

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Abderrahmane MIRA de Béjaïa

Faculté des sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences Alimentaires.

# Mémoire

Présenté par : M<sup>elle</sup> Kahina OUDJEDI

En vue de l'obtention du diplôme de **Magister. Filière : Biologie**

**Option : Alimentation et Technologie Alimentaire**

## Thème

**Teneur en composés phénoliques et activité antioxydante d'extraits bruts d'extrait bruts *Salvia officinalis* L. et de *Laurus nobilis* L.**

Soutenu publiquement le 01 juillet 2014 .Devant le jury composé de :

Mr IGUEROUADA Mokrane	Professeur	Univ.De Bejaia	Président
M <sup>R</sup> ·ZAIDI Farid	Professeur	Univ. De Bejaia	Rapporteur
M <sup>elle</sup> LOUAILECHE Hayette	professeur	Univ. De Bejaia	Examinatrice
Mr AISSAT Kamel	M.C.A	Univ. De Bejaia	Examineur
Mr KATI Djamel Dine	M.C.B	Univ. De Bejaia	Invité

Année universitaire  
2013/ 2014

## *Remerciement*

*Dans cet espace qui m'est réservé, je tiens à présenter mes profonds remerciements à tous ceux qui ont collaboré pour la réalisation de cet humble travail, notamment :*

*Mon encadreur, le Professeur ZAIDI Farid pour sa disponibilité, ses conseils précieux et son grand dévouement pour l'achèvement de ce mémoire.*

*L'honorable jury composé du Professeur IGUEROUADA président, du Professeur LOUAILECHE, et du D<sup>r</sup> AISSAT, examinateurs et D<sup>r</sup> KATI comme invité.*

*Je le remercie d'avoir accepté d'examiner ce travail qui est l'aboutissement d'un grand défi personnel et qui je l'espère pourra répondre à des ambitions expérimentales et scientifiques.*

*A madame Hassissene Nadia pour ces précieux conseils et les corrections apportées à ce document.*

*A toute l'équipe du laboratoire Nutrition et Alimentation pour leur accompagnement et collaboration.*

*A mes chères collègues de la promotion « Alimentation et Technologie Alimentaire » pour leurs sincères engagements scientifiques et véritable aide.*

*Ma gratitude va également à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*Dédicace*

*Je dédie ce mémoire à toutes les personnes qui m'ont soutenue durant sa  
réalisation surtout à :*

*Mes chers parents*

*Ma sœur Sonia, son mari Fatah et sa belle famille*

*Mes frères, Idir, sa femme Mebrarka et Achour*

*Ma petite nièce LAHNA*

*Mes grands parents*

*Mes oncles et leurs familles*

*Mes tantes et leurs familles*

*Mes très cher(es) ami(es) : Ferroudja, Lila, Saliha, Fairouz, Tinhinane, Sabrina,  
Saida, Ghania, Drifa, Siham, Amirouche, Massinissa, Toufik, Mourad,.*

*Mes copines de chambre D414.*

*Mme BOUALI Malika et sa famille.*

<b>Introduction</b> .....	1
---------------------------	---

## **Synthèse bibliographique**

<b>I. Métabolites secondaires des plantes</b> .....	4
I.1. Différents types de métabolites secondaires. ....	4
I.1.1. Les saponines. ....	4
I.1.2. Les phytostérols. ....	5
I.1.3. Les terpènes. ....	5
I.1.4. Les alcaloïdes.....	6
I.1.5. Les composés phénoliques.....	6
I.2. Composés phénoliques.....	7
I.2.1. Classification des composés phénoliques. ....	7
I.2.2. Biosynthèse des composés phénoliques.....	13
I.2.3. Propriétés antioxydantes des composés phénoliques.....	13
I.2.3.1. Le piégeage des radicaux libres. ....	14
I.2.3.2. La chélation des métaux.....	14
I.2.3.3. La complexation des protéines.....	15
I.2.4. Intérêts des composés phénoliques. ....	15
I.2.5. Les composés phénoliques et la santé.....	16
<b>II. Radicaux libres</b> .....	18
II.1. Nature des radicaux libres le système biologique.....	18
II.1.1. Espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	18
II.1.1.1. L'anion-radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ).....	18
II.1.1.2. Le peroxyde d'Hydrogène ( $H_2O_2$ ).....	19
II.1.1.3. Le radical hydroxyle ( $HO\cdot$ ).....	19
II.1.1.4. Les radicaux peroxydes. ....	19
II.1.1.5. L'oxygène singulet ( $^1O_2$ ).....	19
II.1.2. Les espèces réactives de l'azote. ....	19
II.2. Rôles physiologiques des radicaux libres. ....	20
II.3. Les effets néfastes associés aux radicaux libres. ....	20
II.3.1. Oxydation des composés lipidiques. ....	20
II.3.2. Oxydation de l'ADN. ....	23
II.3.3. Oxydation des protéines. ....	24

