



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

Université des Frères Mentouri Constantine

جامعة الاخوة منتوري

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biochimie Moléculaire et santé*

Intitulé :

**Caractérisation et mise en évidence du pouvoir antioxydant
des extraits phénoliques du blé dur (*Triticum durum*)**

Présenté et soutenu par : SAID Imed

Le : 26-06-2016

AOUINA Ishak

Jury d'évaluation:

Président du jury : NECIB Y

(Pr UFM Constantine)

Rapporteur : MERGHEM R

(Pr UFM Constantine)

Examineur : KHEDARA A

(Dr MCA- UFM Constantine)

Année universitaire

2015 – 2016

A decorative border of black maple leaves surrounds the text. The leaves are arranged in a repeating pattern along the top, bottom, and sides of the page.

Remerciement

Ce sujet a été proposé par Monsieur **MERGHEM R**, Professeur et responsable du laboratoire de Développement et Valorisation des Ressources Phytogénétiques à l'université des frères Mentouri Constantine. Nous lui exprimant nos plus vifs remerciements ainsi que Notre profondes gratitudees pour avoir orienté, dirigé ce travail et pour tous ses conseils dans l'élaboration et la conception de ce mémoire.

Nous sommes également très honorés par la présence, dans ce jury de Monsieur **NECIB Y**, professeur à l'université de Constantine.

Nous remerciant de même Monsieur le docteur **KHEDARA A**, Maître de conférences à l'université de Constantine.

Nos remerciements s'adressent également à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire, ainsi que tous ceux qui Nous ont aidés de près ou de loin.

II.5/1- Propriétés antioxydante et piègeurs de radicaux libres.....	17
II.5/2- Activité cardioprotectrice des flavonoïdes	17
II.5/3- Propriétés anti-inflammatoire	17
II.5/4- Autres effets préventifs et thérapeutiques.....	18

Chapitre 03 : Les radicaux libres et l'activité antioxydante des polyphénols.....19

Introduction.....	19
I.Les réactions radicalaires et leurs effets nocifs sur la santé.....	19
I-1/ Les réactions radicalaires.....	19
I-2/ Les effets nocifs des radicaux libres sur la santé humaine.....	20
I-2-3/ Les dommages radicalaires des lipides et des lipoprotéines plasmatiques.....	20
II. Sources et régulation des espèces radicalaires de l'oxygène dans l'organisme.....	20
III. Activité antioxydante des polyphénols et les maladies cardiovasculaires.....	23

PARTIE PRATIQUE

<i>Matériel et Méthode.....</i>	25
I.Matériel végétal.....	25
I.1/ La semence.....	25
I.2/ La récolte et le séchage.....	26
II.Extraction.....	27
II.1/ Traitement préliminaire (Broyage).....	27
II.2/ Extraction solide-liquide.....	27
II.2-1/Macération.....	27
II.2-1-1/Principe.....	27
II.2-1-2/Méthode.....	28
II.2-2/Extraction au soxhlet.....	28
II.2.2-1/ Principe.....	28
II.2.2-2/Méthode.....	28
II.3/ Extraction liquide-liquide (Partition entre solvants)	29
II.3-1/ Protocole.....	29
III. Etude quantitative.....	31
III.1/ Dosage des phénols totaux par colorimétrie.....	31
III.1-1/ Principe de dosage.....	31
III.1-2/ Méthode.....	31

IV. Etude qualitative.....	32
IV.1/ Analyse spectral des Flavonoïdes.....	32
IV.1-1/ Principe.....	32
IV.1-2/ Protocole	32
IV.2/ La chromatographie analytique sur couche mince (CCM).....	33
IV.2-1/ Principe.....	33
IV.2-2-1/ Préparation de la phase stationnaire.....	33
IV.2-2-2/ Préparation de la phase mobile.....	33
IV.2-2-3/ Dépôt.....	33
IV.2-2-4/ Développement.....	33
IV.2-2-5/ Révélation et identification.....	34
A) À l'œil nue ou sous UV.....	34
B) Avec le réactif de Neu.....	34
C) Relation R _f -Structure.....	34
D) Relation Structure-Fluorescence.....	35
V. Mise en évidence de pouvoir antioxydant des extraits phénoliques.....	35
V.1/Principe.....	35
V.2/ Protocole.....	35
Résultats et Discussion	36
I- Etude quantitative.....	36
I-1/ Dosage des phénols totaux.....	36
I-2/ Teneurs en phénols totaux des quatre phases.....	36
I-3/ Teneurs en phénols totaux dans les extraits éthanoliques.....	38
II- Etude qualitative.....	38
II-1/ Résultats et diagnostic de la chromatographie analytique sur couche mince.....	38
II-2/ Analyse spectrale et identification des composés possibles.....	43
II-2-1/ Phase éther diéthylique.....	43
II-2-2/ La phase acétate d'éthyle.....	47
II-2-3/ Phase MEC.....	48
II-2-4/ La phase eau (H ₂ O)	49
III- Test du pouvoir antioxydant par le DPPH.....	52

Conclusion générale.....55

Références bibliographiques

Annexes

Liste des tableaux :

Tableau 01 : Effets des différents messagers chimiques naturelles sur le développement de la plante.....	01
Tableau 02 : valeur nutritive et le contenu en oligoéléments de la plante.....	05
Tableau 03 : Acides aminés essentiels de la plante	06
Tableau 04 : Les flavonoïdes identifiés dans les feuilles de blé	07
Tableau 05 : Principales classes des composés phénoliques	10
Tableau 06 : Origine des deux variétés WAHA et CIRTA	25
Tableau 07 : Volumes nécessaires et les concentrations correspondantes pour la préparation de la gamme étalon de l'acide gallique.....	31
Tableau 08 : teneur en phénols totaux des phases (Moyenne \pm Ecartype)	36
Tableau 09 : teneur en phénols des extraits éthanoliques.....	38
Tableau 10 : Résultat de la CCM.....	39
Tableau 11 : Comportement chromatographique des phases.....	40
Tableaux 12 : les composés possibles des différents extraits.....	41
Tableau 13 : composés possibles de la phase MEC.....	48

Listes des figures :

Figure 01 : Echelle BBCH, stades principaux et secondaires, pour les céréales	04
Figure 02 : exemples de produits à base de feuilles de blé.....	08
Figure 03 : La Chrysin première flavonoïde isoler en 1814	09
Figure 04 : Formule chimique brute d'une fonction phénol	10
Figure 05 : Biosynthèse des composés phénoliques	12
Figure 06 : Effets biologiques des polyphénols	13
Figure 07 : Structure de base des flavonoïdes	14

Figure 08 : Différents types de flavonoïdes	16
Figure 09 : Biosynthèse des flavonoïdes	16
Figure 10 : Effets biologiques des flavonoïdes.....	18
Figure 11 : Les Intermédiaires réduits de l'oxygène	22
Figure 12 : Rôle des polyphénols dans l'amélioration de la fonction endothéliale	24
Figure 13 : Courbe de croissance d'herbe de blé dur (WAHA et CIRTA).....	26
Figure 14 : Pesée et suivi de la croissance de l'humidité	26
Figure 15 : Protocole d'extraction des polyphénols.....	27
Figure 16 : Courbe d'humidité WAHA et CIRTA	30
Figure 17 : Spectre d'absorption d'un flavonoïde.....	32
Figure 18 : Principe réactionnel des flavonoïdes avec le réactif de Neu.....	34
Figure 19 : la réduction du radical libre DPPH.....	35
Figure 20 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	36
Figure 21 : Contenu en phénols totaux des différentes phases.	37
Figure 22 : Spectres d'absorption de la phase éther diéthylique.....	44
Figure 22-A : structure et propriétés des molécules identifiées dans la phase E, Waha...	44
Figure 22-B : structure et propriétés des molécules identifiées dans la phase E, Waha...	45
Figure 22-C : structure et propriétés des molécules identifiées dans la phase E, Cirta...	46
Figure 22-D : structure et propriétés des molécules identifiées dans la phase E, Cirta...	46
Figure 23 : Spectres d'absorption de la phase Acétate d'éthyle.....	47
Figure 23-A : structure et propriétés des molécules identifiées dans la phase A, Waha...	47
Figure 24 : Spectres d'absorption de la phase MEC.....	48
Figure 24-A : structure de la molécule identifiée dans la phase MEC, Cirta.....	49
Figure 25 : Spectres d'absorption de la phase eau (H ₂ O).....	49
Figure 25-A : Structure et propriétés de la molécule identifiée dans la phase H ₂ O, Waha et Cirt.....	50
Figure 26 : les sites possibles de la glycosylation des flavones.....	51

Figure 27 : Structure des quatre flavones détectés dans les tiges et les feuilles de <i>Triticum durum</i> cultivar (<i>cv</i>) <i>Ofanto</i>	51
Figure 28 : Evolution de la coloration au cours de test DPPH.....	52
Figure 29 : Estimation du pouvoir Antioxydant des différentes phases.....	53

Abréviations

AcOEt : Acétate d'éthyle

AcOH : Acide acétique

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ang II : angiotensine II

ARN : Acide ribonucléique

AT1R : récepteur à l'angiotensine II de type 1

BBCH : Biologische Bundesanstalt bunderssortenamt and Chemical industry

CAD : cinnamyl alcool déshydrogénase

CCM : Chromatographie sur couche mince

CCR : Cinnamate CoA Réductase

CHI : Chalcone Flavanone Isomérase

CHS : Chalcone Synthase

COXs : cyclo-oxygénases

DPPH : 1,1-diphényl 2- picrylhydrazyl

EAG : Equivalent d'acide gallique

EDCFs : facteurs contracturants dérivés de l'endothélium

EDH : hyperpolarisation dépendante de l'endothélium

eNOS : Endothelialnitric oxide synthase 3

EP : Éther de pétrole

ERN : Espèces réactives de l'azote

ERO/ROS : Espèces Réactives Oxygénées /Reactive Oxygen Species.

EtOH : Éthanol

GPx : Glutathion peroxydase

GSH : Glutathion

GSSG : disulfure de glutathion

LDL : Low Density Lipoprotein

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1

MEC : Méthyl éthyl cétone

MeOH : Méthanol

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium

NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NO : monoxyde d'azote

O• : Anions superoxydes

OH• : Radical hydroxyle

PAL : Phénylalanine AmmoniaLyase

R• : Radical libre

Rf : Rapport frontal

SOD : Superoxyde dismutase

TAL : Tyrosine AmmoniaLyase

Tol : Toluène

UV : Ultra-Violet

VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule-1

Introduction générale

Introduction générale :

Les termes antioxydant et radicaux libres sont des expressions populaires utilisées par les nutritionnistes et d'autres professionnelles de la santé. Dans ces dernières années beaucoup d'informations sont apparus sur le rôle de stress oxydatif dans le développement d'un certain nombre de sérieuses maladies, telle que certains cancers, des maladies cardiovasculaires, des maladies dégénératives liées à l'âge, et au sujet de la valeur thérapeutique possible des antioxydants contre ces maladies (Andzi Barhe´ et Feuya Tchouya,2014)

L'oxydation inapproprié des biomolécules est un risque associer à toute vie aérobie, cette oxydation nocive est souvent attribuée aux espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont générées par de nombreux processus biologiques, y compris la respiration mitochondriale, et les réactions chimiques à la fois enzymatiques et non enzymatiques.

Les ERO sont nocives pour les cellules, qui contribuent aux processus de vieillissement (Harman, 1956), et impliquées dans une large gamme de processus de maladies, y compris le cancer et les maladies cardiovasculaires.

Et pour contrer leurs effets néfastes sur la santé, l'organisme dispose de plusieurs mécanismes de défenses antioxydants endogène, ce qui pourrai conduire à améliorer la santé et la longévité.

Sous certain circonstances l'organisme seul ne pourrai neutraliser ces effets néfastes, il sera besoin de sources exogènes d'antioxydants comme une alimentation riche en polyphénols.

Les composés phénoliques et les flavonoïdes en particuliers présents dans les aliments d'origine végétales ont montré un grand intérêt ces dernières décennies [plusieurs polyphénols ont été isolés et identifiés à partir des plantes et leurs activités pharmacologiques a été étudié (Crozier et al., 2015)], en raison de preuves de plus en plus convaincantes de leurs effets bénéfiques sur la santé humaine. l'intérêt a été stimulé principalement par des études épidémiologiques indiquant une association inverse entre la consommation d'aliments riches en ces composés phénoliques (Flavonols et flavones) et l'incidence des maladies non transmissibles comme les maladies cardiovasculaires, ces composés sont capables d'augmenter la formation endothéliale de facteurs vasoprotecteurs comme le monoxyde d'azote, un puissant vasodilatateur et un inhibiteur de la réponse pro-inflammatoire et prothrombotique (Cyril Auger, Valérie B. Schini-Kerth, 2014).

Selon d'autres études épidémiologiques, la diète méditerranéenne semble jouer un rôle essentiel dans la longévité de populations et la prévention de diverses maladies, parmi les aliments composant le régime méditerranéen, le blé et les légumineuses, ces derniers qui contrairement au blé dur ont vu leurs consommations chuter considérablement au point de n'être plus consommée que quelque fois par an en moyenne (Valérie Micard et al, 2010).

La présente étude a pour but de contribuer à la valorisation des deux variétés de blé dur WAHA et CIRTA grâce à des études quantitatives et qualitatives des composés phénoliques présents dans les extraits de leurs feuilles et la mise en évidence de leurs propriétés antioxydantes, les extraits polyphénoliques ont été testés avec du 1,1 diphényl-hydrazyl (DPPH) qui est un radical libre qui a été utilisé dans de nombreuses études scientifiques (Athamena et al., 2010 ; Ba et al., 2010 ; Cristina et al., 2009 ; N'gaman Kohue' et al., 2009 ; Sharma et Bhat, 2009), l'efficacité antiradicalaire des deux plantes est comparée, on se basant sur les résultats obtenus on pourrait proposer d'orienter l'exploitation de blé dur autant que plante médicinale.

Etude

Bibliographique

Chapitre 01
Les feuilles de blé

Introduction :

Depuis des millénaires, certaines médecines connaissent les vertus santé des feuilles de blé : la médecine égyptienne antique l'utilisait il y a 5000ans, et elle est encore aujourd'hui utilisée par les pharmacopées traditionnelles chinoise et indienne.

Dans le monde occidental, le 31 juillet 1930 était un jour important dans l'histoire des aliments d'herbe, grâce aux travaux de Charles F Schnabel, un ingénieur agricole américain qui a mené diverses études sur les céréales. Il utilisa cette herbe pour restauré la santé des poules en état critique, Non seulement les poules retrouvèrent leurs forces, mais elles pendirent, plus d'œufs que les poules saines (il a obtenu ce jour de fin de juillet 126 œufs à partir de 106 poules), ces résultats phénoménaux l'on pousser à sécher et mettre en poudre les feuilles de blé afin de compléter l'alimentation de sa famille et de ses voisins.

Par la suite, l'expérimentateur fit la promotion de sa découverte a tous les acteurs intéressés de l'industrie agroalimentaire.

En 1940, des boites de conserves de poudre de feuilles séchées étaient en vente dans tous les principaux supermarchés des Etats-Unis et du Canada.

Schnabel a notamment découvert que le blé consommé « jeune » avait de bien meilleures propriétés nutritives que le blé récolté à maturité (à condition d'être consommé rapidement), il a créé par la suite le premier concentré multivitaminé au monde, en créant de petites tablettes de feuilles de blé séchées.

I. Stades phénologiques de développement de la plante :

Le blé est une plante autogame ou à autofécondation, c'est à dire que la fécondation a lieu à l'intérieur des glumelles, avant que les étamines n'apparaissent à l'extérieur.

La croissance de la plante est pilotée par des substances naturelles qui circulent dans la plante à des moments définis, ce sont les messagers de croissance (ou hormones végétales). Chaque messenger est un régulateur biologique naturel, il coordonne la croissance et le développement de la plante par des effets précis (Tableau 01).

Tableau 01 : Effets des différents messagers chimiques naturels sur le développement de la plante (Guide pratique des régulateurs de croissance, Septembre 2007)

Messager chimique naturelle	Lieu de formation dans la plante	Effet sur le développement de la plante
Les cytokinines	Racine, Bourgeons	Stimulent la multiplication des cellules, des racines et des talles
Les gibberellines	Partie jeune de la plante	Stimulent le développement de tous les organes de la plante et l'élongation. Inhibent la croissance des racines et des bourgeons.
Les auxines	Sommet de la plante	Stimulent l'élongation des cellules, en particulier des tiges.
L'éthylène	Toute la plante	Bloque les auxines, favorise l'épaississement des tissus et la maturation
L'acide abscissique	Grain, bourgeons, fruits	Inhibe la croissance

Pour identifier les stades phénologiques des plantes cultivées, le code BBCH emploie un système de code universel subdivisé en stades de croissances principaux et secondaires, il dérive de code mis au point pour les céréales par le phytopathologiste Zadok Jan C en 1974

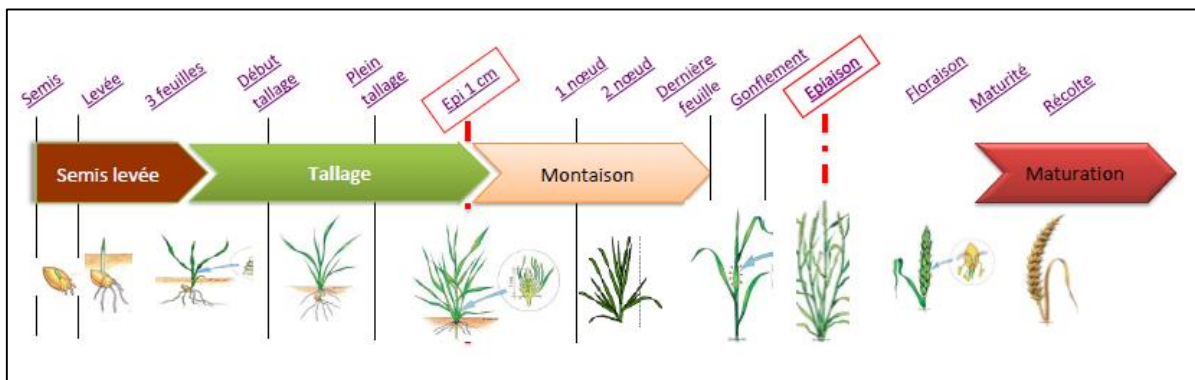


Figure 01 : Echelle BBCH, stades principaux et secondaires, pour les céréales (Witzenberger et al. 1989 ; Lancashire et al. 1991)

II. Description des feuilles :

Les feuilles sont à limbe étroit, linéaire, à nervures parallèles, à disposition généralement distique, avec une gaine ouverte, parfois fendue et une ligule prolongeant la gaine (plus rarement nulle ou représentée par des poils). Et quelques feuilles plus grandes que l'ont appelé "drapeaux", et qui se trouvent au sommet de la tige.

Morphologiquement le blé dur se différencie du blé tendre par un feuillage plus clair totalement glabre. L'appareil végétatif est à tallage faible, à chaume long et souple (Olmedo, 1995 ; Soltner, 2005).

Cette plante annuelle mesure de 60 cm à 1 m de haut selon les variétés, le degré d'humidité, la fertilité du sol et le temps d'ensoleillement.

III. Intérêt nutritionnel et thérapeutique :

III.1/ Aspect nutritionnel :

Blé et orge sont les céréales les plus connues pour leur germination en herbe, C'est en pleine croissance que la plante contient la plus forte concentration en phyto-nutriments.

Le blé est tellement riche en nutriments que 7 à 8 kilos d'herbe de blé équivaldraient à 175 kilos d'autres légumes ordinaires.

Les tableaux suivants indiquent les éléments nutritifs contenus dans l'herbe de blé (18-25 cm de hauteur).

Tableau 02 : valeur nutritive et le contenu en oligoéléments de la plante (Wigmore,1984).

Nutriment	Unité	Quantité par 100g	Minéraux	Quantité
Énergie	Cal	21.00	Calcium	18 mg
Eau	g	95.00	Cuivre	2 mg
Protéine	g	1.42	Fer	2mg
Sucre	g	2.00	Magnésium	3.6 mg
Fibre	g	0.10	Phosphore	18 mg
Gras	g	0.06	Potassium	112 mg
/	/	/	Sodium	1 mg

Tableau 03 : Acides aminés essentiels de la plante (Wigmore,1984).

Le jus des feuilles de blé contient des protéines complètes à 80%	
Acides aminés essentiels	mg/g de protéine
Histidine	19
Isoleucine	31
Leucine	68
Lysine	54
Méthionine + Cystine	20
Phénylalanine + Tyrosine	76
Thréonine	42
Tryptophane	6
Valine	59

III. 2/ Intérêt thérapeutique :

L'herbe de blé est une herbe aux vertus médicinales très nombreuses pour l'organisme, les études sur l'herbe de blé ont démontré que les feuilles contiennent des hauts teneurs en flavonoïdes particulièrement les flavones et les anthocyanidines (Yu et al., 2002).

Autres études démontrent qu'après deux semaines d'alimentation riche en jus de feuilles de blé, le sang est désintoxiqué fortement et le système immunitaire est renforcé. Ces changements conduisent à plus d'énergie et à une amélioration de la capacité de combattre et de vaincre la maladie.

Le jus des feuilles de blé a plusieurs effets bénéfiques pour aider le Corps à corriger les anomalies :

III. 2-1/ Le vieillissement :

La poudre de jus de feuilles de blé contient des composés qui neutralisent les radicaux superoxydes du corps et aide à ralentir le processus de vieillissement, éventuellement le développement des rides et des cheveux gris. En outre, ces composés peuvent aider à atténuer les effets des rayonnements et de ralentir le vieillissement cellulaire (Nadège, 2014).

III. 2-2/ Le cancer :

Le jus de feuilles de blé est bénéfique dans la lutte contre le cancer, une variété de flavonoïdes et des agents anticancéreux trouvés dans ces feuilles sont de puissants antioxydants.

Des chercheurs japonais travaillant avec le docteur Yoshihide Hagiwara, 1971 ont prouvé que les jeunes plantes de blé désactivent les effets mutagènes et cancérogènes du 3,4 benzopyrène, substance que l'on retrouve dans le poisson fumé et dans les viandes grillées au barbecue.

III. 2-3/ la réparation de l'ADN :

Les feuilles de blé ont la capacité de stimuler la production et la réparation naturelle du sperme humain et de l'ADN.

III. 2-4/ Autres indications thérapeutiques :

Les travaux de (Wang et al.,2002) ont montré l'efficacité de l'utilisation du jus de feuilles de blé : - Dans l'amélioration de la formule sanguine et comme agent détoxifiant.

- Dans le rétablissement de l'équilibre acido-basique grâce à sa richesse en magnésium.
- Dans la régulation du taux de sucre dans le sang chez les diabétiques.

IV- les composés phénoliques présents dans les feuilles de blé :

Les composés phénoliques sont des métabolites particulièrement intéressants par leurs propriétés thérapeutiques comme des molécules antioxydantes (Macheix et al ,2005).

