



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية والجزيئية

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : **Sciences de la Nature et de la Vie**

Filière : **Sciences Biologiques**

Spécialité : **Biochimie moléculaire et santé**

Intitulé :

**Contribution à l'étude des flavonoïdes et de l'activité antioxydant
de l'orge : *Hordeum vulgare***

Présenté et soutenu par : *ZIBOUCHE MARIA*

Le : 21/06/2016

GRIMES CHAHRA

Jury d'évaluation :

Président : *NOUADRI T* (MCA UFM Constantine)

Encadreur : *MERGHEM R* (Pr- UFM Constantine)

Examineur : *HABIBATNI* (MCB UFM Constantine)

*Année universitaire
2015 - 2016*

Remerciements

Ce sujet a été proposé par Monsieur R. MERGHEM, Professeur et responsable du laboratoire de Biochimie Micro-moléculaire & Phytochimie du département des Sciences de la nature, Université de Constantine, on lui exprime nos plus vifs remerciements ainsi que nos profondes gratitude pour avoir orienté, dirigé ce travail et également pour tous ses conseils dans l'élaboration et la conception de ce mémoire.

Nos remerciements s'adressent également à Monsieur T. NOUADRI, Maître de conférences à l'université de Constantine qui nous fait l'honneur d'être le président de ce jury.

Nous sommes également très honorées de la présence, dans ce jury Madame HABIBATNI.

Nous remercions aussi la doctorante I. Djemmel pour ses conseils et aide.

Enfin, que tous ceux qui m'ont accordé un soutien, une aide technique ou un conseil, trouvent ici l'expression de nos profondes reconnaissances.



DEDICACES

*Grâce à toi mon bon dieu, je m'incline devant ta puissance et ta miséricorde,
pour te remercier de l'aide et du courage que tu m'as donné au cours de la
réalisation de ce modeste travail, que je dédier:*

A ma mère : Fatiha

A mon père: Ahmed

A mes frères :Mohamed ;Youcef ;

A mes sœurs Fatima ;Aïcha ; Sihem et Imene;

Les enfants de mes sœurs : Aya ; Abed raoufe ;Ritadje ;Aymene ;

Abderrahmane ; Hadjare ;Ayobe

A toute ma famille;

A tous mes camarades de promotion.

A mon binôme Maria

Sommaire

Introduction.....	1
<u>Chapitre 1 : Les composés phénoliques</u>	
Généralités	3
2-Classification des composés phénoliques.....	3
3- La biosynthèse des composés phénoliques.....	5
4 - Les flavonoïdes.....	7
4-1- Définition.....	7
4-2- Structure chimique.....	7
4-3-Distribution et localisation.....	7
4-4 -Classification des flavonoïdes.....	7
4-5- Principales classes de flavonoïdes.....	8
4-5-1 - Les flavones et flavonols.....	8
4-5-2 -Flavanones et dihydroflavonols.....	8
4-5-3- Les anthocyanes.....	9
5 - Propriétés thérapeutiques des flavonoïdes.....	9
5-1- Action antioxydant.....	9
5-2- protection vasculaire.....	10
5-3 -Flavonoïde et ménopause.....	10
5-4-Effet contre le cancer.....	10
5-5-Action anti – inflammatoire.....	10
<u>Chapitre 2 : Les céréales</u>	
1- Les céréales comme sources des composés phénoliques.....	12
1-1-les principaux groupes de céréales.....	12
1-2- L'orge (Hordeum vulgare) :	13
1-3-Caractères botaniques.....	14

1-3-1-Le cycle de développement.....	14
1-4-Usages et l'importance d'orge.....	15
1-4-1-Production nationale.....	15
1-5- Biochimie des céréales.....	16
1-5-1-Molécules issues du métabolisme primaire.....	16
1-5-2-Molécules issues du métabolisme secondaire.....	17
1-6-Description.....	17
1-6-1-Graine.....	17
1-6-2- Les feuilles : (herbe d'orge)	19
1-6-3-Les principaux composés phénoliques présents chez l'orge :	19

Chapitre 3 : propriétés biologique de l'orge

Introduction.....	20
1- Importance des grains :	20
1-1- Les affections cardiaques.....	20
1-2- Le cancer.....	22
1-3- Le diabète.....	23
2- Importance de l'herbe d'orge (feuilles d'orge)	22
2-1- Cancer.....	23
2-2- Anémie.....	23
2-3-Le jus d'herbe d'orge.....	24
2-3-1-Quelques exemples de produits à base d'orge en herbe.....	24

Chapitre 4 : Stress oxydatif

1- Mécanisme dégradation des radicaux libres.....	25
2-Définition de stress oxydant.....	26
3-Les maladies liées au stress oxydant.....	26
4- Les antioxydants.....	26
5-Systèmes de défenses antioxydants.....	27

5-1- Systèmes antioxydants enzymatiques :	27
5-1-1- La superoxydedismutase.....	27
5-1-2- La glutathion peroxydase.....	27
5-1-3-La catalase.....	28
5-2-Le système antioxydant non enzymati.....	28
5-2-1- La vitamine C ou acide ascorbique:	28
5-2-2- La vitamine E ou tocophérol:	28
5-2-3-Les catéchine.....	29
5-2-4-Le glutathion réduit (GSH)	29
6- Les différentes localisations cellulaires des antioxydants.....	29
7-Mécanismes d'actions des antioxydants:	34
8- Propriétés antioxydants des flavonoïdes :	30

Chapitre 5 : Matériels et méthodes

Matériels et méthodes	31
1- Matériel Végétal:	31
2- Extraction:	32
-1-2Extraction solide-liquide.....	32
2-2-Chromatographie de partage (partitions entre solvants)	32
3-Aspect quantitatif.....	34
3-1-Dosage des composés phénoliques totaux.....	34
4-Aspect qualitatif:	35
4-1-Chromatographie analytique sur couche mince.....	35
4-1-1- Principe de la CCM.....	35
4-1-2- mode opératoire.....	35
4-1-3-identification :	36
4-2- La spectrophotométrie UV – Visible :	38
5- Evaluation de l'activité anti-radicalaire des flavonoïdes.....	40

5-1-Mode opératoire du DPPH°.....	40
-----------------------------------	----

Chapitre 6 : Résultats et interprétations

Résultats et interprétations.....	41
1- Aspect quantitatif	41
-1-1 Dosages des polyphénols totaux par le réactif de Folin-ciocalteu.....	41
1-1-1-Teneur en phénols totaux d'extraits méthanoliques.....	41
2- Résultats aspect qualitatif.....	43
2-1 Diagnostic par chromatographie analytique sur couche mince :	43
2-2-L'analyse spectrale des fractions :	48
3-Le pouvoir antioxydant «DPPH°»	51

Conclusion générale et perspectives.

Référence bibliographique

Annexes

Résumé

Liste des Tableaux

Tableau 01: principale classe des composés phénoliques selon le nombre de carbone.....	4
Tableau 02 : composition moyenne pour 100g d'orge	20
Tableau 03 : Les composés phénoliques rapportés chez l'orge.....	21
Tableau 04 : Origine des radicaux libres	29
Tableau 05 : Relation entre Rf et la structure	41
Tableau06: La relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes.....	41
Tableau 07 : Caractéristique des spectres UV-V des flavonoïdes	43
Tableau 08: Teneur en phénol totaux des extraits	45
Tableau 09: comportement chromatographique des phases:éther diéthylique, acétate d'éthyle, MEC et eau des 2Variétés d'orge.....	50
Tableau 10 : Résultats des tests DPPH de chaque extrait.....	57

Liste des figures

Figure 01: Les grandes lignes de biosynthesis des principaux groups de composésphénolique.....	6
Figure 02: Structure de base des flavonoïdes	7
Figure 03: structure de base flavones.....	8
Figure 04: structure de base des flavonol.....	8
Figure 05: structure chimiques flavanones.....	8
Figure 06: structure chimiques dihydroflavonols.....	8
Figure 07: structure chimique des anthocyanes.....	9
Figure 08: taxonomie des céréales.....	12
Figure09: Le cycle de développement des céréales.....	14
Figure 10: Production nationale d'orge entre 2000 et 2009.....	16
Figure 11: les principales parties d'orge.....	19
Figure 12: Le jus d'herbe d'orge.....	25
Figure 13: Structure de l'hémoglobine et la chlorophylle.....	26
Figure 14: Pyramide des systèmes de défenses antioxydants	31
Figure 15: Sites d'action des nutriments antioxydants (en rouge) et des enzymes Antioxydantes (en noir).....	33
Figure 16: Caractéristiques structurelles des flavonoïdes avec une activité de piégeage des radicaux libre.....	34
Figure 17: Les différentes étapes pour l'obtention de poudre végétale étudiée	35
Figure 18: L'extraction des polyp.....	37
Figure 19: Mode de dépôt pour une CCM.....	40
Figure 20: Le rapport frontal (Rf).....	40
Figure 21: spectre d'absorption d'un flavonoïd.....	42
Figure 22: Forme libre et réduite du DPPH°	44
Figure 23: d'étalonnage de l'acide gallique.....	45

Liste des figures

Figure 24: Teneur en phénol totaux d'extrait.....	46
Figure 25: CCM analytique représentative des flavonoïdes des phases: E : éther diéthylique ; A: acétate d'éthyle ; M: MEC et H: eau des deux variétés d'orge sur plaque de polyamide DC6 développés dans système solvant Toluène /Méthyleéthylcétone / Ethanol/Ether de pétrole (40/30/30/2).....	48
Figure 26: Spectres UV des différentes phases de feuille d'orge : Saïda (1: Ether diéthylique, 2 : Acétate d'éthyle, 3 : MEC, 4 : eau).....	52
Figure 27: Spectres UV des différentes phases de feuille d'orge : Barberousse (1: Ether diéthylique, 2 : Acétate d'éthyle, 3 : MEC, 4 : eau.....	53
Figure 28: Résultat de l'évaluation du pouvoir antioxydant de différent phases des variétés.....	56
Figure 29: Histogramme de test de DPPH.....	57

ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

CAT :Catalase

CCM : Chromatographie sur couche mince

DO : Densité optique

DPPH : Diphényl-picrylhydrazyle

FLO• : Radical flavoxyle

FLOH : Flavonoïde

GSH :Glutathion réduit

GSH- Px : Glutathion peroxydase

H3PW12O40 : Acide phosphotungstique

H3PMo12O40 : Acide phosphomolybdique

MEC : Méthyl-éthyl-cétone

MeOH: Méthanol

Na₂CO₃ :Carbonate de sodium

NO• :Monoxyde d'azote

O₂•- : Radical superoxyde

OH• :Radical hydroxyle

ONOO- :Radical peroxydinitrite

R• :Radical libre

Rf: Rapport frontale

RH :Radical stable

SOD :Superoxyde dismutase

UV-VIS : Ultra violet visible

Φ-OH : Composé phénolique

Introduction générale

Introduction

Avec le développement industriel notre santé est altérée par les facteurs qui favorisent l'apparition et la propagation de nombreuses maladies telles que ; les cancers, le diabète, les maladies neurodégénératives et les maladies cardiovasculaires où l'environnement et le mode vie joue un rôle très important.

Depuis plusieurs années, les recherches se multiplient pour renforcer le lien entre le régime alimentaire et la prévention de ces maladies, de ce fait il a été démontré que les gens qui consomment les légumes et les fruits ont moins de risque pour avoir ces maladies.

D'après Bérubé 2006, ces dernières années, les recherches scientifiques s'intéressent aux composés des plantes qui sont destinés à l'utilisation dans le domaine phytopharmaceutique. Les molécules issues des plantes naturelles sont considérées comme une source très importante de médicaments d'origine naturelle ; sachant que plus de 120 composés provenant de plantes sont aujourd'hui utilisés en médecine moderne et près de 75% entre eux sont appliqués selon leur usage traditionnelle.

Les composés phénoliques occupent une place importante en biochimie moléculaire. Ils correspondent à une très large gamme de structures chimiques et sont un bon témoin de l'extraordinaire capacité de biosynthèse des plantes, capacité qui permet à l'homme de les utiliser dans des domaines aussi variés que l'agroalimentaire la pharmacologie et l'industrie pharmaceutique.

Notre travail consiste à dévoiler la présence ou non des composés phénoliques dans les feuilles d'orge et de déterminer leurs propriétés biologiques.

Les céréales sont les espèces végétales les plus cultivées et les plus utilisées dans l'alimentation humaine et animale.

Introduction

Cette étude va nous permettre de détecter des nouvelles sources phytogénétiques riches en composés phénoliques dans le but de valoriser le grain complet; les sous-produits d'orge et les feuilles d'orge et les destiner à la fabrication d'aliments fonctionnels , et voir aussi si ces herbes peuvent être utilisées dans la production de jus , de tisane ou de gélule qui entrent dans la catégorie de produits pharmaceutiques et compléments alimentaires

Notre travail présentera trois grandes parties :

La première partie sera consacrée aux données bibliographiques est divisé en 4chapitre:

- Les composés phénoliques : comporte leur description ainsi que leur biosynthèse, répartition et leur rôle et intérêts biologique.
- Les céréales : leur classification, leur qualité comme source de composés phénoliques, et les propriétés thérapeutiques de leurs feuilles.
- Propriétés biologique d'orge.
- Le stress oxydant : concernant les radicaux libres, les systèmes de défense enzymatique et non enzymatique.

La seconde partie comprend l'expérimentation qui a été réalisé sur les feuilles des deux espèces de l'orge (**Saïda** et **Barberousse**) effectuée au niveau du Laboratoire de Biologie Micromoléculaire et Phytochimie de l'Université des Frères Mentouri Constantine.

La troisième partie, décrit les méthodes d'études phytochimiques utilisées qui englobent :

- L'extraction des composés phénolique et leur partition entre solvants spécifiques.
- Le dosage des phénols totaux.
- Le diagnostic par CCM analytique.
- Le diagnostic par spectrophotometrie UV-Visible.
- L'activité antioxydant par un test DPPH.

Enfin, une présentation des résultats obtenus, la discussion générale et les perspectives.

Nous terminerons notre mémoire par une conclusion et les références bibliographiques.

Chapitre 1

Les composés phénoliques

1- Généralités

Historiquement les composés produits par la plante ont été classés en métabolites primaires et secondaires.

Par définition les métabolites primaires sont des molécules présentes dans toutes les cellules végétales et nécessaire à la vie de la plante contrairement aux métabolites secondaires les métabolites secondaires ne sont pas essentiels à la croissance et au développement de base de plantes, mais ils peuvent jouer différents rôles pour la survie du végétal lui-même : rôle de résistance. (Merghem, 2009).

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique des groupements hydroxyles libres ou engagé avec un glucide. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des grains ou la maturation des fruits (Merouane, 2013).

Les polyphénols prennent une importance croissante, notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé (Stanley et al, 2003).

En effet, leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer (D.Chen. et al,2004).des maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives. Ils sont également utilisés comme additifs pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (ISANH,2006).

2-Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes qui se différencient d'abord par:

- la complexité du squelette de base, (de simple C₆ à des formes polymérisées).
- les degrés de modification de squelette (degrés d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation).
- Liaison possible de ses molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides protéines et d'autres métabolites secondaires qui peuvent être des composés phénoliques). (Herbert, 1989 ; Macheix et al, 2005 ; Beta et al., 2005).

Selon **Dacost Y. (2003)**, on répartit généralement les composés phénoliques en plusieurs classes:

-Les acides phénoliques: (acide hydroxbenzoïque, acide hydroxycinnamiques)

Les flavonoïdes-

Les tanins et lignines-

Les coumarines -

Tableau 01: principales classes des composés phénoliques selon le nombre de carbone (Merghem R., 2009).

Nombre de C	Classe	Exemples / origine
C_6	Phénols simples	Hydroquinone, catéchol
$C_6 - C_1$	Acide phénols	Acide salicylique, Acide p- (OH) benzoïque
$C_6 - C_3$	Acide cinnamique Coumarines phénylpropènes	Acides caféique, férulique (café, pomme) Esculétine, scopolétine (citron), Eugénol (giroflie)
$(C_6 - C_3)_2$	Lignane	Pinorésinol (pin)
$(C_6 - C_3)_n$	Lignines	Bois, noyau des fruits
$C_6 - C_3 - C_6$	Flavonoïdes Isoflavonoïdes Anthocyanes	Apigénine, lutéoline, quercétine (fruits) Génistéine (soja, pois), Pélargonidine, cyanidine et delphinidine (Fleurs, fruits rouge)
$(C_6 - C_3 - C_6)_n$	Biflavonoïdes	Amentoflavone
$(C_6 - C_3 - C_6)_n$	Proanthocyanes (tannins)	Pocyanidines, Prodelphinidines (Raisin rouge)

3- La biosynthèse des composés phénoliques

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

Les polyphénols sont synthétisés à partir deux voie de biosynthétique:

- **Celle de l'acide shikimique**, qui conduit après transamination et désamination, à l'acide cinnamique et à leurs nombreux dérivés tels que l'acide benzoïque ou les phénols simples ;
- Celle issue de l'acétate/ malonate**, qui conduits à des polys β -coasters (poly-acetates) de longueur variable menant par cyclisation à des composes polycycliques tells les dihydroxy 1,8 –anthraquinone ou les naphthoquinones.