II.4. Le stress oxydant. ....	24
II.5. Les antioxydants. ....	25
II.5.1. Rôle des antioxydants. ....	26
II.5.2. Défense de l'organisme contre le stress oxydatif. ....	26
II.5.3. Les antioxydants enzymatiques. ....	27
II.5.3.1. Les superoxydesdismutases (SOD). ....	27
II.5.3.2. La catalase (CAT). ....	27
II.5.3.3. La glutathion peroxydase (GPx). ....	27
II.5.3.4. La Glutathion réductase. ....	27
II.5.4. Les antioxydants non-enzymatiques. ....	28
II.5.4.1. Le glutathion. ....	28
II.5.4.2. La bilirubine. ....	29
II.5.4.3. L'acide urique. ....	29
II.5.4.4. Le coenzyme Q. ....	29
II.6. Classification des antioxydants. ....	29
II.6.1. Antioxydants synthétiques. ....	29
II.6.2. Antioxydants naturels. ....	30
II.6.2.1. Les vitamines. ....	31
II.6.2.2. Les caroténoïdes. ....	32
II.6.2.3. Les oligoéléments. ....	33
II.6.2.4. Les composés phénoliques. ....	33
II.6.3. Antioxydants primaires. ....	33
II.6.4. Antioxydants secondaires. ....	33
II.6.5. Les antioxydants synergiques. ....	34
<b>III. Données générales sur le laurier et la sauge. ....</b>	<b>35</b>
III.1. Dénomination et classification botanique. ....	35
III.2. Description botanique des deux plantes. ....	36
III. 3. Origine et distribution des deux plantes. ....	37
III.4. Utilisation des deux plantes. ....	37

## **Partie expérimentale**

<b>I. Matériel et méthodes. ....</b>	<b>40</b>
I.1. Récolte et préparation des échantillons. ....	40

I.1.1. Origine des échantillons.....	40
I.1.2. Séchage.....	40
I.1.3. Broyage.....	40
I.1.4. Tamisage.....	40
I.2. Composition chimique globale.....	41
I.3. Extraction et dosage des composés phénoliques.....	41
I.3.1. Extraction.....	41
I.3.2. Dosage des composés phénoliques.....	42
I.3.2.1. Dosage des phénols totaux solubles.....	43
I.3.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	43
I.3.2.3. Dosage des tannins condensés.....	44
I.3.2.4. Dosage des tannins hydrolysables.....	45
I.3.2.5. Dosage des tannins précipités par la BSA.....	45
I.4. Mise en évidence d'autres métabolites secondaires dans les extraits.....	45
I.5. Fractionnement par CCM des extraits.....	46
I.5.1. Identification des fractionnements.....	47
I.5.2. Test du pouvoir anti-radicalaire du DPPH sur plaque CCM.....	49
I.5.3. Récupération de fractions chromatographique.....	49
I.6. Etude in vitro de l'activité antioxydante.....	49
I.6.1. Pouvoir antiradicalaire du DPPH.....	50
I.6.2. Le pouvoir réducteur du fer.....	51
I.6.3. Test de blanchiment de $\beta$ -carotène couplé à l'oxydation de l'acide linoléique.....	51
I.6.4. Chélation du fer ferreux.....	52
I.7. Analyses statistiques des résultats.....	53
<b>II. Résultats.....</b>	<b>54</b>
II.1. Composition chimique.....	54
II.2. Le rendement d'extraction.....	54
II.3. Teneur en composés phénoliques.....	55
II.3.1. Teneur en phénol totaux solubles.....	55
II.3.2. Teneur en flavonoïdes.....	56
II.3.3. Teneur en tanin hydrolysable.....	57
II.3.4. Teneur en Tanin condensé.....	58
II.3.5. Teneur en Tanin précipité par la BSA.....	59
II.4. Résultats du screening chimique.....	60

