*Origanum floribundum* (à gauche)

Tableau 26 : L'activité scavenger du radical du DPPH par l'*Origanum vulgare* (*O. vulgare*) et d'*Origanum floribundum* (*O. floribundum*)

Extrait	<i>Origanum vulgare</i>		<i>Origanum floribundum</i>	
	% d'inhibition à 1mg/ml	EC ₅₀ en (mg/ml)	% d'inhibition à 1mg/ml	EC ₅₀ en (mg/ml)
Totum	52,82	0,988±0,14	69,72	0,718±0,06
Edi	90,9	0,529±0,05	90,68	0,510±0,007
AcOEt	87,28	0,530±0,032	85,42	0,536±0,07
Mec	72,26	0,564±0,03	82,93	0,594±0,08
H ₂ O	57,3	0,872±0,031	72,02	0,784±0,11

Les valeurs représentent la moyenne de deux essais± Ecartype

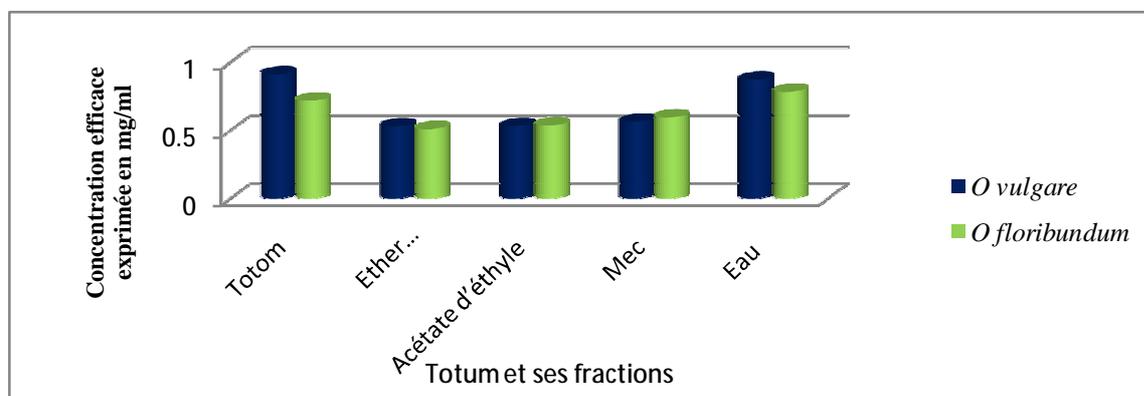


Figure 68 : Histogramme comparatif du pouvoir antioxydant des deux espèces d'*Origanum*

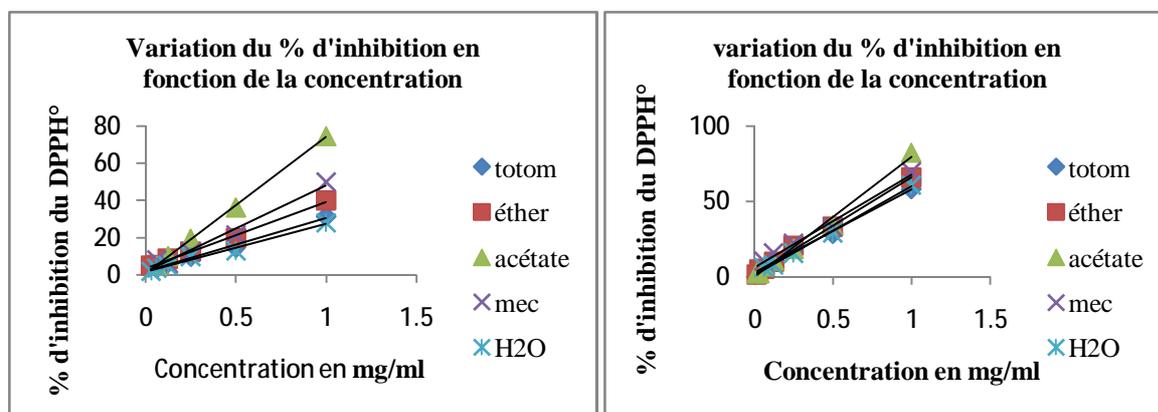
Les différents extraits des deux espèces d'*Origanum* démontrent un pouvoir antioxydant important puisqu'ils agissent à de faible dose (inférieur à 1mg/ml). Mais, ce pouvoir est faible par rapport aux antioxydants de référence testés : en comparaison avec l'extrait le plus actif (l'extrait éther d'*O. floribundum*), l'acide gallique et la quercétine sont 8 fois plus élevés, 5 fois plus élevé pour l'acide tannique (Tableau 17).

Le pouvoir antioxydant est presque semblable entre les extraits de ces deux espèces. Ainsi les extraits éther, acétate et MEC de ces deux plantes ont un EC₅₀ entre 0,510±0,007 et 0,594±0,08 mg/ml respectivement pour l'extrait éther de d'*O. floribundum* et l'extrait MEC de la même plante. Leur pourcentage d'inhibition allant de 72,26% à 90,9% à une concentration de 1mg/ml. Les différences enregistrées entre ces deux espèces sont marquées pour les extraits H₂O : celle d'*O.floribundum* est le plus actif avec un EC₅₀ égal à 0,784±0,11 mg/ml (inférieur à celle d'*O. vulgare* qui est égal à 0,872±0,031mg/ml).

Le pouvoir antioxydant de notre extrait brut d'*O. floribundum* est si proche de celui de l'extrait méthanolique d'*Origanum vulgare spp hirtum* étudié par Lagouri V. et al. (2011) (0,78mg/ml) mais il est assez loin de celui de Perez M.B. et al. (2011) : EC₅₀ égal à 11,42 mg/ml et de Lee C.J. et al. (2011) : EC₅₀ d'*Origanum majoranum* égale à 0,1mg/ml. La différence entre les résultats peuvent être expliquée par la différence dans la méthodologie appliquée, l'origine des plantes étudiées, la partie testée (feuilles, fleurs...), la méthode d'extraction...tous ces facteurs peuvent avoir une influence sur la composition chimique de l'extrait et par conséquent sur leurs pouvoirs antioxydants.

3-2-Le pouvoir antioxydant de la *Calamintha grandiflora* et celui de *Thymus numidicus*

Les courbes de régression (Figure 69) et l'histogramme de *C. grandiflora* et *T. numidicus* (Figure 70) et leurs résultats sont reportés dans le Tableau 27



Les équations de régression des courbes (de chaque extrait) ont été notées dans l'annexe 4

Figure 69: L'estimation de l'EC₅₀ de l'extrait brut et de ses fractions du *Calamintha grandiflora* (à droite) et celle de *Thymus numidicus* (à gauche)

Tableau 27 : L'activité scavenger du radical du DPPH° du *C. grandiflora* et *T. numidicus*

Extrait	<i>Calamintha grandiflora</i>		<i>Thymus numidicus</i>	
	% d'inhibition à 1mg/ml	EC ₅₀ (en mg/ml)	% d'inhibition à 1mg/ml	EC ₅₀ (en mg/ml)
Totum	31,41	1,675±0,16	58,41	0,878±0,08
Ether diéthylique	39,86	1,305±0,17	65,9	0,769±0,18
Acétate d'éthyle	74,53	0,672±0,02	82,54	0,625±0,003
MEC	49,98	1,01±0,1	69,81	0,726±0,1
Eau	27,94	1,865±0,13	60,75	0,744±0,18

Les valeurs représentent la moyenne de deux essais± Ecartype

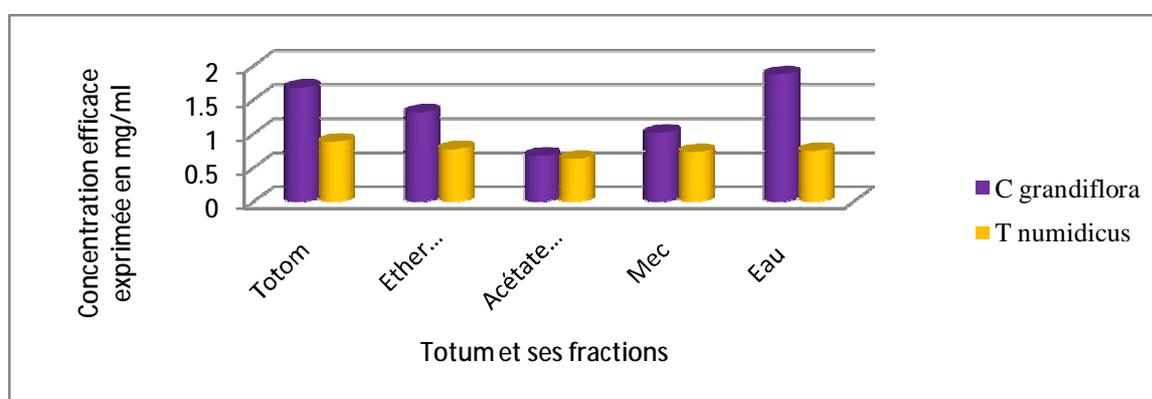


Figure 70 : Histogramme comparatif du pouvoir antioxydant de la *Calamintha grandiflora* et celle de *Thymus numidicus*

Parmi les extraits de *C. grandiflora*, la fraction acétate est la plus active avec un EC₅₀ égal à 0,672mg/ml et pourcentage d'inhibition égal à 74,53% à 1mg/ml, suivi par la fraction MEC qui a un EC₅₀ égal à 1,01. Le pouvoir antioxydant de la fraction éther est intermédiaire avec un EC₅₀ de 1,309. Le totum a un EC₅₀ égal à 1,671mg/ml. La fraction eau semble être la moindre active avec un EC₅₀ égal à 1,871 et un pourcentage d'inhibition de 27,94% à 1mg/ml.

Concernant le pouvoir antioxydant du *T. numidicus*, la fraction acétate est la plus active et a un EC₅₀ égal 0,625mg/ml suivi par la fraction MEC avec un EC₅₀ de 0,726mg/ml et la fraction eau qui a un EC₅₀ égal à 0,744. La fraction éther et le totum sont moins actives avec un EC₅₀ égal à 0,769 et 0.878mg/ml respectivement.

Le pouvoir antioxydant de l'extrait AcOEt de *C. grandiflora* peut être en relation avec la présence notamment d'un dérivé de la quercétine et l'autre d'un myricétine (deux flavonols). Ces deux derniers montrent toutes les caractéristiques structurales pour conférer

une forte activité antiradicalaire (fonction catécol, double liaison, OH en 3). Pour plus de détail voir le Tableau 02.

3-3-Relation contenu phénolique- pouvoir antioxydant des quatre plantes médicinales testées

La corrélation entre l'activité antioxydante et le contenu phénolique total des plantes de la famille des Lamiacées a été étudiée par plusieurs auteurs. Wojdylo A. et al. (2007) ; Djeridane et al. (2006) et Shan et al. (2005) ont trouvé une forte corrélation linéaire entre ces paramètres. Par contre, Capecka et al. (2005) ont reporté une faible corrélation chez les Lamiacées. Prenant le cas d'*Origanum vulgare* comme un exemple : la corrélation entre le pouvoir antioxydant (exprimé par l'inverse de la concentration efficace ($1/EC_{50}$]) avec le contenu phénolique (A1) et/ou flavonoïdique (A2) a été présentée Figure 76.

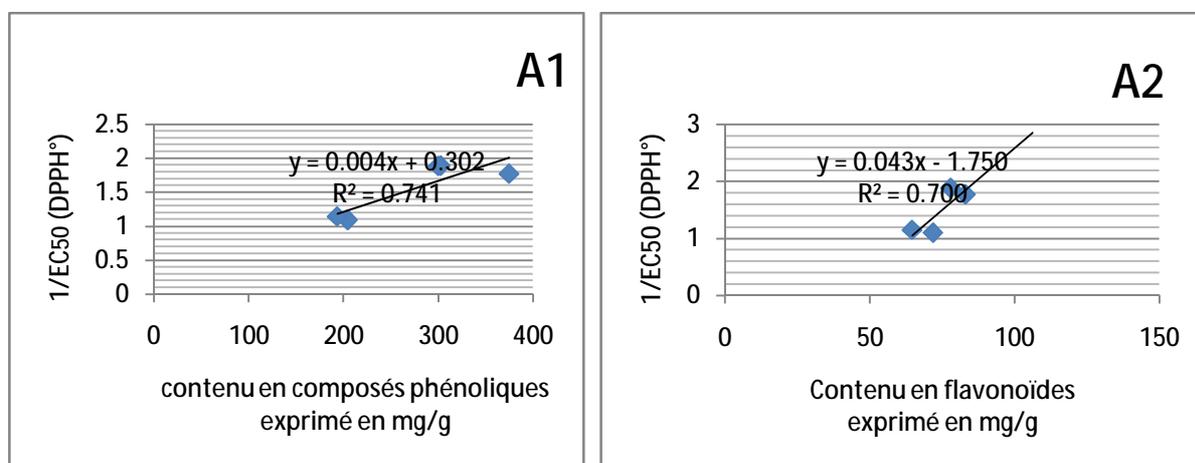


Figure 71: Les courbes de corrélation entre le contenu phénolique et le pouvoir antioxydant (exprimé par $1/EC_{50}$) (cas d'*Origanum vulgare*)

Les coefficients de corrélation (R^2) que nous avons obtenu varient d'une plante à une autre. L'*Origanum vulgare* étant pris comme exemple dont leurs courbes de régressions sont représentées dans la Figure 71. Le coefficient de corrélation entre la teneur des extraits en composés phénoliques et leurs pouvoirs antioxydants est linéaire et significatif ($R = 0,74$) pour les cinq extraits de la plante, qui devient hautement significatif (non mentionné) ($R = 0,98$), excepté l'extrait MEC. Les 74% à 98% de la capacité antioxydante des extraits d'*O. vulgare* est dû à la contribution des composés phénoliques qui sont des antioxydants dominants. La corrélation (DPPH, flavonoïdes) de la même plante (*Origanum vulgare*) est modérée ($R^2 = 0,54$) et devient significative ($R^2 = 0,7$) (excepté l'extrait éther) (Figure A2).

Sachant que la méthode de DPPH° est indépendante de la polarité du substrat. En d'autres termes, l'hydro-lipophilé du substrat n'a pas d'effet sur l'activité antioxydante (Nickavar B., Esbati N., 2012). La faible corrélation entre le contenu phénolique/ flavonoïdes et le pouvoir antioxydant peut être expliquée par la dépendance de cette dernière à la nature physico-chimique des composés phénoliques individuels présents dans les extraits que dans le contenu phénolique estimé par la méthode de Folin-Ciocalteu. De plus, elle peut aussi indiquer que la concentration critique en composés phénoliques et/ou flavonoïdes est suffisante pour obtenir une activité antioxydante désirée après laquelle il y'a un effet de saturation par la présence d'autres composés phénoliques ne pouvant augmenter l'activité antioxydante.