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

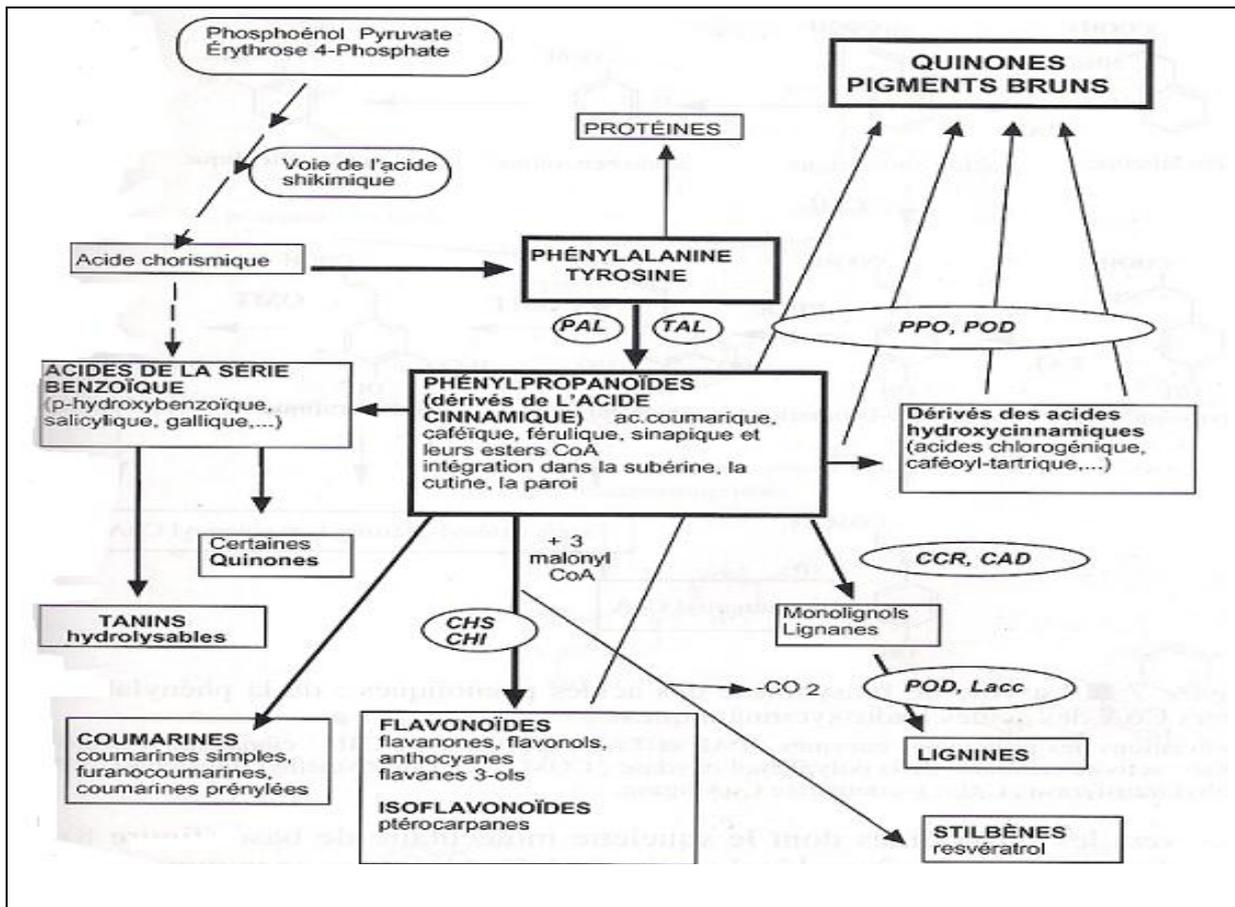


Figure 01: Les grandes lignes de biosynthèses des principaux groupes de composés phénolique (Macheixet al., 2005).

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

4 - Les flavonoïdes

4.1 – Définition

Les flavonoïdes sont des molécules d'origine végétale. Il s'agit de pigments donnant la coloration aux fleurs, fruits et dans certains cas aux feuilles (Milane., 2004).

4.2 – Structure chimique

Les flavonoïdes sont des dérivés benzo-y-pyranne. Leur structure de base est celle d'une diphenyl propane à 15 atomes de carbone (C₆- C₃ - C₆), constitué de deux noyaux aromatiques qui désignent les lettres A et B, relié par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C (Dacosta Y. 2003).

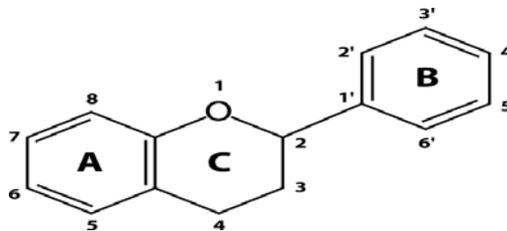


Figure 02 : Structure de base des flavonoïdes (karabin M, 2015).

4.3 -Distribution et localisation

Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, Les flavanones, les dihydroflavanols, les isoflavanones, les chalcones, les auronnes et les anthocyanes. Ces divers composés se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, ou ils peuvent être localisés dans divers organe : racine, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits. (Moulay Y,2012).

4.4 -Classification des flavonoïdes

Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules selon le degré d'oxydation et la nature des substituants portés sur le cycle C (Pietta, 2000), 14 groupes différents ont été identifiés dont six groupes sont particulièrement les plus répandus et les mieux caractérisés : flavones, isoflavones, flavanones, flavanols, flavonols, anthocyanidines (Heim et al., 2002 ; Hendrich, 2006).

4.5-Principales classes de flavonoïdes

4.5.1 - Les flavones et flavonols

Les flavonols diffèrent des flavones par la présence d'un groupement hydroxyle en C₃

Chez les flavonols, la position 3 de l'hétérocycle est toujours glycolée, ainsi que fréquemment la position 7 du cycle A mais jamais la position 5 (Macheix J.J et al.,2006). La teneur des flavonols est plus élevée dans la peau des fruits puisque la lumière en stimule la biosynthèse.

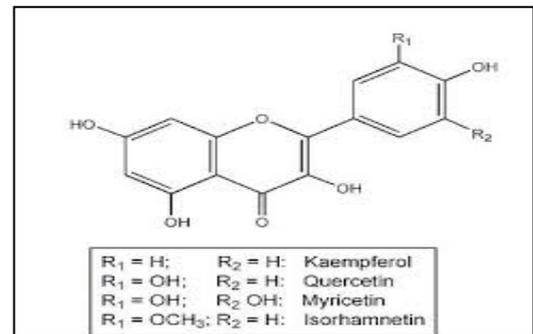
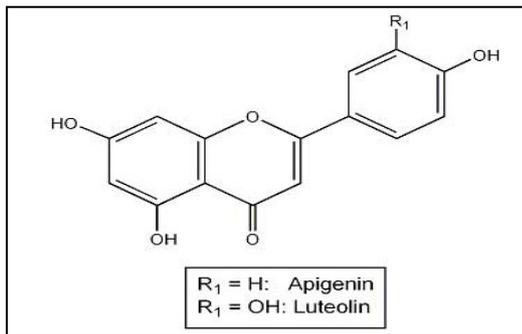


Fig03 : structure de base flavones (Giulia et al.,1999)

Fig04: structure de base des flavonol

4.5.2 -Flavanones et dihydroflavonols

Les flavanones et dihydroflavonols sont caractérisés par l'absence de double liaison entre le C₂ et C₃. Les dihydroflavonols se différencient des flavanones par la présence d'un groupement hydroxyle en position 3 (Bruneton J., 2009; Chosson et al, 1998).

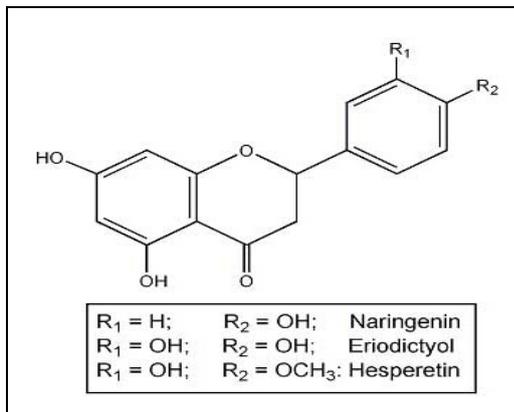


Figure 05 : structure chimiques flavanones

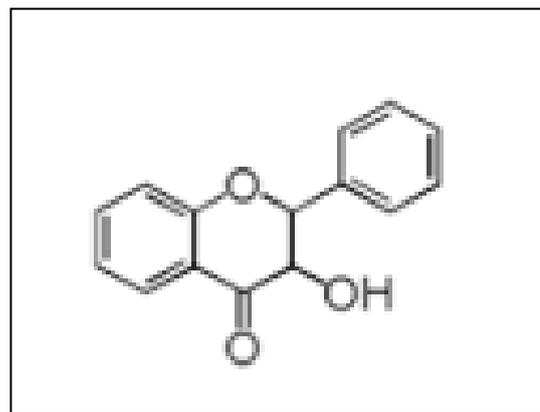


Figure 06 : structure chimiques dihydroflavonols

(Giulia et al 1998)

4.5.3- Les anthocyanes

Sont des pigment hydrosolubles responsables des couleurs bleu, mauve, rouge ou rose de certaines parties végétales (fleurs, fruits, feuilles, racines,...) (valls J et al.,2009).

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

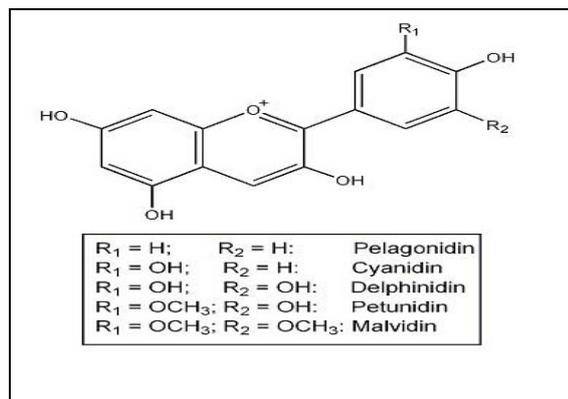


Figure 07:structure chimique des anthocyanes (Knežević S.V. et al., 2012).

5 - Propriétés thérapeutiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent plusieurs propriétés thérapeutiques, certaines établies depuis longtemps (2000 ans), par leurs propriétés nutritionnelles et thérapeutiques multiples, dans cette partie on va citer certaine action de flavonoïdes

5.1- Action antioxydant

Les antioxydants sont largement utilisés dans la prévention primaire et secondaire, les plus connus sont le β -carotène, l'acide ascorbique, les anthocyanes. les polyphénols les flavonoïdes (Bjelakoic et al., 2007). Ils ont la capacité de piéger les radicaux libres générés par notre organisme en réponse aux agressions de l'environnement (cigarette,polluants,infectieux, etc.) qui favorisent le vieillissement cellulaire. Les antioxydants renforcent nos défenses naturelles en protégeant les constituants tissulaires.

5.2- protection vasculaire

Les flavonoïdes sont «veino-actif» c'est –à-dire ayant la capacité de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance; une étude menée aux Pays Bas (l'étude Zutphen) à mis en évidence le fait que les personnes chez qui l'on a donné une dose importante de flavonoïdes sont moins exposées aux maladie cardiaques que les autres (**Hertog et al.,1995**).Grace à l'effet synergique des flavonoïdes de nombreuses plantes sont maintenant classées dans la catégorie des protecteurs vasculaires (**Rice et al.,1996**). C'est ainsi que l'on classe les flavonoides,de raisins dans cette catégorie (**Fleuriet et al 2005**).

5.3 -Flavonoïde et ménopause

Les flavonoïdes ont également des effets protecteurs contre les maladies hormono-dépendantes. En effet, les isoflavones du soja par exemple, interagissent de manière spécifique avec les récepteurs des œstrogènes et inhibent les bouffées de chaleur chez la femme ménopausée, pour cela, ils maintenant considérés comme phyto-œstrogènes.

La quercitrine de l'oignon et le kaempferol de la chicorée, possèdent de leur côté des propriétés pseudo-ostrogéniques qui inhibent la perte osseuse chez la rate ovariectomisée. De nouvelles études restent cependant nécessaires pour valider ces effets sur l'être humain (**Fleuriet et al .,2005**).

5.4-Effet contre le cancer

Les flavonoïdes ont pour effet d'inhiber l'activité d'une enzyme, la topoisomérase II, qui joue un rôle essentiel dans l'apparition du cancer, notamment la maladie de Hodikin. Ils ont largement montré leurs effets protecteurs contre plusieurs cancers, dont la prostate, le colon et le poumon (**Rice et al.,1996**).

5.5-Action anti – inflammatoire

Des recherches récentes ont démontré que les flavonoïdes, notamment les flavonols du cacao, peuvent prévenir la douleur musculaire en accélérant la réparation des tissus au niveau moléculaire. De manière spécifique, ils éliminent la synthèse de l'oxyde nitrique, déclencheur chimique de l'inflammation. Il a été également démontré que d'autres flavonoïdes inhibaient la sécrétion des mastocytes impliqués dans les phénomènes inflammatoires (**Fleurit et al.,2005**), cette activité concerne de nombreux composés phénoliques et en premier lieu l'acide salicylique sous sa forme acétylé (acétyl salicylique) commercialisée sous le nom d'aspirine. Ainsi que

certaines anthocyanes, la cyanidine extraits de cerises, les flavonoïdes des agrumes (**Manthey., 2000**).

En plus des activités biologiques décrites les flavonoïdes présentés d'autres avantages pour la santé, pour les flavonoïdes d'instance ont anti-allergique, anticoagulant, antiplaquettaire, activité antimicrobienne, activité antidiabétique (karbin Met *al.* , 2015)

Chapitre 2

Les céréales

1- Les céréales comme sources des composés phénoliques

1-1-les principaux groupes de céréales

Les céréales sont un groupe de plantes cultivées appartenant, botanique à la famille des **Poacées** appelées *graminées*. Il existe trois grands groupes de céréales (Guignard et Dupont.,2004) :

- Un premier grand groupe formé par le blé, l'orge, le seigle et l'avoine
- Un deuxième grand groupe formé par le maïs.
- Un troisième grand groupe ordonné autour du riz (Alais et al.,2003) :

Le blé: il y a deux types de blé: blé dur (*Triticum durum*), blé tendre (*Triticum aestivum*) et l'orge (*Hordeum vulgare*) la figure ci-dessous représente la phylogénie de la famille des graminées :

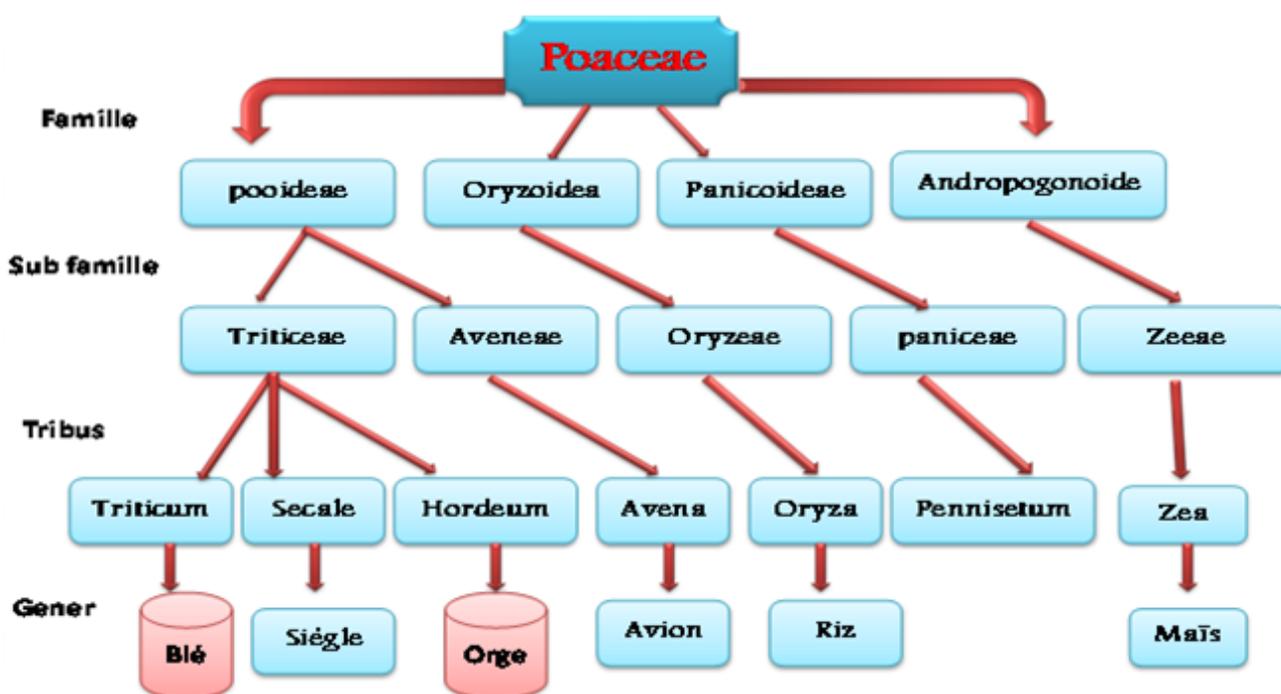


Figure 08 :taxonomie des céréales (Belitz H.D.et al.,2009)

1.2 Aspect botanique: Historique, Origine, Et Classification d' *Hordeum vulgare*:

L'orge est une plante annuelle de la classe des monocotylédones, qui appartient à la famille des graminées et au genre *Hordeum* qui comprend 31 espèces, mais seule vulgare est couramment cultivée, *Hordeum vulgare* est une espèce diploïde ($2n=14$). Elle a été l'une des premières cultures domestiquées, il y a 10 000 ans dans le croissant fertile du moyen-orient (**Baik, B.-k & Ulrich, S.E.**).