Tableau 04 : les flavonoïdes identifiés dans les feuilles de blé

Aglycone	Classe	Auteurs
Apigénine	Flavones	Wojakowska A et al.,2012
Chrysoériol	//	//
Lutéoline	//	//
Quercétine	Flavonols	Peterson, 2001
Tricetine	Flavones	Wojakowska A et al.,2012
Tricetine triméthyl éther	//	//
Tricine	//	//

V- Quelques exemples de produits à base de feuilles de blé :

À côté du jus de feuilles de blé, l'industrie agroalimentaire offre d'autres formes utilisées particulièrement comme des suppléments alimentaires :

<i>Herbe de blé bio comprimé.</i>	<i>Herbe de blé bio en gélule</i>	<i>Herbe de blé bio en poudre.</i>
 		 

Figure 02 : exemples de produits à base de feuilles de blé

Chapitre 02

*Les composés phénoliques : Une seule
dénomination pour une multitude de
structures*

Introduction :

Les polyphénols, groupe de molécules de structures variées, trouvent d'ores et déjà une large utilisation en phytothérapie. Pour autant, leur connaissance est encore imparfaite. Ils suscitent actuellement beaucoup d'intérêt en raison du bénéfice qu'ils pourraient apporter en termes de prévention des maladies liées au vieillissement : infarctus du myocarde, cancers, maladies neurodégénératives. Mais on continue de s'interroger sur le réel impact de leur action antioxydante sur la santé humaine, et leur biodisponibilité elle-même est encore mal élucidée.

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH). Les représentants les plus nombreux et les plus connus en sont les « flavonoïdes », qui après l'isolement de la première molécule flavonoïde nommé Chrysin en 1814, plus de 4000 molécules ont été isolées et identifiées par la suite à ce jour (Guanhua Du, 2016).

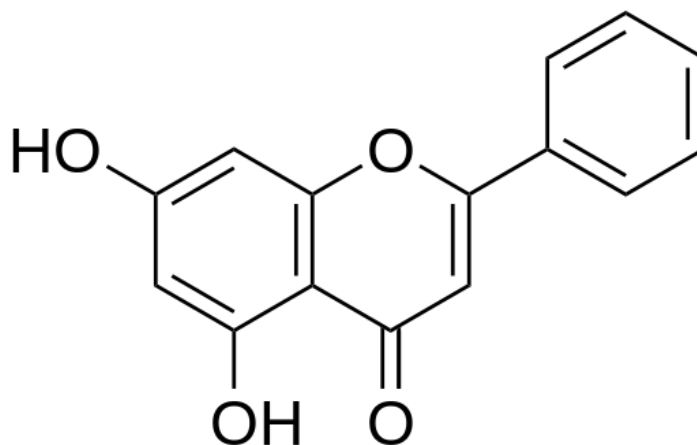


Figure 03 : la Chrysin première flavonoïde isolée en 1814 (Guanhua Du, 2016).

I- Les composés phénoliques :

I-1/ Définition :

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide, ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) (Boizot et Charpentier, 2006).

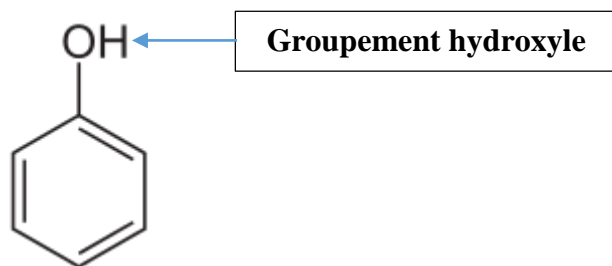


Figure 04 : formule chimique brute d'une fonction phénol (C₆H₅OH)

I-2/ Les principales classes de composés phénoliques :

Les composés phénoliques des plantes sont regroupés en différentes classes selon la structure de leur squelette de base (tableau 05)

Harborne ,1980 ; Machiex et al,1990 ont classifié les composés phénoliques en se basant sur le nombre du carbone dans la molécule.

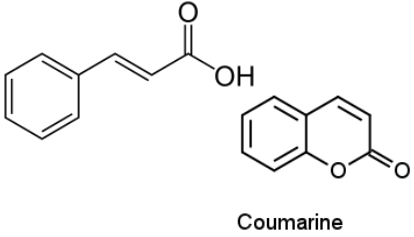
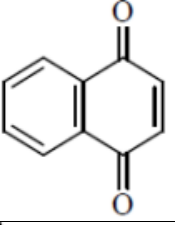
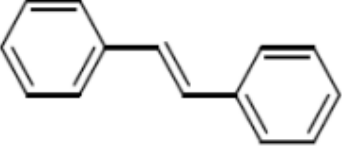
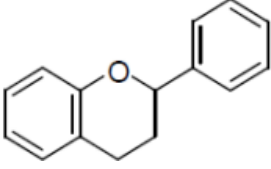
On distingue :

- Les acides phénoliques (C₆-C₁ et C₆-C₃)
- Les flavonoïdes (C₆-C₃-C₆)
- Les lignanes (C₆-C₃-C₃-C₆)
- Les Tannins (C₆-C₃-C₆)_n

La classification proposée ici correspond à ce que proposent la plupart des auteurs (malgré quelques variantes).

Tableau 05 : Principales classes des composés phénoliques (REZAIRE, 2012)

Nombre de carbone	Classe	Structure de base
C ₆	Phénols simples	
C ₆ -C ₁	Acides benzoïques	

C6-C3	Acides cinnamiques Coumarines	 <p>Coumarine</p>
C6 – C4	Naphtoquinones	
C6-C2-C6	Stilbènes	
C6-C3-C6	Flavonoïdes	
(C6-C3) ₂	Lignanes	//
(C6-C3) n	Lignines	//
(C6-C3-C6) n	Tannins condensés	//

I-3/ Biosynthèse :

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires synthétisés par des plantes au cours de leur développement, Ces composés phytochimiques provenant de la phénylalanine et la tyrosine sont ubiquitaires dans les plantes (Pereira Nunes X et al., 2012) ; Ils sont eux-mêmes formés à partir de sucres simples issus du métabolisme primaire (Macheix, 2005), Les polyphénols sont synthétisés généralement à partir de deux voies :

La voie de l'acide shikimique et la voie de l'acide malonique :

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

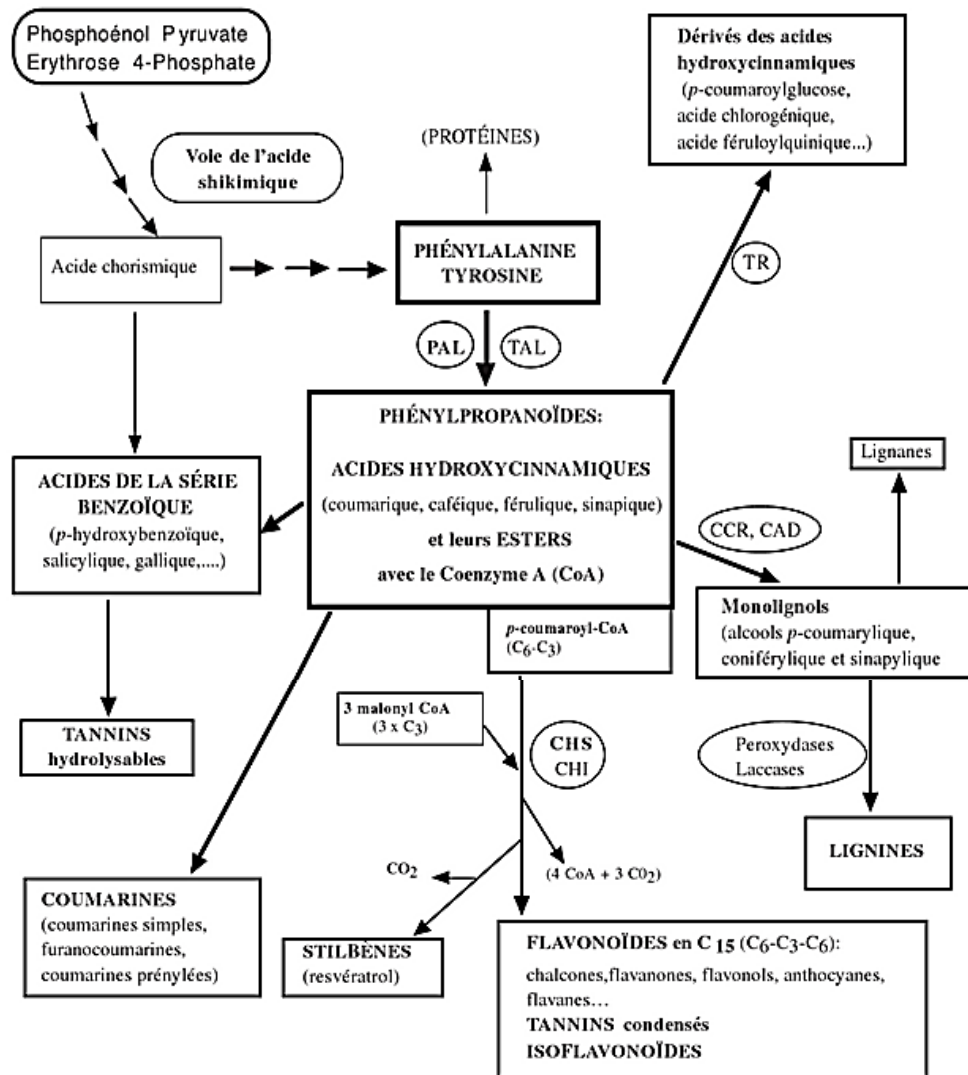


Figure 05 : Biosynthèse des composés phénoliques (Macheix et al, 2005).

I-4/ Rôle biologique des composés phénoliques :

Selon « Macheix et al., 2005 », Le rôle des composés phénoliques est reconnu dans différents aspects de la vie de la plante et dans leurs utilisations par l'homme. Ils peuvent en effet intervenir :

- Dans certains aspects de la physiologie de la plante (régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains parasites...)
- Dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV)
- Dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles...) qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des

organes végétaux (fruit, légumes...) et des produits qui en dérivent par transformation.

- Dans les variations de certaines caractéristiques des végétaux lors des traitements technologiques (préparation des jus).
- Dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies.

I-5/ Propriétés thérapeutiques :

La consommation d'aliments riches en polyphénols réduit le développement de nombreuses pathologies, telles que le cancer, l'ischémie cardiaque, l'athérosclérose et l'hypertension. Cela peut être expliqué par le fait que ces composés ont la capacité de modifier de nombreux facteurs impliqués dans la genèse de ces maladies. Les polyphénols sont en effet capables d'abaisser la pression artérielle chez le rat, d'empêcher l'oxydation des LDL, d'inhiber la prolifération des cellules musculaires, d'empêcher l'agrégation plaquettaire. Ils ont ainsi été décrits comme étant des antioxydants, des anti-inflammatoires, des anti-allergènes, des anti-thrombotiques et des anti-tumoraux (Figure 06) (Martin et Andrantsitohaina, 2002).

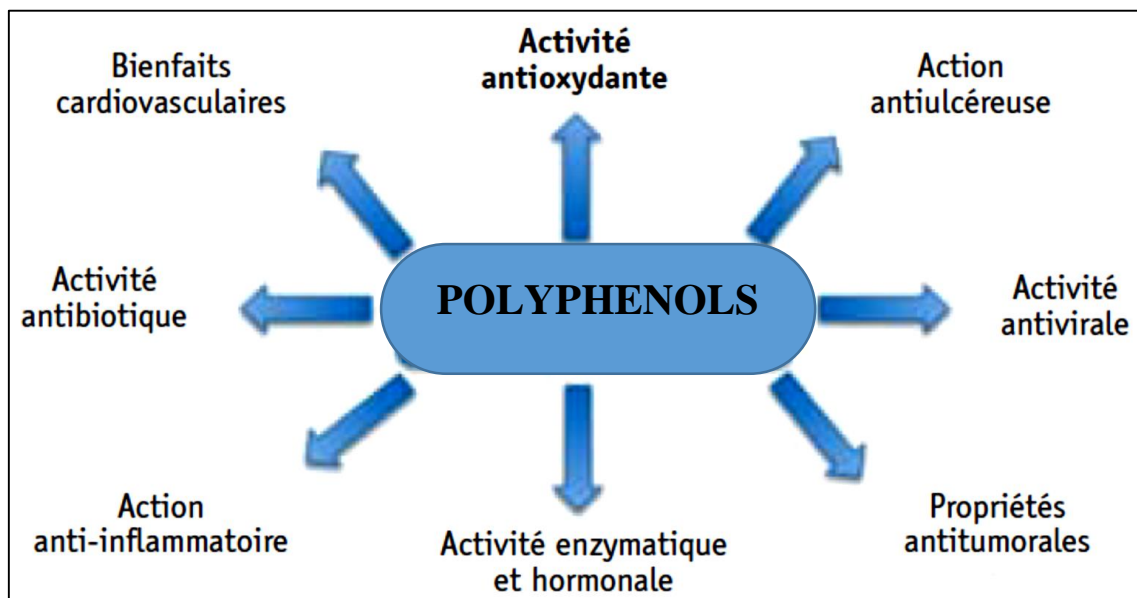


Figure 06 : Effets biologiques des polyphénols (Martin S et Andrantsitohaina R, 2002)

II- Les flavonoïdes :

II-1/ Généralités :

Les flavonoïdes appartiennent à la famille des polyphénols. Ces molécules sont les plus abondantes de notre alimentation et plus de 4000 composés ont pu être identifiés. Le terme flavonoïde provient du latin « Flavus » qui signifie la couleur trouvée entre le jaune et le rouge, comme celle du miel et de l'or (Alejandro et al., 2013).

Ces composés sont présents généralement dans tous les organes aériens de la plante, ils ont une teneur maximale dans les organes jeunes (feuilles) (Paris et al., 1981), et largement abondants dans les enveloppes superficielles des fruits (le zeste) et sont également rencontrés dans d'autres types d'aliments, comme les céréales (Grotewold E, 2005).

Les flavonoïdes sont réputés pour leur caractère antioxydant, neutralisant les radicaux libres et limitant ainsi certains dommages oxydatifs responsables de maladies. Ils sont donc à l'origine d'effets physiologiques bénéfiques pour l'organisme humain (Raskin et al., 2002)

II-2/ Structure :

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C).

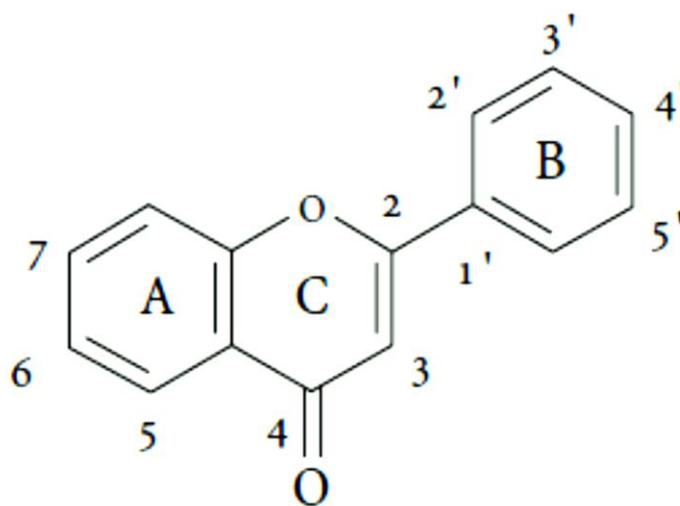
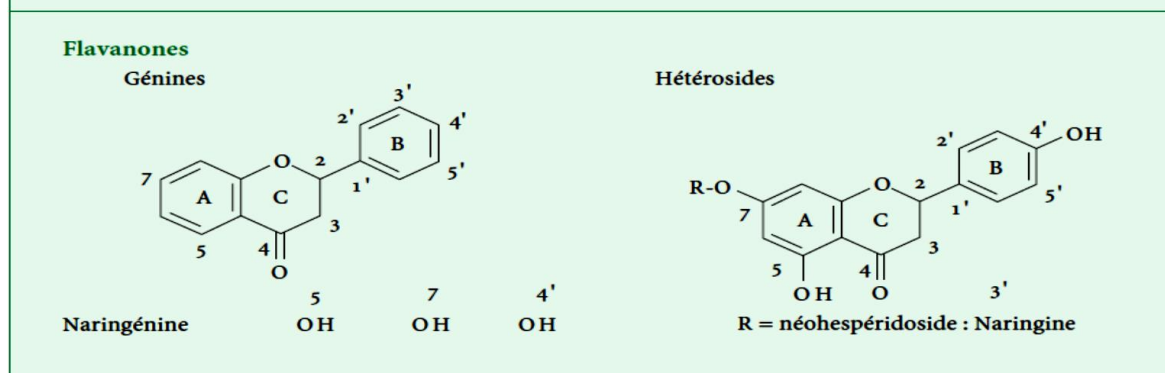
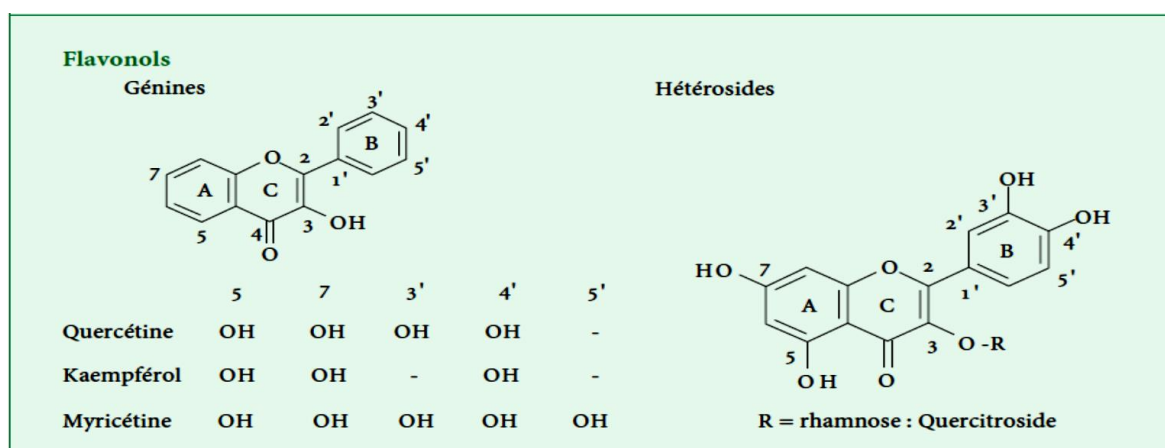
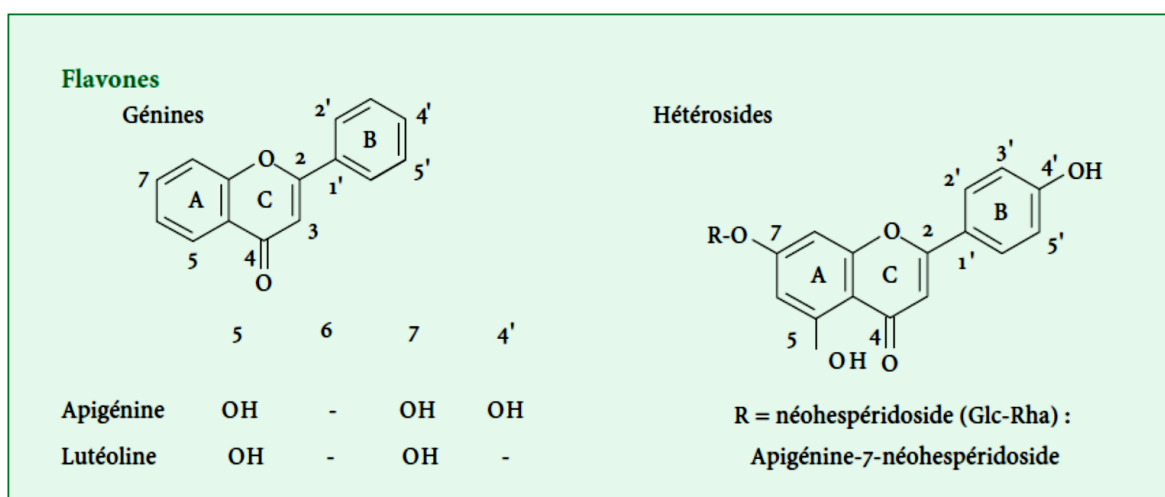


Figure 07 : structure de base des flavonoïdes (Alejandro et al., 2013)

II-3/ Différents types de flavonoïdes :

Les flavonoïdes peuvent se présenter sous forme d'aglycones ou génines (entités dépourvues de reste osidique) ou d'hétérosides (portant un ou plusieurs résidus osidiques). Flavones et Flavonols sont les composés flavonoïdiques les plus répandus dont notamment : la quercétine, le kaempférol, la myricétine et l'apigénine ; Les Flavanones (naringénine) et les Flavanols (catéchine) ainsi que les Dihydroflavonols (dihydrokaempférol, dihydroquercétine) et les dihydroflavan-3,4-diols (leucopélargonidol, leucocyanidol) sont considérés comme des flavonoïdes minoritaires en raison de leur distribution naturelle restreinte (figure 08) (Ghedira K, 2005).



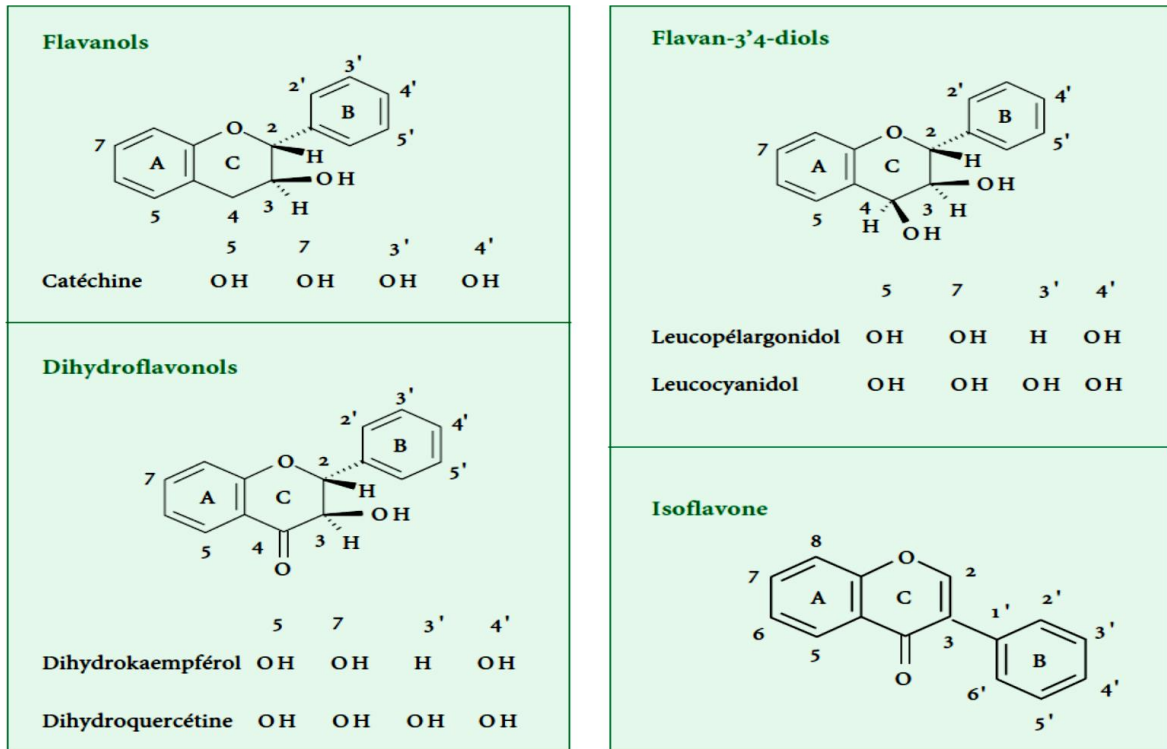


Figure 08 : Différents types de flavonoïdes (Ghedira K,2005)

II-4/ Biosynthèse des flavonoïdes :

Les flavonoïdes résultent de la condensation de trois groupements acétates (fournis sous forme malonyl-CoA) avec l'acide 4 hydroxy cinnamoyl-CoA cette condensation conduit à la formation de 2 noyaux benzéniques –A et B – réunis par une chaîne de trois atomes de carbones (hétérocycle C) (Merghem R, 2009).