Discussion générale

Ø Discussion sur la partie phytochimique

Nos résultats du dosage colorimétrique via le réactif de Folin-Ciocalteu et au chlorure d'aluminium, nous permettent de donner une idée sur la teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes totaux. Les extraits de plantes médicinales avaient des teneurs élevées comparées aux extraits de céréales alimentaires.

Le son d'orge et l'Origan étant marqués par leurs teneurs élevées respectivement pour les céréales alimentaires et les plantes médicinales. Entre ces deux derniers, l'Origan est 4 fois plus supérieur dans ses teneurs en composés phénoliques par rapport au son d'orge (Tableau 12 et 19).

L'étude comparative entre les plantes médicinales et les céréales alimentaires a été peu traitée. Wojdylo A. et *al.* (2007) ont fait une étude comparative entre plusieurs espèces appartenant à plusieurs familles botaniques mais n'inclut pas la famille des céréales.

Cette large différence trouverait une explication dans les diverses sources de variations qui peuvent être d'ordre intrinsèques ou extrinsèques. Les composés phénoliques comme tous les produits du métabolisme secondaire ont une répartition quantitative inégale selon les espèces (génotype), les organes (feuilles, graines...), et les tissus et les stades physiologiques.

A la récolte, les grains de céréales se trouvent à l'état de dormance, le métabolisme cellulaire se situe dans ses conditions de base. Les composés phénoliques présents alors dans un grain ne constituent que des molécules « starters » ou précurseurs. Ces derniers se trouvent principalement dans les tissus qui restent encore vivants de la graine : la couche d'aleurone du son et le scutellum du germe. D'après Quattrocchio F. et *al.* (2006), au départ, les enzymes du métabolisme primaire peuvent déjà avoir produit de petites quantités de plusieurs flavonoïdes simples, du fait d'un manque de spécificité complète pour le substrat de ces enzymes.

Les composés phénoliques de la graine ont un rôle important dans sa défense au cours de sa maturation et de sa germination. La reprise de la respiration et du processus métabolique, les « starters » vont initier les voies de biosynthèse et seront par la suite diversifiés.

Les facteurs environnementaux (climat, lumière...) peuvent jouer aussi un rôle important dans cette différence. D'autres facteurs peuvent influencer le contenu phénolique : la nature du matériel végétal investigué, la méthode d'extraction, la taille des particules de l'échantillon, les conditions, le temps du stockage et la présence des substances d'interférences telles que les cires, lipides et chlorophylle (Knežević S.V. et *al.*, 2012).

Les composés phénoliques des céréales ont la particularité d'être beaucoup plus liés aux parois cellulaires (jusqu'à 80%) (Liyana –Pathirana et Shahidi, 2007 ; Verma B. et *al.*, 2009) et jouent ainsi un rôle structural. Pour cela, l'extraction de ce type de matériel végétal nécessite préalablement une hydrolyse (acide, basique, ou enzymatique). Celle-ci a été évitée pour empêcher la modification chimique de nos molécules.

L'intérêt porté aux composés phénoliques n'est pas seulement d'ordre quantitatif. Vitaglione P. et *al.* (2008), indiquent qu'une présence continue d'une concentration relativement faible en composés phénoliques peut avoir des potentiels bénéfiques pour la santé en comparaison avec une observation immédiate d'un pic de concentration élevée en antioxydant dans le plasma après l'ingestion des aliments riches en composés phénoliques libres. Les composés phénoliques liés aux parois cellulaires sont résistants à l'action des enzymes humaines, et peuvent survivre dans l'estomac et l'intestin grêle et ainsi peuvent atteindre le côlon. La microflore colique peut libérer les composés phénoliques liées à travers la fermentation et ainsi fournir des éléments bénéfiques pour la santé dans le côlon ou autres tissus après leurs absorption (Okarter N. et *al.*, 2010).

Du point de vue qualitatif, le contenu phénolique de nos extraits a été mis en évidence par des techniques chromatographiques (CCM) comme le précise le chromatogramme comparatif ci-dessous (Figure 72) :

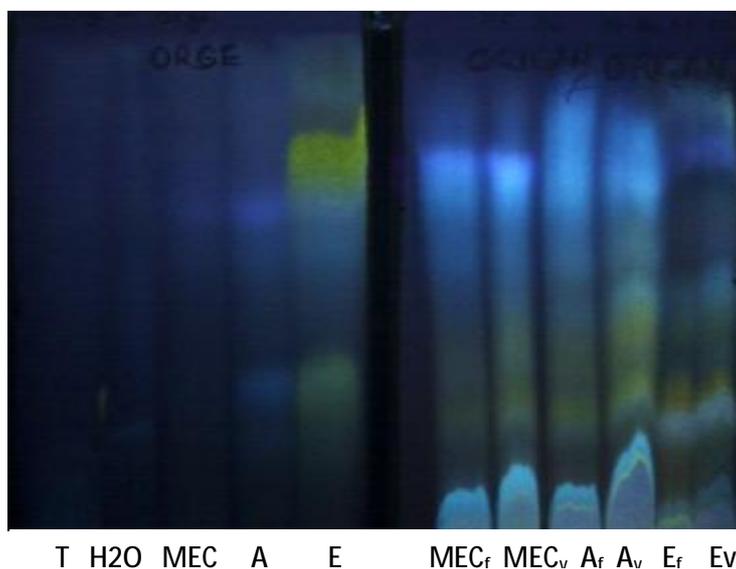


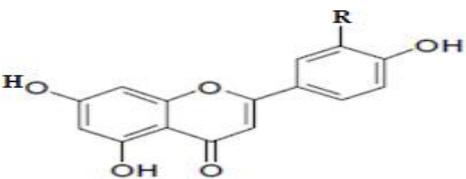
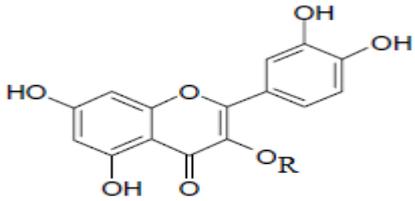
Figure 72 : Chromatogramme CCM comparatif entre les céréales alimentaires (son d'orge) et les plantes médicinales (Origan)

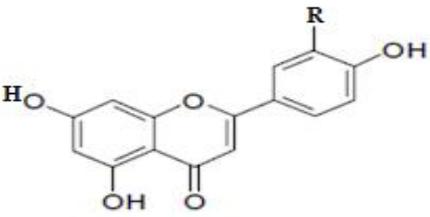
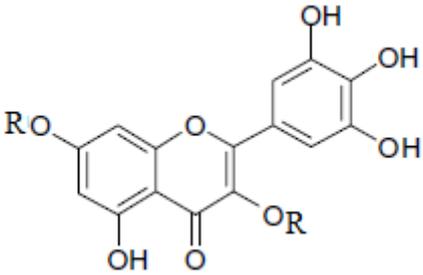
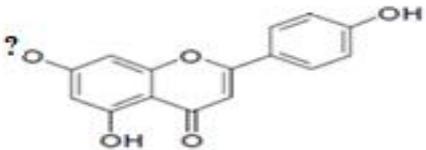
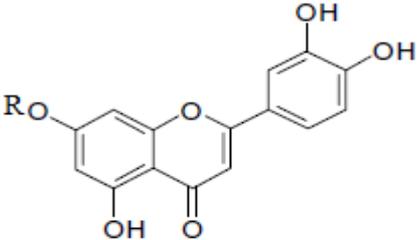
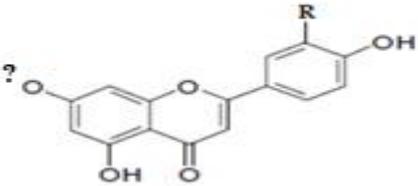
Ce chromatogramme montre que les plantes médicinales ont une constitution flavonique plus importante, plus diversifiée que celle des céréales alimentaires (cas d'orge) (couleur, nombre de spot).

Deux hypothèses ont été formulées, en ce qui concerne les avantages liés à la production de flavonoïdes, d'après Markham K.R. (1988), les flavonoïdes ont été considérés efficaces comme « écran solaire » contre le rayonnement UV depuis l'apparition des plantes sur terre. En revanche, Stafford (1991) a soutenu que la première fonction des flavonoïdes était de réguler le niveau des hormones végétales, il affirme que cette hypothèse est plus probable que l'hypothèse de protection UV car les enzymes de la biosynthèse vraisemblablement au début n'étaient pas aussi efficaces que les enzymes actuelles, et donc de grandes quantités de flavonoïdes ne sont pas probablement accumulées plus tôt. Il faut garder à l'esprit que la biosynthèse des flavonoïdes est un résultat de gènes, de structure et de régulation.

Un essai d'identification structurale a été effectué. Après l'isolement des molécules par la chromatographie sur couche mince préparative (pour les céréales) et la chromatographie sur colonne pour les plantes médicinales, on a pu mettre les premières hypothèses sur la structure de nos molécules. Le tableau suivant résume les molécules identifiées (Tableau 28).

Tableau 28 : La comparaison entre les composés phénoliques isolés des céréales alimentaires et celles de plantes médicinales.

Céréales alimentaires	Plantes médicinales
	
Dérivé d'apigénine ou lutéoline (flavone)	Quercétine 3-glycosyl (flavonol)

	
Dérivé d'apigénine ou lutéoline (flavone)	Myricétine 3, 7 glycosyl (flavonol)
	
Dérivé d'apigénine (flavone)	Lutéoline 7-glycosyl (flavone)
	
Dérivé d'apigénine ou lutéoline (flavone)	

Ce sont des dérivés de flavone et de flavonol qui ont été supposés présents dans nos extraits de céréales alimentaires et de plantes médicinales. Ces composés identifiés sont des flavonoïdes majoritaires de nos échantillons parce qu'elles existent en grande concentration dans nos extraits. D'après Bellebcir L. (2009), les céréales sont riches en flavonoïdes de type flavones et flavonols. Selon Bruneton J. (2009), ce sont les flavones et les flavonols qui sont les composés flavonoidiques les plus répandus. Nos résultats ne sont pas en accord avec Harborne (1967) cité par Regnault –Roger C. et *al.* (2004), où il indique que les composés phénoliques peuvent être identifiés à partir d'une observation générale sur l'évolution des plantes : les Lamiacées sont des dicotylédones produisant principalement des flavones et des acides hydroxycinnamiques, alors que les flavonols et les anthocyanidines sont retrouvés dans les plantes inférieures.

Les dernières recherches sur le contenu phénolique de céréales telles que celle de Gelmez N. et *al.* (2009) indiquent que les glycoflavones sont les flavonoïdes les plus abondants dans le germe de blé. Plusieurs auteurs (Moheb A. et *al.*, 2011 ; Kharazian N. et Rahiminejad M.R., 2009) ont mis en évidence ce type de molécules dans les grains de céréales. Les 6-C et 8-C-glycosides de lutéoline et d'apigénine sont les plus courants (Asenstorfer R.E. et *al.*, 2006 ; Moheb A. et *al.*, 2011 ; Dinelli G. et *al.*, 2009). Ces composés agissent comme antibiotiques, antioxydants, et comme phytoalexines produits en réponse aux diverses conditions de stress (Moheb A. et *al.*, 2011). Le tricine (5, 7, 4' tri-OH, 3', 5' diméthoxy flavone) est le premier flavone qui a été extrait par Anderson et Perkin en (1931) comme étant un facteur de résistance à la rouille des feuilles de céréales. Cependant, une étude récente menée par De Vasconcelos M.C.B.M. et son équipe (2013) identifient la quercétine (flavonol) comme le flavonoïde le plus majoritaire du germe de blé. Cette différence peut être due notamment à l'association du contenu phénolique avec le génotype de la graine (Vaher M. et *al.*, 2010). D'autres travaux confirment que les flavonols sont synthétisés sous l'influence des rayons UV, et sont identifiés dans les feuilles des céréales (Zagoskina N.V. et *al.*, 2005) et la synthèse des flavonols est associée à l'activité des chloroplastes, l'un des sites majeurs de la synthèse des composés phénoliques.

Ø Discussion sur la partie d'évaluation du pouvoir antioxydant

Il est à noter un intérêt croissant aux antioxydants naturels d'origine végétale en raison de leurs capacités biologiques prometteuses pour protéger le corps humain contre les effets néfastes des radicaux libres, pour retarder la progression de plusieurs maladies chroniques et éviter le rancissement des aliments par l'oxydation des lipides.

Les évaluations des propriétés antioxydantes des composés naturels sont très importantes grâce à leurs utilisations en médecine, dans les secteurs alimentaires et en cosmétiques (Mishra K. et *al.*, 2012). Plusieurs méthodes ont été développées (plus d'une vingtaine) qui sont généralement basées sur les réactions d'oxydo-réduction et la capacité des composés phénoliques d'agir comme agents réducteurs ou donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électron (Stratil P. et *al.*, 2007).

Dans la présente étude, la méthode du DPPH° a été développée pour évaluer le pouvoir antioxydant de nos extraits préparés à partir des céréales alimentaires et de plantes médicinales sélectionnées. Trois antioxydants de références ont été aussi testés : l'acide gallique, la quercétine et l'acide tannique. Nos résultats ont été exprimés par la mesure de la

concentration efficace (EC_{50}). Cette dernière est la concentration de l'échantillon qui est nécessaire pour inhiber la concentration (ou l'absorbance) du DPPH° à 50%. Sachant que, la valeur d' EC_{50} est inversement proportionnelle au pouvoir antioxydant.

Les antioxydants des extraits de céréales alimentaires, tous semblent agir en tant qu'agents scavenger du radical du DPPH°. Cette activité est plus marquée pour les extraits acétate et MEC de tous les échantillons (Tableau 18). Le son d'orge est classé en premier suivit par les extraits de son et germe de blé. L'extrait acétate d'éthyl du son d'orge est le plus actif avec un EC_{50} la plus basse et est égale à 1,77 mg/ml (Tableau 18). Par rapport aux antioxydants de références, l'acide gallique et la quercétine est 26 fois plus actif que l'extrait AcOEt du son d'orge et 16 fois pour l'acide tannique (Tableau 18 et 17).

Concernant les antioxydants de plantes médicinales, ils fonctionnent comme de puissants antioxydants mais plus faibles que les antioxydants de références. Elles paraissent plus puissantes que les extraits de céréales alimentaires. Mais on peut signaler que l'extrait AcOEt du son d'orge a un pouvoir antioxydant ($EC_{50}= 1,77$ mg/ml) presque identique à l'extrait brut de *Calamintha grandiflora* ($EC_{50}= 1,675$ mg/ml) (Tableau 27 et 18).

Le pouvoir antioxydant d'un extrait est en relation avec ses teneurs en composés phénoliques et particulièrement en flavonoïdes, et aussi en fonction des structures chimiques des molécules bioactives présentes (Tableau 01). Quelques cas particuliers peuvent être enregistrés, comme dans le cas de *Calamintha grandiflora*, qui d'après les chromatogrammes CCM (Figure 61), elle semble être riche en flavonols et marquée par ses teneurs les plus élevées en flavonoïdes (Tableau 20), mais elle présente une activité antioxydante faible par rapport aux autres plantes testées (Origan et Thymus) (Tableau 26, 27). Cette constatation a été remarquée par Dobravalskyte D. et *al.* (2012). selon ces auteurs, il faut prendre en considération la nature chimique individuelle des composés phénoliques présents. A notre avis, elle peut être expliquée par l'action prooxydante des flavonoïdes.