L'orge est classée selon les types printemps ou hiver (sensible au gel ou au contraire résistant au froid environ jusqu'à -15°C), sa classification est basée sur la fertilité des épillets latéraux, la densité de l'épi et la présence ou l'absence des barbes (**Rasmusson., 1992**).

On y distingue deux types selon la forme de leur épi :

- L'orge à 2 rangs ou l'orge distique: a un épi aplati composé de 2 rangées d'épillets fertiles, un sur chaque axe du rachis, entouré de 4 épillets stériles. Dans ce type existent surtout des variétés de printemps.
- L'orge à 6 rangs ou orge hexastique : encore appelé exourgeon, à une section rectangulaire, sur chaque axe du rachis les 3 épillets sont fertiles. Dans ce type n'existent pratiquement que des variétés d'hivers (**Soltner., 2005**).

❖ Classification

D'après Feillet 2000, l'orge cultivée est appartenue à la classification suivante:

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
S/Classe	Commelinidae
Ordre	Poales
Famille	Poaceae
S/Famille	Hordeoideae
Tribu	Hordeae (Hordées)
S/Tribu	Hordeinae
Genre	<i>Hordeum</i>
Espèce	<i>Hordeum vulgare</i> L.

1-3-Caractères botaniques

Ce sont des plantes herbacées qui poussent en touffes, elles sont constituées par les racines, les feuilles, la tige et l'épi dans lequel sont contenues les graines.

Ces céréales ont un cycle évolutif qui se divise en trois grandes périodes (période végétative, période reproductrice et période de maturation) (Slafer et al.,2002).

1-3-1 –Le cycle de développement

▪ La période végétative

- ❖ **La germination:** correspond à l'entrée de la semence en vie active et au tout début de Croissance de l'embryon.
- ❖ **la levée:** cette période est caractérisée par le nombre de feuilles de la jeune plante et leur stade de développement (Giban et al.,2003).
- ❖ **le tallage:** le début du tallage est marqué par l'apparition de l'extrémité de la 1^{ère} feuille de la talle latérale puis d'autres talles naissent successivement, formant un plateau du tallage situé juste au niveau du sol. Le fin tallage est celle de la fin de la période végétative, elle marque le début de la phase reproductrice (Hadria.,2006).

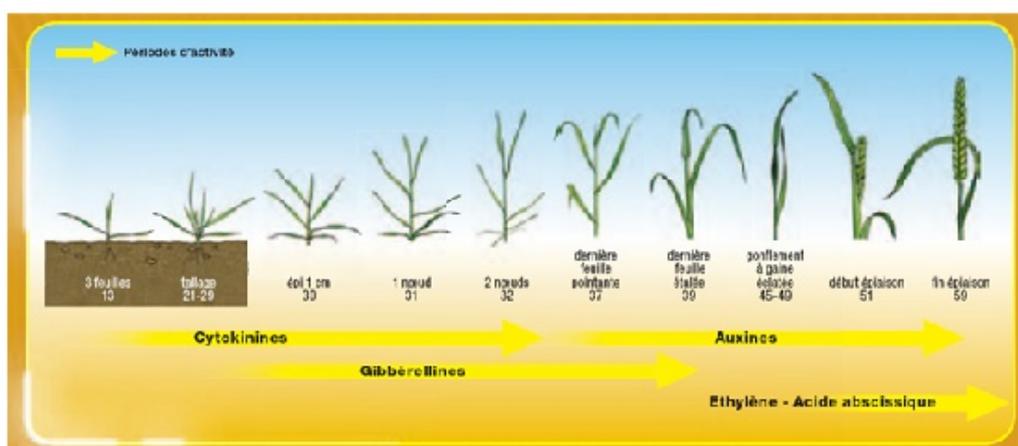


Figure09 : Le cycle de développement des céréales (www.agro.basf.fr)

▪ La période reproductive

- ❖ **La montaison:** ce stade est repérable une fois l'ébauche de l'épi du brin maître, atteint 1cm de hauteur. Cette phase s'achève une fois l'épi prend sa forme définitive à l'intérieur de la gaine de la feuille étendard qui gonfle (stade gonflement) (**Giban et al.,2003**).
- ❖ **L'épiaison:** est la période allant de l'apparition des premiers épis jusqu'à la sortie complète de tous les épis hors de la gaine de la dernière feuille (**Giban et al.,2003**).
- ❖ **La floraison:** est la sortie des premières étamines hors des épillets au milieu de l'épi sur 50% des épis la formation du grain se fait quand les grains du tiers moyen de l'épi parviennent à la moitié de leur développement. Ils se développent en deux stades:
 - Le stade laiteux où le grain vert clair, d'un contenu laiteux atteint cette dimension définitive; (le grain contient encore 50% d'humidité et le stockage des protéines touche à sa fin)
 - Le stade pâteux où le grain, d'un vert jaune, s'écrase facilement. (le grain a perdu son humidité et l'amidon a été constitué).
- ❖ **La maturité complète:** la teneur en humidité atteint environ 20%; le grain est mûr et prêt à être récolté, c'est alors la période des moissons.

1-4-Usages et l'importance d'orge

Au début du XIXe siècle, l'orge venait en tête des cultures par son importance, elle était destinée à l'autoconsommation humaine et servait de complément fourrager aux troupeaux entretenus pendant la plus grande partie de l'année dans les régions steppiques (**Hakimi.,1993**). Actuellement, l'orge n'est pas d'emploi courant dans l'alimentation humaine.

Maintenant admis que l'orge est efficace contre les maladies du cœur, la constipation et autres dérèglements du système digestif, et probablement également contre le cancer. La façon dont l'orge réduit le taux sanguin de cholestérol est semblable à celle des spécialités pharmaceutiques anti cholestérol (**Houmani.,2007**).

1-4-1-Production nationale

La culture de l'orge est pratiquée essentiellement sur les hautes plaines, en Algérie. Les superficies qui lui sont consacrées varient d'une année à l'autre avec une moyenne, sur plus d'un siècle (1901-2005), de 1 million d'hectares, une production moyenne variant de 3 à 16 millions quintaux et une moyenne de rendement en grain de 7q/ha. Parmi les pays du Maghreb, l'Algérie se classe en seconde position après le Maroc, qui produit plus de 16 millions de quintaux en moyenne (**Faostat, 2008**).

L'orge est une espèce très adaptée aux systèmes de cultures pratiqués en zones sèches. Cette adaptation est liée à un cycle de développement plus court et à une meilleure vitesse de croissance en début du cycle (**Abbas et Abdelguerfi, 2008**).

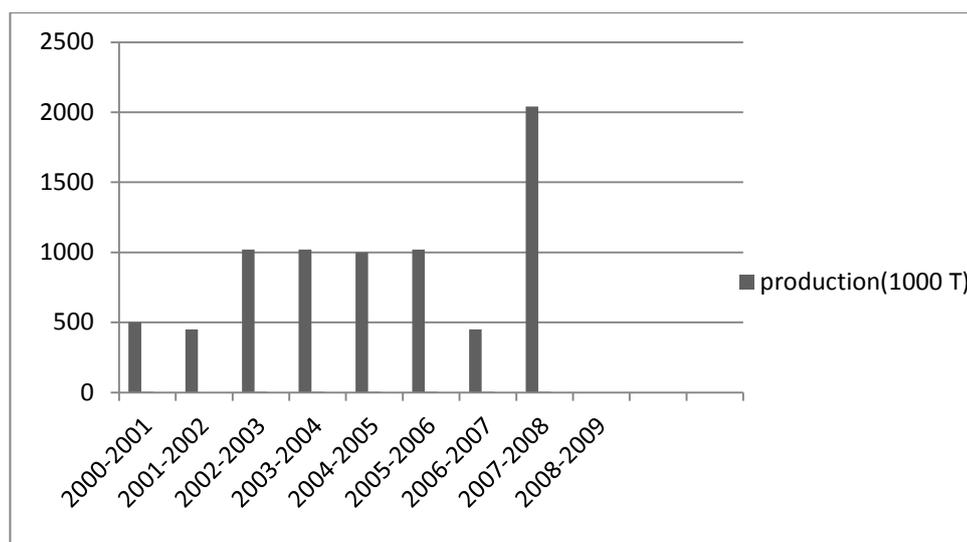


Figure 10: Production nationale d'orge entre 2000 et 2009.

La figure 10 montre que la production d'orge a connu une évolution remarquable en 2009 par rapport à l'an 2000, en passant de 574700 T à 2203400 T.

1-5- Biochimie des céréales

On a deux phases de métabolisme au niveau des céréales : le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire à l'issue desquels résultent des groupes moléculaires différents (**Kumar P.,2011**).

1-5-1-Molécules issues du métabolisme primaire

Il s'agit des : **glucides, lipides et protides**, (**Jeantet et al.,2007**).

- **Les glucides**

Les glucides ou source se présentent sous la forme de quelques sources simples, mais surtout de composés plus ou moins complexes de ces mêmes sucres simple tels que le glucose et le pentose .Le plus important est l'amidon qui est la substance énergétique par excellence, facilement digestible ,et la cellulose qui est un glucide complexe .

- **Les protides et les protéines**

Ce sont des composés azotés que l'on rencontre sous forme simple (acide aminés) et sous forme plus complexe (protéines). La teneur en protéines des céréales varie suivant les espèces, 12% pour le blé ,11%pour l'orge et seulement 10%pour maïs. Certains de ces acides aminés, telle la lysine, sont indispensables pour l'alimentation humaine et animale (substance nécessaire à la croissance).

- **Les lipides**

Ce sont les matières grasses .Dans les céréales elles sont fortement concentrées dans le germe.

1-5-2 –Molécules issues du métabolisme secondaire

Il s'agit des composés phénoliques qui correspondent à un vaste ensemble de molécules ayant en commun un noyau benzénique portant un ou plusieurs hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction. Ces molécules sont spécifiques des végétaux et notamment des angiospermes.

Les composés phénoliques interviennent dans différents aspects de la vie de la plante .Ils sont impliqués dans la physiologie de la plante (lignification, interactions symbiotiques.....), et dans ses mécanismes de défense (interactions biotiques et abiotiques).

Ils sont particulièrement intéressants par leur propriété antioxydant (**macheix et al.,2005**).

1-6-Description

1-6-1-Graine

Le grain d'orge est composé de plusieurs parties : les enveloppes organisées en plusieurs assises (testa, péricarpe, glumelles), l'embryon, la couche à aleurone et l'albumen amylicé.

➤ **Les glumelles**

Les glumelles constituent l'enveloppe externe du grain d'orge et représentent environ 10 % de son poids sec. On distingue les glumelles dorsales (lemma) des ventrales (palea). Les glumelles sont principalement formées de cellulose (20 %), d'hémicellulose (30-45 %) et de lignine (10-20 %) (**Höije et al. 2005**).

➤ **Le péricarpe**

Le péricarpe est composé de plusieurs types de cellules qui se situent entre les glumelles et la testa.

Il est séparé des glumelles par une couche protectrice cuticularisée appelée épicarpe et est soudé à la testa (aussi appelé tégument séminal) (**Freeman et Palmer 1984**). Cette couche agit comme une membrane semi-perméable permettant les échanges gazeux Sur sa face externe, le péricarpe est formé de l'hypoderme et sur sa face interne, de cellules croisées de forme rectangulaire et situées près de la testa.

La testa est entourée de deux zones cuticulaires, la plus interne issue du tissu nucellaire étant plus fine que la plus externe qui est issue des cellules de la testa (**Briggs 1998**).

➤ L'embryon

Situé dans la partie dorsale de la graine, les deux composants majeurs de l'embryon sont l'axe embryonnaire qui formera la plantule au cours de la germination et le scutellum qui aura un rôle dans la synthèse d'enzymes et le transfert des nutriments de l'albumen vers l'embryon lors du développement du grain.

A maturité l'embryon se divise en trois régions : la tige (coléoptile), le mésocotyle et les racicules enveloppées dans le coléorhize. La mésocotyle et l'axe embryonnaire se trouvent entre le coléoptyle et les racicules (**Briggs 1998**).

➤ L'albumen

L'albumen est le tissu de réserve de l'orge, il contient des grains d'amidon, des protéines de réserve, des lipides et des polysaccharides pariétaux. L'albumen est composé de la couche à aleurone et de l'albumen amylicé (**Fincher and Stone 1986; Jadhav et al. 1998; Sullivan et al. 2010**).

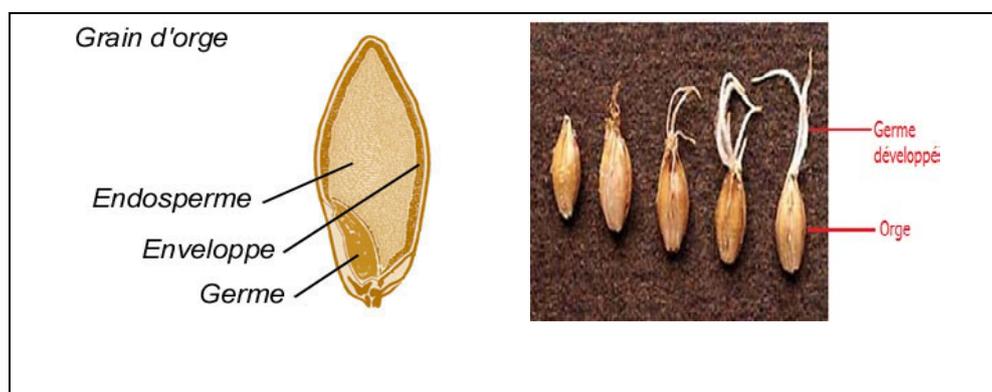


Figure 11: les principales parties d'orge

1-6-1-1-Composition chimique des grains d'orge :

Tableau 02 : composition chimique moyenne d'orge (d'après CETIOM et enquêtes ITCF-ONIC, 2010).(% DE LA MS).

Amidon	60
Cellulose	5.0
Protéines	11
Matières grasses	2.5

1-6-2- Les feuilles : (herbe d'orge)

L'herbe d'orge est, récolté avant la phase de floraison quand il atteint 20-38cm. Cette plante a une grande valeur nutritionnelle. Il est très riche en flavonoïdes et en composés phénoliques et également, la saponarine et lutonarine (Holtekjflen et al.,2006).

1-6-3-Les principaux composés phénoliques présents chez l'orge :

Tableau 03 : Les composés phénoliques rapportés chez l'orge.

	Composés phénolique	Référence
Grain d'orge	Acides phénoliques	
	p-Hydroxybenzoïques	Suba et al,2002
	Protocatéchique	Mattila et al,2005
	Salicylique	Kim et al,2006
	Vanillique	Zhou et al 2004
	Férulique	Andreasen et al,2000
	Caféique	Suba et al,2002
	Syringique	McDonough et al,2000
	o-coumarique	Mazza et Gao,2005
	m-coumarique	Mazza et Gao,2005
	p-coumarique	Kim et al,2006
	Sinapique	Zhou et al 2004
	Flavonoïdes	
	Cyanidine	Mazza et Gao,2005
	Cyanidine-3-galactoside	Abdel-Aal & Hul,2003
	Delphinidine	Mazza & Gao,2005
	Pelargonidine	Awika et al,2004
	Peonidine-3-glucoside	Mazza & Gao,2005
	Catéchine	
	Leucocyanidine	
Leucodelphenidine		
Chrysoeriol		
Procyanidine B-3	Holtekjolen et al ,2006	
Feuille d'orge	Apigenine	Peterson,2001
	Lutéoline	
	Lutonarine	
	Saponarine	
	Kaempférol	
Quercétine		

Chapitre 3

Propriétés biologique de l'orge

Introduction

Peu de substances dans la nature surpassent toutes les autres pour les possibilités qu'elles offrent au niveau de la santé.

Les céréales complètes renferment de nombreux composants utiles à la santé, notamment des fibres alimentaires, de l'amidon, des acides gras essentiels, des anti-oxydants, des vitamines, des minéraux, des lignanes et des composés phénoliques dont l'effet a pu être mis en relation avec une réduction des risques de maladies cardiaques, de cancer, de diabète et d'autres affections chroniques. Récemment toutefois, on s'est de nouveau intéressés à l'orge comme céréale pour l'alimentation humaine, car les consommateurs sont plus conscients de l'importance d'une bonne nutrition et recherchent davantage les aliments et les ingrédients alimentaires riches en fibres (**Izydorczyk et Dexter, 2008**).

1-Importance des grains :

L'orge est l'un des grains dans le régime alimentaire d'un grand nombre de la population du monde, et peut donc jouer un rôle important dans la qualité de la nutrition et de l'alimentation et la santé humaine.

-1-Les affections cardiaques

La recherche a démontré l'existence d'un lien entre la consommation de céréales complètes dans le cadre d'un régime pauvre en graisses et la diminution du risque d'affections cardiaques. Les études effectuées ont montré de manière cohérente que le risque d'événements cardio-vasculaires, chez les personnes qui consomment au moins trois fois par jour des aliments à base de céréales complètes, est de 20 à 30 % inférieur à celui auquel se trouvent exposées les personnes qui en consomment moins. Ce niveau de protection, que l'on n'observe pas dans le cas de la consommation de céréales raffinées, est encore supérieur à celui constaté pour les fruits et légumes (**Jacobs DR et al.,2007**).

