

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche**

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

**Université Mohammed Seddik Ben Yahia - Jijel -**

جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل -

Faculté des Sciences Exactes et informatique

كلية العلوم الدقيقة والاعلام الالي

Département : Chimie

قسم الكيمياء



**Mémoire de fin d'études**

En vue de l'obtention du diplôme : **Master Académique en chimie**

**Option : Chimie pharmaceutique**

## **Thème**

**Contribution à la recherche des nouveaux composés  
phénoliques antioxydants par investigation  
phytochimique bioguidée d'une espèce végétale marine.**

**Présenté par :**

KHELFALLAH Choubaila

BOUBADJA Fatiha

### **Jury :**

<b>Président :</b>	Mr BELGHOSI Mabrouk	Pr	Univ.de Jijel
<b>Examinatrice :</b>	M <sup>me</sup> AYAD Radia	MCA	Univ.de Jijel
<b>Encadreur :</b>	M <sup>me</sup> BOUDEBAZ Khadidja	MCB	Univ.de Jijel

**Année Universitaire 2021- 2022**

## Remerciements



*Avant tout, nous remercions du plus profond de notre cœur, Dieu le tout puissant de nous avoir donné la force, le courage et la volonté pour réaliser ce modeste travail.*

*En terme de notre mémoire de fin d'étude, nous tenons à remercier notre encadreur **Dr. Boudebaz Khadidja** pour la disponibilité, la confiance, les conseils, l'amitié, l'encadrement et le soutien moral qu'il a su m'apporter tout au long de ce travail. Nous tenons également à le remercier de toute la patience dont elle a su faire preuve au cours de la rédaction de ce mémoire. Ainsi pour la proposition de ce thème de ce mémoire, pour ses conseils et ses dirigés du début à la fin de ce travail.*

*Nous adressons également nos vifs remerciements à **Dr. Belghobsi** qui nous a fait l'honneur en acceptant de présider le jury.*

*Nous exprimons nos vifs remerciements au **Dr. Ayad** pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de faire partie de ce jury et d'examiner ce mémoire.*

*Nous aimerons également remercier **les ingénieurs**. Pour leurs aides dans la réalisation de notre calculs statistique ainsi que pour les précieux conseils qu'ils ont bien voulu nous transmettre à chacune de nos rencontres.*

*Merci à **nos parents** pour leur contribution dans chaque travail que nous avons effectué et pour tous les sacrifices consentis.*

*Merci à tous **nos amis**.*

*Nos remerciements s'adressent également à tous **les enseignants** de département de chimie de la faculté des sciences exactes et informatique à l'université de Jijel, ainsi que **nos collègues** de la spécialité chimie pharmaceutique.*

*Enfin, nous remercions profondément tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## **Dédicace**

*Avec l'aide de Dieu le tout puissant clément et miséricordieux, j'ai pu accomplir ce travail que je dédie :*

*A mes chers parents.*

*Ma mère « **Fatima Zohra** » et mon père « **Abdel Ali** » à ceux qui m'ont toujours encouragé et leur amour pour que je réussisse dans mes études pour leurs sacrifices et leurs soutiens tous au long mes études.*

*Et à mon fiancé « **Omar** » pour le soutenir tout au long de mes études dans chaque grand et petit.*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour ma construction et mon bien être. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse Dieu, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.*

*Au corps enseignant qui nous a donné une très bonne formation pendant le cursus universitaire.*

*A mon cher frère : « **Ali** »*

*A mes frères, mes sœurs surtout ma sœur « **Yasmina et Ikram** » pour leur affection. Que dieu leur accorde le succès, le bonheur et la santé et renforce notre union.*

*A tous les membres de ma famille, petits et grands.*

*Pour leurs soutiens moraux et leurs conseils précieux tout au long de mes études.*

*Et surtout mon binôme « **Choubaila** » d'être une amie si merveilleuse, je suis vraiment chanceux de t'avoir à mes côtés.*

*A tous mes amis et collègues sans exception est surtout « **Donia et Nozha, Meriem et Nabila, Fatima et Chahla** »*

*A tous mes amis de la promotion de master en Chimie pharmaceutique.*

*A tous les gens que j'aime, et m'aime*

**BOUBADJA FATIHA**



## **Dédicace**

*A l'aide de dieu « **ALLAH** » tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, J'ai pu réaliser ce modest travail que dédie*

*A **ma mère** qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous ces sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour sons assistance et sa présence de ma vie, reçois à travers ce travail aussi modest soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*A **mon père** qui peut être fier de trouver ici les résultats des longues années de sacrifices et de privation pour m'aider avancer dans la vie ; merci pour les valeurs nobles.*

*A mes très chers frères, **mouhamed amine** et **yasser***

*A mes très chères sœurs **imane**, **narimane**, **Youssra**, **dina***

*Qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance*

*A ma 2ème famille « **BELLAH** » avec qui j'ai grandi et qui j'ai partagé les merveilleux souvenirs.*

*A mon binôme **fatiha**.*

*A mes chers Amies : **Fatima**, **Hassiba**, **nouzha**, **meriem**, **nabila**, **chahla**, **sarra**, en témoignage de l'amitié sincère qui me a liée et des bons moments passés ensemble.*

**KHELFALLAH CHOUBAILA**



**ABRÉVIATIONS**

<b>ABTS</b>	: Acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
<b>AAO</b>	: Activité antioxydante
<b>CC</b>	: Chromatographie sur colonne
<b>CCM</b>	: Chromatographie sur couche mince
<b>FT</b>	: Flavonoïdes Totaux
<b>PT</b>	: Phénoliques Totaux
<b>DPPH</b>	: 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl
<b>EAG</b>	: Équivalent Acide Gallique
<b>EC</b>	: Equivalent Catéchine
<b>Eq Aasc</b>	: Equivalent de l'acide ascorbique
<b>ERN</b>	: Espèces réactives de l'azote
<b>ERO</b>	: Espèces réactives de l'oxygène
<b>ET</b>	: Écart type
<b>F</b>	: Fractions
<b>FRAP</b>	: Ferrique réduction antioxydant power
<b>g</b>	: Gramme
<b>IC50</b>	: Concentration nécessaire pour inhiber 50% du radical
<b>m</b>	: Masse
<b>ml</b>	: Millilitre
<b>NO</b>	: Radical d'oxide nitrique
<b>NO<sub>2</sub><sup>·</sup></b>	: Radical dioxyde du nitrogène
<b>OH<sup>·</sup></b>	: Radical hydroxyle
<b>PI%</b>	: Pourcentage Inhibitrice
<b>PO</b>	: Pouvoir antioxydant
<b>PR</b>	: Pouvoir réducteur
<b>TF</b>	: Teneur en flavonoïdes totaux
<b>TP</b>	: Teneur en polyphénols totaux
<b>µg Eq [Aasc]</b>	: Microgramme d'équivalent acide ascorbique
<b>µg Eq [Aasc]/mg ext</b>	: Microgramme d'équivalent acide ascorbique par milligramme d'extrait
<b>UV</b>	: Ultra-violet

## TABLE DES MATIÈRES

### REMERCIEMENT

### DEDICACES

### ABRÉVIATIONS

### TABLE DES MATIÈRE

<b>Introduction</b> .....	<b>01</b>
<b>Chapitre I : Etude bibliographique</b>	
<b>I. Etude bibliographique</b> .....	<b>03</b>
<b>I.1- Composés phénoliques</b> .....	<b>03</b>
I.1.1- Définition et structure chimique .....	<b>03</b>
I.1.2- Classification .....	<b>03</b>
I.1.3- Biosynthèse des composés phénoliques .....	<b>04</b>
I.1.4- Composés phénoliques des espèces végétales marines .....	<b>05</b>
I.1.5- Rôle des composées phénoliques .....	<b>06</b>
<b>I.2- Activité antioxydante</b> .....	<b>07</b>
I.2.1- Radicaux libres .....	<b>07</b>
I.2.1.1- Espèces réactives de l'oxygène (ERO) .....	<b>07</b>
I.2.1.2- Espèces réactives azotés (ERN) .....	<b>07</b>
I.2.2- Stress oxydants et production des radicaux libres .....	<b>08</b>
I.2.3- Système antioxydant .....	<b>08</b>
I.2.3.1- Définition .....	<b>08</b>
I.2.3.2- Antioxydants enzymatiques .....	<b>08</b>
I.2.3.3- Antioxydants non enzymatiques .....	<b>09</b>
I.2.3.4- Mécanisme d'action .....	<b>09</b>
I.2.4- Activité antioxydante des composés phénoliques .....	<b>10</b>
<b>Chapitre II : Travail personnel</b>	
<b>II- Travail personnel</b> .....	<b>12</b>
<b>II.1- Matériel et méthodes</b> .....	<b>12</b>
II.1.1- Matériel végétal .....	<b>12</b>
II.1.2- Extraction .....	<b>12</b>
II.1.3- Etude phytochimique des composés phénoliques .....	<b>15</b>
II.1.3.1- Analyse quantitative des composés phénoliques .....	<b>15</b>
II.1.3.1.1- Dosage des polyphénols totaux .....	<b>15</b>
II.1.3.1.2- Dosage des flavonoïdes .....	<b>16</b>
II.1.3.2- Analyse qualitative des composés phénoliques .....	<b>17</b>
II.1.3.2.1- Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince .....	<b>17</b>
II.1.3.2.2- Séparation des extraits par chromatographie sur colonne .....	<b>18</b>
II.1.4- Evaluation de l'activité antioxydante .....	<b>18</b>
II.1.4.1- Test DPPH .....	<b>18</b>
II.1.4.2- Test ABTS .....	<b>20</b>
II.1.4.3- Test FRAP .....	<b>22</b>
<b>II.2- Résultats et discussion</b> .....	<b>24</b>
<b>II.2.1- Etude phytochimique des composés phénoliques des extraits</b> .....	<b>24</b>

---

II.2.1.1- Rendement d'extraction .....	24
II.2.1.2- Analyse quantitative des composés phénoliques des extraits .....	24
II.2.1.2.1- Teneurs en polyphénols totaux .....	24
II.2.1.2.2- Teneurs en flavonoïdes .....	26
<b>II.2.2- Evaluation de l'activité antioxydante des extraits .....</b>	<b>27</b>
II.2.2.1- Test DPPH .....	27
II.2.2.2- Test ABTS .....	29
II.2.2.3- Test FRAP .....	31
<b>II.2.3- Corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en composés phénoliques</b>	<b>33</b>
<b>II.2.4- Etude phytochimique des composés phénoliques de l'extrait chloroforme .....</b>	<b>36</b>
II.2.4.1- Analyse qualitative des composés phénoliques de l'extrait chloroforme .....	36
II.2.4.1.1- Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) .....	36
II.2.4.1.2- Séparation de l'extrait chloroforme par chromatographie sur colonne .....	37
II.2.4.2- Analyse quantitative des composés phénoliques des différentes fractions de l'extrait chloroforme .....	39
II.2.4.2.1- Teneurs en polyphénols totaux .....	39
II.2.4.2.2- Teneurs en flavonoïdes .....	40
<b>II.2.5- Activité antioxydante des différentes fractions de l'extrait chloroforme .....</b>	<b>42</b>
II.2.5.1- Test DPPH .....	42
II.2.5.2- Test ABTS .....	43
II.2.5.3- Test FRAP .....	45
<b>II.2.6- Corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en composés phénoliques des fractions .....</b>	<b>46</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>50</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>52</b>

**Introduction**

Depuis l'antiquité, les plantes médicinales ont toujours fait partie du savoir de base de toutes les sociétés humaines. A l'issue des progrès rapides de la technologie médicale, les préparations à base de plantes appelées aussi « médecine alternative ou complémentaire » gagnent beaucoup de popularité, et l'intérêt accru pour leur utilisation a encouragé des études plus détaillées sur les ressources végétales (Bettaieb et al., 2017).

Les plantes de la médecine traditionnelle constituent un potentiel médical et économique des ressources naturelles qui fournissent les matières premières nécessaires à la fabrication des médicaments. Ce sont toutes les plantes qui contiennent une ou plusieurs substances pouvant être utilisées à des propriétés thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles (Sofowora, 2010). Les recherches ont montré que l'action des plantes médicinales est due à quelques constituants élaborés par la plante appelés « principes actifs » qui peuvent être des composés phénoliques, des minéraux, des glycosides, des résines, des huiles essentielles, des alcaloïdes et d'autres (Cherif et al., 2009).

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels a augmenté considérablement à cause de leurs propriétés thérapeutiques. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires (Sanchez-moreno, 2002). Les antioxydants sont des molécules capables de ralentir ou d'empêcher l'oxydation des autres molécules. L'oxydation est une réaction chimique qui s'explique par le transfert d'électrons d'une substance vers l'agent oxydant, ce qui donne comme produits des radicaux libres en mesure de démarrer une réaction en chaîne (Chemat, 2011). Une quantité élevée de radicaux libres engendre un stress oxydatif. Dans le corps humain, ce stress généré par une grande variété de liaisons biochimiques et physiologiques, se traduit le plus souvent par des maladies métaboliques et une morte cellulaire.

Les antioxydants les plus connus sont les caroténoïdes, les polyphénols et les flavonoïdes (Chemat, 2011). Les polyphénols représentent les composés majoritaires dans la plante puisqu'ils agissent comme des antioxydants primaires contre les radicaux libres (Moussa et al., 2011). De plus, les composés phénoliques sont constitués par de nombreuses catégories, dont les plus abondants sont les flavonoïdes qui possèdent un potentiel antioxydant remarquable. Ces derniers sont naturellement présents dans la plante ainsi sont considérés d'avoir des effets positifs sur la santé humaine (Nunes et al., 2012).



Les composés phénoliques sont présents aussi dans les végétaux marins et particulièrement dans les algues brunes, la richesse de ces derniers en composés phénoliques en fait l'une des priorités de recherches scientifiques au cours de la dernière décennie pour l'exploration de ces ressources vers la découverte de nouvelles substances antioxydantes prometteuses. Les végétaux marins représentent donc une ressource naturelle précieuse pour les composés phénoliques bioactifs. Les composés phénoliques produits par les végétaux marins face à un stress environnemental, leur rôle antioxydant peut donc prévenir les dommages cellulaires résultants de la formation des espèces réactives oxygénées (Surget, 2017).

Notre étude est de mettre le point sur la contribution de la teneur en polyphénols et flavonoïdes des plantes marines à ses propriétés antioxydantes par une étude phytochimique bioguidée d'une espèce végétale marine afin de chercher de nouveaux composés phénoliques antioxydants.

L'étude phytochimique est basée premièrement sur l'extraction et la quantification des composés phénoliques ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits afin de déterminer l'extrait le plus riche en composés phénoliques antioxydants. Ce dernier soumis ensuite à une séparation chromatographique sur colonne pour l'isolement des composés phénoliques puis l'évaluation à nouveau de leur activité antioxydante.

L'étude est organisée en deux chapitres. Le premier concerne la recherche bibliographique où on définit les composés phénoliques et les propriétés antioxydantes. La méthodologie de travail est représentée dans le deuxième chapitre où l'on expose les méthodes d'extraction et les protocoles expérimentaux des dosages des composés phénoliques et d'évaluation de leur activité antioxydante. Dans le troisième chapitre sont présentés les résultats obtenus suivis de leurs discussions. Finalement, l'ensemble de ce travail est clôturé par une conclusion et les perspectives de recherche envisageables.

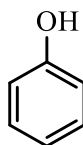
L'étude est organisée en deux chapitres. Le premier concerne la recherche bibliographique où on définit les composés phénoliques et les propriétés antioxydantes. La méthodologie de travail est représentée dans le deuxième chapitre où l'on expose les méthodes d'extraction et les protocoles expérimentaux des dosages des composés phénoliques et d'évaluation de leur activité antioxydante ainsi les résultats obtenus suivis de leurs discussions. Finalement, l'ensemble de ce travail est clôturé par une conclusion et les perspectives de recherche envisageables.

## Chapitre I : Etude bibliographique

### I.1- Les composés phénoliques

#### I.1.1- Définition et structure chimique

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des phytomicronutriments synthétisés par les plantes et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ces composés participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales (Escarpa et Gonzalez., 2001). Ils sont majoritairement issus de la voie des phénylpropanoïdes et ayant la L-phénylalanine (L-Phe ou Phe) comme précurseur, ils peuvent également provenir de la voie du shikimate (Cheynier et al., 2013). Les composés phénoliques peuvent être définis comme une substance organique qui possède un cycle aromatique portant un substituant hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction (esters, éthers méthyliques, glycosides, etc.) (figure 01) (Harborne., 1989).



**Figure 01:** Structure du noyau phénol.

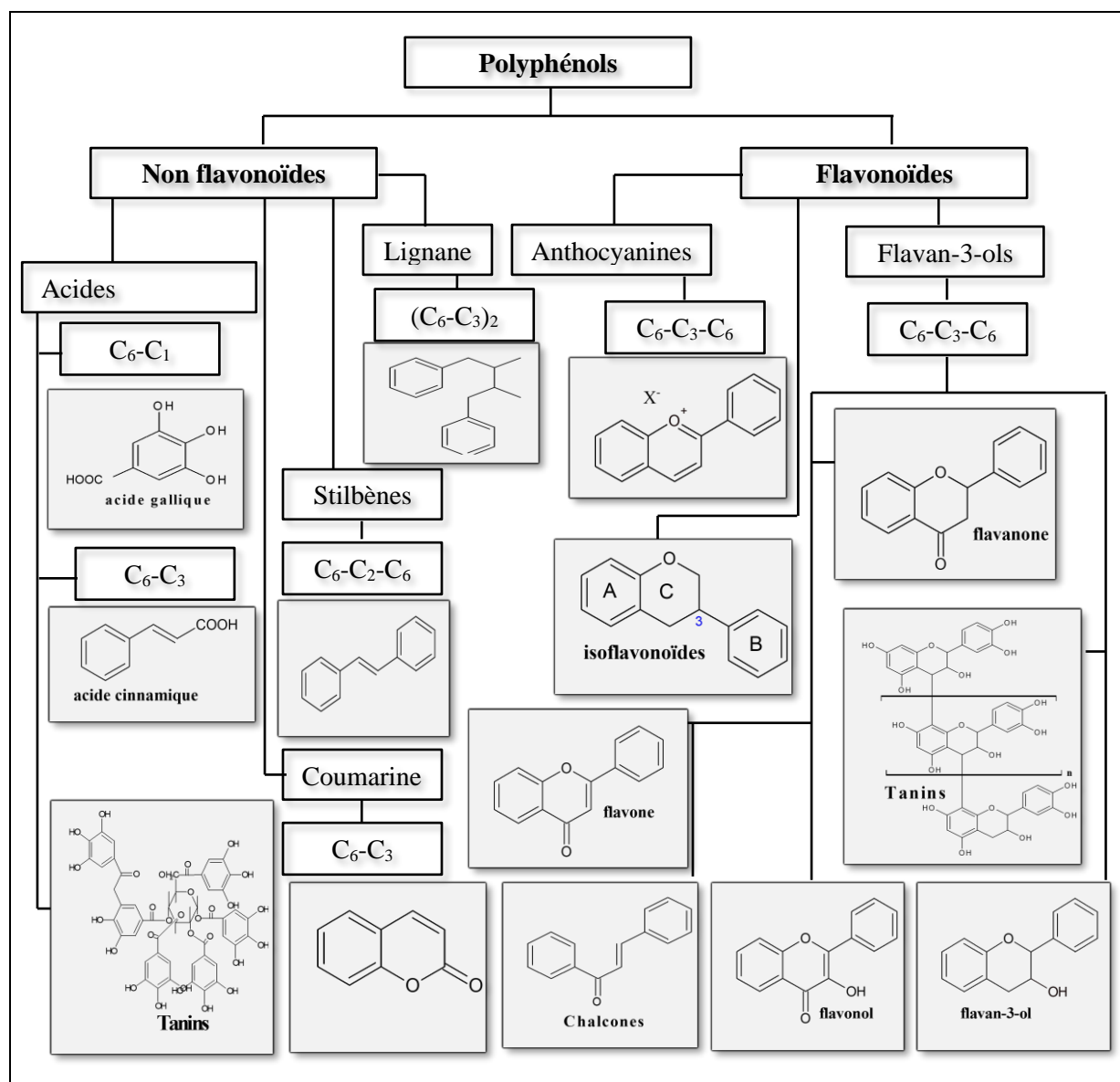
#### I.1.2- Classification

Les milliers de polyphénols extraits de plantes ont été regroupés en différentes classes. La classification de ces composés est basée sur le nombre d'atome de carbone constitutif et ensuite en regard à la structure du squelette de base de la molécule (Macheix et billot, 1990) et Selon Corona (2011) les polyphénols peuvent être répartis en deux classes majeures : les flavonoïdes et les non flavonoïdes (figure 02).