Conclusion générale

Le présent travail a pour but d'établir une comparaison entre quelques espèces appartenant à deux familles botaniques : les céréales alimentaires (famille des Graminées) et les plantes médicinales (cas de la famille des Lamiacées) sur la base de leurs teneurs en composés phénoliques et de leurs pouvoirs antioxydants. A cette fin, une étude phytochimique a été réalisée commençant par l'extraction, le fractionnement et l'identification structurale des molécules phénoliques.

Les principaux résultats obtenus indiquent que les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes des extraits de céréales alimentaires sont plus faibles que celles des extraits de plantes médicinales. Ceci est en relation en particulier avec la nature chimique du matériel investigué.

L'isolement des molécules flavoniques par des techniques chromatographiques : la CCM préparative (pour les extraits de céréales alimentaires) et la chromatographie sur colonne (pour les extraits de plantes médicinales) a été effectué. Les résultats ont montré que les céréales alimentaires sont riches en flavonoïdes de type flavone alors que les flavones et les flavonols sont les principaux flavonoïdes des plantes médicinales.

Les analyses qualitatives de nos extraits de céréales alimentaires par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC/DAD) ont confirmé l'absence de la quercétine et la présence principalement des flavonoïdes de type flavone.

L'évaluation du pouvoir antioxydant de nos extraits analysés a été réalisée par la détermination de leur pouvoir de piégeage du radical du DPPH° en déterminant leur concentration efficace (EC_{50}). Suivant ce paramètre, les extraits de plantes médicinales paraissent plus puissants que les extraits de céréales alimentaires.

Les résultats de la présente étude ne constituent qu'une initiation à la recherche des composés phénoliques, qui sont des métabolites secondaires dans les céréales alimentaires et les plantes médicinales. A la suite de ces résultats, il serait intéressant d'approfondir notre étude afin :

- Ø D'atteindre la structure exacte des molécules en utilisant des techniques instrumentales les plus sophistiquées telles que la spectrométrie de masse.
- Ø D'appliquer d'autres tests antioxydants (in vitro et in vivo) pour avoir une indication plus affinée sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester.

- Ø De faire une bio-évaluation « in vivo » de ces extraits afin de tester leur capacité à traiter quelques maladies notamment : l'obésité, le diabète type2, le cancer du côlon...
- Ø De préparer des extraits de céréales alimentaires qui peuvent être utilisés dans les produits alimentaires (yaourt, pains, biscuits...), créant ainsi une valeur ajoutée pour les fabricants et les avantages pour les consommateurs.

Références Bibliographiques

- Adom K.K., Liu R.H. (2002).** Antioxidant activity of grains. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **50**: 6182-6187.
- Adzet T., Vila R., Caffigueral S. (1988).** Chromatographic analysis of polyphenols of some Iberian Thymus. *J. Ethnopharm.* **24** : 147-154.
- Akroum S. (2011).** Etude analytique et biologique des flavonoides naturels. Thèse de Doctorat en Science de l'Université de Constantine.
- Alan S., Ocak A., Duman H. (2007).** Calamintha pamphylica subsp. Alanyense (Lamiaceae), a new subspecies from South Anatolia, Turkey. *Ann. Bot. Fennici* **44**: 309-314.
- Amarowicz R., Zegarska Z., Pegg R.B., Karamac M., Kosinska A. (2007).** Antioxidant and Radical Scavenging Activities of a Barley Crude Extract and its Fractions. *Czech J. Food Sci.* **25**: 73-80
- Andreyev A.Y., Kushnareva Y.E., Starkov A.A. (2005).** Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (MOSC).* **70**, 200-14.
- Angelo A.I. et Capasso F. (2007).** Herbal medicines to treat Alzheimer's disease. *Pharmacological Sciences.* **28**: 1-2.
- Anisko T. (2008).** When perennials Bloom. Longwood Gardens p. 129.
- Antoine, C., Peyron, S., Mabile, F., Lapierre, C., Bouchet, B., Abecassis, J., & Rouau, X. (2003).** Individual contribution of grain outer layers and their cell wall structure to the mechanical properties of wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7. 2026-2033.
- Aribi I. (2011).** Etude ethnobotanique des plantes médicinales de la région de Jijel: étude anatomique, phytochimique, pharmacotoxicologique de deux espèces végétales. Thèse de Magister de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB).
- Arshad M.U., Anjum F.M., Zahoor T. (2007).** Nutritional assessment of cookies supplemented with defatted wheat germ. *Food Chemistry* **102**: 123-128.
- Arya P.; Alibhai, N.; Qin, H.; Burton, G. W.; Batist, G.; You, S. X.; You, L.; Alaoui-Jamali, M. A. (1998).** *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**: 2433-2438.
- Asenstorfer R.E., Wang Y., Mares D.J. (2006).** Chemical structure of flavonoid compounds in wheat (*Triticum aestivum* L.) flour that contribute to the yellow color of Asian alkaline noodles. *Journal of Cereal Science* **43**: 108-119.
- Asmus KD, Bonifacic M. (2000).** Free radical chemistry. In: Sen CK, Packer L, Hanninen O, editors. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Amsterdam: Elsevier: 3-53.
- Baba-Aissa F. (1999).** Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb. EDAS P. 194, 195: 277, 278.
- Baik B.K., Ullrich S.E. (2008).** Barley for food: characteristics, improvement, and renewed interest. *Journal of Cereal Science* **48**: 233-242
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agri industrial by- products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods. Food Chemistry* **99**: 191-203.
- Barouki R. (2006).** Stress oxydant et vieillissement. *Médecine/sciences* **22** : 266-72.

- Barron C., Surget A., Rouau X. (2007).** Relative amounts of tissues in mature wheat (*Triticum aestivum* L.) grain and their carbohydrate and phenolic acid composition. *Journal of Cereal Science* **45**: 88-96
- Barros L., Heleno S.A., Carvalho A.M., Ferreira I.C.F.R. (2010).** Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: vitamins and phenolics. *LWT-Food Science and Technology* **43**: 544-550
- Barthole G., Lepiniec L., Rogwsky P.M., Band S. (2011) In press.** Controlling lipid accumulation in cereal grains. *Plant Science* : 1-7.
- Belitz H.D., Grosch W., Schieberle P. (2009).** Cereals and cereal products. *Food Chemistry* : 670
- Belkheiri N. (2010).** Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes. Thèse de Doctorat de l'Université de Toulouse.
- Bellebcir L. (2008).** Etude des composés phénoliques en tant que marqueurs de biodiversité chez les céréales. Thèse de Magister de l'Université de Constantine.
- Beloued A. (2005).** Plantes médicinales d'Algérie. Office des Publications Universitaire : 134
- Benbrook C.M. (2005).** Accroître la teneur en antioxydant des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologique. The Organic Center: 1-87
- Bendahou M., Muselli A., Dubois M.G., Benyoucef M., Desjobert J.M., Bernardini A.F., Costa J. (2008).** Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. Essential oil and extract obtained by microwave extraction: comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry* **106**: 132-139.
- Benkiniouar R. (2007).** Contribution à l'étude des composés phénoliques de certaines espèces des Labiées de la flore algérienne. Thèse de Doctorat de l'Université de Constantine.
- Benkiniouar R., Touil A., Zaidi F., Rhouati S., Chosson E., Seguin E., Comte G., Bellvert F. (2010).** Isolation and identification of five free flavonoid aglycones from *Thymus numidicus*. *J.Soci. Alger. Chim*, **20** (1): 11-15.
- Benkiniouar R., Zaidi F., Rhoati S., Jay M., Gilles C., Viricel M. R. (2009).** Flavonoids from *Calamintha baborensis* Batt. VII^{ème} journées Internationales de Chimie 7-9 Décembre, Université Mentouri Constantine.
- Bensegueni A. (1989).** La variabilité flavonique chez *Artemisia herba alba* Asso. Et son incidence au plan de la reconnaissance pharmacodynamique. Thèse de Magister de l'Université de Constantine.
- Bentes de Souza AM, Wang CC, Chu CY, Briton-Jones CM, Haines CJ & Rogers MS. (2004).** In vitro exposure to carbon dioxide induces oxidative stress in human peritoneal mesothelial cells. *Hum Reprod* **19**, 1281-1286.
- Berger M.M. (2006).** Manipulation nutritionnelles du stress oxydant: état des connaissances. *Nutrition clinique et métabolisme* **20** : 48-53.
- Beta T., Nam S., Dexter J.E., Sapirstein H.D. (2005).** Phenolic content and antioxidant activity of peeled wheat and roller milled fractions. *Cereal chemistry* **82**: 390-393.
- Bianchini F. et Corbetta F. (1975).** Atlas des plantes médicinales. Fernand Nathan Editeur, Paris : 22, 184.
- Björck I., östman E., Kristensen M. et al. (2012) In press.** Cereal grains for nutrition and health benefits: Overview of results from in vitro, animal and human studies in the HEALTHGRAIN project. *Food Science and Thechnogy*, doi: 10: 1016/j.tifs.2011.11.005. pp. 1-14.

- Boizot N., Charpentier J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le cahier des techniques de l'Inra* : 79-82.
- Borbala B., Jakabova S., Dornyei A., Horvath G., Pluhar Z., Kilar F., Felinger A. (2010).** Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of chromatography A*, **12**: 7972-7980.
- Bouguet G. (2009).** Le thym du bassin de Saint-Martin de Londres: une diversité de chemotypes à préserver et valoriser. Rapport de stage de Master IEGB. Université Montpellier2 Sciences et Techniques : 1-54.
- Brand- Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995).** Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant activity. *Lebensm. Wiss.Technol.***28**: 25-30.
- Brauchler C., Meimberg H., Heubl G. (2010).** Molecular phylogeny of Menthinae (Lamiaceae, Nepetoideae, Menthae) . *Molecular Phylogenetics and Evolution* **55**: 501-523
- Broucke V.D., Dommissie R.A., Esmans E.L., Lemli A.J. (1982).** Three flavones from *Thymus vulgaris*. *Phytochemistry*, **21.10**: 2581-2583.
- Bruce A.B. (1987).** Intraspecific Flavonoid Variation. *The Botanical Review*. Vol.**53**, N° 02: 1-5.
- Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie: Plantes médicinales, Eds.Technique et documentation Lavoisier, Paris.
- Bruneton J. (2002).** Phytothérapie. Les données de l'évaluation. Lavoisier :1-39.
- Bruneton J. (2009).** Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. 4^{ème} édition Lavoisier : 87-91
- Bunzel M., Ralph J., Lu F., Hatfield R. D. et Steinhart H. (2004).** Lignins and ferulateconiferyl alcohol cross-coupling products in cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 6496-6502.
- Bunzel, M., Ralph, J., Marita, J., Steinhart, H. (2000).** Identification of 4-O-50-coupled diferulic acid from insoluble cereal fiber. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 3166–3169.
- Bunzel, M., Ralph, J., Marita, J.M., Hatfield, R.D., Steinhart, H. (2001).** Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *J. Sci. Food Agric.* **81**: 653–660.
- Burney Ph. (2011).** Production et commerce mondial en céréales en 2010-2011. Livre Blanc « céréales » *ULg Gembloux Agro. Bio. Tech. Et CRA-W Gembloux*, 1-10.
- Cao L., Liu X., Qiu T., Sun G., Guo Y., Chang F., Zhou S., Sun X. (2011).** Antitumor and immunomodulatory of arabinoxylans: a major constituent of wheat bran. *International Journal of Biological Macromolecules* **48**: 160-164.
- Carew J.S., Huang, P. (2002).** Mitochondrial defects in cancer. *Mol. Cancer* **1**, 1–9 (Epub).
- Czapecka E., Mareczek A., Leja M., 2005.** Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food Chemistry*, **93**: 223-226.
- Charalampopoulos D., Wang R., Pandiella S.S., Webb C. (2002).** Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology* **79** : 131-141.

Chebil L. (2006). Acylation des flavonoides par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia*: études cinétiques, structural et conformationnelle. Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine

Chirinos R., Betallely-Pallardel I., Huaman A., Arbizu C. (2009). HPLC-DAD characterization of phenolic compounds from Andean Oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. *Food Chemistry* **113**: 1243-1251

Chirinos R., Campos D., Costa N., Arbizu C., Pedreschi R., Larondelle Y. (2008). Phenolic profiles of andean mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz and Pavon) tubers : Identification by HPLC-DAD and evaluation of their antioxidant activity. *Food Chemistry* **106**: 1285-1298

Chosson, E.; Chabond, A.; Chulia, A. J., Raynaud, J. (1998). Dihydroflavonol glycosides

Ciesla L., Hajnos M.W. (2009). Two dimensional thin Layer Chromatography in the analysis. *Journal of Chromatography A.*, **1216**: 1035-1052

Costa J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. Essential oil extract obtained by microwave extraction: comparison with hydrodistillation. *Food chemistry* **106**: 132-139

Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. (2002). Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci.*; **59**:627-47.

De Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Gooijer, C. and Brinkman, U.A.T. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2): 31-63.

De Vasconcelos M.C.B.M., Bennett R., Castro C., Cardoso P., Saavedra M.J., Rosa E.A. (2013). Study of composition, stabilization and processing of wheat germ and maize industrial by-products. *Industrial Crops and Products* **42**: 292-298.

Delattre J, Durand G, Jardillier J.C. (2003). Biochimie pathologique : aspects moléculaires et cellulaires. Radicaux libres et antioxydants. Flammarion Médecine-Sciences.

Delattre J, Théron P, Bonnefont-Rousselot D. (2005). Espèces réactives de l'oxygène, antioxydants et vieillissement. In : Delattre JB, Bonnefont-Rousselot D, eds. *Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques*. Paris : Lavoisier : 281-309

Delille L. (2007). Plantes médicinales d'Algérie. Bertie édition : 5-9, 55, 56, 151-216

Densiov E.T., Afanas'ev, I.B. (2005). IN: *Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology*. Eds: Taylor & Francis Group (U.S.A), Pp: 703-861.

Dinelli G., Carrtero A.S., Silvestro R.D., Marotti I., Fu S., Benedettelli S., Ghiselli L., Gutiérrez A.F. (2009). Determination of phenolic compounds in modern and old varieties of durum wheat using liquid chromatography coupled with time- of- flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1216**: 7229-7240

Djeridane A., Yousfi M., Najemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry* **97**: 654-660.

Djermoun A. (2009). La production céréalière en Algérie : les principales caractéristiques. *Revue Nature et Technologie* **01**, 45-53.