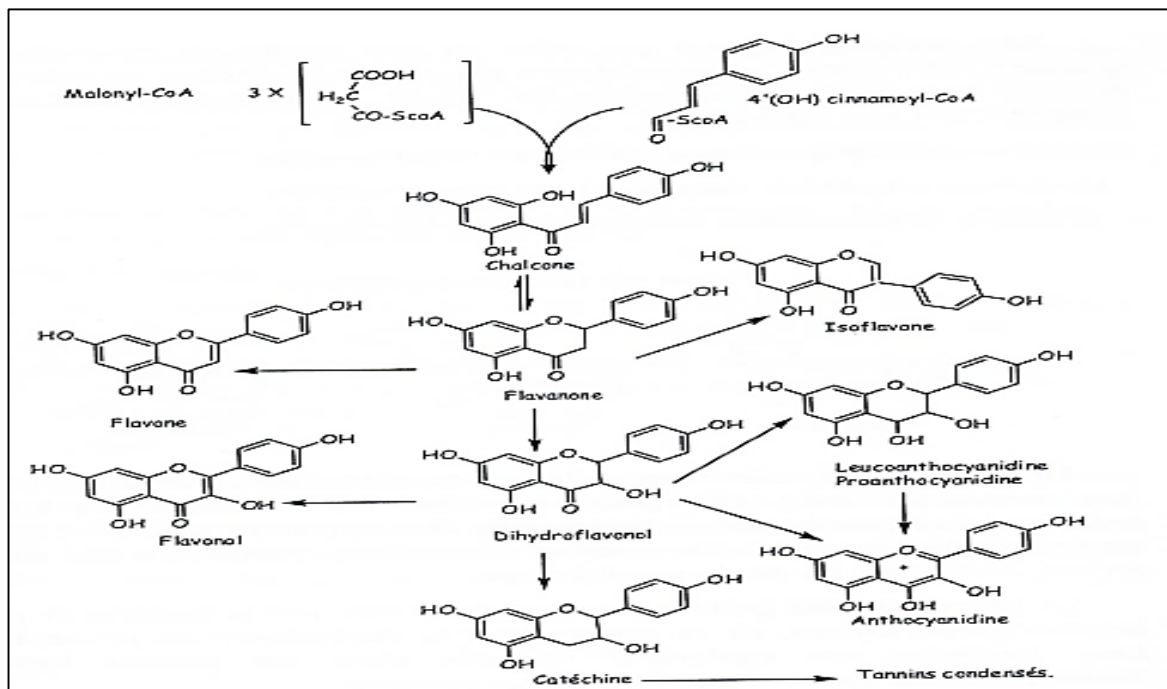
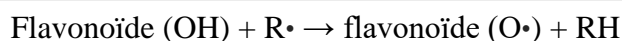


Figure 09 : biosynthèse des flavonoïdes (Merghem R, 2009)

II-5/ Propriétés thérapeutiques des flavonoïdes :

II-5-1/ Propriétés antioxydantes et piègeurs de radicaux libres :

La propriété des flavonoïdes la mieux décrite est leur activité antioxydante et leur capacité à piéger les radicaux libres : radicaux hydroxyles (OH·), anions superoxydes (O₂^{·-}) et radicaux peroxylipidiques, selon la réaction suivante :



En tant qu'antioxydants, les flavonoïdes sont capables d'inhiber la carcinogénèse. Ils inhibent en plus l'angiogénèse, la prolifération cellulaire et affectent le potentiel invasif et métastatique des cellules tumorales. (Ghedira K, 2005)

II-5-2/ Activité cardioprotectrice des flavonoïdes :

Un grand nombre d'études réalisées sur modèles expérimentaux ont rapporté pour ces flavonoïdes des effets biologiques en lien avec la santé cardio-métabolique. Ainsi, des études chez l'animal ont montré l'impact d'une supplémentation du régime en divers flavonoïdes pour améliorer le profil des lipides sanguins, augmenter la vasodilatation et maintenir la perméabilité vasculaire normale car ils agissent sur les vaisseaux sanguins sous forme d'activité vitaminique « P » (P pour perméabilité).

Une étude prospective a trouvé une corrélation inverse entre l'apport en flavonoïdes et le risque de décès par les maladies cardiovasculaires, dans une population de près de 100 000 hommes et femmes âgés d'environ 70 ans, En effet, le niveau d'apport le plus élevé en anthocyanes a été associé à une diminution de 14 % du risque de décès par les maladies cardiovasculaires (Morand C, 2014).

II-5-3/ Propriétés anti-inflammatoires :

Les flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique plaquettaire (Delporte et al., 2005), C'est ainsi que la myricétine et la quercétine inhibent la cyclo-oxygénase et la lipoxygénase à des concentrations relativement élevées (Asongalem et al., 2004)

Autre étude a démontré que la quercétine bloque l'action des phospholipase A2 et C ainsi que toutes les enzymes proinflammatoires (Delporte et al., 2005).

II-5-4/ Autres effets préventifs et thérapeutiques :

À côté des propriétés citées précédemment, selon (Ghedira, 2005) et (Yixiang Xu et al., 2016) les flavonoïdes possèdent d'autres activités (figure 10) :

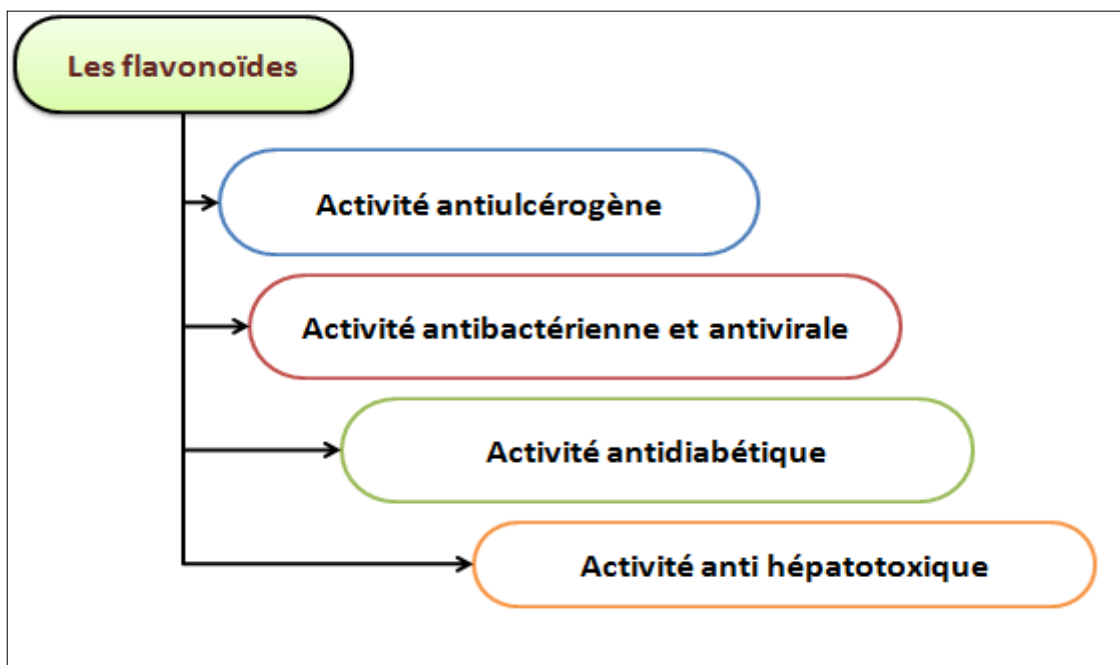


Figure 10 : Effets biologiques des flavonoïdes.

Chapitre 03

Les Radicaux libres et aliments antioxydants

Introduction :

La croissance actuelle des connaissances à propos des radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans le domaine de la biologie sont à l'origine d'une révolution médicale importante.

L'oxygène qui est un élément indispensable à la vie, peut sous certaines conditions être à l'origine des ERO qu'ils causent des dommages aux acides nucléiques, protéines et aux lipides des membranes cellulaires ainsi qu'aux lipoprotéines plasmatiques, cela peut être une cause de certains cancers, des maladies cardiovasculaires, des maladies dégénératives liées à l'âge et peut accélérer le processus de vieillissement.

L'importance des légumes et fruits comme une partie de régime alimentaire sain est démontré, une des raisons possibles de leurs effets bénéfiques sur la santé pourrait être la présence d'un ensemble d'antioxydants dans ces plantes comestibles, comme par exemple la vitamine C et D, le carotène, le sélénium, les folates et les composés phénoliques, y compris les flavonoïdes (Andzi Barhe´ T et Feuya Tchouya G.R, 2014).

I- Les réactions radicalaires et leurs effets nocifs sur la santé :

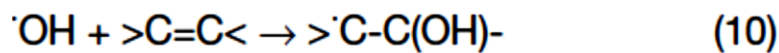
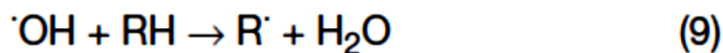
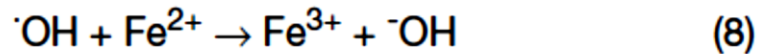
I-1/ Les réactions radicalaires :

Les radicaux libres sont des espèces moléculaires très réactives possédant un électron non apparié : ils ont une existence très brève (de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-12} sec) avant d'entrer en collision avec une autre molécule et de soit capturer soit donner un électron pour devenir stable. Ce faisant ils génèrent un nouveau radical à partir de la molécule avec laquelle ils sont entrés en collision. La seule façon de neutraliser un radical libre pour terminer cette réaction en chaîne et de faire réagir deux radicaux ensemble pour qu'il y ait appariement des électrons non appariés dans l'une ou l'autre des moléculaires parentes c'est un événement rare du fait de la demi vie très courte de chaque radical et de la très faible concentration tissulaire des radicaux.

Les radicaux les plus dévastateurs des systèmes biologiques sont les espèces radicalaires de l'oxygène (ERO) notamment l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, l'hydroxyle $\cdot OH$, et le perhydroxyle ($\cdot O_2H$).

Les radicaux hydroxyles sont les ERO les plus dommageables du stress oxydant, en raison de leur extrême réactivité qui se traduit par des constantes de vitesse ($k(\cdot\text{OH} + \text{substrat})$) comprises entre 10^8 et $10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$. (Monique Gardès-Albert et al., 2003)

Les radicaux hydroxyles attaquent tous les matériaux biologiques (ADN, protéines, lipides...). Ce sont des oxydants puissants qui réagissent selon trois modes d'action : soit en arrachant un électron (réaction (8)), soit en arrachant un atome d'hydrogène (d'un substrat organique RH, réaction (9)), soit encore en s'additionnant sur les doubles liaisons (réaction (10)).



Les lésions tissulaires causées par l'oxygène radicalaire sont souvent appelées des dommages oxydatifs et les facteurs qui protègent contre les lésions par l'oxygène radicalaire sont appelés antioxydants.

I-2/ Les effets nocifs des radicaux libres sur la santé humaine :

Les radicaux libres entraînent des dommages au niveau des Macromolécules biologiques, dont les plus marqués sont les dommages des lipides :

I-2-1/ Les dommages radicalaires des lipides et des lipoprotéines plasmatiques :

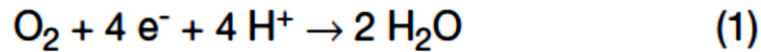
La modification chimique de protéines ou de lipides des lipoprotéines plasmatiques de faible densité (LDL) conduit à des LDL anormales qui ne sont pas reconnus par les récepteurs hépatiques et qui ne sont donc pas capturés par le foie.

Les LDL modifiés sont capturés par les récepteurs éboueurs des macrophages, les macrophages encombrés de lipides s'infiltrant sous l'endothélium des vaisseaux sanguins (particulièrement lorsque cet endothélium est déjà endommagé) ils sont tués par le contenu élevé en cholestérol non estérifié qu'ils ont accumulé. Ce phénomène a lieu lors de la formation des plaques d'athérosclérose qui peuvent dans les cas extrêmes provoquer l'occlusion plus ou moins complète d'un vaisseau sanguin.

II- Sources et régulation des espèces radicalaires de l'oxygène (ERO) dans

l'organisme :

La majeure partie de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente (addition de 4 électrons, réaction (1)) conduisant à la production d'eau.



Cette réaction est catalysée par la cytochrome oxydase, accepteur terminal d'électrons présent dans le complexe IV de la chaîne de transport des électrons située dans la membrane interne mitochondriale.

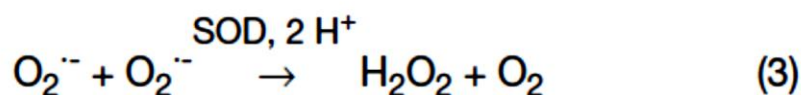
Toutefois, cette chaîne de transport peut laisser « fuir » une certaine proportion d'électrons qui vont réduire l'oxygène, mais en partie seulement. C'est ainsi qu'environ 2 % de l'oxygène subit une réduction monoélectronique (addition d'un seul électron, réaction (2)) conduisant à la formation du radical superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$, au niveau de l'ubiquinone (ou coenzyme Q)



De même, la NADH-déshydrogénase située dans la membrane mitochondriale interne, tout comme la NADPH oxydase présente au niveau des cellules vasculaires endothéliales peuvent conduire à la formation de radicaux $\text{O}_2^{\cdot-}$.

Par ailleurs, l'apparition de radicaux superoxydes peut résulter de l'auto-oxydation (oxydation par l'oxygène) de composés tels que des neuromédiateurs (adrénaline, noradrénaline, dopamine...), des thiols (cystéine), des coenzymes réduits (FMNH₂, FADH₂), mais aussi de la détoxification des xénobiotiques (toxiques, médicaments) par le système des cytochromes P450 présents au niveau du réticulum endoplasmique.

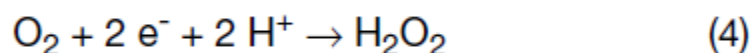
Le radical superoxyde qui présente une certaine toxicité est éliminé ou tout au moins maintenu à un niveau de concentration assez bas par des enzymes appelées superoxydes dismutases (SOD) qui catalysent sa disparition par dismutation (réaction (3)).



Il existe deux types de superoxyde dismutases, l'une dont le site actif contient du cuivre et du zinc (Cu, Zn-SOD) et qui est essentiellement localisée dans le cytosol, tandis que l'autre contient du manganèse (Mn-SOD) et est présente dans les mitochondries.

L'eau oxygénée (ou peroxyde d'hydrogène, H_2O_2) ainsi formée n'est pas elle-même un radical libre mais une molécule (ayant tous ses électrons périphériques appariés).

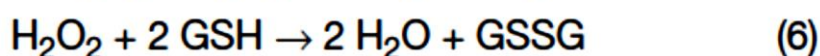
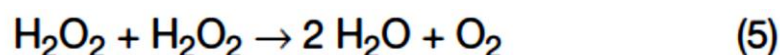
Sa production peut également résulter de la réduction biélectronique de l'oxygène (réaction (4)), en présence d'oxydases (aminoacides oxydases, glycolate oxydase, urate oxydase...) qui se trouvent principalement dans des organites cellulaires bien individualisés comme les peroxysomes.



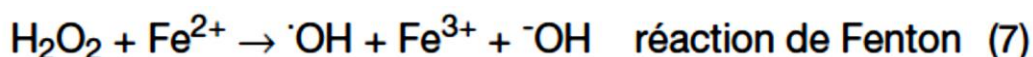
Par ailleurs, la membrane mitochondriale externe renferme une monoamine oxydase capable de catalyser la désamination oxydative de certaines amines, avec production simultanée de H₂O₂.

L'eau oxygénée est un intermédiaire réduit de l'oxygène qui est relativement toxique. Sa concentration est régulée par des enzymes telles que la catalase (présente dans les peroxysomes) et les glutathion peroxydases (essentiellement localisées dans le cytosol).

La catalase accélère la réaction de dismutation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau (réaction (5)), tandis que la glutathion peroxydase (GPx) accélère la réaction d'oxydation du glutathion (thiol peptidique, symbolisé ici par GSH) par l'eau oxygénée (réaction (6)).



La majeure partie de la toxicité de l'eau oxygénée provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle ·OH en présence de cations métalliques tels que Fe²⁺ (réaction (7), dite de Fenton) ou Cu⁺ (Wardman P et al., 1996).



Le radical hydroxyle ·OH et l'anion basique -OH sont tous deux formés au cours de la réaction (7). Toutefois, ce sont deux espèces chimiques nettement distinctes, puisque l'une (-OH) a tous ses électrons périphériques appariés, tandis que l'autre (·OH) a un électron célibataire sur sa couche périphérique. Leur différence de réactivité est directement corrélée à cette différence de structure électronique. D'un point de vue formel, la réduction de l'oxygène en eau nécessite l'apport de 4 électrons qui peuvent s'additionner un par un, successivement sur O₂, en conduisant aux intermédiaires respectifs O₂·⁻, H₂O₂ et ·OH. Ces intermédiaires sont appelés espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou encore espèces activées de l'oxygène, car ils ont une réactivité beaucoup plus importante que l'oxygène qui leur a donné naissance.

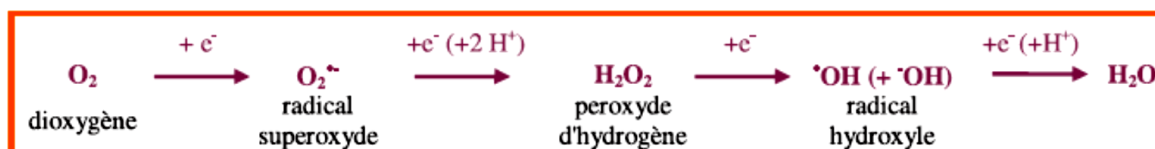


Figure 11 : les Intermédiaires réduits de l'oxygène

Dans certaines conditions, il apparaît un déséquilibre provoqué par une production exagérée de radicaux libres ou par une diminution des systèmes de défense (enzymatiques et non enzymatiques), ou encore par une association de ces deux phénomènes. Un tel déséquilibre entre systèmes producteurs des ERO et systèmes de défense caractérise l'état de

stress oxydant (Halliwell B, Gutteridge J.M.C, 1999), sans qu'il soit aisé de déterminer si ce dernier est causal ou s'il constitue seulement une réponse de l'organisme à des stimuli, notamment inflammatoires.

III- Activité antioxydante des polyphénols et les maladies cardiovasculaires :

Le paradigme concernant le mécanisme d'action des polyphénols est leurs activités antioxydante directes, en raison de leurs interactions avec ERO, y compris à la fois les ERO radicalaires et non radicalaires ainsi que ceux dérivées par les biomolécules, telle que les LDL, des protéines et les acides oligonucléiques (ADN et ARN).

Les caractéristiques structurelles telle que le nombre et la position relative des groupements hydroxyles et catéchol détermine les propriétés antioxydantes des polyphénols.

Les polyphénols peuvent aussi agir comme des antioxydants par chélation aux ions métalliques, telle que le Fer et le Cuivre, ces derniers sont responsables de de la conversion de $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 en $\cdot OH$ hautement agressive (Réaction de Fenton).

Ils peuvent aussi bloquer l'action de certain enzymes responsables de la generation des radicaux superoxydes comme les xanthines Oxidases (XO) et proteins Kinases C ainsi que l'activation des enzymes Antioxydantes.

Il y a un débat en cours sur la probabilité d'observer une activité antioxydante directe des polyphénols *in vivo*, cette activité est observer *in vitro* a des concentrations supraphysiologiques de l'ordre de 1 à 400 μM lors des essais utilisés pour déterminer leurs propriétés antioxydantes.

La faible biodisponibilité (environ 1 μM) des composés phénoliques dans l'organisme pose de sérieuses questions a propos de leurs capacités d'avoir un potentiel antioxydant direct *in vivo*.

Le nouveau concept sur le mode d'action des composés phénoliques est que ces derniers peuvent induires des systèmes de defense antioxydants endogènes par la modulation de l'expression génique ou en stimulants certains signalisations intracellulaires. Par consequence la protection contre le stress oxydatif se fait dans ce cas d'une manière indirecte, la figure suivante est un exemple de rôle indirecte des polyphénols dans l'amélioration de la protection vasculaire en stimulant la fonction endothélial se qui protège des maladies cardiovasculaires, ralenti la formation de la plaque d'athérome et agir contre les cardiopathie ischémiques (Guanhua Du et al., 2016)

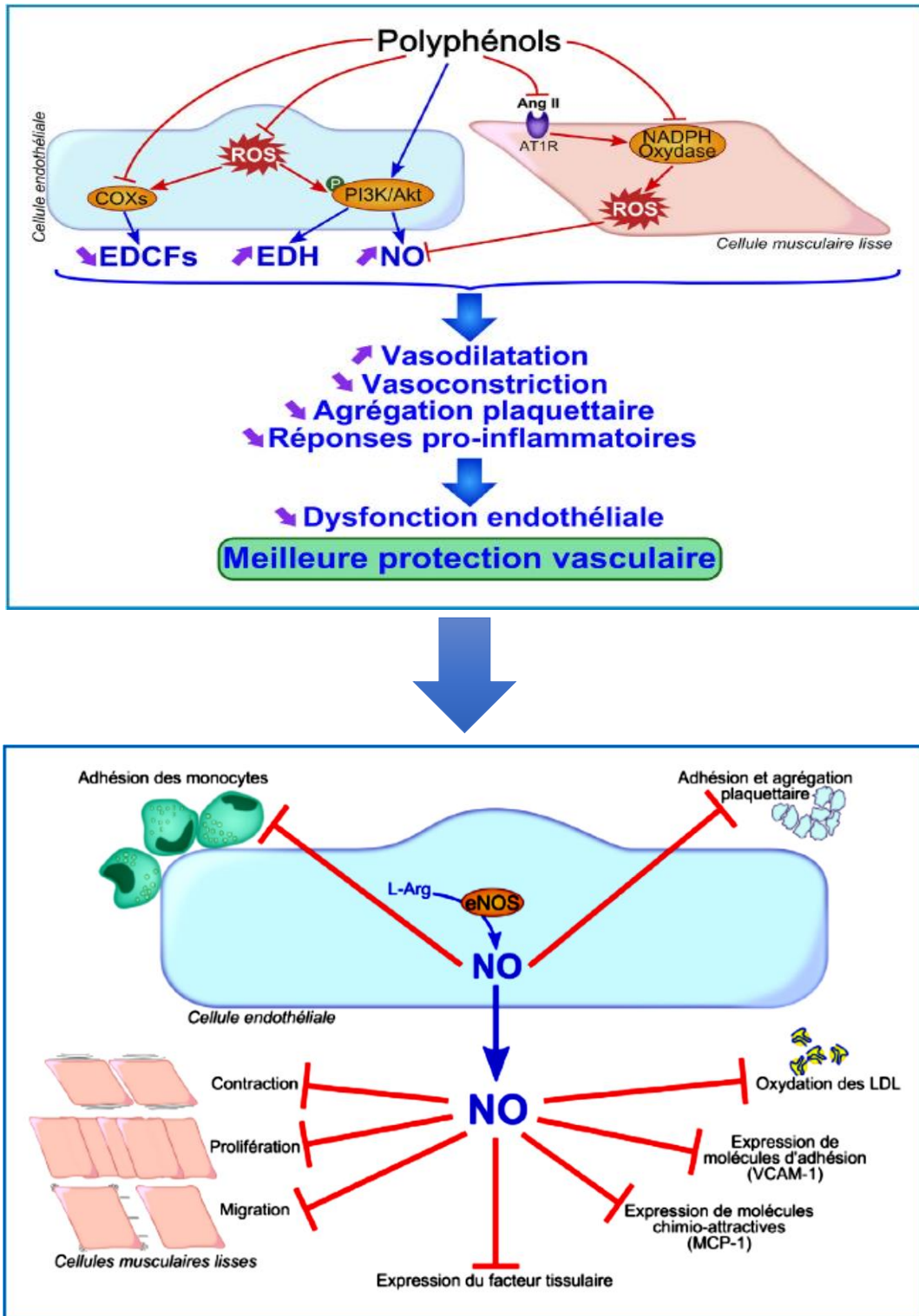


Figure 12 : Rôle des polyphénols dans l'amélioration de la fonction endothéliale (Cyril Auger et al.,2014)

Partie pratique

Matériel et Méthode

Notre travail a été réalisé au laboratoire de Développement et Valorisation des Ressources Phytogénétiques à l'université des frères Mentouri Constantine (Chaab Ersas).