Les non-flavonoïdes peuvent être classés selon leur structure chimique dans les groupes suivants : acides phénoliques avec les sous-classes dérivées de acides hydroxy benzoïques et l'acide hydroxycinnamique, les stilbènes et les lignanes (Vladimir-Knežević et al., 2012).

Les flavonoïdes sont une classe de composés phénoliques qui, avec les caroténoïdes et la chlorophylle donne de la couleur à de nombreuses espèces de fleurs et de fruits. Les flavonoïdes n'existent que dans des plantes où sont présents principalement sous forme de glycosides (El Gharras, 2009), dans lequel un ou plus de groupes hydroxyles de phénols sont combinés avec des sucres réducteurs. Les flavonoïdes sont également associés à un large éventail d'effets biologiques sur la santé (Pyrzynska et Biesaga, 2009). Le terme flavonoïde est attribué aux composés phénoliques de structure générale C6-C3-C6. Ainsi, les flavonoïdes

existent sous différentes classes et ceci en fonction du degré d'oxydation et d'insaturation du cycle C. Les principales différentes classes sont : flavonols, flavones, isoflavones, flavanones, monomères, oligomères et anthocyanines.



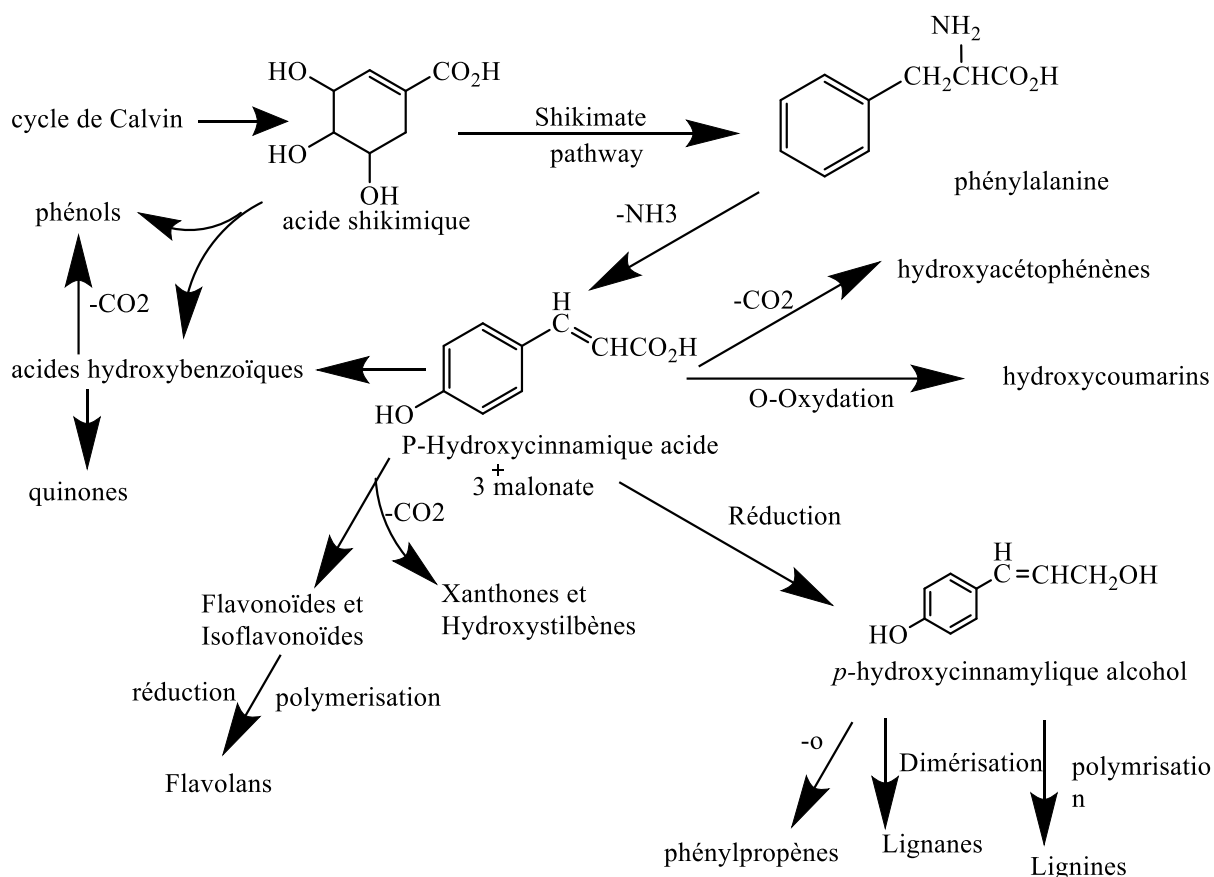
**Figure 02 :** Classification, structures chimiques et nomenclature des composés phénoliques (Rasines-Perea et Teissedre, 2017).

### I.1.3- Biosynthèse des composés phénoliques

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes. Ils sont synthétisés à partir de deux voies biosynthétiques :

- 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 ;
- Celle issue de l'acétate.

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



**Figure 03 :** Origine biosynthétique des composés phénoliques (Harborne, 1989).

#### I.1.4- Composés phénoliques des espèces végétales marines

L'une des priorités de l'innovation biotechnologique au cours de la dernière décennie a été l'exploration des ressources vers la découverte de nouvelles bio-activités prometteuses (Surget et al., 2017). Les végétaux marins représentent une ressource naturelle précieuse pour les composés phytochimiques bioactifs. Pour faire face à un son large éventail d'habitats, ils ont développé diverses voies métaboliques secondaires qui produisent un grand nombre de composés chimiques inhabituels pour s'adapter à leur mode de vie. Ces composés englobent une grande variété de classes chimiques, y compris les terpènes, shikimates, polycétides, acétogénines, peptides, alcaloïdes, et beaucoup structures non identifiées et non caractérisées (Sarker et al., 2002).

Beaucoup de ces composés ont prouvé leur potentiel dans plusieurs domaines, en particulier comme agents thérapeutiques potentiels pour une variété de maladies.

Les composés phénoliques peuvent présenter d'autres activités biologiques encore peu étudiées mais d'un grand intérêt pour les industries et la société civile. Ces molécules actives peuvent présenter des activités originales ayant un lien direct avec leur rôle biologique, comme des propriétés photo-protectrices (c'est-à-dire lorsqu'ils sont synthétisés de nouveau par les végétaux marins en cas de stress lumineux ou d'irradiation aux ultra-violet). Les composés phénoliques produits par les végétaux marins face à un stress environnemental, leur rôle antioxydant peut donc prévenir les pathologies cellulaires résultantes de la formation des espèces réactives oxygénées (ERO) (Surget, 2017).

### **I.1.5- Rôle des composées phénoliques**

Les polyphénols sont connus pour leurs activités biologiques directement liées avec la santé humaine (Halliwell, 1994). Des études plus récentes ont montré que les polyphénols présentent une activité antibactérienne importante (Ferrazzano et al., 2011). Ces composés agissent par deux mécanismes d'actions : un premier consiste à l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique dans les bactéries (Wu et al., 2013) et un deuxième provoquant l'endommagement des membranes cellulaires des bactéries (Tsuchiya et Linuma., 2000). Par suite (Fuchs, 1998) a montré que les polyphénols protègent contre le stress photo-oxydatif cutané causé par le soleil, raisons pour lesquelles les polyphénols se retrouvent dans plusieurs préparations cosmétiques utilisés dans le traitement du vieillissement cellulaire et la protection de la peau (Mena et al., 2014).

## **I.2- Activité antioxydante**

### **I.2.1- Radicaux libres**

Un radical libre est un atome ou une molécule qui porte sur sa couche électronique périphérique un ou plusieurs électrons non appariés (Ibert et al., 2003).

Les radicaux libres peuvent être dérivés de l'oxygène appelés espèces réactives oxygénées (ERO) ou d'autres atomes comme l'azote dites espèces réactives d'azote (ERA) ou (RONS ; reactive oxygen and nitrogen species). L'appellation ERO inclut donc les radicaux libres de l'oxygène : anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). De par sa structure particulière, ils ont tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner leurs stabilité (Delattre et al., 2005).

#### **I.2.1.1- Espèces réactives de l'oxygène (ERO)**

Les ERO sont un groupe de radicaux libres, de molécules réactives et d'ions qui sont dérivés d'oxygène  $O_2$ . On estime qu'environ 1% d' $O_2$  consommé par les plantes est dirigé vers la production d'ERO. Dans divers compartiments subcellulaires tels que les chloroplastes, les mitochondries, peroxysomes. Les ERO sont bien connus pour jouer un double rôle à la fois nuisible et bénéfique en fonction de leur concentration dans les plantes. A fortes concentrations, les ERO provoquent des dommages aux biomolécules, alors qu'à concentration faible modérée, il agit comme un second messager dans la signalisation intracellulaire cascades qui médient les réponses multiples dans les cellules végétales (Sharma et al., 2012).

#### **I.2.1.2- Espèces réactives azotés (ERN)**

Le monoxyde d'azote radicalaire ou  $NO^{\bullet}$  est un composé important ; il est notamment synthétisé par les cellules endothéliales via l'action de NO synthétases sur la L-arginine. C'est une molécule labile très diffusible, dont les effets régulateurs s'exercent sur la plupart des fonctions physiologiques de l'organisme (maintien du tonus vasculaire, neurotransmission, fonctionnement rénal, ...). Toutefois, le  $NO^{\bullet}$  peut former avec l'anion superoxyde le peroxyde d'azote ( $HOONO$ ), un oxydant puissant et diffusible, capable d'endommager de nombreuses molécules organiques (Haleng et al., 2007).

Les espèces non radicalaires azotées sont caractérisées par sa grande capacité de diffusion dans les membranes cellulaires et sa réactivité moyenne (de l'ordre de quelques secondes *in vivo*), le monoxyde d'azote radicalaire peut aisément réagir avec la plupart des espèces oxygénées et se transformer en dioxyde d'azote ( $NO_2$ ) ( $2 NO^{\bullet} + O_2 \rightarrow 2 NO_2$ ), lequel

peut donner du trioxyde d'azote ( $N_2O_3$ ) : ( $NO^{\bullet} + NO_2 \rightarrow N_2O_3$ ) pour enfin aboutir à un ion nitrate stable ( $NO_2^-$ ) : ( $N_2O_3 + H_2O \rightarrow 2 NO_2^- + 2H^+$ ). De plus, le monoxyde d'azote forme avec l'ion superoxyde le peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) ( $NO^{\bullet} + O_2^{\bullet-} \rightarrow ONOO^-$ ) moins réactif que son précurseur azoté, mais responsable de l'oxydation de nombreuses biomolécules (protéines, lipides et acides nucléiques) (Rezaire, 2012).

## **I.2.2- Stress oxydants et production des radicaux libres**

Le stress oxydatif provient de déséquilibre entre les systèmes produisant des espèces réactives oxygène (ERO) et systèmes antioxydants, enzymes (superoxyde dismutases [SOD], glutathion peroxydase [GPx] etc.) ou non (glutathion, vitamines etc.). De par sa nature même le stress oxydatif reste un phénomène physiopathologique difficile à arrêter (Zbadi et al., 2018).

La production intracellulaire des ERO se produit souvent dans le réticulum endoplasmique et les mitochondries. Dans des circonstances normales, une poignée de ERO sont produits de manière durable dans les cellules (Cheng et al., 2022).

## **I.2.3- Système antioxydant**

### **I.2.3.1- Définition**

Le terme « antioxydant » est couramment utilisé dans un sens large, se référant à des agents capables d'interférer avec les processus liés au stress oxydatif. Dans un sens plus étroit le terme signifie un effet de rupture de chaîne lors de l'auto-oxydation des lipides (Vichnevetskaia et al., 1999).

### **I.2.3.2- Antioxydants enzymatiques**

La cellule dispose d'un système complexe de détoxification contre les ERO comprenant des enzymes (superoxyde dismutase «SOD», catalase «CAT», glutathion peroxydase «GPX».) (Li et al., 2012). Ces enzymes opèrent dans différents compartiments sous-cellulaires et répondent lorsque les cellules sont exposées à un stress oxydatif, ce qui joue un rôle important dans le nettoyage des ERO induites par le stress généré dans les plantes (Sharma et al., 2012).

### **I.2.3.3- Antioxydants non enzymatiques**

Une bonne partie des antioxydants non enzymatiques sont contenus dans les aliments (exogènes), notamment les fruits et légumes comme les vitamines (E, C...). Ils permettent de renforcer les défenses antioxydantes endogènes (Glutathion et enzymes) (Vincent et al., 2006) et comprennent généralement un noyau aromatique dans le cadre de la structure moléculaire. Ceux-ci peuvent être associés à une variété de structures cycliques et la présence d'un ou plusieurs groupes hydroxyles pour fournir un hydrogène labile et une base pour la formation de radicaux libres. Ce dernier peut être une composante transitoire du mécanisme de fonctionnement antioxydant ou, dans certains cas, il peut être l'antioxydant réel. Les molécules typiques des antioxydants naturels sont des dérivés d'isomères de flavones, isoflavones, flavonols, catéchines, eugénols, coumarine, tocophérols, acide cinnamique, phosphatides et acides organiques polyfonctionnels. Les antioxydants naturels peuvent fonctionner comme des composés réducteurs (Vichnevetskaia et al., 1999).

### **I.2.3.4- Mécanisme d'action**

L'oxydation est un processus au cours duquel des substances chimiques sont transformées en radicaux libres hautement réactifs, connus sous le nom d'espèces réactives de l'oxygène. Par conséquent, les antioxydants préviennent ou éliminent les maladies liées au stress oxydatif en contrecarrant l'effet détériorant des ERO et préserver les fonctions cellulaires.

Le mécanisme d'action des composants antioxydants (tableau 01) dépend de leurs propriétés chimiques, ainsi que leur emplacement. Les antioxydants exercent leurs action d'une ou de plusieurs manières :

- a) Inhibent l'activité des enzymes de peroxydation,
- b) Chélatent les ions métalliques de manière à ce qu'ils soient incapables de générer des espèces réactives ou de décomposer les peroxydes lipidiques,
- c) Trempe l'O<sub>2</sub>, empêchant la formation de peroxydes,
- d) Rupture de la réaction en chaîne auto-oxydative, et réduire l'O<sub>2</sub> localisé concentrations.

Chez les végétaux, la tolérance aux dommages oxydatifs induites par le stress dépend largement de la rapidité de détoxification efficace des ERO par un mécanisme constitué par son système de défense, les composés antioxydants enzymatiques et non enzymatiques comme les flavonoïdes et les polyphénols sont parmi les agents les plus importants (Kurek-Górecka et al., 2013)



**Tableau 01** : Mécanisme d'action de quelques molécules antioxydantes (justin, 2005 ; delattre, 2005).

	Nature	Mode d'action
non enzymatique	<b>Vitamine E</b>	Neutralise les radicaux libres issus de la peroxydation lipidique.
	<b>Vitamine C</b>	Piégeur de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , O
	<b>β -carotène</b>	Fixation des métaux de transition.
	<b>Ubiquinone</b>	Inhibiteur de la peroxydation lipidique. Implication dans la chaîne respiratoire mitochondriale.
	<b>α -tocophérol</b>	Inhibiteur de la peroxydation lipidique.
	<b>Acide R-α-lipoïque</b>	Piégeur de radicaux libres. Production de glutathion.
	<b>Lycopène</b>	Piégeur de l'oxygène.
enzymatique	<b>Superoxydes dismutases</b>	Catalyse la dismutation de l'anion superoxyde.
	<b>Catalases</b>	Métabolise le H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	<b>Glutathion peroxydase</b>	Action réductrice sur H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Anion hydroxyle et les hydro peroxydes

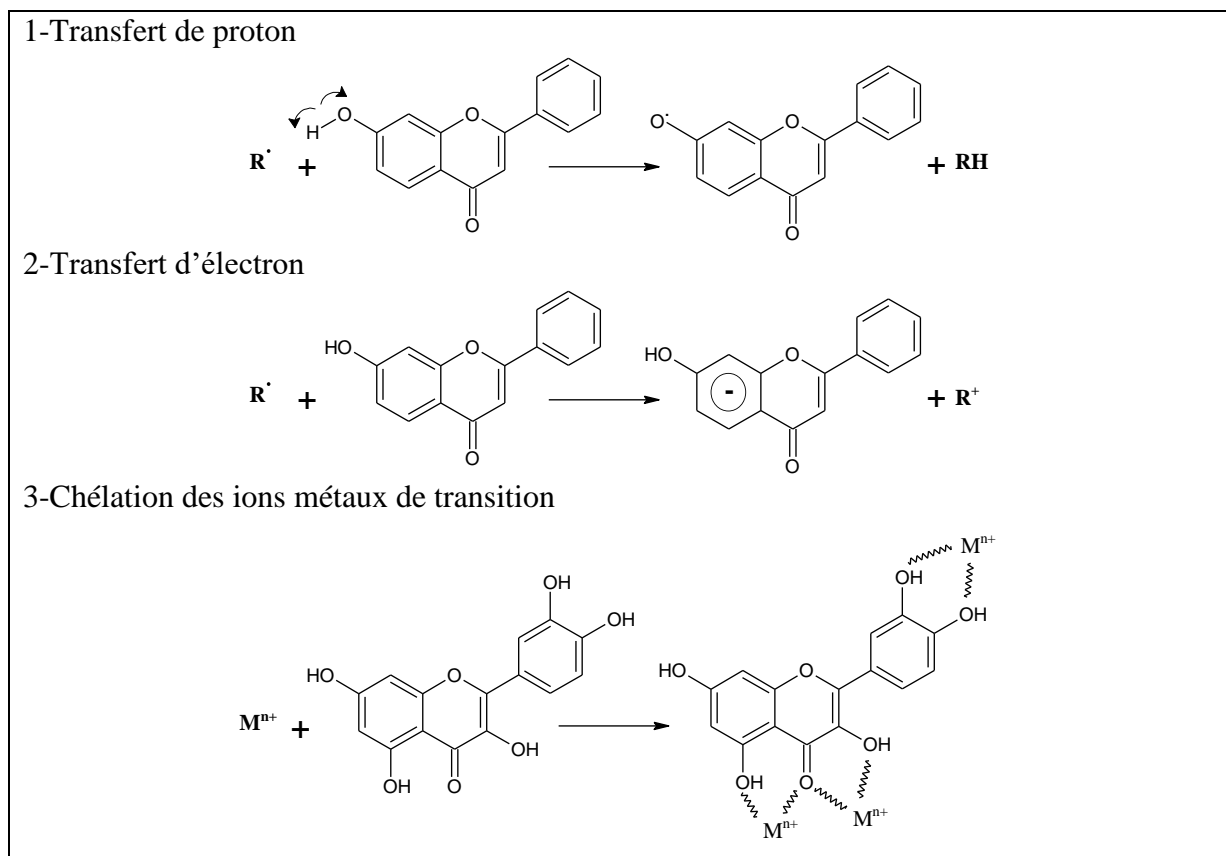
#### I.2.4- Activité antioxydante des composés phénoliques

L'aspect défensif des composés phénoliques semble particulièrement étudié à l'heure actuelle. Certains composés phénoliques présentent des activités antioxydantes. Ces derniers étant connus pour leur rôle pro-oxydant dans plusieurs compartiments cellulaires (réaction de Fenton) à réduire le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à l'aide d'une peroxydase de raifort avec une très grande efficacité.

La formidable capacité qu'ont certains phénols à céder très facilement leurs électrons (figure 04) pourrait en fait ne pas servir uniquement à la lutte contre les ERO. Les phénomènes d'oxydations médiés, cette fois-ci, par des enzymes (laccases, catéchol oxydases et peroxydases) seraient en fait un moyen de créer des molécules aux propriétés nouvelles. Nous pouvons prendre l'exemple suivant : un flavonol qui est un antioxydant « classique » est oxydé formant ainsi un flavonol o-quinone (antimicrobien) lui-même oxydé pour créer une forme condensée, la proanthocyanidine (écran contre les UV-B). De la même manière, la cyanidine (anthocyane) et la rutine (flavonol) voient leurs concentrations cellulaires augmenter lors d'un traitement aux UV-B (Heymes., 2016).

Ces polyphénols peuvent agir aussi par deux autres mécanismes d'actions : un premier consiste à l'inhibition des enzymes pro-oxydantes et la chélation des ions métalliques

(figure 04) et un deuxième consiste à la protection des systèmes biologiques de défenses anti-oxydants. L'étude de Halliwell a montré que l'activité anti-oxydante des polyphénols est déterminée par leurs structures, en particulier la position des groupements hydroxyles sur les noyaux aromatiques et la capacité des composés aromatiques à supporter une délocalisation électronique (menaa et al., 2014).



**Figure 04** : Mécanisme d'action antioxydante des composés phénoliques (Leopoldini et al., 2011).

## **Chapitre II : Travail personnel**

### **II.1- Matériels et méthodes**

#### **II.1.1- Matériel végétal**

L'espèce végétale marine étudiée est une algue qui a été prélevée dans les îles de la mer méditerranée. Elle vive généralement sur un substrat dur (pâté corallien, dalle volcanique ou encore débris). Cette algue est de couleur marron à vert foncé, elle est utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement de certaines maladies après un séchage au soleil. Ce mode de séchage est adopté aussi dans notre étude pour éviter la multiplication des moisissures malgré que ce mode se ne soit pas avéré complètement optimal pour l'étude des composés phénoliques et la mesure des activités biologiques.