Concernant les mécanismes de cet effet protecteur, un certain nombre d'hypothèses ont été avancées, qui ne sont pas encore totalement étayées. On estime que les composants de certaines céréales complètes, à savoir les fibres solubles, le bêta-glucane, l'alpha-tocotriénole et le rapport arginine-lysine, jouent un rôle dans la réduction du cholestérol sanguin.

Les céréales complètes pourraient diminuer le risque de maladie cardiaque grâce à leur teneur en anti-oxydants. Le stress oxydatif et l'état inflammatoire étant des facteurs pathologiques prédominants de plusieurs affections majeures, on a pu évoquer l'hypothèse selon laquelle la diversité des composés phyto-chimiques relevés dans les céréales complètes inhiberait directement ou indirectement ces deux facteurs.

Des études épidémiologiques, *in vitro* et animales ont indiqué que les flavonoïdes ont des effets bénéfiques sur les paramètres associés à l'athérosclérose, y compris l'oxydation des lipoprotéines, l'agrégation des plaquettes du sang, et la réactivité vasculaire (**Mladenka et al., 2010**).

L'effet cardioprotecteur de flavonoïdes peut être attribuée à leurs propriétés antioxydants, anti thrombogène, anti- inflammatoire, et hypolipidémique propriétés, et les apports élevés flavonoïdes sont jouer un rôle clé dans la réduction du risque de développer des maladies cardiovasculaires (**Velayutham et al., 2008**).

1-2-Le cancer

Des études réalisées au cours des dernières années ont prouvé l'existence d'agents anticancérigènes dans le secteur du houblon, des composés phénoliques en particulier.

Les flavonoïdes sont capables d'inhiber la prolifération des cellules tumorales, pour arrêter la croissance de la tumeur et à participer activement à inhiber la carcinogenèse dans les phases initiales, de promotion, et à la fin de la prolifération cellulaire.

Activités anticancérigènes de flavonoïdes ont été attribués à une grande variété de mécanismes, en particulier l'inhibition de la métabolique activation des procarcinogènes, et l'induction d'enzymes de détoxification carcinogène.

Dans le stade avancé des tumeurs, les flavonoïdes sont capables de supprimer le processus en inhibant la synthèse de l'ADN, inhibant induire l'apoptose et l'angiogenèse des cellules tumorales (**Gerhauser, 2005; Ramos., 2008**).

L'attention a été concentrée en particulier sur prénylflavonoïdes qui ont activités anticancérigènes forte et à large spectre (**Gerhauser., 2005**).

D'autres flavonoïdes, on peut citer quercétine et myricétine (**Araujo et al., 2011**). Quercétine particulier, est un composé avec des propriétés anticancéreuses, y compris le cycle

cellulaire la réglementation, l'inversion de la multirésistance et l'induction de tumeurs l'apoptose des cellules (**Thangasamy et al., 2008**).

Kaempférol a été également rapporté à inhiber la croissance des cellules cancéreuses et l'angiogénèse et pour induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses (**Chen et Chen., 2013**).

1-3-Le diabète

Des études épidémiologiques capitales montrent qu'une consommation plus importante de céréales complètes ou de fibres de céréales entraîne une diminution de 20 à 30 % du risque de développement d'un diabète de type

Les flavonoïdes présentent des activités antidiabétiques par inhibition de α -glucosidase (**Liu et al., 2014**), une enzyme qui contrôle le postprandial niveau de glucose dans le sang, empêchant ainsi l'absorption du glucose en excès l'intestin grêle et faciliter l'hyperglycémie.

Ils ont pour potentiel utiliser dans le traitement du diabète de type 2 (**Havsteen., 2002**).

Le diabète sucré est reliée avec une autre enzyme, appelé aldose-réductase, ce qui réduit l'excès de D-glucose en D-sorbitol. Aldose réductase est une enzyme clé dans la voie des polyols (sorbitol aldose reductase voie) qui joue un rôle important dans le développement de dégénérescence les complications du diabète, en particulier dans les lésions microvasculaires à la rétine, les reins et les nerfs.

Mok et Lee enquête (2013), le une activité inhibitrice de la flavonols de houblon kaempférol, quercétine et myricétine contre aldose réductase del'objectif de rat (**Mok et Lee.,2013**).

2-Importance de l'herbe d'orge (feuilles d'orge)

L'étude faite sur les jeunes feuilles d'orge a montré que ces feuilles contiennent un niveau élevé de composés antioxydants: la saponarine et lutonarine qui sont des flavonoïdes (**Holtekjflen et al., 2006**). Ces flavonoïdes (Polyphénols) ont une propriété préventive de certaines maladies, et des études variées sur des animaux ont montré que les feuilles d'orge possèdent des propriétés chimiques bioactives très bénéfiques pour la santé : antiulcère, antioxydant, hypolipidémique, antidépresseur, et un antidiabétique potentiel (**Besançon, P. 2000**).

2-1 Cancer

La nutrition joue un rôle important dans la prévention du cancer. Les fibres alimentaires dans l'herbe d'orge comme la chlorophylle et les composés phénoliques spécialement les flavonoïdes sont importants grâce à leurs propriétés anti oxydantes.

L'herbe d'orge contient de sélénium qui a une activité anticancéreuse. Il renforce le système immunitaire et réduit le risque de cancer.

Il contient au moins 13 vitamines (dont plusieurs sont antioxydants) comme B12,acide abscisique, superoxyde dismutase (SOD), cytochrome oxydase ...etc.

2-2 Anémie

L'herbe d'orge est riche en chlorophylle qui est une fibre alimentaire très important.

La chlorophylle a la propriété de détruire les germes, est une source importante de magnésium et agit sur l'anémie aussi vite que le fer.

De plus, la formation du sang dépend de la chlorophylle et a également grandement besoin de vitamines K, C, B12, acide folique et pyridoxine qui sont tous présents dans l'herbe d'orge. (**De vogel J et al, 2005**).

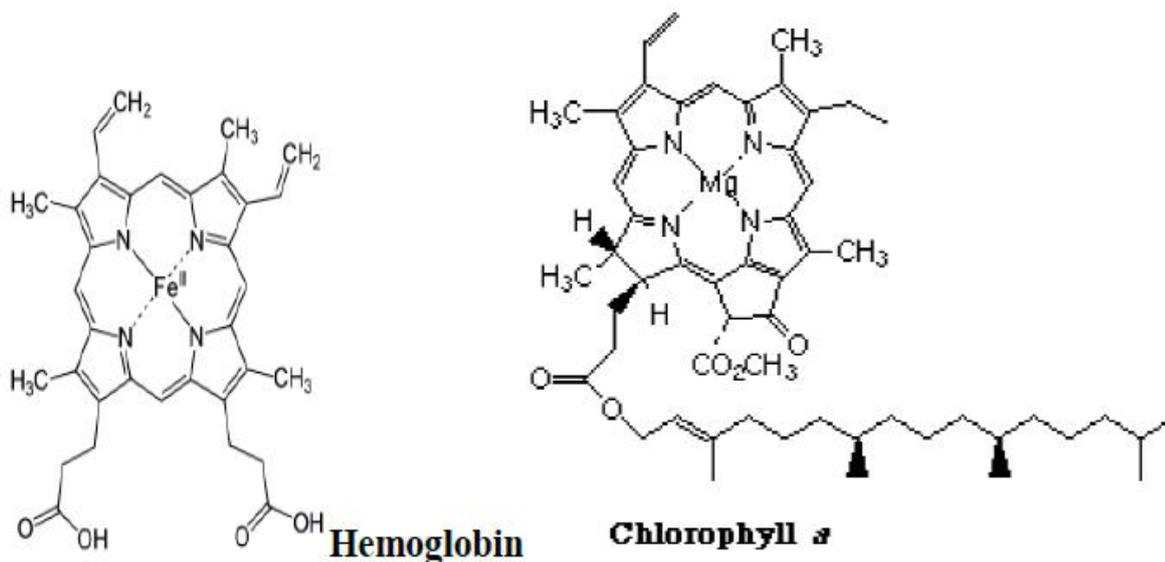


Figure 13 : Structure de l'hémoglobine et la chlorophylle.

2-3-Le jus d'herbe d'orge

L'extrait d'orge en herbe a une activité anti-oxydant et anti-inflammatoire, soutient le système immunitaire rétablit à équilibre acido-basique des liquides physiologiques.

les feuilles d'orge est d'une richesse tout à fait exceptionnelle en minéraux comme le fer, le magnésium, le zinc, le cuivre, le manganèse et le potassium ,ces minéraux tampons neutralisent les matières acides et peuvent aider à conserver un équilibre sain entre acidité et alcalinité ; ainsi, bien sûr, qu'en vitamines et en enzymes (C, E B6, B12, acide folique, bêta-carotène, SOD).

Les protéines des feuilles d'orge en herbe sont des polypeptides et donc sont directement absorbés par le sang favorisant ainsi le métabolisme des cellules.

L'orge en herbe est considérée comme la plus nutritive des graminées vertes.

2-3-1Quelques exemples de produits à base d'orge en herbe

DÉTOX	AIM BarleyLief	Poudre d'herbe d'orge
		

Chapitre 4

Le stress oxydatif

1. Mécanisme dégénération des radicaux libres

L'**oxygène** est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant de la matière organique. Mais nos cellules convertissent une partie de cet oxygène en métabolites toxiques: les radicaux libres organiques (Descheemaeker., 2004).

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un électron célibataire (ou électron non apparié) sur leur couche externe (Toussaint., 2008). Leur principal danger vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants tels que l'ADN ou la membrane cellulaire, avec risque de multiplication anormale des cellules, entraînant un dysfonctionnement ou une mort cellulaire, un cancer (Tanguy et *al.*, 2009).

Tableau 04 : Origine des radicaux libres (Mandelker L, 2008)

L'origine des radicaux libre	
Endogènes	Exogènes
NADPH oxydase, Chaîne respiratoire mitochondriale, Peroxysomes, Cytochrome P ₄₅₀ , Xanthine oxydase, Cyclo-oxygénases,	Toxiques environnementaux, Radiation ionisantes et UV, Champs électriques, Xénobiotiques pro-oxydants, Cytokines

Les radicaux libres peuvent se former lorsque l'oxygène interagit avec certaines molécules. Très instables, ils réagissent rapidement avec les autres composants, essayant de capturer l'électron qui leur est nécessaire pour acquérir de la stabilité. Une réaction en chaîne débute lorsqu'ils attaquent la molécule sradicaux libres table la plus proche en lui «volant» son électron, la transformant elle-même en radical libre (Tanguy et *al.*, 2009). Les radicaux libres sont piégés par des composés facilement oxydables (Toussaint, 2008).

L'augmentation de la production des radicaux libres entrainant le stress oxydatif (Céline C, 2004).

2-Définition de stress oxydant

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est conséquence d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres et la destruction par des systèmes de défenses antioxydants.

Les radicaux libres peuvent engendrer des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles : protéines, lipides et acides nucléiques. Les radicaux libres sont une forme particulière d'espèces chimique (atomes ou molécules) qui possèdent un électron célibataire (ou non apparié) (Angelos et al., 2005).

3-Les maladies liées au stress oxydant

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, car le vieillissement diminue les défenses anti-oxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux.

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aiguë, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré.

Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies multifactorielles tel que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et maladies cardiovasculaires (Favier, 2003).

4- Les antioxydants

Les antioxydants sont des molécules capables d'interagir sans danger avec les radicaux libres et mettre fin à la réaction en chaîne avant que les molécules vitales ne soient endommagées. Chaque molécule antioxydante ne peut réagir qu'avec un seul radical libre, et par conséquent, il faut constamment refaire le plein de ressources anti-oxydantes. (Kristina P. et Marika., 2003).

5-Systèmes de défenses antioxydants

L'organisme est déterminé d'un ensemble de systèmes de défenses antioxydants très efficaces afin de diminuer la concentration des espèces oxydants dans l'organisme. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques (figure 14)

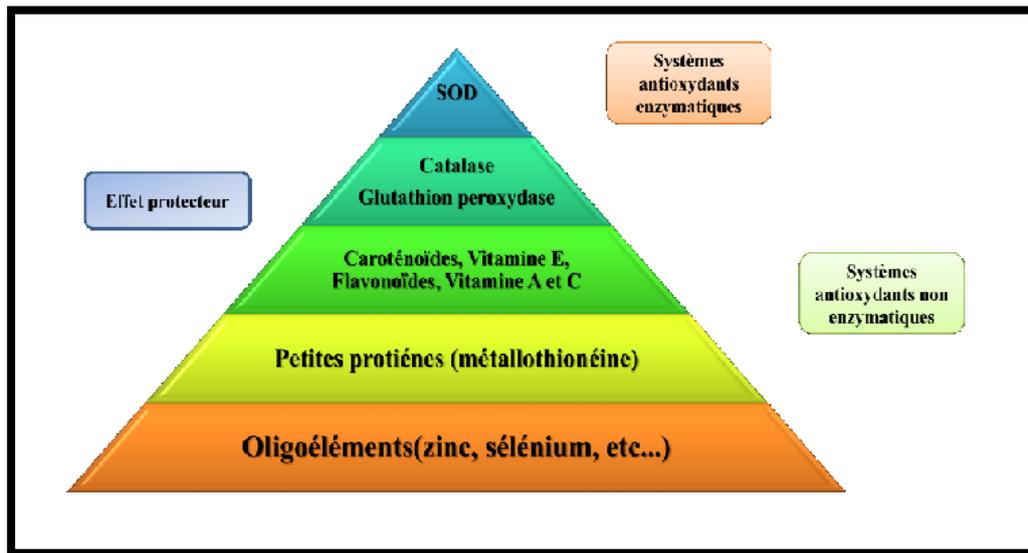


Figure 14 : Pyramide des systèmes de défenses antioxydants (Droge W. 2002)

5.1-Systèmes antioxydants enzymatiques :

Les principaux systèmes enzymatiques antioxydants les plus efficaces chez les mammifères ainsi que chez les plantes sont la superoxyde dismutase, la catalase et le glutathion peroxydase (Sharma P. et al., 2012).

5.1.1-La superoxyde dismutase

La SOD, est une métalloprotéine capable d'éliminer l'anion superoxyde, par une action de dismutation. Cette réaction aboutit, à partir de deux superoxydes, à la formation d'une molécule d'oxygène et d'une molécule de peroxyde d'hydrogène (Garrel. et al., 2007). Selon la réaction suivante :

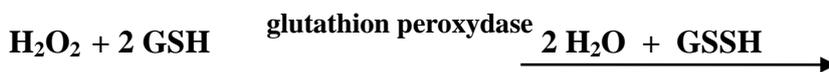


5.1.2-La glutathion peroxydase

La glutathion peroxydase (GSH- Px) est une enzyme formée de quatre sous-unités contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélénocystéine.

La GSH- Px a un rôle important dans la réduction du H₂O₂ en présence de glutathion réduit (GSH) et protège ainsi les membranes et les protéines cellulaires contre le stress oxydatif (Schrader.et al.,2006).

Cette enzyme a un rôle clé dans les systèmes de défense enzymatiques et réduit les peroxydes organiques en leurs alcools correspondants (Valko. et al., 2007).



5.1.3-La catalase

La catalase (CAT) est une enzyme responsable de la détoxification du peroxyde d'hydrogène produit dans les conditions physiologiques. La catalase est une enzyme extrêmement active, une seule molécule de cette enzyme est capable de décomposer plusieurs millions de molécules de peroxyde par minute (Nancy. et al.,2006). La catalase est surtout active lorsque le niveau du stress oxydant est élevé ou que la quantité de la glutathion peroxydase est limitée et elle joue un rôle significatif dans le développement d'une tolérance au stress oxydatif dans la réponse adaptative des cellules (Niki.et al.,2007).



5.2-Le système antioxydant non enzymatique

Contrairement aux enzymes antioxydants, la plupart de ces composés ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons, le glutathion réduit (GSH), les vitamines E et C et les polyphénols (Kanoun K., 2011).

5.2.1- La vitamine C ou acide ascorbique:

C'est un puissant réducteur. Il joue un rôle important dans la régénération de vitamine E (Diallo,2005).

5.2.2- La vitamine E ou tocophérol:

Prévient la peroxydation des lipides membranaires in vivo en capturant les radicaux peroxy. (Diallo,2005).

5.2.3-Les catéchine

Les catéchine sont des molécules polyphénoliques hydrosolubles, composées d'au moins un groupement phénolique. Elles sont abondantes dans certaines plantes, particulièrement dans les feuilles de thé et dans la vin. Elles ont la capacité de piéger les ions superoxydes O_2^- , et l'oxygène singulet 1O_2 , O_2° étant directement réduit en H_2O_2 .

5.2.4-Le glutathion réduit (GSH)

Le glutathion réduit (GSH) est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine) connu par son puissant pouvoir antioxydant (Douris.et al.,2009). C'est l'antioxydant le plus important dans le contrôle du redox, et qui protège non seulement contre les radicaux libres, mais aussi contre les peroxydes (Tange. et al.,2006).