I- Matériel végétale :

Nous avons utilisé comme matériel végétal les feuilles de deux variétés de blé dur Waha et Cirta au stade trois feuilles, après 30 jours de semence des grains fournis par l'industrie technique des grandes cultures (ITGC) d'EL-Kheroub-Constantine.

Tableau 06 : Origine des deux variétés Waha et Cirta (Guide des principales variétés de céréales à paille en Algérie, 2006)

Variété Données	WAHA	CIRTA
Origine	Syrie	Algérie
Pédigrée	PLC/Ruff//GTA 'S'/3/	Hadeba3/GOD VZ 619
Obtenteur	ICARDA	ITGC Khroub
Demandeur	ITGC	ITGC
Année d'inscription	1998	2004

I-1/ La semence

Le 09 mars 2016, dans la serre de Biopol Chaab Ersas, Université des frères Mentouri Constantine, nous avons procédé à la semence de 50g des grains de blé dur des deux variétés pesées préalablement à l'aide d'une balance analytique, dans quatre pots rectangulaires (deux pots pour chaque variétés), les pots sont étiquetés pour différencier entre les variétés.

L'arrosage est entrepris d'une façon régulière deux fois par semaine avec la surveillance attentive de la croissance de plantes jusqu'à ce qu'elles atteignent une hauteur de 20 cm.

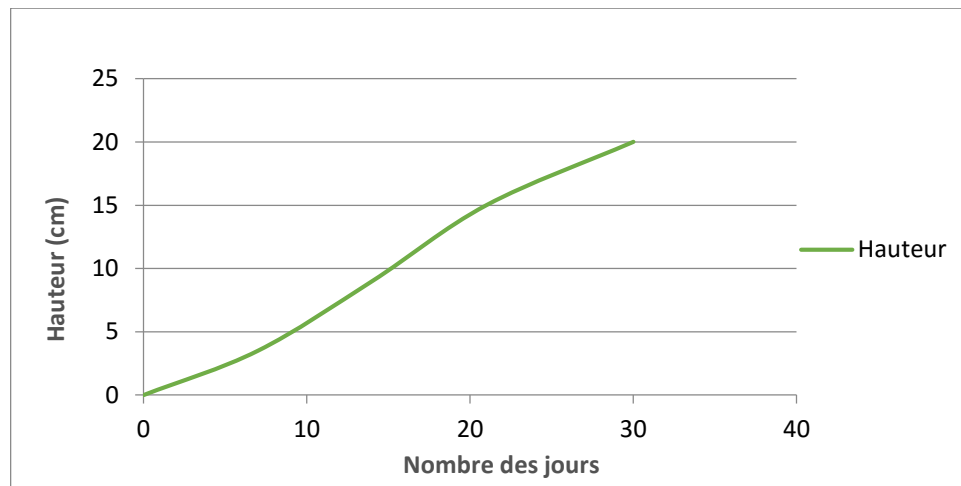


Figure 13 : courbe de croissance d'herbe de blé dur (WAHA ET CIRTA)

I-2/ La Récolte et le séchage

Le 11 avril 2016 les feuilles ont été récoltées, qui consiste à couper toute la partie aérienne de la plante ensuite on les a laissés séchées en couches mises sur un papier journal à l'abri du soleil pendant quelques jours et au même temps on a surveillé la décroissance du taux d'humidité par la prise de leurs poids à l'aide d'une balance analytique.

Variétés	Poids	Date
WAHA	262.5 g	11 avril 2016
	51 g	13 avril 2016
	34 g	17 avril 2016
CIRTA	337.5 g	11 avril 2016
	86.1 g	13 avril 2016
	42 g	17 avril 2016



Figure 14 : Pesée et suivi de la décroissance de l'humidité.

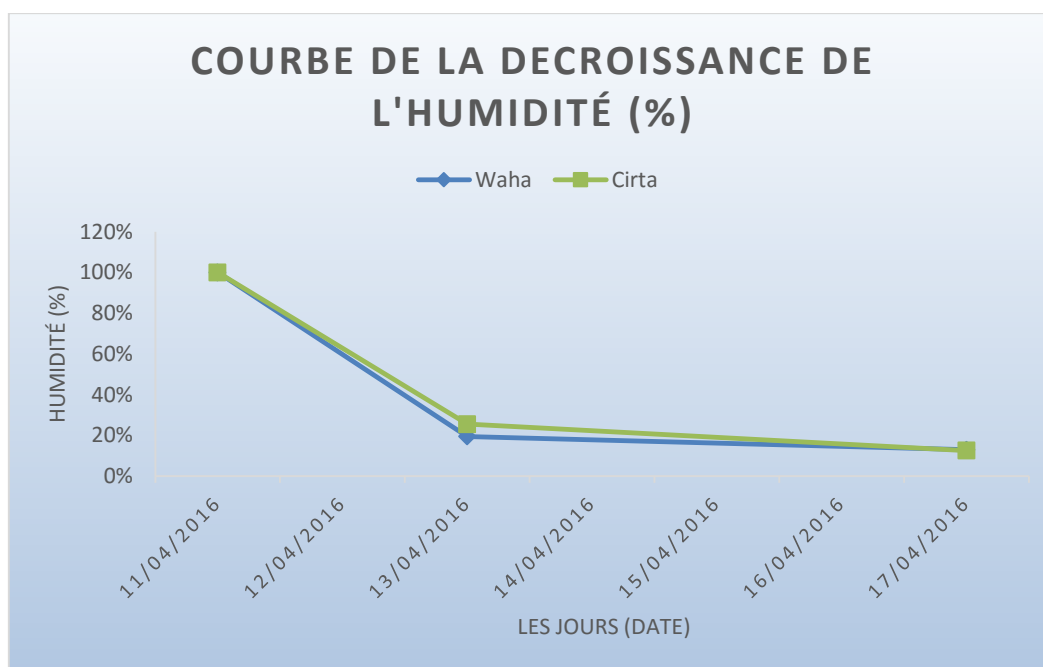


Figure 15 : courbe d'humidité Waha et Cirta

II. Extraction

II.1/ Traitement préliminaire (Broyage)

On a effectué le broyage des feuilles séchées à l'aide d'un moulin et un ciseau et encore en utilisant un mortier et pilon afin d'obtenir une poudre très fine ; puis nous avons réalisés deux pesées séparément : 20 g pour l'étude qualitative et 1 g pour l'étude quantitative.

II.2/ Extraction solide-liquide :

L'extraction solide-liquide est une technique d'extraction par solvant, dans notre étude l'opération a été effectuée selon deux approches :

II.2-1/ Macération :

II.2-1-1/ Principe :

La macération est une méthode classique qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs, elle se déroule à température ambiante ce qui est très positif pour conserver l'intégrité des molécules.

II.2-1-2/ Méthode :

Le broyat de 20g (la poudre du matériel végétal) de chaque variété est placé dans un bécher afin de subir une macération par un volume de 600 ml de solvant hydroalcoolique

(éthanol/eau, 50/50) pendant 72h à l'air libre avec renouvellement de solvant chaque 24h (600ml+400ml+400ml), l'extrait est récupéré dans un récipient, filtré à l'aide d'un papier filtre et un entonnoir puis évaporé sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif équipé d'une pompe à air (Rotavapor BÜCHI).

II.2-2/ Extraction au soxhlet :

II.2.2-1/ Principe :

Le soxhlet est une pièce de verrerie permet de faire l'extraction par solvant continue des espèces chimiques contenue dans une poudre solide. Cet appareil porte le nom de son inventeur : Franz von Soxhlet.

L'extraction au Soxhlet consiste à faire passer à travers la matière à traiter contenue dans une cartouche de cellulose, un flux descendant de solvant toujours neuf puisque distillé à chaque cycle.

II.2.2-2/ Méthode :

Le broyat de 1g (la poudre végétal) de chaque variété est mis dans une cartouche propre et sec, cette dernière sera placée dans le corps en verre de l'appareil de Soxhlet, le solvant d'extraction qui est un volume de 500 ml d'éthanol, est introduit dans un ballon porté à ébullition, les vapeurs de solvant passent par le tube adducteur, se condensant dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'extracteur, faisant ainsi macérer la poudre végétal au bout de 1h 30 min, le solvant condensé s'accumule dans le corps en verre jusqu'à atteindre le sommet de tube siphon qui provoque alors le retour de liquide dans le ballon accompagné des substance extraites et le solvant contenu dans le ballon s'enrichit donc progressivement en composés solubles.

Le solvant continu alors de s'évaporer, alors que les substances extraites restent dans le ballon (leurs températures d'ébullition doivent être nettement supérieur à celle du l'éthanol). L'extraction est arrêtée lorsque le liquide entourant la cartouche devient clair, cette couleur indiquant que le solvant n'extrait plus rien du solide.

Le contenu du ballon (solvant chargé d'extrait) est récupéré puis évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif pour éliminer le solvant.

Le résidu sec est repris avec 4 à 5 ml de méthanol dans deux tubes à essais pour chaque variété.

II.3/ Extraction liquide – liquide (partitions entre solvants) :

La phase limpide des Extraits de 20 g obtenus après l'évaporation et décantation pendant 24h sont soumis à plusieurs affrontements par divers solvants organiques de polarité croissante cette opération permet de séparer les composés phénoliques selon leur structure et leur degré de polymérisation, ces affrontements se font dans des ampoules à décanter.

- **Affrontement avec l'éther de pétrole** : pour éliminer tous les composés non phénoliques, comme les lipides et caroténoïdes et les pigments chlorophylliens.
- **Affrontement avec l'éther diéthylique** : qui est un solvant préférentiel des composés simples tels que les acides phénols et les flavonoïdes.
- **Affrontement avec l'acétate d'éthyle** : pour entraîner les flavonoïdes aglycones mais surtout les monoglycosides et partiellement les di-o-glucosides.
- **Affrontement avec le méthyle-éthyle-cétone (butanone)** : pour le reste des di-o-glycosides, les tri-o-glycosides et les c-glycosides.

II.3-1/ Protocole :

140 ml de la phase aqueuse est déversé dans une ampoule à décanter à laquelle on rajoute 100 ml de premier solvant qui est l'éther de pétrole après une agitation vigoureuse accompagnée de l'ouverture de temps en temps de robinet de l'ampoule pour dégager les éventuels gaz des solvants organiques.

On replace l'ampoule sur son support et on laisse décanter, dans un délai de quelques minutes on observe la formation de deux phase non miscible : Une phase organique supérieure et une phase aqueuse inférieure.

Après une heure d'affrontement, la phase éther de pétrole est récupérée dans un bécher ou erlenmeyer alors que la phase aqueuse est remise dans l'ampoule afin de subir l'affrontement avec le deuxième solvant et ainsi de suite.

À la fin on se débarrasse de la phase éther de pétrole qui ne renferme pas des composés phénoliques par contre les autres phases récupérées d'acétate d'éthyle et de MEC sont évaporées à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif à l'exception de la phase éther diéthylique qui est évaporée à l'air libre, puis on récupère le résidu de chaque phase par 4ml à 5ml de méthanol dans des tubes à essais (Merghem R ,2009)

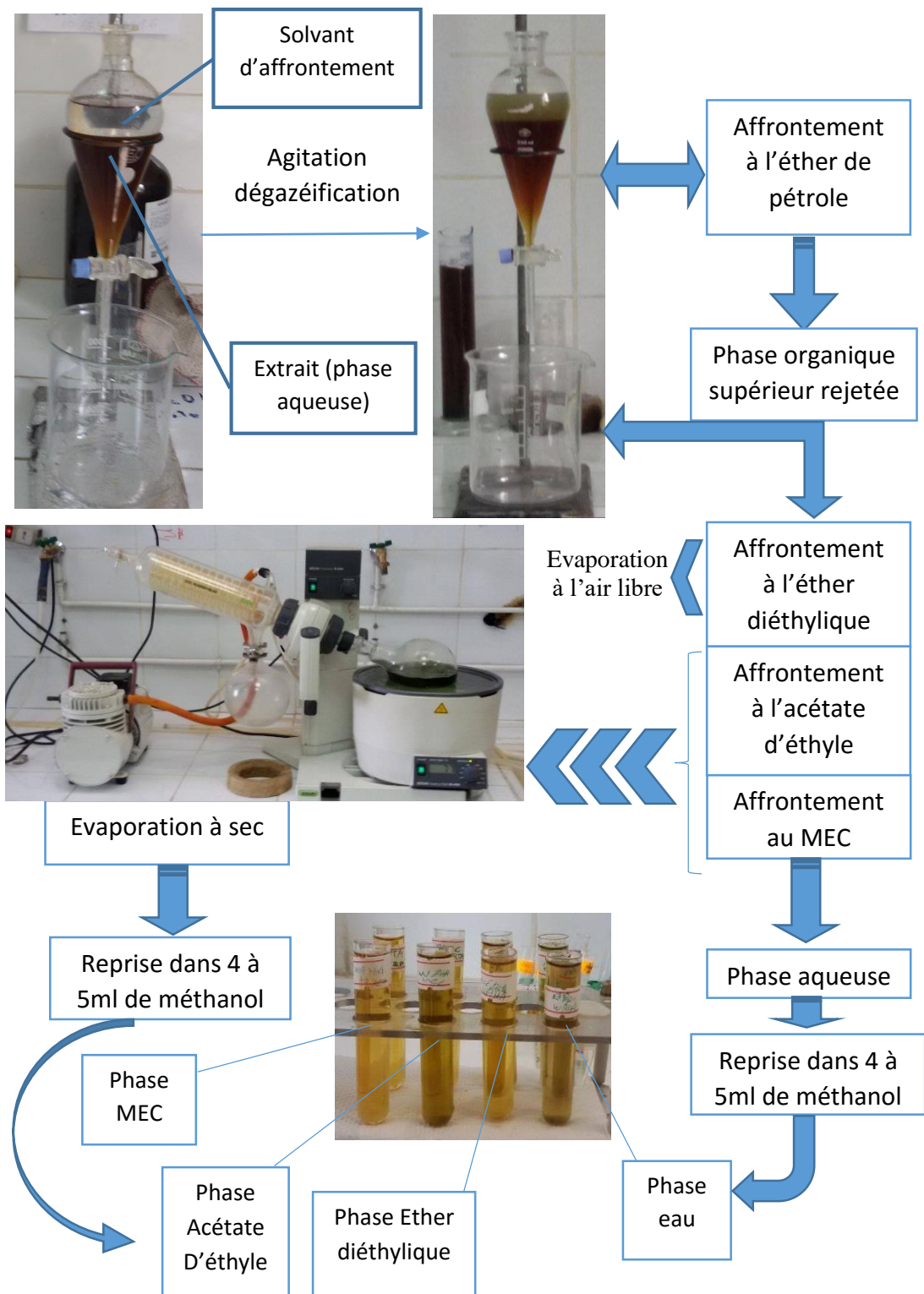


Figure 16 : Protocole d'extraction des polyphénols

IV. Etude quantitative :

III.1/ Dosage des phénols totaux par colorimétrie :

Selon Singleton et Rossi, 1965 ; Parmi les méthodes fréquentes de quantification des composés phénoliques la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin ciocalteu.

III.1-1/ Principe de dosage :

Le réactif de Folin ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_3) (Boizot N., Charpentier J.P., 2006). La coloration produite dont l'absorption maximal à 765 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

III.1-2/ Méthode :

Le dosage a été effectué selon la méthode de Zhu. Kx ,2011, une gamme d'étalonnage a été préparée à partir d'une solution mère d'acide gallique de différentes concentrations (0-2 mg/ml), la solution mère est préparée préalablement par la dissolution de 0.2 g d'acide gallique en poudre dans 1000 ml d'eau distillée. Les volumes utilisés pour la préparation de la gamme d'étalonnage sont montrés dans le tableau suivant :

Tableau 07 : Volumes nécessaires et les concentrations correspondantes pour la préparation de la gamme étalon de l'acide gallique.

Concentration (mg/ml)	0	0.4	0.8	1.6	2
Volume prélevé de la solution mère de l'acide gallique (ml)	0	0.2	0.4	0.8	1
Volume d'eau distillée (ml)	1	0.8	0.6	0.2	0

1 ml de chaque solution de la gamme étalon a été introduit à l'aide d'une pipette dans des tubes à essais, suivi de 5 ml du réactif de Folin ciocalteu (dilué 10 fois dans l'eau distillée) après 2 minutes, 2 ml de carbonates de sodium à 20 % (20 g poudre de Na_2CO_3 préparés dans 100 ml d'eau distillée à l'aide d'une fiole jaugé) ont été rajoutés puis après une incubation de 30 minutes à une température ambiante dans l'obscurité, l'absorbance de chaque solution a été déterminée à 765 nm avec un spectrophotomètre UV-Visible (UV 1601, SHIMADZU).

Pour le dosage des phénols totaux contenus dans les extraits, la même procédure précédente a été suivie juste on a pris un volume de 1 ml de chaque phase (phase éther diéthylique – acétate d'éthyle-MEC-H₂O) au lieu de l'acide gallique prit à différents volumes.

V. Etude qualitative :

IV.1/ Analyse spectrale des flavonoïdes :

Dans la littérature, de nombreuses publications et articles traitant des flavonoïdes, ont étudié, la classification, le rôle biologique et l'intérêt thérapeutique de ces molécules mais peu des recherches d'ordre physico-chimique ont été faites, l'analyse structural des flavonoïdes est devenue un travail important et relatif à l'identification de ces composés.

IV.1-1/ Principe :

Les flavonoïdes sont considérés comme des pigments qui absorbent très fortement les radiations UV, Dans le méthanol neutre, les composés flavoniques absorbent dans deux régions différentes entre 300 et 385 nm (Bande I), et entre 250 et 280 nm (Bande II).

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

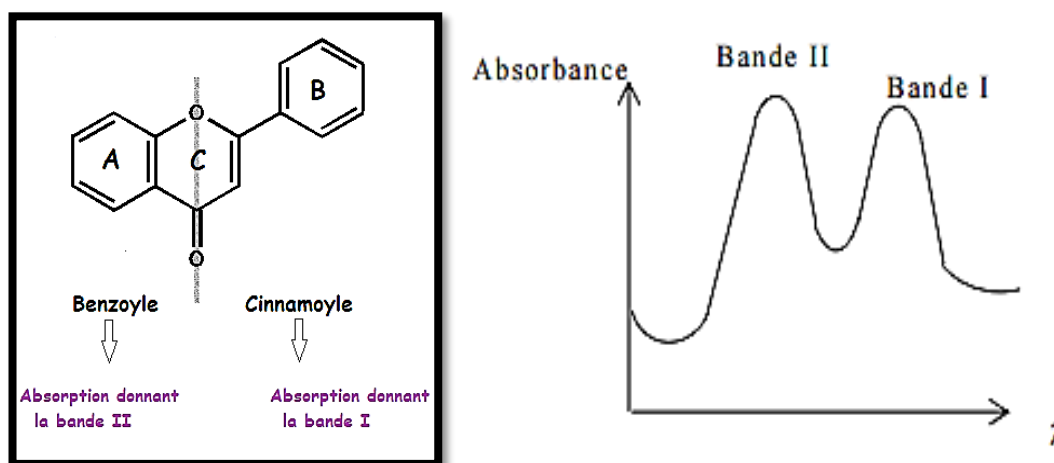


Figure 17 : spectre d'absorption d'un flavonoïde

IV.1-2/ Protocole :

À l'aide d'une pipette appropriée et une poire, 0.5 ml de chaque phase d'extrait de 20g est rajouté au méthanol contenu dans la cuve en quartz placé dans le puis de mesure de spectrophotomètre.

IV.2/ La chromatographie analytique sur couche mince (CCM) :

IV.2-1/ Principe :

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque en verre ou en plastique rigide.

L'éluant monte à travers la phase stationnaire essentiellement par capillarité, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse.

IV.2-2/ Mode opératoire :

IV.2.2-1/ Préparation de la phase stationnaire :

La phase stationnaire est constituée par un gel de polyamide préparé dans l'éthanol et étalé ensuite sur une plaque en verre (20×20cm) à l'aide d'un étaleur, après le séchage la phase stationnaire sera prête à l'utilisation.

IV.2.2-2/ Préparation de la phase mobile :

La phase mobile (l'éluant) est un système de solvant (mélange de solvants organiques), après deux essais le système qui montre une bonne séparation est le suivant :

Toluène / MEC / éthanol / éther de pétrole : 40 / 30 / 30 / 2.5

IV.2.2-3/ Le dépôt :

À l'aide des capillaires propres à usage unique préparés au laboratoire à partir des pipettes pasteurs on a déposé le produit de chaque phase des deux variétés classées de droite à gauche comme suite : la phase Ether diéthylique, la phase acétate d'éthyle, la phase MEC, et enfin la phase eau sur une ligne de dépôt à partir de 2 cm de bord inférieur de la plaque, les dépôts sont espacés environ de 1cm, plusieurs gouttes superposées de chaque extrait sont appliqués sur la plaque afin de concentrer les dépôts.

IV.2.2-4/ Développement :

La plaque est déposée doucement en position verticale dans la cuve (la ligne de dépôt ne doit pas tremper dans l'éluant), cette dernière est saturée en vapeur de solvant.

Au cours de l'élution le solvant migre (monte) sur la plaque en imprègnant le long de la phase stationnaire par capillarité, la plaque est retirée avec un pince lorsque le front du solvant est à 5 cm du bord supérieure puis on laisse la plaque se sécher à l'air libre.

IV.2.2-5/ Révélation et identification :

A) A l'œil nue ou sous UV :

Lorsque les composants d'extrait analysé sont colorés, leur séparation est observable sur la plaque. Soit à l'œil nu, soit par révélation dans une chambre noire sous une lampe UV (365nm), les composés apparaissent sous forme de taches colorées.

B) Avec réactif de Neu (C₁₄H₁₆BNO) ou 2-aminoéthyl diphenyl borate :

C'est une révélation chimique ce qui consiste à vaporiser et pulvériser ce réactif sur la plaque. (Grünz G et al., 2010).

Les spots flavoniques sont caractérisés par leurs fluorescences et leurs facteurs de rétention.