- Dobravalskyte D., Vensktonis P.R., Talou T. (2012).** Antioxidant properties and essential oil composition of *Calamintha grandiflora* L. *Food Chemistry* **135**: 1539-1546.
- Donkor O.N., Stojanovska, L., Ginn, P., Ashton, J., Vasiljevic, T. (2012) In press.** Germinated grains –sources of bioactive compounds. *Food Chemistry* **135**: 950-959. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.058>
- Doumandji A., Doumandji S., Doumandji-Mitiche B. (2003).** Technologie de transformation des blés et problèmes dus aux insectes au stock. Office des publications universitaires. Pp. 1-9.
- Dvorakova M, Moreira M.M., Dostalek P.,Skulilova Z., Guido F.L., Barros A.A. (2008).** Characterization of monomeric and oligomeric flavan-3 ols from barley and malt by liquid chromatography-ultraviolet detection electropray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.*, 1189: 398-405.
- El Bedawey A.A., Mansour E.H., Zaky M.S., Hassan A.A. (2010).** Characteristics of Antioxidant Isolated from Some Plant Sources. *Food and Nutrition Sciences* **1**: 5-12.
- El-Nekeety A.A., Mohamed S.R., Hathout A.S., Hassan N.S., E.Aly S., Abdel Wahhab M.A. (2011).** Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin induce oxidative stress in male rats. *Toxicol* **57**: 984-991.
- Ernest S. (2006).** Culinary herbs. 2^{ème} edition National Research council of Canada: 229.
- Evers T., Millart S. (2002).** Cereal grain structure and development some implications for quality. *Journal of Cereal Science* **36**: 261-284.
- Fang Y.Z., Yang S., Wu G. (2002).** Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition* **18**: 872-879.
- FAOSTAT (2008).** FAO agricultural statistics. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations (<http://faostat.fao.org>).
- Fardet A., Rock E., Rémésy C. (2008).** Is in vitro antioxidant potential of whole grain cereals and cereals products well reflected in vivo? *Journal of Cereal Science* **48**, 258-276.
- Favier, A. (2003).** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Review. L'actualité chimique-novembre* : 108-115
- Finaud J, Lac G & Filaire. (2006).** Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med.* **36**, 327-358.
- Forkmann, G.; Martens, S. (2001).** Metabolic engineering and applications of flavonoids from *Rhododendron Ferrugineum*. *Phytochemistry.*, **49**: 1431-1433.
- Gallardo C., Jimenez L., Garcia-Conesa M-T. (2006).** Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions. *Food Chemistry* **99**: 455-463.
- Gattuso G., Barreca D., Gargiulli C., Leuzzi U., Caristi C. (2007).** Flavonoid Composition of Citrus Juices. *Molecules*, **12**: 1641-1673
- Gavrilorie M., Maginot M.J., Gavrilorie C.S., Wallach J. (1996).** Manipulation d'analyse biochimique. 3^{ème} édition Doin Paris : 112-120.

- Gelmez N., Kincal N.S., Yener M.E. (2009).** Optimisation of supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from roasted wheat germ based on yield, total phenolic and tocopherol contents, and antioxidant activities of the extracts. *The Journal of Supercritical Fluids* **48**: 217-224.
- Ghedira K. (2005).** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* **4**: 162-169.
- Gil A., Ortega R.M., Maldonado J. (2011).** Whole grain cereals bread: a duet of Mediterranean diet for the prevention of chronic diseases. *Public Health Nutrition* **14**: 2316-2322.
- Gilly G. (2005).** Les plantes aromatiques et huiles essentielles à Grasse- Botanique- Culture- Chimie- Production et Marché-préface de Hubert R. Harmattan pp. 239-315.
- Gil-Munoz, M.I. (1993).** Contribution al estudio fitoquímico y quimiosistemático de flavonoides en la familia Labiatae, PhD thesis, *University of Murcia*, 293 pp.
- Golmakani M.T., Rezaei K. (2008).** Comparison of microwave assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chemistry* **109**: 925-930.
- Grabber, J.H., Ralph, J., Hatfield, R.D. (1998).** Ferulate cross-links limit the enzymatic degradation of synthetically lignified primary walls of maize. *J.Agr. food chem.***46** : 2609-2614.
- Grijalbo R.P. et Villar L., Sesé J.A. (1993).** Nouvelle localité de *Calamintha grandiflora* (L.) Moench (Labiatae) dans les Pyrénées espagnoles 447 : 7-11.
- Grünz G., Daniel H. and Spanier B. (2010).** *In vivo* visualization of flavonoids in *C. elegans* using 2-aminoethyl diphenyl borate. *The worm breeder's gazette* **18** : 1
- Guiga W. (2006).** Identification des inhibiteurs de la germination de l'orge et mise au point d'un procédé de traitement des eaux de trempage en malterie en vue de leur recyclage. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Hager T., Howard L. (2009).** Berry fruit phytochemicals. Berry Fruit, CRC Press.
- Haliwell B. (2008).** Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics* **476**, 107-112.
- Hanhineva K , Törrönen R, Bondia-Pons I, Pekkinen J, Kolehmainen M, Mykkänen H and Poutanen H. (2010).** Impact of Dietary Polyphenols On Carbohydrate Metabolism. *Int. J. Mol. Sci*, **11**: 1365-1402
- Haraguchi H. et al. (1996).** *Planta. Med.* 62: 217.
- Havsteen B.H. (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics* **96**: 67-202
- Hazzit M., Baaliouamer A., Verissimo A.R., Faleiro M.L., Miguel M.G. (2009).** Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food chemistry* **116**: 714-721.
- Hensley, K., Robinson, K.A., Gabbita, S.P., Salsman, S., Floyd, R.A. (2000).** Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 1456–1462.
- Hostettmann, K. and Wolfender, J.-L. (2004).** Applications of liquid chromatography/ UV/MS and liquid chromatography/NMR for the on-line identification of plant metabolites. In *Bioactive compounds in natural sources*, Taylor and Francis, Londres : 31-68.

- Houston M.C. (2007).** The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. *Altern Ther Health Med* **13** : S128-133.
- Hu Y, Block G, Norkus EP, Morrow JD, Dietrich M & Hudes M. (2006).** Relations of glycemic index and glycemic load with plasma oxidative stress markers. *Am J Clin Nutr.* **84**: 70-76;
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005).**The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural & Food Chemistry.* **53**:1841-1856.
- Huang, P. (2003).** Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. *J. Biol. Chem.* **278**: 37832–37839.
- Hurtado-Fernandez E., Romero M.G., Pancorbo A.C. (2010).** Application and potentiel of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic coumpounds from plant food meterial. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **53**: 1130-1160
- Ibanoglu E. (2002).** Kinetic study on color changes in wheat germ due to heat. *Journal of Food Engineening* **51**: 209-213.
- Ignat I., Volf I., Popa I.V. (2011).** A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry* **126**: 1821-1835.
- Ivanisova E., Ondrejovic M., Silhar S. (2012).** Antioxidant activity of milling fractions of selected cereals. *Nova Biotechnologica et Chimica* **11-1**: 45-54.
- Jackson A.L., Loeb L.A. (2001).** The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat. Res.* **477**, 7–21.
- Jurd, L. and Horowitz, R. (1962).** Spectral properties of flavonoid compounds. pergamon press, Oxford: 107-2055.
- Kamisaka, S., Takeda, S., Takahashi, K., Shibata, K. (1990).** Diferulic and ferulic acid in the cell wall of Avena coleoptiles: their relationships to mechanical proprieties of the cell wall. *Physio. Plant.* **78**: 1-7.
- Kanazawa, K., Kawasaki, H., Samejima, K., Ashida, H., Danno, G. (1995).** Specific desmutagens (antimutagens) in oregano against dietary carcinogen, Trp-P-2, are galangin and quercetin. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 404–409.
- Karamac M., Amarowicz R., Weidner S., Abe S., Shahidi F. (2002).** Antioxidant activity of rye caryopses and embryos extracts. *Czech J.Food Sci.*, **20**: 209-214.
- Kaurinovic B., Popovic M., Vlaisavljevic S., Svetlana T. (2011).** Antioxidant Capacity of Ocimum basilicum L. and Origanum vulgare L. Extracts. *Molecules* **16**: 7401-7414.
- Kebièche M., Lakroun Z., Mraïhi Z., Soulimani R. (2011).** Effet antidiabétogène et cytoprotecteur de l'extrait butanolique de Rununculus repens et de la quecétine sur un modèle expérimental de diabète alloxanique. *Phytothérapie* : 1-9.

- Kharazian N., Rahiminejad M.R. (2009).** Study of phenolic constituents of Triticum L. (Poaceae) species in IRAN. *Iranian Journal of Science and Technology*, Transaction A, Vol. **33**, A4: 309-315.
- Kim J.Y., Ahn H.J., Ryu J.H., Suk, K., Park J.H. (2004).** BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxiainducible factor 1_α. *J. Exp. Med.* **199**: 113–124.
- Kim K.H., Tsao R., Yang R., Cui S.W. (2006).** Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chem.*, **95**: 466-473.
- Knežević S.V., Blazekwic B., Stefan M.B., Babac M. (2012).** Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. In “Phytochemicals as nutraceuticals-global approaches to their role in nutrition and health. Edition Venketeshwer Rao: 155-180
- Koehlin-Ramonatxo C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique et Métabolique.* **20**: 165-177.
- Kohen R., Nyska A. (2002).** Oxidation of biological systems : oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology.* **30**: 620-650.
- Koppenol WH. (2001).** The Haber-Weiss cycle, 70 years later. *Redox Rep*; **6**:229–34.
- Kosinska A., Karamac M. (2006).** Antioxidant capacity of roasted health promoting products. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences.* **15/56, 02**: 193-198
- Koukoulitsa, C., Karioti, A., Bergonzi, M.C., Pescitelli, G., di Bari, L., Skaltsa, H. (2006).** Polar constituents from aerial parts of *Origanum vulgare* L. ssp. *Hirtum* growing wild in Greece. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 5388–5392.
- Krim S., Bahlouli M., Boutekedjiret C., Bentahar F. (2008).** Effet de l'état de la plante sur la teneur en composés phénoliques des hydrosols de l'origan algérien usagé. 1^{ères} Journées Scientifiques du Réseau de Chercheurs GP3A de l'Agence Universitaire de la Francophonie « Génie des Procédés Appliqué à l'Agro-Alimentaire », 11 et 12 septembre 2008.
- Kumar P., Yadara R.K., Gollen B., Kumar S., Verma R.K., Yadav S. (2011).** Nutritional contents and Medicinal properties of wheat: A review. *Life Science and Medicine Research* **22**: 1-10
- Lagouri V., Guldaz M., Gurbuz O. (2011).** In vitro Antioxidant/ Free Radical Scavenging and Antibacterial Properties of Endemic Oregano and Thyme Extracts from Greece. *Food Sci-Biotechnol.* **20 (6)**: 1487-1493.
- Laguerre M., Lecomte J., Villeneuve P. (2007).** Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods. *New trends and challenges progress in lipid research* **46**: 244-282.
- Lahouel M. (2005).** Interaction Flavonoïdes-Mitochondrie et rôle de la Propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de Doctorat d'Etat de L'Université de Constantine.
- Lahouel M., Boulkour S., Segueni N., Fillastre J.P. (2004).** Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. *Pathologie expérimentale* **52** : 314-322
- Lamri Senhadji M. (2011).** Effet des fibres alimentaires en santé humaine. In « congrès international de Nutrition. 22, 23 Mai 2011. Université d'Oran, Algérie. P 31.

- Laparra J.M., Sanz Y. (2010).** Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological Research* **61**: 219-225
- Lee C.J., Chen L.G., Chang T.L., Ke W.M., Lo Y.F., Wang C.C. (2011).** The correlation between skin-care effects and phytochemical in Lamiaceae plants. *Food Chemistry* **124**: 833-841.
- Lee K.W., Lee H.J. (2006).** Biphasic effects of dietary antioxidants on oxidative stress mediated carcinogenesis, *Mech. Ageing Dev.* **127**: 424-431.
- Lehucher-Michel, M.P., Lesgards, J.F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., Prost, M. (2001).** Stress oxydant et pathologies humaines. La Presse médicale. **30**: 1076-1081.
- Liu L., Deseo M.A., Morris C., Winter K.M., Leach D.N. (2011).** Investigation of α -glucosidase inhibitory activity of wheat bran and germ. *Food chemistry* **126**: 533-561.
- Liu L., Winter M.K., Stevenson L., Morris C., Leach D.N. (2012).** Wheat bran lipophilic compounds with in vitro anticancer effects. *Food Chemistry* **130**: 156-164
- Liu Q., Yao H. (2007).** Antioxidant activities of barley seeds extracts. *Food Chemistry* **102**: 732-737.
- Liu R.H. (2007).** Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science* **46**: 207-219.
- Liyana-Pathirana C.M., Shahidi F. (2007).** Antioxidant and free radical scavenging activities of whole wheat and milling fractions. *Food Chemistry* **101**: 1151-1157.
- Mabry T.G., Markham K.R. and Thomas M.B. (1970).** The systematic identification of flavonoids. Ed. Sprenger-Verlag, Berlin, Heideberg, New York, 354.
- Macheix JJ, Fleuriet A., Billot J. (1990).** Fruit phenolics. CRC Press, Boca Raton
- Macheix JJ., Fleuriet A., Chritian JA. (2006).** Composés phénoliques dans la plante- structure, biosynthèse, répartition et rôles In « les polyphénols en agroalimentaire ». Édition Lavoisier : 1-27.
- 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. Thèse de Magister de l'Université de Constantine.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. et Jimenez, L. (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am.J Clin Nutr.* **79**(5), 727-747.
- Marie E.S. (2005).** Les fibres alimentaires et le pain de blé entier. Mémoire de maitrise en Science et technologie des aliments. Université Laval Québec
- Marjorie M.C. (1999).** Chemical Microbiology *.Reviews.* **12** (4): 564-582.
- Markham K. R. (1982).** Techniques of flavonoids identification. Ed Academic Press: 6-58.
- Markham K.R. (1988).** Distribution of flavonoids in the lower plants and its evolutionary significance. In “The Flavpnoids”. Advances in Research since 1980, Harbone J.B.ed.Chapman and Hall, London: 427-468.
- Marston A., Hosttmann K. (2006).** Separation and Quantification of Flavonoids. In “Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. *Taylor and Francis*: 1-36.
- Martin S et Andriantsitohaina R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angiologie* **51**, 304-315.
- Martínez-Cayuela M. (1995).** Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie.* **77**: 147-161.

