



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية
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 : Biologie moléculaire et santé

Thème

**Contribution à l'étude des flavonoïdes des céréales de la région de
Constantine et évaluation de leurs activités biologiques.**

Présenté et soutenu par :

Le : 21/06/2015

- ABED AMIRA
- OIUS IMEN

Devant le jury :

Président : Kitouni R (MAA- Université des Frères Mentouri Constantine).

Rapporteur : Merghem R (Pr- Université des Frères Mentouri Constantine).

Examineurs : Mosbah A (MAA- Université des Frères Mentouri Constantine).

*Année universitaire
2014 - 2015*

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 **R. KITOUNI**, l'université de qui nous fait l'honneur d'être le président de ce jury.*

*Nous sommes également très honorées de la présence, dans ce jury Madame **A. MOUSBAH***

*Nous remercions aussi la doctorante **I. Djemmel** pour ses conseils et aide. Egalement nous remercions **Mr SAKHRI EL HADI** : directeur de l'ITGC d' El khroub.*

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

Sommaire

<i>Introduction</i>	01
----------------------------------	----

Chapitre 01 : Les composés phénoliques

Introduction.....	03
1- Les composés phénoliques.....	03
1-1- Définition.....	03
1-2- La biosynthèse des composés phénoliques.....	04
1-3- Les principales classes des composés phénoliques.....	05
2- Les flavonoïdes	06
1-4- Biosynthèse des flavonoïdes.....	06
1-5- Classification des flavonoïdes.....	07
1-6- Intérêt thérapeutique des flavonoïdes.....	08

Chapitre02 : Les céréales

Introduction	09
1- La production des céréales en Algérie.....	10
2- Le blé.....	11
2-1- Classification.....	11
2-2- Le cycle de développement.....	12
2-2-1- Période végétative.....	12
2-2-2- Période reproductrice.....	12
3- Description.....	13
3-1- Grain.....	13
3-1-1- Composition biochimique.....	14
3-2- Feuilles (herbe de blé).....	14
3-3- Les principaux composés phénoliques identifiées chez le blé.....	15

Chapitre03 : Propriétés biologiques de blé

Introduction.....	16
1- Importance des grains.....	16
1-1- Les affections cardiaques.....	17
1-2- Cancer.....	17
1-3- Le diabète.....	18
1-4- Le contrôle du poids	18
2- Importance de l'herbe de blé.....	19
2-1- Cancer.....	20
2-2- Anémie.....	20
2-3- Le jus d'herbe de blé	21

Chapitre 04 : les propriétés antioxydants des flavonoïdes

Introduction.....	22
1- L'oxygène et les radicaux libres.....	22
2- Le stress oxydant.....	23
3- Les antioxydants.....	23
4- Propriétés anti oxydantes des flavonoïdes.....	25

Chapitre 05 : Matériels et méthodes

1- Matériel végétal.....	26
a- Isolement du germe.....	26
b- Les feuilles.....	27
c- Le son de blé.....	27
2- Extraction.....	28
2-1- Extraction solide-liquide.....	28
*Extraction par macération.....	28
* Extraction au soxhlet.....	28
2-2-Chromatographie de partage (partition entre solvants).....	28
3- Aspect quantitatif.....	30
3-1- Dosage des polyphénols.....	30
a- Principe	
b- Protocole	
3-2- Dosage des flavonoïdes.....	30
a- Protocole.....	30
4- Aspect qualitatif.....	
4-1- La chromatographie analytique sur couche mince.....	31
4-1-1- Principe de la CCM.....	31
4-1-2- Mode opératoire.....	31
a- Préparation de la phase stationnaire.....	31
b- Préparation de la phase mobile.....	31
c- Le dépôt	31
d- Développement.....	32
e- Visualisation.....	32
4-1-3- Identification.....	32
a- Facteur de rétention Rf	32
b- Structure – fluorescence	33
4-2- La spectrophotometrie UV-Visible.....	35
❖ Spectres UV-Visibles des flavonoïdes.....	35
5- Evaluation de l'activité anti-radicalaire des flavonoides.....	37

a- Principe.....	37
b- Protocole.....	37

Chapitre 06 : Résultats et interprétations

1- Résultats de l'aspect quantitatif.....	38
1-1-Dosage des polyphénols totaux.....	38
1-1-1-Teneur en phénols totaux d'extraits éthanoliques.....	38
1-2-Dosage des flavonoïdes.....	39
1-2-1-Teneur en flavonoïdes d'extraits éthanoliques.....	40
2- Résultats de l'aspect qualitatif.....	41
2-1- Diagnostique par CCM.....	41
2-2- L'analyse spectrale des fractions.....	45
3- Le pouvoir antioxydant 'test DPPH'.....	47

Conclusion générale et perspectives.

<i>Références bibliographique</i>	49
--	----

Annexes.

Résumé.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principale classe des composés phénoliques	5
Tableau 2 : Principales classes des flavonoïdes	7
Tableau 3 : Production et importation des céréales en Algérie	10
Tableau 4 : Taxonomie de blé	11
Tableau 5 : Composition chimique d'un grain de blé	14
Tableau 6 : Les composés phénoliques rapportés chez le blé.....	15
Tableau 7 : Origine des radicaux libres	22
Tableau 8 : Les radicaux libres centrés sur l'oxygène	23
Tableau 9 : Les espèces des blés étudiées.....	26
Tableau 10 : Rendement des grains pour l'obtenir 10g de germe	26
Tableau 11 : Relation entre Rf et la structure	33
Tableau 12 : La relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes.....	34
Tableau 13 : Caractéristiques des spectres UV-V des flavonoïdes	36
Tableau 14 : Teneur en phénol totaux des extraits	38
Tableau 15 : Concentration des flavonoïdes des extraits.....	40
Tableau 16 : Comportement chromatographique des phases: éther diéthylique, Acétate d'éthyle , MEC des 3 variétés de blé.....	43

LISTE DES TABLEAUX

Liste des figures

Figure 01 : Biosynthèse des composés phénoliques	4
Figure 02 : Structure de base des flavonoïdes	6
Figure 03 : Taxonomie des céréales	9
Figure 04 : Blé tendre et blé dur.....	11
Figure 05 : Le cycle de développement des céréales	13
Figure 06 : Histologie du grain de blé.....	14
Figure 07 : Production de l'herbe de blé.....	19
Figure 08 : Structure de l'hémoglobine et la chlorophylle.....	20
Figure 09 : Le jus d'herbe de blé.....	21
Figure 10 : Les différents types antioxydants.....	24
Figure 11 : Caractéristiques structurales des flavonoïdes avec une activité de piégeage des radicaux libre.....	25
Figure 12 : Les différentes étapes pour l'obtention de poudre végétale étudiée.....	27
Figure 13 : Protocole d'extraction des flavonoïdes.....	29
Figure 14 : Mode de dépôt pour une CCM.....	32
Figure 15 : Le rapport frontal	34
Figure 16 : Spectre d'absorption d'un flavonoïde.....	35
Figure 17 : Forme libre et réduite du DPPH.....	37
Figure 18 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	38
Figure 19 : Teneur en phénols totaux d'extraits.....	39
Figure 20 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	39
Figure 21 : Concentration des flavonoïdes des extraits	40
Figure 22 : CCM analytique représentative des flavonoïdes des phases : éther diéthylique, acétate et MEC des 3 variétés de blé sur plaque de polyamide DC6 développés dans un système solvant (MEC/MeOH/EtOH/éther de pétrole : 40/30/30/7) : 1 : Hidhab, 2 : Citrta, 3 : Arz.....	42
Figure 23 : Spectres des différentes phases de feuille de blé variété : Hidhab (1: Ether diéthylique, 2: Acétate d'éthyle, 3: MEC)	45
Figure 24 : Spectres des différentes phases de germe de blé variété : Arz (1: Ether diéthylique, 2: Acétate d'éthyle, 3: MEC).....	45
Figure 25 : Spectres des différentes phases de son de blé dur (1: Ether diéthylique, 2: Acétate d'éthyle, 3: MEC).....	46
Figure 26 : Résultat de l'évaluation du pouvoir antioxydant de différentes phases des variétés.....	47

Liste des figures

ABREVIATIONS

ADN :	Acide désoxyribonucléique
AlCl₃ :	Chlorure d'aluminium
CCM :	Chromatographie sur couche mince
DO :	Densité optique
DPPH :	Diphényl-picrylhydrazyle
F :	Feuille
FLO• :	Radical flavoxyle
FLOH :	Flavonoïde
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
R_f :	Rapport frontale
RH :	Radical stable
SOD :	Superoxyde dismutase
UV-V :	Ultra violet visible
Φ-OH :	Composé phénolique

Introduction générale

Introduction générale

Les céréales ont pris depuis des milliers d'années une très grande place dans l'alimentation humaine.

Le blé est l'une des principale céréales cultivées dans le monde, avec le riz, le maïs, l'orge et le sorgho. Elles fournissent plus de 60% des calories et des apports en protéines de l'alimentation humaine en tant qu'ingrédient principal.

Les céréales contiennent une gamme de substances qui peuvent avoir des effets favorable à la santé, ces substances sont souvent appelées phytochimiques ou substances bioactives des plantes. C'est des métabolites secondaires, les plus présents chez les céréales semblent être les composés phénoliques.

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.

Des études épidémiologiques ont montré que la consommation régulière de céréales complètes et de produits à grains entiers est associé a des risques réduits de divers types de maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète de type 2 et certains cancers.

Au cours des dernières années les études n'ont pas porté uniquement que sur les grains mais aussi l'intérêt s'est porté sur les feuilles des céréales ou l'herbe. Ces études ont montré la richesse des feuilles en composés phénoliques lesquels possèdent grand pouvoir antioxydant (Abdel et *al.*, 2006 ; Jonnala S et *al.*, 2010).

Le présent travail a pour objectif de rechercher de nouvelles sources des composés phénoliques. Notre contribution porte sur la recherche des composés phénoliques dans les grains et les feuilles de blé cultivées et utilisés en alimentation humaine dans la région de Constantine. **Cette étude permettra de dévoiler de nouvelles sources phytogénétiques riches en composés phénoliques dans le but de valoriser le grain complet, les sous produits du blé et les feuilles de blé.**

Notre travail présentera trois grandes parties :

La première partie sera consacrée aux données bibliographiques : aspect botanique, aspect phytochimique et nutritionnel. Elle décrit aussi les différentes classes des composés phénoliques ainsi que leur biosynthèse, répartition, rôles et intérêts biologiques. L'activité biologique principalement l'activité antioxydante.

La seconde partie comprend l'expérimentation qui a été réalisée au sein du laboratoire de Biologie Micromoléculaire et Phytochimie de l'université Mentouri Constantine 1.

Introduction générale

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

- L'extraction des composés phénoliques et leur partition entre solvants spécifiques,
- Le dosage des phénols totaux et flavonoides,
- Le diagnostic par CCM analytique
- Le diagnostic par spectrophotométrie UV-Visible
- L'activité antioxydante par un test approprié

La dernière partie porte sur présentation des résultats obtenus, la discussion et les perspectives.

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

Chapitre 1

Les composés phanoliques

Introduction

Les métabolites primaires sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules d'une plante pour y assurer sa survie. Ils sont classés en quatre grandes catégories : les glucides, les lipides, les acides aminés et les acides nucléiques.

A l'opposé, Les métabolites secondaires sont des molécules qui ne participent pas directement au développement des plantes mais plutôt interviennent dans les relations avec les stress biotiques, abiotiques ou améliorent l'efficacité de reproduction (Buchanan C, 2007), ils sont impliqués dans les voies métaboliques primaires spécifiques à certaines organismes végétaux.

Des nombreux métabolites secondaires jouent des rôles essentiels dans les relations entre les plantes et leur environnement (participent à la filtration des UV, les pigments floraux sont essentiels aux processus de pollinisation, etc.), Ils sont des molécules qui sont aussi très utiles pour l'homme, comme colorants, arômes, antibiotiques, herbicides, drogues etc.

1- Les composés phénoliques :

1-1- Définition

Les composés phénoliques ou Les polyphénols sont des molécules organiques synthétisées par les végétaux lors du métabolisme secondaire, possédant un ou plusieurs cycles aromatique, avec un ou plusieurs groupes hydroxyle (Liu RH, 2004).

Ils constituent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales. On les trouve, d'une manière générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes: racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruit (Dehak K, 2013).

Les polyphénols jouent un rôle important dans les interactions de la plante avec son environnement physico-chimique et biotique en particulier dans les relations avec les micro-organismes symbiotique ou pathogène (Macheix et *al.*, 2005).

En plus de leur rôle dans les plantes, les composés phénoliques dans notre alimentation offrent des avantages pour la santé associés à un risque réduit de maladies chroniques, possèdent des propriétés anti-inflammatoires, antiallergiques, antioxydants et protègent contre les maladies dégénératives comme les maladies cardiaques et le cancer (Gani A et *al.*, 2012).

1-2- La biosynthèse des composés phénoliques

La synthèse des composés phénoliques suit généralement deux voies:
La voie de l'acide shikimaïque et la voie de l'acide malonique (figure 01).

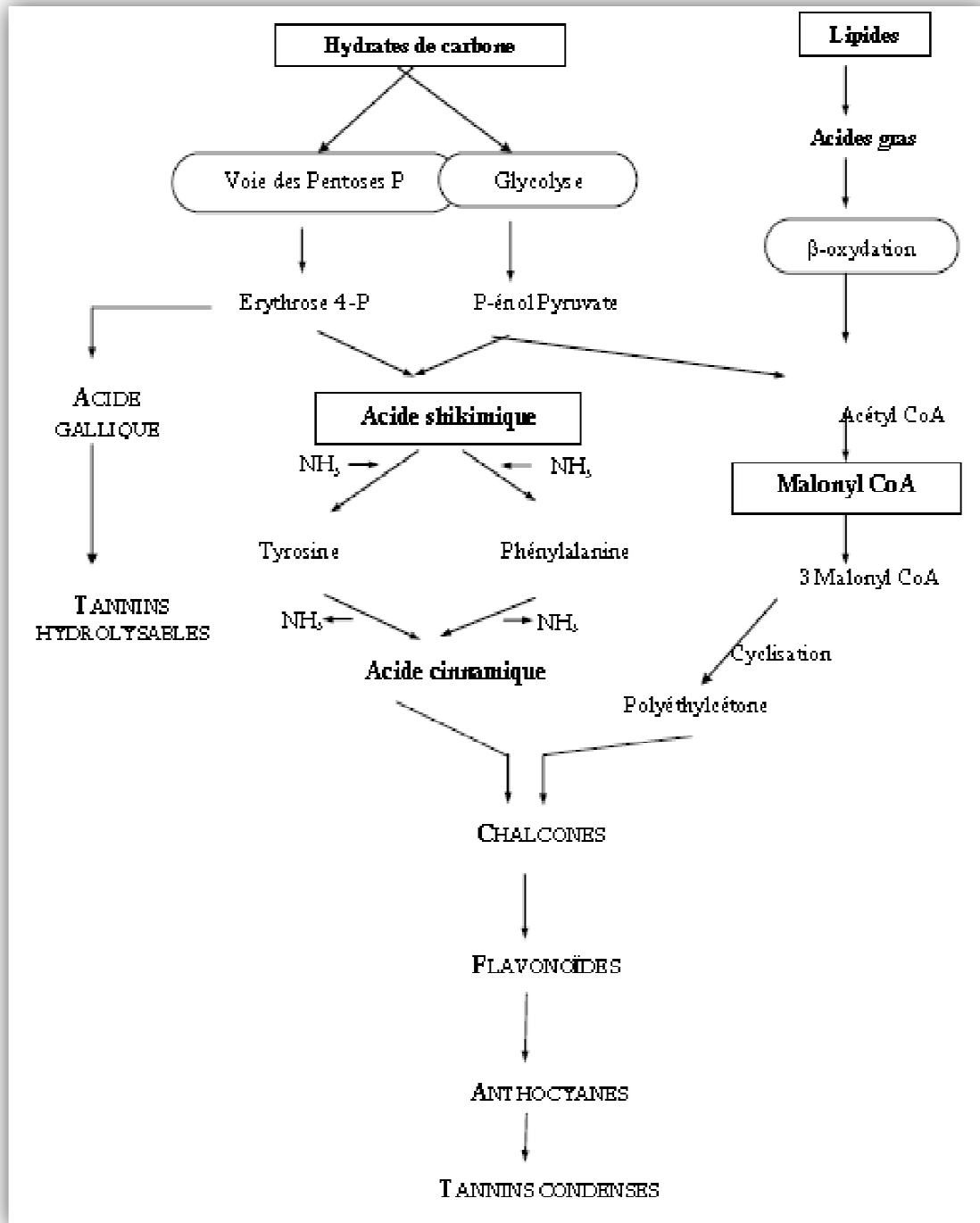


Figure 01 : Biosynthèse des composés phénolique (Akroum S, 2011).