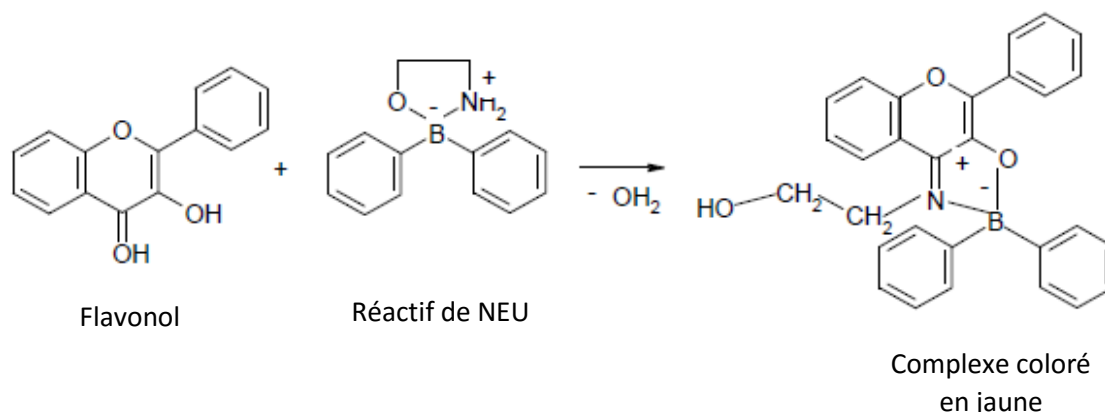


Figure 18 : Principe réactionnel des flavonoïdes avec le réactif de Neu.

C) Relation R_f- structure :

Le rapport frontal ou bien facteur de rétention peut donner des informations sur la structure des composés flavoniques séparés (Bandyukova et Shinkarenko, 1973 ; Yaou, 2001).

$$R_f = \frac{\text{Distance ligne de dépôt - tache}}{\text{Distance ligne de dépôt - front de solvant}}$$

D) Relation structure – fluorescence :

Les spots brillants seront comparés avec la référence aux spots qui correspondent aux composés flavoniques (Markham, 1982, Lahouel, 2005).

VI. Mise en évidence de pouvoir antioxydant des extraits phénoliques :

Dans notre travail l'activité antiradicalaire est évaluée par la dégradation du DPPH ou (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) qui est un radical libre synthétique en poudre qui peut être solubilisé dans le méthanol, donnant une coloration violette en solution, utilisé pour remplacer les radicaux libres produits par les cellules.

V.1/ Principe :

Le DPPH[•] est initialement violet, en contact d'antioxydants la couche électronique de ce radical (électron célibataire) est saturée, il s'agit d'une réduction, et la coloration vire vers le jaune selon la capacité des composés phénoliques contenus dans nos extraits (Pérez M et al, 2007).

Le mécanisme principal d'action des composés phénoliques(Φ -OH) est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH[•] Qui se transforme en molécule stable de coloration jaune. $DPPH^{\bullet} + \Phi-OH \rightarrow DPPHH + \Phi-O^{\bullet}$

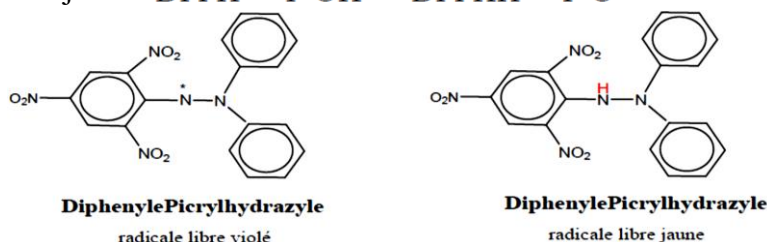


Figure 19 : la réduction du radical libre DPPH (molyneux,2004)

V.2/ Protocole :

L'activité antioxydante (antiradicalaire) a été évaluée selon la méthode (Zeghad.N et Merghem. R ,2013) avec quelques modifications, une solution méthanolique de DPPH à 0.02 % (0.02g \longrightarrow 100 ml méthanol) est préparée fraîchement (dans le même jour de la réalisation du test), 4 ml de la solution sont introduits dans des tubes à essais propres et secs, suivis de 0.5 ml de chaque phase, puis à travers des périodes concurrent le pouvoir antioxydant des composés contenus dans les extraits, il est évalué selon le changement de la couleur, les résultats sont comparés avec celle de la quercétine et de l'acide gallique

Résultats et Discussion

IV- Etude quantitative :

I-1/ Dosage des phénols totaux :

Le dosage des phénols totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrique adaptée de Zhu Kx et al.,2011 avec le réactif de Folin ciocalteu.

Malgré la sensibilité et la simplicité de la méthode, elle n'est pas spécifique pour les polyphénols, en effet le réactif peut réagir avec des protéines et des sucres réducteurs (Singleton et al.,1999).

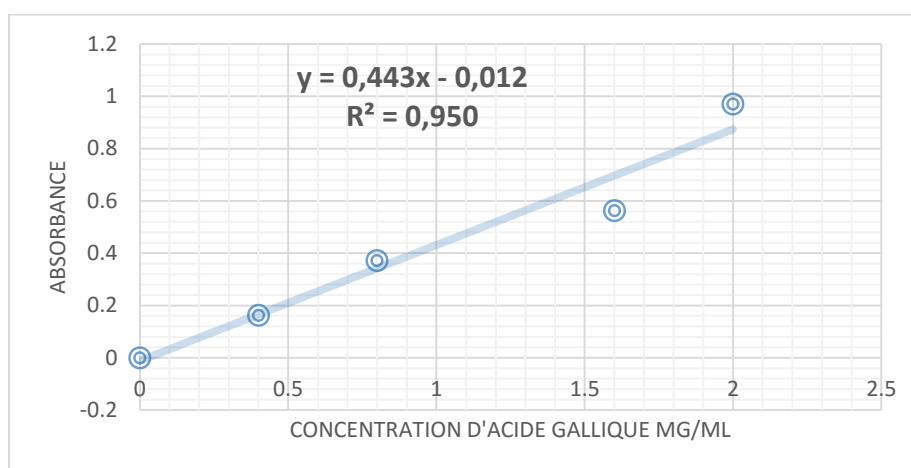


Figure 20 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Les valeurs de concentration des phénols totaux sont estimés par une application numérique dans l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage établie à l'aide de la solution d'acide gallique [$y=0.443x-0.012$] avec un coefficient $R^2 = 0.950$ correspond à la forme $Abs = a [AG] + b$, la teneur en composés phénoliques est exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par millilitre (mg EAG/ml) , les résultats sont résumés dans le tableau (08) et sont représentés sur les histogramme de la figure (21)

I-2/ Teneur en phénols totaux des quatre phases :

Tableau 08 : teneur en phénols totaux des phases (Moyenne \pm Ecartype)

Variété	Extrait de 20 g			
	WAHA			
Les phases	Phase éther diéthylique	Phase acétate d'éthyle	Phase MEC	Phase eau (H2O)
Concentration Des phénols Totaux (mg/ml)	0.74 \pm 0.14	0.31 \pm 0.04	1.29 \pm 0.02	0.34

Variété	Extrait de 20 g			
	CIRTA			
Les phases	Phase éther diéthylique	Phase acétate d'éthyle	Phase MEC	Phase eau (H2O)
Concentration Des phénols Totaux (mg/ml)	0.49 ± 0.08	1.01 ± 0.07	0.29 ± 0.04	0.25

L'histogramme illustré par la figure (21) montre que nos extraits sont riches en polyphénols, d'après les résultats nous constatons que le contenu phénolique dans les deux variétés se varie plus ou moins considérablement d'une phase à l'autre, les extraits éther et MEC de la variété Waha sont les plus riches en polyphénols où la teneur la plus élevée est constatée dans la phase MEC, elle est de l'ordre de 1.29 ± 0.02 mg EAG/ml par contre dans la variété Cirta la phase AcOEt présente la valeur la plus élevée avec une teneur de 1.005 ± 0.08 mg EAG/ml. Le classement décroissant de contenu phénolique des phases de deux variétés est le suivant :

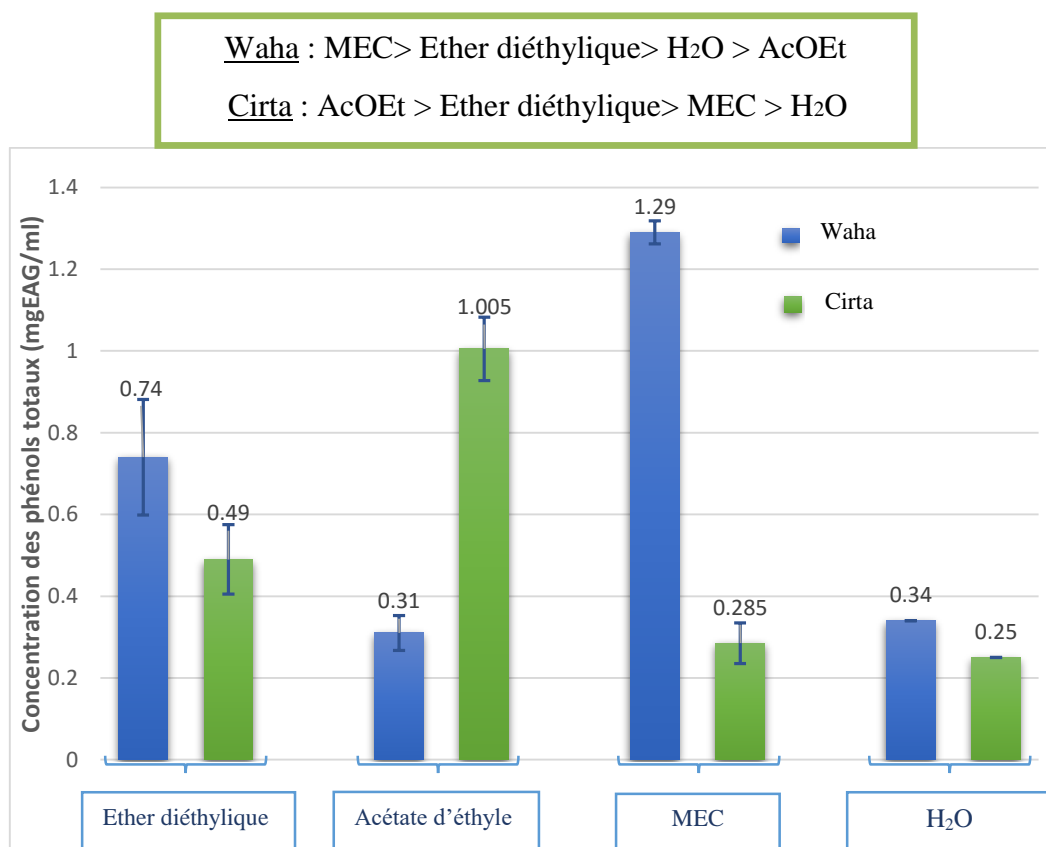


Figure 21 : Contenu en phénols totaux des différentes phases.

I-3/ Teneur en phénols totaux dans les extraits éthanoliques :**Tableau 09** : teneur en phénols des extraits éthanoliques

Variété	Extrait de 1 g	
	WAHA	CIRTA
Concentration Des phénols Totaux (mg/ml)	1.20 ± 0.38	1.46 ± 0.58

D'après le tableau (09) on remarque que l'extrait éthanolique de la variété Cirta renferme plus de composés phénoliques que l'extrait de la variété Waha dont la teneur estimée respectivement est 1.46 ± 0.58 mg EAG/ml et 1.20 ± 0.38 mg EAG/ml.

La teneur en phénols des extraits éthanoliques de la plante dépend essentiellement de leur origine et certains facteurs intrinsèques (la génétique) et extrinsèques (conditions climatiques, maturité à la récolte) et les différentes maladies qui peuvent affecter la plante (Zeghad N, 2009). À titre de comparaison de nos résultats du dosage avec ceux de la bibliographie on constate que la teneur en polyphénols de deux variétés de blé dur (*Triticum durum*) est supérieure par rapport à celle trouvée dans certaines plantes médicinales de la famille des labiées et rutacées comme l'espèce *Mentha pulegium* dont la valeur est de 0.33 mg EAG/ml et l'espèce *Ruta chalepensis* de 1.27 mg EAG/ml selon Ghazghazi H et al., 2013.

V- Etude qualitative :**II-1/ Résultats et diagnostic de la chromatographie analytique sur couche mince :**

La CCM analytique des extraits phénoliques est réalisée sur le gel de polyamide DC₆ avec le système solvant : Tol/MEC/EtOH/EP (40/30/30/2,5). Ce dernier a permis une bonne séparation des constituants du dépôt de la phase éther diéthylique et acétate d'éthyle, Surtout pour la première qui donne autant de tâches que de produits constituants du dépôt (tous les spots obtenus sont avérés être des flavonoïdes, dont certains sont plus purs que d'autres).

Tableau 10 : Résultat de la CCM, avec E : Éther diéthylique, A : Acétate d'éthyle, M : MEC, O : H₂O

	Œil nue	UV à 365nm
Sans réactif de Neu		
Avec réactif de Neu (1ère révélation)		
Avec réactif de Neu (après 72h)		

Après la visualisation du chromatogramme Sous UV à une longueur d'onde de 365nm dans une chambre noire, on a remarqué que la phase éther diéthylique donne trois spots bien distincts chez la variété Waha et Cirta cette dernière a la tache Rose plus dense. (Le Rf et la fluorescence des autres phases sont représentés sur le tableau-11)

Concernant la phase eau une seule tâche a été observé à la ligne de dépôt. La CCM pour cette phase avec des systèmes à base d'eau pourrai séparer les constituants qu'elle contient tel que par exemple l'utilisation de système solvant : H2O/EtOH/MEC/AcOH.

L'utilisation de réactif de Neu a permis l'observation d'autres couleurs tel que le jaune verdâtre le jaune fluorescent ainsi que le marron et le virage de certain couleur tel que le virage des couleurs du marron vert au jaune fluorescent, la fluorescence et les Rf de ces tâches les plus remarquées sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 11 : Comportement chromatographique des phases Ether diéthylique (E), Acétate d'éthyle(A), MEC(M) et Eau (O) De la variété Waha et Cirta sur plaque de polyamide, dans le système solvant Tol/MEC/EtOH/EP (40/30/30/2,5) sans révélateur et sous UV 365nm, et avec révélateur (Réactif de Neu)

Extraits	Sans révélateur				Extrait	Avec réactif de Neu			
	UV 365nm					UV 365nm			
	Waha		Cirta			Waha		Cirta	
	Rf	Couleur	Rf	Couleur		Rf	Couleur	Rf	Couleur
E	0.60	Violet marron	0.52	Rose marron	E	0.14	Jaune verdâtre	0.14	Jaune verdâtre
	0.75	Violet	0.65	Violet		0.41	Vert sombre	0.50	Vert
	0.94	Rose clair	0.80	Rose		0.59	Bleu clair	0.65	Violet
						0.80	Rose		
A	0.10	Marron vert	0.10	Marron vert	A	0.04	Jaune fluorescent	0.04	Jaune fluorescent
	0.50	Bleu clair	0.50	Bleu clair		0.09	Marron	0.26	Marron clair
	/	/	0.92	Rose clair		0.16	Bleu clair	0.60	Bleu clair
M	0.10	Marron vert	0.09	Vert sombre	M	0.04	Jaune fluorescent	0.03	Jaune fluorescent
	0.78	Violet				0.07	Marron	0.30	Bleu clair
	0.97	Rose clair							
O	0.07	Bleu claire	0.07	Bleu claire	O	0.00	Jaune Fluorescent	0.00	Jaune Fluorescent

On se basant sur ces résultats on remarque que la phase éther diéthylique est la plus riche en composés phénoliques avec l'apparition d'un 4^{ème} spot de couleur jaune verdâtre après pulvérisation au réactif de Neu pour la variété Cirta. Après ces observations et en s'appuyant sur les données de la bibliographie quant à la séparation des composés phénoliques par CCM et leur observation sous UV On peut éventuellement prédire les composés ou les familles de composés les plus probables qui peuvent entrer dans la composition des extraits.

Tableaux 12 : les composés possibles des différents extraits (NI : Non Identifier) :

Extraits	Sans révélateur-UV365nm			Avec réactif de Neu-UV 365nm		
	Waha		Composés possibles	Waha		Composés possibles
Rf	Couleur	Rf		Couleur		
Ether diéthylique	0.60	Violet marron (Spot hétérogène)	NI	0.14	Jaune verdâtre	Flavonols 5 OH libre ou 5 OH substitué
	0.75	Violet	-Flavones 5-OH et 4' OH -Flavones 3-OR et 5 OH ,4'-OH -Flavones 6 ou 8 OH -Chalcones -Dihydroflavonols -Isoflavones -Flavanones	0.41	Vert sombre	NI
	0.94	Rose clair	-Anthocyanidine 3,5 di glucoside	0.59	Bleu clair	Flavones sans 5-OH libre Flavonols sans 5-OH libre avec 3 OH substitué
	Cirta		Composés possibles	Cirta		Composés possibles
	Rf	Couleur		Rf	Couleur	
	0.52	Rose marron	NI	0.14	Jaune verdâtre	Flavonols 5 OH libre ou 5 OH substitué
	0.65	Violet	-Flavones 5-OH et 4' OH -Flavones 3-OR et 5 OH ,4'-OH -Flavones 6 ou 8 OH -Chalcones -Dihydroflavonols -Isoflavones -Flavanones	0.50	Vert	NI
	0.80	Rose	Anthocyanidine 3,5 di glucoside	0.65	Violet	-Flavones 5-OH et 4' OH -Flavones 3-OR et 5 OH ,4'-OH -Flavones 6 ou 8 OH -Chalcones -Dihydroflavonols -Isoflavones -Flavanones
				0.80	Rose	-Anthocyanidine 3,5 di glucoside

Extraits	Sans révélateur			Avec réactif de Neu		
	Waha		Composés possibles	Waha		Composés possibles
Acétate d'éthyle	Rf	Couleur		Rf	Couleur	
	0.10	Marron vert (Spot hétérogène)	NI	0.04	Jaune fluorescent	Flavonols avec 3OH libres Aurones Chalcone Flavanones
	0.50	Bleu clair	Hydroxyflavonol ou Flavone méthylé Flavones sans 5-OH libre Flavonols sans 5-OH libre avec 3 OH substitué	0.09	Marron	NI
				0.16	Bleu clair	Flavones sans 5-OH libre Flavonols sans 5-OH libre avec 3 OH substitué
	Cirta		Composés possibles	Cirta		Composés possibles
	Rf	Couleur		Rf	Couleur	
	0.10	Marron vert (Spot hétérogène)	NI	0.04	Jaune fluorescent	Flavonols avec 3OH libres Aurones Chalcone Flavanones
	0.50	Bleu clair	Flavones sans 5-OH libre Flavonols sans 5-OH libre avec 3 OH substitué	0.26	Marron clair	NI
0.60				Bleu clair	Flavones sans 5-OH libre Flavonols sans 5-OH libre avec 3 OH substitué	

Extraits	Sans révélateur			Avec réactif de Neu		
	Waha		Composés possibles	Waha		Composés possibles
Méthyl-Éthyle-Cétone (MEC)	Rf	Couleur		Rf	Couleur	
	0.10	Marron vert (Spot hétérogène)	NI	0.04	Jaune fluorescent	Flavonols avec 3OH libres Aurones Chalcone Flavanones
0.78	Violet	-Flavones 5-OH et 4' OH -Flavones 3-OR et 5 OH ,4'-OH -Flavones 6 ou 8 OH -Chalcones -Dihydroflavonols -Isoflavones -Flavanones	0.07	Marron	NI	

	0.97	Rose clair	-Anthocyanidine 3,5 di glucoside	0.95	Rose clair	-Anthocyanidine 3,5 di glucoside
	Cirta		Composés possibles	Cirta		Composés possibles
	Rf	Couleur		Rf	Couleur	
	0.09	Vert Sombre (Spot hétérogène)	NI	0.03	Jaune fluorescent	Flavonols avec 3OH libres Aurones Chalcone, flavanones
				0.30	Bleu clair	Flavones sans 5-OH libre Flavonols sans 5-OH libre avec 3 OH substitué

Extraits	Sans révélateur			Pulvérisation au réactif de Neu		
	Waha		Composés possibles	Waha		Composés possibles
Eau (H ₂ O)	Rf	Couleur		Rf	Couleur	
	0,00	Jaune fluorescent	Flavonols avec 3OH libres Aurones, Chalcone, Flavanones	0.40	Jaune Fluorescent	Flavonols avec 3OH libres Aurones, Chalcone, Flavanones
				0.53	Vert	NI
		Cirta		Cirta		Composés possibles
		Rf	Couleur	Rf	Couleur	
0,00	Jaune fluorescent	Flavonols avec 3OH libres Aurones, Chalcone, Flavanones	0.00	Jaune Fluorescent	Flavonols avec 3OH libres Aurones, Chalcone, Flavanones	

II-2/ Analyse spectrale et identification des composés possibles :

L'identification suivante des molécules est approximative car les molécules n'ont pas été purifiées et seulement une ccm analytique a été préparées. Le spectre d'absorption prendra donc une allure moyenne des molécules les plus dominantes dans les extraits d'un point de vue quantitative et non qualitative. Pour identifier les molécules d'une manière précise, on aura besoin des études encor plus poussé (CCM préparative) et d'acquérir du matériel un peu plus sophistiqué tel que l' HPLC ou la RMN.

II-2-1/ Phase éther diéthylique :

Les solutions méthanoliques de la phase Ether diéthylique des deux variétés sont révélées d'être des solutions flavoniques donnant deux pics caractéristiques dans le domaine [220-400] nm. Avec la possibilité d'être des Isoflavones. Les spectres montrent la présence d'un épaulement à proximité de la Bande II.

On observe que les spectres des deux variétés ont la même allure approximativement, ce qui signifie la présence des mêmes classes des flavonoïdes dominants.