La taxonomie des espèces végétales marines est difficile car elle se base sur des études morphologiques et moléculaires. En effet, l'espèce étudiée ici est au cours d'identification et le nom systématique est non mentionné dans ce travail en attendant de l'identifier plus précisément.

#### **II.1.2- Extraction**

L'extraction c'est une étape très importante avant l'analyse quantitative et qualitative. L'isolement des composés phénoliques des plantes par extraction est généralement un processus très difficile compte tenu de la variété de composés qu'il est possible de trouver dans les échantillons naturels. L'obtention de rendements élevés est parfois compliquée et par conséquent des soins doivent être pris pendant la manipulation afin d'éviter les modifications chimiques qui peuvent survenir lors du processus d'extraction en raison de l'activité enzymatique élevée des échantillons naturels. En effet, l'oxydation et l'isomérisation durant l'extraction sont un souci constant (Antolovich et al., 2000).

Il existe plusieurs techniques utilisées pour l'extraction de polyphénols. La macération, connue comme une méthode traditionnelle, a été couramment employée (Spigno et De Faveri.,2007 ; Budic-Letoc et al., 2005).

##### **❖ Principe**

La macération, c'est une méthode qui consiste à laisser la matière végétale à l'intérieur du solvant utilisée pour extraire les composés phénoliques, placée dans un récipient fermé, est laisser reposer à température ambiante pendant plusieurs heures, voire plusieurs jours, en agitant de temps en temps. Le mélange est ensuite filtré et pressé pour récupérer le filtrat. Le filtrat est évaporé et concentré (Bohui, G et al 2018).

### ❖ **Protocol d'extraction**

Après séchage, la plante est broyée entièrement, puis pesée ( $m=131\text{g}$ ). La matière végétale obtenue est mise à macérer dans 500 ml d'un mélange de méthanol/eau (80/20 : V/V) pendant 24 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière afin d'éviter les phénomènes d'oxydations photochimiques. Cette macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant. Les 3 extraits hydro-méthanoliques sont réunis, après filtration à l'aide de papier filtre, puis le solvant est totalement évaporé à une température n'excédant pas environ 35 °C pour obtenir un extrait brut qui est conservé à basse température jusqu'à utilisation (Hamann, 2006 ; Andersen et Markham, 2005).

L'extrait brut obtenu est dilué avec 150 ml d'eau distillé, la solution a subi des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le n-butanol.

Les trois phases organiques ainsi obtenues (chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol) sont séchées par du sulfate de magnésium anhydre ( $\text{MgSO}_4$ ), puis filtrées et concentrées à sec sous pression réduite. Le protocole d'extraction est résumé par un schéma dans la figure (05).

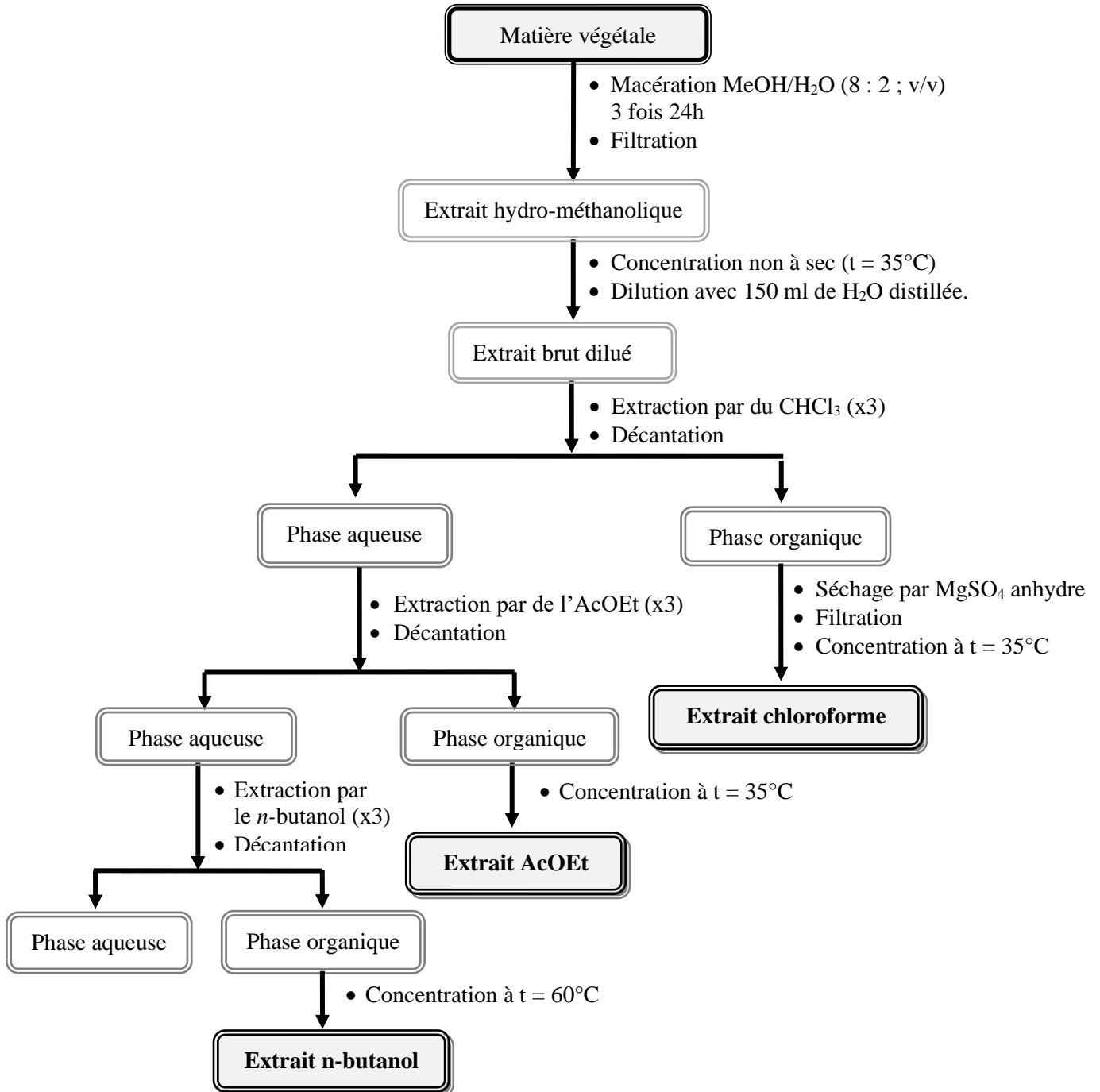


Figure 05 : Protocole d'extraction de la plante.

## II.1.3- Etude phytochimique des composés phénoliques

### II.1.3.1- Analyse quantitative des composés phénoliques

#### II.1.3.1.1- Dosage des polyphénols totaux

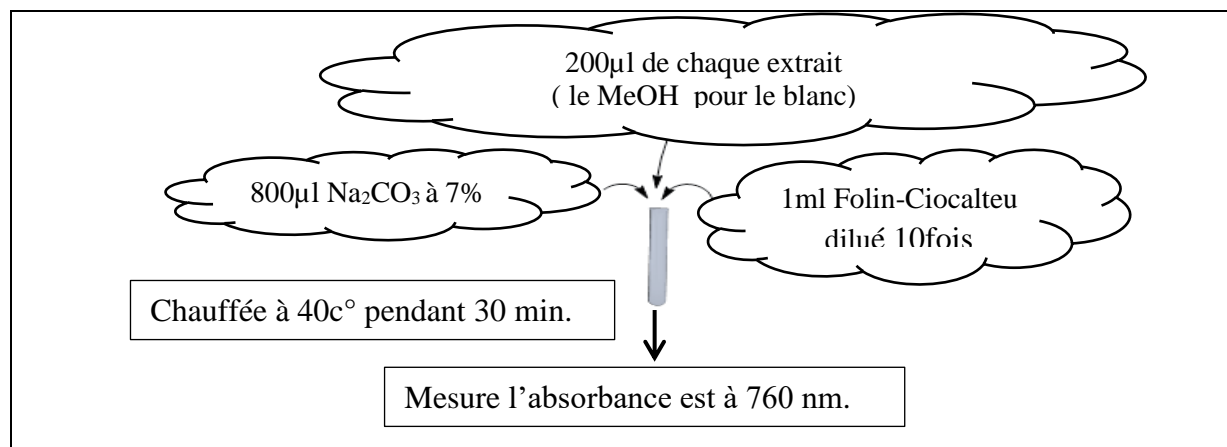
##### ❖ Principe

Le dosage des polyphénols totaux a été déterminé par spectrophotométrie, selon la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999). Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait. (Ali-Rachedi et al., 2019). Lors de l'oxydation de polyphénols, le réactif de Folin-Ciocalteu est réduit en un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleu. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés (Boizot et Charpentier ,2006).

##### ❖ Mode opératoire

Le protocole de la quantification des polyphénols totaux (résumé dans la figure 06) a été effectué selon la méthode colorimétrique décrite par Singleton et al. (1965). Au début, 200  $\mu$ l de chaque échantillon est mélangé avec 1 ml de Folin-Ciocalteu (2N) 10 fois dilué dans l'eau distillée. Après 3 min, 800  $\mu$ l de carbonates de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) à 7% ont été ajoutée et les solutions ainsi obtenues ont été secouées immédiatement. Le développement d'une couleur bleu est obtenu après incubation à l'obscurité pendant 30 min à 40°C. Le blanc est préparé comme précédemment en remplaçant l'échantillon par le solvant de solubilisation (MeOH). L'absorbance est mesurée à 760 nm contre le blanc par un spectrophotomètre UV-Visible.

Le taux de polyphénols totaux dans nos échantillons, a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire, réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif.

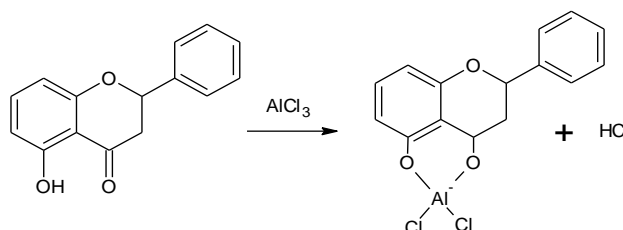


**Figure 06** : Protocole de dosage des polyphénols totaux.

### II.1.3.1.2- Dosage des flavonoïdes

#### ❖ Principe

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode basée sur la formation d'un complexe très stable, entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes (figure 07) (Lagnika., 2005). La coloration ainsi formée est proportionnelle au taux de flavonoïdes dans le mélange (Ribereau et Gayon, 1968).

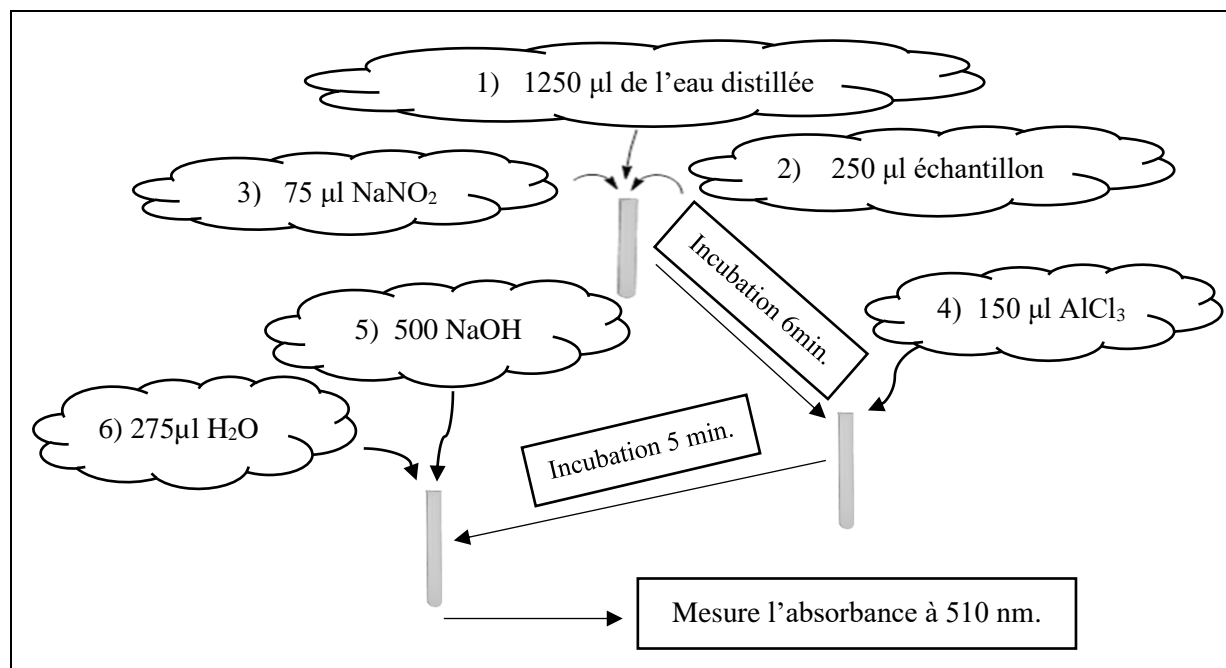


**Figure 07** : Réaction des flavonoïdes avec le chlorure d'aluminium (Lagnika., 2005).

#### ❖ Mode opératoire

Le protocole de la quantification des flavonoïdes (résumé dans la figure 08) a été effectué selon la méthode colorimétrique décrite par Zhishen et al. (1999). Une quantité de 250 µl de chaque échantillon est ajoutée à 1250 µl de l'eau distillée. Au temps zéro, 75 µl de nitrite de sodium NaNO<sub>2</sub> à 5 % est ajouté au mélange qu'on a agité immédiatement. Après 6 min, 150 µl de trichlorure d'aluminium AlCl<sub>3</sub>, 6 H<sub>2</sub>O à 10 % (m/v) est rajouté et le mélange est vigoureusement agité. Après 5 min d'incubation à la température ambiante, 500 µl d'hydroxyde de sodium NaOH (1 M) est additionné puis le volume total est ajusté jusqu'à 2,5 ml avec l'eau distillée. Le contrôle négatif est préparé comme précédemment en remplaçant l'échantillon par le solvant de solubilisation (MeOH). L'absorbance de la solution obtenue est directement mesurée au spectrophotomètre UV-visible à 510 nm.

Une courbe d'étalonnage ( $y = a x + b$ ) établie par la catéchine dans les mêmes conditions opératoires que les extraits, servira à la quantification des flavonoïdes.



**Figure 08 :** Protocol de dosage des flavonoïdes.

## II.1.3.2- Analyse qualitative des composés phénoliques

### II.1.3.2.1. Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince (CCM)

#### ❖ Principe

La CCM est une technique analytique basée sur la différence d'affinité des produits chimiques entre la phase stationnaire (plaque) et la phase mobile (éluant). Cette différence permettra de séparer ces différentes espèces sur la plaque.

La principale application de la chromatographie sur couche mince (CCM) est la séparation sur couche de gel de silice des composés phénoliques. Ceux-ci incluent les flavones méthylées, toutes classes de quinones et d'isoflavonoïdes, en particulier les dérivés isoprénylés. Par conséquent, la CCM est une procédure applicable à toutes les classes de composés phénoliques (Harborne., 1989).

#### ❖ Mode opératoire

Afin d'avoir une idée sur les systèmes d'éluant, nous avons effectué des tests analytiques sur plaque CCM en utilisant plusieurs systèmes d'éluant. Différents tests chromatographiques ont été effectués sur une plaque d'aluminium avec du gel de silice pour les différents extraits avec plusieurs systèmes d'éluant de polarité différente. Le choix d'un bon système d'éluant s'est porté sur le système qui donne une meilleure séparation.



### II.1.3.2.2- Séparation des extraits par chromatographie sur colonne

#### ❖ Principe

La chromatographie d'adsorption est une technique de séparation, et en fait la chromatographie sur colonne est la méthode de base dans toutes les études phytochimiques. La séparation se réfère à l'adsorption des molécules par la phase stationnaire. Cette liaison est due à la formation de liaisons superficielles secondaires (liaison dipolaire ou dipôle-dipôle ou liaison de Van der Waals) c'est l'adsorption. Dans cette forme de chromatographie, la phase stationnaire se trouve dans la colonne. L'éluant entre par une extrémité et sort par l'autre. Il peut s'agir d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants. Sous l'action de l'éluant et des liaisons qu'ils établissent avec l'adsorbant, les molécules se déplaceront différemment dans la colonne et prendront un certain retard les uns des autres pendant la migration. L'élution peut être réalisée de manière isocratique ou sous forme de gradient. En principe, la phase mobile est composée des mêmes solvants que ceux utilisés pour la CCM analytique. Cependant, l'élution peut être accélérée par l'ajout progressif de solvant de plus en plus polaire par rapport à la phase initiale (Lagnika., 2005).

#### ❖ Mode opératoire

Sur une colonne remplie aux 2/3 avec une suspension de 30 g de gel de la silice 60 préparé dans le solvant le moins polaire du système d'élution choisi précédemment (chloroforme). Environ 650 mg de l'extrait à séparer, solubilisé dans le minimum de chloroforme, est déposé à l'aide d'un compte-gouttes au-dessus de la phase stationnaire. L'élution est réalisée sous forme de gradient de polarité par un fractionnement tous les 25 ml.

Le suivi de la composition des fractions a été effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice 60 sur support aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV ( $\lambda=254$  et  $365\text{nm}$ ) puis révélées par l'anisaldéhyde et chauffées à  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant 3 min. Les pots de même composition sont rassemblés.

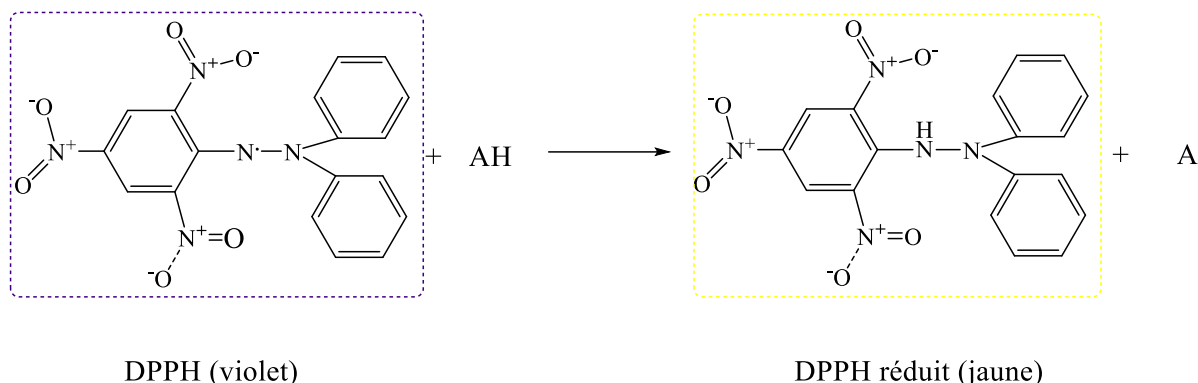
### II.1.4- Evaluation de l'activité antioxydante

#### II.1.4.1- Test DPPH

#### ❖ Principe

Le test DPPH est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydante. En effet, le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) (forme oxydée) se caractérise par sa forme d'un radical libre stable. Cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule (Molyneux., 2004). Le DPPH radical (DPPH<sup>\*</sup>) est soluble dans le méthanol caractérisé par sa couleur violet foncé avec un maximum

d'absorption à 515 nm. La réduction de ces radicaux par un agent antioxydant (figure 09) entraîne une décoloration de la solution (forme réduite).



**Figure 09** : La réaction de DPPH<sup>•</sup> avec un antioxydant AH.

### ❖ Mode opératoire

Le test est basé sur le protocole de Brand-Williams et al. (1995) (simplifié par un schéma dans la figure 10). Une solution de DPPH à 60 µM est préparée à l'avance car la solubilisation est difficile. Une masse de 1,5 mg de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle), de formule brute C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub> et de masse molaire 394,33 g/mol, est solubilisée dans 60 ml de méthanol sous agitation pendant une heure à l'obscurité, et à température de 4 °C.

Dans des tubes secs, des volumes de 50 µl de chaque échantillon (extraits ou fractions) de concentrations différentes sont ajoutés à 1950 µl de la solution méthanolique du DPPH. Parallèlement, un contrôle négatif de 2 ml de la solution méthanolique de DPPH a été préparé. Le mélange réactionnel est agité vigoureusement pendant 10 secondes. Après 30 min d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante, la lecture de l'absorbance contre un blanc de méthanol (solvant de solubilisation des échantillons et de DPPH) est faite pour chaque concentration à 515 nm par un spectrophotomètre UV-Visible.