- Mears J.A. and Mabry T.J. (1972).** A procedure for the UV detection of hydroxyl and methoxyl groups at C6 in flavones and 3-O-substituted flavonols. *Phytochemistry* **11**, 411-412.
- Mendham, Denney, Barnes, Thomas (2006).** Analyse chimique quantitative de Vogel. De Boeck Larcier : 272.
- Merghem R. (2000).** Rôle des polyphénols et tanins condensés dans l'alimentation. Institut des Sciences de la Nature et de la Vie. Université de Constantine. Vol. n°3 : 113-118
- Merghem R. (2009).** Eléments de biochimie végétale. Edition Bahaeddine: 107-133.
- Merghem R. (2011).** Les plantes sources de molécules d'intérêt pharmacologique ou nutritionnel. In « congrès international de Nutrition. 22, 23 Mai 2011. Université d'Oran, Algérie. P 24-25.
- Merghem R., Jay M., Brun N., Voirin B. (2004).** Qualitative Analysis and HPLC Isolation and Identification of Procyanidins from *Vicia faba*. *Phytochemical Analysis* **15**: 95-99
- Merghem R., Jay M., Viricel M. R., Bayet C., Voirin B. (1995).** Five 8-C-Benzylated flavonoids from *Thymus hirtus* (Labiatae). *Phytochemistry* **38**, 3: 637-640.
- Mirovich, M.V. (1987).** Studies on the phenolic compounds of common *Origanum*. *Nauchnye trudy, vsesoyuznyi nauchno-issledovatel'skii institut farmatsii* **25**: 105–109.
- Misan A.C., Mimica Dukic N.M., Mandic A.I., Sakac M.B., Milovanovic I.J., Sedej I.J. (2011).** Development of a rapid resolution HPLC method for the separation and determination of 17 phenolic compounds in crude plant extracts. *Cent. Eur.J. Chem.* **9** (1): 133-142.
- Mishra K., Ojha H., Chaudhury N.K. (2012).** Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH° assay: A critical review and results. *Food Chemistry* **130**: 1036-1043.
- Mohajeri A., Asemani S.S. (2009).** Theoretical investigation on antioxidant activity of vitamins and phenolic acids for designing a novel antioxidant. *Journal of Molecular Structure* **930**: 15-20
- Moheb A., Ibrahim R.K., Roy R., Sarhan F. (2011).** Changes in wheat leaf phenolome in response to cold acclimation. *Phytochemistry* **72**: 2294- 2307
- Molyneux P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, **26** (2): 211-219.
- Moore J., Liu J.G., Zhou K.Q., Yu I.I. (2006).** Effects of genotype and environment on the antioxidant properties of hard winter wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 5313-5322.
- Morel C. (2007).** Etude de la régulation de la sulfhydryl oxydase QSOX1 et de son implication dans l'apoptose induite par le stress oxydant. Thèse de Doctorat de l'université de Franche Comté.
- Morel Y, Barouki R. (1998).** Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes. *Med Sci (Paris)* ; 14 : 713-21.
- Morimitsu Y., Yoshida K., Esaki S., Hirota, A. (1995).** Protein glycation inhibitors from thyme (*Thymus vulgaris*). *Biosci. Biotechn. Biochem.* **59**: 2018-2021
- Naczk M., Shahidi F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A.*, **1054**: 95-111
- Naczk M., Shahidi F. (2006).** Phenolic in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical analysis* **41**, 1523-1542.

- Nakagawa Y. (2004).** Initiation of apoptotic signal by the peroxydation of cardiolipin of mitochondria. *Ann N Y Acad Sci.*; **1011**: 177-84.
- Neve J. et Pincemail J. (2008).** Antioxydants alimentaires: vitamines, oligoéléments et non nutriments. In « aliments fonctionnels ». 2^{ème} édition. Lavoisier PP. 203-953.
- Nickavar B., Esbati N. (2012) In press.** Evaluation of the Antioxidant capacity and phenolic content of Three Thymus Species. *Journal of Acupuncture and Meridian Studie*, doi: 10.1016/j.jams.2012.03.003: 1-6
- Niki E. (2010).** Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine* **49**: 503-515.
- Novak M.H. (2004).** Valorisation non alimentaires des céréales. *Valorisation de la Biomasse asbl* **06** : 1-22.
- Oliveira A.C., Valentim I.B., Goulart M.O.F., Silva C.A., Bechara, E.J.H., Trevisan M.T.S. (2009).** Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, Vol.**32**, No.3 : 689-702.
- Pecquet C. et Laurière M. (2003).** Hydrolysates de proteins du blé: nouveaux allergens. *Revue Française d'Allergologie et d'immunologie clinique* **43** : 21-23
- Pedersen J.A. (2000).** Distribution and taxonomic implications of some phenolics in the family Lamiaceae determined by ESR spectroscopy. *Biochemical Systematics and Ecology* **28**: 229-253
- Penchev P. (2010).** Etude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de technique séparatives à basses et hautes pressions. Thèse de Doctorat de l'Université de Toulouse
- Pereira Nunes X, Souza Silva F., Alneida J.R.G. et al., (2012).** Biological Oxidations and Antioxidant Activity of Natural Products. Chapter1. In "phytochemicals as Nutraceuticals Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health". 1^{ère} édition Venketeshwer Rao. Pp 1-20
- Perez M.B., Banek S.A., Croci C.A. (2011).** Retention of antioxidant activity in gamma irradiated argentinian. *Food Chemistry* **126**: 121-126.
- Peyron, S., Chaurand, M., Rouau, X., & Abecassis, J. (2002).** Relationship between bran mechanical properties and milling behaviour of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) Influence of tissue thickness and cell wall structure. *Journal of Cereal Science*, 36, 3, 377-386.
- Phase A. (2006-2010).** Plan de gestion du parc national de Taza. Approche descriptive et analytique : 3-37.
- Piber, M., Koehler, P. (2005).** Identification of dehydro-ferulic acidtyrosine in rye and wheat: Evidence for a covalent cross-link
- Pierrel R. (2005).** Reproduction et dispersion des graminées. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* **45**, 633-635.
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O. (2002).** Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. **16**: 233-239.
- Pomeranz, Y. (1988):** Chemical composition of kernel structures. In Y. Pomeranz (Ed.), *Wheat Chemistry and Technology*. St. Paul, MN : *American Association of Cereal Chemists*. pp. 97-118.

- Popovici C., Saykova I., 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.
- Poutanen K. (2012).** Past and future of cereal grains as food for health. *Trends in Food Science and Technology* **25**: 58-62.
- Prior R.L. et Cao G. (1999).** In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine* **27**, 1173-1181
- Prochazkova D., Bousova I., Wilhelmova N. (2011).** Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* **82**: 513-523
- Quattrochio F., Baudry A., Lepiniec L., Grotewold E. (2006).** The regulation of Flavonoid Biosynthesis. In « the Science of Flavonoids ». Grotewold E. : 97-122.
- Quezel P., Santa S. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (Tome II). Editions du Centre National de la Recherche Scientifique Paris 7^e : 781,804,819.
- Ragaee S., Abdel-Aal E.M., Noaman M. (2006).** Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. *Food Chemistry* **98**: 32-38.
- Ragaee S., Guzar I., Dhull N., Seetharamank K. (2011).** Effects of fiber addition on antioxidant capacity and nutritional quality of wheat bread. *LWT-Food Science and Technology* **44**: 2147-2153.
- Ralph, J., Hatfield, R.D., Grabber, J.H., Jung, H.G., Quideau, S., Helm, R.F. (1998).** Cell wall cross-linking in grasses by ferulates and diferulates. In: Lewis, N.G., Sarkanen, S. (Eds.), Lignin and Lignan Biosynthesis, ACS Symposium Series, vol. 697. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 209–236.
- Regnault-Roger C., Ribodeau M., Hamraoui A., Bateau I., Blanchard P. et Gil Munoz M.I. (2004).** Polyphenolic compounds of Mediterranean Lamiaceae and investigation of orientational effects on *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Journal of Stored Products Research* **40**, 395-408.
- Reis D., Vian B., Bajon C. (2006).** Le monde des fibres. Edition Belin: 267-286.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996).** Structure- antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. **20**.7: 933-956.
- Rizzello C.G., Nionelli L., Coda R., Angelis M.D., Gobbetti M. (2010).** Effect of sourdough fermentation on stabilization, and chemical and nutritional characteristics of wheat germ. *Food Chemistry* **119**: 1079-1089
- Rusznayk I.; Szent-Györgyi A. (1936).** Vitamin P: flavanols as vitamins. *Nature.*, **138**: 27.
- Sade, H., Sarin, A. (2004).** Reactive oxygen species regulate quiescent Tcell apoptosis via the BH3-only proapoptotic protein BIM. *Cell Death. Differ.* (Epub ahead of print).
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Rémésy C et Jiménez L. (2005).** Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews Food Science and Nutrition* **45**: 287.
- Scherver R., Godoy H.T. (2009).** Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2- diphenyl-1-picryl hydrazyl method. *Food Chemistry* **112**: 654-658

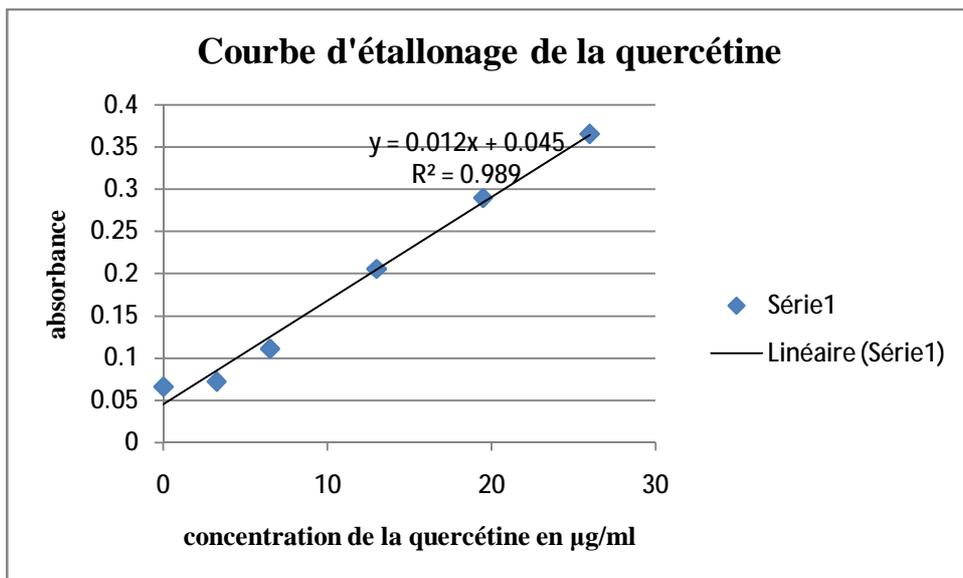
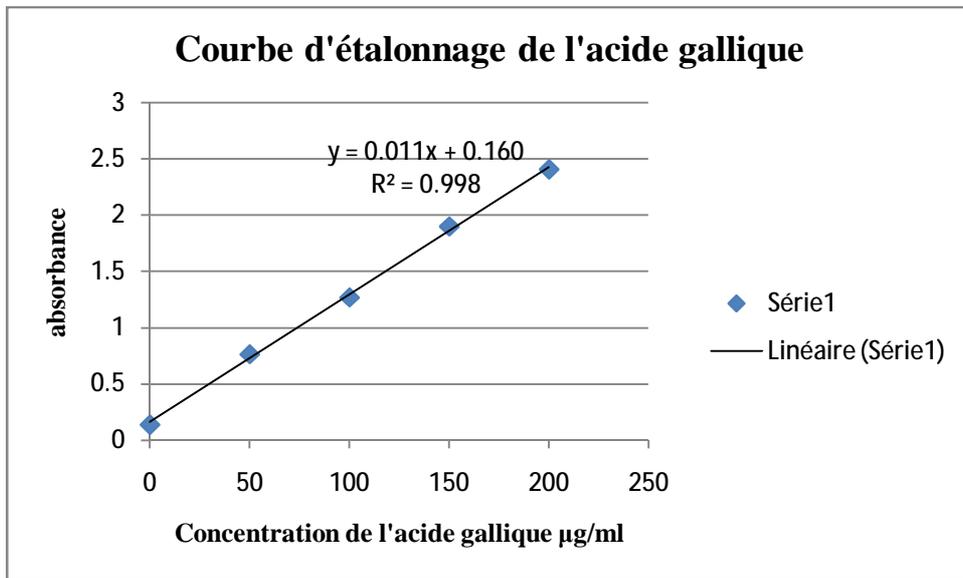
- Schimmel, M., Bauer, G. (2002).** Proapoptotic and redox state-related signaling of reactive oxygen species generated by transformed fibroblasts. *Oncogene* **21**, 5886–5896.
- Schlienger J.L. (2011).** Nutrition clinique pratique. Edition Masson Paris : 31.
- Schooneveld-Bergmans, M.E.F., Beldman G., Voragen, A.G.J. (1999).** Structural features of glucuronoarabinoxylans extracted from wheat by barium hydroxyle. *Journal of cereal Science*, **29**:63-75.
- Schwab, M.(1998).** Amplification of oncogenes in human cancer cells. *Bioessays* **20** : 473–479.
- Servais S., 2004.** Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l’ozone : effets de l’âge et d’une supplémentation en OMEGA-3. Thèse de Doctorat. Université Claude Bernard. Lyon1.
- Sghaier M.B., Skaudrani I., Nasr N., Franca M.G.D., Ghedira L.C., Ghedira K. (2011).** Flavonoids and sesquiterpenes from *Teucrium ramosissimum* promote anti proliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: a structure- activity relationship study. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **32**: 336-348
- Shan B., Cai Y.Z., Sun M., Corke H., 2005.** Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 7749-7759.
- Site officiel de la Wilaya de Jijel <http://www.jijel-dz.org/jijel/>
- Skerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hras A.R., Simonic M., Krez Z. (2005).** Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry* **89**: 191-198.
- Skoula M., Grayer R.J., Kite G.C. et Veitch N.C. (2008).** Exudate flavones and flavanones in *Origanum* species and their interspecific variation. *Biochemical Systematics and Ecology* **36** : 646-654.
- Sofowora A. (2010).** Plantes médicinales et médecine traditionnelle d’Afrique. Edition Karthala : 22
- Sorvani V., Blandino M., Scarpino V., et al. (2012).** Bioactive compounds content antioxydant activity, deoxynivalenol and heavy metal contamination of pearled wheat fractions. *Food chemistry* **135**: 39-46.
- Stafford H.A. (1991).** Flavonoid evolution: an enzymatic approach. *Plant physiol.* **96**: 680-685.
- Stahl E. (1969).** Thin Layer Chromatography. Berlin-Heidelberg-New-York: 264-268.
- Stalikas C.D. (2007).** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, **30**: 3268-3295.
- Stefano V.D., Avellone G., Bongiorno D., Cunsolo V., Muccilli V., Sforza S., Dossena A., Drahos L., Vekey K. (2012) In press.** Applications of HPLC-MS for food analysis. *Journal of Chromatography A* :
- Stevanovic T. Automne (2005).** *Chimie du bois*. CHM-22170. Université Laval. Québec.
- Szent-Györgyi, A., Oxidation, Energy Transfer, and Vitamins (1965).** In *Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1922-1941, Elsevier Publishing Company*: Amsterdam
- Toyokuni S. (1998).** Oxidative stress and cancer: the role of redox regulation. *Biotherapy* **11**: 147–154.