II.5. Fractionnement des composés par CCM.....	62
II.5.1. Analyse des chromatogrammes par CCM.....	63
II.5.1.1. Caractérisation dans le système Acétate d'éthyle.....	63
II.5.1.2. Caractérisation dans le système chlorométhane/méthanol/eau.....	67
II.5.1.3. Test de DPPH sur plaque CCM.....	75
II.6. Résultats d'activité antioxydante in vitro.....	77
II.6.1. Activité anti radicalaire du DPPH.....	77
II.6.1.1. Activité anti radicalaire du DPPH des extraits bruts.....	77
II.6.1.2. Activité anti radicalaire du DPPH des fractions.....	79
II.6.1.2.1. Activité anti-radicalaire du DPPH des fractions de sauge dans le système dichlorométhane.....	82
II.6.1.2.2. Activité anti-radicalaire du DPPH de fraction de sauge dans le système acétate d'éthyl.....	84
II.6.1.2.3. Activité anti radicalaire du DPPH des fractions de laurier dans le système dichlorométhane.....	85
II.6.2. Pouvoir Réducteur du fer.....	87
II.6.2.1. Pouvoir Réducteur du Fer des extraits bruts.....	87
II.6.2.2. Pouvoir Reducteur du Fer des fractions.....	89
II.6.2.2.1. Pouvoir réducteur du Fer de fraction de sauge récupéré dans le dichlorométhane.....	89
II.6.2.2.2. Pouvoir réducteur des fractions de sauge récupérée dans le système Acétate d'éthyle.....	91
II.6.2.2.3. Pouvoir réducteur de fraction du laurier.....	93
II.6.3. Test de blanchiment du $\beta$ -carotène.....	95
II.6.4. Chélation du fer ferreux.....	96
II.7. Corrélation.....	97
<b>III. Discussion générale.....</b>	<b>99</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>105</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>108</b>

- ABS** : Absorbance
- AC** : Acide Caféique
- AcFER** : Acide Ferrulique
- APC** : Acide p-coumarique
- AR** : Acide Rosmarinique
- AT** : Acide Tannique
- BHT** : butylhydroxytoluène
- BSA** : Bovine Sérum Albumine
- CAT** : Catéchine
- CCM** : Chromatographie sur Couche Mince
- DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil
- EqAG** : Equivalent Acide Galique
- EqAT** : Equivalent Acide Tannique
- EqCAT** : Equivalent Catéchine
- EqQ** : Equivalent quercétine
- ERO** : espèce réactive de l'oxygène
- FLAV** : Flavonoïde
- HPLC** : Chromatographie en phase liquide à haute performance
- IC50** : Concentration inhibitrice de 50%
- LED** : Extrait aqueux du Laurier
- LDL** : Lipoprotéine de basse densité
- L60** : Extrait éthanolique 60% du Laurier
- L80** : Extrait éthanolique 80% du Laurier
- L100** : Extrait éthanolique 100% du Laurier
- MS** : Matière Sèche
- PTS** : Phénols Totaux Solubles
- Q** : Quercétine
- RF** : Rapport frontal
- TCA** : Acide Trichloracétique
- TEA** : Triéthanolamine