1-3- Les principales classes des composés phénoliques

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

- La complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées).
- Le degré de modifications de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation).
- Les liaisons possibles de ces molécules de base avec l'autre molécule (glucides, lipides, protéine, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques).

Il existe plusieurs classifications des composés phénoliques.

D'après Merghem Rachid (2009) les composés phénoliques classés en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique liée au noyau benzénique. On distinguera :

- Les dérivés en C6 C1.
- Les dérivés en C6 C3 ou phenylpropanoïdes.
- Les composés en C6 C3 C6 sont les plus importants.

Tableau 01 : Principale classe des composés phénoliques (Merghem R, 2009).

Nombre de C	Classe	Exemples/origine
C6	Phénols simples	Hydroquinone, catéchol
C6 - C1	Acide phénols	Acide salicylique, Acide <i>p</i> -(OH) benzoïque
C6 - C3	Acide cinnamique Coumarines Phénylpropènes	Acide caféique, férulique (café, pomme) Esculétine, scopolétine (citron) Eugénol (giroflie)
(C6 - C3)2	Lignane	Pinorésinol (pin)
(C6 - C3) n	Lignines	Bois, noyau des fruits
C6 - C3 - C6	Flavonoïdes Isoflavonoïdes Anthocyanes	Apigénine, lutéoline, quercétine (fruits) génistéine (soja, pois) pélagonidine, cyanidine et delphinidine (fleur, fruits rouges)
(C6 - C3 - C6) 2	Biflavonoïdes	Amentoflavone
(C6 - C3 - C6) n	Proanthocyanes (tannins)	Procyanidines, Prodelphinidines (raisin rouge)

2- Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des substances phénoliques qui représentent un large groupe des métabolismes secondaires des plantes, ils sont produits dans toutes les parties de la plante et sont largement distribués dans les aliments et les boissons de la plante (Crozier *et al.*, 2006).

Les flavonoïdes sont des pigments végétaux solubles dans l'eau responsables de la coloration des fleurs, des fruits, parfois des feuilles. La coloration due à la présence de flavonoïdes est généralement la coloration jaune, sont synthétisés au niveau des chloroplastes puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles.

Leur structure comprend de deux cycles aromatiques (A et B) reliés par une chaîne carbonée, généralement organisée comme un hétérocycle oxygéné (C).

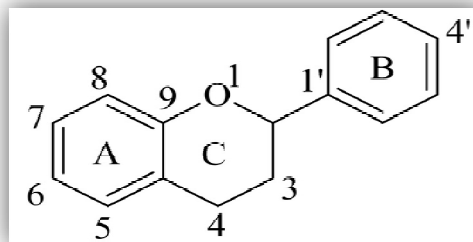


Figure 02 : Structure de base des flavonoïdes (Karabin M, 2015).

2-2- Biosynthèse des flavonoïdes

Les flavonoïdes résultent de la condensation de trois groupements acétates (fournis sous forme d'acétyl CoA) avec l'acide 4'(OH) cinnamoyl-CoA, cette condensation conduit à la formation de 2 noyaux benzéniques A et B réunis par une chaîne de 3 atomes de carbones (hétérocycle C). La chalcone synthase ou flavone synthase est un complexe multi-enzymatique comprenant trois sites, chacun d'eux assurent successivement l'addition des unités malonates, l'accepteur est l'acide *p*-(OH) cinnamique ou l'acide caféique.

Les flavonoïdes sont synthétisés au niveau des chloroplastes à partir de cinnamoyl-CoA (provenant du réticulum endoplasmique). Certaines molécules flavoniques quittent les chloroplastes et s'accumulent dans les vacuoles (anthocyanes).

Selon le degré d'oxydation de l'hétérocycle formé en général par condensation avec un OH phénolique du noyau A et la chaîne latérale de l'acide cinnamique, on distingue un grand nombre de variétés de flavonoïde.

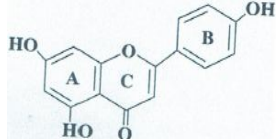
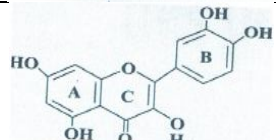
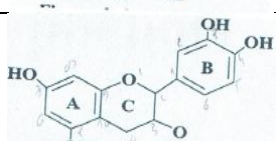
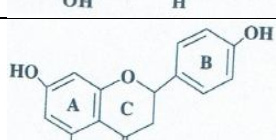
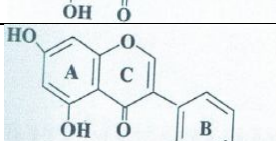
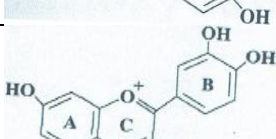
Leurs différentes modalités de synthèse à partir des chalcones (hydroxylation des noyaux aromatiques, méthylation, degré d'oxydation de la chaîne médiane) sont encore imparfaitement connues. La formation des isoflavonoïdes résulte d'une transposition secondaire du noyau aromatique (Merghem R, 2009).

2-3- Classification des flavonoïdes

Plus de 5000 variétés de flavonoïdes ont été identifiés et peuvent classer selon leur structure sur la base du degré de substitution et l'oxydation (Yao LH *et al.*, 2004).

Les flavonoïdes prédominants sont le plus souvent divisés en six sous-classes : Les flavones, les flavonols, flavan-3-ols, les flavanones, les isoflavones et anthocyanidines (Karabin M *et al.*, 2015).

Tableau 02 : Les principales classes des flavonoïdes (Karabin M *et al.*, 2015).

Classe	Structure	Exemple
Les flavones		Apigénine
Les flavonols		Quercétine
Flavan-3-ols		Catéchine
Les flavanones		Naringénine
Isoflavonones		Génistéine
Anthocyanidines		Cyandine

2-4- Intérêts thérapeutiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont été décrits comme agent de promotion de la santé avec des effets biologiques *in vitro* et éprouvés, telle que :

➤ **Activité antioxydant :**

Les flavonoïdes ont la capacité de piéger les radicaux libres, générées par notre organisme en réponse aux agressions de notre environnement et qui favorisent le vieillissement cellulaire (Karbin M et *al.*, 2015).

Parmi ces flavonoïdes : la rutine.

➤ **Activité anti-inflammatoire :**

Les flavonoïdes sont des agents protecteurs contre les inflammations chroniques, la Production excessive d'activateur de tissus en particulier les prostaglandines.

Les flavonoïdes inhiber les enzymes clé implique dans biosynthèse de ces activateurs tissulaires (Karbin M et *al.*, 2015).

Parmi ces flavonoïdes nous citons la lutéoléine.

➤ **Activité anticancéreux :**

Ils excitent des agents anticancéreux dans les flavonoïdes qui sont capable d'inhiber la prolifération des cellules tumorales et participe activement à inhiber la carcinogénèse dans la phase initiales (Karbin M et *al.*, 2015).

Parmi ces flavonoïdes : la quercitrine.

➤ **Activité cardiovasculaire :**

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, les flavonoïdes jouer un rôle clé dans la réduction du risque de développer des maladies cardiovasculaires.

Parmi ces flavonoïdes nous citons les flavonones.

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

Chapitre 2

Les céréales

Introduction

Les céréales sont un groupe de plantes cultivées appartenant à la famille des Poacées. Cette famille, parmi toutes celles du règne végétal, occupe une place à part, non seulement par le nombre de ses espèces, 9000, mais encore son ubiquité, sa répartition et son intérêt humain, historique comme économique (Guignard et Dupont., 2004; Alais *et al.*, 2003).

De plus les Poacées fournissent les éléments indispensables à la nourriture, soit directement par leurs céréales, soit indirectement par les espèces fourragères apportant, par le biais de l'animal, les protéines dont nous avons besoin (Guignard, 2004).

Les grains alimentaires appartiennent à une dizaine d'espèces végétales. Les plus employées sont: le blé, le riz et le maïs. A cela il faut ajouter les céréales devenues secondaires actuellement: orge, seigle et triticales (Alais *et al.*, 2003).

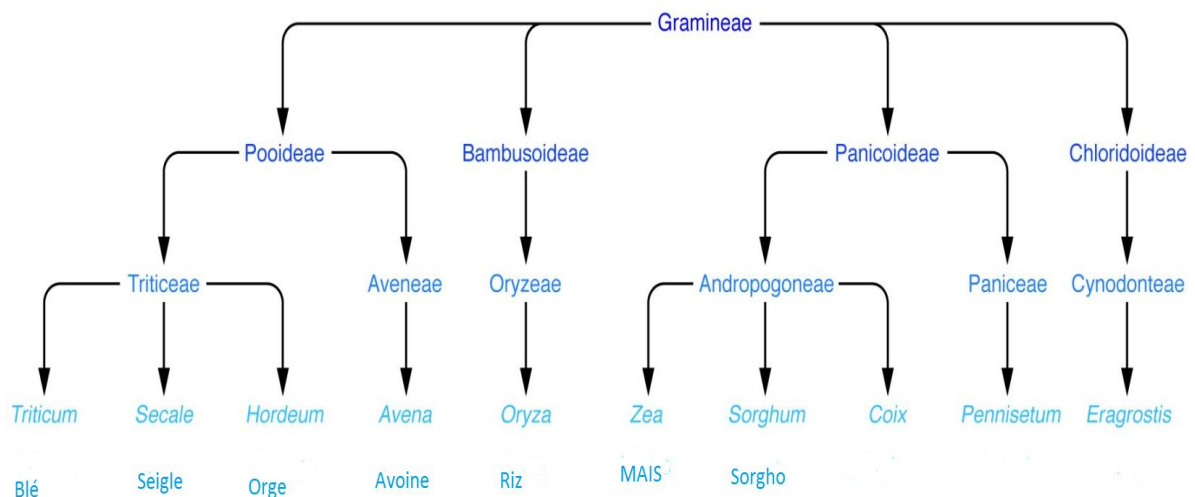


Figure 03 : taxonomie des céréales (Belitz H.D *et al.*, 2009).

Les céréales, le blé en particulier occupe une place importante dans la production agricole et constitue la nourriture de base pour 35% de la production mondiale.

De toutes les plantes cultivées, le blé est celle qui a pris le plus d'importance dans l'alimentation de l'être humain. À l'échelle mondiale avec celle du riz et du maïs. Actuellement, plus de 600 millions de tonnes de blé sont produites chaque année dans le monde.

En Algérie, les produits céréaliers occupent une place stratégique dans le système alimentaire et dans l'économie nationale.

1- La production des céréales en ALGERIE

La production des céréales spécialement le blé, jachère comprise, occupe environ 80% de la superficie agricole utile (SAU) du pays, La superficie emblavée annuellement en céréales se situe entre 3 et 3,5 million d'ha. Les superficies annuellement récoltées représentent 63% des emblavures. Elle apparait donc comme une spéculation dominante (Djermoun A, 2009).

La couverture des besoins de consommations des céréales (blés et orge) est assurée à hauteur de 37,7 % par la production nationale au cours de la période 1995-2004. L'offre domestique demeure encore faible, le taux d'autosuffisance se situe au environ de 28,4 % pour les blés (moyenne de 1995 /2004). La satisfaction de la demande intérieure est assurée alors essentiellement par les importations, à la hauteur de 72% environ pour les blés et à 30,4% en moyenne pour l'orge.

Tableau 3 : Production et importation des céréales en Algérie (MADR, Alger, 2013).

PRODUIT		
	PRODUCTION	IMPORTATIONS
BLÉ	2 953	5 757
MAÏS	1	2 019
ORGE	2 203	131
AVOINE	96	-
RIZ (ÉQ. BLANCHI)	-	74
CÉRÉALES (TOTAL)	5 253	7 986

2- Le blé

Le blé est une plante annuelle de la classe des monocotylédones, qui appartient au genre *Triticum* de la famille des Gramineae. C'est une céréale dont le grain est un fruit sec et indéhiscent, appelé caryopse, constitué d'une graine et de téguments. Les deux espèces les plus cultivées sont le blé tendre *Triticum aestivum* et le blé dur *Triticum durum* qui se différencient par leur degré de ploïdie et par leur nombre de chromosomes (feuillet, 2000).

-Blé dur : tetraploïde (4×7 chr) : sa se caractérise par épis denses dont les grains riches en gluten, servent a fabriquer les pates alimentaires.

-Blé tendre : hexaploïde(6×7 chr) : sa se caractérise par épis assez larges et a grains riches en amidons, nécessaire a la fabrication du pain (Lesage V, 2011).



Figure 04 : Blé tendre et blé dur (Lesage V, 2011).

2-1- Classification

Tableau 04 : Taxonomie du blé.

Embranchement	Angiospermes
S/Embranchement	Spermaphytes
Classe	Monocotylédones
Ordre	Glumiflorales
S/Ordre	Comméliniflorales
Famille	Gramineae
Tribu	Triticeae
S/Tribu	Triticinae
Genre	Triticum

2-2- Le cycle de développement du blé

2-2-1-Période végétative

Celle-ci comprend elle-même trois phases :

- la phase semis-levée; La germination d'une céréale se traduit par la sortie des racines séminales de la coléorhize et, à l'opposé, par la croissance d'une préfeuille, la coléoptile. Celui-ci sert de manchon protecteur et perforateur du sol pour la première feuille qui sera fonctionnelle et percera le sommet du coléoptile peu après l'apparition de ce dernier au niveau du sol.
- la phase levée-début tallage; Dès que la première feuille a percé l'extrémité de la coléoptile, celui-ci s'arrête de croître et peu à peu se dessèche. Cette première feuille fonctionnelle s'allonge, puis apparaît une deuxième, puis une troisième, puis une quatrième feuille.
- la phase début tallage-début montée : Le tallage est caractérisé par l'entrée en croissance de bourgeons différenciés à l'aisselle de chacune des premières feuilles : il s'agit donc d'un simple processus de ramification (Moule C, 1971).