- Trachootham D., Alexander J., Huang P. (2009).** Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanism: a radical therapeutic approach? *Nat. Rev.* **8**: 579–591.
- Treki A., Merghem R., Dehimat L. (2009).** Etude phytochimique et Evaluation de l'activité antibactérienne d'une Labiée : *Thymus hirtus*. *Sciences et Technologie C-N° 29* : 25-29.
- Tudek B., Winczura A., Janik J., Siomek A., Foksinski M., Olinski R. (2010).** Involvement of oxidatively damaged DNA and repair in cancer development and aging, *Am. J. Transl. Res.*: 254–284.
- Vaher M., Matso K., Levandi T., Helmja K., Kaljurand M. (2010).** Phenolic compounds and the antioxidant activity of the bran, flour and whole grain of different wheat varieties. *Procedia Chemistry* **2**: 76-82
- Valko M, Morris H & Cronin MT. (2005).** Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* **12**, 1161-1208.
- Valko M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser J. (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Biocell.* **39**: 44-84.
- Valls J., Millan S., Marti M.P., Borrás E., Arola L. (2009).** Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of chromatography A*, **1216**: 7143-7172
- Van de Velde, C.J., Verspaget, H.W. (1999).** Superoxide dismutases in the human colorectal cancer sequence. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **125**: 327–335.
- Verma B., Hucl P., Chibar R.N. (2009).** Phenolic acid composition and antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed wheat bran fractions. *Food Chemistry* **116**: 947-954
- Villano D., Pachon M.S.F., Moya M.L., Troncoso A.M., Parrilla M.C.G. (2007).** Radical Scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* **71**: 230-235.
- Vitaglione P., Napolitano A., et Fogliano V. (2008).** Cereal dietary fiber: a natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut. *Food and Technology* **19**; 451-463.
- Voirin B. (1983).** UV Spectral differentiation of 5-hydroxy and 5-hydroxy-3-hydroxy-3-methoxy flavones with mono-(4'), di-(3'-4') or tri-(3', 4', 5')-substituted B rings. *Phytochemistry.*, **22** (10) : 2107-2145.
- Waldron, K.W., Smith, A.C., Parr, A.J., Ng, A., Parker, M.L. (1997).** New approaches to understanding and controlling cell separation in relation to fruit and vegetable texture. *Trends Food Sci. Technol.* **8**, 213–221.
- Wang Y. (2008).** Bulky DNA lesions induced by reactive oxygen species. *Chem Res Toxicol* **21**, 276-281.
- Wichtl M., Anton R. (1999).** Plantes thérapeutiques. Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. 3^{ème} édition *médicale internationales* pp. 355-556.
- Wilson M. (2006).** Fleurs comestibles. Du jardin à la table. Edition Fides: 50, 151.
- Wojdylo A., Oszmianski J., Czemerys R. (2007).** Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* **105**: 940-949
- Yuan X., Wang J., Yao H., Chen F. (2005).** Free radical-scavenging capacity and inhibitory activity on rat erythrocyte hemolysis of feruloyl oligosaccharides from wheat bran insoluble dietary fiber. *LWT* **38**: 877-883

- Zagoskina N.V., Olenichenko N.A., Chzhou Y., Zhivukhina E.A. (2005).** Formation of Phenolic compounds in various cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Applied Biochemistry and Microbiology* vol. **41** N° 1: 99-102.
- Zahid A. (2010).** Mécanismes cellulaires et moléculaires régissant le métabolisme des semences de céréales : Rôle du réseau rédoxines- système antioxydant dans la prédiction de la qualité germinative. Thèse de Doctorat de l'Université de Toulouse.
- Zeghad N. (2009).** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêts économiques (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité anti-bactérienne. Thèse de Magister de l'Université de Constantine.
- Zeitoun R. (2011).** Procédés de fractionnement de la matière végétale- application à la production des polysaccharides du son et de la paille de blé. Thèse de Doctorat de l'Université de Toulouse.
- Zheng , S., Wang, X., Gao, L., Shen, X., Liu, Z. (1997).** Studies on the flavonoid compounds of *Origanum vulgare* L. *Indian J. Chem.B* **36**: 104–106.
- Zhu K., Zhou H. (2005).** Purification and characterization of a novel glycoprotein from wheat germ water soluble extracts. *Process Biochemistry* **40**: 1469-1474.
- Zhu K.X., Lian C.X., Guo X.N., Peng W., Zhou H.M. (2011).** Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ. *Food Chemistry* **126**: 1122-1126.
- Zitterman A. (2003).** Bran. Université of Bonn, Germany.P1844-1848.
- Zou Y, Qian Zl, Li Y, Kim MM, Lee SH & Kim SK. (2008).** Antioxidant Effects of Phlorotannins Isolated from *Ishige okamurae* in Free Radical Mediated Oxidative Systems. *J Agric Food Chem.*

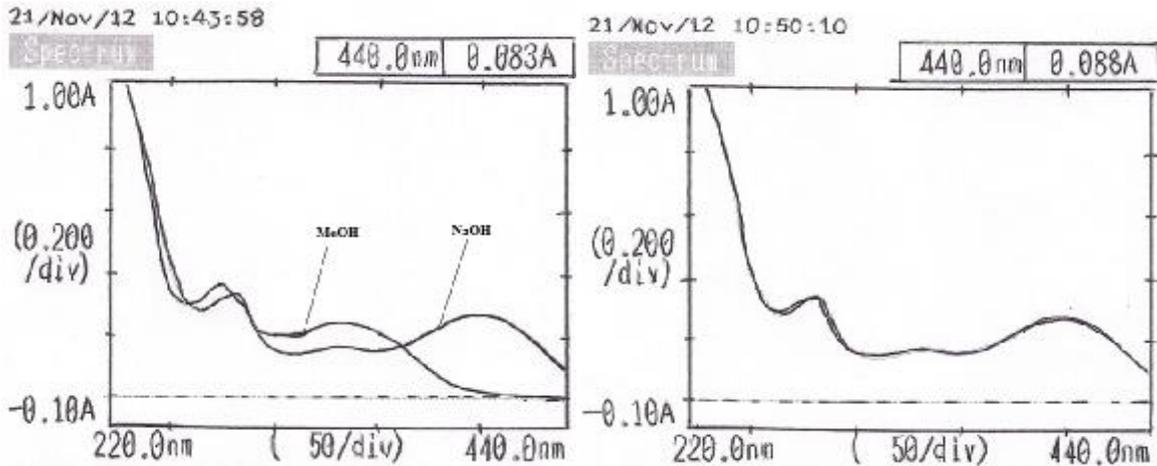
Annexes

Annexe 01 : Courbes d'étalonnage



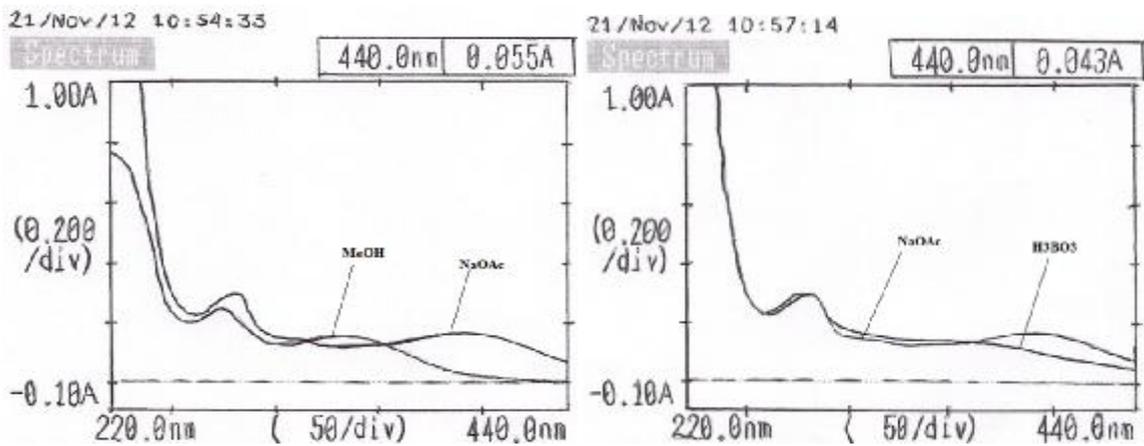
Annexe 2 : Série spectrale des molécules isolées à partir des céréales alimentaires

Molécule 02 : Bande 1 (Noire, Rf= 0,6) de la MEC :



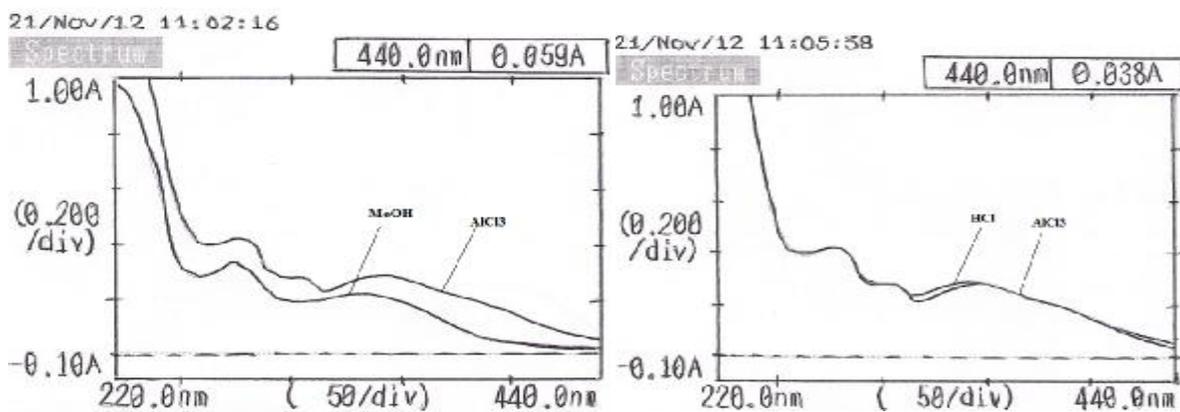
Spectre MeOH et en présence de NaOH

Après 5min d'ajout de NaOH



Spectre MeOH et en présence de NaOAc

Spectre NaOAc et en présence de H₃BO₃



Spectre MeOH et en présence de AlCl₃

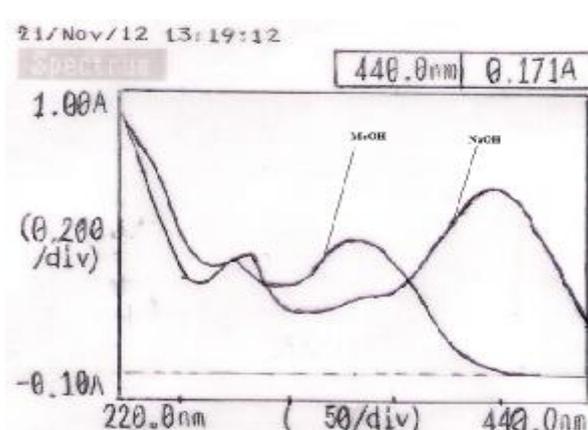
Spectre de AlCl₃ et après l'ajout d'HCl

Figure : Analyse spectrale de la molécule 02 qui provienne de la phase Mec de son+germe de blé (Noire, Rf= 0.6)

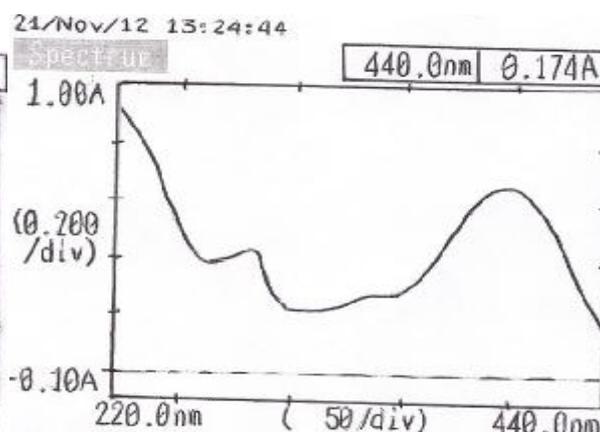
Tableau : Interprétation des déplacements observés par analyse spectrophotométrique UV de la molécule 02 d'après Markham 1982

Réactif de déplacement	Bande I (nm)	Bande II (nm)	Interprétation
MeOH	332	274	Flavone
NaOH (base forte)	399 (+67nm) Effet bathochrome	281	4' OH OH libre en 7
AlCl ₃ AlCl ₃ /HCl	341 341 (+9nm/ MeOH)	276 276	Pas de système ortho di OH (3', 4') OH en 5
NaOAc (base faible)	391 (+59 nm /MeOH)	282	OH-7 libre (confirmation)
NaOAc/H ₃ BO ₃	358 (+24nm/ MeOH)	281	Présence d'Ortho di- OH 3', 4'?

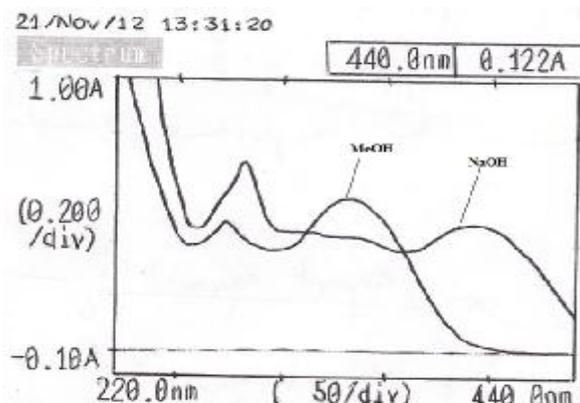
Molécule 03 : à partir de extrait acétate de son +germe de blé (noir, Rf= 0,9)