**Liste des figures**

Figure 1 : La molécule d'isoprène.....	5
Figure 2 : Structures de quelques alcaloïdes .....	6
Figure 3: Structure des acides hydroxybenzoïques et hydrocinnamiques.....	7
Figure 4: Exemple de quelques acides phénoliques de la série benzoïques.....	8
Figure 5 : Exemple de quelques acides phénoliques de la série cinnamique .....	8
Figure 6 : Structure de base des flavonoïdes .....	9
Figure 7 : Structure de quelques tannins hydrolysables .....	11
Figure 8 : Structures de quelques pro-anthocyanidines .....	12
Figure 9 : Piégeage des radicaux libres par les polyphénols .....	14
Figure 10 : Chélation des métaux de transition par les flavonoïdes.....	14
Figure 11 : Les différents types de liaison des polyphénols avec les protéines .....	15
Figure 12 : Représentation simplifiée de la cinétique de formation et de décomposition des hydroperoxydes et de la cinétique de formation des produits secondaires d'oxydation .....	22
Figure 13 : Formation de radicaux libres .....	22
Figure 14 : Phase de propagation .....	23
Figure15 :déséquilibres entre la production des espèces réactives de l'oxygène et les capacités antioxydantes de l'organisme.....	25
Figure 16 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydantes.....	28
Figure 17 : quelques antioxydants synthétiques.....	30
Figure 18 : Quelques composés naturels possédant des propriétés antioxydantes.....	31
Figure 19 : Effet scavenger de l' $\alpha$ -tocophérol sur le radical peroxyde.....	31
Figure 20 : oxydation de l'acide ascorbique .....	32
Figure 21 : Neutralisation des radicaux libre par mécanisme donneur de proton.....	33
Figure 22 : Action des antioxydants secondaires .....	34
Figure 23: Photos du Laurier (a) et de la sauge (b) .....	36
Figure 24 : Protocole d'extraction des composés phénoliques .....	42
Figure25 : Réaction du Chlorure d'Aluminium avec les flavonoïdes .....	43
Figure 26 : Réaction de la vanilline avec la catéchine .....	44
Figure 27 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH). .....	50
Figure 28: Composition chimique globale de la sauge et du laurier .....	54

Figure 29 : Taux d'extraction des composés phénoliques .....	55
Figure 30 : Teneur en phenol totaux solubles .....	56
Figure 31 : Teneur en flavonoïdes.....	57
Figure 32 : Teneur en tannin Hydrolysable .....	58
Figure 33: Teneur en tannin condensé .....	59
Figure 34 : teneur en tanins précipités par la BSA .....	59
Figure35: teneur en phénols attachés et non attaché à la BSA en % de PTS .....	60
Figure 36 : Mise en évidence des saponines dans les extratis du laurier(a) et de Saug(e)(b)....	61
Figure 37 : Mise en évidence des terpénoïdes dans les extratis du laurier(a) et de saug(e)(b).....	62
Figure 38 : photos de mise en évidence des alcaloïdes dans les extraits de Laurier .....	62
Figure 39: Chromatogrammes des extraits de sauge photographiés sous la lampe UV à 254nm (a) , à la lumière du jour (b), après révélation avec la vanilline –acide sulfurique (c) et après révélation avec le AlCl <sub>3</sub> (d).....	66
Figure 40: Chromatogrammes des extraits de sauge photographiés sous la lampe UV à 365nm (a) à la lumière du jour (b), après révélation avec la vanilline –acide sulfurique (c) et après révélation avec le AlCl <sub>3</sub> (d).....	73
Figure 41 : Chromatogrammes des extraits du laurier photographiée sous la lampe UV à 365nm (a) à la lumière du jour (b), après révélation avec la vanilline –acide sulfurique (c) et après révélation avec l'AlCl <sub>3</sub> (d) .....	74
Figure 42: Test de l'activité anti-radicalaire au DPPH sur plaque CCM (10mg/ml).....	75
Figure43 : Test de l'activité anti-radicalaire au DPPH sur plaque CCM(10mg/ml).....	76
Figure 44: activité antiradicalaire du DPPH des extraits bruts .....	77
Figure 45: Effet de la concentration des extraits et standards sur l'activité antiradicalaire du DPPH.....	78
Figure 46: IC50 des différents échantillons contre le radical DPPH .....	79
Figure 47: Activité anti-radicalaire du DPPH des fractions de sauge (dichlorométhane) .....	82
Figure 48 : Activité antiradicalaire du DPPH des fractions S60 (a), S80 (b) et S100(c) dans le système dichlorométhane .....	83
Figure 49: Activité antiradicalaire du DPPH par les fraction s de S60 (a) et S80 (b) dans le système Acétate d'éthyle .....	84
Figure 50: activité anti-radicalaire du DPPH des fractions de sauge dans le système Acétate d'éthyl .....	85
Figure 51: activité anti-radicalaire du DPPH de fraction du laurier .....	85