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

Pour chaque concentration le test est répété 3 fois et l'activité anti-oxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH (% PI) suivant l'équation suivante :

$$\% \text{ PI} = [(A \text{ contrôle négatif} - A \text{ échantillon}) / A \text{ contrôle négatif}] \times 100 ; \text{ avec :}$$

- A contrôle négatif correspond à l'absorbance du DPPH après le temps de la réaction.
- A échantillon correspond à l'absorbance de l'échantillon avec DPPH après le temps de la réaction.

L'activité antioxydante est exprimée ensuite par la détermination d'IC50, sachant que L'IC50 est la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH.

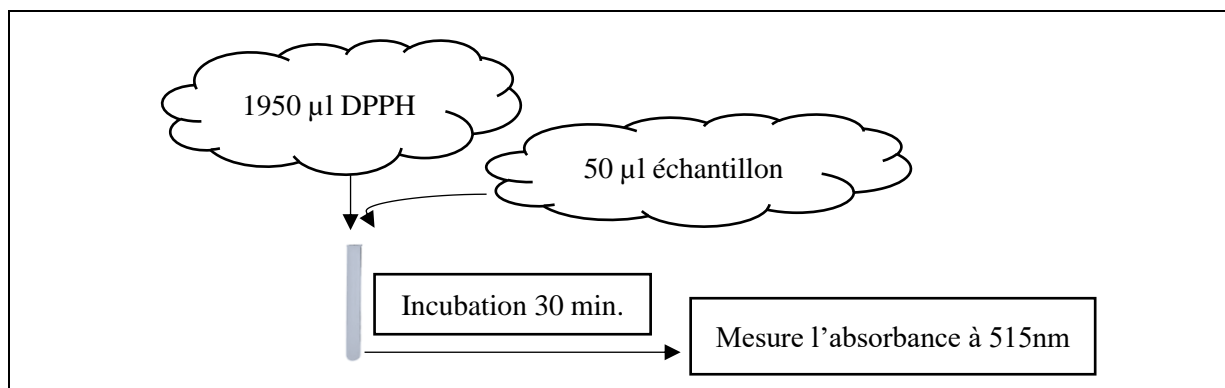


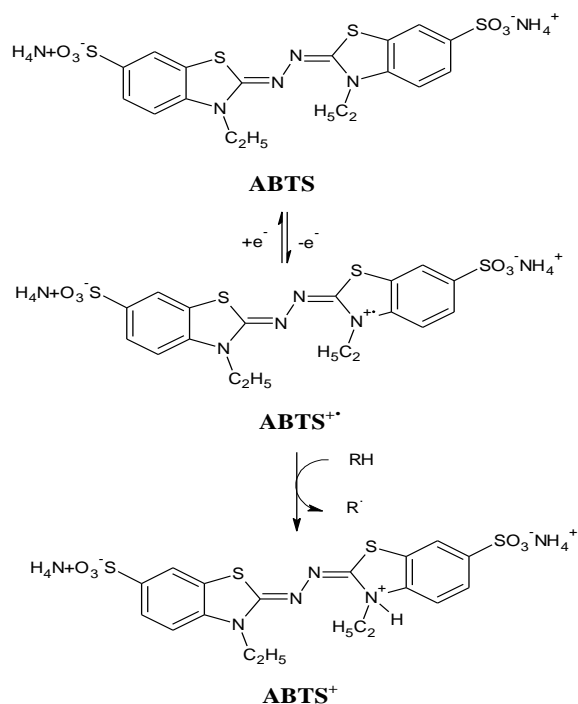
Figure 10 : Protocol du test DPPH.

#### II.1.4.2- Test ABTS

##### ❖ Principe

Le premier test ABTS a été décrit par (Miller et al., 1997) la méthode a été développée sur la base de l'absorbance du cation radical  $ABTS^{*+}$  pour l'évaluation de la capacité antioxydante totale des fluides corporels et des solutions médicamenteuses. Cette méthode était d'abord basée sur la production de cation radicalaire  $ABTS^{*+}$  par activation de la metmyoglobine avec du peroxyde d'hydrogène en présence d'ABTS [acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)], avec ou sans antioxydants. Ensuite, les antioxydants arrêtent le radical  $ABTS^{*+}$  [Acide 2,2-azino-bis(éthylbenzène-thiazoline-6-sulfonique)], entraînant une diminution de l'absorbance, qui est détectée par la combinaison antioxydante d'antioxydant avec des radicaux à différents moments. (Miller et al., 1993)

En présence d'un antioxydant, le passage du radical  $ABTS^{*+}$  à la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de la coloration vert bleu intense (figure 11) qui peut être suivie par la mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 734 nm (Chen et al., 1997).



**Figure 11** : Formation et piégeage du radical ABTS<sup>•+</sup> par un antioxydant donneur de RH.

#### ❖ Mode opératoire

Le test est basé sur le protocole de Re et al. (1999) en y apportant quelques modifications Prior et al. (2005) (simplifié par un schéma dans la figure 12). L'ABTS est dissous dans de l'eau à une concentration de 7 mM et le cation radical ABTS<sup>•+</sup> est produit en faisant réagir cette solution ABTS avec du persulfate de potassium 2,45 mM (concentration finale). Le mélange réactionnel est mis en incubation, à l'obscurité, pendant 16 h à température ambiante. La solution fille de travail d'ABTS<sup>•+</sup> est obtenue en diluant la solution mère d'ABTS<sup>•+</sup> avec de l'eau distillée jusqu'à obtention d'une absorbance de 0,7 à une longueur d'onde de 734 nm.

L'activité antiradicalaire est mesurée par addition de 1950 µl de la solution diluée de radical ABTS<sup>•+</sup> et 50 µL pour chaque échantillon (extrait ou fraction) à des concentrations variables. Après une heure, pour chaque concentration, la décroissance de l'absorbance est mesurée à de 734 nm par un spectrophotomètre UV-Visible contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'échantillon par de solvant qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre).

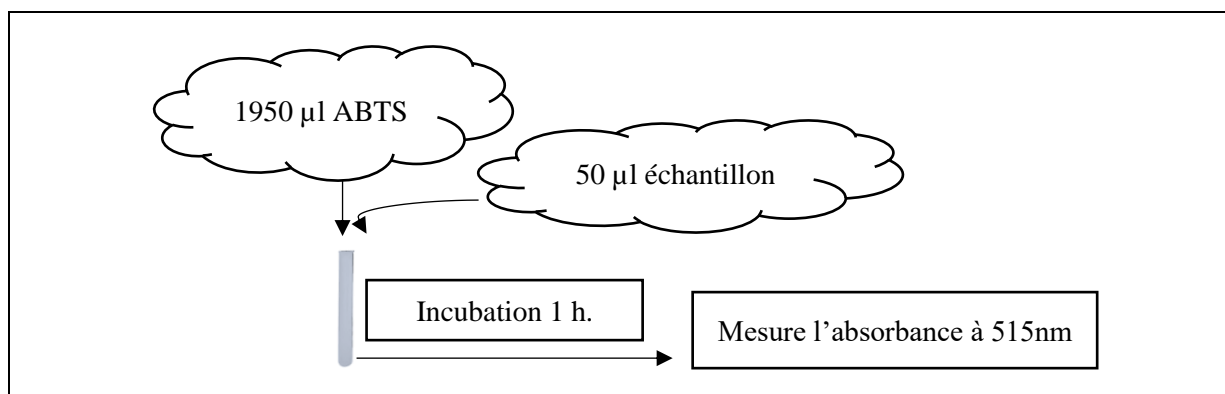
Le contrôle positif est réalisé en parallèle par une solution d'un antioxydant standard, l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons.

Pour chaque concentration le test est répété 3 fois et l'activité anti-oxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical ABTS (% PI) suivant l'équation suivante :

$\% \text{ PI} = [(A \text{ contrôle négatif} - A \text{ échantillon}) / A \text{ contrôle négatif}] \times 100$  ; avec :

- A contrôle négatif correspond à l'absorbance de l'ABTS après le temps de la réaction.
- A échantillon correspond à l'absorbance de l'échantillon avec ABTS après le temps de la réaction.

L'activité antioxydante est exprimée ensuite par la détermination d'IC50, sachant que l'IC50 est la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50 % de la forme réduite du radical ABTS.



**Figure 12 :** Protocol du test ABTS.

### II.1.4.3- Test FRAP

#### ❖ Principe

La méthode de FRAP est basée sur la réaction chimique de réduction des ions ferriques Fe (III) présent dans le complexe de ferricyanure de potassium  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , par l'extrait testé, en ion Ferreux Fe (II) qui donne la couleur bleu. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Hubert, 2006).

#### ❖ Mode opératoire

Le pouvoir réducteur du fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ) dans les échantillons est déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu (1986) (simplifiée par un schéma dans la figure 13). Un volume de 1 ml de l'échantillon (extrait ou fraction) à différentes concentrations est mélangé avec 2,5 ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 2,5 ml d'acide trichloroacétique à 10% est ajouté pour stopper la réaction et les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. Un aliquote (2,5 ml) de surnageant est combinée avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution aqueuse de  $\text{FeCl}_3$  à 0,1%.

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

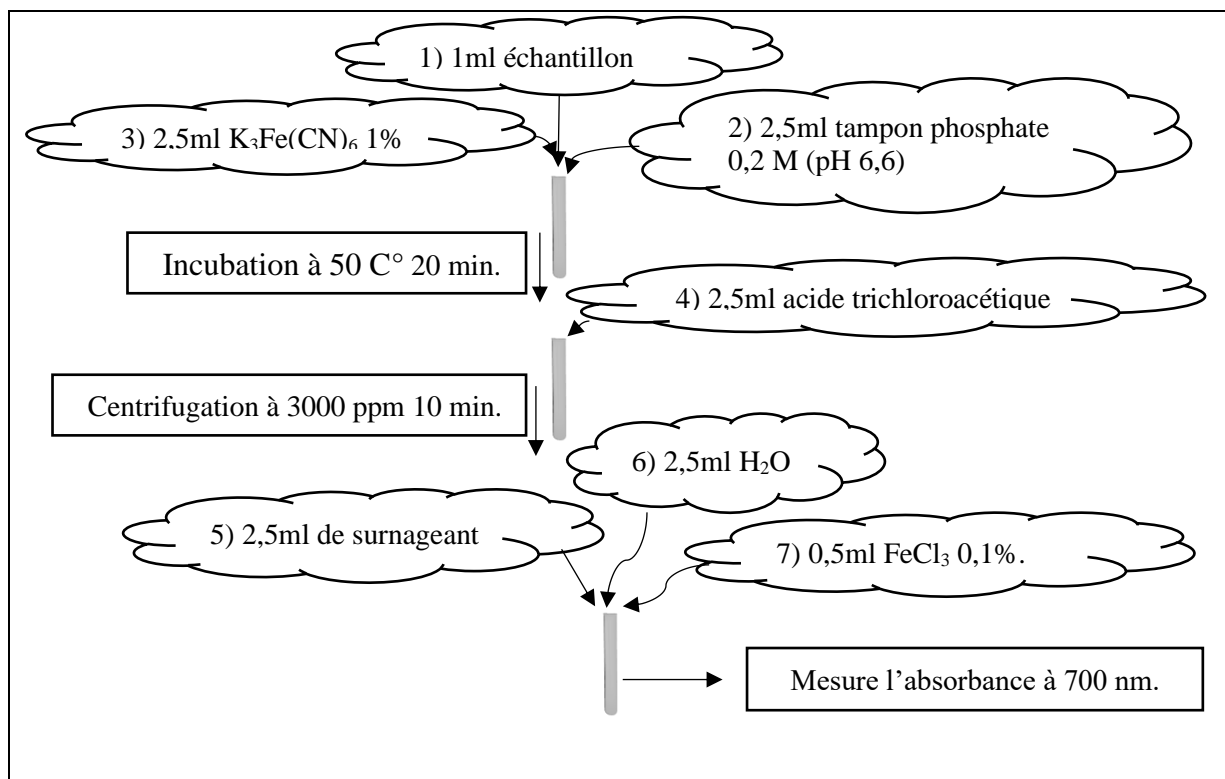
Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des échantillons testés. La droite d'étalonnage est établie à partir des absorbances lues pour la gamme de solutions de l'acide ascorbique utilisée comme composé de référence. Elle est de la forme :  $Abs = a \times [Aasc] + b$ . Chaque échantillon est testé, et l'absorbance qui en découle permet de déterminer sa concentration soit en  $\mu g$  d'équivalent Aasc en utilisant la formule suivante :

$$\text{Concentration en } \mu g \text{ d'Eq [Aasc]} = \frac{Abs - b}{a}$$

« a » représente la pente, « b » l'ordonnée à l'origine de la droite étalon.

En considérant en suite la concentration de l'échantillon étudié, on exprime alors l'activité antioxydante soit directement en  $\mu g$  d'équivalent acide ascorbique soit en mg d'équivalent Aasc/g d'extrait sec (Doukani et *al.*, 2014).



**Figure 13** : Protocol du test FRAP.

## II.2- Résultats et discussion

### II.2.1- Etude phytochimique des composés phénoliques des extraits

#### II.2.1.1- Rendement d'extraction

Le rendement est défini comme étant le rapport de la quantité de substances végétales extraites et la quantité du matériel végétales utilisée pour l'extraction. Le rendement est exprimé en pourcentage selon la relation suivante (Stalikas., 2007) :

$$R = (m_{\text{expérimentale}} / m_{\text{théorique}}) \times 100$$

**Tableau 02** : Rendement des trois extraits.

Extraits	Chloroforme	Acétate d'éthyle	n-butanol
Rendement (%)	0,42	0,13	1,09

Selon les résultats obtenus (tableau 02), nous avons remarqués que l'extrait n-butanol présente le rendement le plus élevé de l'ordre de 1,09 % par rapport aux deux extraits chloroforme et acétate d'éthyle qui ont présentés des rendements plus faibles de l'ordre 0,42 % et 0,13 % respectivement. Cette variabilité de rendement dans les trois extraits peut être due à la différence de polarité du solvant utilisé, ceci montre la richesse de la plante par les substances polaires par rapport aux autres substances apolaires ou moyennement polaires extractibles par le chloroforme et l'acétate d'éthyle.

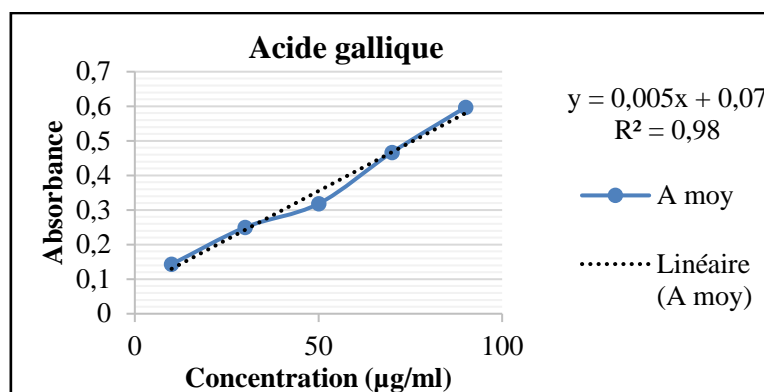
#### II.2.1.2- Analyse quantitative des composés phénoliques des extraits

##### II.2.1.2.1- Teneurs en polyphénols totaux

La teneur en polyphénols des différents extraits a été déterminée par le réactif du Folin-Ciocalteu. La couleur bleu obtenue après incubation confirme la présence des polyphénols qui ont réduits le réactif. L'intensité de la couleur qui varie entre le bleu clair et le bleu foncé est en fonction de la teneur en polyphénols.

Les teneurs ont été déterminées à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée à l'aide de différentes concentrations de l'acide gallique comme un standard dont :  $y = 0,005 x + 0,07$  avec  $R^2 = 0,98$  (figure 14).

Les résultats obtenus sont exprimés en milligramme d'équivalent de l'acide gallique par gramme d'extrait.



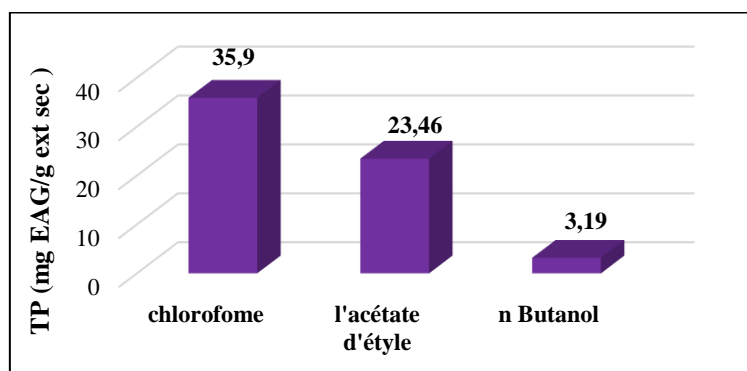
**Figure 14 :** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

Les résultats présentés dans le tableau (03) montrent que les extraits étudiés contiennent une teneur moyennement considérable en composée phénoliques variant entre 3,19 et 35,90 mg EAG/g d'extrait sec.

**Tableau 03 :** Teneurs en polyphénols des trois extraits étudiés.

Extrait	Teneurs en polyphénols TP ± ET (mg EAG /g d'extrait sec)
Chloroforme	35,90 ± 7,55
Acétate d'éthyle	23,46 ± 2,05
n-butanol	3,19 ± 0,12

Pour plus de clarté, les résultats des analyses quantitatives par spectrophotomètre UV-visible des différents extraits sont ordonnés et indiqués sur un histogramme présenté dans la figure (15). Nous constatons que l'extrait de chloroforme est le plus riche en polyphénols totaux de l'ordre de 35,90 mg EAG/g de l'extrait sec, suivi par l'extrait de l'acétate d'éthyle avec une teneur égale à 23,46 mg EAG/g de l'extrait sec puis l'extrait n-butanol qui a enregistré une teneur faible égale à 3,19 mg EAG/g de l'extrait sec .



**Figure 15 :** Teneurs en polyphénols dans les différents extraits.

**Ext chloroforme > Ext Acétate d'éthyle > Ext n-butanol**

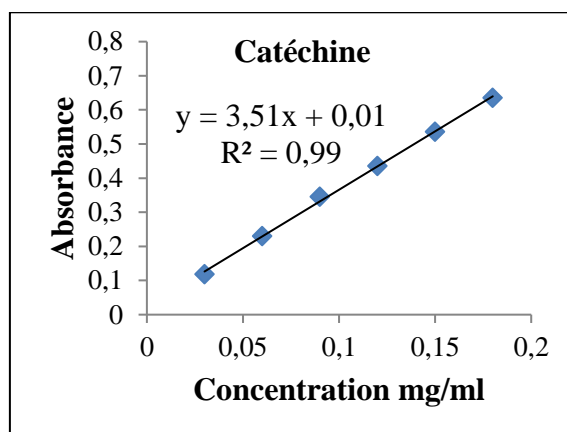


Les valeurs obtenues dans ce travail sont très faibles à celle trouvées dans une espèce végétale marine étudiée par (Surget, G., 2017) qui a trouvé une teneur de polyphénols dans l'extrait acétate d'éthyle égale à  $431,5 \pm 19,9$  mg EAG /g MS.

#### II.2.1.2.2- Teneurs en flavonoïdes

L'estimation de la teneur en flavonoïdes a été réalisée selon la méthode colorimétrique de trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ). Une couleur jaunâtre est obtenue dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de l'extrait en flavonoïdes après l'addition d' $AlCl_3$ , ce qui confirme la présence des flavonoïdes. Les teneurs ont été calculées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de la catéchine :  $y = 4,70x + 0,02$  avec  $R^2 = 0,99$  présentée dans la figure (16).

La teneur de flavonoïde a été déterminée dans l'extrait en mg équivalent de catéchine /g d'extrait (mg EC/g de l'extrait sec).



**Figure 16 :** Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

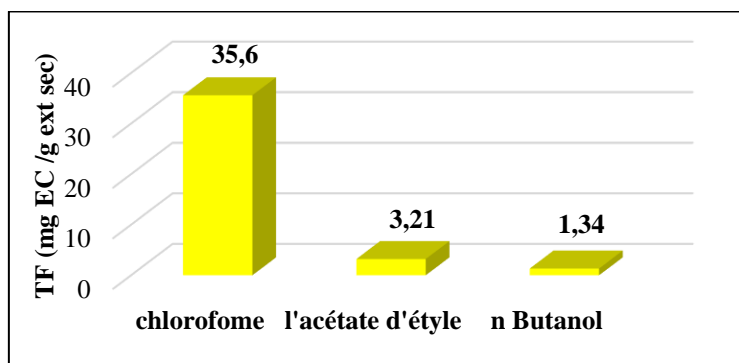
Les résultats obtenus par ce dosage pour les extraits sont conciliés dans le tableau (04). Les valeurs obtenues ont montrés des teneurs variées entre 1,34 à 35,60 mg EC/g de l'extrait sec.