2-2-2- Période reproductrice ou de la « Montée»

Celle-ci comporte 3 phases principales :

- la phase de formation des ébauches (primordial) d'épillets; 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).
- la phase de spécialisation florale; 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.
- la phase de 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 (Moule C, 1971).

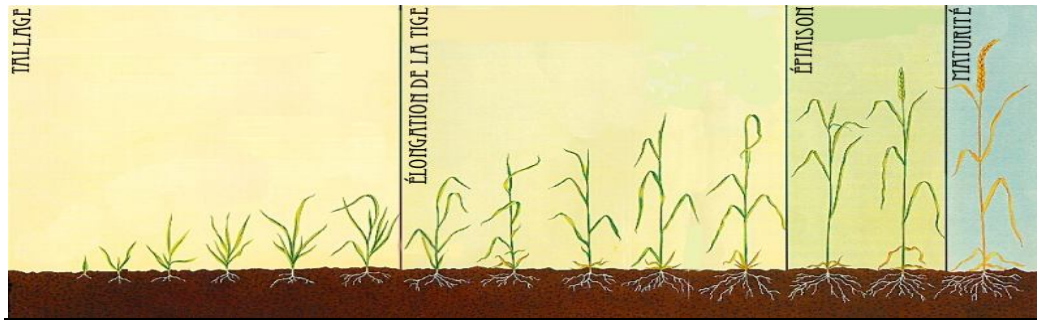


Figure 05 : Le cycle de développement des céréales (Moule C, 1971). .

3- Description

3-1- graine

Un grain de blé est formé de trois régions :

- **l'albumen** : constitué de l'albumen amylicé (au sein duquel subsistent des cellules remplies de granules d'amidon dispersées au milieu d'une matrice protéique et dont les parois celluloses sont peu visibles) et de la couche à aleurone (80-85% du grain).

- **les enveloppes** : de la graine et du fruit, formées de six tissus différents, épiderme du nucelle, tégument séminal ou testa (enveloppe de la graine), cellules tubulaires, cellules croisées, mésocarpe et épicarpe (13-17 %).

- **le germe** : (3 %) composé d'un embryon (lui-même formé de la coléoptile, de la gemmule, de la radicule, du coléorhise et de la coiffe) et du scutellum.

Le grain de blé possède un sillon résultant d'une invagination des téguments vers l'intérieur du grain, sur toute sa longueur et du côté du germe ; les faisceaux nourriciers de la graine au cours de son développement sont localisés au fond de ce sillon (Lesage V, 2011).

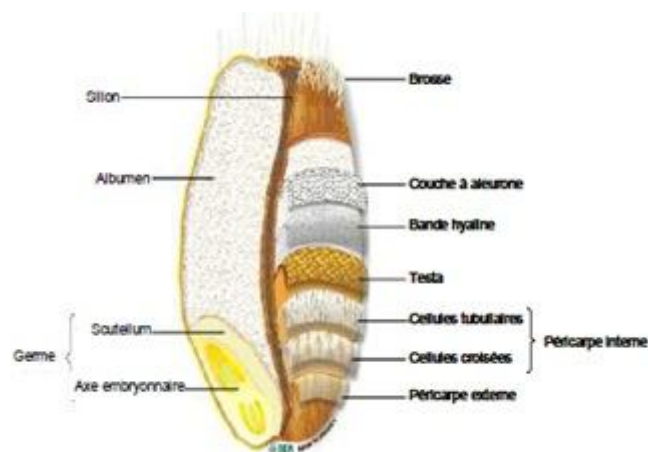


Figure 06 : Histologie du grain de blé (Suiget et Barron., 2005).

3-1-1- Composition biochimique

Il est constitué majoritairement d'amidon qui représente environ 70% de la matière sèche du grain et qui est situé dans l'albumen. Les protéines représentent entre 10 et 15% de la matière sèche et se retrouvent dans tous les tissus du grain de blé avec une concentration plus importante dans le germe et la couche à aleurone.

Les pentosanes (polysaccharides non amylicés) représentent quant à eux entre 2 et 3% de la matière sèche et sont les principaux constituants des parois cellulaires de l'albumen.

Tableau 05 : Composition chimique d'un grain de blé (Feuillet, 2000).

	Eau (%)	Glucides totaux (%)	Matière protéique (%)	Matière grasse (%)	Matière minérale (%)
Blé entier	13	68-72	10	1,5-2	1,7-2,1
Enveloppe	13	65-68	17-19	4-5	6-7
Amande farineuse	13	74-76	9-12	0,7-1	0,4-0,5
Germe	13	37-43	22-32	15-18	4-5

3-2- Feuilles : (herbe de blé)

L'herbe de blé est, récolté avant la phase de floraison quand il atteint 20-38cm. Cette plante a une grande valeur nutritionnelle : 3,5g d'herbe contient 860mg de protéines, 18,5 mg de chlorophylles, 15mg de calcium, 38mg de lysine, 7,5mg de vitamine c, et un nombre de micronutriments comme le complexe de vitamine B et les acides aminées.

Il est très riche en flavonoïdes et en composés phénoliques et également, carbohydrates, saponines (Satyavati et *al.*, 2011).

3-3- Les principaux composés phénoliques identifiées chez le blé :

Tableau 06 : Les composés phénoliques rapportés chez le blé.

	Composées phénoliques	Référence
Grain de blé	Acide hydroxybenzoïque	Jonnala S <i>et al</i> , 2010. Jonnala S <i>et al</i> , 2010. Matilla <i>et al</i> , 2005. Kim <i>et al</i> , 2006.
	Protocatéchine	
	p- hydroxybenzoïque	
	Salicylique	
	Vanillique	Kim <i>et al</i> , 2006.
	Acides hydroxycinnamique	Kim <i>et al</i> , 2006. Kim <i>et al</i> , 2006. Zhou <i>et al</i> , 2004. Hahn <i>et al</i> , 2005. Abdel <i>et al</i> , 2006. Dykes L <i>et al</i> , 2007.
	Syringique	
	Férulique	
	Caféique	
	Cinnamique	
Flavonoïdes		
Anthocyanes	Abdel <i>et al</i> , 2006.	
Flavones	Dykes L <i>et al</i> , 2007.	
Feuille de blé	Flavonoïdes	Peterson <i>et al</i> , 2001.
	Apigénine	
	Luteoline	
	Tricine	
	Kaempferol	
	Quercétine	

Chapitre 3

Les propriétés biologiques de blé

Introduction

Le terme nutraceutique est une combinaison entre 'nutrition' et 'pharmaceutique'. créé par Stephen DeFlice en 1989, selon lui nutraceutique est un aliment ou une partie d'un aliment qui fournit des avantages médicaux, y compris la prévention ou le traitement d'une maladie. (Saikia et *al.*, 2011).

Ces produits peuvent varier de nutriments isolés, des compléments alimentaires, à des aliments génétiquement modifiés, les produits à base de plantes et les aliments transformés tels que les céréales.

Il y a beaucoup de confusion concernant la terminologie comme 'nutraceutique', 'aliment fonctionnelle', 'complément alimentaire', 'aliments'. La ligne de séparation est mince dans leur utilisation interchangeable par différentes personnes dans différentes occasions (Neelam C et *al.*, 2011).

1- Importance des grains :

Le blé est l'un des principaux grains dans le régime alimentaire d'un grand nombre de la population du monde, et par conséquent peut jouer un rôle important dans la qualité de la nutrition, le régime alimentaire et la santé humaine.

Le grain complet et le son de blé sont une importante source d'antioxydants et de fibres alimentaires (Linhardet et *al.*, 2008).

Les acides phénoliques libres ou estérifiés ont un grand potentiel à être bénéfique pour la santé humaine.

1-2- 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.

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 phytochimiques relevés dans les céréales complètes inhiberait directement ou indirectement ces deux facteurs.

Les études ont montré que l'apport en flavonoïdes dans le régime alimentaire est inversement corrélé à la mortalité par maladies cardio-vasculaires.

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 antioxydantes, anti-thrombogène, anti-inflammatoire, et hypolipidémique propriétés, et les apports élevés flavonoïdes sont pensés pour 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'angiogenèse et pour induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses (Chen et Chen., 2013).

1-3- Le diabète

Des études épidémiologiques 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 2. Les indications fournies par les études d'observation et les évaluations cliniques vont dans le sens d'une amélioration de la glycémie chez les personnes atteintes de diabète, tandis que, chez les non-diabétiques, la consommation de céréales complètes pourrait faire baisser le taux d'insuline à jeun et réduire la résistance à l'insuline.

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 de l'objectif de rat (Mok et Lee., 2013).

La quercétine a également été démontrée pour être un inhibiteur de glycogène phosphorylase, enzyme clé dans la régulation de glycogenmetabolism.

L'inhibition de cette enzyme est considérée comme étant bénéfique dans le traitement de type II le diabète (Kantsadi et al., 2014).

2-4- Le contrôle du poids corporel

D'après les données qui tendent actuellement à s'imposer, la consommation de céréales complètes pourrait aider à atteindre et conserver un poids corporel équilibré. Certaines études montrent que les personnes qui intègrent des céréales complètes à leur diététique personnelle ont, à terme, un moindre risque de prendre du poids. L'application d'un régime riche en céréales complètes est statistiquement associée à un indice de masse corporelle et à un poids moins élevés, à un tour de taille moins important et à une réduction du risque de surcharge pondérale. L'importance de la consommation de céréales complètes va de pair avec la probabilité de mener un mode de vie plus sain.

Parmi les mécanismes évoqués pour expliquer que les céréales complètes puissent contribuer au contrôle du poids corporel, il convient de citer le renforcement et la prolongation de la sensation de satiété (régulation de l'apport énergétique par repas, pour une réduction de l'apport quotidien), ainsi que l'allongement du processus de vidange gastrique, qui retarde le retour de la sensation de faim. (Kurasawa S et al., 2000).

2- Importance de l'herbe de blé (feuilles de blé)

Depuis toujours, les plantes sont utilisées pour soulager les symptômes de plusieurs maladies.

Malgré les technologies avancées dans la médecine moderne, les plantes apportent une grande contribution grâce à leurs antioxydants naturels (Seyed hossein zendehbad., 2014).

Il existe une relation entre la biosynthèse des composés phénolique et la photosynthèse. La chalcone synthase est un enzyme condensant qui dépend de la lumière et qui est active par la photosynthèse. Elle synthétise les premiers composés phénoliques, du coup on déduit l'importante relation entre la chlorophylle et les composés phénolique.

L'herbe de blé a plusieurs effets bénéfique comme :

- Améliore le sommeil
- Régulateur naturel de la glycémie et la tension artérielle
- Améliore la digestion et l'élimination des toxines
- Guérit les ulcères et des maladies dermatologiques comme les hémorroïdes, eczéma, brulures et thalassémie.
- Retarde le vieillissement des cellules : l'herbe de blé contient beaucoup de vitamines : A , C , et E qui sont des antioxydants et retardent le vieillissement des cellules du corps qui cause des problèmes au niveau du cerveau et du cœur.
- bénéfique pour plusieurs maladies : anémie, diabète, cancer, constipation, grippe ... etc.



Figure 07 : Produit de l'herbe de blé.

2-1- Cancer :

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

L'herbe de blé contient le Sélénium qui a une activité anticancéreuse. Il renforce le système immunitaire et réduit le risque du 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 de blé est riche en chlorophylle qui est une fibre alimentaire très important.

La molécule de chlorophylle dans l'herbe de blé est presque identique a l'hémoglobine dans le sang de l'humain, la différence consiste en l'élément centrale : dans la chlorophylle c'est le Magnésium et dans l'hémoglobine c'est le fer. C'est pour ça l'herbe de blé est appelé 'le sang vert' (De vogel J et al, 2005).

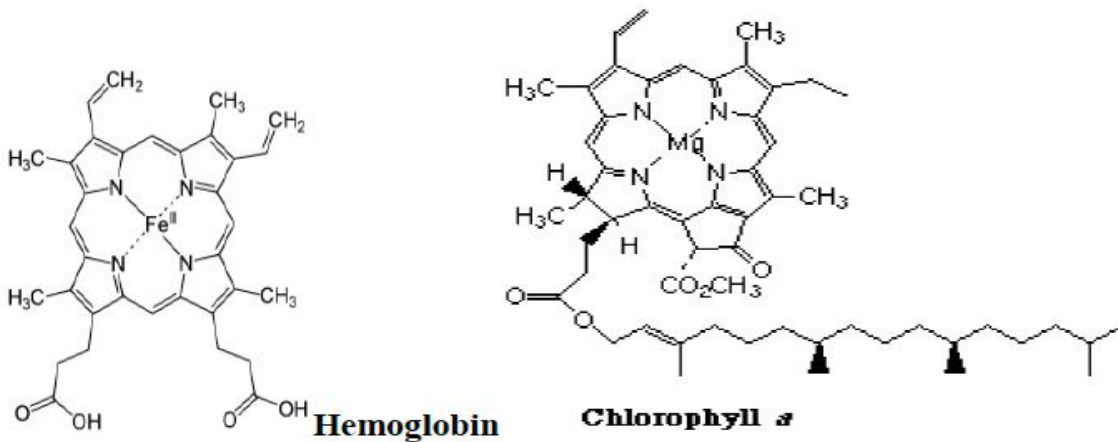


Figure 08 : Structure de l'hémoglobine et la chlorophylle.

2-3- Le jus d'herbe de blé :

Le jus d'herbe de blé contribue fortement a la reconstitution du système immunitaire grâce a tous ses nutriments. il procure au sang le fer nécessaire a une bonne circulation et favorise la digestion et la stabilisation du taux de sucre dans le sang.

Entre autres, la chlorophylle est très efficace dans les cas de troubles chroniques, favorisant l'élimination des dépôts et toxines accumulés au cours des années dans notre organisme. Elle contribue à une purification du foie, des poumons et du colon, favorisant ainsi une cicatrisation rapide. (Satyavati R *et a.*, 2011)

Excellent régénérateur du sang et du corps, la chlorophylle a la capacité de dégénérer un environnement défavorable à la croissance et au développement des bactéries.



Figure 09 : Le jus d'herbe de blé.

Chapitre 4

Les propriétés antioxydantes des flavonoïdes

Introduction :

Notre corps est en lutte permanente contre le vieillissement et la maladie. La science se penche de plus en plus sur les antioxydants, sans qui la vie serait tout simplement impossible. Leur efficacité aujourd'hui reconnue pour prévenir de nombreuses maladies graves : cancer, Parkinson, Alzheimer, diabète, etc. La vie moderne, avec son procession de stress, de pollution et de difficultés met à rude épreuve les défenses de l'organisme. Nous sommes de plus en plus nombreux à en subir les conséquences. C'est pourquoi, il est indispensable d'apporter jour après jour, à notre corps, les précieux éléments dont il a tant besoin pour être au mieux de sa forme et de son équilibre (Line M, 2010).