Figure 52: activité-radicalaire du DPPH des fractions LED(a) et L60(b) dans le système dichlorométhane .....	86
Figure 53: Activité anti-radicalaire du DPPH des fractions L80 (a) et L100 (b) dans le système dichlorométhane .....	87
Figure 54 : Effet de la concentration extraits et standards sur le pouvoir réducteur du Fer....	88
Figure 55 : Concentration réductrice de 50% du fer .....	88
Figure 56: Pouvoir réducteur du fer des fractions de sauge dans le dichlorométhane.....	89
Figure 57: Pouvoir réducteur du fer des fractions flavonoides (a) et Acide rosmarinique (b) de sauge dans le dichlorométhane.....	90
Figure 58 : Pouvoir réducteur des fractions Acide ferrulique (A) et tanin (B) de sauge dans le dichlorométhane .....	91
Figure 59 : Pouvoir réducteur des fractions de sauge (Acétate d'éthyl).....	92
Figure 60 : Pouvoir réducteur des fraction de sauge (Acétate d'éthyl) comparé à celui de la rutine et de quercétine .....	92
Figure 61: Pouvoir réducteur des fractions de laurier (Dichlorométhane).....	93
Figure 62: Pouvoir réducteur des fractions rutine (A), acide p-coumarique (B) et quercétine (C) de laurier dans le dichlorométhane. ....	94
Figure 63 :Inhibition du blanchiment du $\beta$ -carotène.....	95
Figure 64 : Pouvoir chélateur du fer ferreux .....	96

**Liste des tableaux**

Tableau I : Principales classes de flavonoides .....	10
Tableau II : Classification botanique de <i>Salvia officinalis</i> L. et <i>Laurus nobillis</i> .....	35
Tableau III : Dénomination des plantes utilisées .....	36
Tableau IV : Systèmes d'élution testés .....	47
Tableau V : Résultats du screening phytochimique des extraits .....	61
Tableau VI : Résultats de la chromatographie sur couche des extraits de laurier et sauge dans le système Acétate d'éthyle /acide formique/acide acétique/eau .....	65
Tableau VII : Résultats de la chromatographie sur couche mince des standards utilisés sur gel de silice, dichlorométhane/méthanol/eau .....	67
Tableau VIII: Résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits de sauge et laurier dans le système dichlorométhane/méthanol/eau .....	68
Tableau IX : Les fractions récupérées pour l'activité antioxydantes .....	77
Tableau X: Codification de fractions utilisées dans l'activité antioxydante des différents extraits .....	81
Tableau XI : La matrice de corrélation .....	98

# **Introduction**

### ❖ Introduction

L'utilisation des plantes aromatiques par l'Homme est une pratique antique. De nos jours, la majorité des habitants du globe terrestre utilisent de très nombreuses plantes, compte tenu de leurs propriétés aromatiques, comme source d'assaisonnement ou comme remède en médecine traditionnelle. Cette utilisation compte simplement des observations au cours des siècles.

Les substances d'origine végétale ont récemment gagné un grand intérêt en raison de leurs multiples applications (Ncube, 2008). Beaucoup d'herbes, des épices et leurs extraits ont été ajoutés dans plusieurs aliments pour améliorer leur qualité sensorielle et prolonger la durée de vie (Shahidi *et al.*, 1992). Les Herbes de la famille des Lamiacées, principalement la sauge (*Salvia officinalis* L.), l'origan (*Origanum vulgare* L.) et le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.), ont été rapportées comme ayant une capacité antioxydante importante (Shan *et al.*, 2005; Wojdylo *et al.*, 2007).

L'oxydation constitue probablement l'un des paramètres majeurs à l'origine de l'altération des produits alimentaires et cosmétiques. Les dégradations oxydatives qui en résultent affectent les qualités nutritionnelles et sensorielles des produits et peuvent avoir des répercussions sur la santé humaine. Dans ce contexte, différents moyens de prévention sont disponibles pour limiter ces phénomènes dont les antioxydants synthétiques butylhydroxytoluène (BHT), l'hydroxyanisole butyle (BHA), le tert-butylhydroquinone (TBHQ), etc. utilisés dans l'industrie alimentaire (Ribeiro *et al.*, 2001 ; Marongiu *et al.*, 2004).

De nombreuses études ont porté sur la toxicité élevée des antioxydants synthétiques. Le besoin de réduire leur utilisation (maintenant limitée dans plusieurs) impose l'orientation du marché vers des antioxydants d'origine naturelle et stimule la recherche dans ce domaine.