6- Les différentes localisations cellulaires des antioxydants

Les antioxydants peuvent être classés en molécules liposolubles ou hydrosolubles. Selon Leurs caractéristiques physico-chimiques, ils auront une localisation cellulaire préférentielle :

- les membranes cellulaires pour les substances liposolubles et le cytosol
- Le milieu extracellulaire pour les substances hydrosolubles. Ils seront particulièrement efficaces sur les radicaux libres présents dans chaque type de milieu, respectivement (Fig.16)

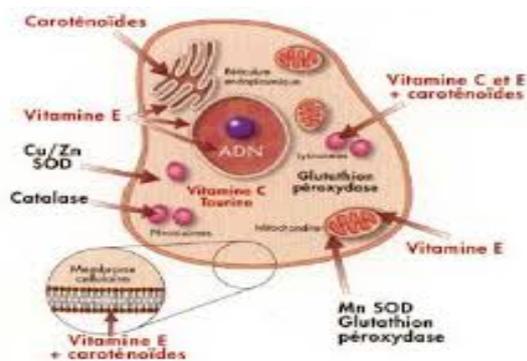


Figure 15 : Sites d'action des nutriments antioxydants (en rouge) et des enzymes Antioxydantes(en noir) (Opara, 2002).

7-Mécanismes d'actions des antioxydants:

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers,incluant le captage de l'oxygène singulet, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente,la réduction de radicaux ou de peroxydes,la chélation des métaux de transition (Diallo,2005).

8- Propriétés antioxydants des flavonoïdes :

Parmi les antioxydants secondaires obtenus à partir de l'alimentation on a les polyphénols et plus particulièrement les flavonoïdes.

Les activités anti-oxydantes des flavonoïdes sont déterminées par leur structure chimique, en particulier l'état d'hydroxylation aromatique de leurs anneaux. Il a été démontré que l'activité antioxydant est en relation avec les flavonoïdes contenant un cycle phénol B. Les groupes hydroxyle en C3' et C4' positions sur le squelette flavane sont les principaux déterminants structurels des activités antioxydants des flavonoïdes. Puis les groupes hydroxyle en positions C3 et C5, ainsi que le groupe carbonyle en C4 (Karabin M et al., 2015).

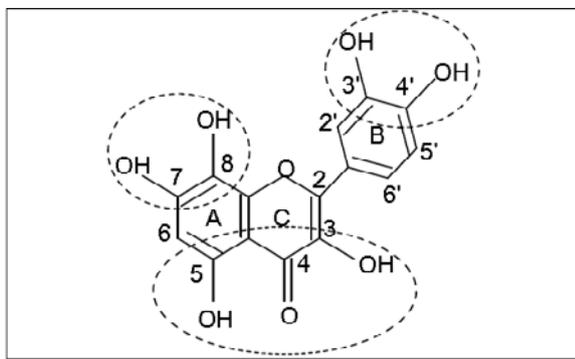


Figure 16 : Caractéristiques structurales des flavonoïdes avec une activité de piégeage des radicaux libre (Zeghad N et Merghem R., 2013).

Les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux flavoxy les moins réactifs, cette capacité peut être expliquée par leur propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle selon la réaction représentée ci-dessous:



Cette réaction de piégeage donne une molécule stable (RH) et un radical flavoxy (FLO•) ce dernier va subir un changement de structure par résonance ; redistribution des électrons impaires sur le noyau aromatique pour donner des molécules de faible réactivité par rapport aux R•; en outre les radicaux flavoxyles peuvent interagir entre eux pour former des composés non réactifs (Amić et al., 2003).



Chapitre 5

Matériel et méthodes

Matériels et méthodes

Nous avons réalisé ce travail au niveau du laboratoire de Biologie Micromoléculaire et phytochimie à l'Université Frère Mentouri Constantine.

1- Matériel Végétal:

Le matériel végétal utilisé dans notre étude consiste en deux variétés d'orge (Saïda et Barberousse)

Nous avons semé les graines de deux variétés le 09 mars 2016, dans des pots rectangulaires installés dans la serre au Biopol Chaabet Erssas, Université Mentouri Constantine (figure17, A).

L'arrosage est entrepris régulièrement à raison de deux fois par semaine jusqu'à ce que les plantes atteignent une hauteur de 20 cm (figure 17, B).

Le 13 avril 2016 nous avons procédé à la récolte qui consiste à couper toute la partie arienne de la variété Saïda et le 14 avril 2016 nous avons procédé à la récolte de la 2^{ème} variété Barberousse et on laisse sécher à l'aire libre (figure 17, C), puis broyer à l'aide d'un mortier jusqu'à l'obtention d'une poudre fine.

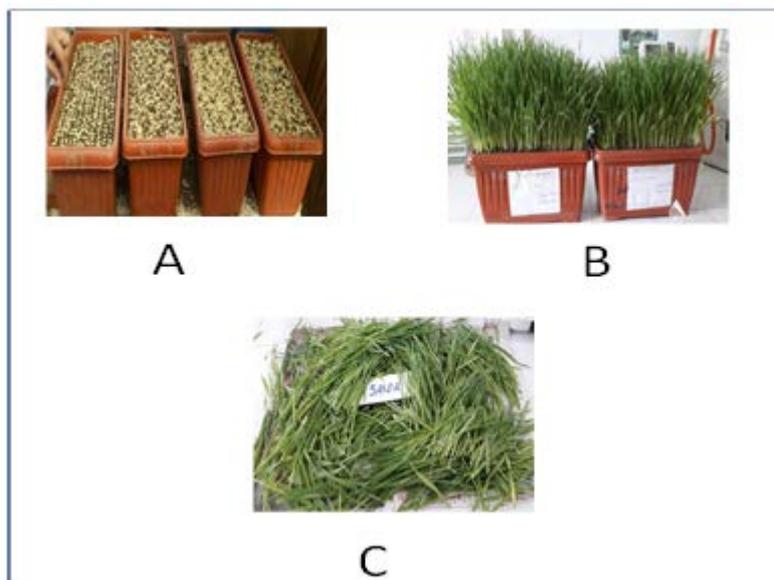


Figure 17: Les différentes étapes pour l'obtention de poudre végétale étudiée.

2- Extraction:

2-1-Extraction solide-liquide

Dans notre étude nous avons appliqué deux méthodes d'extraction solide-liquide.

-Extraction par macération

La macération est une technique qui consiste à laisser le matériel végétal en contact prolongé avec un solvant, pour extraire les principes actifs comme les composés phénolique.

La solution éthanoïque d'extraction (éthanol/eau: 50/50) est préparée. Pour les céréales, il est préféré l'éthanol pour la macération (Yu et al, 2002), ou éthanol-eau avec différentes proportion (Pathirina, 2003).

Protocole d'extraction

20 g de feuille de deux variétés d'orge qui déjà broyé a été mise à macérer dans un mélange hydro alcoolique d'éthanol-eau distillé (50/50) cette macération est répétée 2 fois en renouvelant le solvant chaque 24H. En suit le mélange est filtrer sur un papier filtre. Les filtrats obtenus sont évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif.

- Extraction au soxhlet

L'extraction alcoolique de feuille d'orge a été préparée à l'aide d'un soxhlet

Après la récolte, le matériel végétal est coupé en petits morceaux ensuite broyé à l'aide d'un mortier puis pesé 1g de feuilles de deux variétés d'orge, sont extraits dans un solvant alcoolique (500ml du éthanol), le matériel végétal est placé dans une cartouche qui sera exposée au solvant d'extraction à une température d'évaporation, après environ 2h d'extraction la cartouche est retirer et solvant chargé d'extrait de la variété est récupéré pour être évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif.

2-2-Chromatographie de partage (partitions entre solvants)

Pour avoir les différentes phases (fractions). Les extraits bruts ainsi obtenus sont soumis à plusieurs affrontements par divers solvants organiques allant du moins polaire au plus polaire pour séparer les polyphénols selon leur structure et leur degré de polymérisation

-**Affrontement avec éther de pétrole:** élimine les pigments chlorophylliens, caroténoïdes et les lipides; tous composés non phénoliques.

- **Affrontement avec éther diéthylique:** solvant préférentiel des composés simples tels que les acides phénols et les flavonoïdes.
- **Affrontement avec acétate d'éthyle:** cette extraction entraîne les mono-o-glucosides et partiellement les di-o-glucosides.
- **Affrontement avec méthyle -Ethyle -Cétone (butanone):** ce solvant va entraîner essentiellement le reste des di-o-glycosides, les tri-o-glycosides et les c-glycosides.

Ces affrontements se font dans des ampoules à décanter. On verse 150ml de l'extrait et on ajoute 100 ml de solvant. La phase aqueuse et le solvant (V/V) sont mélangés énergiquement en laissant sortir à chaque fois les gaz des produits.

Après un repos d'une heure, on récupère séparément le solvant utilisé chargé de ses composés spécifiques (en haut) et la phase eau (en bas).

Les phases éther de pétrole ne contenant pas de composés phénoliques sont rejetées.

Les deux phases acétate d'éthyle, MEC ont été évaporées à l'aide du rotavapeur, la phase éther diéthylique a été évaporée à l'air libre. Chaque phase a été reprise dans du méthanol (4 à 5 ml) pour l'étude phytochimique.

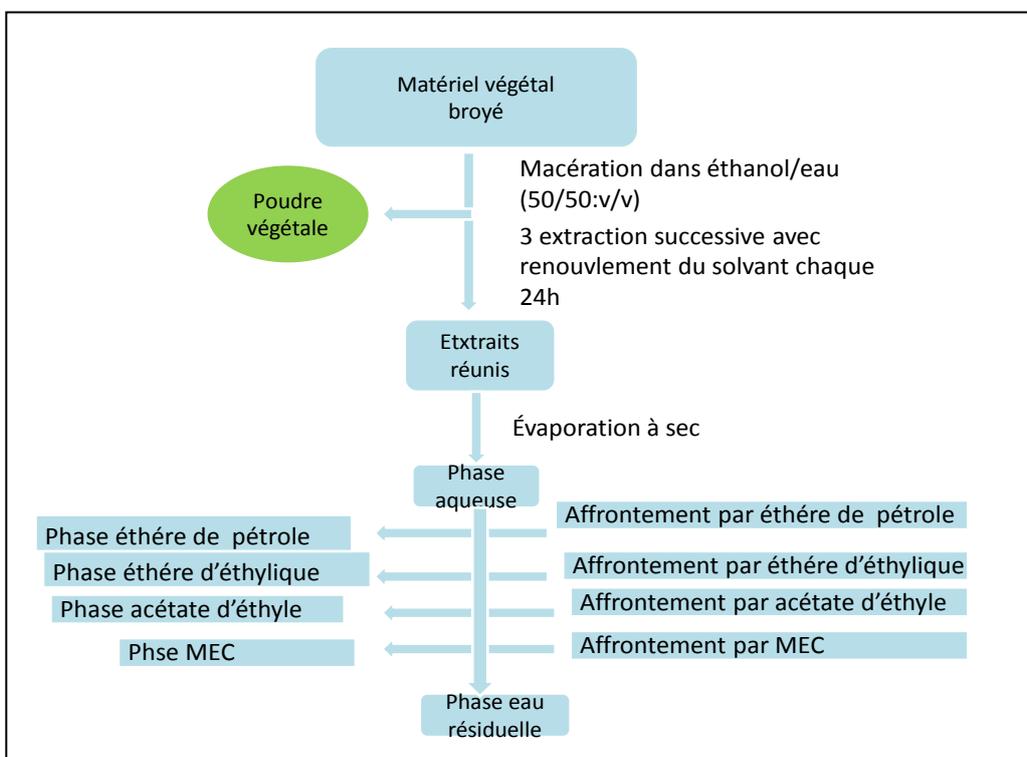


Figure 18 : L'extraction des polyphénols (Merghem, 2003).

3-Aspect quantitatif

3-1-Dosage des composés phénoliques totaux

Parmi les méthodes de quantification phénolique, la méthode la plus utilisée préférentiellement un protocole utilisant le réactif de folin-ciocalteu.

a. Principe

Le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW 12040) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo 12040). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Boizot et Charpentier, 2006).

b. Protocole

Le dosage des phénols totaux s'effectue par le Folin-ciocalteu selon la méthode de Zhu K.X 2011:

-1ml d'extrait

-5ml de réactif de folin –ciocalteu (dilué 10 fois)

-Après 10minutes, 2ml de carbonate de sodium (Na₂CO₃) (20% Na₂CO₃)

-Après 30 minutes d'incubation à une température ambiante, l'absorbance du mélange est lue à 765nm avec un spectrophotomètre UV.

La courbe d'étalonnage est effectuée par une solution mère de l'acide gallique (0.2g/l)

A différentes concentrations : 100% 80% 60 %40% 20%, dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage.

4-Aspect qualitatif:

4-1-Chromatographie analytique sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une méthode simple est rapide, utilisée pour la séparation, l'identification et éventuellement le dosage des constituants chimique dans des mélange complexe.

4-1-1- Principe de la CCM

La séparation des constituants du dépôt se fait dans une cuve ; c'est un récipient en verre à l'aide de deux phases :

- La phase mobile : c'est l'éluant. Il est composé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvant.
- Une phase stationnaire: est un adsorbant maintenu sur une plaque de verre.

4-1-2- mode opératoire

a/Préparation de la phase stationnaire:

La chromatographie sur couche mince a été réalisée sur des plaque pré-étalée de gel de polyamide (DC6), ces dernières sont préparées en mélangeant 11g de poudre de polyamide dans 55 ml d'éthanol, après étalement du gel sur des plaque en verre (20 x 20) et séchage, la phase stationnaire sera prête à l'utilisation.

b/Préparation de la phase mobile :

La phase mobile est constituée par un mélange de solvants organiques, Ils excitent plusieurs systèmes solvant utilisés la CCM de gel de polyamide.

Dans notre analyse nous avons utilisé le système suivant:

-Toluène/Méthyléthylcétone/Méthanol/Ether de pétrole: 40/30/30/2

c/Le dépôt :

Le dépôt se fait avec des tubes capillaires en verre à usage unique d'une façon perpendiculaire et linéairement. Chaque phase doit être déposée en solution diluée dans le méthanol, on peut effectuer plusieurs dépôts successifs du même analyse en même endroit, cette pratique permet de concentrer l'analyse (figure 20).

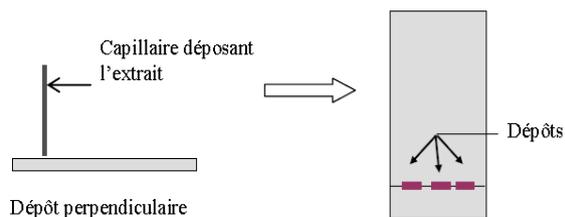


Figure 19 : Mode de dépôt pour une CCM.

Développement:

La plaque est déposée en position verticale ou légèrement inclinée dans la cuve préalablement saturée par les vapeurs du système solvant approprié, l'échantillon à étudier sera plus ou moins entraîné par la progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque.

e/ Visualisation de la plaque :

- à l'œil nu
- la lampe UV (254 / 365) : on place les plaque souq la lampe UV à 365nm : les produits qui absorbent les UV apparaissent sous forme des taches colorées.
- Réactif de Neu : les plaques de CCM sont révélées avec réactif de Neu. Les flavonoïdes apparaissent sous forme des taches fluorescente ; selon la couleur obtenue nous avons identifié le type de flavonoïdes.

4-1-3-identification :

Il existe différentes méthodes d'identification des polyphénols notamment les flavonoïdes, parmi ces méthodes :

a-Facteur de rétention Rf :

Les relations existant entre le Rf (rapport frontal ou facteur de rétention) et la structure des molécules apportaient aussi des renseignements sur la structure des polyphénols séparés par CCM. Le comportement chromatographique en fonction de composition moléculaire dans un solvant alcoolique ou aqueux de mentionner les premières indications concernant la substitution de la molécule. (Tableau 13).

La valeur de Rf est définie comme suit :

$$Rf = \frac{\text{Distance entre l'origine (le dépôt) et la tache du produit H}}{\text{Distance entre l'origine (le dépôt) et le front du solvant h}}$$

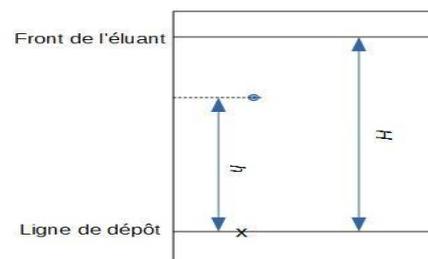


Figure 20 : Le rapport frontal (Rf).

Tableau 05 : Relation entre Rf et la structure (yaou. 2001).

Structure flavoniques	Rf (rapport frontal-facteur de rétention)
Augmentation des OH	Diminution du Rf dans solvant lipophile
Glycosylation	Rf augmente dans un solvant aqueux Rf diminue dans un solvant alcoolique
Hydroxyles méthyles	Rf augmente dans un solvant alcoolique
Méthylation d'un OH en C5	Rf diminue dans un solvant alcoolique
Hétérosides de flavones avec 3-OH libre	Rf nul dans l'eau

b- Structure-fluorescence:

L'examen en lumière ultraviolette est la méthode la plus utilisée pour la détermination de la structure des flavonoïdes, le tableau résume la relation qui peut exister entre la structure d'un composé et sa fluorescence sous UV.

Tableau 06 : La relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes (Lahouel M, 2005).