1- L'oxygène et les 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.

Un radical libre est une espèce chimique neutre ou chargée. Dont la couche externe possède un ou plusieurs électrons non appariés (radical) et capable d'exister seule en tant que telle (libre) (Mandelker L, 2008).

Tableau 07 : Origine des radicaux libres (Mandelker L, 2008).

l'origine des radicaux libres	
Exogènes	Endogènes
-xénobiotiques -rayon UV, X, Gamma - tabac -pollution -métaux	-la chaine respiratoire mitochondriale -le système de défense immunitaire

L'extrémité des chaînes d'ADN de nos cellules sont particulièrement exposées aux attaques des radicaux libres. Leur dégradation est responsable du vieillissement cellulaire prématuré et par voie de conséquence de certains cancers.

Les radicaux libres agissent un peu comme la rouille sur le métal, en s'attaquant aux tissus et aux cellules, en accélérant ainsi leur vieillissement (Céline C, 2004).

Tableau 08 : Les radicaux libres centrés sur l'oxygène (Céline C, 2004).

Radicaux libres centrés sur l'oxygène	
radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$	Il naît de la combustion des sucres et des graisses.
radical hydroxyle OH^{\cdot}	Il résulte de l'action du rayonnement solaire sur notre peau, notamment quand celui-ci n'est pas bien filtré par la couche d'ozone. Il peut aussi être synthétisé par réaction du fer ou du cuivre avec la vitamine C, c'est à ce radical que l'on attribue la plupart des lésions du vieillissement
radical peroxyde d'azote $ONOO^{\cdot}$	Il est produit à partir de l'azote par les globules blancs, ces cellules contenues dans le sang et dont le principal rôle est de protéger l'organisme contre les infections.
Monoxyde d'azote NO^{\cdot} , peroxyde d'alkyle	Sont d'autres radicaux libres qui interviennent à différents niveaux.

L'augmentation de la production des radicaux libres entraînant le stress oxydatif.

2- Le stress oxydant :

Le stress oxydant peut se définir comme un déséquilibre dans la balance entre peroxydant (Producteurs de radicaux libres) et antioxydants (protection contre les radicaux libres) au profit des premiers ; conduisant à des altérations cellulaires et tissulaires. L'ADN, les lipides membranaires, ou encore les protéines seront des cibles privilégiées de ces oxydations.

Ce déséquilibre est dû, soit à une surproduction d'espèces radicalaires, soit à un affaiblissement des défenses antiradicalaires de l'organisme (Rueff D, 2011).

3- Les antioxydants :

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés

phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydants sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$) et superoxydes ($\text{O}_2\cdot$) (Bartosz G, 2003).

Les différents types des antioxydants sont démontrés dans la figure suivante :

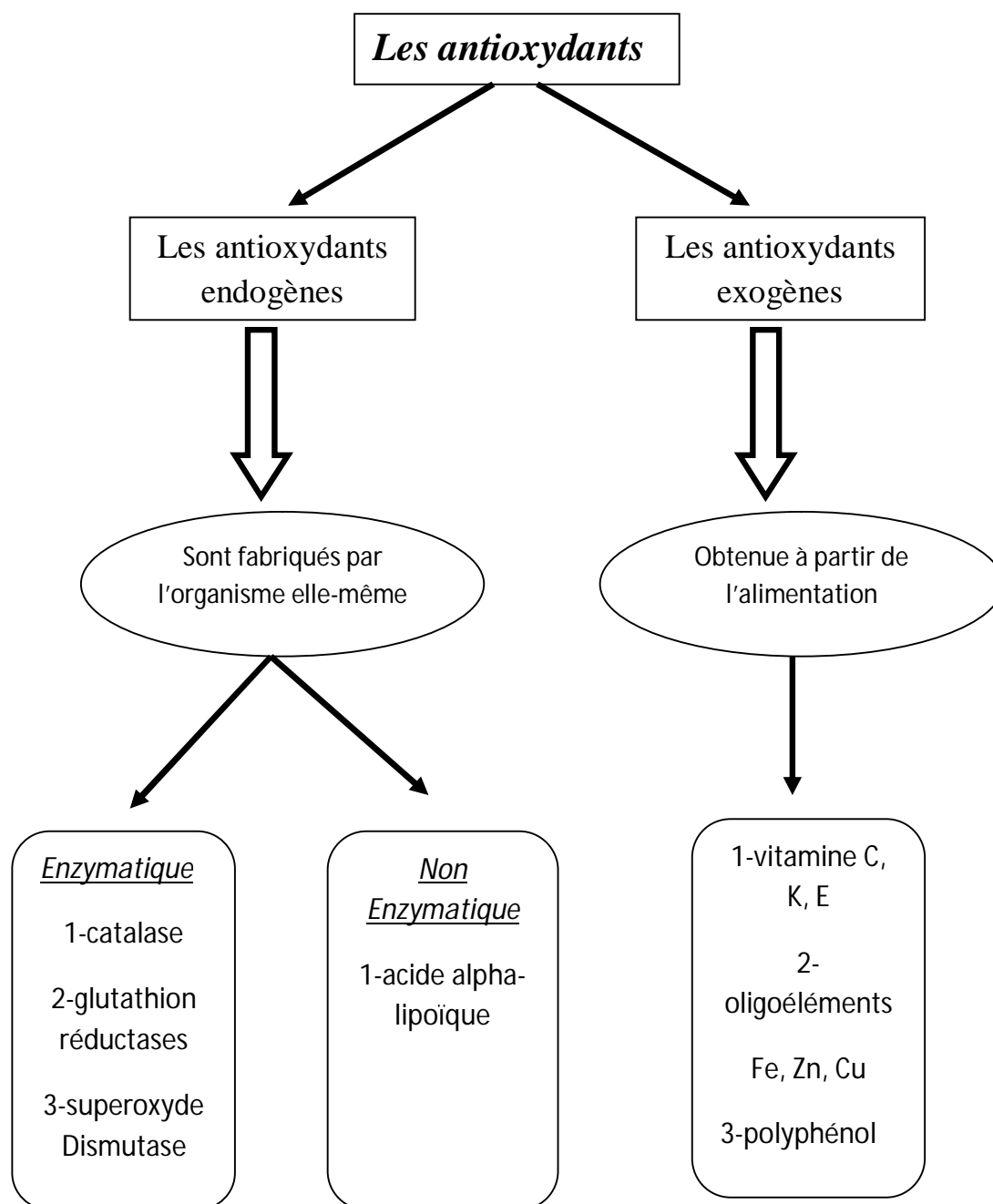


Figure 10 : Les différents types des antioxydants (Bartosz G, 2003).

4- Propriétés antioxydants des flavonoïdes :

Parmi les antioxydants secondaires obtenus à partir de l'alimentation on a les polyphénole 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).

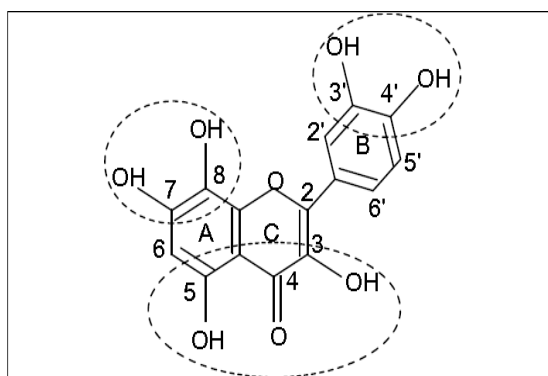
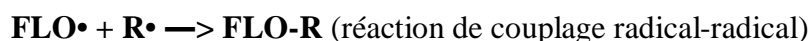


Figure 11 : Caractéristiques structurales des flavonoïdes avec une activité de piégeage des radicaux libre (Zeghad N et Merghem R., 2013).

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).



Les références bibliographiques

- [1] Line Martin, Les Antioxydants: Des substances débordantes de santé, Dangles, 2010.p175
- [2] **Lesgards, J.F. (2000)**. Contribution à l'étude du statut antioxydant de l'homme ; aspectchimiques et biochimique. Thèse de doctorat, 19-20.
- [3] **Corrine, A. (2010)**.Stress oxydatif, calcium et thermalisme.Press.Therm.Climat.147 (2) :121-138
- [4] Mandelker, L.(2008).Introduction to oxidative andmitochondrial dysfunction. Vet Clin : Small Anil Practice. F. r. Oxidative stress : the role of mitochondria, and antioxydants, Elsevier Inc.38 : 2-30.
- [5] Cao G, Alessio H, Cutler R, Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants , Free Radic Biol Med, vol. 14, no 3, 1993, p. 303–11
- [6] Les secrets de santé des antioxydants Céline Causse p15 Alpen Editions s.a.m., 2004 - 95 pages 6
- [7] Bonnefont-Rousselot D., Therond P. et. Delattre J., 2003.Radicaux libres et antioxydants.Ed :Flammarion Médecine-Sciences PP ,59-81
- [8] D. Rueff, Mieux que guérir, les bénéfices de la médecine intégrative", Ed° Lyon, 2011 Se reporter à [son site](#).
- [9] Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* **1995**, 22, 375-383.
- [10]. Bartosz G. Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology* **2003**, 9, 5-21.
- Amić D., Davidović-Amić D., Bešlo D. et Trinajstić N.** 2003. Structure–Radical scavenging activity relationships of flavonoids. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA.*, **76** (1) : 55-61.

Chapitre 5

Matériels 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 :

1-1- Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans notre étude consiste en quatre échantillons de grains de blé (voire tableau) dans deux blés durs et deux blés tendres.

Le matériel végétal : les graines (2015) nous a été fournies par l'institut Technique des Grandes Cultures (ITGC) d'El-khroub Constantine.

Tableau 09 : Les espèces des blés étudiées.

Variété	Espèce
Blé dur <i>Triticum durum</i>	Cirta
	Waha
Blé tendre <i>Triticum aestivum</i>	Hidhab
	Arz

Notre travail est réalisé en deux parties pour les quatre échantillons.

a. Isolement du germe

Nous avons procédé à l'isolement des germes.

Comme première étape, nous avons mis les grains dans de l'eau distillée pendant 24H, ensuite, on à isoler les germes avec un scalpel, ces germes ont été séchés à l'air libre puis broyés.

Dans le tableau 10 nous avons résumé les quantités nécessaires pour l'obtention de 10 grammes de germe pour les quatre échantillons étudiées.

Tableau 10 : Rendement des grains pour l'obtenir 10g de germe.

Blé dur	Cirta	133g
	Waha	80g
Blé tendre	Arz	100g
	Hidhah	82g

b. Les feuilles

Nous avons semé les graines de quatre échantillons le 13 mars 2015, dans des pots rectangulaires installés dans la serre au Biopol à Chaabet Erssas, Université Mentouri Constantine (figure 12, 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 12, B).

Le 08 avril 2015 nous avons procédé à la récolte qui consiste à couper toute la partie aérienne et on laisse sécher à l'air libre puis broyer à l'aide d'un mortier jusqu'à l'obtention d'une poudre fine (Figure12, C).



A



B



C

Figure 12 : Les différentes étapes pour l'obtention de poudre végétale étudié.

c. Le son de blé

Le déchet de son de blé de la variété blé dur a été fourni par la minoterie Amour Benamor Guelma (2015).

2- Extraction :

2-1- Extraction solide-liquide

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

❖ Extraction par macération

10g des feuilles de blé (herbe de blé), et 100g de son ont été extraits dans un 500ml du solvant hydroalcoolique (éthanol/eau, 70/30), on laisse le mélange macéré à l'air libre pendant 72 heures successifs avec changement de solvant chaque 24H (500ml+300ml+200ml) et agitation de temps en temps. Ensuite le mélange est filtré sur un papier filtre. Les filtrats obtenus sont évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif.

❖ Extraction au Soxhlet

L'extraction hydroalcoolique de germe a été préparée à l'aide d'un Soxhlet.

10g de germe de blé broyé à l'aide d'un mortier, extraits dans un 500ml d'une solution éthanolique aqueuse (éthanol/eau, 70/30). Le matériel végétal est placé dans une cartouche qui sera exposée au solvant d'extraction à une température d'évaporation, après environ 4h d'extraction la cartouche est retirée et le 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 -Éthyle -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 100ml de l'extrait et on ajoute un même volume 100ml de 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). Pour chaque solvant (chaque partition), on

refait deux fois cette opération pour un entraînement optimal des groupes polyphénoliques séparés.

Les phases éther de pétrole ne renfermant 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 5ml) pour l'étude phytochimique.

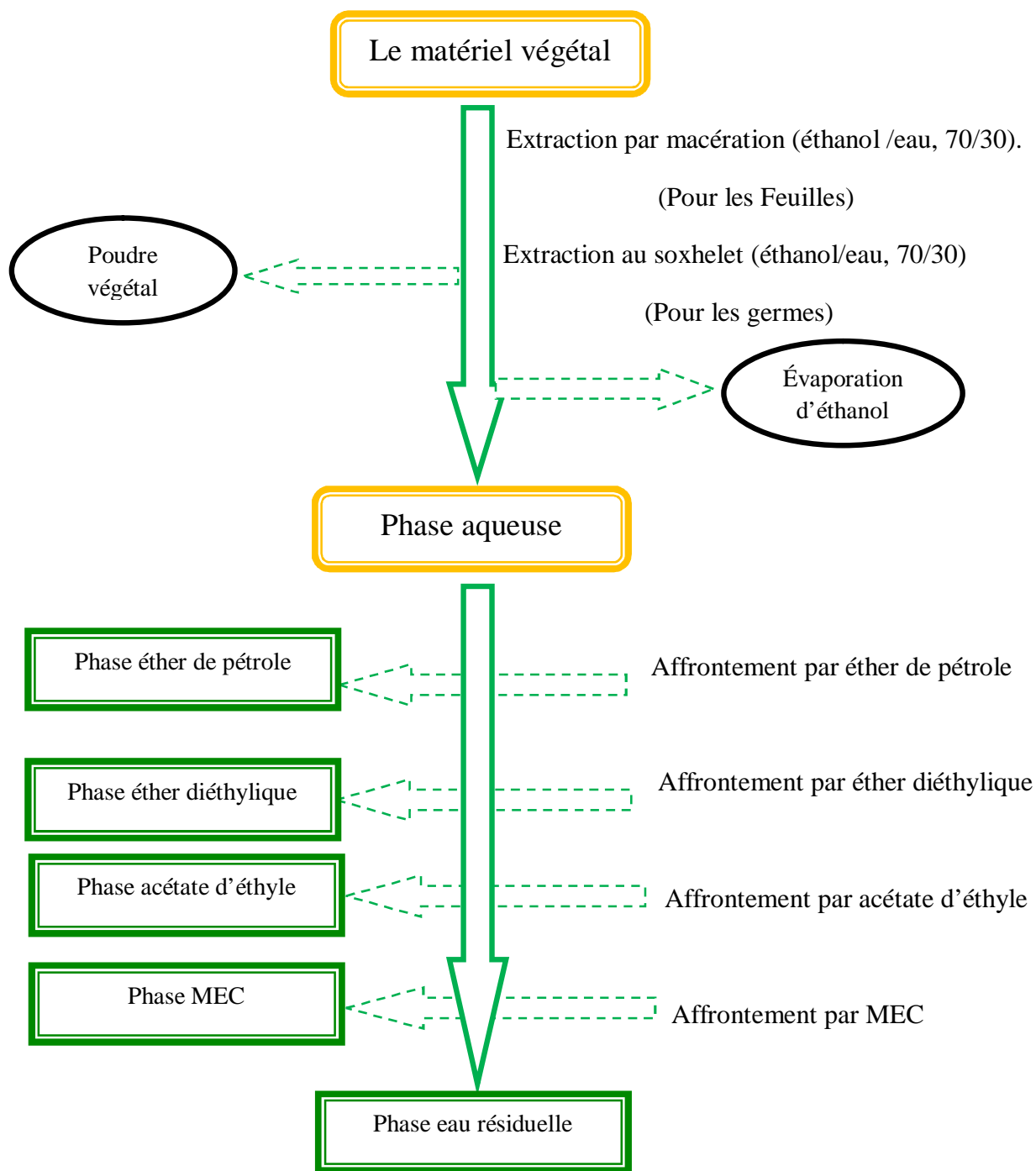


Figure 13 : Protocole d'extraction des flavonoïdes (Merghem R, 2009).