**Tableau 04 :** Teneurs en flavonoïdes des trois extraits.

Extrait	Teneurs en flavonoïdes FT $\pm$ ET (mg EC /g d'extrait sec)
Chloroforme	35,60 $\pm$ 2,15
Acétate d'éthyle	3,21 $\pm$ 0,28
n-butanol	1,34 $\pm$ 0,13

D'après la figure (17), il apparait clairement que l'extrait de chloroforme contient la teneur le plus élevée avec une valeur de 35,60 mg EC/g d'extrait sec, tandis que les autres

extraits ont montrés des teneurs faibles et proches de l'ordre de 3,21 mg EC/g d'extrait sec dans l'extrait acétate d'éthyle et de 1,34 mg EC/g d'extrait sec dans l'extrait n-butanol.



**Figure 17** : Teneurs en flavonoïdes dans les différents extraits.

$$\text{Ext chloroforme} > \text{Ext Acétate d'éthyle} \geq \text{Ext n-butanol}$$

Nos résultats sont considérés comme des teneurs très faibles par rapport à ceux trouvés par (Surget, G., 2017) chez une espèce végétale marine dont l'extrait possède une teneur largement supérieure à celle de notre étude de l'ordre de  $285,1 \pm 2,8$  mg EC/g Ext.

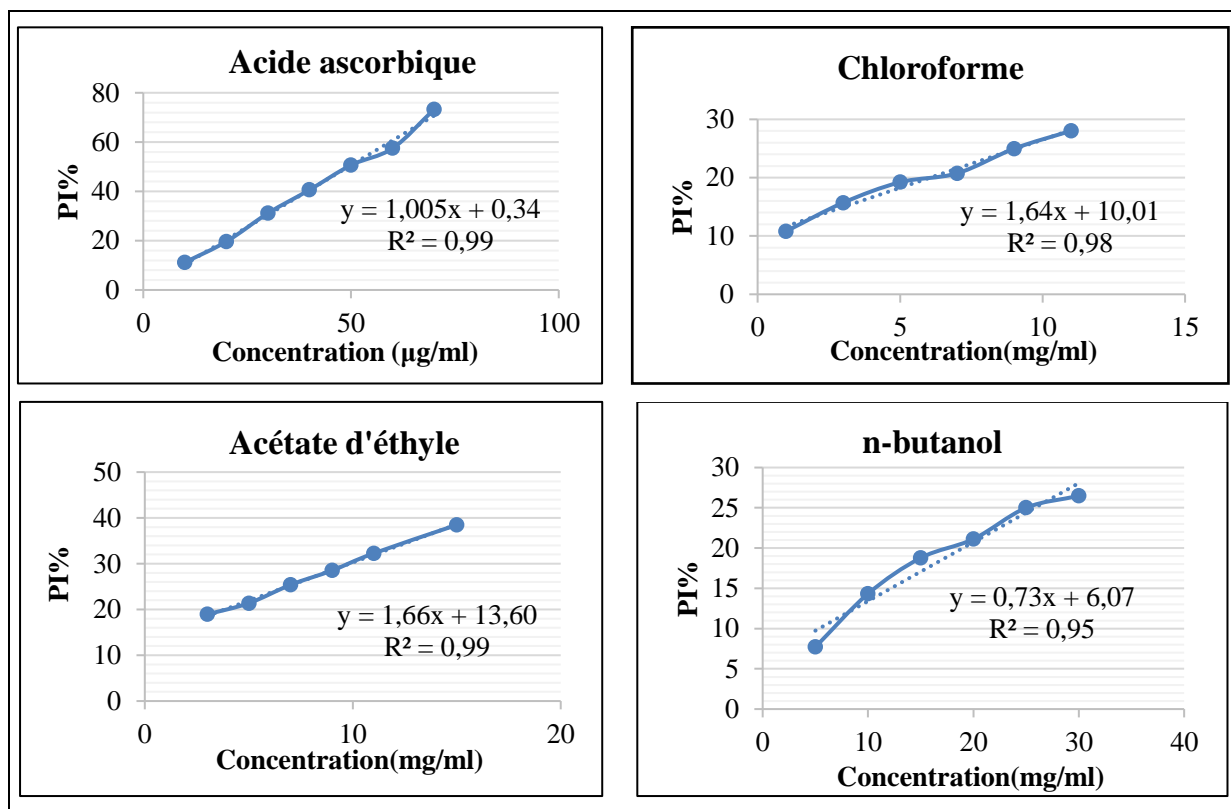
## II.2.2- Evaluation de l'activité antioxydante des extraits

Dans ce travail, nous avons évalué l'activité antioxydante des extraits : chloroforme, acétate d'éthyle et le n-butanol par trois tests complémentaires : DPPH ; ABTS et FRAP.

### II.2.2.1- Test DPPH

Les résultats de l'activité anti-radicalaire par test DPPH sont représentés par les pourcentages d'inhibition pour chaque concentration ainsi que les valeurs de la concentration d'inhibition à 50% l'IC50. Ce paramètre est défini comme étant la concentration efficace de l'extrait capable de piéger 50% des radicaux DPPH dans le mélange réactionnel, dont l'activité la plus forte correspond à l'IC50 la plus faible (Pourmorad et al., 2006).

Les valeurs d'IC50 de chaque extrait ont été estimées graphiquement en utilisant la courbe de régression linéaire de pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testées (figure 18).



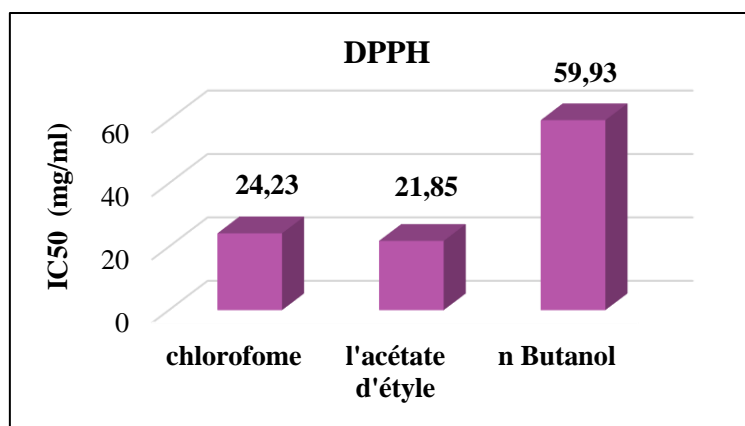
**Figure 18 :** Représentation graphique des pourcentages d'inhibition du radical DPPH.

Les résultats obtenus des IC50 des extraits sont présentés dans le tableau (05).

**Tableau 05 :** Les IC50 des extraits étudiés vis-à-vis du radical DPPH.

Echantillon	Concentration inhibitrice 50 (IC50)
Extraits	IC <sub>50</sub> ± ET (mg / ml)
Chloroforme	24,23±0,67
Acétate d'éthyle	21,85± 1,05
n-butanol	59,93± 3,11
Référence	IC <sub>50</sub> ± ET (µg / ml)
Acide ascorbique	49,38 ±1,47

Pour plus de clarté, les IC50 sont illustrés dans la figure (19). L'activité antiradicalaire de l'ensemble des extraits est inférieure à celle de l'acide ascorbique (IC50 égale 49,38 µg/ml). Parmi les trois extraits, les deux extraits chloroforme et acétate d'éthyle présente une activité antioxydante relativement importante avec des valeurs de IC50 de l'ordre de 24,23 mg/ml et 21,85 mg/ml respectivement, ceci par rapport à l'extrait de n-butanol qui a montré une activité de piégeage du radical DPPH' très faible avec une grande valeur de IC50 égale 59,93 mg/ml.



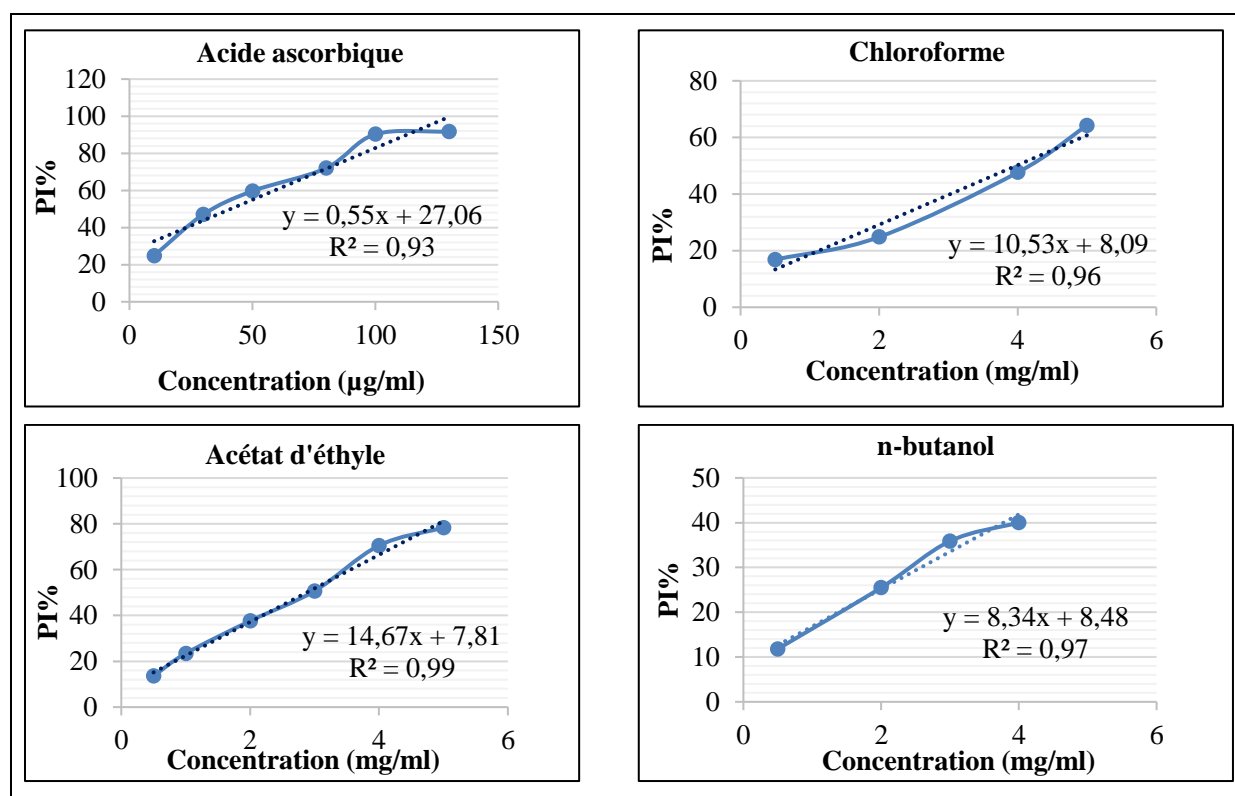
**Figure 19** : Histogramme représentant l'activité antioxydante exprimée en IC50 des extraits vis-à-vis Le radicale DPPH.

**AAO Ext acétate d'éthyle > AAO Ext chloroforme > AAO Ext n-butanol**

Ces résultats qui sont également différents de ceux de (Lhuillery, 2006) ont montré une activité antioxydante importante chez une espèce végétale marine avec une IC 50 faible égale à  $0,12 \pm 0,007$  mg/ml. Par ailleurs, (Surget, 2017) ont aussi obtenus une activité antioxydante supérieure à celle de notre étude avec une IC50 égale à  $0,76 \pm 0,02$  mg/ml.

#### II.2.2.2- Test ABTS

L'activité antioxydante des extraits est déduite par la capacité des molécules à inhiber le radical  $ABTS^{+\cdot}$ . Elle est exprimée par la concentration inhibitrice à 50% (IC50). En effet, une dégradation de la couleur bleu-vert de la solution d' $ABTS^{+\cdot}$  en présence des extraits ou la solution référence peut être suivie par spectrophotométrie en mesurant la diminution de l'absorbance à une longueur d'onde 734 nm. La concentration inhibitrice à 50% est calculée ensuite à partir de l'équation de régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des échantillons testés (figure 20).



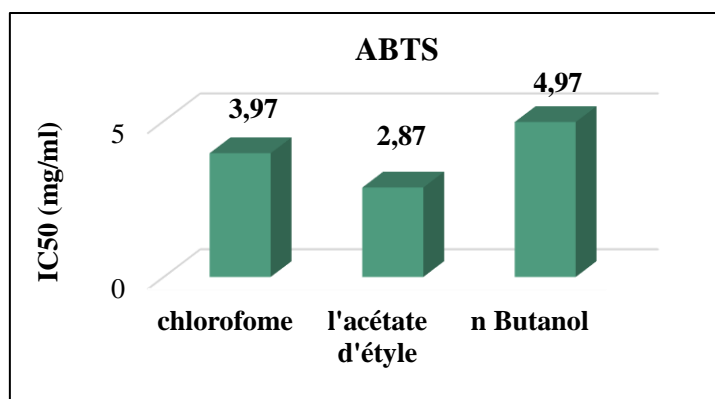
**Figure 20 :** Représentation graphique des pourcentages d'inhibition du radical ABTS.

Les résultats des IC<sub>50</sub> des extraits sont conciliés dans le tableau (06) et présentés sous forme d'histogrammes dans la figure (21).

**Tableau 06 :** Les IC<sub>50</sub> des extraits étudiés vis-à-vis du radical ABTS.

Echantillon	Concentration inhibitrice 50 (IC <sub>50</sub> )
<b>Extraits</b>	<b>IC<sub>50</sub> ± ET (mg / ml)</b>
Chloroforme	3,97 ± 0,12
Acétate d'éthyle	2,87 ± 0,08
n-butanol	4,97 ± 0,42
<b>Référence</b>	<b>IC<sub>50</sub> ± ET (µg / ml)</b>
Acide ascorbique	41,11 ± 0,45

D'après les résultats, tous les extraits ont montré une activité d'inhibition du radical ABTS considérablement faible avec des IC<sub>50</sub> variant de 2,87 à 4,97 mg/ml. Les IC<sub>50</sub> sont largement inférieurs à celui de l'acide ascorbique qui montre une IC<sub>50</sub> égale à 41,11 µg/ml.



**Figure 21** : Histogramme représentant l'activité antiradicalaire exprimée en IC<sub>50</sub> des extraits vis-vis le radical ABTS.

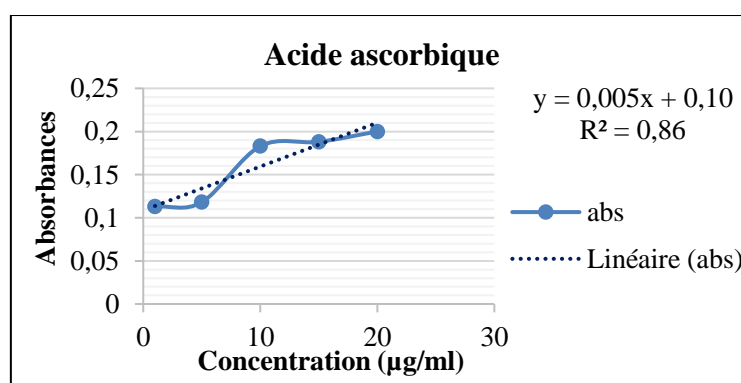
**AAO Ext acétate d'éthyle > AAO Ext chlorofome > AAO Ext n-butanol**

La meilleure activité d'inhibition du radical ABTS a été trouvée dans l'extrait acétate d'éthyle avec la faible valeur de IC<sub>50</sub> égale à 2,87 mg/ml suivi par l'extrait de chlorofome qui a une valeur de IC<sub>50</sub> de 3,97 mg/ml, tandis que l'activité la plus faible a été enregistrée dans l'extrait n-butanol avec une valeur de IC<sub>50</sub> égale à 4,97 mg/ml.

### II.2.2.3- Test FRAP

La méthode est basée sur la capacité des antioxydants présents dans l'extrait à réduire le fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>), une couleur verte est obtenue dont l'intensité varie en fonction de la concentration de l'extrait de plante immédiatement après l'addition de chlorure ferrique, ce qui confirme les propriétés réductrices de cet extrait.

La courbe d'étalonnage (figure 22) est établie à partir des absorbances en fonction de différentes concentrations de l'acide ascorbique (utilisée comme référence), une augmentation de l'absorbance indique une augmentation de pouvoir réducteur.



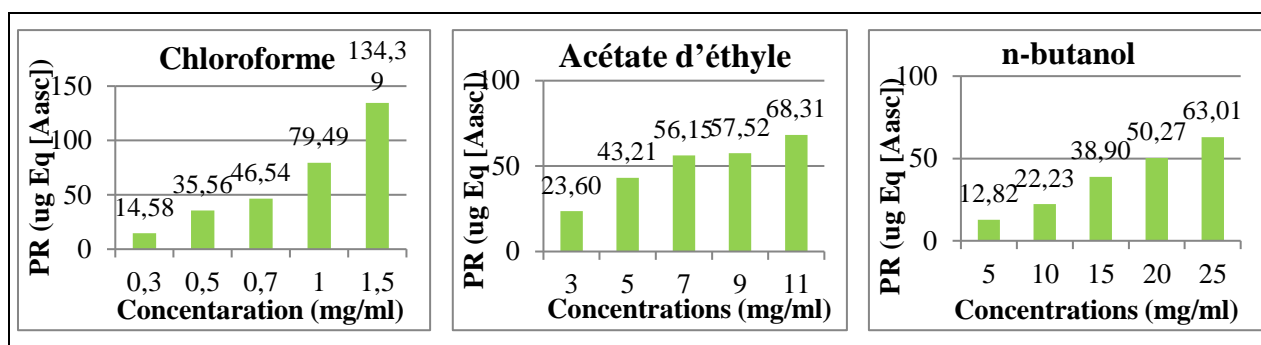
**Figure 22** : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour le test FRAP.

Dans la première estimation, chaque extrait est testé, et l'absorbance qui en découle permet de déterminer sa concentration en  $\mu\text{g}$  d'équivalent acide ascorbique ( $\text{mg d'eq } A_{\text{asc}}$ ) en utilisant la formule suivante :

$$\text{Concentration en mg d'eq } [A_{\text{asc}}] = (\text{Abs} - b) / a$$

« a » : représente la pente , « b » : l'ordonnée à l'origine de la droite étalon.

Les résultats du pouvoir réducteur des extraits sont illustrés à l'aide des histogrammes (figure 23) en  $\mu\text{g}$  équivalent d'acide ascorbique en fonction de différentes concentration de chaque extrait.



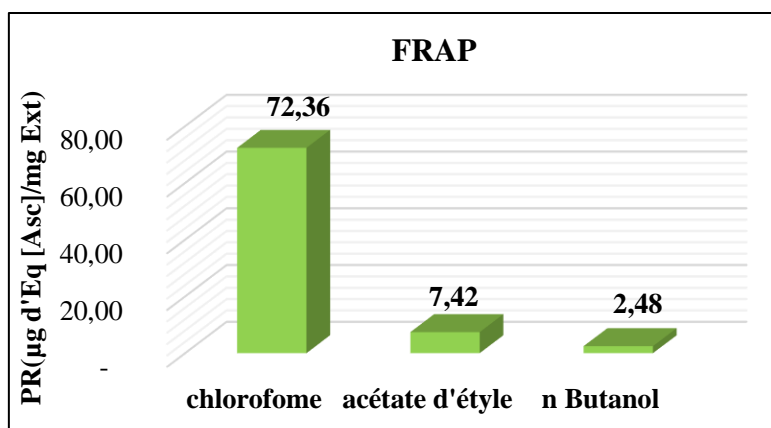
**Figure 23 :** Variation du pouvoir réducteur des extraits en fonction de la concentration.

D'après les histogrammes présentés dans la figure (23), nous constatons que la capacité réductrice est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des extraits. En remarque que l'extrait chloroforme en particulier, même à des concentrations faibles, montre un pouvoir réducteur important par rapport aux autres extraits acétate d'éthyle et n-butanol.

Par la suite d'estimation, en considérant la concentration de l'extrait étudié, le pouvoir réducteur signifie la capacité antioxydante et s'exprime en microgramme équivalent d'acide ascorbique par milligramme de l'extrait sec ( $\mu\text{g Eq Aasc} / \text{mg Ext}$ ). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau (07) et reformulés en histogramme (figure 24) afin de simplifier la comparaison.

**Tableau 07 :** Pouvoir réducteur des différents extraits testés.

Extraits	PR $\pm$ ET ( $\mu\text{g Eq Aasc} / \text{mg Ext}$ )
Chloroforme	72,36 $\pm$ 6,59
Acétate d'éthyle	7,42 $\pm$ 1,06
n-butanol	2,48 $\pm$ 0,14



**Figure 24** : Pouvoir réducteur des différents types d'extraits.

**Ext chloroforme > Ext acétate d'éthyle > Ext n-butanol**

Nous remarquons, d'après la figure (24), que tous les extraits ont pu réduire le fer avec des variations différentes d'un extrait à un autre. Le pouvoir réducteur le plus élevée apparue dans l'extrait chloroforme avec une valeur de 72,36 µg Eq  $A_{asc}$ /mg d'extrait sec suivi par l'extrait acétate d'éthyle avec une valeur égale à 7,42 µg Eq  $A_{asc}$ /mg d'extrait sec, puis l'extrait de n-butanol a montré le plus faible pouvoir réducteur avec une valeur de 2,45 µg Eq  $A_{asc}$ /mg d'extrait sec.