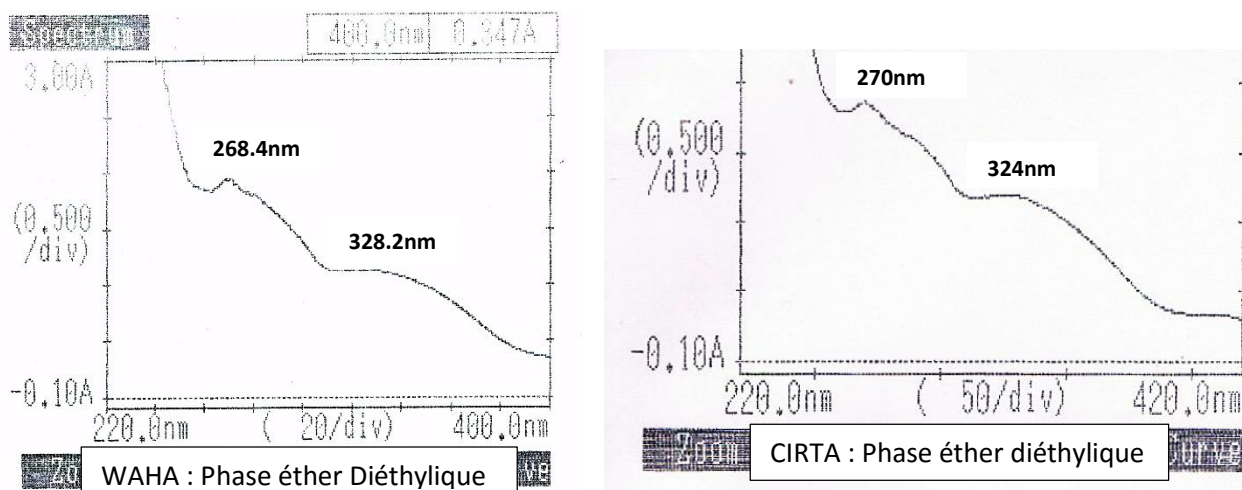
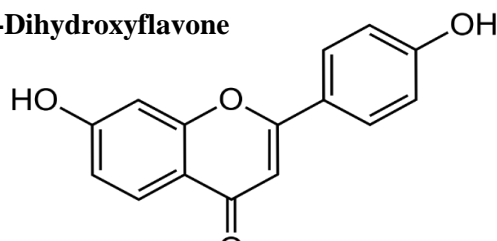


Figure 22 : Spectres d'absorption de la phase éther diéthylique

A) La variété Waha : En supposant que la molécule est pure et en comparant les λ_{\max} (λ_{\max} de la bande I=328,2nm) obtenu, avec la littérature (Marby et al., 1970), Nous avons eu la chance de tomber sur deux Flavones que sont le 4',7-Dihydroxyflavone et la 5-Deoxyvitexin (Bayin) dont la structure et les propriétés spectrales sont représentées dans la figure suivante :

4',7-Dihydroxyflavone

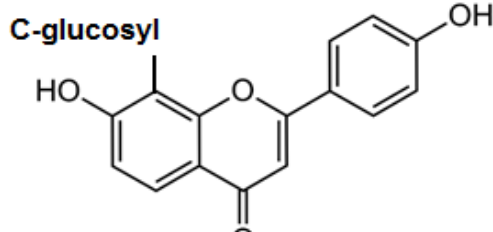


Donnés chromatographiques

Apparence de spot (UV) : Fluorescence bleu clair

Données spectrales (nm) : MeOH 253sh ,312sh, 328

5-Deoxyvitexin



Donnés chromatographiques

Apparence de spot (UV) : Fluorescence bleu clair

Données spectrales (nm) : MeOH 255sh, 312sh 328

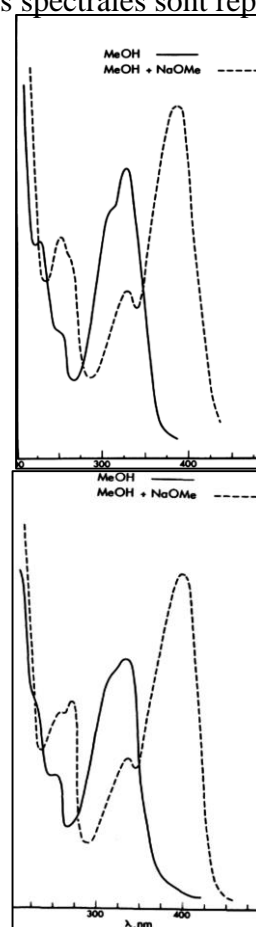


Figure 22-A : structure et propriétés des molécules identifiées dans la phase E, Waha

En comparant les deux spectres avec celui que nous avons obtenu on observe un déplacement hypsochromique de la bande I ce qui signifie que nos molécules sont méthylées ou glycosylées en carbone 5- ou 4' selon Mabry et al., 1970, ou plutôt que la bande I est un épaulement caractéristique des ISOFLAVONES.

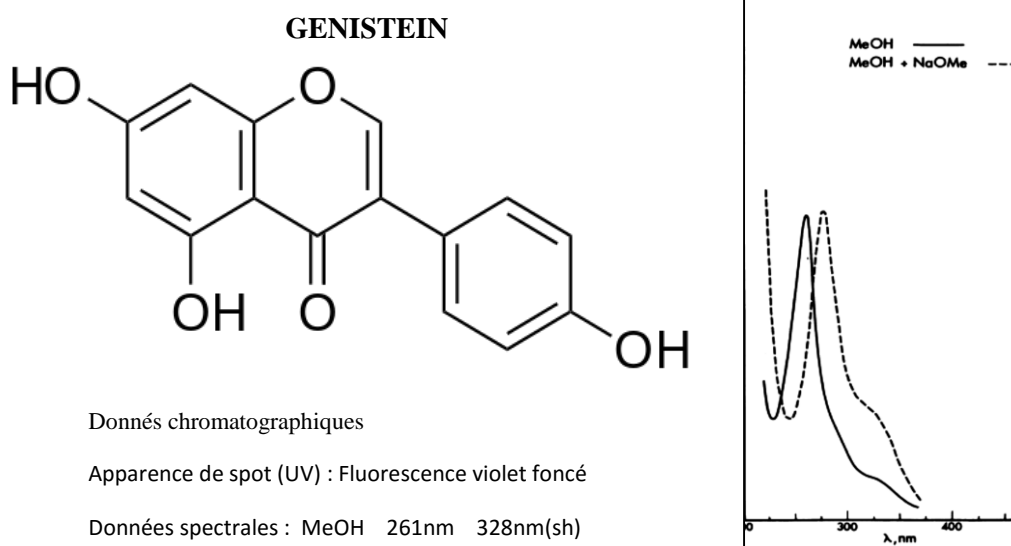


Figure 22- B : structure et propriétés des molécules identifiées dans la phase E, Waha

Les grands R_f de ces spots augmente la possibilité que ces flavonoïdes seront méthylés ou ayant un manque des hydroxyles. Néanmoins les λ_{max} obtenu n'exclut pas la possibilité de la présence de Flavonol 3OH libre ou de ses dérivés révélés par la pulvérisation au réactif de Neu et qui a donné une coloration caractéristique de jaune verdâtre et dont le $R_f=0.14$ « pas assez loin de la ligne de dépôt ».

B) La variété Cirta :

Selon la même démarche précédente, on a déterminé que la phase éther de la variété Cirta est très marquée par une tache violette marron et une large tache rose, cette dernière comme c'est déjà mentionné dans le diagnostic CCM correspond à l'anthocyanidine 3,5 di glucoside, Néanmoins l'absorbance de la Bande I et la valeur de R_f ne confirme pas ce diagnostic.

L'analyse spectral de cette phase, selon (Mabry et al ;1970), nous suggères une autre possibilité, la longueur d'onde $\lambda_{max}=324nm$ de la bande I correspond aux caractéristiques spectrales de l'Acacetin 7-O-Glucoside et ses dérivés.

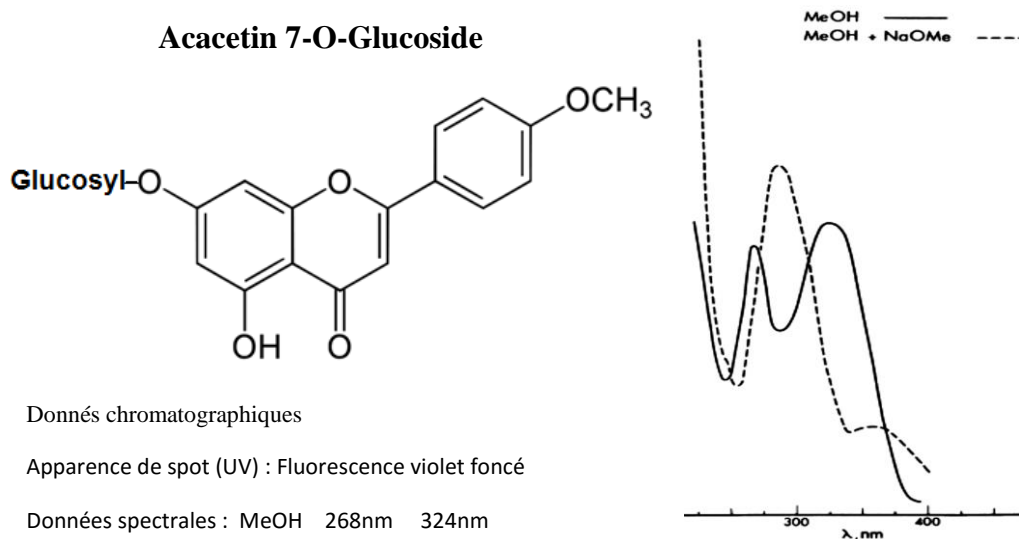


Figure22-C : structure et propriétés des molécules identifiées dans la phase E, Cirta

L'intensité de l'absorption de la bande I, nous indique que notre molécule dominante de la phase est un dérivé méthylé de la molécule comme la 5,7 Dihydroxy-2' methoxy Flavone ou l'un des dérivés possibles. (Autres molécules du diagnostic CCM peuvent aussi être présentes)

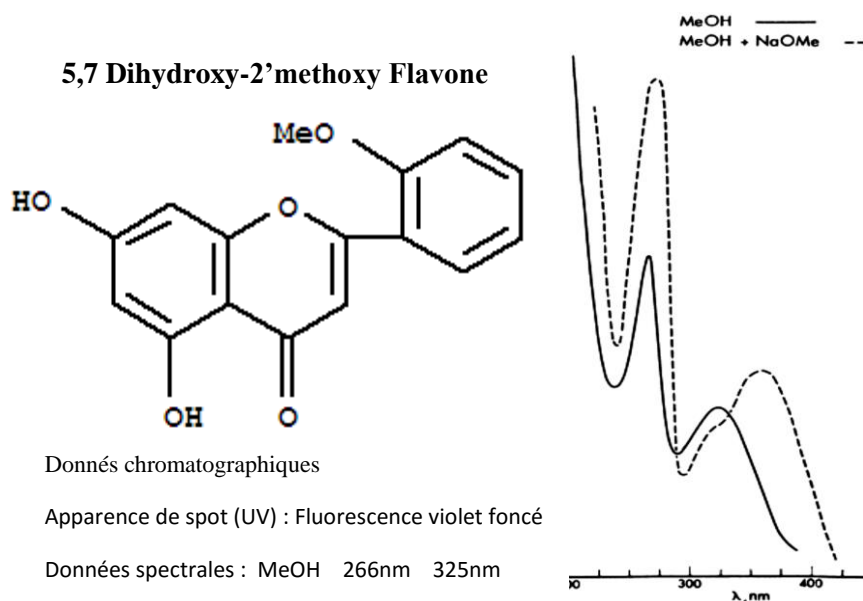


Figure 22-D : structure et propriétés des molécules identifiées dans la phase E, Cirta

II-2-2/ La phase acétate d'éthyle :

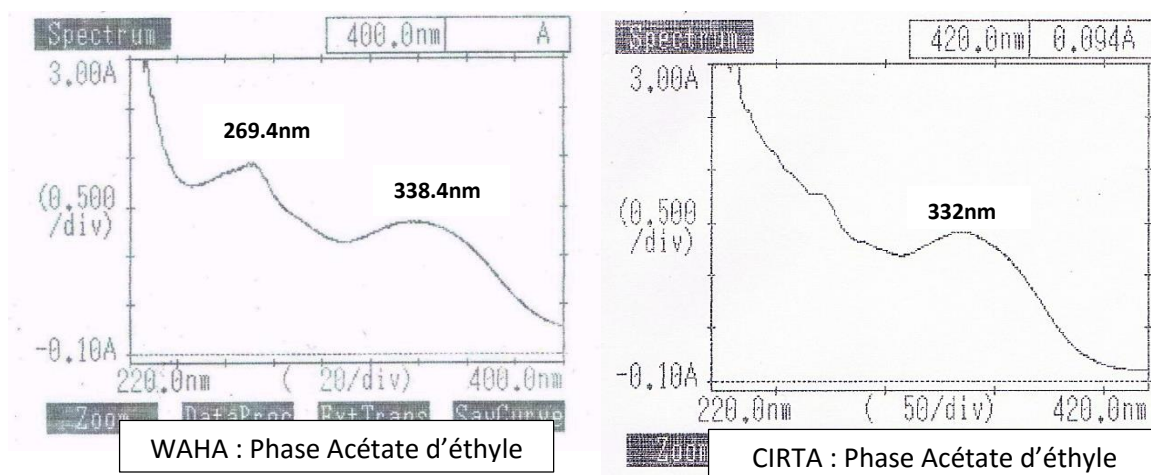
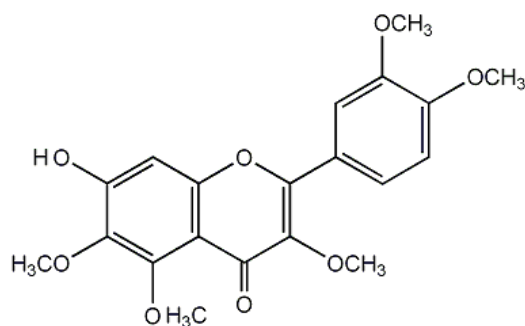


Figure 23 : Spectres d'absorption de la phase Acétate d'éthyle

A) La Variété Waha :

À ces λ_{max} , correspond un Hydroxyflavonol méthyé : Quercetagetin 3,3',4',5,6-penthaméthyl éther. (Ou un autre composé similaire)

Quercetagetin 3,3',4',5,6-penthaméthyl éther



Donnés chromatographiques

Apparence de spot (UV) : Fluorescence Bleu clair

Données spectrales (nm) : MeOH 251sh, 265sh, 338

Figure 23-A : structure et propriétés des molécules identifiées dans la phase A, Waha

B) La Variété Cirta : Composés Non Identifiés, les composés possibles sont ceux de Diagnostic CCM.

II-2-3/ Phase MEC :

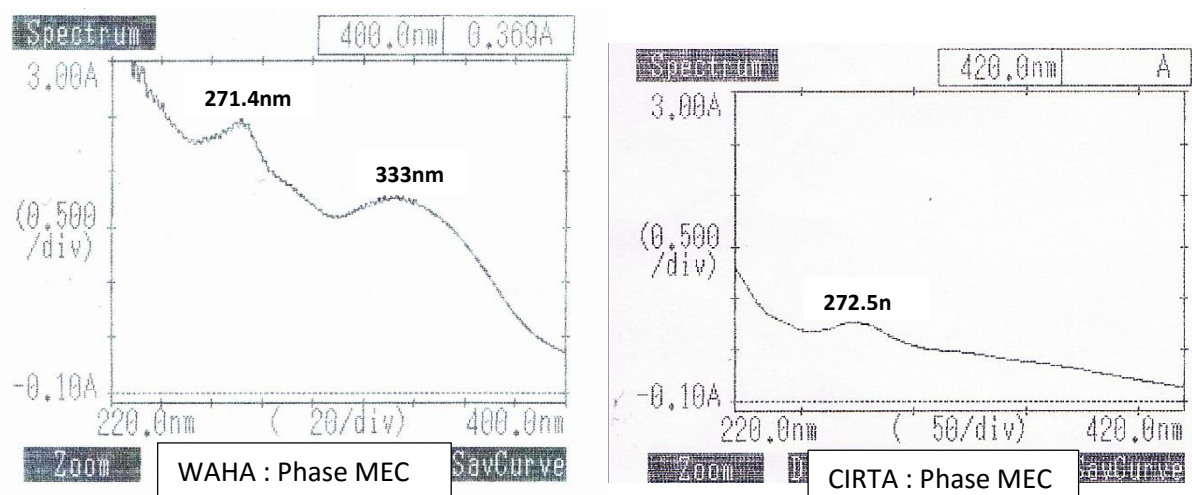
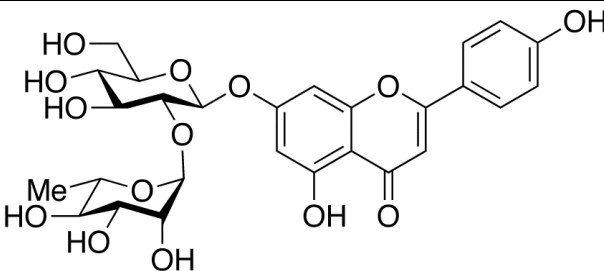


Figure 24 : Spectres d'absorption de la phase MEC

A) **La variété Waha :** quarts composés montrent des propriétés spectral similaire a ce spectre (tableau 13) :

Tableau 13 : composés possibles de la phase MEC

Composé possible	Structure
<p>5-Hydroxyflavone</p> <p>Donnés chromatographiques</p> <p>Apparence de spot (UV) : Fluorescence Violet foncé</p> <p>Données spectrales : MeOH 268, 296sh, 333</p>	
<p>3',4'-Diméthoxyflavone</p> <p>Donnés chromatographiques</p> <p>Apparence de spot (UV) : Fluorescence Bleu clair</p> <p>Données spectrales : MeOH 242, 314sh, 333</p>	
<p>Apigénin 7-O-glucoside</p> <p>Donnés chromatographiques</p> <p>Apparence de spot (UV) : Fluorescence Violet foncé</p> <p>Données spectrales : MeOH 268, 333</p>	

<p>Apigenin 7-O-neohesperidoside</p> <p>Donnés chromatographiques</p> <p>Apparence de spot (UV) : Fluorescence Violet foncé</p> <p>Données spectrales : MeOH 268, 333</p>	
--	--

B) La Variété Cirta :

Le spot est incolore à l'œil nu, il se présente sur le chromatogramme sous forme d'une tache bleue sous UV, d'une couleur jaune verdâtre après pulvérisation par le NEU, son Rf est de 0,09 et son spectre d'absorption correspond à une longueur d'onde λ_{max} de : 272.5nm

Ce spectre d'absorption présente un seul λ_{max} donc dans cette phase il y a peu de flavonoïdes et le composé dominant est un acide phénolique (ALILOU H et al.,2014), qui correspond probablement à l'acide cinnamique qui présente une longueur d'onde maximal d'absorption de 273nm dans le méthanol.

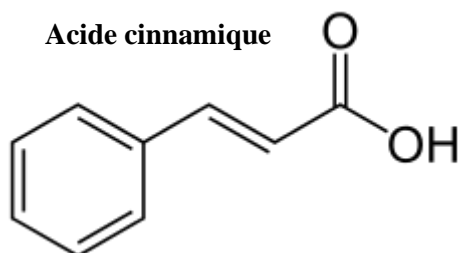


Figure 23-A : structure de la molécule identifiée dans la phase MEC, Cirta

II-2-4/ La phase eau (H₂O) :

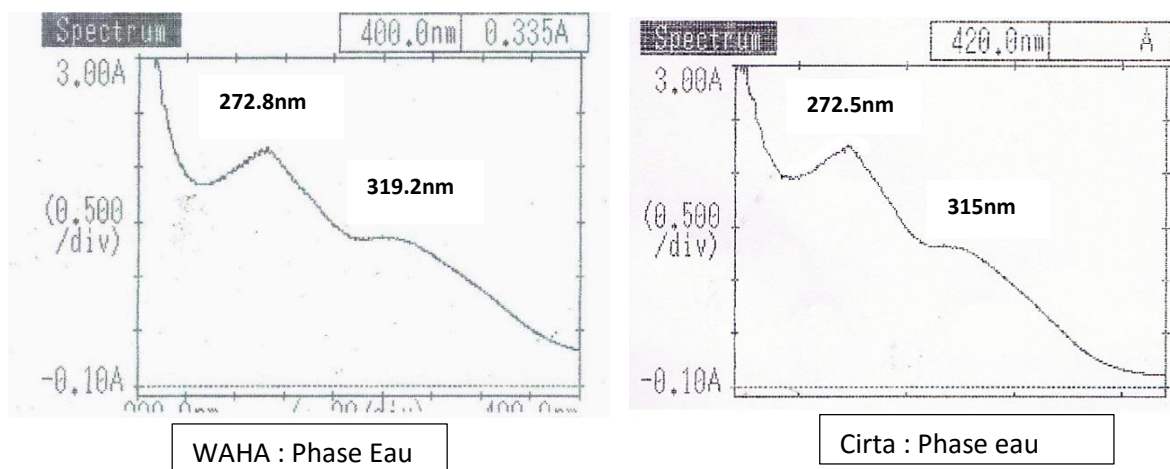


Figure 25 : Spectres d'absorption de la phase eau (H₂O)

Selon la démarche précédente les deux variétés Cirta et Waha ont le même spectre d'absorption, le représentant le plus possible des molécules de cette phase est selon la littérature la Baicalin (5,6,7-trihydroxyflavone 7-O-glucuronide), ce résultat paraît logique du fait que la molécule est riche en groupement hydroxyle ce qui explique le comportement des constituants de cette phase au cours de la CCM qui est représenté par un Rf nulle (à la ligne de dépôt), les molécules n'ont pas pu migrés avec le solvant organique, les liaisons à la phase stationnaire sont très fortes.

La Baicalin (5,6,7-trihydroxyflavone 7-O-glucuronide)

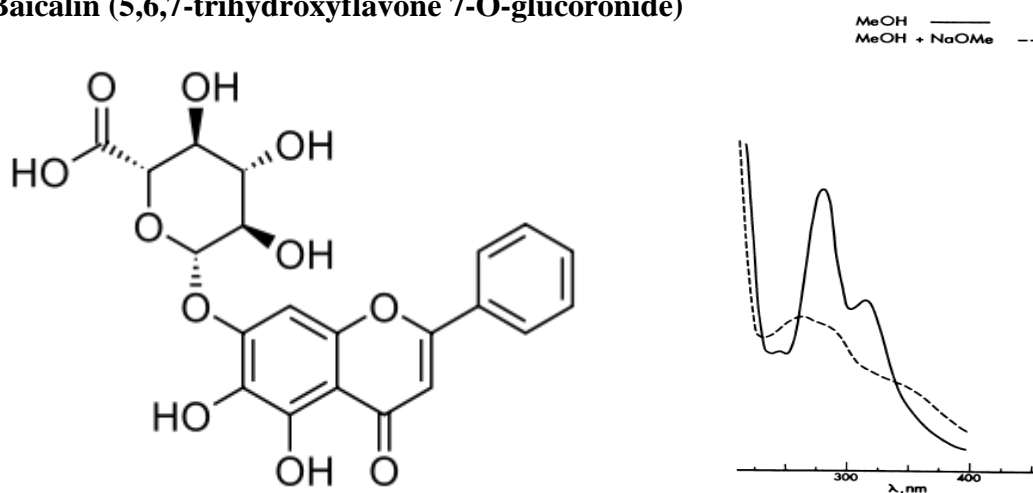


Figure 25-A : structure et propriétés de la molécule identifiée dans la phase H₂O, Waha et Cirta

En fin, selon cette étude, la plupart des molécules identifiées approximativement appartiennent à la classe des flavones, ou des dérivés de 5-Hydroxyflavone, l'utilisation de λ_{\max} de la bande I nous a permis de les différencier des Flavonols (Mabry et al., 1970).

Ces molécules pouvaient être présentes sous différentes formes (aglycones ou avec substitutions), la glycosylation se fait généralement pour ces molécules au niveau du cycle A benzoyle selon Cavaliere et al., 2005, c'est possible que le type de glycosylation justifie la légère différence entre λ_{\max} de la bande II mesuré et celle correspondante dans la littérature (Mabry et al., 1970) comme par exemple les 7 C-glucosylé ou O-glucosylé (Apigenin 7-O-glucoside et Apigenin 7-O-neohesperidoside), les Flavonol 3OH substitués (méthyles) ont aussi été identifiés (Quercetagein 3,3',4',5,6-pentaméthyl éther)

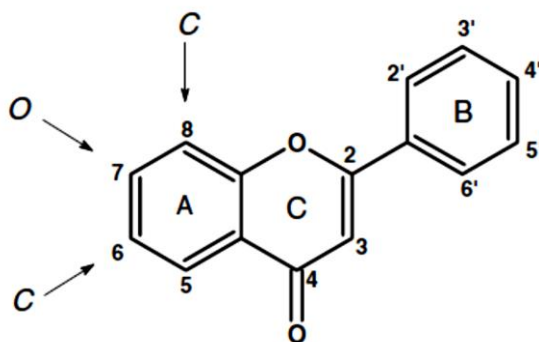
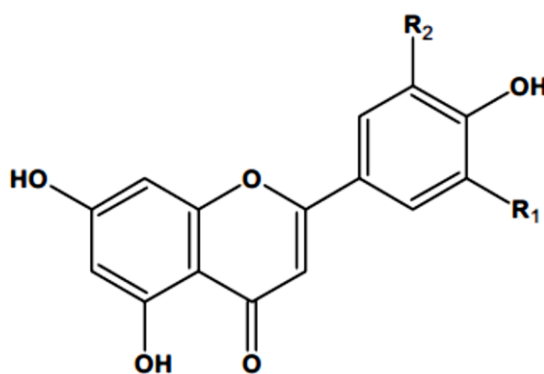


Figure 26 : les sites possibles de la glycosylation des flavones selon Cavaliere et al.,2005

Dans l'étude menée par Cavaliere et al.,2005 sur les tiges et les extraits des feuilles de *Triticum durum cultivar (cv) Ofanto*, selon une approche différente en utilisant HPLC avec spectrométrie de masse, Les flavonoïdes aglycones libres n'ont pas été observé alors que les monoglycosides, diglycosides, triglycosides et une tetraglycoside ont été détectés, la plupart entre eux sont des C- conjugués. Tous les conjugués glycosidiques identifiés étaient des dérivés de seulement de quatre flavones : apigénine, lutéoline, tricine et chrysoeriol. Seules de petites traces d'autres flavonoïdes et les Isoflavones ont été détectés, ce qui est en corrélation avec notre interprétation des résultats et correspond à quelques classes des flavonoïdes identifiées par notre étude.