Spot coloré	Type de flavonoïdes
Noir	Flavonols 5, 6,7 tri OH libres Flavonols 5, 7,8 tri OH libres
Brun –noir	3-OH absent ou 3-OH Substitué
Violet	Flavones 5OH et 4' OH Flavones 3OR et 5 OH, 4'OH Flavones 6ou 8 OH Chalcones, isoflavone, dihydroflavonols, flavonones
Bleu clair (fluorescent)	Flavones sans 5-OH libres Flavonols sans 5-OH libre avec 3 OH substitué
Jaune terne ,jaune ,fluorescence orangée	Flavonols 3-OH libre avec ou 5-OH libre
Jaunevert brillant	5-OH libre ou 5-OH substitué
Jaunefluorescent	Flavonols avec 3-OH libre , aurone, chalcone ,flavanones
Fluorescentpâle	Dihydroflavonols

4-2- La spectrophotométrie UV – Visible :

C'est une technique qui permet de compléter l'information apportée par le comportement chromatographique et fluorescence du produit à identifier.

Le spectre UV- Vis fournissent des informations sur la structure moléculaires, mais sont surtout utilisés pour une confirmation ou une identification grâce à des règles empiriques et à la comparaison avec des spectres de référence.

-Spectres UV –Visible des flavonoïdes:

Dans le méthanol neutre, les flavonoïdes absorbent dans deux régions différentes du spectre ultra-violet, entre 300 et 385 nm (Bande I),et entre 250 et 280(Bande II).

-La Bande I présent un maximum d'absorption entre 300 et 385 nm, elle correspond à l'absorption du système cinnamoyle qui fait intervenir la conjugaison du groupement CO de l'hétérocycle central avec le noyau B.

La Bande II est associée à l'absorption du système benzoyle du noyau A, cette bande permet de connaitre le nombre de substituant du noyau A (Lahoul M et al., 2004).

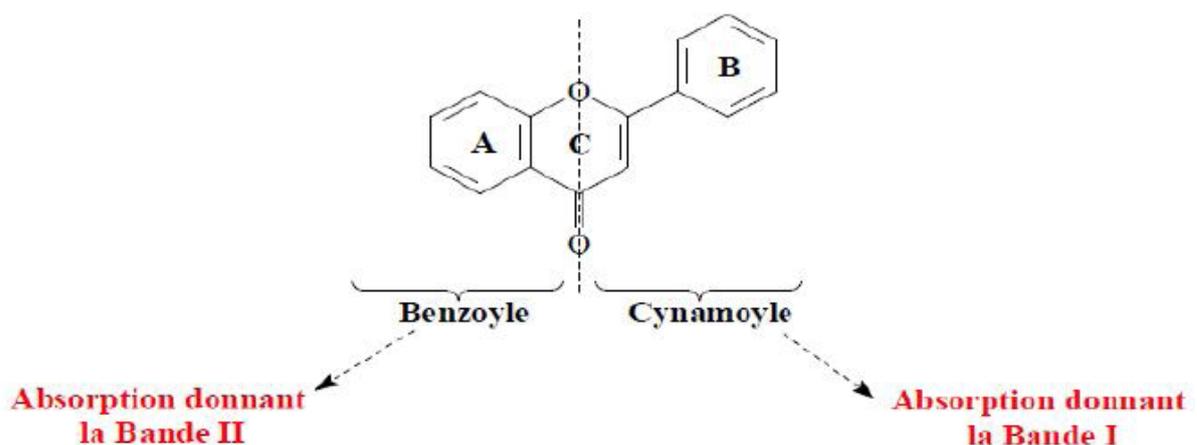


Figure 21: spectre d'absorption d'un flavonoïde (Khelfflah A, 2013)

Tableau 07: Caractéristique des spectres UV-V des flavonoïdes (Markham, 1982).

Bande II	Bande I	Types de flavonoïdes
250-280	310-350	Flavones
250-280	330-360	Flavonols(3 OH substitué)
250-280	350-385	Flavonol (3- OH free)
245-275	310-330 220 pics	Isoflavones Isoflavones (5-deoxy6,7-dioxygenates)
275-295	300-330 Epaulement	Flavanones et dihydroflavonols
230-270 (faible intensité)	340-390	Chalcone
230-270	380-430	Aurones
270-280	465-560	Anthocyanidines et anthocyanines

5- Evaluation de l'activité anti-radicalaire des flavonoïdes

Plusieurs protocoles de dosage mesurent l'activité antioxydant par piégeage des radicaux libres, c'est-à-dire l'activité antiradicalaire.

Parmi ces méthodes la méthode utilisant le radical libre DPPH° (diphényl-picrylhydrazyle).

Le test DPPH (2,2'-diphényl- 1-picrylhydrazyle), basé sur le piégeage du radical libre stable DPPH par une molécule antiradicalaire, le DPPH° accepte un atome d'hydrogène (H) à partir d'une molécule scavenger par exemple un antioxydant, résultant une réduction du DPPH, le degré de changement de la couleur est proportionnel à la concentration et à la puissance des antioxydants s, aussi, cette méthode est rapide et facile à mettre en œuvre, et elle s'effectue à température ambiante, ceci permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules testées (Mishra K. et al,2012).



1,1-diphényl 2- picrylhydrazyl (violet)

1,1-diphényl 2- picrylhydrazine (jaune)

Figure 22 : Forme libre et réduite du DPPH° (Pereira Nunes X., 2012 °).

5-1-Mode opératoire du DPPH°

b- L'activation anti radicalaire de ces extraits est mesurée selon la méthode décrite par (Zaghad et Merghem, 2013).

On a préparé une solution méthanoïque de DPPH° 0,002%, puis on met 4ml de réactif de DPPH° dans des tubes et on ajoute 1ml de chaque phase et on attend les résultats.

On utilise la quercitrine, l'acide gallique comme témoins, et on comparé le temps de la réaction pour chaque phase.

Chapitre 6

Résultats et interprétations

Résultats et interprétations

Notre travail apporté sur l'étude quantitative et qualitative des composés phénoliques plus particulièrement les flavonoïdes par des méthodes utilisés au niveau de laboratoire de biologie Micro-Moléculaire et phytochimie

1- Aspect quantitatif

1-1- Dosages des polyphénols totaux par le réactif de Folin-ciocalteu

Le test phénolique a été déterminé par test de Folin-Ciocalteu.

Le contenu phénolique total de nos extraits a été estimé à partir de la courbe d'étalonnage $Y=0,443X - 0,012$ ($Y=$ l'absorbance, $X=$ concentration de la solution acide gallique, mg / ml) (Figure). La teneur en phénols totaux est rapportée en mg d'acide gallique / 1g d'extrait de plante et 20g de extrait aqueuse après affrontement.

La lecture de la densité optique à 765nm permet de déterminer la concentration des phénols totaux.

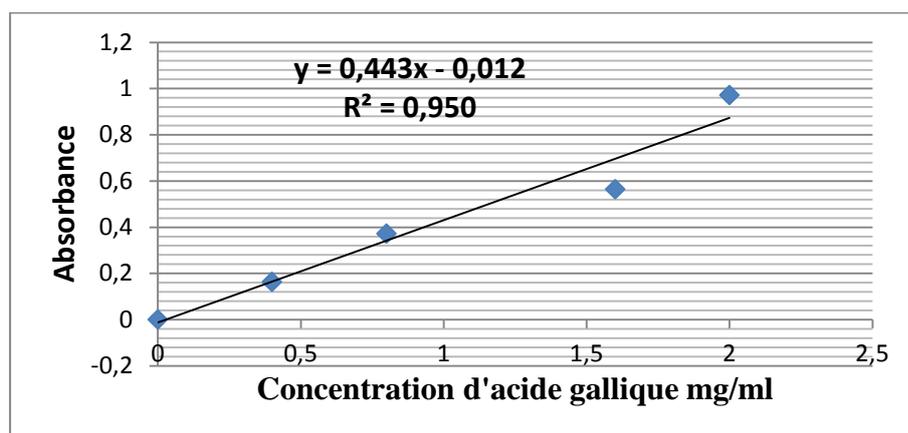


Figure 23: d'étalonnage de l'acide gallique

1-1-1-Teneur en phénols totaux d'extraits méthanoliques

Tableau 08: Teneur en phénol totaux des extraits

Concentration des polyphénols (mg/ml)	Variété	Extrait				
		Ether	Acétate	MEC	eau	Brut
	Barberousse	1.42±0.13	0.47±0.04	0.39±0.09	0.35±0.16	2.12±2.93
	Saïda	1.79±0.07	0.49±0.02	0.46±0.09	0.18±0.04	2.19±2.70

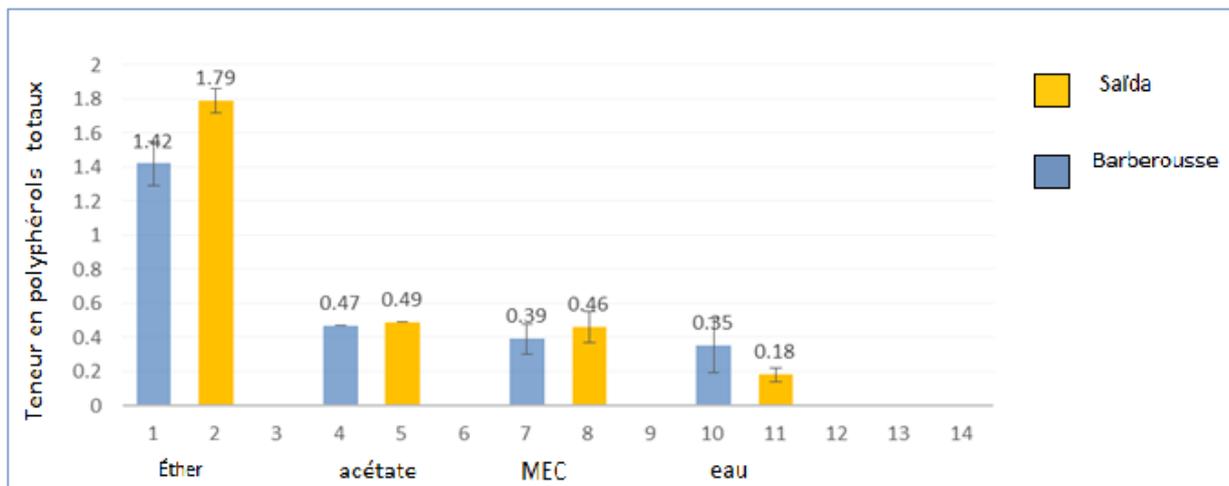


Figure 24 : Teneur en phénol totaux d'extrait

D'après la figure, On observe que nos extraits sont riches en composés phénoliques ; la teneur en composés phénoliques totaux varie d'une variété à un autre. Cette variation peut être expliquée par les différences qui existent dans la composition chimique entre les tissus des végétaux.

La teneur en composés phénolique varie entre les variétés. On remarque que l'orge Saïda contient plus des composés phénoliques que l'orge Barberousse.

$$\text{l'orge Saïda} \geq \text{l'orge Barberousse}$$

D'après khalfallah 2013 et Adoum 2002, cette variation est reliée à des facteurs génétiques, structurelles ou physiologique des céréales.

2- Résultats aspect qualitatif

2-1 Diagnostic par chromatographie analytique sur couche mince :

La plaque de CCM utilisé est une plaque de verre constituée de gel de polyamide DC6. La migration s'est fait dans le système solvant suivant :

Toluène /Méthyléthylcétone / Ethanol /Ether de pétrole (40/30/30/2) pour toutes les phases (éter di-éthylique, acétate d'éthyle, MEC, eau).

Cette technique peut nous informer sur le contenu en polyphénols et en particulier en flavonoïdes des extraits analysés sous forme des spots flavoniques.

Après séchage la plaque de chromatographie, ils sont examinées à l'œil nu, sous l'UV à la longueur d'onde de 354 nm dans une chambre noire, avant et après pulvérisation avec le réactif de Neu.

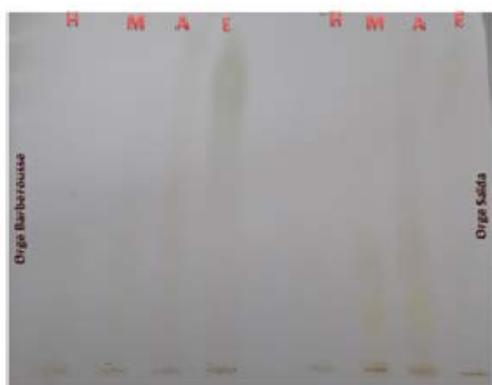
- Œil nu

- Sous UV

Avant Pulvérisation avec le réactif de Neu



Après Pulvérisation avec le réactif de Neu



Après 24h de Pulvérisation avec le réactif de Neu

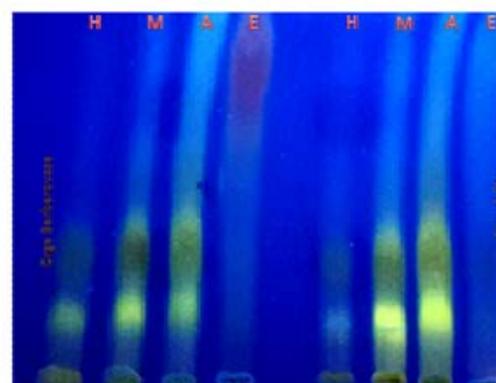
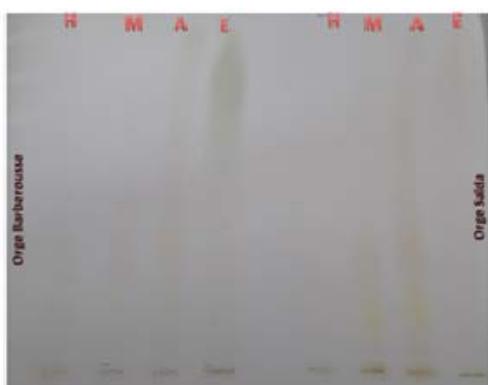


Figure 25 : CCM analytique représentative des flavonoïdes des phases: E : éther d'éthylque ; A: acétate d'éthyle ; M: MEC et H: eau des deux variétés d'orge sur plaque de polyamide DC6 développés dans système solvant Toluène /Méthyleéthylcétone / Ethanol/Ether de pétrole (40/30/30/2).

- **avant la pulvérisation avec le réactif de Neu:**

A l'œil nu la plaque montre plusieurs taches jaune pâle, jaune marron, vert.

Sous l'UV à longueur d'onde 365 nm. La plaque montre des taches différentes couleurs ; marron, violet, Brun noire

- **Après pulvérisation de plaque avec réactif de Neu:**

A l'œil nu ont remarqué l'intensification du marron et jaune.

Sous l'UV à longueur d'onde 365 nm on apparut jaune et observe les différentes couleurs seront modifiés le noire et marron en jaune verdâtre.

-On observe 24 heures plus tard dans la plaque les différentes couleurs seront modifiés le jaune en jaune fluorescent et le jaune verdâtre.

La réaction positive de réactif de Neu avec les molécules confirme que le l'orge est riche en flavonoïdes de type flavones (correspondant aux taches violet), et flavonols (jaune fluorescence). Ces résultantes sont proches de ceux de khelfallah 2013.

-Les céréales sont riches en flavonoïdes de type flavones et flavonols. Selon Bruneton J. (2009), ce sont les flavones et les flavonols qui sont les composés flavonoidiques les plus répandus.

La chromatographie CCM d'analyse des extraits des deux variétés d'orge (Figure), on constate que l'extrait acétate et MEC est le plus riche en composés phénolique suivi par la phase éther d'éthylique et la phase eau.

La visualisation des plaque sous UV365 nm permet d'observer les couleurs ainsi d'observer de mesurer les Rf des tache les plus majoritaires pour chaque variétés.

Tableau 09: comportement chromatographique des phases: éther d'éthylique, acétate d'éthyle, MEC et eau des 2 Variétés d'orge.

Orge Saïda	Pulvérisation sans le réactif de Neu		Pulvérisation avec le réactif de Neu		Type des flavonoïdes
	RF	Couleur	RF	Couleur	
Extrait					
Phase éther diéthylique	0.31	Marron	0.31	Marron	Flavones
Phase : acétate d'éthyle Orge			0.23	Jaune fluorescent	flavanols
	0.34	Noire	0.43	Jaune Verdâtre	
			0.46	Jaune	
Phase MEC			0.23	Jaune fluorescent	flavanols
	0.35	Noire	0.39	Jaune Verdâtre	
	0.31		0.44	Jaune	
Phase eau	0.34	Marron	0.25	Bleu	Flavones
			0.39	Marron	Flavones

Orge Barrberousse	Pulvérisation sans le réactif de Neu		Pulvérisation avec le réactif de Neu		Type de flavonoïdes
	RF	Couleur	RF	Couleur	
Extrait					
Phase éther diéthylique	0.78	Violet	0.78	Violet	Flavones
			0.8	Marron	
Phase : acétate d'éthyle	0.35	Noire	0.25	Jaune fluorescent	flavanols
	0.38	Marron	0.43	Jaune verdâtre	
			0.47	Jaune	
Phase MEC	0.3	Brun noire	0.25	Jaune fluorescent	flavanols
			0.45	Marron	Flavones
	0.36	Marron	0.48	Jaune	flavanols
Phase eau	0.35	Marron	0.25	Jaune fluorescent	flavanols
			0.45	Marron	

-On remarque que la migration des molécules diffère d'une phase à l'autre, ce qui explique que la migration (vertical) est en fonction de la polarité des substances, de la polarité de l'éluant (phase mobile) et du pouvoir d'adsorption de la phase stationnaire.