3- Aspect quantitatif :

3-1- dosage des polyphénols

Parmi les méthodes de quantification des composés phénoliques, 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 un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). 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
- Après 10 minutes, 2ml de carbonate de sodium (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 (0,2 µg/ml) à différentes concentrations : 100% ,80%,60%,50%,30%,10%, dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage.

3-2-Dosage des flavonoides

Les flavonoïdes contenus dans les extraits éthanoliques sont estimés par la méthode d'AlCl₃ (Ayoola *et al*, 2008).

a. Protocole

- 1ml d'une solution éthanolique d'AlCl₃ (2%)
- 1ml de l'extrait
- 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 quercétine (0,1 µg/ml) à différentes concentrations : 100% ,80%,60%,50%,30%,10%, dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage.

4- Aspect qualitatif :

4-1- La chromatographie analytique sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une méthode simple et 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 plaques pré-étalées de gel de polyamide (DC6), ces dernières sont préparées en mélangeant 11 g de poudre de polyamide dans 55 ml d'éthanol, après étalement du gel sur des plaques 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 pour la CCM de gel de polyamide.

Les systèmes essayés:

- o Toluène /Métyléthylcétone /éthanol / éther du pétrol: 40/ 30/ 30/ 7.
- o Toluène /Métyléthylcétone /méthanol / éther du pétrol: 40/ 30/ 30/ 7.

Le système choisi :

- o Toluène /Métyléthylcétone /méthanol / éther de pétrol: 40/ 30/ 30/ 7.

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 analyte en même endroit, cette pratique permet de concentrer l'analyte (figure 14).

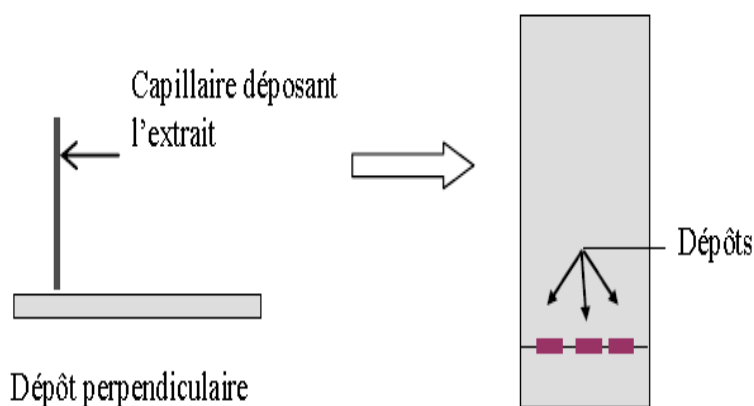


Figure 14 : Mode de dépôt pour une CCM.

D / Développement des plaques :

Chaque 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 des plaque :

-à l'œil nu

-la lampe UV (254/365) : on place les plaques 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 la composition moléculaire dans un solvant alcoolique ou aqueux permettait de mentionner les premières indications concernant la substitution de la molécule (Tableau 11).

La valeur de Rf est définie comme suit :

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

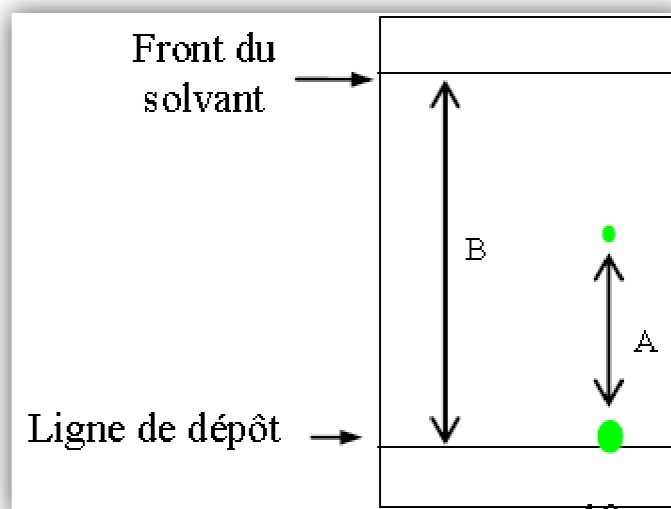


Figure 15 : Le rapport frontal (Rf).

Tableau 11 : Relation entre Rf et la structure (Yaou., 2001).

Structure flavoniques	Rf (rapport frontal-facteur de rentention)
Augmentation des OH	Diminution du Rf dans un 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 12 : La relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes (Lahouel M., 2005).

Spot coloré	Types de flavonoïdes
Noir	Flavonols 5, 6, 7, tri OH libres Flavonols 5, 7, 8, tri OH libres
Brun noir	3-OH absent ou 3-OH substitué
Violet	Flavones 5-OH et 4' OH Flavones 3-OR et 5 OH ,4'-OH Flavones 6 ou 8 OH Chalcones Dihydroflavonols Isoflavones Flavanones
Bleu claire (fluorescent)	Flavones sans 5-OH libre Flavonols sans 5-OH libre avec 3 OH substitué
Jaune terne Jaune Fluorescence orangée	Flavonols 3- OH libre avec ou sans 5-OH libre
Jaune vert brillant	5 OH libre ou 5 OH substitué
Jaune fluorescent	Flavonols avec 3OH libres Aurones Chalcone flavanones
Jaune pâle	dihydroflavonols

4-2- La spectrophotométrie UV-Visible :

C'est une technique qui permet de compléter les informations apportées par le comportement chromatographique et la fluorescence du produit à identifier.

Les spectres 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 présente un maximum d'absorption entre 300 et 385 nm, elle correspond à l'absorption du système cinnamoyl qui fait intervenir la conjugaison du groupement CO de l'hétérocycle central avec le noyau B.

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

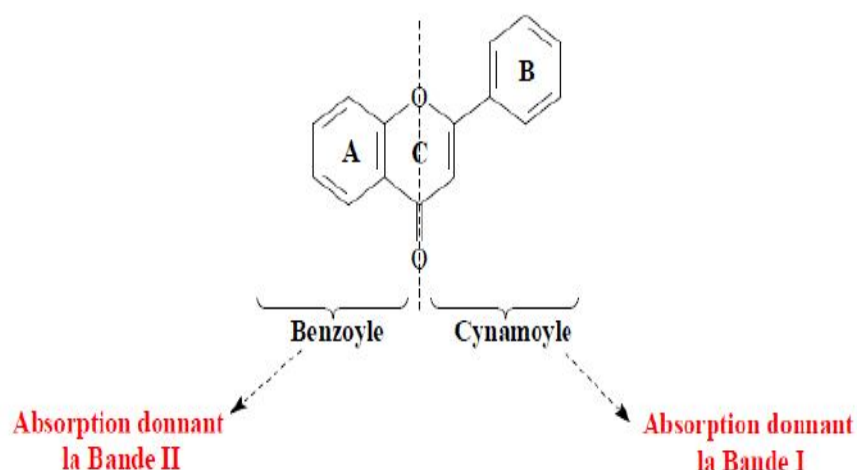


Figure 16 : Spectre d'absorption d'un flavonoïde (Khelfallah A, 2013).

Tableau 13 : Caractéristiques des spectres UV-V des flavonoïdes (Markham, 1982).

Bande II	Bande I	Type des flavonoïdes
250-280	310-350	Flavones
250-280	330-360	Flavonols (3-OH substitué)
250-280	350-385	Flavonol (3-OH free)
245-275	310-330 320 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 antioxydante par piégeage des radicaux libres, c'est-à-dire l'activité antiradicalaire.

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

a- Principe

Le composé chimique 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques.

Le DPPH est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH• est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH•, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (Molyeneux P, 2004).

Dans le cas des composés phénoliques (Φ -OH), le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH• alors transformé en une molécule stable DPPHH :

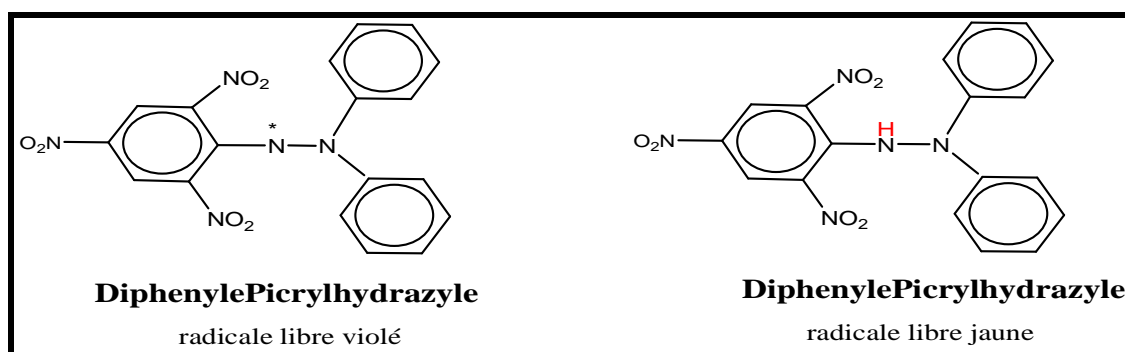
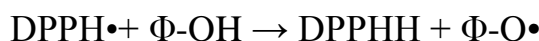


Figure 17 : Forme libre et réduit du DPPH (Parejo L, 2002).

b- Protocole

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

On a préparé une solution méthanolique de DPPH° 0,004%, puis on met 3ml de réactif de DPPH° dans des tubes et on a ajouté 0,1ml de chaque phase et on attend les résultats.

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

Chapitre 6

Résultats et interprétations

Résultats et interprétations

Notre travail a porté sur l'étude quantitative et qualitative des composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes par des méthodes utilisées au niveau de laboratoire de Biologie Micro-Moléculaire et Phytochimie.

1- Aspect quantitatif

1-1- Dosage des polyphénols totaux :

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

Le contenu phénolique total de nos extraits a été estimé à partir de la courbe d'étalonnage $Y=0,0308X-0,5222$ (Y = l'absorbance, X = concentration de la solution acide gallique, $\mu\text{g/ml}$) (Figure 18). La teneur en phénols totaux est rapportée en μg d'acide gallique/10 mg d'extrait de plante. La densité optique de chaque espèce mesurée à la longueur d'onde de 765nm.

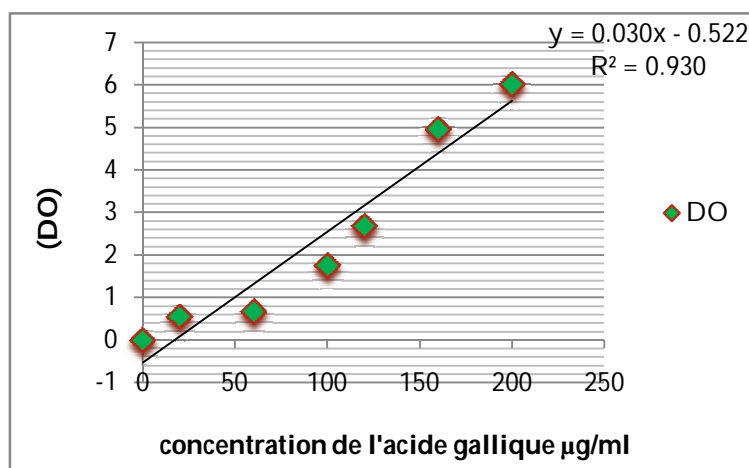


Figure 18 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

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

Tableau14 : Teneur en phénol totaux des extraits.

	feuille				germe	
	Cirta	Waha	Hidhab	Arz	Waha	Arz
Concentration de phénols totaux (mg/ml)	51,28±0,015	56,85±0,007	57,13±0,016	62,80±0,004	17,42±2,124	20,07±0,002

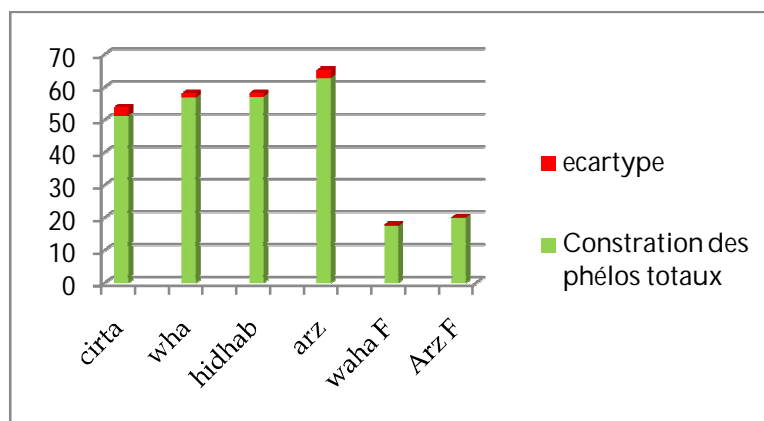


Figure 19 : Teneur en phénols totaux d'extraits.

1-2- Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de tri- chlorure d'aluminium (AlCl₃).

La quercitine a été utilisée comme standard et les valeurs ont été calculées selon la courbe d'étalonnage ($y=0,0123x+0,0453$; $R^2= 0,9891$; x est l'absorbance ; y est la concentration de la solution de la quercitine, $\mu\text{g/ml}$). La teneur en flavonoïde est rapportée en μg de la quercitine/ 10mg d'extrait de plante. La densité optique de chaque espèce est mesurée à la longueur d'onde de 420nm.