Aglycone	R ₁	R ₂
Apigenin	H	H
Luteolin	OH	H
Chrysoeriol	OCH ₃	H
Tricin	OCH ₃	OCH ₃

Figure 27 : Structure des quatre flavones détectés dans les tiges et les feuilles de *Triticum durum cultivar (cv) Ofanto* (Cavaliere et al.,2005)

VI- Test du pouvoir antioxydant par le DPPH :

L'activité antioxydante de nos extraits est estimée en se basant sur le changement de la couleur, à des fins comparatives deux antioxydants standards sont utilisés, la quercétine et l'acide gallique qu'ils ont montré une activité antiradicalaire puissante d'après la coloration qui vire vers le jaune contrairement de nos extraits qui donnent une coloration avec la solution de DPPH moins importante que celle de ces deux antioxydants.

Les résultats du pouvoir antioxydant des extraits sont figurés dans les photos et représentés approximativement sur l'histogramme (Figure 29).

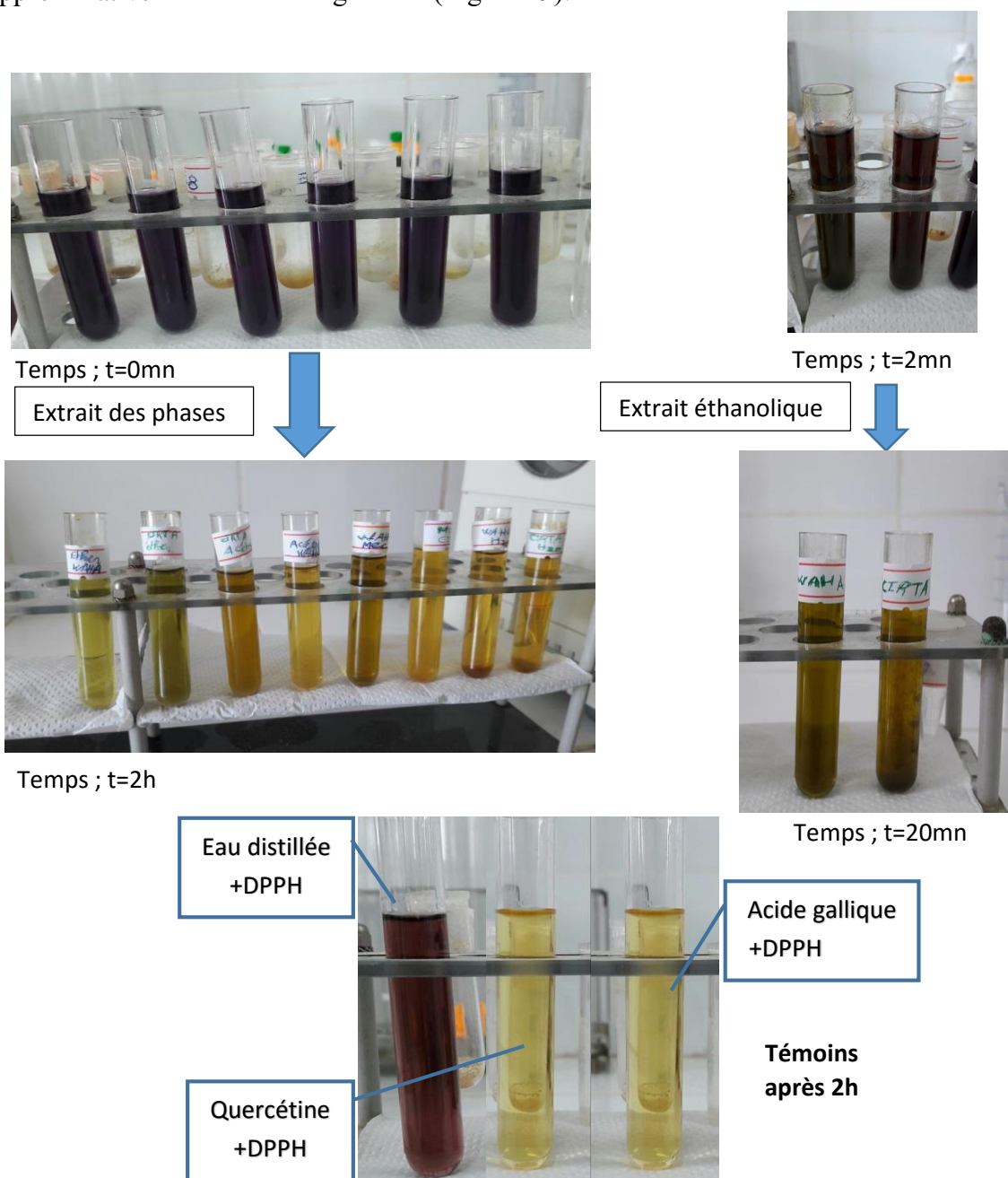


Figure 28 : Evolution de la coloration au cours de test DPPH

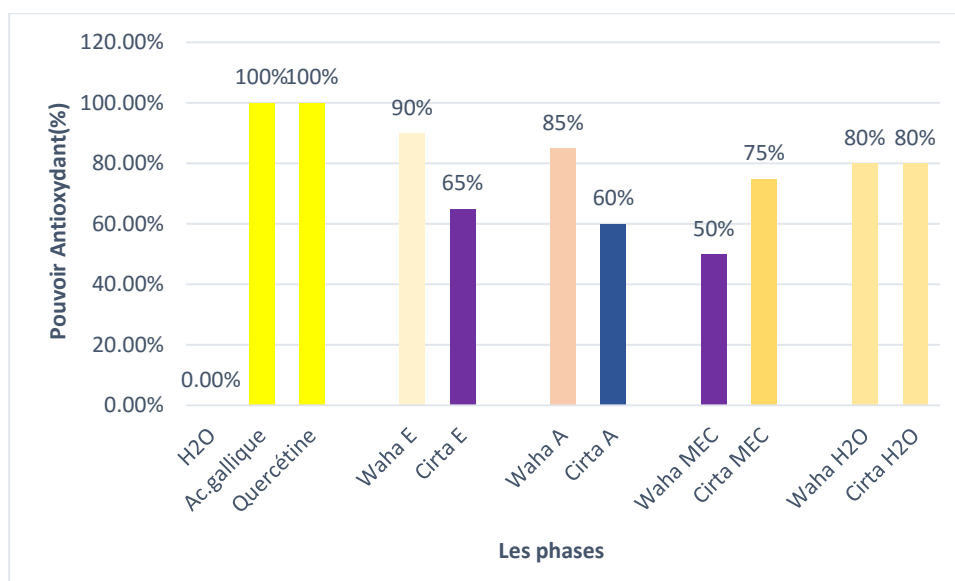


Figure 29 : Estimation du pouvoir Antioxydant des différentes phases (Après 2h de réaction)

Le pouvoir antioxydant de la phase éther diéthylique des deux variétés montre une différence de l'intensité de la coloration, après 2 heures de réaction un virage de la coloration est marqué dans le tube de Waha, ce qui explique que le pouvoir antioxydant de l'extrait Waha dépasse celui de Cirta.

Concernant la phase AcOEt, la couleur de l'extrait de Waha est moins intense par rapport à l'extrait de Cirta ce qui explique que l'activité antioxydante de Waha est plus importante (85%), qui contrairement à la phase MEC la variété Cirta montre une cinétique rapide dans le changement de la coloration du violet vers le jaune et donc cette phase possède un pouvoir antiradicalaire plus fort par rapport à la phase de la variété Waha.

Finalement, pour la phase H₂O. Les deux variétés présentent une même coloration quasiment jaune ce qui indique l'équivalence de la capacité à piéger les radicaux libres.

Concernant les deux extraits éthanoliques on observe un changement de la couleur vers le jaune avec le temps de la variété Cirta supérieur à celui de Waha donc on peut dire que le pouvoir antioxydant est plus important pour la première variété, ce qui est confirmé par la quantification des phénols totaux (1.46 ± 0.58 mg/ml pour l'extrait Cirta et 1.20 ± 0.38 pour Waha).

Au niveau moléculaire les antioxydants réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène (Bougandoura N et Bendimerad N, 2012) L'intensité de la couleur jaune reflète le pouvoir antioxydant des molécules particulièrement

les flavonoïdes présents dans les extraits et dépend d'une façon de la concentration, la nature et la structure de ces molécules.

Conclusion générale

Conclusion générale et perspectives :

Le présent travail a pour but de valoriser deux variétés de blé dur largement cultivées sur le territoire national Algérien comme la variété Waha ou régional comme la variété Cirta par la mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits phénoliques des feuilles de l'herbe de ces variétés.

A cette fin, une étude phytochimique a été réalisée commençant par l'extraction, le fractionnement et l'identification structurale des molécules phénoliques.

Les principaux résultats obtenus indiquent que les teneurs en composés phénoliques des extraits des herbes de blé dur (*Triticum durum*) sont plus importantes que celles de certains extraits de plantes médicinales (ceci est en relation en particulier avec la nature chimique du matériel investigué) comme celles de l'espèce *Mentha pulegium* et l'espèce *Ruta chalepensis* de la famille des rutacées.

La séparation des constituants des différentes phases préparées par la technique de partition entre solvants et leurs visualisations par la technique de chromatographie sur couche mince « CCM analytique » a été effectuée.

Les résultats ont montré que les deux variétés de blé dur sont riches en composés phénoliques y compris essentiellement les flavonoïdes de type flavone alors que les flavones et les flavonols sont les principaux flavonoïdes des plantes médicinales (Khelfallah, 2013).

L'évaluation du pouvoir antioxydant de nos extraits analysés a été réalisée par la détermination de leur pouvoir de piégeage du radical du DPPH° en estimant leur activité antioxydante par l'utilisation des réactions antiradicalaires témoins avec la quercétine, l'acide gallique et l'eau distillée. Suivant ce paramètre, l'activité antioxydante de notre extrait a été mise en évidence et l'orientation de l'utilisation des jeunes plantes de ces deux variétés de blé dur comme étant des plantes médicinales est proposée.

Les résultats de la présente étude ne constituent qu'une initiation à la recherche des composés phénoliques présents dans les feuilles de ces plantes, et de leur pouvoir antioxydant. A la suite de ces résultats, il serait intéressant d'approfondir notre étude afin :

- ❖ D'atteindre la structure exacte des molécules en utilisant des techniques instrumentales les plus sophistiquées telles que la spectrométrie de masse.
- ❖ D'appliquer d'autres tests antioxydants (in vitro et in vivo) pour avoir une indication plus affinée sur la capacité antioxydante de ces extraits phénoliques.
- ❖ De faire une bio-évaluation « in vivo » de ces extraits afin de tester leur capacité à traiter quelques maladies notamment les maladies cardiovasculaires.

Références

Bibliographiques

Alejandro Chehue Romero, Elena G. Olvera Hernández, Telma Flores Cerón and Angelina Álvarez Chávez (2013) The Exogenous Antioxidants. Chapter 2. DOI: 10.5772/52490 In *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology* » "Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants", book edited by José A. Morales-González, ISBN 978-953-51-1123-8, May 2013.

Alilou H, bbencharki B, Lalla Mina Idrissi H et Noureddine B (2014) Screening phytochimique et identification spectroscopique des flavonoïdes d'*Asteriscus Graveolens* Subsp. *Odorus*. *Afrique SCIENCE* **10** (3) : 316 – 328.

Andzi Barhe´ T et Feuya Tchouya. G. R (2014) Comparative study of the anti-oxidant activity of the total polyphenols extracted from *Hibiscus Sabdariffa* L., *Glycine max* L. Merr., yellow tea and red wine through reaction with DPPH free radicals. *Arabian Journal of Chemistry*. Vol **9** (1) January 2016 :1-8.

Asongalem EA, Foyet HS, Ngogang J, et al (2004) Analgesic and antiinflammatory activities of *Erigeron floribundus*. *J Ethnopharmacol* **91** (2-3) : 301-308.

Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., Khebri, S (2010) Activité Anti-Oxydante et Antimicrobienne d'extraits de *Cuminum Cyminum* L. *Lebanese Sci. J.* **11** (1) : 69–81.

Ba, K., Tine, E., Destain, J., Cissé, N., Thonart, P (2010) Etude Comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **14** (1), 131–139.

Bandyukova V. A. et Shinkareako A. L (1973) The thin layer chromatography of flavonoids. *Chemistry of natural compounds.*, **9** (1) : 17-21.

Boizot N., Charpentier J.P (2006) Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Le cahier des techniques de l'Inra : 79-82.

Bougandoura N, Bendimerad N (2012) Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp.Nepeta* (L.) Briq. *Revue Nature & Technologie*. B- Sciences Agronomiques et Biologiques, n° 09/Juin 2013 : 14-19.

Cavaliere chiara, Patrizia Foglia, Elisabetta Pastorini, Roberto Samperi and Aldo Lagana (2005) Identification and mass spectrometric characterization of glycosylated

flavonoids in *Triticum durum* plants by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom* **19** : 3143-3158.

Cristina, P., Ilonka, S., Bartek, T (2009) Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réaction avec le radical libre DPPH. *Rev. séné Ind.* **4**, 25–39.

Crozier A,a Indu B. Jaganathb and Michael N. Cliffordc (2009) Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* **26** (8) : 965-1096.

Cyril Auger, Valérie B. Schini-Kerth (2014) Potentiel des polyphénols à améliorer la protection vasculaire en stimulant la fonction endothéliale. *Cahiers de nutrition et de diététique*, No. of Pages 13.

Delporte C, Backhouse N, Erazo S (2005) Analgesic-antiinflammatory properties of *Proustia pyrifolia*. *J Ethnopharmacol* **99** (1) : 119-124.

Ghazghazia H, Aouadhi C, Maaroufi A et Hasnaoui B (2013) Comparaison des contenus en polyphénols et de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques de quatre plantes collectées du nord de Tunisie. *Microbiol. Hyg. Alim.* Vol **25**, N° 73 : 37-41.

Ghedira k (2005) Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie.*, **3** (4) : 162-169.

Grotewold E. The science of flavonoids. *Springer* (2005).

Grünz G., Daniel H. and Spanier B (2010) In vivo visualization of flavonoids in *C. elegans* using 2-aminoethyl diphenyl borate. *The worm breeder's gazette* **18** : 1.

Guanhua Du, Lan Sun, Rui Zhao, Lida Du, Junke Song, Li Zhang, Guorong He, Yongxiang Zhang, Juntian Zhang (2016) Polyphenols: potential source of drugs for the treatment of ischaemic heart disease. *Pharmacology and Therapeutics*.

Harborne, J.B (1980) Secondary Plant Products. *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol **8**, Bell EA, Charlwood BV, eds, *Springer-Verlag, Berlin*, 1980, pp.329-402. In : Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. Macheix, J.J., Fleriet, A., Christian, A. 2005. PPTUR Lausanne.

Harman D (1956) A Theory based on free radical and radiation chemistry. From the Donner Laboratory of Biophysics and Medical Physics, University of California, Berkeley, *Journal of Gerontology* : 298-300.

Khelfellah A (2013). Etude comparative de contenu phénolique et du pouvoir antioxydant de quelques plantes médicinales et des céréales alimentaires. Thèse de magister de l'université de Constantine.

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 Université de Constantine.

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

Mabry, K. R. Markham and M. B (1970). Thomas The Systematic Identification of Flavonoids. *Springer-Verlag Berlin-Heidelberg* . New York : 62-164.

Macheix JJ, Fleuriet A., Billot J (1990) Fruit phenolics. CRC Press, Boca Raton.

Macheix, J.J., Fleriet, A et Christian, A (2005) Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. PPTUR Lausanne.

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

Martin S et Andriantsitohaina R (2002) Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angiologie* **51**, 304-315.

Merghem R (2009) Eléments de biochimie végétale. *Edition Bahaeddine*: 118-132.

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

Monique Gardès-Albert, Dominique Bonnefont-Rousselot, Zohreh Abedinzadeh et Daniel Jore (2003) Espèces réactives de l'oxygène. *Mécanismes biochimiques* : 91-96.

Morand C (2014) Intérêt des aliments riches en flavonoïdes pour le maintien de la santé cardio-métabolique., **8** (5) : 477-482.

N'gaman Kohue', C.C., Békro, Y.A., Mamyrbékova-Békro, J.A., Bénéié , A., Gooré Bi, S., (2009) la composition en métabolites secondaires et l'activité anti-oxydante d'extraits

Bruts de *Gmélina Arborea Roxb. (Verbanaceae)* de Côte d'Ivoire, Afrique de l'Ouest : Analyse par Chromatographie en Couche Mince. *Eur. J. Sci. Res.* **36** (2), 161–171.

Nadège (2014) 7 incroyables bénéfiques grâce à une seule plante et nouveautés crues, *Veg an' Bio*

Olmedo-Arcega, O. B ; Cantrell, R. G (1995) Recurrent selection for grain yield in Durum Wheat. *Crop Scid.* N° 35 : 714-719

Paris M et Hurabeille M (1981) Abrégé de matière médicale, *Ed : Masson*, 82-101.

Pereira Nunes X, Souza Silva F., Alneida J.R.G. et al (2012) Biological Oxidations and Antioxidant Activity of Natural Products. Chapter1. In “phytochemicals as Nutraceuticals Global Approaches to Their Role in *Nutrition and Health*”. 1ère édition Venketeshwer Rao : 1-20

Pérez M. B., Calderón N. L. et Croci C. A (2007) Radiation–induced enhancement of antioxidant activity in extracts of Rosmary (*Rosmarinus officinalis L.*). *Food chemistry.*, **104** : 585-592.

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

Raskin, I. ; Ribnicky, D. ; Komarnytsky, S. ; Ilic, N. ; Poulev, A. ; Borisjuk, N. ; Brinker, A. ; Moreno, D. ; Ripoll, C. ; Yaboki, N. ; O’Neal, J. ; Cornwell, T. ; Pastor, I. ; Fridlender, B. ; *Trends Biotechnol* (2002) **20 : 522-531.**

Rezaire Aïra (2012) Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa). Thèse de doctorat de l’Université des Antilles et de la Guyane-France.

Sharma, Om P., Bhat, T.K (2009) DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.* **113** (4), 1202-1205.

Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* **299** : 152-178.

Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* **16** :144-158.

Soltner D (2005) Les grandes productions végétales. 20ème.Ed. CCTA : 48

Valérie Micarda, Chantal Brossard, Martine Champ, Isabelle Crenon, Dominique Jourdeuil-Rahmani, Chantal Minier, Maud Petitot (2010) Aliment mixte « blé dur-légumineuse » : influence de la structuration de leurs constituants sur leurs qualités nutritionnelles et organoleptiques. *Cahiers de nutrition et de diététique* **45** :237-245.

Von Sonntag C., Enzymes (chap. 14), *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor & Francis, Londres, 1987 : 429

Wang J., Mazza G (2002) Effect of Anthocyanins and other phenolic compounds on the production of Tumor Necrosis Factors α in LPS/IFN- γ -Activated RAW.264.7. Macrophages. *J. Agric. Food. Chem.* **50**.4183-4189.

Wardman P., Candeias L.P., Radiat. Res., 1996, 145 : 523.

Wigmore A (1984) The Hippocrates Diet and Health Program : 93.

Wojakowska A, Perkowski J, Góral T, Stobiecki M (2012) Structural characterization of flavonoid glycosides from leaves of wheat (*Triticum aestivum L*) using LC/MS/MS profiling of the target compounds in *Journal of Mass Spectrometry* **48** (3):329-339 · March ,2013.

Yaou A (2001) Contribution à l'étude des composés flavoniques d'une labiée : le *Teucrium polium* thèse de magister Université de Constantine.

Yixiang Xu., Sheanell Burton., Chyer Kimand Edward sismour (2016) Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial properties of pomace extracts from four Virginia-grown grape varieties in *Food Science & Nutrition* **4** (1) :125-133.

Yu, L., Haley, S., Perret, J and Harris, M (2002) Antioxidant properties of hard winter wheat extracts. *Food Chemistry.* **78** : 457-46

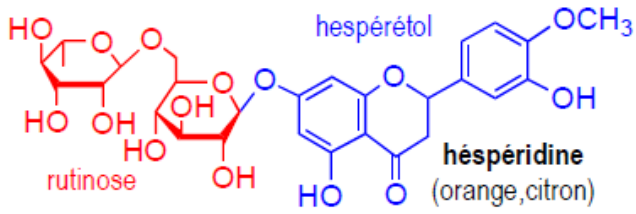
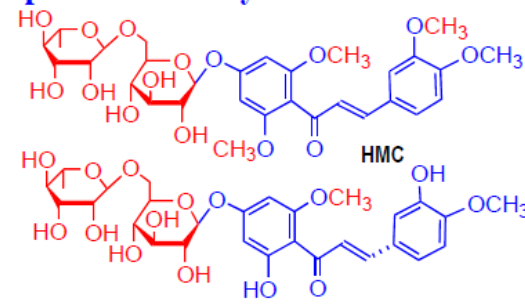
Zeghad N. (2009) Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêts économiques (*Thymus vulgaris, Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Thèse de Magister Université de Constantine.

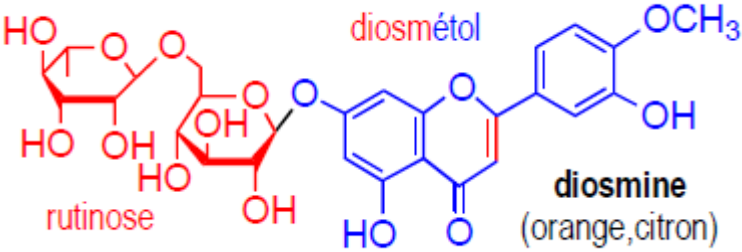
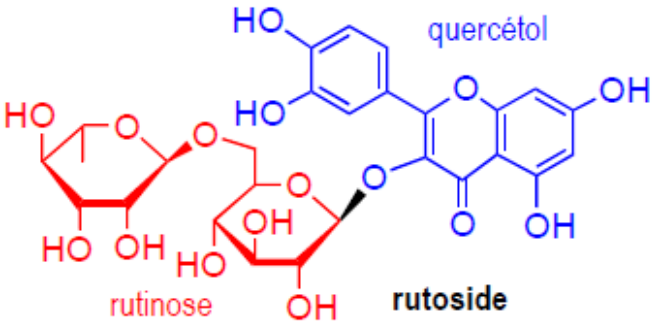
Zeghad N., Merghem R (2013) Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus vulgaris* *LMedicinal and Aromatic. Plant Research Journal* Vol **1** (1) : 5-11.