Les industries agro-alimentaires sont actuellement à la recherche d'extraits végétaux à fort pouvoir antioxydant en vue d'élaborer de nouveaux produits naturels répondant mieux aux exigences du consommateur. Les extraits naturels obtenus à partir des végétaux peuvent ainsi être avantageusement substitués aux différents antioxydants de synthèse. Les polyphénols, molécules bioactives, avec leurs différentes structures ont eu un regain d'intérêt dans le domaine de la nutrition et de la pharmacologie. Cet intérêt a commencé depuis les années 1990, où les effets bénéfiques sur la santé humaine des produits alimentaires et boissons comprenant des fruits et des légumes semblaient être étroitement associés à la capacité antioxydante des polyphénols s'y trouvant (Martha, 2008).

Cette étude vise à étudier l'activité antioxydante des extraits de deux plantes aromatiques, *Salvia officinalis L.* et *Laurus nobilis L.*, qui appartiennent respectivement à la famille des Lamiacées et des Lauracées très connues comme source mondiale d'épices et d'extraits à qualité médicale intéressante.

Le choix de ces plantes s'est reposé sur leur utilisation fréquente par nos populations dans le domaine culinaire et celui de la médecine traditionnelle. Leur efficacité dans le traitement symptomatique de troubles de l'appareil digestif supérieur reconnue traditionnellement, présente un sujet de recherche scientifique intéressant.

Notre travail est réparti en deux grandes parties :

- ❖ Une partie relative à l'étude bibliographique résumant les généralités sur les composés phénoliques, les radicaux libres ainsi que et les éléments scientifiques apportés par différents travaux concernant les deux plantes étudiées : *Laurus nobilis L.* et *Salvia officinalis L.*
- ❖ Une partie abordant l'étude expérimentale qui a porté sur deux aspects :
  - Extraction et teneur en composés phénoliques de chacune des deux plantes
  - Activité antioxydante des extraits obtenus au moyen de quatre tests :
    1. Test de l'activité anti radicalaire du DPPH.
    2. Pouvoir réducteur du fer.
    3. Inhibition du blanchiment du  $\beta$ -carotène.
    4. Chélation du fer ferreux.
      - Activité antioxydante de quelques fractions des extraits isolées par CCM.

# **Synthèse bibliographique**



## I. Métabolites secondaires des plantes

En dehors des molécules du métabolisme primaire (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), les plantes possèdent l'originalité de produire un nombre important d'autres types de molécules appelées métabolites secondaires. Ces derniers sont d'une très grande diversité et leur rôle au sein de la plante n'est pas toujours connu, pour une grande majorité d'entre eux. Ils ne sont pas directement issus de la photosynthèse, mais sont le produit de chaînes des réactions enzymatiques complexes. Ces composés constituent une importante source de molécules utilisées par l'Homme dans des domaines variés, allant de la pharmacologie à l'agro-alimentaire en passant par le cosmétique (Bellow, 2012).

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches. Vu leurs intérêts multiples, ils sont mis à profit aussi bien dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique. Ils sont largement utilisés en thérapie comme vasculo-protecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti-radicalaires.

La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche découvre chez les plantes des molécules actives nouvelles ou des matières premières pour l'hémi-synthèse de composés actifs. On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. L'isolement de principes actifs au XIX<sup>ème</sup> siècle a contribué à l'amélioration des connaissances des structures, ce qui a permis de passer progressivement d'une phytothérapie traditionnelle souvent empirique, acceptée parfois avec une certaine méfiance à une thérapie moderne, acceptée scientifiquement.

Les produits du métabolisme secondaire sont nombreux (plus de 200.000 structures définies) et d'une variété structurale extraordinaire, mais sont produits en faible quantité. Ces molécules marquent de manière originale, une espèce, une famille ou un genre de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique. Les composés phénoliques, les terpénoïdes, les stéroïdes et les alcaloïdes sont des exemples de métabolites secondaires ; ils ont de nombreuses applications pharmaceutiques (Kone, 2009).

### I.1. Différents types de métabolites secondaires

#### I.1.1. Les saponines

Le nom saponine dérive du mot latin « sapo », qui signifie savon ; ces composés moussent une fois agités avec de l'eau. Ils se composent d'aglycones non polaires liés à un

ou à plusieurs sucres. Cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaires en leurs molécules explique leur comportement moussant en solution aqueuse.