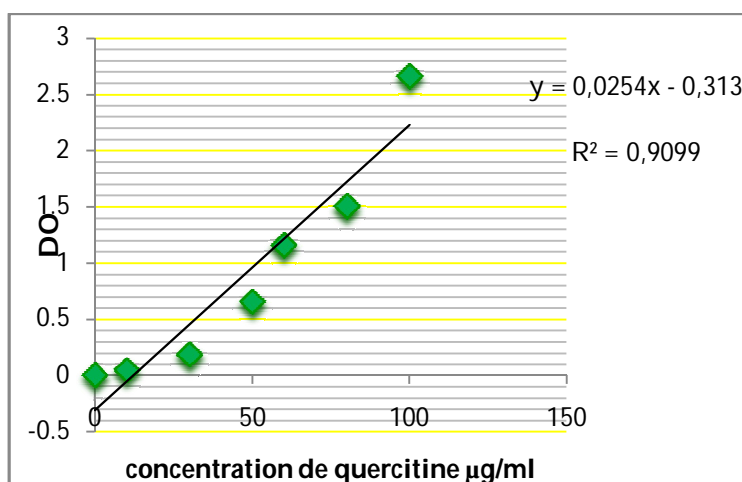
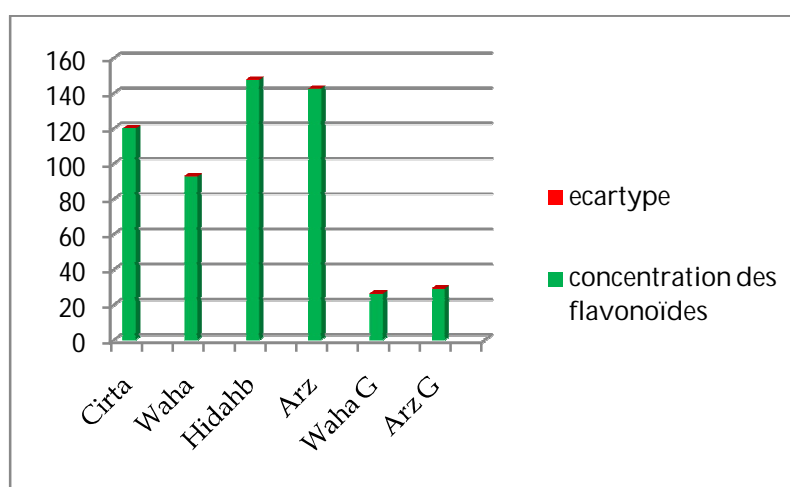


Figure 20: Courbe d'étalonnage de la quercitine.

1-2-1 Teneur en flavonoïdes d'extraits éthanolique

Tableau 15: Concentration des flavonoïdes des extraits.

Concentration des flavonoïdes (mg/ml)	feuille				germe	
	Cirta	Waha	Hidhab	Arz	Waha	Arz
	120,02±0,046	92,54±0431	147,47±0399	142,63±0,089	26,2±0,216	29,13±0,124

**Figure 21:** Concentration des flavonoïdes des extraits.

D'après les figures 20 et 21, On observe que nos extraits sont riches en composés phénoliques et en flavonoïdes ; la teneur en composés phénoliques totaux et flavonoïdes varie d'un échantillon à un autre. Cette variation peut être expliquée par les différences qui existent dans la composition chimique entre les tissus des végétaux.

On remarque que la partie feuille renferme plus de composés phénoliques que le germe, sa peut être expliquée par l'augmentation de la concentration des composés phénoliques qui est en relation avec l'augmentation de la photosynthèse.

La teneur en composés phénoliques varie entre les échantillon. On remarque que le blé tendre contient plus de composés phénoliques que le blé dur.

Ces résultats sont proches à ceux d'Amarwicz et *al* 2002.

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

2- Résultats de l'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 faite dans le système solvant suivant : Toluène/Méthyléthylcétone/Méthanol/éther de pétrole (40/30/30/7 ; v/v/v/v) pour toutes les phases (éther di-éthylique, acétate d'éthyle, MEC).

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

Les spots sont visualiser à :

A : l'œil nu.

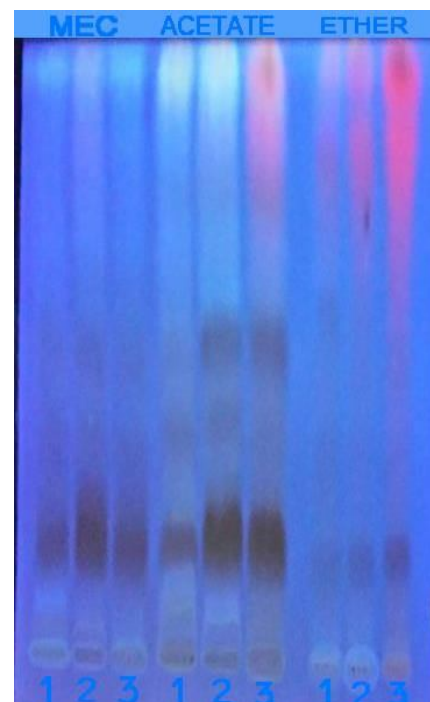
B : sous UV à longueur d'onde 365nm avant pulvérisation avec réactif de Neu.

C : à l'œil nu après pulvérisation avec le réactif de Neu.

D : sous UV à longueur d'onde 365nm après pulvérisation avec réactif de Neu.



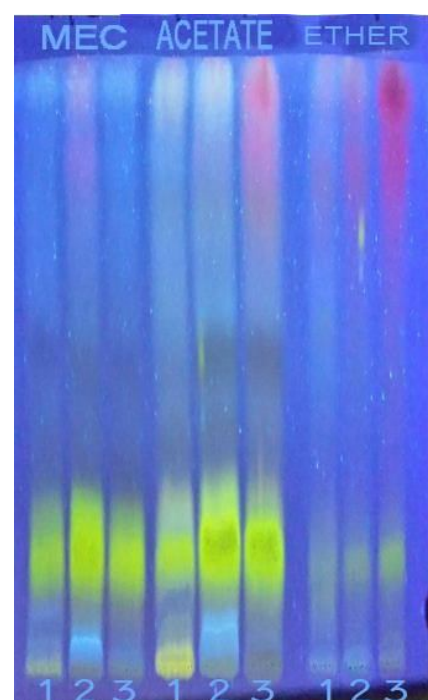
A



B



C



D

Figure 22: CCM analytique représentative des flavonoïdes des phases : éther diéthylique, acétate et MEC des 3 variétés de blé sur plaque de polyamide DC6 développés dans système solvant MEC/MeOH/EtOH/éther de pétrole : 40/30/30/7) : 1 : Hidhab, 2 : Citrta, 3 : Arz.

La visualisation des plaques sous UV 365nm permet d'observer les couleurs ainsi de mesurer les Rf des taches les plus majoritaires pour chaque variétés.

Tableaux 16: Comportement chromatographique des phases : éther diéthylique, Acétate d'éthyle et MEC des 3 variétés de blé.

Blé tendre : Arz					
Phase éther diéthylique		Phase acétate		Phase MEC	
fluorescence	Rf	Fluorescence	Rf	fluorescence	Rf
Noir violet	0,235	Noir	0,270	Noir	0,282
Rose +	0,930	Rose -	0,950	/	/

Blé tendre : Hidhab					
Phase éther diéthylique		Phase acétate		Phase MEC	
fluorescence	Rf	Fluorescence	Rf	fluorescence	Rf
Noir	0,235	Noir	0,117	Noir	0,235
Rose -	0,970	Noir violet	0,235	Bleu	0,552
/	/	Bleu blanc	0,970	/	/

Blé dur : Cirta					
Phase éther diéthylique		Phase acétate		Phase MEC	
fluorescence	Rf	Fluorescence	Rf	Fluorescence	Rf
Bleu clair	0,141	Bleu clair	0,105	Bleu	0,082
Noir	0,211	Noir	0,270	Noir violet	0,282
Violet	0,858	Bleu blanc	0,930	/	/

-Les chromatogrammes obtenus sur polyamide, présentent une bonne migration par conséquent une bonne séparation qui permet l'analyse qualitative des flavonoïdes, les spots sont bien distincts et montrent une richesse et une diversité considérable.

A l'œil nu la plaque montre plusieurs taches jaunes (jaune pâle, jaune marron).

Sous l'UV à longueur d'onde 365nm. La plaque montre des taches à différentes couleurs : noir, bleu, rose violet, bleu blanc, Après pulvérisation de plaque avec réactif de Neu, à l'œil nu on remarque l'intensification du noir.

Sous l'UV à longueur d'onde 365nm on observe que les différentes couleurs seront modifiées le noir et le violet en jaune vert, le rose en pourpre et le bleu en bleu clair fluorescent.

La réaction positive de réactif de Neu avec les molécules confirme que le blé est riche en flavonoïdes de type flavones (correspondant aux tâches violet, bleu), et flavonols (correspondant aux tâches noir). Ces résultats sont proches de ceux de Khelfallah 2013.

La chromatographie CCM d'analyse des extraits des trois variétés de blé (Figure 22), on constate que l'extrait éther diéthylique est le plus riche en composés phénoliques suivi par la phase acétate d'éthyle.

-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 d'éthyle et MEC) par un spectrophotomètre à défilement de longueur d'onde entre 220-400nm à permet de tirer les spectres suivant :

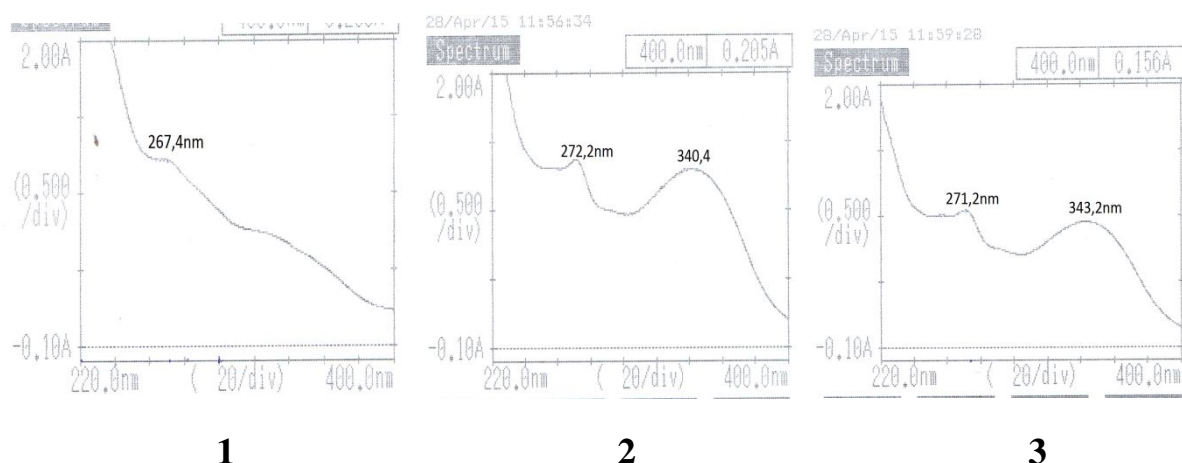


Figure 23 : Spectres UV des différentes phases de feuille de blé variété : Hidhab (1 : Ether diéthylique, 2 : Acétate d'éthyle, 3 : MEC).

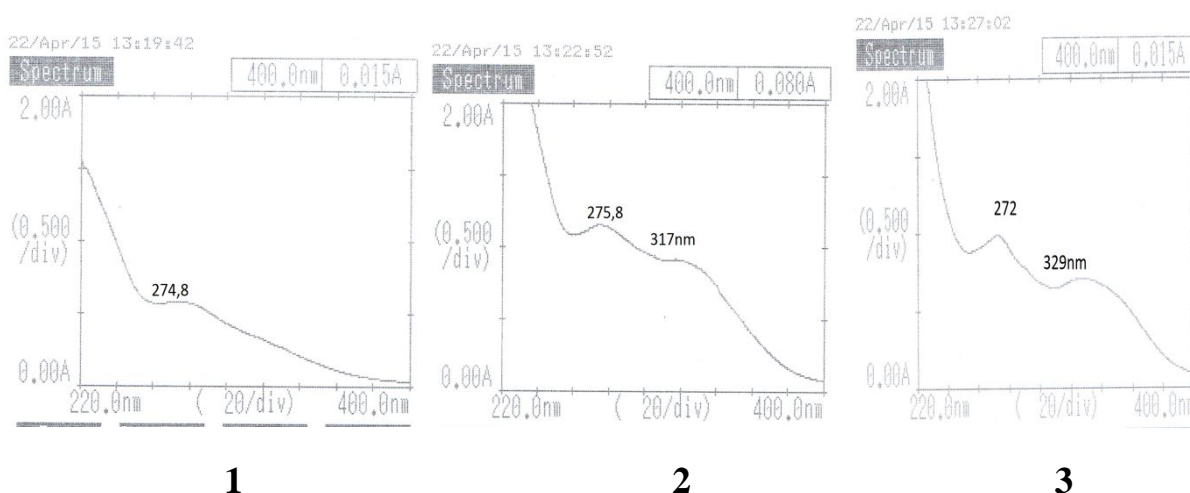


Figure 24 : les spectres UV des différentes phases de germe de blé variété : Arz (1 : Ether diéthylique, 2 : acétate d'éthyle, 3 : MEC).

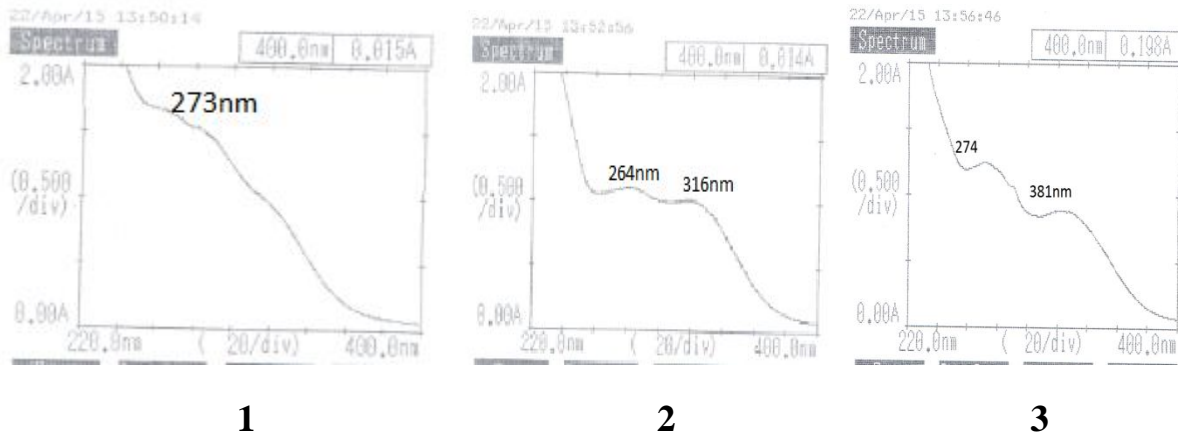


Figure 25 : les spectres UV des différentes phases de son de blé dur
(1 : éther diéthylique, 2 : acétate d'éthyle, 3 : MEC).

D'après l'analyse spectrale des phases éther, acétate et MEC, on constate que les trois plantes 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 267-273nm. 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 et MEC donnant deux pics :

- La bande I, le maxima d'absorbance entre 270-377nm, montre l'existence des flavonols dans les phases.
- La bande II dans l'intervalle 250 nm et 282 nm montre l'existence des flavonones et dihydroflavonols.

L'analyse spectrale des différentes parties de blé (feuille, germe, son) dévoile la richesse des céréales en composés phénoliques notamment les flavonoïdes.