Zhu K.X., Lian C.X., Guo X.N., Peng W., Zhou H.M (2011) Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ. *Food Chemistry* **126** : 1122-1126.

Annexes

Annexe 01 : quelques exemples de médicaments à base de flavonoïdes, VercauterenJ,2011

	Classe de médicaments	Structure de la molécule du principe actif et indication thérapeutique
Drogues à citroflavonoïde	Les Flavanones	<p>• hespéridoside (hespéridine) :</p>  <p style="text-align: center;">(peu soluble/H₂O ; sans goût)</p> <p style="text-align: center;">7-O-rutinosyl hespérotol (hespéridine)</p> <p>hespéridine méthyl chalcone :</p>  <p style="text-align: center;">(très soluble/H₂O ; jaune)</p> <p style="text-align: center;">hespéridine méthyl chalcone (HMC) et dihydro-chalcone correspondante</p>
	<p><u>Médicaments à hespéridines :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - DAFLON 500 mg cp pelliculé (Servier) - DAFLON 375 mg cp enrobé <p><u>Médicaments à hespéridine méthyle chalcone :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - BICIRKAN Cp pelliculé (acide ascorbique (400 mg), fragon extrait sec (80 mg), hespéridine méthylchalcone (200 mg) (P. Fabre) - CYCLO 3 FORT gél et sol buv (acide ascorbique (100 mg), fragon extrait sec (150 mg), hespéridine méthylchalcone (150 mg) (P. Fabre) 	<p>Indication :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Traitement des symptômes en rapport avec une insuffisance veinolymphatique (jambes lourdes, douleurs, impatiences de primodécubitus). -Traitement des métrorragies lors de la contraception par microprogestatifs et des métrorragies dues au port du stérilet, après leur exploration clinique et paraclinique. Utilisé dans - -le traitement des signes fonctionnels liés à la crise hémorroïdaire.

	<p style="text-align: center;">Les Flavones</p> <p><u>Médicaments à</u></p> <p><u>Diosmine :</u></p> <p>DIO 300 mg cp DIO 600 mg cp dispers DIOSMINE ARROW 300 mg cp pellic DIOSMINE ARROW 600 mg cp pellic DIOSMINE BIOGARAN 300 mg cp pellic DIOSMINE BIOGARAN 600 mg cp pellic DIOSMINE CRISTERS 600 mg cp pellic DIOSMINE EG 300 mg cp pellic DIOSMINE EG 600 mg cp pellic DIOSMINE MYLAN 300 mg cp pellic DIOSMINE MYLAN 600 mg cp DIOSMINE MYLAN 600 mg pdre p susp buv DIOSMINE RATIOPHARM CONSEIL 600 mg cp pellic DIOSMINE RPG 600 mg cp pellic DIOSMINE SANDOZ CONSEIL 600 mg cp pellic</p>	 <p style="text-align: center;">7-O-rutinosyl diosmétel.</p> <p><u>Indication :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Amélioration des symptômes en rapport avec l'insuffisance veinolymphatique : jambes lourdes, douleurs, impatiences du primodécubitus. - Traitement d'appoint des troubles fonctionnels de la fragilité capillaire. - Traitement des signes fonctionnels liés à la crise hémorroïdaire.
Droque à Rutoside	<p style="text-align: center;">Médicament à rutine</p> <p>ESBERIVEN FORT cp enr ESBERIVEN FORT sol buv VELITEN cp pellic VINCARUTINE géll VITARUTINE collyre</p>	 <p style="text-align: center;">3-O-rutinosylquercétol</p> <p><u>Indication :</u></p> <p>En association (avec alcaloïdes vincaminiques, vit. C) : insuffisances circulatoires cérébrales.</p> <p>Plus largement utilisé sous forme de dérivés hémisynthétiques, plus hydrosolubles.</p>

Médicament à Troxérutine	La rutine n'est pas suffisamment hydrosoluble pour pouvoir la présenter en solutions aqueuses buvables (ampoules).
<p>GINKOR FORT pdre p sol buv en sach GINKOR gel p appl loc GINKORGEL gel p appl loc RHEOBRAL gé RHEOFLUX 3 500 mg pdre p sol buv RHEOFLUX 3 500 mg/7 ml sol buv TROXERUTINE ALMUS 3,5g pdre p sol buv TROXERUTINE ALTER 3,5g pdre p sol buv TROXERUTINE ARROW 3,5 g pdre p sol buv TROXERUTINE BIOGARAN 3,5 g pdre p sol buv TROXERUTINE EG 3,5 g pdre p sol buv TROXERUTINE MAZAL 3 500 mg/7 ml sol buv TROXERUTINE MAZAL 3500mg pdre p sol buv TROXERUTINE MERCK 3,5g pdre p sol buv sachet-dose TROXERUTINE RPG 3,5 g pdre p sol buv TROXERUTINE SANDOZ 3,5g pdre p sol buv TROXERUTINE TEVA 3,5g pdre p sol buv VEINAMITOL 3 500 mg pdre p sol buv VEINAMITOL 3500mg/7ml sol buv à diluer VIVENE cp pellic</p>	<p>Contrairement à ce qu'on pourrait penser, c'est en préparant son dérivé triéthoxyéthyléther (= troxérutine ») donc, en masquant les groupements polaires (-OH) fixés sur le squelette aromatique (phénols), qui résout facilement ce problème « galénique »</p> <div data-bbox="616 633 1350 891" data-label="Chemical-Block"> </div> <p><u>Indication :</u></p> <p>Les manifestations fonctionnelles de l'insuffisance veinolympatique (jambes lourdes, douleurs, impatience du primodécubitus).</p> <p>Le traitement symptomatique des troubles fonctionnels de la fragilité capillaire.</p> <p>Le traitement des signes fonctionnels liés à la crise hémorroïdaire.</p> <p>Les baisses d'acuité et troubles du champ visuel présumés d'origine vasculaire.</p>

Annexe 02 : Relation entre Rf et la structure flavonoïdes

(Bandyukova et Shinkarenko, 1973, Yaou, 2001)

Structure flavonique	Facteur de rétention (Rf)
Augmentation des (OH)	Diminution du Rf
Méthylation des groupements (OH)	Augmentation du Rf
Acétylation	Augmentation du Rf
Glycosylation	Diminution des du Rf due à l'introduction de nouveaux groupements (OH)
Hétérosides de flavones avec 3-OH libre	Rf nul dans l'eau

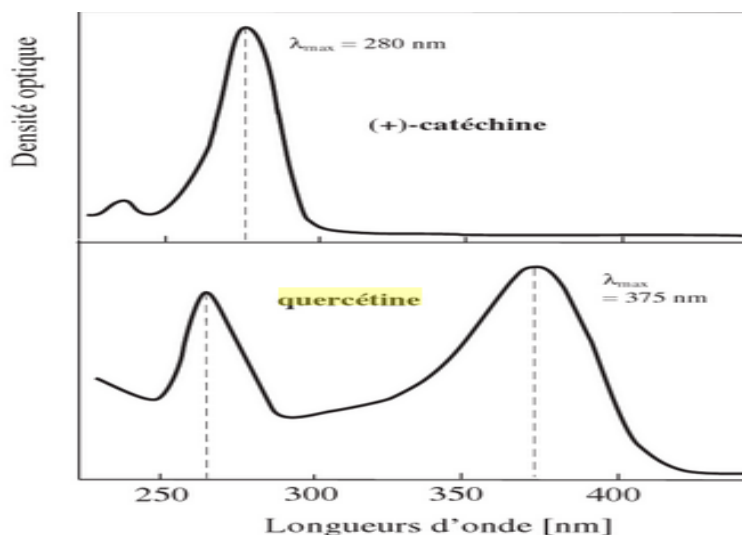
Annexe 03 : La relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes

(Markham, 1982, Lahouel, 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	Flavonols 3- OH libre avec ou sans 5-OH libre
Jaune	
Fluorescence orangée	
Jaune vert brillant	5 OH libre ou 5 OH substitué
Jaune fluorescent	Flavonols avec 3OH libres Aurones Chalcone Flavanones
Jaune pâle	dihydroflavonols
Rouge	Anthocyanidine 3 glucoside
Rose	Anthocyanidine 3,5 di glucoside

Annexe 04 : Quelques données de la littérature**Annexe 04-a** : spectre d'absorption de la catéchine et de la quercétine en UV

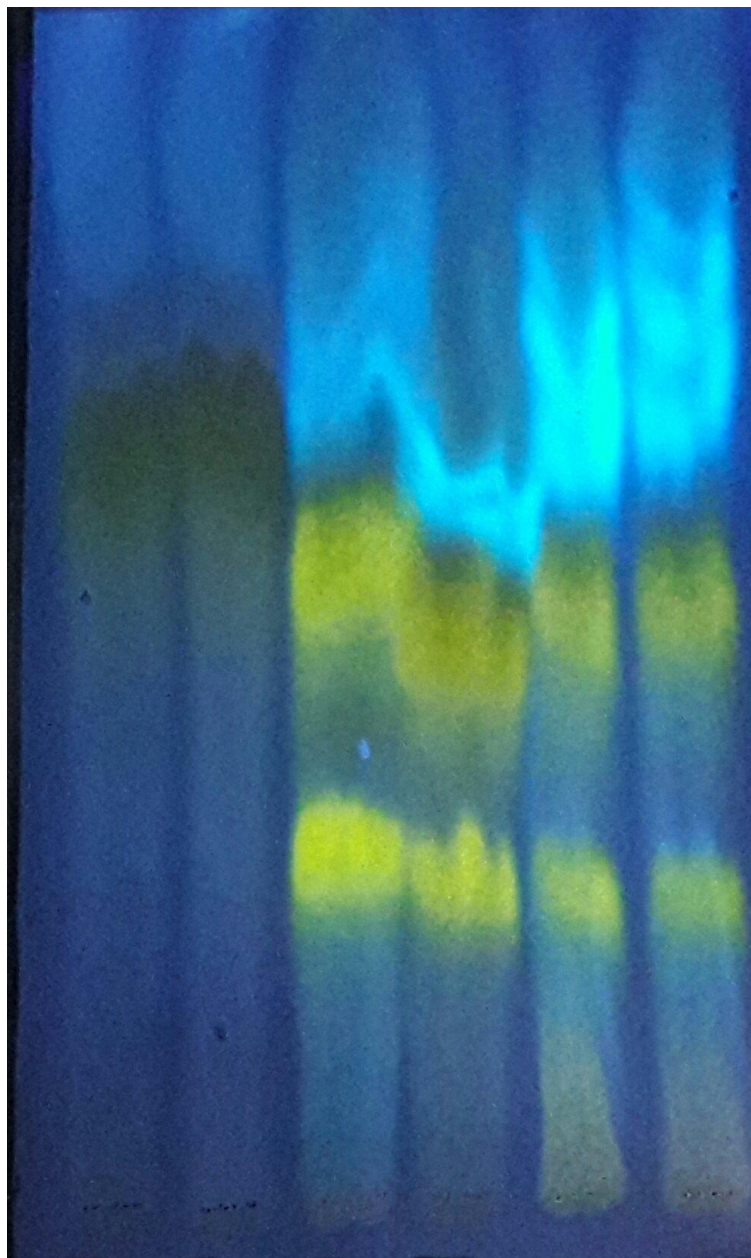
(Macheix et al., 2005)

**Annexe 04-b** : Les principales caractéristiques des spectres UV-visible des flavonoïdes

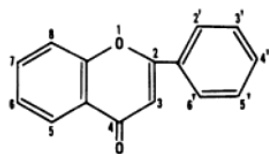
(Markham, 1982)

Bande II (nm)	Bande I (nm)	Types de flavonoïdes
250-280	310-350	Flavones
250-280	330-360	Flavonols (3-OH substitué)
250-280	350-385	Flavonols (3-OH libre)
245-275	310-330 Epaulement 320 pics	Isoflavones Isoflavones (5-desoxy-6,7- désoxygéné)
275-295	300-330 Epaulement	Flavanones et Dihydroflavonols
230-270 (Faible intensité)	340-390	Chalcones
230-270 (Faible intensité)	380-430	Aurones
270-280	465-560	Anthocyanidines et anthocyanines

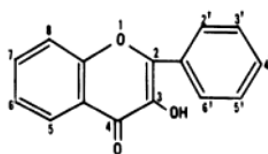
Annexe 05 : Résultats de la CCM de la phase eau avec le système solvant
H₂O/EtOH/MEC/AcOH 13/3/3/1



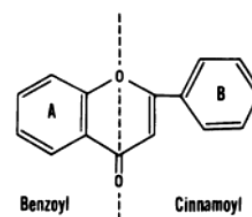
Annexe 06 : Spectre UV de la bande I des flavones et des flavonols dans le méthanol selon mabry et al.,1970)



I. Flavone skeleton



II. Flavonol skeleton



III.

Table V-1. Band I in the ultraviolet spectra of flavones and flavonols in methanol

Spectrum No.	Flavonoid	Band I (nm)
100	Gossypitrin	385
98	Gossypetin	385 ^a
99	Gossypin	380
64	Herbacetin 8-methyl ether	377
102	Myricetin	374
93	Patulitrin	373
66	Quercetin 7-O-rhamnoside	372
76	Rhamnetin	371
90	Patuletin	371
65	Quercetin	370
77	Isorhamnetin	370
82	Morin ^a	370
80	Tamarixetin 7-O-neohesperidoside	369
58	Kaempferol	367
83	Robinetin	367
61	Kaempferol 4'-methyl ether	367
81	Tamarixetin 7-O-rutinoside	367
56	3,3',4'-Trihydroxyflavone	366
59	Kaempferol 7-O-neohesperidoside	364
18	5,7,8-Trihydroxyflavone (Norwogonin)	364 ^c
62	Fisetin	362
67	Quercetin 3-O-galactoside	362
75	Quercetin 3',4',5,7-tetramethyl ether	362
54	Galangin	359
69	Rutin	359
73	Quercetin 3-methyl ether	358
72	Quercetin 3-O-glucoside 7-O-rutinoside	358
71	Quercetin 3-O-glucoside 7-O-rhamnoside	358
78	Isorhamnetin 3-O-galactoside	357
79	Isorhamnetin 3-O-rutinoside	356
53	3,4',7-Trihydroxyflavone	356
92	Patuletin 3-O-rutinoside	356
57	3-Hydroxy-3',4'-dimethoxyflavone	355
70	Quercetin 3,7-O-diglucoside	355
52	3-Hydroxy-4'-methoxyflavone	355
91	Patuletin 3-O-glucoside	355
95	Quercetagenin 3',4',5,6,7-pentamethyl ether	354
88	Jacein	352
87	Jaceidin	351
101	Gossypetin hexamethyl ether	351
60	Kaempferol 3-O-robinoside 7-O-rhamnoside (Robinin)	350
68	Quercitrin	350
44	Tricin	350
89	Centaurein	350
37	Isoorientin	349
34	Luteolin	349
39	Lucenin-1	349
74	Quercetin 3-methyl ether 4'-O-glucoside 7-O-diglucoside	349

Spectrum No.	Flavonoid	Band I (nm)
36	Luteolin 7-O-rutinoside	349
35	Luteolin 7-O-glucoside	348
32	Zapotinin	348 ^c
40	Chrysoeriol	347
38	Orientin	346
94	Artemetin	345
41	Scoparin	345
42	Diosmetin	344
51	3-Hydroxyflavone	344
13	3'-4'-7-Trihydroxyflavone	343
19	5,7,8-Trihydroxyflavone 7-O-glucuronide	342 ^c
14	3',4',7-Trihydroxyflavone 7-O-rhamnoglucoside	341 ^a
5	3',4'-Dihydroxyflavone	340
63	Fisetin 3-O-glucoside	340 ^a
55	Galangin 3-methyl ether	340 ^c
43	5,7-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavone	340
84	Penduletin	340
86	3,5,6,7,8-pentamethoxyflavone	338
96	Quercetagenin 3,3',4',5,6-pentamethyl ether	338
48	Hymenoxin	336
23	Isovitexin (Saponaretin)	336
24	Saponarin	336
20	Apigenin	336
26	Rhamnosylvitexin	336
25	Vitexin	336
28	Violanthin	335
49	Amentoflavone	335
103	3',5,5'-Trihydroxy-3,4',6,7-tetramethoxyflavone	335
27	2''-O-Xylosylvitexin	335
2	5-Hydroxyflavone	333
6	3',4'-Dimethoxyflavone	333
21	Apigenin 7-O-glucoside	333
22	Apigenin 7-O-neohesperidoside	333
97	Quercetagenin hexamethyl ether	333
47	Xanthomicrol	332
45	5,7-Dihydroxy-3',4',5'-trimethoxyflavone	331
85	Pendulin	330
15	7-Hydroxy-3',4'-dimethoxyflavone	330
46	Nevadensin	329
9	4',7-Dihydroxyflavone	328
11	5-Deoxyvitexin (Bayin)	328
29	Acacetin	327
50	Sciadopitysin	326
10	4',7-Dihydroxyflavone 7-O-rhamnoglucoside	325
31	5,7-Dihydroxy-2'-methoxyflavone	325
33	Zapotin	325
30	Acacetin 7-O-glucoside	324
16	Baicalein (5,6,7-Trihydroxyflavone)	323
12	7-Hydroxy-4'-methoxyflavone (Pratol)	323
4	4'-Methoxyflavone	317
17	Baicalin (5,6,7-Trihydroxyflavone 7-O-glucuronide)	315
7	Chrysin	313
3	7-Hydroxyflavone	307
1	Flavone	307
8	Tectochrysin	303

ملخص

بينت دراسات حديثة مؤخرا أن المضادات للأكسدة الإصطناعية مثل بوتيل هيدروكسي تولوين والأيسول تشكل خطرا على صحة الإنسان مما أدى إلى تكثيف الأبحاث من أجل الكشف عن مركبات أخرى مضادة للأكسدة طبيعية فعالة وغير سامة مثل البوليفينول.

من جهة أخرى تشير بعض الدراسات الوبائية أن الإلتزام بحمية البحر الأبيض المتوسط تلعب دورا هاما في طول العمر بالنسبة للسكان والوقاية من أمراض مختلفة (القلب-السكري من النوع 2-السرطان...) من بين الأغذية المكونة لهذا النظام القمح والبقوليات على عكس القمح الصلب الذي انخفض استهلاكه حسب بعض الإحصائيات رغم احتوائه على مركبات فينولية تقي الجسم من الكثير من الأمراض.

الهدف من هذه الدراسة هو الكشف عن مستخلصات فينولية يا استعمال طريقة Folin ciocalteu ونشاطها المضاد للأكسدة يا اختبار DPPH لأوراق نوعين من القمح الصلب (*Triticum durum*) حيث تحقق أن هذه المستخلصات لها قدرة فعالة ضد الجذر الحر الإصطناعي DPPH° وهذه النتائج ليست سوى مقدمة للبحث مما يثير الإهتمام لتعميق الدراسة عن طريق إستعمال تقنيات أكثر تطور ودقة.

الكلمات المفتاحية: مستخلصات فينولية، نشاط مضاد للأكسدة، القمح الصلب *Triticum durum*

Abstract :

Synthetic antioxidants like butylhydroxytoluene or butylhydroxyanisol have been recently reported to be dangerous for the human health. Also the research for the natural efficient non toxic components, having an antioxidant activity like polyphenols, has been intensified during this last few years.

According to some epidemiological studies, the Mediterranean diet seems to play an essential role for the longevity of populations and the prevention of diverse diseases (cardiovascular, type 2 diabetes, cancer...). Among the elements composing the Mediterranean regime; wheat and leguminous contrary to the hard wheat which their consumption has been dropped substantially at a point to only consummated for a few times on average per annum.

In parallel, other epidemiological studies have shown that a reverse association exist between cardiovascular morbidity-mortality and the consumption of products rich of polyphenols.

This work is realised in the context of a research for the antioxidant activity of phenolic extracts from young leafs of two hard wheat varieties (*Triticum durum*) widely cultivable in national Algerian territory like Waha variety or the regional territory like Cirta variety.

With the DPPH test we had been able to demonstrate that the phenolic extracts from the two varieties of hard wheat have developed an antiradical activity more or less important.

This activity is in a correlation with the phenolic amounts determined by colorimetric methods of Folin-Ciocalteu followed by CCM, thanks to this last one and to a spectral analyse had allowed as to identify that the majority of phenolic components present in these extracts belong to flavonoids class and particularly flavones , most of the time substituted (methylated or glycosylated).

The results of the present study constitute only an initiation of the research, as follows, it will be interesting to deepen our study in order to achieve the exact structure of these molecules using more sophisticated technics such as mass spectrometry and to apply other antioxidant tests (in vitro-in vivo) to have an indication more affined on the antioxidant capacity of these phenolic extracts.

Keywords : phenolic extracts, scavenging activity, Durum wheat (*Triticum durum*).

Année universitaire : 2015/2016

Présenté par : AOUINA ISHAK
SAID IMED

Intitulé : Caractérisation et mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits phénoliques du blé dur (*Triticum durum*)

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

Des antioxydants synthétiques comme butylhydroxytoluène ou butylhydroxyanisol ont récemment été signalé dangereux pour la santé humaine. Ainsi la recherche de composés naturels efficaces, non toxiques ayant une activité antioxydante tel que les polyphénols, a été intensifié au cours de ces dernières années.

Selon certaines études épidémiologiques, la diète méditerranéenne semble jouer un rôle essentiel dans la longévité des populations et la prévention de diverses maladies (cardiovasculaire, diabète de type 2, cancer...), parmi les aliments composants le régime méditerranéen le blé et les légumineuses qui contrairement au blé dur ont vu leurs consommations chuter considérablement de point de n'être consommé que quelques fois par an en moyenne. En parallèle d'autres études épidémiologiques ont montré qu'il existait une association inverse entre la morbi-mortalité cardiovasculaire et la consommation de produits riches en polyphénols.

Ce travail est réalisé dans le contexte de la recherche d'une activité antioxydante des extraits phénoliques des feuilles de la jeune plante de deux variétés de blé dur (*Triticum durum*) largement cultivé sur le territoire national.

Par le teste de DPPH nous avons pu montrer que les extraits phénoliques des deux variétés de blé dur ont développés une activité antiradicalaire plus ou moins importante, cette activité est en corrélation avec la quantité des polyphénols dosés par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu, suivi d'une CCM, cette dernière et grâce à une analyse spectral nous a permis d'identifié que la plupart des composé phénoliques présents dans ces extraits appartiens à la classe des flavonoïdes et en particulier des flavones le plus souvent substitués (méthylé ou glucosylé).

Les résultats de la présente étude ne constituent qu'une initiation à la recherche, à la suite, il serait intéressant d'approfondir notre étude afin d'atteindre la structure exacte des molécules en utilisant des techniques plus sophistiqués telles que la spectrométrie de masse et d'appliquer d'autres tests antioxydants (in vitro et in vivo) pour avoir une indication plus affinée sur la capacité antioxydante de ces extraits phénoliques.

Mots clés : Extraits phénoliques, pouvoir antioxydant, Blé dur (*Triticum durum*)

Laboratoire de recherche : laboratoire de Développement et Valorisation des Ressources Phytogénétiques à l'université des frères Mentouri Constantine

Jury d'évaluation :

Président du jury : *NECIB Youçef* (Professeur - UFM Constantine),
Rapporteur : *MERGHEM Rachid* (Professeur - UFM Constantine),
Examineur : *KHEDARA Abdelkrim* (Docteur. MCA- UFM Constantine).

Date de soutenance : 26/06/2016