Une saponine est définie comme un glycoside de stéroïde ou de tri-terpène. Ainsi, on distingue fondamentalement les saponines stéroïdiques et les saponines tri-terpéniques. Ils manifestent des propriétés hémolytiques, antimicrobiennes, insecticides, molluscicides anti-inflammatoires et antalgiques (Vincken *et al.*, 2007).

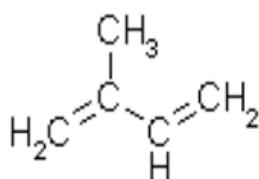
### **I.1.2. Les phytostérols**

Les phytostérols végétaux ont une structure chimique similaire à celle du cholestérol, comportant un noyau stéroïdien 3-β-hydroxylé. Les principaux stérols végétaux sont le β-sitostérol (24-α-éthylcholesterol), le campesterol (24-α-méthylcholesterol) et le stigmasterol (Itoh *et al.*, 1973).

Aux Etats-Unis, la Food and Drug Administration a reconnu officiellement en 2000 que les produits contenant des phytostérols diminuent les risques de maladies cardiovasculaires s'ils sont associés à une alimentation pauvre en graisses saturées et en cholestérol (US FDA, 2000). Les phytostérols sont également utilisés en cosmétique comme émulsifiants (Clark, 1996).

### **I.1.3. Les terpènes**

Ce sont des hydrocarbures produits par de nombreuses plantes, volatiles ou non et représentent une grande famille de molécules du métabolisme primaire et secondaire (Guitton, 2012). La molécule de base de ces composés est l'isoprène de formule C<sub>5</sub>H<sub>8</sub> (Figure 1) ; Selon le nombre de répétitions de cette dernière, on distingue les hémiterpènes (C<sub>5</sub>), monoterpènes (C<sub>10</sub>), sesquiterpènes (C<sub>15</sub>), diterpènes (C<sub>20</sub>), sesterpènes (C<sub>25</sub>), triterpènes (C<sub>30</sub>), tetraterpènes (C<sub>40</sub>) et polyterpènes.



**Figure 1 : La molécule d'isoprène**

Aujourd'hui, les terpénoïdes ont plusieurs usages dans différents secteurs. Ils sont largement utilisés dans le secteur de la nutrition humaine (saveur, conservateur) et l'industrie du parfum. Depuis ces dernières années et avec la découverte des caractéristiques anticancéreuses de certains monoterpènes, leur importance dans le secteur pharmaceutique a été renforcée (Van de Braak et Leijten, 1999).

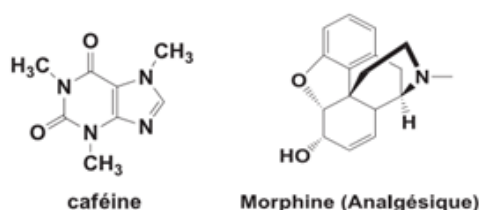
Les corps terpéniques (le terpène se trouve dans le menthol, le camphre, etc.) eux même forment la base des stéroïdes retrouvés notamment dans de nombreuses vitamines. Ils sont connus pour leurs activités insecticides, anti-inflammatoires et analgésiques antibactérienne, antifongique, antivirale (Cowan , 1999).

#### **I.1.4. Les alcaloïdes**

Les alcaloïdes représentent un groupe fascinant de produits naturels ; ils constituent un des plus grands groupes de métabolites secondaires avec près de 10 000 à 12 000 différentes structures (Stöckigt *et al.*, 2002).

Un alcaloïde (Figure 2) est un composé organique naturel (le plus souvent d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome. Les alcaloïdes dérivent des acides aminés, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose (Zenk et Juenger, 2007 ).

Ils ont plusieurs applications pharmaceutiques chez l'Homme : antalgiques (morphine, codéine), spasmolytiques (tubocurarine et papaverine) ; antitussifs (codéine) (Stöckigt *et al.*, 2002).



**Figure 2 : Structures de quelques alcaloïdes (Badiaga, 2011).**

#### **I.1.5. Les composés phénoliques**

Les composés phénoliques constituent une grande famille de molécules très largement répandues dans le monde végétal. Ce sont des métabolites secondaires synthétisés par la plante de façon ubiquitaire, notamment chez les Angiospermes au cours du développement normal ou en réponse à des conditions de stress telles que les infections, les blessures et les radiations UV (Leitao, 2011).