Ces différentes parties de la plante pourront être valorisées soit en fabricant un jus à base d'herbe de blé ou en incorporant les autres parties comme le son ou le germe de blé dans d'autres aliments pour leur apporter une valeur ajoutée comme c'est le cas des yaourts enrichis en germe de blé.

Le son pourrait être soit consommé soit ajouté à d'autres aliments, les graines complet pour la fabrication de gâteaux.

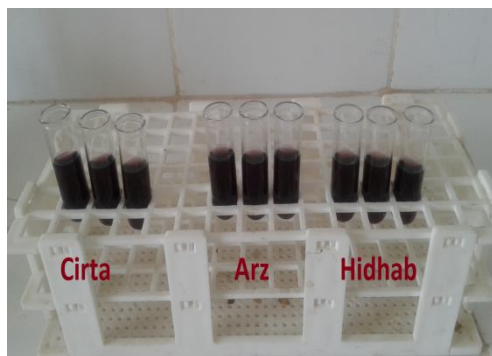
Remarque : pour les spectres des autres variétés voir annexe n=1.

3- Le pouvoir antioxydant « test au DPPH° »

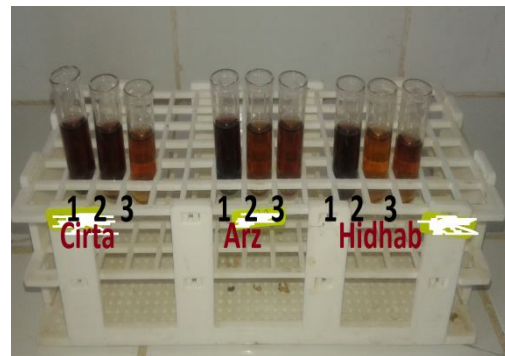
Le pouvoir antioxydant de nos différents extraits testés a été estimé par la méthode de DPPH°, qu'est un radical libre possède une couleur violette est réduit en un composé jaune. Ce changement de couleur est attribué à la présence des antioxydants.

Nos résultats sont comparés avec des composés phénoliques comme témoin : l'acide gallique, quercitrine (voir annexe n=2).

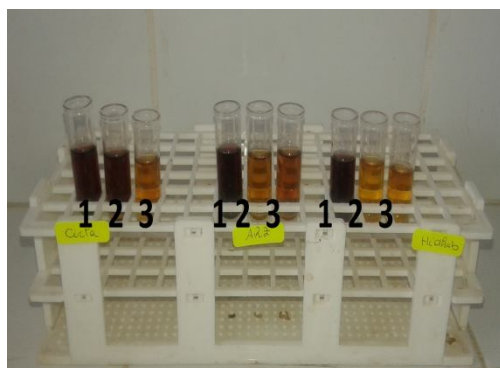
Nos résultats sont estimés à l'œil nu, on observe le changement de couleur en fonction du temps.



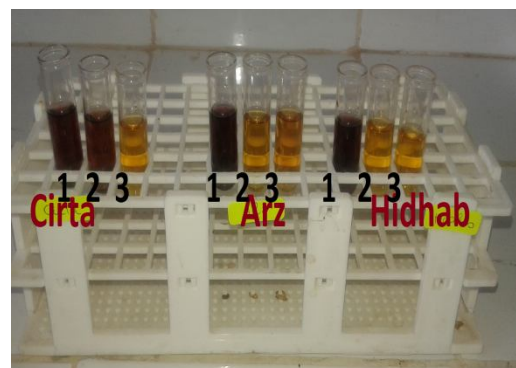
T = 0 min



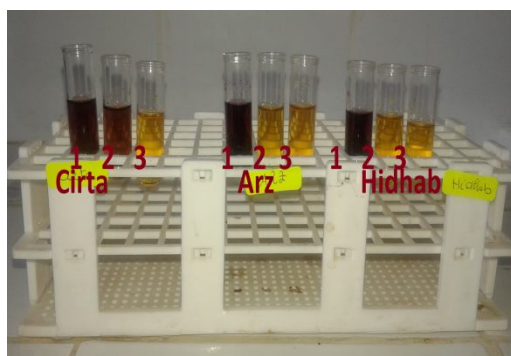
T=10 min



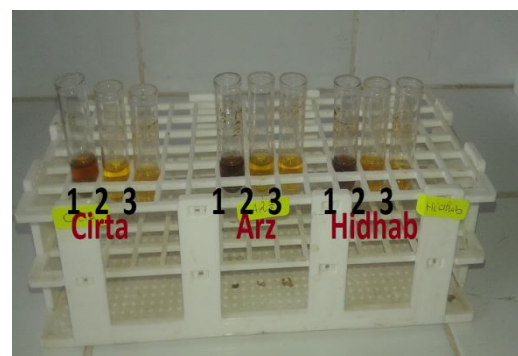
T = 20min



T = 30min



T = 45min



T= 120min

Figure 26 : Résultat de l'évaluation du pouvoir antioxydant de différent phases des variétés.

D'après la figure on observe un changement de couleur des différentes phases des variétés de blé, 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 acétate de toutes les variétés de blé change plus rapidement que les autres phases suivie par les phases MEC.

La variété Hidhab montre un changement plus rapide que les autres variétés suivies par la variété Arz.

D'après cette observation on conclut que le blé dur et le blé tendre sont riches en composés phénoliques et possèdent un pouvoir antioxydant et la phase acétate possède un pouvoir capteur des radicaux libre puissant par rapport aux deux autres phases (éther et MEC).

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Le présent travail avait pour but d'étudier la présence des composés phénoliques dans les grains et les feuilles de blé 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 le grain complet et les feuilles de blé

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 les fortes concentrations de ces produits apparaissent chez les feuilles plus que chez le germe. Nous avons remarqué que les variétés de blé tendre contiennent plus de composés phénoliques que les variétés de blé dur.

Des études phytochimiques basés sur l'extraction, la chromatographie sur couches mince et la spectrométrie de ces composée nous permettons une approche de la structure moléculaire.

Les tests effectués sur chromatographie analytique sur couche mince ont permis tout d'abord de visualiser des empreintes flavoniques de nos extraits des trois échantillons étudiés dans trois phases.

Nous avons remarqué que les phases éther diéthylique sont les plus riches en composés phénoliques suivent par les phases acétates ; la réaction positive de réactif de Neu avec les molécules confirme que le blé 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 céréaliers contre le DPPH qui est un radical stable représentant les radicaux libres existant dans les cellules animales. Nous avons remarqué que la phase acétate de toutes les variétés la couleur a été changée plus rapidement que les autres phases suivie par les phases MEC. La variété Hidadhab montre un changement plus rapide que les autres variétés suivies par la variété Arz.

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 :

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

Résumé

Résumé

Cette contribution porte sur l'étude de la composition phytochimique et l'activité antioxydante des quatre variétés de blé : blé dur (Cirta, Waha) et blé tendre (Arz et Hidhab).

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

Le dosage des phénols totaux par la méthode de folin-ciocalteu des différentes variétés et le dosage des flavonoides par la méthode d' $AlCl_3$ montrent que la teneur en phénols totaux et en flavonoïdes varie d'une variété à une autre. Cette étude quantitative indique la richesse du blé 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 antioxydante déterminée par le test DPPH a montré que le blé a un pouvoir antioxydant fort, varie d'une phase à une autre selon les composés phénoliques existants dans la phase (la phase acétate présente une activité plus forte que les autres), cette activité antioxydante est due principalement à la richesse de ses blés en flavonoides.

Mots clés : blé dur, blé tendre, composés phénoliques, flavonoïdes, activité antioxydante.

Summary

This work aims the study of phytochemical composition and antioxidant activity of the four varieties of wheat (durum wheat: cirta, Waha Wheat. Arz and Hidhab).

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

The dosage of total phenols by Folin-Ciocalteu method of different varieties and dosage of flavonoides by the method of $AlCl_3$ shows that the content of total phenols and flavonoids varies from one variety to another, this quantitative study indicates the wealth of Wheat with phenolic and flavonoid compounds.

The chromatographic analysis (CCM) on polyamide 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 wheat has a strong antioxidant power, varies from one phase to another according to existing phenolic compounds in phase (the diethylacetic phase presents a higher activity than the other) This antioxidant activity and mainly due to the wealth of wheats with flavonoides.

Key words: durum wheat, soft wheat, phenolic compounds, flavonoids, antioxidant activity.

ملخص

يركز هذا العمل على دراسة التركيبة الكيميائية والنشاط المضادة للأكسدة لأربع أنواع القمح : القمح الصلب (Waha، Cirta) والقمح اللين (Hidhab, Arz)

يتم استخراج المركبات الفينولية من أصناف أربعة وفصلها عبر مراحل مختلفة

قياس كمية المركبات الفينولية بطريقة folin-ciocalteu وقياس كمية الفلافونيدات بواسطة AICI 3 تبين أن المحتوى الإجمالي للمركبات الفينولية والفلافونيدات يختلف من نوع إلى آخر. وتشير هذه الدراسة الكمية تدل على ثراء القمح بالمركبات الفينولية و الفلافونيدات.

التحليل الكروماتوغرافي (TLC) على هلام مادة البولي أميد يدل على تنوع مكونات الفلافونويد والوفرة النسبية للفلافون ومركبات الفلافونول.

أظهر النشاط المضادة للأكسدة التي يحددها اختبار DPPH أن القمح يحتوي على مضاد للأكسدة قوي يختلف من نوع إلى أخرى وفقا للمركبات الفينولية الموجودة في المرحلة (مرحلة الاسيتات ديثيل لديها نشاط أعلى من غيرها) ويرجع ذلك أساسا إلى غني القمح بالفلافونيدات.

الكلمات الرئيسية: القمح القاسي القمح اللين، المركبات الفينولية , الفلافونيدات, النشاط المضاد للأكسدة.

Références bibliographique

Références bibliographique

Akroum S., 2011. Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse de doctort Université Mentouri de Constantine.

Amarowicz R., Zegarska Z., Pegg R.B., Karamac M., Kosinska A. (2007). Antioxidant and Radical Scavenging Activities of a Barley Crude Extract and its Fractions. *Czech J. Food Sci.* **25**: 73-80.

Amić D., Davidović-Amić D., Bešlo D., et Trinajstić N., 2003. Structure–Radical scavenging activity relationships of flavonoids. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA.*, **76** (1) : 55-61

Ayoola G. A., Ipav S., Solidiya M. O., Adepoju-Bello A. A., Coker H. A. B., et Odugbemi T. O., 2008. Phytochemical screening and free radical scavenging activities of the fruits and leaves of *Allanblackia floribunda* oliv (Guttiferae). *International journal of health research.*, **1** (2) : 81-93.

Araujo JR., Goncalves P., Martel F., 2011 . Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutr Res*;31:77–87.

Abdelkader Djermoun. ; 2009 . La production céréalière en Algérie : les principales caractéristiques *Revue Nature et Technologie.* n° 01/Juin. Pages 45 à 53.

Andreasen M.F., Christensen L.P., Meyer A.S., et Hansen., 2000. Content of phenolic acids dehydromersin 17 rye (*Secale Cereale* L.) varieties, *J.Agric. Food Chem*,48:2837,.

Abdel-Aal ES. M., Young J.C., Rabalski, I., 2006. Anthocyanin composition in black, blue, pink, and red cereal grains. *Agric. J., Food Chem*, 544696.

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

Buchanan C., 2007. Les métabolites secondaires.

Bartosz G., 2003. Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*, 9, 5-21.

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.*

C. MOULE., 1971. *PHYTOTECNIE SPÉCIALE* Tome II CÉRÉALES.

Chen AY., Chen YC., 2013 . A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chem*;138:2099–107.

Crozier A., Jaganath IB., Clifford MN., 2006. Phenols, polyphenols and tannins: An overview. In: Crozier A, Clifford MN, Ashihara H, editors. *Plant secondary metabolites: Occurrence, Structure and Role in the human diet.* Oxford: Blackwell Publishing Ltd. p. 1–24.



Références bibliographique

Dhak K., 2013. Méthodes d'extraction et de séparation des substances naturelles. Université Kasdi Merbah Ouargla.

Dykes L; Rooney L.W., 2007. Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits: Texas A&M university college station TX. PDF.

DeVogel J., Denize SML., Jonker TM., Katan MB., Meer R van der., 2005. Natural chlorophyll but not chlorophyllin prevents heme-induced cytotoxic and hyperproliferative effect in rat colon. *J Nutr*, 135: 1995-00.

Feillet P., 2000. Le grain de blé. Composition et utilisation. Edition INRA. Pp58-75; 196-198.

Gani Adil., Wani SM., Masoodi FA and Gousia Hamees., 2012. Whole-Grain Cereal Bioactive Compounds and Their Health Benefits: A Review. Department of Food Science and Technology, University of Kashmir, India.

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

Gerhauser C., Frank N., 2005. Xanthohumol, a new all-rounder? *Mol Nutr Food Res*;49:821-5.

Havsteen BH., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Therapeut*;96:67-202.

Hahn D. H., Faubion J.M., and Rooney L.W., 1983 . Sorghom phenolic acids, their high performance chromatography separation and their relation to fungal resistance. *Cereal Chem.* 60: 255, 1983. In: Phenolic Compounds in Cereal Grains and Their Health Benefits. Dykes, L; Rooney, W.L. 2007. Texas A&M University.CFW-52-3-0105.

Jonnala R.S., 2010 . Phenolics in the bran of waxy wheat and triticale.

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

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.

Kim K. H., Tsao,, R and Cui S. W., 2006. Phenolic acid profile and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect hydrolysis conditions. *Food Chem.*95: 466,2006.



Références bibliographique

Kantsadi AL., Apostolou A., Theofanous S., Stravodimos GA., Kyriakis E., Gorgogietas VA., et al., 2014. Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of *Vitis vinifera* extracts against glycogen phosphorylase. *Food Chem Toxicol*;67:35–43.

Liu M., Yin H., Liu G., Dong JJ., Qian ZH., Miao JL., 2014 . Xanthohumol, a Prenylated Chalcone from Beer Hops, Acts as an alpha-Glucosidase Inhibitor in Vitro. *J Agric Food Chem*;62:5548–54.

Line Martine., 2010. Les Antioxydants : Des substances débordantes de santé, Dangles. P 175.

Lahouel M., Boulkour S., Segueni N., Fillastre J.P., 2004. Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. *Pathologie expérimentale* 52 : 314-322.

Lahouel M., 2005. Interaction Flavonoïdes-Mitochondrie et rôle de la Propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de Doctorat d'Etat de L'Université de Constantine.

Mandelker L., 2008. Introduction to oxidative and mitochondrial dysfunction. *Vet Clin : Small Anil Practice*. F. r. Oxidative stress: the role of mitochondria, and antioxydants, Elsevier Inc.38: 2-30.

Merghem R., 2009. Elément de biochimie végétal. Ed. Bahaeddine .

Molyneux P., 2004. The use of stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26 (2), 211-219.

Mattila, P., Pihlava J. M and Hellström K., 2005. Contents of phenolic acids, alkyl and alkylesorcinols, and avenanthramides in commercial grain product *J..Agric.Food chem.*53:8290-2005.