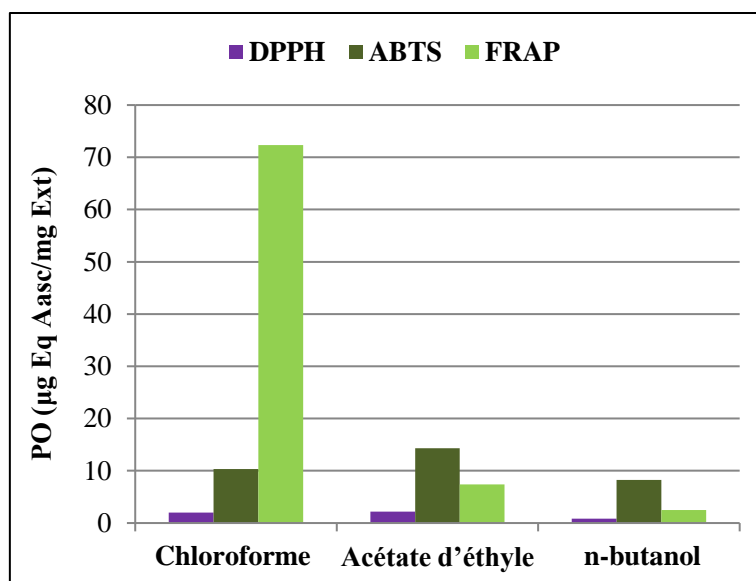
### II.2.3- Corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en composés phénoliques

Nous avons fait le choix d'exprimer les résultats de l'activité antioxydante de façon homogène pour cette étude comparative : autrement dit, en µg d'équivalent d'un antioxydant (l'acide ascorbique est choisi comme référence) par milligramme d'extrait dans les tests DPPH et ABTS. Les résultats sont présentés dans le tableau (08) dont la valeur la plus élevée correspondra à l'activité la plus forte.

**Tableau 08** : Pouvoir antioxydant exprimé en µg d'Eq  $A_{asc}$ /mg extrait sec.

Extraits	DPPH	ABTS	FRAP
	PO ± ET (µg Eq $A_{asc}$ /mg Ext)	PR ± ET (µg Eq $A_{asc}$ /mg Ext)	PR ± ET (µg Eq $A_{asc}$ /mg Ext)
Chloroforme	2,03 ± 0,05	10,35 ± 0,22	72,36 ± 6,59
Acétate d'éthyle	2,16 ± 0,10	14,32 ± 0,27	7,42 ± 1,06
n-butanol	0,82 ± 0,05	8,27 ± 0,70	2,48 ± 0,14





**Figure 25** : Pouvoir antioxydant des extraits par les tests DPPH, ABTS et FRAP.

La corrélation entre les trois tests DPPH, ABTS, FRAP a pour but de montrer que les différentes techniques sont complémentaires. Les résultats obtenus, simplifiés par des histogrammes dans la figure (25), montrent que les deux extraits ; chloroforme et acétate d'éthyle, révèlent une activité de piégeage de radical DPPH considérablement plus élevée que celle obtenue avec l'extrait n-butanol, et cette tendance de variation est similaire à celle observée pour le test ABTS. En effet, le test ABTS confirme l'activité antiradicalaire obtenue par DPPH.

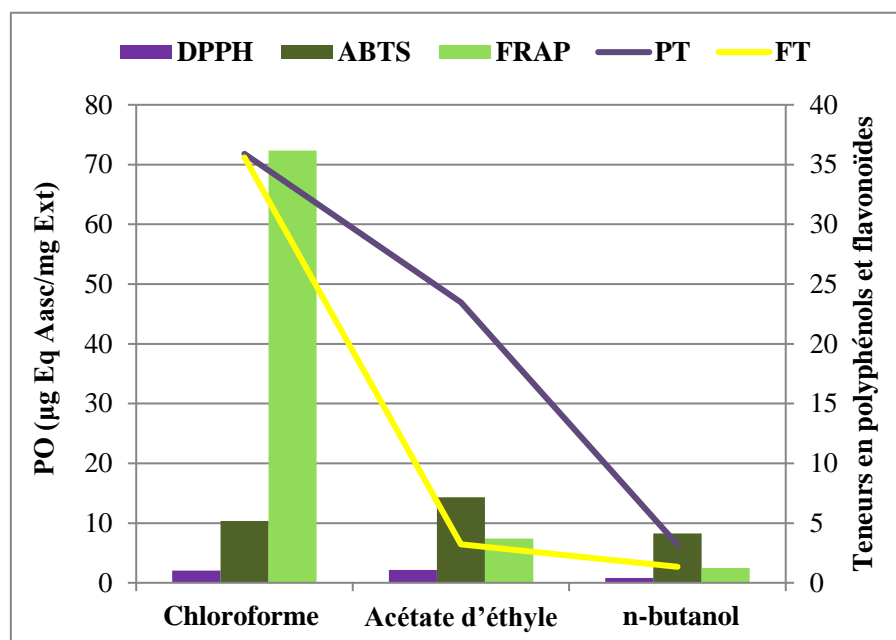
Par ailleurs, ces résultats révèlent que l'extrait acétate d'éthyle est plus actif en utilisant les tests DPPH et ABTS comparativement avec les autres extraits. Concernant le test FRAP, pour tous les extraits, l'activité antioxydante la plus élevée a été observée dans l'extrait chloroforme avec une valeur très élevée, et cette tendance est l'inverse de celle observée pour les tests DPPH et ABTS lorsque on tient compte de la différence qui existe entre les extraits chloroforme et acétate d'éthyle.

Ceci peut être dû à des différences aux mécanismes réactionnels de chaque test utilisé. Il ressort que l'interaction d'un antioxydant potentiel avec le DPPH dépend de sa conformation structurale. De nombreux antioxydants qui réagissent rapidement avec les radicaux peroxyde peuvent réagir lentement ou même être inertes vis-à-vis du DPPH en raison de l'inaccessibilité stérique (Prior et al., 2005). Les petites molécules qui ont un meilleur accès au site radical ont une activité antioxydante apparent plus élevée avec ce test (Prior et al., 2005). De plus, thermodynamiquement, un composé peut réduire l'ABTS<sup>•+</sup> s'il a un potentiel redox inférieur à celui de l'ABTS. On note aussi que les réactions mis en jeu peuvent différer d'un test à

l'autre. Tantôt, il s'agit d'une réduction pour le FRAP, tantôt d'un transfert d'électron pour le DPPH, ou encore d'un transfert d'électron et de proton pour l'ABTS. A ce titre, dans le cas de l'extrait chloroforme, ces résultats semblent indiqués que cet extrait contiennent principalement des composés antioxydants de type agents réducteurs.

**Tableau 09** : Pouvoir antioxydant et teneurs en composés phénoliques des extraits.

	Chloroforme	Acétate d'éthyle	n-butanol
<b>DPPH</b> (PO $\pm$ ET ( $\mu\text{g}$ Eq Aasc/mg Ext))	2,03 $\pm$ 0,05	2,16 $\pm$ 0,10	0,82 $\pm$ 0,05
<b>ABTS</b> (PO $\pm$ ET ( $\mu\text{g}$ Eq Aasc/mg Ext))	10,35 $\pm$ 0,22	14,32 $\pm$ 0,27	8,27 $\pm$ 0,70
<b>FRAP</b> (PR $\pm$ ET ( $\mu\text{g}$ Eq Aasc/mg Ext))	72,36 $\pm$ 6,59	7,42 $\pm$ 1,06	2,48 $\pm$ 0,14
<b>TP <math>\pm</math> ET</b> (mg EAG /g d'extrait sec)	35,90 $\pm$ 7,55	23,46 $\pm$ 2,05	3,19 $\pm$ 0,12
<b>TF <math>\pm</math> ET</b> (mg EC /g d'extrait sec)	35,60 $\pm$ 2,15	3,21 $\pm$ 0,28	1,34 $\pm$ 0,13



**Figure 26** : Corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en antioxydants des extraits.

A partir des données, rassemblées dans le tableau (09) et présentées dans la figure (26), nous constatons que, dans chaque extrait, la teneur en composés phénoliques est proportionnelle à son activité antiradicalaire. En effet, l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait de chloroforme sont caractérisés par la capacité antioxydante la plus forte par rapport à l'extrait de n-butanol dans les deux tests DPPH et ABTS, ces deux extraits ont comporté une teneur en polyphénols totaux élevée traduite par des concentrations en antioxydants phénoliques les plus élevées. Par la suite, la capacité antioxydante est diminuée parallèlement avec le contenu en composés phénoliques de l'extrait n-butanol qui possède un potentiel antioxydant faible.

proportionnel à une concentration en antioxydants phénoliques faibles respectivement. Dans le test de FRAP on remarque que l'extrait de chloroforme caractérisé par la capacité antioxydante la plus élevée par rapport aux deux autres extraits, reflète sa richesse en flavonoïdes totaux exprimée par la teneur la plus élevée.

L'évaluation de l'activité antioxydante à l'aide de trois méthodes différentes, a montré une forte corrélation entre les teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux des extraits et leur capacité antioxydante. Les polyphénols sont des antioxydants puissants capables d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules, mais l'activité antioxydante ne dépend pas seulement de la concentration des polyphénols, mais aussi de la nature et la structure des antioxydants dans l'extrait (Fadili et al., 2015). Elle dépend de la capacité du phénol à céder un atome H, la délocalisation électronique du radical phénol et de l'encombrement stérique des groupements substituant des atomes d'hydrogène du noyau aromatique (Rahmani, Z., 2015). La différence entre la capacité antioxydante des trois extraits *vis-à-vis* les trois tests étudiés peut être dû à des différences dans leur composition en flavonoïdes qui pouvant intervenir par multiple types de fonction antioxydante ; ce sont entre autres des agents réducteurs et des donneurs de proton (Rice-Evans et al., 1996), comme peut également être relié à la présence d'autres composés phénoliques antioxydants.

Le niveau de corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante entre les extraits de la plante est un aspect intéressant, qui soutient l'hypothèse que ce sont les premiers composés qui contribue directement à l'effet antioxydant (Falleh et al., 2008).

#### **II.2.4- Etude phytochimique des composés phénoliques de l'extrait chloroforme**

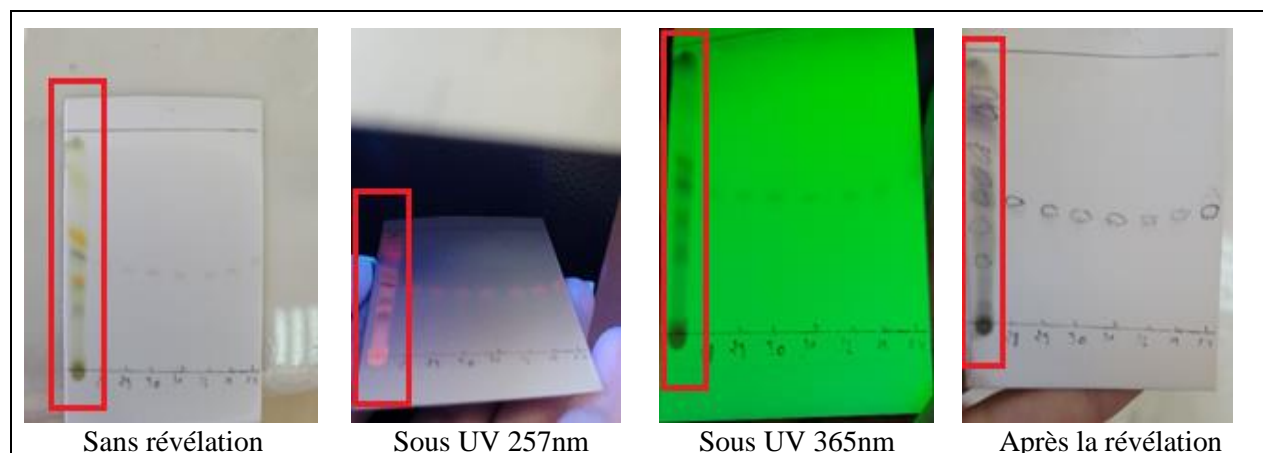
Au vu des résultats précédents, et de la richesse en polyphénols et en flavonoïdes qui caractérisent l'extrait chloroforme, ainsi de sa forte activité antioxydante, nous sommes intéressés à compléter l'étude de la composition en polyphénols de cet extrait dans le but d'isolement des composés phénoliques antioxydants.

##### **II.2.4.1- Analyse qualitative des composés phénoliques de l'extrait chloroforme**

###### **II.2.4.1.1- Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)**

L'utilisation du système chloroforme/acétone/éthanol (9/0,5/0,5, v/v/v) pour séparer les extraits par chromatographie sur couche mince nous a permis d'avoir une bonne séparation des différents constituants de l'extrait chloroforme.

L'extrait chloroforme montre particulièrement en CCM plusieurs tâches visibles à l'œil, sous UV à longueur d'onde 257 nm et 365 nm et après la révélation par un révélateur à base d'anisaldéhyde (figure 27).



**Figure 27** : CCM de l'extrait chloroforme.

#### II.2.4.1.2- Séparation de l'extrait chloroforme par chromatographie sur colonne

L'extrait chloroforme obtenu précédemment soumis à une séparation chromatographique sur colonne pour l'isolement des composés phénoliques en utilisant le système d'élution chloroforme/acétone/éthanol à divers gradients. En effet, 26 fractions ont été ainsi obtenues, le tableau 10 rassemble les résultats de cette colonne.

**Tableau 10** : Fractions de l'extrait chloroforme.

Fractions	Tubes (25 ml)	Système d'élution			Observations
		Chloroforme	Acétone	Éthanol	
<b>Fa</b>	1 à 2	100%	0%	0%	Rien.
<b>Fb</b>	3 à 5	100%	0%	0%	Une seule tâche visible à l'œil.
<b>Fc</b>	6 à 8	100%	0%	0%	Rien.
<b>Fd</b>	9 à 11	100%	0%	0%	Une tâche fluorescente UV (365 nm).
<b>Fe</b>	12 à 14	100%	0%	0%	2 tâches séparées visibles après révélation.
<b>Ff</b>	15 à 20	100%	0%	0%	Une tâche visible à l'œil et fluorescente UV (257 nm) et après révélation.
<b>Fg</b>	21 à 25	100%	0%	0%	Une tâche visible à l'œil et fluorescente UV (257 nm).
<b>Fh</b>	26 à 28	99%	0.5%	0.5%	2 tâches séparées visibles à l'œil.
<b>Fi</b>	29 à 57	99%	0.5%	0.5%	Une tâche visible à l'œil, fluorescente à l'UV (257 et 365nm) et après la révélation.
<b>Fj</b>	58 à 60	98%	1%	1%	Une tâche fluorescente UV (257 et 365nm) et après la révélation.
<b>Fk</b>	61 à 76	98%	1%	1%	Une tâche fluorescente UV (257 nm).
<b>Fl</b>	77 à 78	98%	1%	1%	3 tâches séparés fluorescents UV (257 nm).
<b>Fm</b>	79 à 92	98%	1%	1%	2 tâches séparées fluorescents UV (257 nm).
<b>Fn</b>	93 à 99	97%	1.5%	1.5%	Une tâche fluorescente UV (257 nm).
<b>Fo</b>	100 à 104	97%	1.5%	1.5%	Rien
<b>Fp</b>	105 à 107	95%	2.5%	2.5%	2 tâches séparées fluorescents UV (257 nm).
<b>Fq</b>	108 à 109	95%	2.5%	2.5%	Rien
<b>Fr</b>	110 à 113	90%	5%	5%	Une tâche fluorescente UV (257 nm).
<b>Fs</b>	114 à 119	90%	5%	5%	2 tâches séparées fluorescents UV (257 nm).
<b>Ft</b>	120 à 125	70%	15%	15%	2 tâches séparées visibles à l'œil et fluorescents UV (257nm).
<b>Fu</b>	126 à 132	70%	15%	15%	Une tâche fluorescente UV (257 nm).
<b>Fv</b>	133 à 141	50%	25%	25%	Rien
<b>Fw</b>	142 à 145	20%	40%	40%	mélange complexe
<b>Fx</b>	146 à 156	0%	50%	50%	Rien
<b>Fy</b>	157 à 173	0%	30%	70%	Rien
<b>Fz</b>	174 à 184	0%	0%	100%	Rien

## II.2.4.2- Analyse quantitative des composés phénoliques des différentes fractions de l'extrait chloroforme

### II.2.4.2.1- Teneurs en polyphénols totaux

Le dosage de polyphénols des différentes fractions a été déterminé par la méthode du folin-ciocalteu. Les teneurs en polyphénols totaux ont été déterminées à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée précédemment à l'aide de différentes concentrations de l'acide gallique comme un standard.

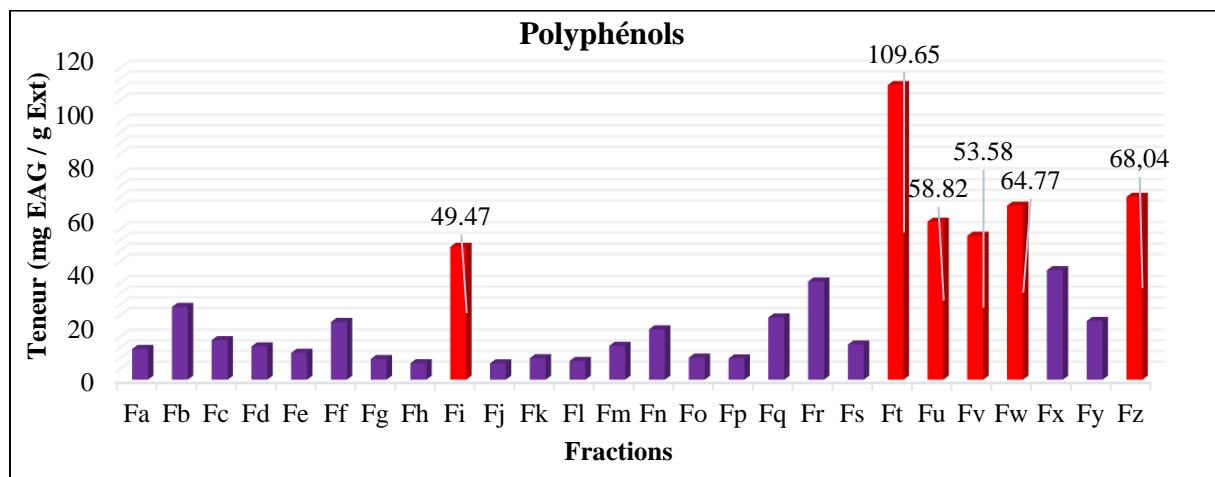
Les résultats obtenus (tableau 11) sont exprimés en milligramme équivalent de l'acide gallique par gramme d'extrait.

**Tableau 11** : Teneurs en polyphénols dans les différentes fractions d'extrait chloroforme.

Fractions	Teneurs en polyphénols TP $\pm$ ET (mg EAG /g Ext)
<b>Fa</b>	11,44 $\pm$ 3,14
<b>Fb</b>	27,09 $\pm$ 8,64
<b>Fc</b>	14,71 $\pm$ 1,41
<b>Fd</b>	12,39 $\pm$ 0,77
<b>Fe</b>	10,01 $\pm$ 1,76
<b>Ff</b>	21,5 $\pm$ 1,70
<b>Fg</b>	7,69 $\pm$ 0,51
<b>Fh</b>	6,14 $\pm$ 1,72
<b>Fi</b>	49,47 $\pm$ 5,74
<b>Fj</b>	6,08 $\pm$ 0,20
<b>Fk</b>	7,98 $\pm$ 0,89
<b>Fl</b>	6,97 $\pm$ 1,34
<b>Fm</b>	12,63 $\pm$ 2,03
<b>Fn</b>	18,76 $\pm$ 0,84
<b>Fo</b>	8,22 $\pm$ 2,007
<b>Fp</b>	7,92 $\pm$ 3,13
<b>Fq</b>	23,16 $\pm$ 1,85
<b>Fr</b>	36,55 $\pm$ 3,37
<b>Fs</b>	13,1 $\pm$ 0,81
<b>Ft</b>	109,65 $\pm$ 5,84
<b>Fu</b>	58,82 $\pm$ 3,94
<b>Fv</b>	53,58 $\pm$ 0,98
<b>Fw</b>	64,77 $\pm$ 4,87
<b>Fx</b>	40,78 $\pm$ 2,87
<b>Fy</b>	21,85 $\pm$ 1,34
<b>Fz</b>	68,64 $\pm$ 5,53

Ces résultats montrent que les fractions contiennent des teneurs variables en polyphénols totaux de 6,08 jusqu'à 109,65 mg EAG /g Ext.