- Les molécules présentent différents R_f dont les plus élevées correspondent à des flavonoïdes plus polaires.

2-2-L'analyse spectrale des fractions :

Les flavonoïdes peuvent être considérés comme des pigments qui absorbent très fortement les radiations UV, par conséquent la spectroscopie UV-Vis reste l'outil principal pour l'analyse structurale des flavonoïdes.

L'analyse spectrale de chaque phase (éther, acétate diéthylique, MEC et eau) par un spectrophotomètre à défilement de longueur d'onde entre 220-400nm à permet de tirer les spectres suivant :

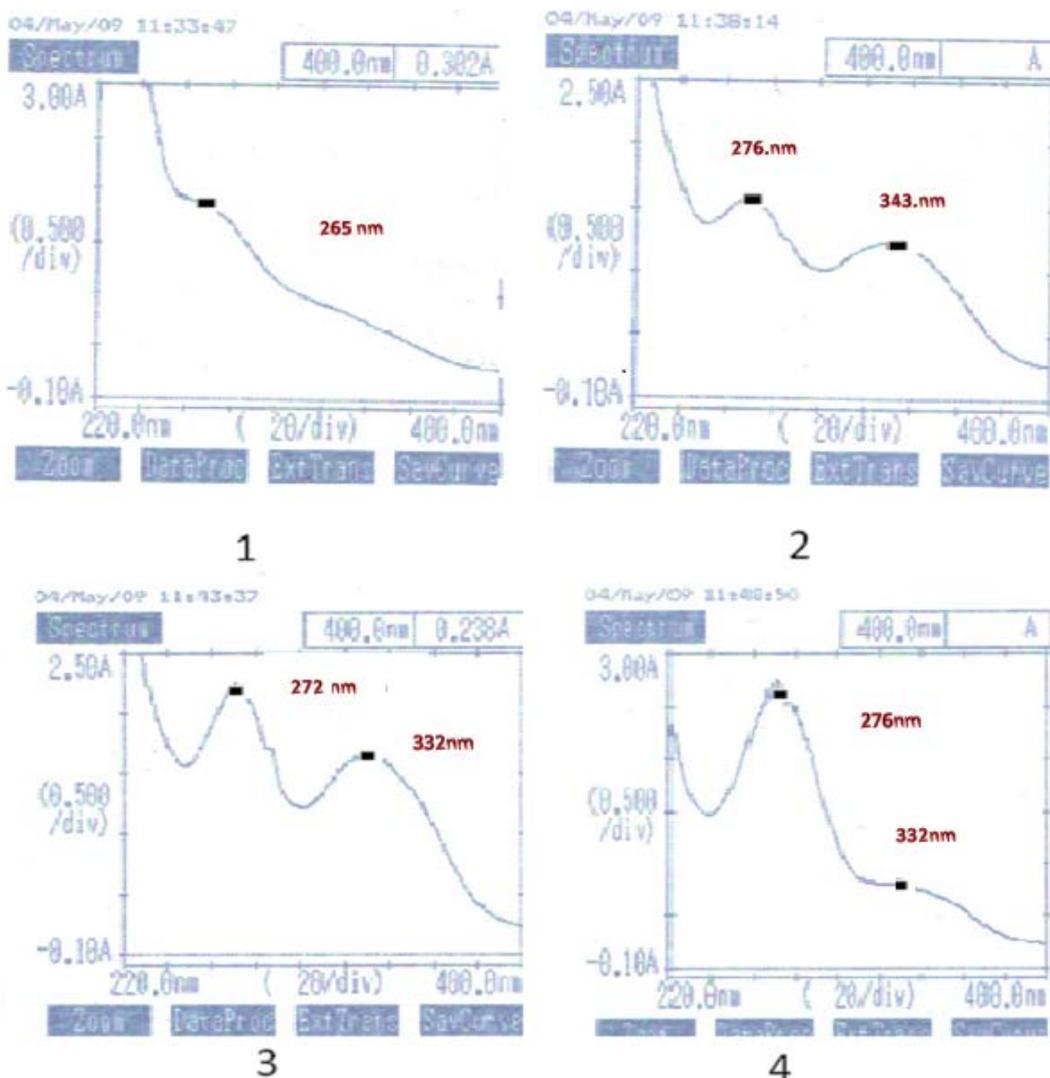


Figure 26: Spectres UV des différentes phases de feuille d'orge : Saïda (1: Ether diéthylique, 2 : Acétate d'éthyle, 3 : MEC, 4 : eau

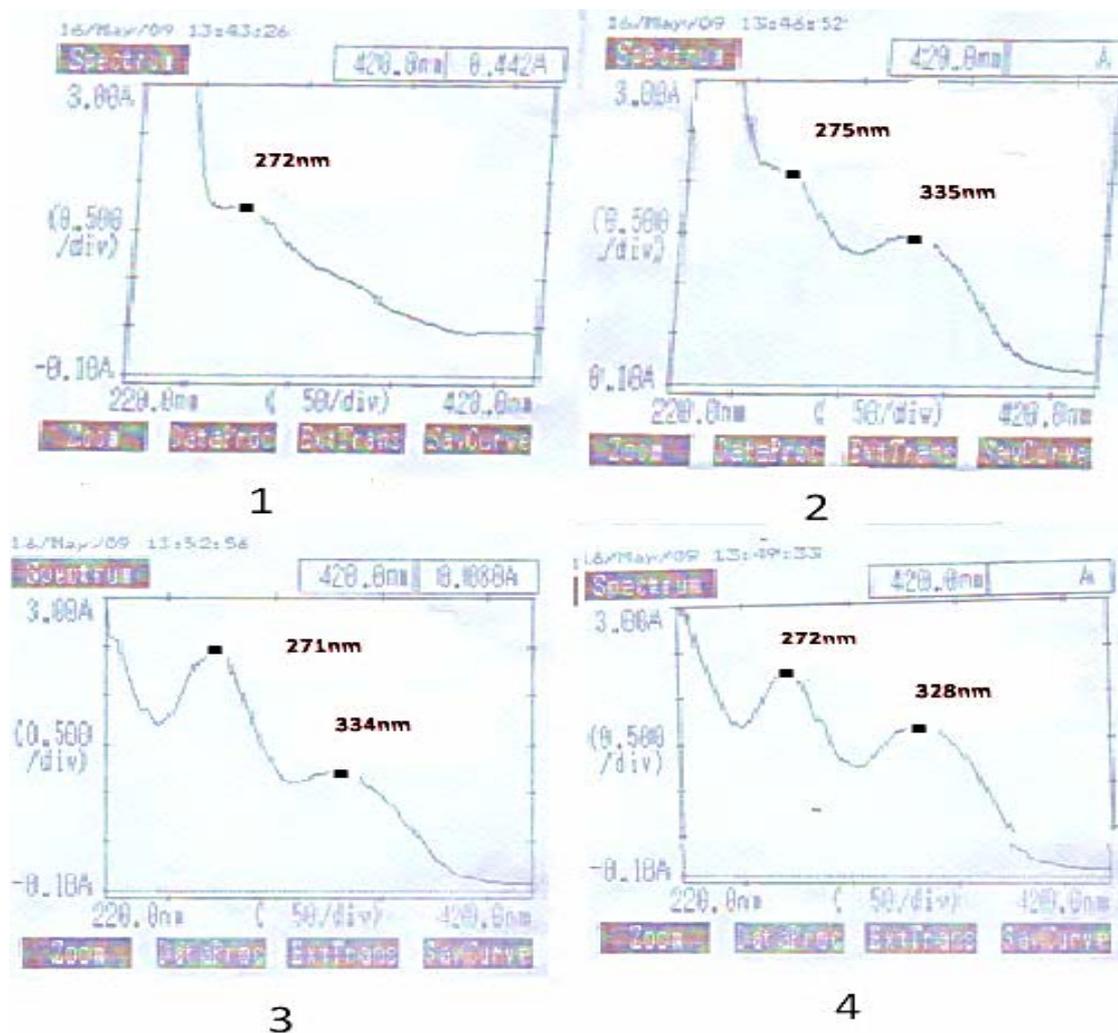


Figure 27: Spectres UV des différentes phases de feuille d'orge : Barberousse (1 : Ether diéthylique, 2 : Acétate d'éthyle, 3 : MEC, 4 : eau)

D'après l'analyse spectrale des phases éther, acétate, MEC et eau, on constate que les deux variétés d'orge étudiées contiennent des flavonoïdes.

Dans le domaine (UV-VIS) les solutions méthanoliques de la phase éther diéthylique donnant pour la majorité un seul pic entre 265-272nm. Ceci nous permet d'en déduire que cette phase ne contient pas de flavonoïdes et de supposer que peut être ces spectres d'absorption représentent des acides phénols.

Les solutions méthanoliques des phases acétate d'éthyle, MEC et eau donnant deux pics :

- La bande I, le maxima d'absorbance entre 320-345nm, montre l'existence des flavones dans les phases.
- La bande II dans l'intervalle 270 nm et 280 nm montre l'existence des anthocyanidines et anthocyanine.

L'analyse spectrale des feuilles d'orge dévoile la richesse des céréales en composés phénoliques notamment les flavonoïdes.

Ces feuilles de différentes variétés d'orge pourront être valorisées en fabricant un jus à base d'herbe d'orge.

3-Le pouvoir antioxydant «DPPH°»

Le pouvoir antioxydant de nos différents extraits testés a été estimé par la méthode de DPPH°, qu'est un radical libre possède une couleur violette est réduit en un composé jaune. Ce changement de couleur est attribué à la présence des antioxydants.

Nos résultats sont comparés avec des composés phénoliques comme témoin : l'acide gallique, quercitrine (voir annexe 03)

Nos résultats sont estimés à l'œil à nus, on observe le changement de couleur en fonction du temps.

1- Variété Saïda



T = 0 min



T =15 min

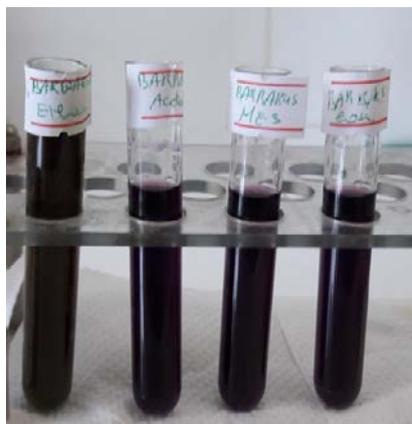


T= 30 min



T=24 heures

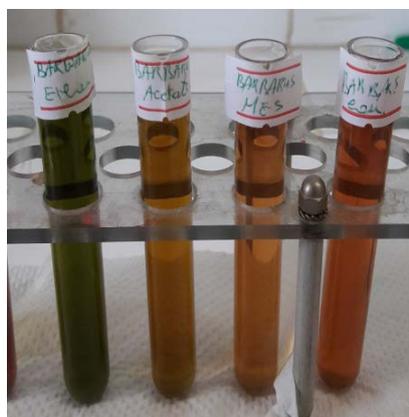
2- Variété Barberousse



T =15 min



T =0



T=30 min

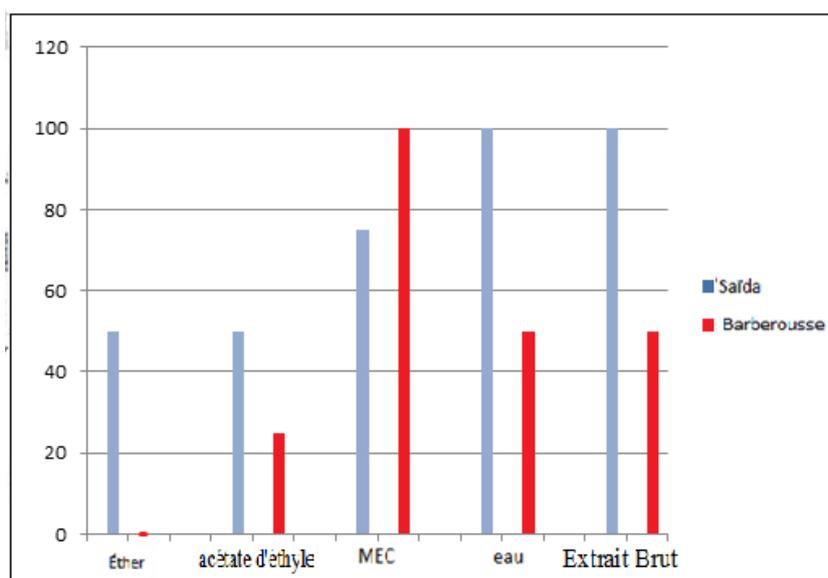


24 heures

Figure 28 : Résultat de l'évaluation du pouvoir antioxydant de différent phases des variétés.

Tableau 10 : Résultats des tests DPPH de chaque extrait

Variété d'orge	Les phases	Remarque		Résultats	
		Après 1 /2 h	Après 24 h	Après 1 /2 h	Après 24 h
• Variété Saïda	phase étherdiéthylique	+	++	25%	50 %
	Phase : acétate d'éthyle	+	++	25%	50%
	Phase MEC	++	++	50%	75%
	Phase eau	++	+++	50%	100%
	Extrait méthalonique	+	+++	25%	100%
• Variété Barberousse	Phase étherdiéthylique	-	-	0%	0%
	Phase : acétate d'éthyle	+	+	25%	25%
	Phase MEC	+	+++	25%	100%
	Phase eau	+	++	25%	50%
	Extrait méthalonique	+	++	25%	50%

(+++) : Test fortement positif.**(++)** : Test positif.**(+)** : Test faiblement positif**(-)** : Test négatif.**Figure 29: Histogramme de test de DPPH**

D'après la figure 28 on observe un changement de couleur des différentes phases des variétés d'orge, la couleur violette se transforme en couleur jaune avec le temps. Cette modification de couleur montre que l'activité antioxydant varie d'une variété à une autre et d'une phase à une autre.

La couleur de la phase MEC et acétate de deux variétés d'orge change plus rapidement que les autres phases suivie par les phases eau.

La variété Saïda montre un changement plus rapide que l'autre variété d'orge Barberousse.

D'après cette observation on conclut que la variété d'orge Saïda et Barberousse sont riches en composés phénoliques et possèdent un pouvoir antioxydant et la phase MEC et acétate possède un pouvoir capteur des radicaux libres puissant par rapport aux deux autres phases (eau et éther).

Conclusion générale et perspective

Conclusion générale et perspective

Le présent travail a pour but d'étudier la présence ou non des composés phénoliques, et leur pouvoir antioxydant dans les feuilles d'orge cultivé dans la serre de bio pôle à chaabet arrsas, et la recherche de nouvelles sources phytogénétiques riches en composés phénoliques dans le but de valoriser les feuilles d'orge.

En premier lieu nous nous sommes intéressés à quantifier les phénols totaux par un dosage colorimétrique de Folin-Ciocalteu qui nous a permis de voir que la variété d'orge Saïda contiennent plus des composés phénoliques que la variété d'orge Barberousse.

Des études phytochimiques basés sur l'extraction, la chromatographie sur couches mince et la spectrophotomètre permettent une approche de la structure moléculaire du contenu phénolique.

Les tests effectués sur chromatographie analytique sur couche mince ont permis tout d'abord de visualiser dans U.V des empreintes flavones de nos extraits des deux échantillons étudié.

Nous avons remarqué que les phases acétates d'éthyle et les phases MEC sont les plus riches en composés phénoliques suivent par les phases éther diéthylique et les phases eau. La réaction positive de réactif de Nue avec les molécules confirme que l'orge est riche en flavonoïdes : de type flavones et flavonols.

En dernier lieu on démontre dans ce travail le rôle antiradicalaire de nos polyphénols issus des extraits d'herbe d'orge contre le DPPH qui est un radical stable représentant les radicaux libres.

Nous avons classé le changement des couleurs de différentes phases : phase MEC, phase acétate d'éthyle, phase eau et la phase éther diéthylique.

La variété Saïda possède pouvoir antioxydant plus important que la variété Barberousse.

Les résultats de la présente étude ne constituent qu'une initiation à la recherche des composés phénoliques, qui sont des métabolites secondaires dans les céréales alimentaires et les plantes médicinales.

A la suite de ces résultats, il serait intéressant d'approfondir notre étude par :

- A 'atteindre la structure exacte des molécules en utilisant des techniques appropriées.
- D'appliquer d'autres tests antioxydants (in vitro et in vivo) pour avoir une indication plus affinée sur la capacité antioxydant de l'échantillon à tester.
- De préparer des extraits de céréales alimentaires qui peuvent être utilisés dans les produits alimentaires (jus, yaourt, pains, biscuits...), créant ainsi une valeur ajoutée pour les fabricants et les avantages pour les consommateurs.

Résumé

Résumé

Cette contribution porte sur l'étude de la composition phytochimique et l'activité antioxydant des deux variétés de l'orge : Saïda et Barberousse.

Les composés phénoliques des deux variétés sont extraits et séparés dans différentes phases.

Le dosage des phénols totaux par la méthode de folin-ciocalteu des différentes variétés montrent que la teneur en phénols totaux varie d'une variété à une autre. Cette étude quantitative indique la richesse d'orge en composés phénoliques et flavonoïdes.

L'analyse chromatographique (CCM) sur gel de polyamide indique la diversité des composants flavoniques et l'abondance relative des flavones et flavonols.