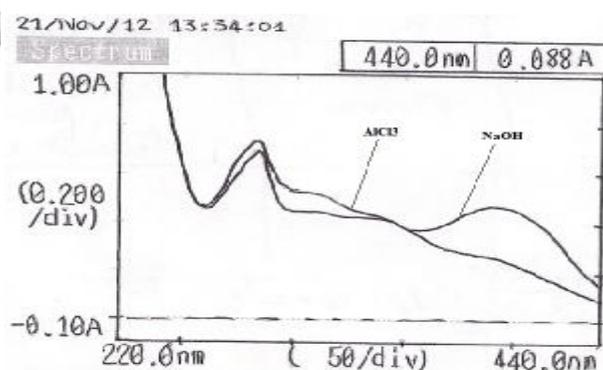
Spectre en présence de NaOH



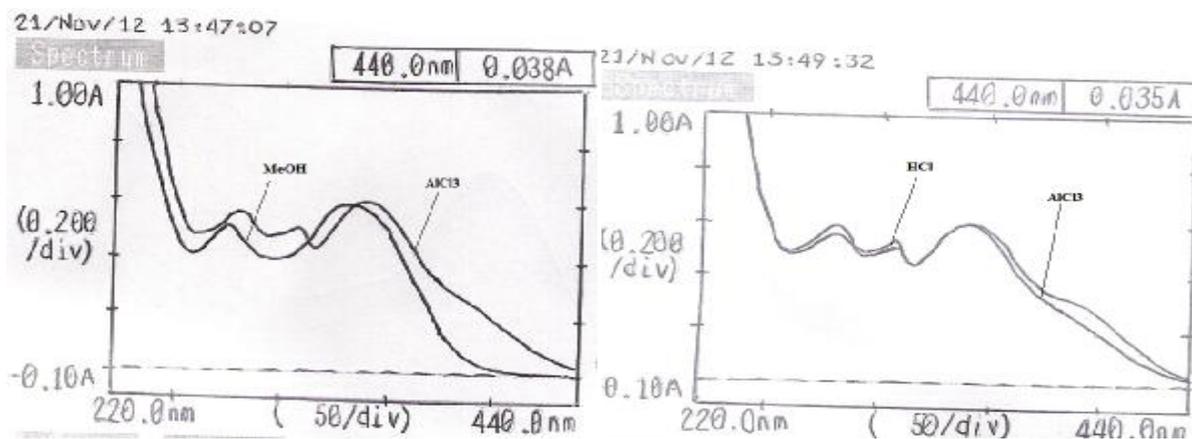
Après 5 min d'ajout de NaOH



Spectre MeOH et après l'ajout de NaOAc



Spectre NaOAc et après l'ajout de H₃BO₃



Spectre MeOH et après l'ajout de AlCl₃

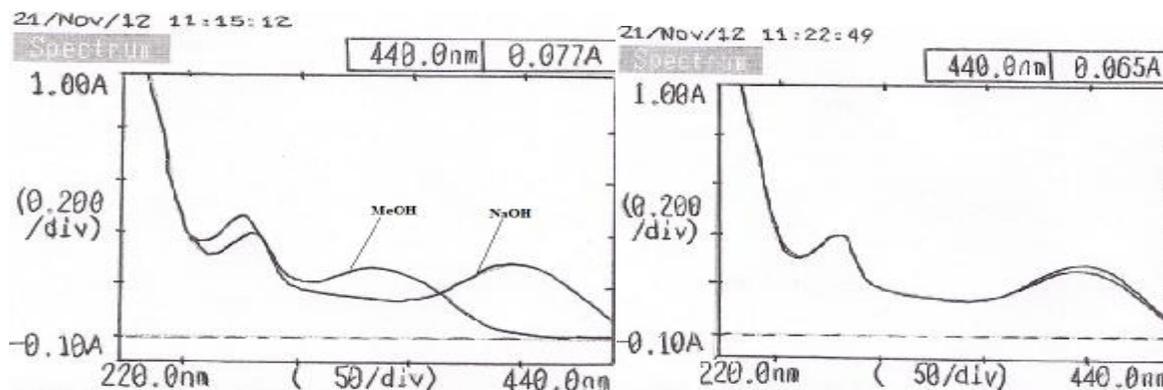
Spectre AlCl₃ et après l'ajout d'HCl

Figure : Analyse spectrale de la molécule 03 (extrait acétate de son +germe de blé (noir, Rf= 0,9)

Tableau : Interprétation des déplacements observés par analyse spectrophotométrique UV de la molécule 03 d'après Markham 1982

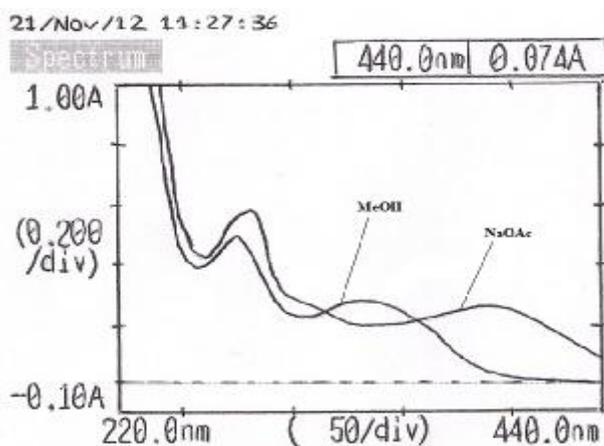
Réactif de déplacement	Bande I (nm)	Bande II (nm)	Interprétation
MeOH	331	274	Flavone
NaOH (base forte)	396 (+67nm) Effet bathochrome	282	4' OH OR en 7
AlCl ₃	338	306	Pas de système ortho di OH (3', 4')
AlCl ₃ /Hcl	338	306	
NaOAc (base faible)	392	333 (+61nm/MeOH)	OH-7 libre ?(confirmation)
NaOAc/H ₃ BO ₃		282	

Molécule 04 : qui provient à partir de la phase eau de son+germe de blé (noire, Rf= 0,7)

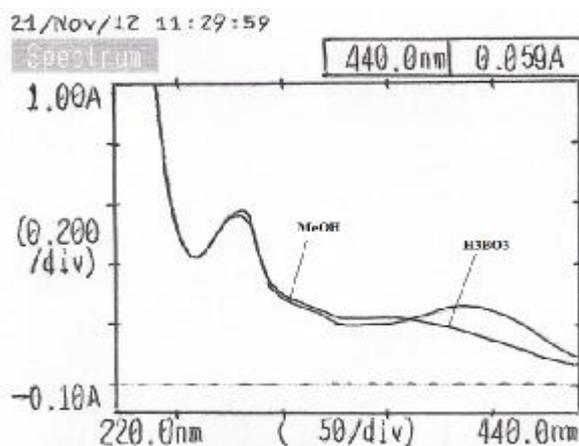


Spectre MeOH et après l'ajout de NaOH

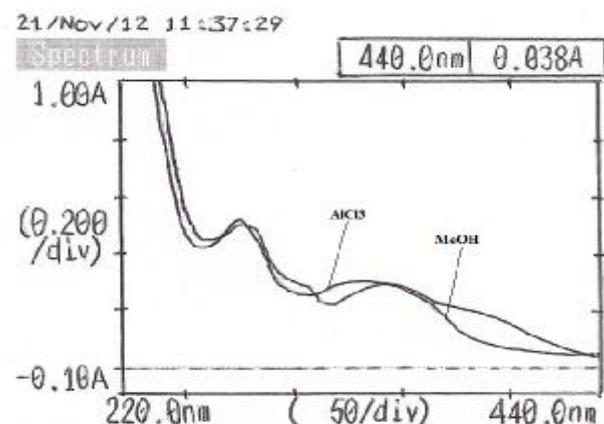
Après 5 min d'ajout de NaOH



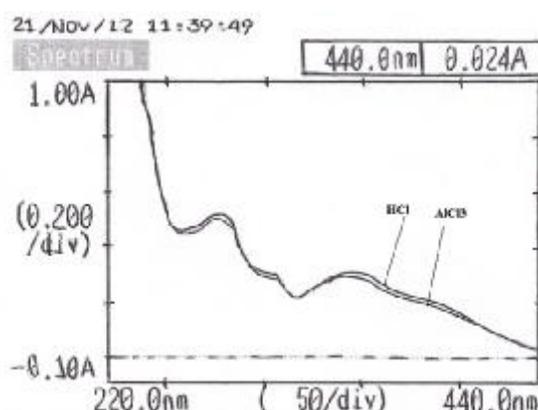
Spectre MeOH et après l'ajout de NaOAc



Spectre NaOAc et après l'ajout de H₃BO₃



Spectre MeOH et après l'ajout de AlCl₃



spectre AlCl₃ et après l'ajout d'HCl

Figure : Analyse spectrale de la molécule 04 (de la phase eau) de son+germe de blé (noir, Rf= 0,7)

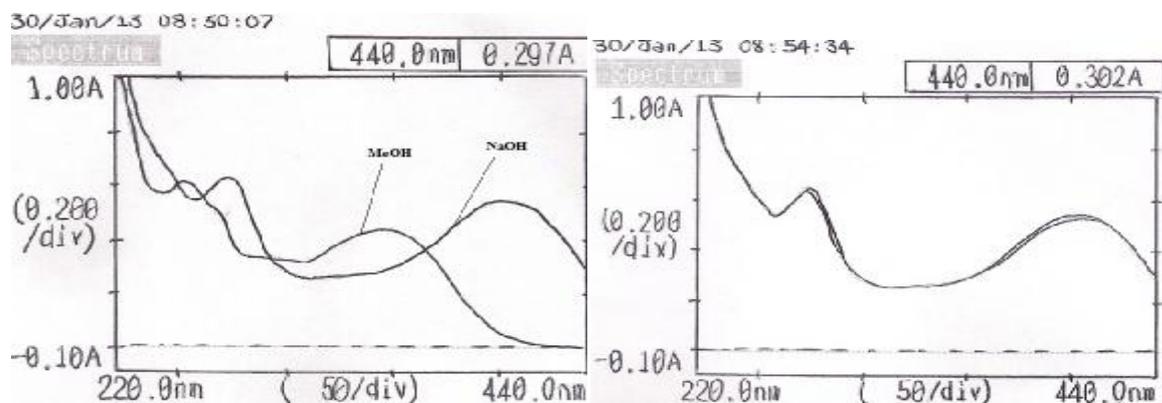
Tableau : Interprétation des déplacements observés par analyse spectrophotométrique UV de la molécule 4 d'après Markham 1982

Réactif de déplacement	Bande I (nm)	Bande II (nm)	Interprétation
MeOH	333	274	Flavone
NaOH (base forte)	398 (+65nm) Effet bathochrome	280	4' OH OR en 7
AlCl ₃	342	276	5 OH libre
AlCl ₃ /HCl	342	342	Pas de système ortho di OH (3', 4')
NaOAc (base faible)	389 (+54nm/MeOH)	281	OH-7 libre ?
NaOAc/H ₃ BO ₃	345 (+12nm/MeOH)	277	système ortho di OH (3', 4')

Annexe 3

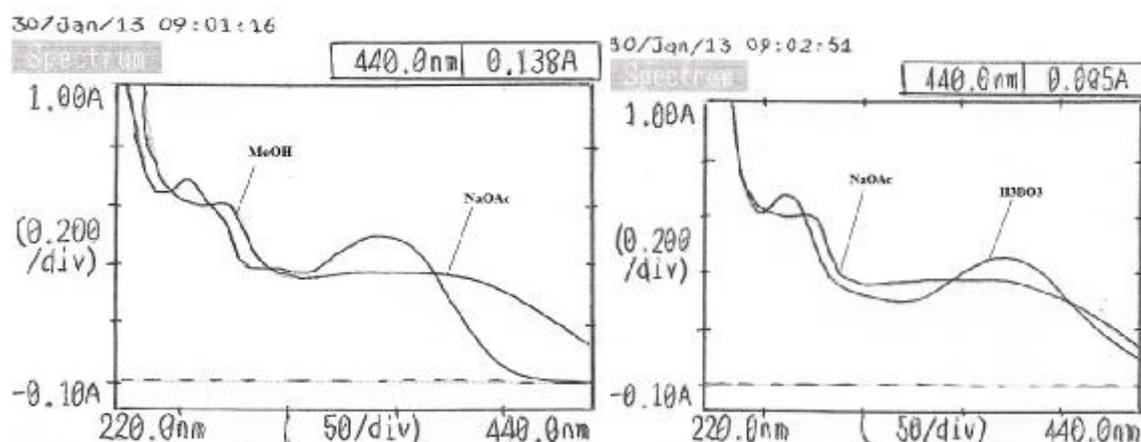
Série spectrale des molécules isolées à partir de *Calamintha grandiflora*

§ Identification structurale de la fraction 2 (100% EtOH)



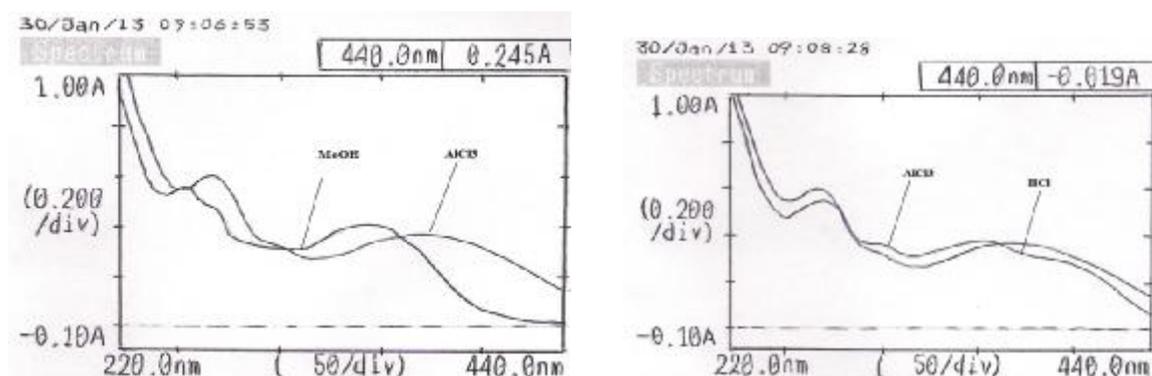
Spectre MeOH et l'ajout de NaOH

Après 5min d'ajout de NaOH



Spectre après l'ajout de NaOAc

spectre après l'ajout d'H₃BO₃



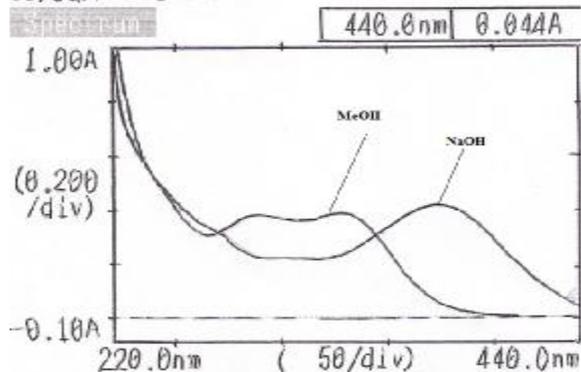
Spectre en présence d'AlCl₃

spectre après l'ajout d'HCl

Figure : Analyse spectrale de la fraction 2 (100% éthanol)

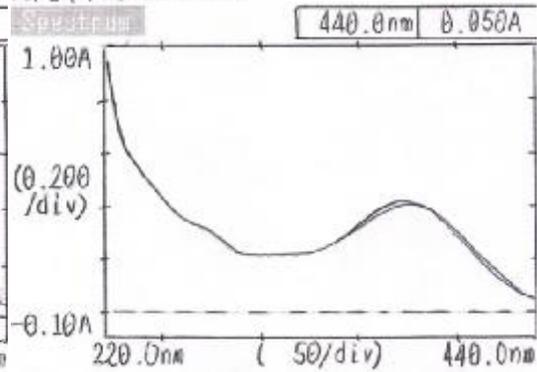
§ Identification structurale de la fraction 4 (60% toluène)