Les teneurs en polyphénols totaux des différentes fractions de l'extrait chloroforme sont représentées sous formes des histogrammes dans la figure (28).



**Figure 28 :** Teneurs en polyphénols dans les différentes fractions d'extrait chloroforme.

D'après l'histogramme de la figure (28), nous constatons que la fraction « Ft » présente la teneur la plus élevée en polyphénols avec un ordre de 109,65 mg EAG /g Ext suivi par la fraction « Fz », la fraction « Fw » et la fraction « Fu » successivement avec des teneurs égales à 68,04mg EAG /g Ext ; 64,77mg EAG /g Ext et 58,82 mg EAG /g Ext respectivement.

Les fractions « Fi » et « Fv » montrent des teneurs moyennes en polyphénols de l'ordre de 49,47 mg EAG /g Ext et 53,58 mg EAG /g Ext respectivement, alors que les autres fractions montrent des valeurs très faibles atteignant 6,14 mg EAG /g au minimum.

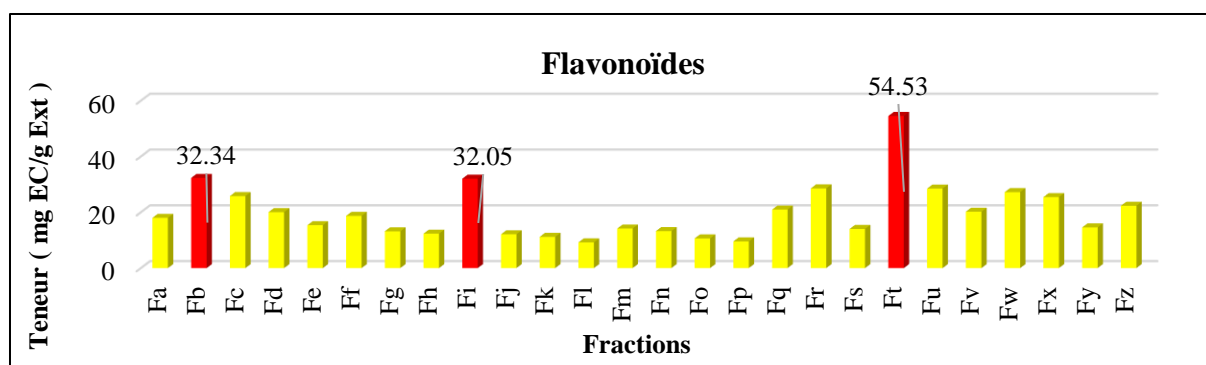
#### II.2.4.2.2- Teneurs en flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes dans les fractions a été réalisé par la méthode colorimétrique de  $AlCl_3$ . Les teneurs en flavonoïdes totaux ont été déterminées à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée précédemment à l'aide de différentes concentrations de la catéchine comme un standard.

La teneur en flavonoïdes a été exprimée en mg équivalent de catéchine /g Ext et les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau (12).

**Tableau 12 :** Teneurs en flavonoïdes dans les différentes fractions d'extrait chloroforme.

Fractions	Teneurs en flavonoïdes FT ± ET (mg EC /g Ext)
Fa	18,01 ± 0,74
Fb	32,34 ± 2,22
Fc	25,81 ± 2,21
Fd	20,07 ± 1,28
Fe	15,39 ± 1,17
Ff	18,72 ± 0,92
Fg	13,19 ± 0,56
Fh	12,34 ± 0,73
Fi	32,05 ± 0,85
Fj	12,12 ± 0,42
Fk	11,20 ± 0,85
Fl	9,21 ± 0,61
Fm	14,18 ± 2,64
Fn	13,26 ± 0,44
Fo	10,63 ± 0,21
Fp	9,57 ± 0,21
Fq	20,99 ± 2,56
Fr	28,58 ± 0,68
Fs	14,04 ± 0,21
Ft	54,53 ± 3,93
Fu	28,51 ± 1,68
Fv	20,21 ± 0,21
Fw	27,23 ± 2,81
Fx	25,46 ± 1,77
Fy	14,60 ± 2,29
Fz	22,34 ± 2,81

**Figure 29 :** Teneurs en flavonoïdes dans les différentes fractions d'extrait chloroforme.

Ces résultats (simplifiés en histogrammes dans la figure 29) montrent que la teneur en flavonoïdes totaux varie d'une fraction à l'autre, entre 9,21 à 54,53 mg EC /g Ext.



Les résultats de teneur en flavonoïdes font apparaître que la fraction « Ft » contient la quantité la plus importante en flavonoïdes de l'ordre de 54,53 mg EC/g Ext suivi par les deux fractions « Fi et Fb » qui ont une teneur moyenne de 32 mg EC/g Ext. Les autres fractions ont montrées des valeurs faibles en flavonoïdes totaux atteint 9,21 mg EC/g Ext au minimum.

## II.2.5- Activité antioxydante des différentes fractions de l'extrait chloroforme

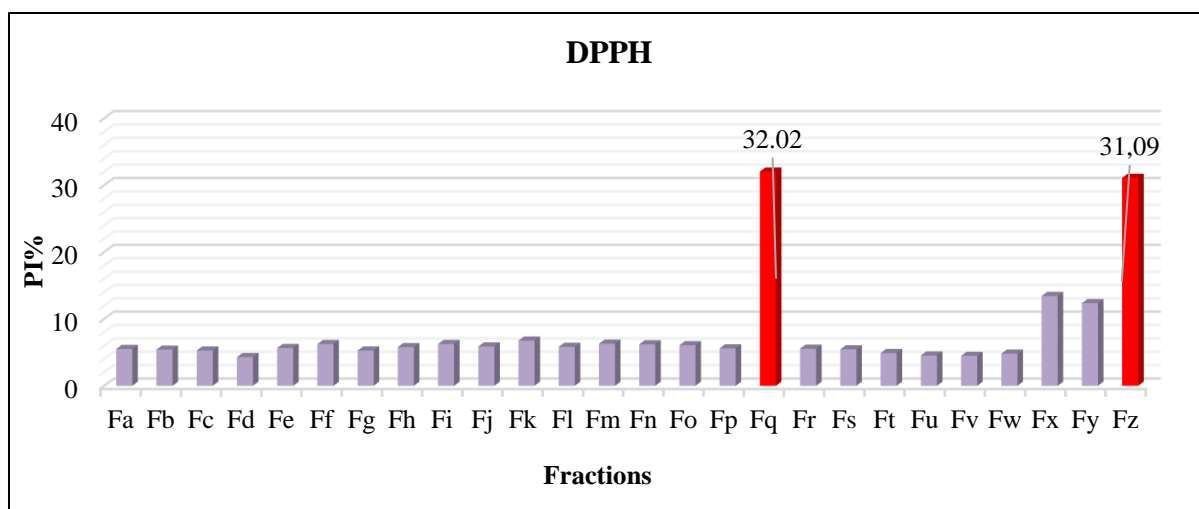
### II.2.5.1- Test DPPH

L'activité antioxydante de nos fractions est exprimée par les pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH par la même concentration de la fraction.

Les résultats de pourcentage d'inhibition des fractions conciliés dans le tableau (13) ont montré des pourcentages d'inhibition variant entre 4,28 % et 32,02 % selon la fraction.

**Tableau 13 :** Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les différentes fractions.

Fractions	Pourcentage d'inhibition de radical DPPH (PI% ± ET)
Fa	5,50 ± 0,68
Fb	5,40 ± 0,21
Fc	5,26 ± 1,61
Fd	4,28 ± 0,63
Fe	5,64 ± 0,29
Ff	6,24 ± 1,12
Fg	5,26 ± 0,68
Fh	5,78 ± 0,58
Fi	6,24 ± 1,40
Fj	5,87 ± 0,13
Fk	6,75 ± 0,32
Fl	5,82 ± 0,49
Fm	6,29 ± 0,37
Fn	6,20 ± 0,21
Fo	6,06 ± 0,21
Fp	5,59 ± 0,41
Fq	32,02 ± 4,26
Fr	5,54 ± 1,01
Fs	5,45 ± 0,60
Ft	4,89 ± 1,47
Fu	4,52 ± 1,18
Fv	4,47 ± 1,33
Fw	4,80 ± 1,18
Fx	13,42 ± 7,53
Fy	12,35 ± 0,58
Fz	31,09 ± 1,92



**Figure 30 :** Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les différentes fractions.

Ces résultats (illustrés à l'aide des histogrammes dans la figure (30)) ont montré un pourcentage d'inhibition élevée dans la fraction « Fq » atteint 32,02 % suivi par la fraction « Fz » avec presque le même pourcentage d'inhibition. Cependant, un faible pourcentage d'inhibition a été observé avec des valeurs proches dans les restes fractions, variant entre 4,28 % et 13,42 %.

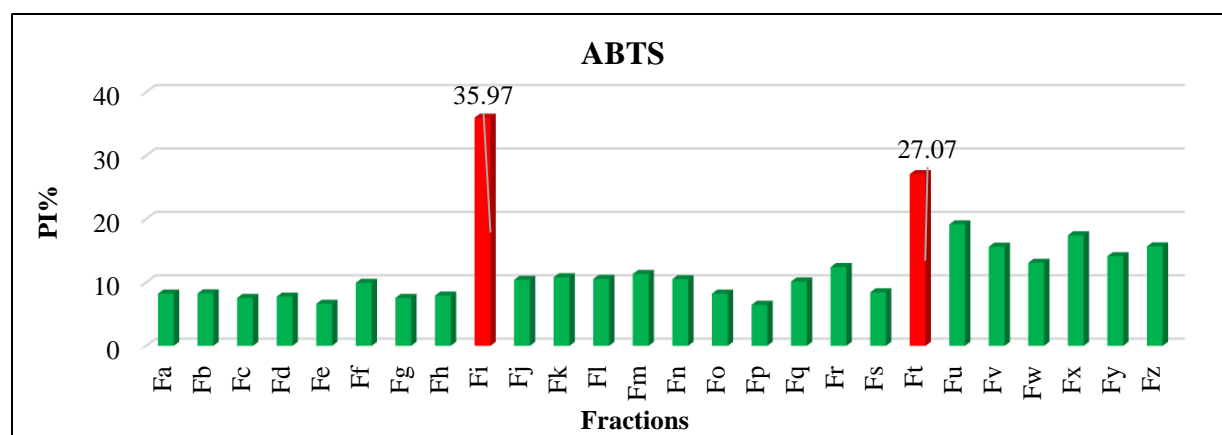
#### II.2.5.2- Test ABTS

L'activité antioxydante des fractions est déduite par la capacité d'une même concentration des différentes fractions à inhiber le radical ABTS<sup>+</sup>.

Les résultats de pourcentage d'inhibition le radical ABTS<sup>+</sup> des fractions rassemblées dans le tableau (14) ont montré que les PI% varient entre 6,46% et 35,97 %.

**Tableau 14** : Pourcentages d'inhibition du radical ABTS par les différentes fractions.

Fractions	Pourcentage d'inhibition de radical ABTS (PI% $\pm$ ET)
Fa	8,22 $\pm$ 1,62
Fb	8,28 $\pm$ 0,23
Fc	7,55 $\pm$ 0,62
Fd	7,76 $\pm$ 1,11
Fe	6,62 $\pm$ 0,23
Ff	9,93 $\pm$ 0,71
Fg	7,55 $\pm$ 0,71
Fh	7,92 $\pm$ 0,54
Fi	35,97 $\pm$ 6,29
Fj	10,40 $\pm$ 1,97
Fk	10,81 $\pm$ 0,76
Fl	10,55 $\pm$ 0,94
Fm	11,33 $\pm$ 0,93
Fn	10,50 $\pm$ 1,40
Fo	8,22 $\pm$ 0,26
Fp	6,46 $\pm$ 0,85
Fq	10,14 $\pm$ 0,64
Fr	12,42 $\pm$ 0,46
Fs	8,43 $\pm$ 0,23
Ft	27,07 $\pm$ 6,89
Fu	19,15 $\pm$ 2,11
Fv	15,63 $\pm$ 3,88
Fw	13,09 $\pm$ 4,61
Fx	17,44 $\pm$ 6,66
Fy	14,13 $\pm$ 2,01
Fz	15,68 $\pm$ 1,88

**Figure 31** : Pourcentages d'inhibition du radical ABTS par différentes fractions.

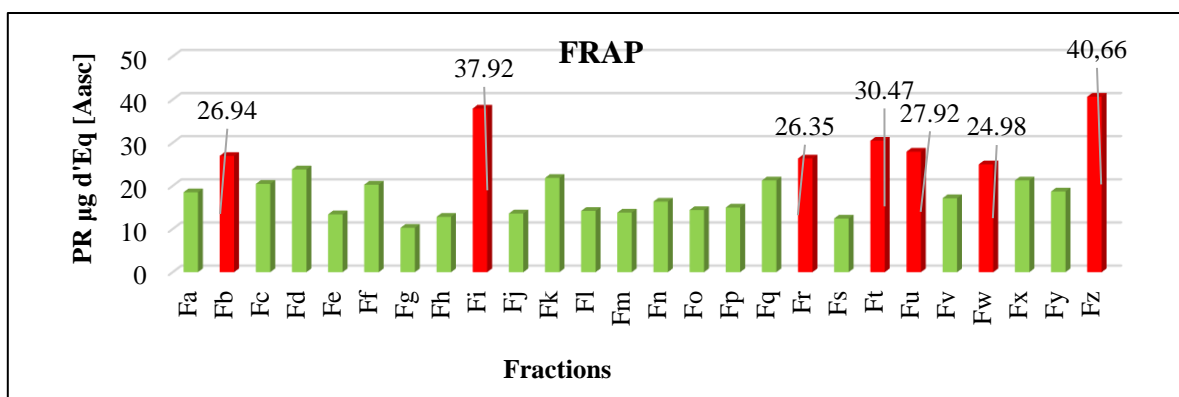
D'après les histogrammes de la figure (31), nous constatons que la fraction « Fi » avait le pourcentage d'inhibition le plus élevée égale à 35,97 % suivi par la fraction « Ft » avec un pourcentage d'inhibition égal 27,07 %, ceci est traduit par des activités antioxydante élevés de ces deux fractions. Cependant, des pourcentages plus faibles ont été obtenus dans les autres fractions qui ont moins d'efficacité à piéger le radical libre ABTS<sup>+</sup>.

### II.2.5.3- Test FRAP

La méthode est basée sur la capacité des antioxydants présents dans les fractions avec la même concentration à réduire le fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>).

**Tableau 15** : Pouvoir réducteur de différentes fractions testées.

Fractions	Pouvoir réducteur PR ± ET (µg Eq [Aasc])
Fa	18,5
Fb	26,94
Fc	20,47
Fd	23,8
Fe	13,41
Ff	20,27
Fg	10,27
Fh	12,82
Fi	37,92
Fj	13,6
Fk	21,84
Fl	14,19
Fm	13,8
Fn	16,35
Fo	14,39
Fp	14,98
Fq	21,25
Fr	26,35
Fs	12,43
Ft	30,47
Fu	27,92
Fv	17,13
Fw	24,98
Fx	21,25
Fy	18,7
Fz	40,66



**Figure 32 :** Pouvoir réducteur par le test FRAP des différents extraits testés.

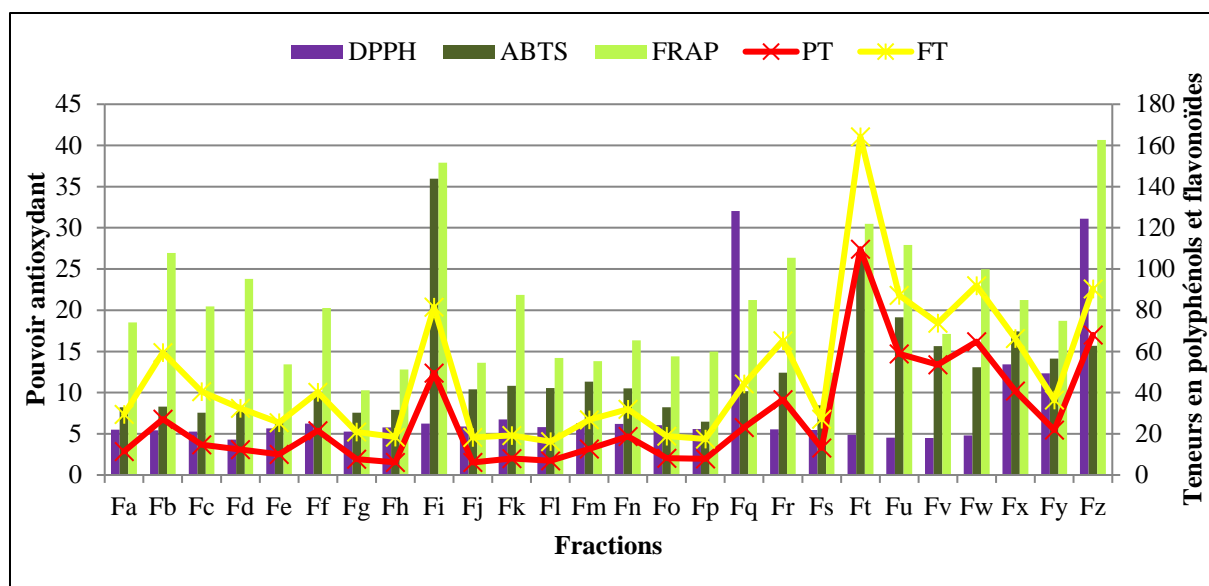
La courbe d'étalonnage est établie précédemment à partir des absorbances en fonction de différentes concentrations de l'acide ascorbique (utilisée comme référence), une augmentation de l'absorbance indique une augmentation de pouvoir réducteur.

Chaque fraction est testée, et l'absorbance qui en découle permet de déterminer sa concentration en µg d'équivalent Aasc en utilisant la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (utilisée comme référence), une augmentation de l'absorbance indique une augmentation de pouvoir réducteur.

A partir des données, rassemblés dans le tableau (15) et présentés dans la figure (32), nous remarquons une capacité de la réduction considérables dans toutes les fractions. Les fractions « Fz » et « Fi » ont montrées la capacité de la réduction la plus élevée égal 40,66 et 37,92 µg Eq d'Aasc, suivi par les fraction « Ft » et « Fu » successivement avec un pouvoir réducteur égale à 30,47 et 27,92 µg Eq Aasc respectivement, tandis que les fractions « Fb » et « Fr » ont montrées un pouvoir réducteur faible et très proche de 26,94 et 26,35 µg Eq Aasc respectivement, suivi par la fraction « Fw » avec une valeur de 24,98 µg Eq Aasc. Le reste des fractions ont enregistrées des faibles valeurs de la capacité réductrice de fer atteint 10,27 µg Eq Aasc dans la fraction « Fg ».

## II.2.6- Corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en composés phénoliques des fractions

Dans cette partie nous avons cherché à établir une relation entre la présence des composés phénoliques et l'activité antioxydante de certaines fractions. Après toutes les combinaisons effectuées (figure 33), les résultats de cette étude ont montrée certaine corrélation entre le pouvoir antioxydant et la teneur en polyphénols dans quelques fractions.



**Figure 33 :** Corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en polyphénols et flavonoïdes des fractions de l'extrait chloroforme.

Les fractions qui révèlent des teneurs élevées en composés phénoliques sont les fractions « Ft », « Fz », « Fw », « Fu », « Fi » et « Fv », ainsi, les fractions les plus riches en flavonoïdes sont les fractions « Ft », « Fi » et « Fb ». Parmi ces fractions, nous avons remarqué que les deux fractions « Fi » et « Ft » montrent une bonne activité antioxydante avec les tests ABTS et FRAP. Cependant, ces deux fractions (« Fi » et « Ft ») ne montrent pas un pouvoir antioxydant intéressant avec le test DPPH.