L'activité antioxydant déterminée par le test DPPH a montré que l'orge a un pouvoir antioxydant fort, varie d'une phase à une autre selon les composés phénoliques existants dans la phase (la MEC présente une activité plus forte que les autres), cette activité antioxydant est due principalement à la richesse de ses orges en flavonoïdes.

Mots clés : Orge *Hordeum vulgare*, composés phénoliques, flavonoïdes, activité antioxydant

Summary

This work aims the study of phytochemical composition and antioxidant activity of the two varieties of Barley (Saïda, Barberous).

Phenolic compounds of the two varieties are extracted and separated into different phases.

The dosage of total phenols by Folin-Ciocalteu method of different shows that the content of total phenols varies from one variety to another, this quantitative study indicates the wealth of Barley with phenolic compounds.

The chromatographic analysis (CCM) on plyamide gel indicates the diversity of flavonoid components and the relative abundance of flavones and flavonols.

The antioxidant activity determined by the DPPH test showed that Barley has a strong antioxidant power, varies from one phase to another according to existing phenolic compounds in phase (the MEC phase presents a higher activity than the other)
This antioxidant activity and mainly due to the wealth of Barley with flavoniodes.

Key words: Barley *Hordeumvulgare*, phenolic compounds, flavonoids, antioxidant activity.

ملخص

يركز هذا العمل على دراسة التركيبة الكيميائية والنشاط المضادة للأكسدة نوعين من الشعير : سعيدة (Saïda) و بربروس (Barberousse)

يتم استخراج المركبات الفينولية من صنفين وفصلها عبر مراحل مختلفة

قياس كمية المركبات الفينولية بطريقة Folin-ciocalteu وتبين أن المحتوى الإجمالي للمركبات الفينولية يختلف من نوع إلى آخر . و تشير هذه الدراسة الكمية على ثراء الشعير بالمركبات الفينولية

التحليل الكروماتوغرافي على هلام مادة البولي أميديدل على تنوع مكونات الفلافونويد والوفرة النسبية للفلافون ومركبات الفلافونول.

أظهر النشاط المضادة للأكسدة التي يحددها اختبار DPPH أن الشعير يحتوي على مضاد للأكسدة قوي يختلف من نوع إلى آخر وفقا للمركبات الفينولية الموجودة في المرحلة (مرحلة متيل اتيل سيتون و مرحلة الاسيتات ديثيل لديهما نشاط أعلى من غيرهما) ويرجع ذلك أساسا إلى غني الشعير بالفلافونيدات .

الكلمات الرئيسية: الشعير ،المركبات الفينولية ,الفلافونيدات ,النشاط المضاد للأكسدة.

Références bibliographique

Références bibliographique

Abbas K., A. Abdelguerfi. 2008. Evaluation of a regenerated natural meadow in a semi -arid area of Algeria. Option méditerranéennes A. 79 : 179-185

Alais, C., Linden, G., Micho. 2003. Biochimie Alimentaire. 5éme ed Dunod. Pp 131.

Angelos,M.G.Kutala,V.K.Torres,C.A.He,G.Stoner,J.D.Mohammed,M,Oeranna,K.2005.Hypic reperfusion of the ischemic heart and oxygen radical generation .**Am JPhysiol Heart Circ Physiol** .Vol 290:341-347.

Baik,B.-k& Ulrich,S.E.Barley for food: characteristics,improvement and renewed intereset.Journal of cereal science 48,233-242(2008)

Besançon, P.2000.Effets benifiques pour la santé des fruits et des légumes. Alimentation méditerranéenne et santé : actualité et perspectives. Montpellier, John libbey. Pp99-108.

Beta, T., Nam, s.,Dexter, J.E., et Sapirstein, H.D., 2005.Phenolic content and antioxydants Activity of Pearledwheat and Roller-Milled. Fractions. Cereal chem.82 (4), Pp 390393.

Boizot N., Charpentier J. P., 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour l'observation et

l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques.

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

Dacosta Y., (2003). Les phytonutrimentsbioactifs.YvesDacosta (Ed).Paris, p 317.

D.Chen. et al. (2004). Green tea and tea polyphenols in cancer prevention, Front Biosci, vol. 9,n° 2618.

FAOSTAT., 2008. <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>.

Feillet P., 2000. Le grain de blé composition et utilisation. Ed. INRA, Paris, 308 p.

Giban, M., Minier, B., Malvosi, R. 2003. Stades du blé ITCF.ARVALLIS. Institut du végétale. Pp 68.

Guignard, J.L ; Dupont, F .2004. Botanique Systématique moléculaire. 13 Ed révisée Masson Paris. Pp 116-117

Références bibliographique

Hadria, R. 2006. Adaptation et spatialisation des modèles stricts pour la gestion d'un périmètre céréalier irriguée en milieu semi aride. Thèse de doctorat. univ Cadi AYYAD Samlalia- Marrakech.

Höije, A., M. Gröndahl, K. Tømmeraas and P. Gatenholm (2005). "Isolation and characterization of physicochemical and material properties of arabinoxylans from barley husks." *Carbohydrate Polymers* 61(3): 266-275.

Holtekjflen, A.K., Kinitz, C., and Knutsen, S.H. 2006. Flavanol and bound phenolic acid contents in different barley varieties. *J.Agric. FoodnChem.*54 :2253,2006.

ISANH. (2006). 3rd international Conference on Polyphenols Application. Ther International Society for Antioxidants in Nutrition and Health.

Jeantet, R., Croguennec, T., PSchuck, P and Gerard Brulé.2007 : Science des aliments : Biochimie Microbiologie, procédés produits Pp138-159.

Kanoun K. (2011). Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhene) de la région de Tlemcen (Honaine). Thèse de magister de l'université de Tlemcen.

Karabín M., Tereza Hudcová., Lukáš Jelínek., Pavel Dostálek., 2015. Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. Department of Biotechnology, Faculty of Food and Biochemical Technology, University of Chemistry and Technology, Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic.

Khelfallah A, 2013. Etude comparative du contenu phénolique et du pouvoir antioxydant de quelques plantes médicinales et des céréales alimentaires. Thèse de magister. Université Constantine.

Knežević S.V., Blazekwic B., Stefan M.B., Babac M. (2012). Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. In "Phytochemicals as nutraceuticals-global approaches to their role in nutrition and health. Edition Venketeshwer Rao: 155-180

Kwong MGY, et al. *Food & Function* 2013;4:401-408.

Lahouel M., 2005. Interaction Flavonoïdes-Mitochondrie et rôle de la Propolis dans la

Références bibliographique

prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de Doctorat d'Etat de L'Université de Constantine.

Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux (un exemple de métabolites secondaires d'importance économiques). Edition techniques et documentation, Lavoisier.

Macheix J.J., Fleuriet A., Chretien J.A. (2006). Composés phénoliques dans la plante- structure, biosynthèse, répartition et rôles In « les polyphénols en agroalimentaire ». Édition Lavoisier : 1-27.

Merghem, 2009. Eléments de biochimie végétale. Edition Bahaeddine.

Markham K. R. (1982). Techniques of flavonoids identification. Ed Academic Press: 6 58.

Mazza G; Gao L., 2005. Blue and purple grains, Pp 313-350. In: Phenolic Compounds in Cereal Grains and Their Health Benefits. Dyke I. Le seigle: Secale cereale Ls L & Rooney W L. (2007).

Texas A&M University, CFW-52-3-0105

Moulay Y. (2012). Investigation phytochimique de l'Acacia arabica Aux propriétés antioxydants et inhibitrices. Mémoire de Magister. Université Kasidi Merbah Ouargla. 56p

Niki L., Reynaert S.W., Aesif T., Mc Goven., Amy B., Emiel F.M., Wouters C., Irvin Y vonne M.W., Janssen H. (2007). Catalase over expression fails to attenuate allergic airways disease in the mouse. The Journal of Immunology. 178:3821

Salfer G.A., Molina-Cano J.L., Savim R., Araus J.L et Romagosa I., 2002- Barley science . Recent Advances from Molecular Biology to Agronomy of yield and Quality. 665p.

Soltner, D. 2005. les grandes productions végétales. 20ème. Ed. CCTA . Pp 20-140

Stanley et al. (2003). Antioxydants and the Radical Theory of Degenerative Disease, Alternative Medicine and Rehabilitation.

Thondre PS, et al. Br J Nutr 2012;107:719-724.

Valls J., Millan S., Marti M.P., Borrás E., Arola L. (2009). Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. Journal of chromatography A, 1216: 7143-7172

Yaou A., 2001. Contribution à l'étude des composés flavoniques d'une labiées : le teucrium polium. Thèse de magister. Université Constantine.

Références bibliographique

Yu, L., Haley, S., Perret, J and Harris, M. 2002. Antioxidant properties of hard winter wheat extracts. Food Chemistry. 78: 457-461.

Zeghad N., Merghem R., 2013. Antioxydant and antibacterial activities of *Thymus vulgaris*L.

Zhu K., Zhou H., 2011. Purification and characterization of a novel glycoprotein from wheat germ water soluble extracts. Process Biochemistry 40: 1469-1474.

Swape sit

<http://www.agro.basf.fr>

Annexes

Annexe

Annexe 01: CCM analytique représentative des flavonoïdes des phases :

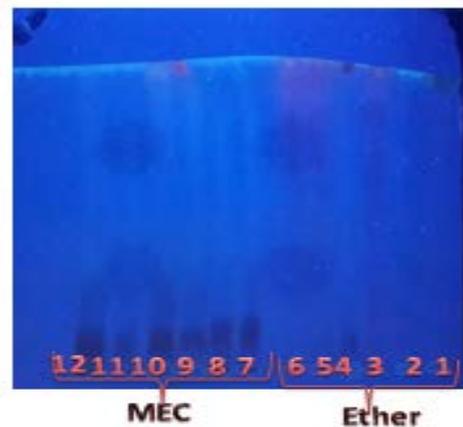
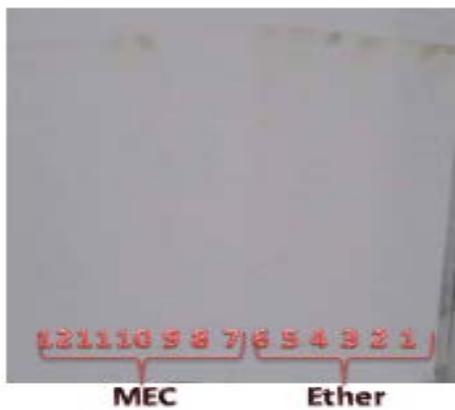
phase éther diéthylique des 3 variétés ; 1: orge Barberousse , 2: orge Saida , 3: Blé dur Cirta 4: blé dur waha , 5: blé tendre Arz, 6:blé tendre Hidhab .

phase MEC des 3 variétés ; 7: orge Barberousse , 8: orge Saida , 9: Blé dur Cirta 10: blé dur waha , 11: blé tendre Arz, 12:blé tendre Hidhab sur plaque de polyamide DC6 développés dan système solvant MEC/MeOH/EtOH/éther.

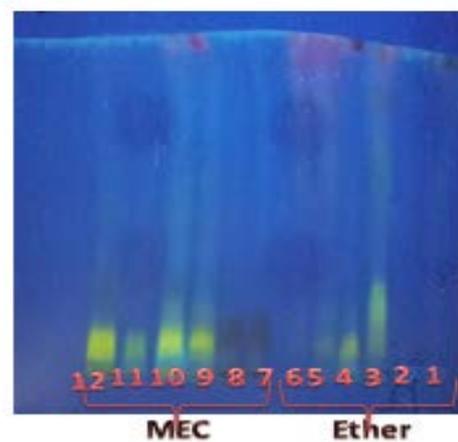
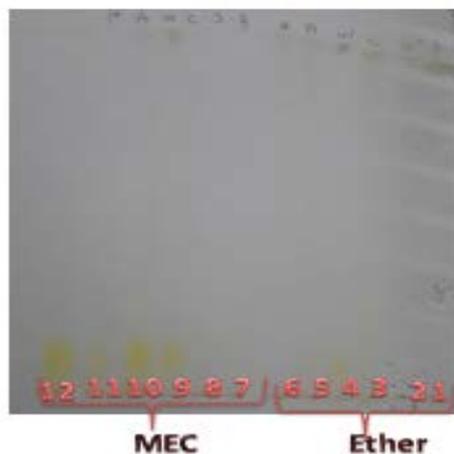
Avant Pulvérisation avec le réactif

œil nu

sous UV



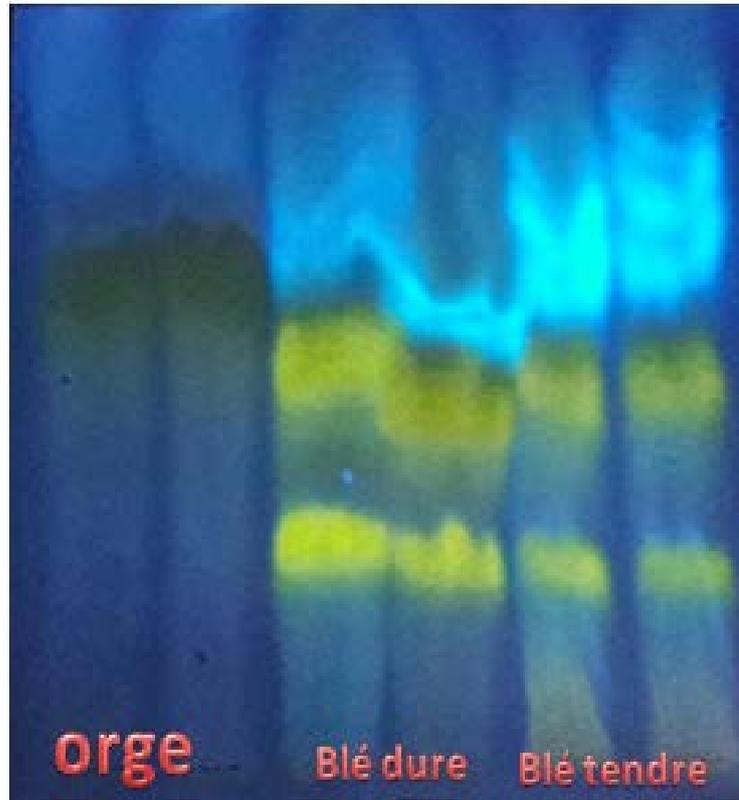
Après Pulvérisation avec le réactif de Neu



Annexe

Annexe 02 : CCM analytique représentative des flavonoïdes des phases eaux des 3 variétés :
orge, blé dure, blé tendre

Phase eau



Annexe

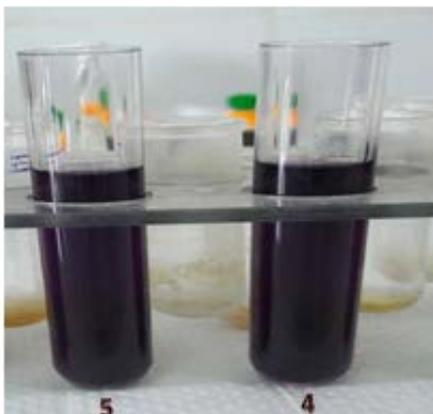
Annexe 03: Résultat de l'évaluation du pouvoir antioxydant des témoins, 1 : eau distillait :
2 : l'acide gallique, 3 : quercitine, 4 : orge Barberousse, 5 : orge Saïda.



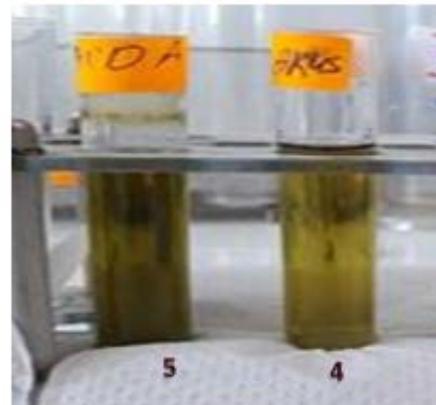
T= 0 min



T= 15min



T= 0 min



T= 15min

Contribution à l'étude des flavonoïdes et de l'activité antioxydant de l'orge : *Hordeum vulgare*

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie

Résumé

Cette contribution porte sur l'étude de la composition phytochimique et l'activité antioxydant des deux variétés de l'orge : Saïda et Barberousse.

Les composés phénoliques des deux variétés sont extraits et séparés dans différentes phases.

Le dosage des phénols totaux par la méthode de folin-ciocalteu des différentes variétés montrent que la teneur en phénols totaux varie d'une variété à une autre. Cette étude quantitative indique la richesse d'orge en composés phénoliques et flavonoïdes.

L'analyse chromatographique (CCM) sur gel de polyamide indique la diversité des composants flavoniques et l'abondance relative des flavones et flavonols.

L'activité antioxydant déterminée par le test DPPH a montré que l'orge a un pouvoir antioxydant fort, varie d'une phase à une autre selon les composés phénoliques existants dans la phase (la MEC présente une activité plus forte que les autres), cette activité antioxydant est due principalement à la richesse de ses orges en flavonoïdes.

, ,

Mots clés : Orge *Hordeum vulgare*, composés phénoliques, flavonoïdes, activité antioxydant.

Laboratoire de recherche : Biologie Micromoléculaire et phytochimie.

Jury d'évaluation :

Président du jury : NOUADRI T (MCA UFM Constantine)

Rapporteur : MERGHEM R (Pr- UFM Constantine)

Examineur : HABIBATNI (MMA UFM Constantine)

Date de soutenance : 21/06/2016