30/Jan/13 10:07:24



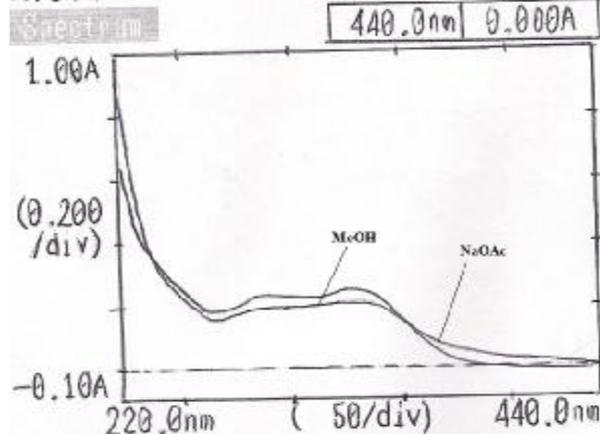
Spectre MeOH et après l'ajout de NaOH

30/Jan/13 10:09:54



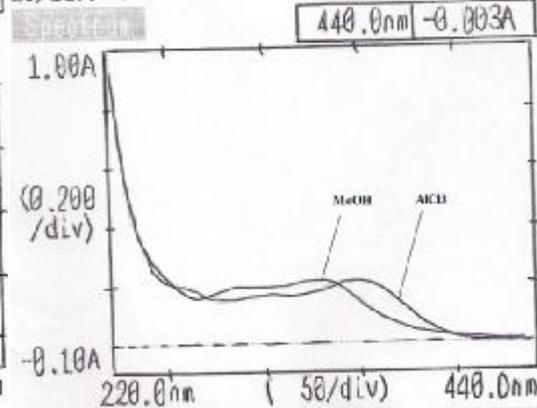
Après 5 min d'ajout de NaOH

30/Jan/13 10:12:52

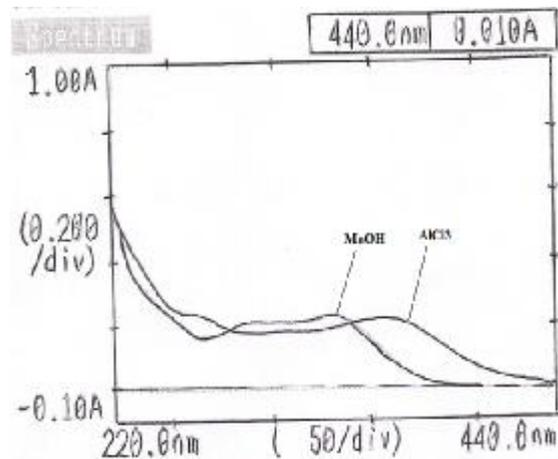


Spectre MeOH et en présence de NaOAc
 H_3BO_3

30/Jan/13 10:13:45



Spectre NaOAc et après l'ajout de
 H_3BO_3



30/Jan/13 10:18:22

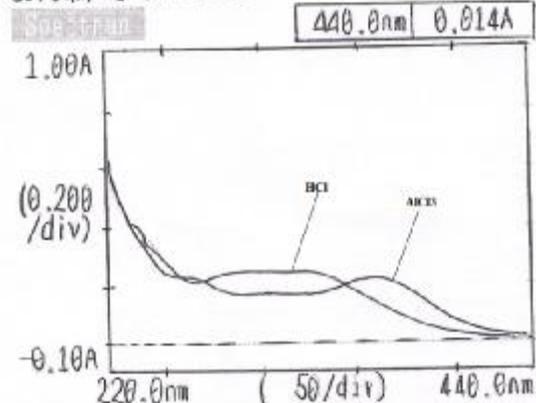


Figure : Analyse spectrale de la fraction 4 (60% Toluène) : 4 (60%Toluène)

Annexe 4 : Les équations de corrélation (DPPH, Concentration)

1/ Origanum vulgare

Extrait	Equation	R²
Totom	Y= 46,539x+4,614	0,9867
Ether diéthylique	Y= 86,838x+4,0762	0,9996
Acétate d'éthyle	Y= 80,958x+5,6156	0,996
MEC	Y= 70,595x+3,8032	0,9903
EAU	Y= 46,897x+9,0895	0,9922

2/ Origanum floribundum

Extrait	Equation	R²
Totom	Y= 66,265x+2,39	0,9963
Ether diéthylique	Y= 87,148x+3,0011	0,9974
Acétate d'éthyle	Y= 79,441x+ 7,3618	0,9961
MEC	Y= 79,417x+ 3,1588	0,9994
EAU	Y= 69,496 x-0,5218	0,9837

3/ Thymus numidicus

Extrait	Equation	R²
Totom	Y=55,159 x+ 2,8348	0,9957
Ether diéthylique	Y= 64,177x + 1,9227	0,9969
Acétate d'éthyle	Y=80,286 x- 0,3519	0,9884
MEC	Y= 61,783x+ 6,2612	0,9888
EAU	Y= 58,7x+ 1,3558	0,9978

4/ Calamintha grandiflora

Extrait	Equation	R²
Totom	Y= 28,772 x+ 1,9188	0,9897
Ether diéthylique	Y= 25,835x + 1,6627	0,9859
Acétate d'éthyle	Y= 73,556 x+ 0,555	0,9994
MEC	Y= 46,592x+ 1,5248	0,9755
EAU	Y= 35,671x+ 3,4903	0,9957

1/ Son plus germe de blé

Extrait	Equation	R²
Totom	$Y = 3,4733x + 4,7646$	0,9938
Ether diéthylique	$Y = 3,6484x + 4,6$	0,9862
Acétate d'éthyle	$Y = 12,575x + 8,171$	0,9987
MEC	$Y = 8,4403x + 3,8701$	0,9903
EAU	$Y = 3,1762x + 4,7363$	0,9874

2/ Son plus germe de blé en farine

Extrait	Equation	R²
Totom	$Y = 4,796x + 8,1909$	0,9945
Ether diéthylique	$Y = 2,1632x + 5,375$	0,8658
Acétate d'éthyle	$Y = 13,655x + 3,0323$	0,9985
MEC	$Y = 7,2986x + 1,1249$	0,9961
EAU	$Y = 4,158x + 3,4819$	0,9864

3/ Son d'orge

Extrait	Equation	R²
Totom	$Y = 9,1974x + 2,4968$	0,9935
Ether diéthylique	$Y = 10,898x + 5,9$	0,9675
Acétate d'éthyle	$Y = 26,159x + 3,9929$	0,9916
MEC	$Y = 20,771x + 1,694$	0,9913
EAU	$Y = 4,537x + 0,9501$	0,9839

Abstract:

After the water and air, nutrition is the third essential element of life. In recent years, research has been focused to find foods, which, beyond their nutritional qualities also have health benefits. Phenolic compounds are ubiquitous in the plant kingdom, they are found in grains, leaves, flowers, medicinal plants and food grains. They have attracted great interest from nutritionists, industrial food processing and consumer recognition due to their antioxidant properties as well as their roles in the prevention of various diseases associated with oxidative stress (cancer, diabetes type 2, cardiovascular diseases). This work is done in this context, through a comparative study of some medicinal plants and food grains on the basis of their phenolic contents and their antioxidant power.

The main results show:

- Qualitative point of view, the analysis of our food grain extracts by HPLC / DAD confirms the absence of quercetin and the predominance of flavone derivatives. The chromatography TLC shows the richness of our different extracts of phenolic compounds, especially flavonoids. The latter were confirmed by spraying the reagent Neu. The isolation by chromatographic techniques followed by spectrophotometiques analyzes assume that they are derived from apigenin and luteolin, which are found in our extracts of food grains. Those herbal two flavonols (quercetin derivative, and myricetin) and flavones (a derivative of luteolin).
- From a quantitative point of view: food grains have a lower content of phenolic compounds and flavonoids as medicinal plants. These results can be explained by the results of several researchers as they indicate that the phenolic compounds of these results can be explained by the fact that the phenolic compounds of cereals particularly wheat germ are essentially the precursor molecules starters or the phenolic metabolism of the plant.

The results of the in vitro antioxidant power by the method of DPPH ° (measured by calculating the EC₅₀) showed that the different extracts can act as free radical scavenger. Our results show that our extracts especially of food grains can provide "added value" in several areas such as functional foods, nutraceuticals for value.

Key words: phenolic compounds, dietary cereals, medicinal plants, flavonoids, antioxidant

ملخص :

تعتبر التغذية (بعد الماء والهواء) العنصر الثالث الأساسي للحياة. في السنوات الأخيرة الأبحاث بدأت تركز لإثبات أن الأغذية وراء خصائصها الغذائية لها أيضا فوائد صحية. المركبات الفينولية موجودة في كل مكان في المملكة النباتية. وقد اجتذبت اهتماما كبيرا من طرف خبراء التغذية والمعالجة الصناعية للأغذية والمستهلك نظرا لخصائصها المضادة للأكسدة وكذلك دورهم في الوقاية من الامراض المرتبطة بالأكسدة (السرطان السكري نوع 2 وأمراض القلب والأوعية الدموية). هذا العمل تم في هذا السياق من خلال دراسة مقارنة لبعض النباتات الطبية والحبوب الغذائية على أساس محتوياتها الفينولية وقدرتها المضادة للأكسدة.

تظهر النتائج الأساسية :

- من جهة نظر نوعية: التحاليل HPLC/DAD تبين غياب quercétine من مستخلصات الحبوب الغذائية وغلبة مشتقات فلافون (flavone). تظهر الرسومات اللونية CCM لمختلف المستخلصات المحضرة عن غناها من المركبات الفينولية وبخاصة المركبات الفلافونويد. هذه الاخيرة أثبتت عن طريق رش الكاشف Réactif de Neu. تقنيات العزل الكروماتوغرافية متبوعة بتحليل الطيف الضوئي (spectrophotométrie) تفترض وجود مشتقات lutéoline و apigénine في مستخلصات الحبوب الغذائية. تلك الموجودة في النباتات الطبية نوعين من flavonol (مشتق quercétine و آخر méricytine) وواحد flavone (مشتق من lutéoline) .
- من جهة نظر كمية: الحبوب الغذائية لديها محتوى اقل من المركبات الفينولية والفلافونيدية من النباتات الطبية. هذه النتائج يمكن تفسيرها من حيث أن المركبات الفينولية للحبوب الغذائية خاصة منها الموجودة في جنين القمح تمثل مستهلات للأبيض الفينولي للنبتة.

أظهرت نتائج المختبر للقوة المضادة للأكسدة من خلال طريقة دي بي بي اش (DPPH) (عن طريق حساب التركيز الفعال EC50) أن مختلف المستخلصات يمكن أن تكون بمثابة كاسحات الجذور الحرة.

نتائج هذه الدراسة تظهر ان المستخلصات المحضرة خاصة منها للحبوب الغذائية يمكن ان تقدم قيمة مضافة « valeur ajoutée » أو غذائية – علاجية « nutra-ceutique » حتى يتم تقييمها.

الكلمات المفتاح : المركبات الفينولية، الحبوب الغذائية ، النباتات الطبية، فلافونويد، القدرة المضادة للأكسدة

Nom : KHELFAH Prénom : Amina	Soutenu le : 07/07/2013												
Thème : Etude comparative du contenu phénolique et du pouvoir antioxydant de quelques plantes médicinales et des céréales alimentaires.													
Nature du diplôme : Magister	Option : Biologie appliquée												
<p>Après l'eau et l'air, la nutrition est le troisième élément essentiel de la vie. Ces dernières années, les recherches ont été focalisées en vue de prouver que les aliments, qui, au-delà de leurs qualités nutritionnelles présentent aussi des avantages pour la santé. Les composés phénoliques sont ubiquitaires dans le règne végétal, ils se trouvent dans les grains, les feuilles, fleurs, plantes médicinales et dans les céréales alimentaires. Ils ont suscité un grand intérêt de la part des nutritionnistes, des industriels de l'agro-alimentaire et des consommateurs, due à la reconnaissance de leurs propriétés antioxydantes et ainsi leurs rôles dans la prévention des diverses pathologies associées au stress oxydant (cancer, diabète type 2, maladies cardiovasculaires). Ce travail est réalisé dans ce contexte, à travers d'une étude comparative entre quelques plantes médicinales et des céréales alimentaires sur la base de leurs contenus phénoliques et de leur pouvoir antioxydant.</p> <p>Les principaux résultats obtenus montrent que :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Du point de vue qualitatif, les analyses de nos extraits de céréales alimentaires par l'HPLC/DAD confirment l'absence de la quercétine et la prédominance des dérivés de flavones. Les diagnostics CCM montrent la richesse de nos différents extraits en composés phénoliques et particulièrement en flavonoïdes. Ces derniers ont été confirmés par la pulvérisation du réactif de Neu. L'isolement par les techniques chromatographiques suivi par les analyses spectrophotométriques supposent que ce sont des dérivés d'apigénine et de lutéoline. Par contre les lamiaceae étudiées (origan, thym et calamintha (plantes médicinales) nous ont livré deux flavonols (dérivé de la quercétine, et de myricétine) et une flavone (dérivée de lutéoline). - Du point de vue quantitatif, les céréales alimentaires ont une teneur plus faible en composés phénoliques et en flavonoïdes que les plantes médicinales. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les composés phénoliques des céréales et particulièrement du germe de blé sont essentiellement les précurseurs ou les molécules starters du métabolisme phénolique de la plante. <p>Les résultats du pouvoir antioxydant in vitro par la méthode de DPPH° (exprimé par le calcul de l'EC₅₀) ont montré que les extraits peuvent agir en tant que piègeur de radicaux libres. Nos résultats mettent en évidence que nos extraits particulièrement ceux des céréales alimentaires peuvent offrir « une valeur ajoutée » dans plusieurs secteurs tels que les aliments fonctionnels, les nutraceutiques pour les valoriser.</p>													
Mots clés : composés phénoliques, céréales, flavonoïdes, Lamiaceae, pouvoir antioxydant.													
Laboratoire : Laboratoire de Biologie Micromoléculaire et Phytochimie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université de Constantine1.													
Les membres de jury : <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 33%;">M^f BENLARIBI M.</td> <td style="width: 33%;">Président</td> <td style="width: 33%;">Pr. Uni. Constantine 1</td> </tr> <tr> <td>M^f MERGHEM R.</td> <td>Directeur de thèse</td> <td>Pr. Uni. Constantine 1</td> </tr> <tr> <td>M^f NAAMOUNE H.</td> <td>Examineur</td> <td>Pr. INATAA</td> </tr> <tr> <td>M^f KHELIFI D.</td> <td>Examineur</td> <td>Pr. Uni. Constantine 1</td> </tr> </table>		M ^f BENLARIBI M.	Président	Pr. Uni. Constantine 1	M ^f MERGHEM R.	Directeur de thèse	Pr. Uni. Constantine 1	M ^f NAAMOUNE H.	Examineur	Pr. INATAA	M ^f KHELIFI D.	Examineur	Pr. Uni. Constantine 1
M ^f BENLARIBI M.	Président	Pr. Uni. Constantine 1											
M ^f MERGHEM R.	Directeur de thèse	Pr. Uni. Constantine 1											
M ^f NAAMOUNE H.	Examineur	Pr. INATAA											
M ^f KHELIFI D.	Examineur	Pr. Uni. Constantine 1											
Année universitaire : 2012-2013													