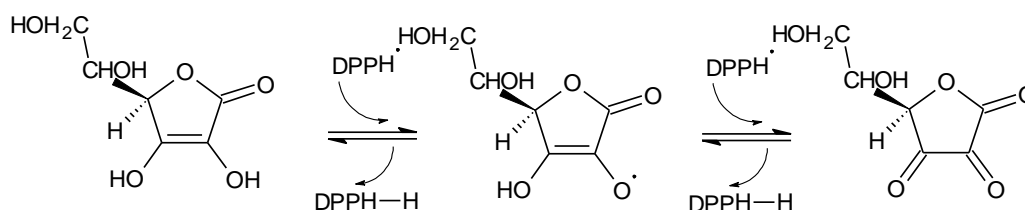
Les fractions « Ft » et « Fi » sont les fractions les plus riches en flavonoïdes. En outre, il est mentionné dans plusieurs travaux que de nombreux antioxydants peuvent réagir lentement ou peuvent même être inertes vis-à-vis du DPPH en raison de l'inaccessibilité stérique, ainsi, les petites molécules qui ont un meilleur accès au site radical ont une capacité antioxydante apparente plus élevée avec ce test. Par ailleurs, il faut rappeler que le radical cation ABTS est soluble dans les solvants aqueux et organiques, il peut donc être utilisé dans plusieurs milieux pour déterminer les capacités antioxydantes des substances hydrophiles et lipophiles sur une large gamme de pH contrairement au radical DPPH qui est insoluble dans les solvants apolaires, ce qui limite l'utilisation de ce test dans la détermination des capacités antioxydantes des substances lipophiles. Ces résultats semblent indiqués que cette inertie chimique des fractions « Ft » et « Fi » vis-à-vis du DPPH peut être une question de structure volumineuse des flavonoïdes présents dans ces fractions comme le cas des flavonoïdes glycosides, mais elle reste une faible probabilité car ce genre des flavonoïdes sont polaires et extractibles générales par le n-butanol. Un autre critère concerne la nature de ces flavonoïdes, c'est-à-dire que ce sont des flavonoïdes lipophiles et l'évaluation de leur activité antioxydante

nécessite un milieu réactionnel plus adapté comme le test ABTS, semble être une bonne explication de cette contradiction. Cela confirme certainement que les flavonoïdes sont responsables de l'activité antioxydante de ces deux fractions.

La fraction « Fz » montre une activité antioxydante importante dans les tests DPPH et FRAP mais pas dans le test ABTS, cette fraction est aussi parmi les fractions les plus riches en composés phénoliques. Ceci peut être expliqué par les limites du test ABTS comme celui thermodynamique et c'est qu'un composé peut réduire l'ABTS<sup>•+</sup> s'il a un potentiel redox inférieur à celui de l'ABTS. (Prior et al., 2005).

Nous constatons, dans le cas des fractions même si elles étaient riches en polyphénols ou en flavonoïdes mais elles ont donné un faible pouvoir antioxydant (la fraction « Fb » est en tête d'exemples), que la synergie des composés phénoliques explique dans ces fractions que l'activité antioxydante dépend non seulement de la teneur mais aussi de la structure de ces molécules et du mécanisme d'action en mélange d'extrait brut. À partir du là, il est très accepté que n'est pas nécessairement la forte teneur en polyphénols pour exhiber une activité antioxydante puissante (Moure et al., 2001).

D'autres fractions, comme la fraction « Fq » par exemple, sont très pauvres en polyphénols et en flavonoïdes mais ils ont données un pouvoir antioxydant important. Les polyphénols ayant des stœchiométries élevées ont responsables à une capacité importante à piéger les radicaux libres par transferts multiples d'atomes H ou d'électrons du phénol et de certains de ses produits d'oxydation, comme dans le cas de la quercétine (Goupy P et al., 2009). De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur capacité antioxydante, les flavonoïdes les plus actifs sont ceux qui renferment des groupements 3'-4' dihydroxy sur le cycle B et/ou un groupement 3 OH sur le cycle C (Amic et al., 2003). Un exemple simple de piégeage des radicaux libres par transferts multiples d'atomes H ou d'électrons et celui de l'acide ascorbique, en effet, une molécule de DPPH<sup>•</sup> est réduite par deux molécules d'acide ascorbique, comme le montre la réaction suivante :



Ceci pourrait s'expliquer que les composés phénoliques contenu dans ces fractions sont très efficace comme antioxydants. Une autre hypothèse serait la présence d'autres molécules antioxydantes non phénoliques et qui agiraient aussi sur les mécanismes antioxydants.



## Conclusion

Ce travail a pour objectif principal la valorisation d'une espèce végétale marine utilisée dans la médecine traditionnelle par une contribution à la recherche des nouveaux composés phénoliques antioxydants par investigation photochimique bio-guidée d'une espèce végétale marine.

Le protocole d'extraction débuté par une macération MeOH/H<sub>2</sub>O (80 : 20 ; v/v) suivi par une extraction de type liquide-liquide pour fractionner l'extrait brute en trois extraits selon la déférence de polarité qui donne trois extraits ; le chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol.

Le screening phytochimique des trois extraits par analyse quantitative des polyphénols et flavonoïdes, a mis en évidence la richesse en polyphénols de certains extraits. La teneur la plus élevée en polyphénols est apparue dans l'extrait de chloroforme estimée  $35,90 \pm 7,55$  mg EAG/g d'extrait sec suivi par l'extrait acétate d'éthyle  $23,46 \pm 2,05$  mg EAG/g d'extrait sec, la plus faible teneur apparue dans l'extrait de n-butanol. De plus, la teneur des flavonoïdes a été plus élevée dans l'extrait de chloroforme avec une valeur de  $35,60 \pm 2,15$  mg EAG /g d'extrait sec par rapport aux deux autres extraits.

Concernant l'activité antioxydante, les deux extraits acétate d'éthyle et chloroforme présentent une activité antiradicalaire très importante contre le radical de DPPH et ABTS. Par la suite, l'extrait de chloroforme a un pouvoir réducteur évalué, par le test FRAP, très important par rapport aux deux autres extraits.

A la lumière de ses résultats, l'extrait chloroforme a été choisi pour le fractionnement sur une colonne de gel de silice afin d'isoler ses composés phénoliques. L'analyse quantitative des fractions des polyphénols et flavonoïdes a montrée des teneurs considérables en polyphénols et en flavonoïdes dans certaines fractions. L'évaluation de l'activité antioxydante de ces différentes fractions par les trois tests DPPH, ABTS, FRAP montre qu'il y'a une certaine corrélation entre la teneur en polyphénols et en flavonoïdes et leur activité antioxydante. Les fractions « Fi et Ft » contient des teneurs les plus élevés en flavonoïdes montrent une bonne activité antioxydante avec les deux tests ABTS et FRAP. Alors que la fraction « Fz » montre une activité antioxydante importante dans les deux tests DPPH et FRAP, cette fraction est aussi parmi les fractions les plus riches en polyphénol. D'autres fractions sont très faibles en polyphénols et en flavonoïdes mais ils ont donné un pouvoir antioxydant important tandis que d'autres même si elles étaient riches en polyphénols ou en flavonoïdes elles ont donné un faible pouvoir antioxydant.

D'après l'ensemble de ces résultats on a conclu que l'activité antioxydante dépend non seulement de la teneur en composés phénoliques mais aussi de la structure de ces molécules, de la synergie, du mécanisme d'action et de la présence d'autres molécules antioxydantes non phénoliques et qui agiraient aussi sur les mécanismes antioxydants.

Donc ces résultats obtenus ne constituent qu'une connaissance primaire à la recherche des nouveaux composés phénoliques antioxydants. Il serait donc intéressant d'étendre et compléter ce travail par une étude plus poussée de l'activité antioxydante non seulement sur les extraits utilisés, mais également sur d'autres types d'extraits et leurs fractions et composants. Il serait intéressant aussi de continuer ces travaux en reprenant la séparation et l'identification de la composition des fractions actives pour déterminer les composés phénoliques et non phénoliques responsables de l'activité antioxydante de cette plante.

**Références bibliographiques**

**Ali-Rachedi, F., Meraghni, S., Touaibia, N., & Mesbah, S. (2018).** Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne *Scabiosa Atropurpurea* sub. *Maritima* L. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège.

**Amic D, Davidovic-Amic D, Beslo D and Trinajstic N (2003).** Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemical Acta*, 76, 55-61.

**Andersen, O. M., & Markham, K. R. (2005).** Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. CRC press.

**Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., & Ryan, D. (2000).** Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, 125(5), 989-1009.

**Benedec, D., Vlase, L., Hanganu, D., & Oniga, I. (2012).** Antioxidant potential and polyphenolic content of Romanian *Ocimum basilicum*. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 7(3), 1263-1270.

**Bettaieb Rebey, I., Bourgou, S., Saidani Tounsi, M., Fauconnier, M. L., & Ksouri, R. (2017).** Etude de la composition chimique et de l'activité antioxydante des différents extraits de la Lavande dentée (*Lavandula dentata*). *Journal of New Sciences*, 39(2).

**Bhattacharya, A., Sood, P., & Citovsky, V. (2010).** The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Molecular plant pathology*, 11(5), 705-719.

**Boizot, N., & Charpentier, J. P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier des Techniques de l'INRA*, 79-82.

**Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.

**Budic-Letoc, I., Lovric, T., Pezo I., Klujuzuric, J.G. (2005).** Study of dynamics of polyphenol extraction during traditional and advanced macération processes of the babic grape variety. *Food Technology and Biotechnology*, 43 (1), 47-5

**Chemat, F. (2011).** Eco-extraction du végétal : Procédés innovants et solvants alternatifs.

**Chen, J. H., et Ho, C. T. (1997).** Antioxidant activities of caffeic acids and its related hydrocinnamic acid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2374–2378.

**Cheng, X. M., Hu, Y. Y., Yang, T., Wu, N., & Wang, X. N. (2022).** Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in Vascular-Related Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

**Cherif, H. S., Saidi, F., Boutoumi, H., Rouibi, A., & Chaouia, C. (2009).** Identification et caractérisation de quelques composés chimiques chez *Aristolochia longa* L. *Agricultura*, 3, 76-82.

- Cheyrier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V., & Martens, S. (2013).** Plant phenolics : recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant physiology and biochemistry*, 72, 1-20.
- Corona, G. (2011).** Seaweed polyphenols : Bioavailability and healthy benefits. *Bioactive from Seaweed, and Innovative Ingredients in Salt Reduction*, 5.
- Doukani, K., Tabak, S., Derriche, A., & Hacini, Z. (2014).** Étude physico-chimique et phyto-chimique de quelques types de miels Algériens. *Revue Ecologie-Environnement*, 10, 37-49.
- EL ABED D., (2007).** Principes actifs des apiaceae. *Phyto Chem et Bio Sub journal*, 1,1-6.
- El Gharras H. (2009).** Polyphenols : food sources, properties and applications - a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 2512–2518.
- Escarpa, A., & Gonzalez, M. C. (2001).** An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 31(2), 57-139.
- Fadili, K., Amalich, S., N’dedianhoua, S. K., Bouachrine, M., Mahjoubi, M., El Hilali, F., & Zair, T. (2015).** Teneurs en polyphénols et évaluation de l’activité antioxydante des extraits de deux espèces du Haut Atlas du Maroc : *Rosmarinus Officinalis* et *Thymus Satureioides*. *Int J Innov Sci Res ISSN*, 17, 2351-8014.
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdelly, C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379
- Ferrazzano, G. F., Amato, I., Ingenito, A., Zarrelli, A., Pinto, G., & Pollio, A. (2011).** Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties : a review. *Molecules*, 16(2), 1486-1507.
- Goupy P., Bautista-Ortin A.-B., Fulcrand H., Dangles O. (2009).** Antioxidant activity of wine pigments derived from anthocyanins : hydrogen transfer reactions to the DPPH radical and inhibition of the heme-induced peroxidation of linoleic acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 57 : 5762-5770.
- GOUSSARD J.P., (1999).** Les radicaux libres et antioxydants. Denis RICÉ in *Guide Nutritionnel des sports d'endurance*. 1-11.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007).** Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-38.
- Halliwell, B. (1994).** Free radicals and antioxidants : a personal view. *Nutrition reviews*, 52(8), 253-265.
- Hamann, M. T. (2006).** *Methods in Biotechnology. Natural Products Isolation*, Edited by Satyajit D. Sarker, Zahid Latif, and Alexander I. Gray. Humana Press, Totowa, NJ. 2005. 515.
- Harborne, J. B. (1989).** General procedures and measurement of total phenolics. *Methods in plant biochemistry*, 1, 1-28.

- Harborne, J. B. (1989).** General procedures and measurement of total phenolics. *Methods in plant biochemistry*, 1, 1-28.
- Heymes, R. (2016).** Modifications qualitative et quantitative en composés phénoliques dans les feuilles de hêtre soumises à des contraintes abiotiques (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- Hossain, M. A., & Shah, M. D. (2015).** A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*. *Arabian Journal of Chemistry*, 8(1), 66-71.
- Hubert, J. (2006).** Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja : étude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines (Doctoral dissertation).
- Kurek-Górecka, A., Rzepecka-Stojko, A., Górecki, M., Stojko, J., Sosada, M., & Świerczek-Zięba, G. (2013).** Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules*, 19(1), 78-101
- L. Lagnika, (2005)** "Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises" Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg, 249.
- Lbert, M. G., Rousselot, D. B., Abedinzadeh, Z., & Jore, D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique. *L'Actualité Chimique*, 11, 91-96.
- Leopoldini, M., Russo, N., & Toscano, M. (2011).** The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants *Food Chemistry*, 125(2), 288-306.
- Lhuillery, M. (2006).** MEMOIRE DE MASTER. PROJET, 2, 1.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Billot, J. (2018).** Fruit phenolics. CRC press.
- Martin, S., & Andriantsitohaina, R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. In *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, 51(6), 304-315
- Menaa, F., Menna, A., Tréton, J. (2014).** Polyphenols against skin aging in polyphenols in human health and disease, 1, 819-830
- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A. (1993).** A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*. 84, 407-412
- Molyneux, P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. Technol*, 26(2), 211-219.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., ... & Parajó, J. C. (2001).** Natural antioxidants from residual sources. *Food chemistry*, 72(2), 145-171.
- Moussa, A. M., Emam, A. M., Diab, Y. M., Mahmoud, M. E., & Mahmoud, A. S. (2011).** Evaluation of antioxidant potential of 124 Egyptian plants with emphasis on the action of *Punica granatum* leaf extract on rats. *International food research journal*, 18(2).

**Nunes, X. P., Silva, F. S., Almeida, J. R. G. D. S., Barbosa Filho, J. M., de Lima, J. T., de Araújo Ribeiro, L. A., & Júnior, L. J. Q. (2012).** Biological oxidations and antioxidant activity of natural products. New York : INTECH Open Access Publisher, 1-20.

**Oreopoulou, A., Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2019).** Extraction of polyphenols from aromatic and medicinal plants : an overview of the methods and the effect of extraction parameters. *Polyphenols in plants*, 243-259.

**Oreopoulou, A., Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2019).** Extraction of polyphenols from aromatic and medicinal plants : an overview of the methods and the effect of extraction parameters. *Polyphenols in plants*, 243-259.

**Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, 44(6), 307-315.

**Pastre, J. (2005).** Intérêt de la supplementation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques (Doctoral dissertation).

**Pourmorad F., Hosseinimehr S-J et Shahabimajd N. (2006).** Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African journal of biotechnology*, 5 (11), 1142-1145

**Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302

**Pyrzynska, K., & Biesaga, M. (2009).** Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(7).

**RAHMANI, Z. (2015).** Etude de la relation structure-activité antioxydante et antihémolyse des érythrocytes humains par quelques dithiolethiones et composés phénoliques (Doctoral dissertation, Université de Ouargla-Kasdi Merbah).

**Rasines-Perea, Z., & Teissedre, P. L. (2017).** Grape polyphenols' effects in human cardiovascular diseases and dia Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 2012. *Betes. Molecules*, 22(1), 68.

**Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

**Rezaire, A. (2012).** Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa). Thèse de Doctorat

**Ribéreau-Gayon, P. (1968).** Les Composés phénoliques des végétaux : par Pascal Ribéreau-Gayon... Dunod, 254

**Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996).** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933-956.

- Sánchez-Moreno, C. (2002).** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food science and technology international*, 8(3), 121-137.
- Sarker, S. D., Latif, Z., & Gray, A. I. (2006).** Natural product isolation. *Natural products isolation*, 1-25.
- SCHAUENBERG P. (2005).** Guide des plantes médicinales., Delachaux et niestle, Paris, 396.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012).** Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 2012.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Sofowora, A. (2010).** Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. KARTHALA Editions.
- Spigno, G., De Faveri, D.M. (2007).** Antioxidants from grape stalks and marc : influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering*, 78, 793-801.
- Stalikas, C. D. (2007).** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*, 30(18), 3268-3295.
- Surget, G. (2017).** Processus adaptatifs des végétaux marins face au changement climatique à différentes échelles de temps et d'espace : dynamique de populations, métabolomique, écophysiologie et potentiels de valorisation (Doctoral dissertation, Université de Bretagne occidentale-Brest).
- Surget, G., Roberto, V. P., Le Lann, K., Mira, S., Guérard, F., Laizé, V., ... & Stiger-Pouvreau, V. (2017).** Marine green macroalgae : A source of natural compounds with mineralogenic and antioxidant activities. *Journal of applied phycology*, 29(1), 575-584.
- Tessier, F., & Marconnet, P. (1995).** Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science & sports*, 10(1), 1-13.
- Tsuchiya, H., & Iinuma, M. (2000).** Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine*, 7(2), 161-165.
- Vichnevetskaia, K. D., & Roy, D. N. (1999).** Oxidative stress and antioxidative defense with an emphasis on plants antioxidants. *Environmental Reviews*, 7(1), 31-51
- Vincent, H. K., & Taylor, A. G. (2006).** Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *International journal of obesity*, 30(3), 400-418.
- Vladimir-Knežević, S., Blažeković, B., Bival Štefan, M., & Babac, M. (2012).** Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. *IntechOpen*, 155-180.

**Wong, C. C., Li, H. B., Cheng, K. W., & Chen, F. (2006).** A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food chemistry*, 97(4), 705-711.

**Wu, T., Zang, X., He, M., Pan, S., & Xu, X. (2013).** Structure–activity relationship of flavonoids on their anti-*Escherichia coli* activity and inhibition of DNA gyrase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(34), 8185-8190.

**Zbadi, R., Mohti, H., & Moussaoui, F. (2018).** Stress oxydatif : évaluation du pouvoir antioxydant de quelques plantes médicinales. *Médecine thérapeutique*, 24(2), 134-141.

**Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999).** The determination of flavonoid Contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*, 64(4), 555-559.



## Résumé

Ce travail est mené dans le but de la recherche des nouveaux composés phénoliques antioxydants à partir d'une espèce végétale marine. La détermination quantitative des composés phénoliques dans trois extraits ; chloroforme, acétate d'éthyle et le n-butanol, obtenus à partir d'un extrait brut macérer, révèle une richesse de l'extrait chloroforme en polyphénols et en flavonoïdes. Alors que l'évaluation de l'activité antioxydante par trois tests ; DPPH, ABTS et FRAP des trois extraits, montre une bonne activité antioxydante de l'extrait chloroforme et de l'extrait acétate d'éthyle et un bon pouvoir réducteur de l'extrait chloroforme. Le fractionnement de l'extrait chloroforme par chromatographie sur colonne suivi par une quantification des composés phénoliques et l'évaluation de l'activité antioxydante des fractions, montrent que certaines fractions révèlent des bonnes teneurs en polyphénols et en flavonoïdes qui sont probablement responsables à leur activité antioxydante.

**Mots clés :** Espèce végétale marine, Polyphénols, Flavonoïdes, Activité antioxydante.

## Abstract

This work is being conducted with the aim of researching new antioxidant phenolic compounds from a marine plant species. The quantitative determination of phenolic compounds in three extracts; chloroform, ethyl acetate and n-butanol, obtained from a macerated crude extract, reveals a richness of the chloroform extract in polyphenols and flavonoids. While the evaluation of antioxidant activity by three tests; DPPH, ABTS and FRAP of the three extracts, shows a good antioxidant activity of the chloroform extract and ethyl acetate extract and a good reductive power of the chloroform extract. Fractionating by column chromatography of the chloroform extract followed by quantification of phenolic compounds and evaluation of the antioxidant activity of the fractions, show that some fractions show good levels of polyphenols and flavonoids that are probably responsible for their antioxidant activity.

**Keywords :** Marine plant species, Polyphenols, Flavonoids, Antioxidant activity.

## ملخص

تم إجراء هذا العمل بهدف البحث عن مركبات فينولية جديدة مضادة للأكسدة من نوع نباتي بحري. التحديد الكمي للمركبات الفينولية لثلاثة مستخلصات؛ كلوروفورم، أسيتات الإيثيل، بوتانول، التي تم الحصول عليها ابتداء من مستخلص منقوع خام، كشف عن ثراء مستخلص الكلوروفورم بالبوليفينول والفلافونويد. بينما تقييم النشاط المضاد للأكسدة بثلاثة اختبارات؛ DPPH و ABTS و FRAP للمستخلصات الثلاثة أظهرت نشاطا جيدا مضادا للأكسدة لمستخلص الكلوروفورم ومستخلص أسيتات الإيثيل وقوة ارجاعية جيدة لمستخلص الكلوروفورم. يُظهر تجزئة مستخلص الكلوروفورم بواسطة كروماتوغرافيا العمود متبوعًا بالتقدير الكمي للمركبات الفينولية وتقييم النشاط المضاد للأكسدة للكسور، أن بعض الكسور تظهر محتوى جيد من البوليفينول والفلافونويد التي ربما تكون مسؤولة عن نشاطها المضاد للأكسدة.

**الكلمات المفتاحية:** الأنواع النباتية البحرية، البوليفينول، الفلافونويد، النشاط المضاد للأكسدة