Mazza G; Gao L ., 2005. Blue and purple grains, Pp 313-350. In: *Phenolic Compounds in Cereal Grains and Their Health Benefits*. Dyke I.3 Le seigle: *Secale cereale* Ls L & Rooney W L. (2007). Texas A&M University, CFW-52-3-0105.

Mladenka P., Zatloukalova L., Filipisky T., Hrdina R., 2010. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med*;49: 963–75.



Références bibliographique

Mok SY., Lee S., 2013. Identification of flavonoids and flavonoid rhamnosides from *Rhododendron mucronulatum* for. *albiflorum* and their inhibitory activities against aldose reductase. *Food Chem*;136:969–74.

Neelam Chaturvedi., Parul Sharma., Kalpana Shukla., Rachna Singh and Sachdev Yadav., 2011. Cereals Nutraceuticals, Health Ennoblement and Diseases Obviation: A Comprehensive Review *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 01 .

Peterson D.M., 2001. Oat antioxydants. *J.Cereal Sci* 33: 115, in Phenolic compound in cereal grains and their health benefits: Dykes, L; Rooney, L W. 2007. Texas A&M university college station TX. PDF.

Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Rosas-Romero A., Flerlage N., Burillo J., Codina C., 2002. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J Agric Food Chem*; 50: 6882–90.

Rueff D., 2011. Mieu que guérir, les bénéfices de la medecine integrative Ed° Lyon, Se reporter à son site.

Ramos S., 2008. Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol Nutr Food Res*;52:507–26.

Satyavati Rana., Jaspreet Kaur Kamboj., and Vandana Gandhi ., 2011. Living life the natural way – Wheatgrass and Health Functional Foods in Health and Disease, 444-456.

Saikia., D. and 2Deka S.C., 2011. Cereals: from staple food to nutraceuticals *International Food Research Journal* 18: 21-30.

Seyed Hossein Zendebed., Mohammad Javad Mehran., Sudhakar Malla., 2014. FLAVONOIDS AND PHENOLIC CONTENT IN WHEAT GRASS PLANT (*TRITICUM AESTIVUM*) *Asian journal of pharmaceutical and clinical research* Vol 7, Issue 4.

Thangasamy T., Sittadjody S., Burd R., 2008 . Quercetin: A Potential Complementary and Alternative Cancer Therapy. In: Watson R, editor. *Complementary and Alternative Therapies in the Aging Population: An Evidence-Based Approach*. Academic Press. p. 563–84.

Véronique lesage ., 2011. Contribution a la validation fonctionnelle du gène majeur controlant la dureté et tendresse de l'albumen du grain de blé.

Velayutham P., Babu A., Liu DM., 2008 . Green tea catechins and cardiovascular health: An update. *Curr Med Chem*;15:1840–50.



Références bibliographique

Yao LH, jiang YM, Shi J, Tomas-barbaran, Datta N, et al, 2004. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant foods Hum Nutr* 59: 113-122.

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

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

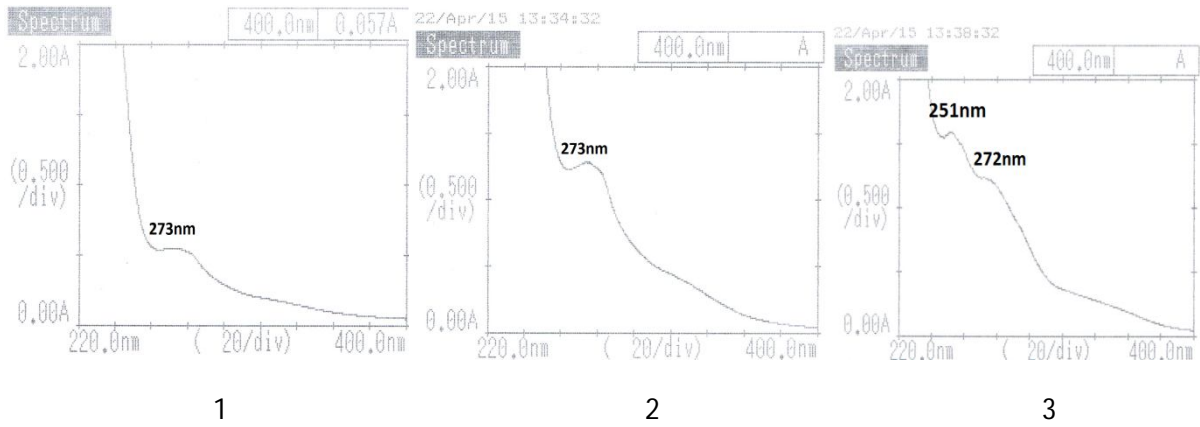
Zhu K., Zhou H., 2011. Purification and characterization of a novel glycoprotein from wheat germ water soluble extracts. *Process Biochemistry* **40**: 1469-1474.

Zhoo Z., Robards K., Helliwell S & Blanchard C., 2004. The distribution of phenolic acids in rice. *Food chem.* 87:401.2004. In *Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits*. Dykes, L; Rooney, L .W. 2007. Texas A&M university college station TX. PDF.

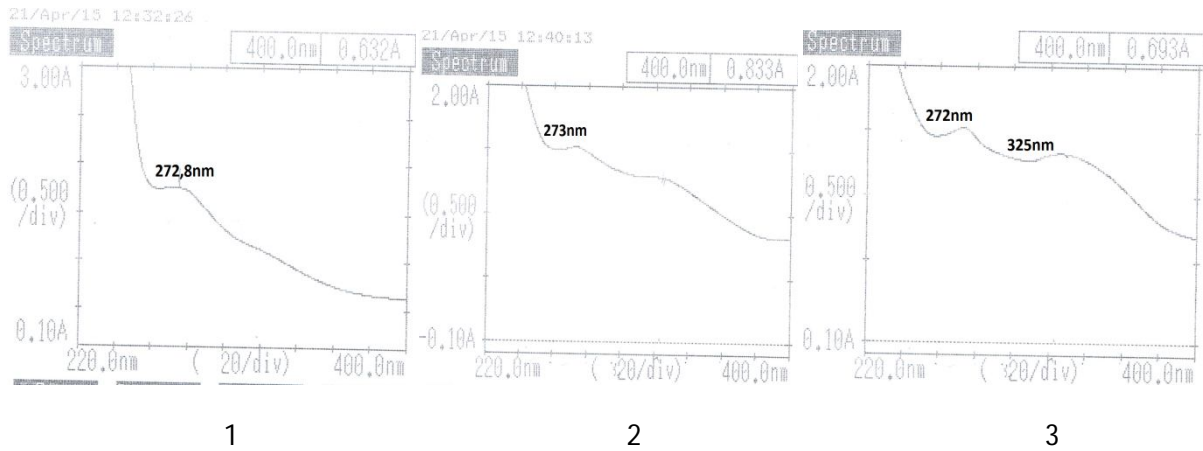


Annexes

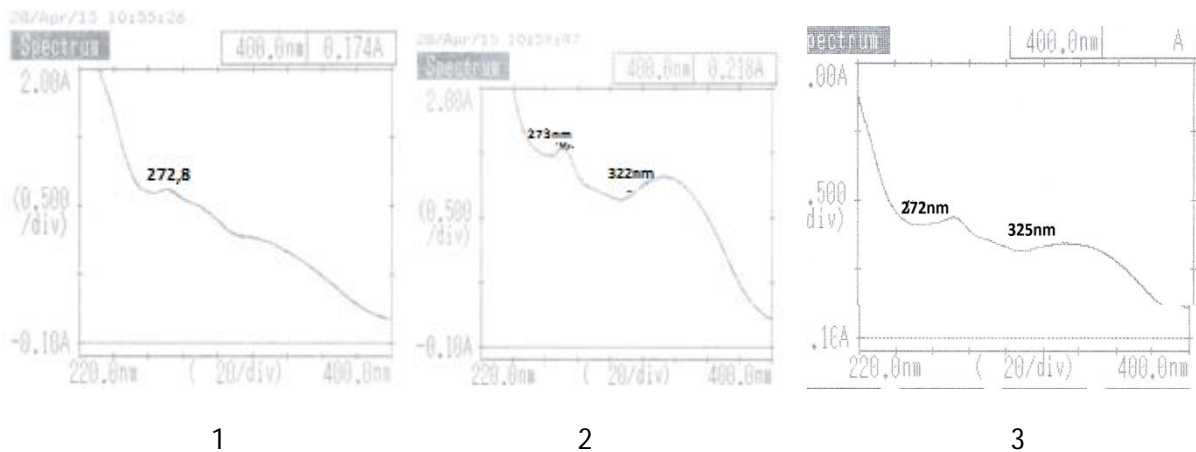
Annexe 1 : Les spectres UV des différent variétés.



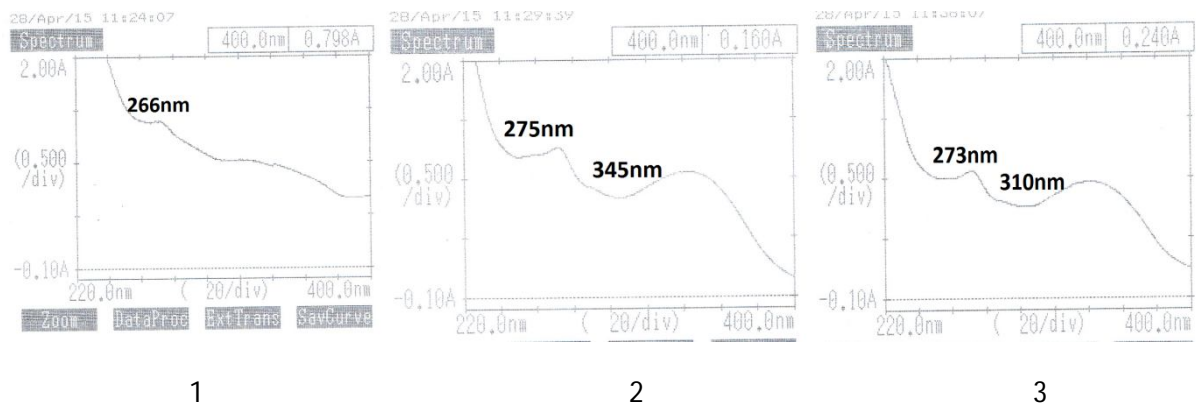
Les spectres UV des différentes phases de germe de blé variété : Hidhab (1 : Ether diéthylique, 2 : acétate, 3 : MEC).



Les spectres UV des différentes phases de germe de blé variété : Cirta (1 : Ether diéthylique, 2 : acétate, 3 : MEC).

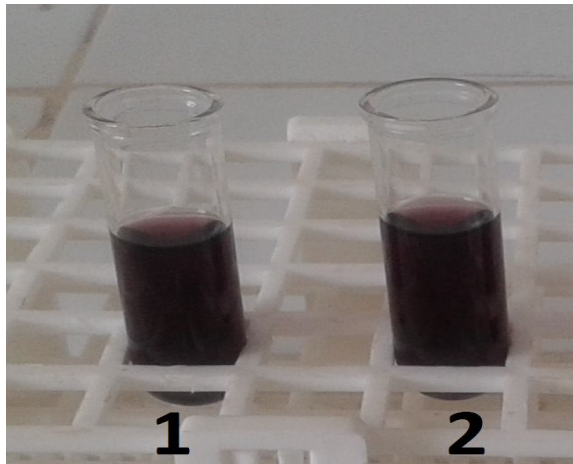


Les spectres UV des différentes phases de feuille de blé variété : Cirta (1 : Ether diéthylique, 2 : Acétate d'étyle, 3 : MEC).

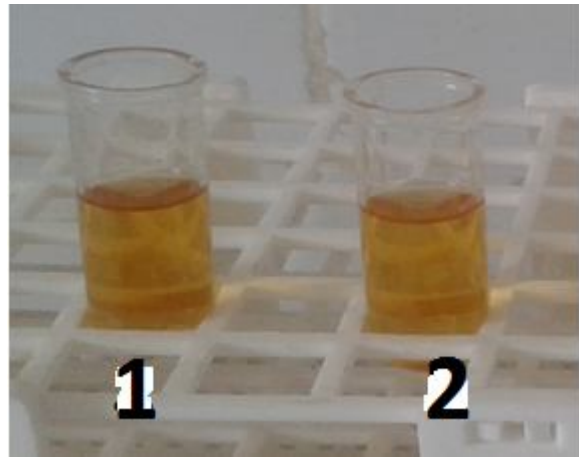


Les spectres des différentes phases de feuille de blé variété : Arz (1 : Ether diéthylique, 2 : Acétate d'étyle, 3 : MEC).

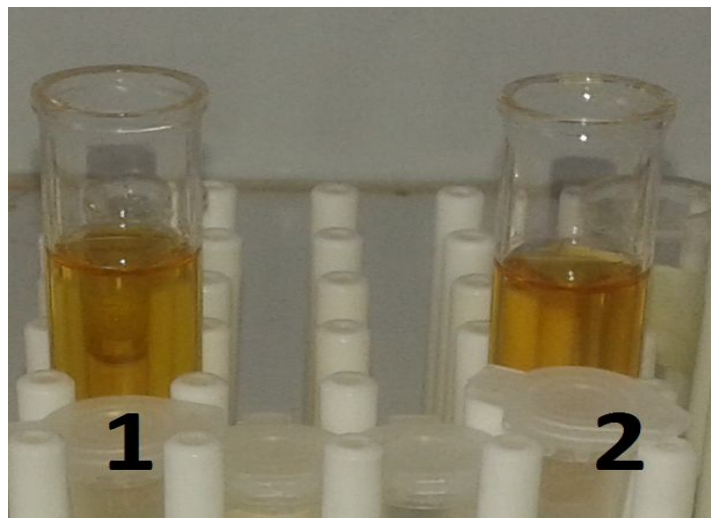
Annexe 2 : Résultat de l'évaluation du pouvoir antioxydant des témoins, 1 : l'acide gallique, 2 : quercitine.



T= 0min



T= 10min



T= 30min

Nom et Prénom :
OUIS IMEN
ABED AMIRA

Soutenu le : 21-06-2015

Contribution à l'étude des flavonoïdes des céréales de la région de Constantine et évaluation de leurs activités biologiques.

Résumé

Cette contribution porte sur l'étude de la composition phytochimique et l'activité antioxydant des quatre variétés de blé : blé dur (Cirta, Waha) et blé tendre (Arz et Hidhab).

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

Le dosage des phénols totaux par la méthode de folin-ciocalteu des différentes variétés et le dosage des flavonoïdes par la méthode d' $AlCl_3$ montrent que la teneur en phénols totaux et en flavonoïdes varie d'une variété à une autre. Cette étude quantitative indique la richesse du blé 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 le blé a un pouvoir antioxydant fort, varie d'une phase à une autre selon les composés phénoliques existants dans la phase (la phase acétate présente une activité plus forte que les autres), cette activité antioxydant est due principalement à la richesse de ses blés en flavonoïdes.

Mots clés : blé dur, blé tendre, composés phénoliques, flavonoïdes, activité antioxydant.

Devant le jury :

Président : Kitouni R (MAA- UFM Constantine).
Rapporteur : Merghem R (Pr- UFM Constantine).
Examineurs : Mosbah A (MAA- UFM Constantine).

Année universitaire 2014 - 2015