## I.2. Composés phénoliques

Les composés phénoliques correspondent à un vaste ensemble de molécules qui ont toutes en commun un noyau benzénique portant un ou plusieurs hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction. Ils interviennent dans différents aspects de la vie de la plante et sont impliqués dans la physiologie (lignification, interactions symbiotiques, etc.), dans les mécanismes de défenses (interactions biotiques et abiotiques) ou encore dans la coloration des fleurs. Par ailleurs, les composés phénoliques sont bénéfiques pour l'Homme vis-à-vis de certaines maladies de par leur action sur le métabolisme humain et de leur propriété antioxydante entre autres (Macheix *et al.*, 2006).

### I.2.1. Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont constitués d'un noyau aromatique comportant une ou plusieurs fonctions hydroxyles ainsi que des groupes fonctionnels (ester, méthyle ester, glycoside, etc.). Ils peuvent être regroupés en nombreuses classes ayant comme point de différence la complexité du squelette de base, le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation et de méthylation) et les différentes liaisons possibles de ces molécules avec d'autres à savoir glucides, lipides, protéines et autres métabolites secondaires phénoliques ou non phénoliques (Nacz et Shahid, 2006). Xiuzhen *et al.*, (2007) ont subdivisé les polyphénols en cinq classes selon leur structure chimique de base; les acides phénoliques, les flavanoides, les tanins, les stilbènes.

#### a) Les acides phénoliques

Les acides phénoliques représentent la forme la plus simple des composés phénoliques et se scindent en deux grands groupes distincts : les acides hydroxybenzoïques (C6-C1) dérivés d'acide benzoïque, et les acides hydroxycinnamiques (C6-C3) dérivés d'acide cinnamique (Figure 3).

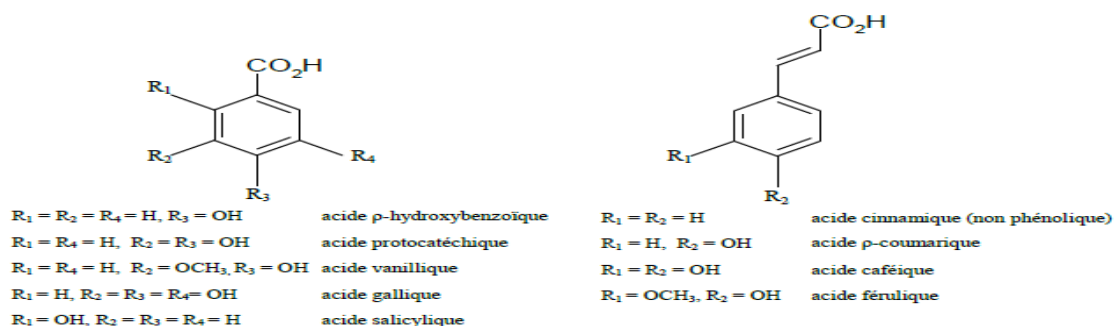
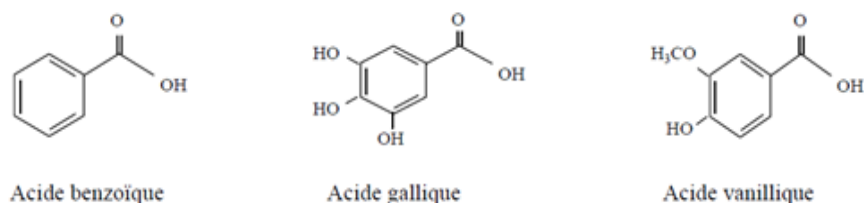


Figure 3: Structure des acides hydroxybenzoïques et hydrocinnamiques (Arimboor *et al.*, 2008).

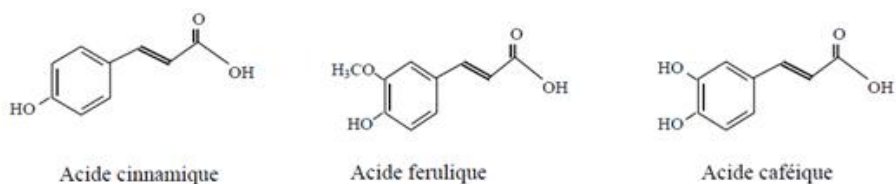
Les acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque (Figure 4) sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinée à l'état d'esters ou d'hétérosides. Exemple : l'acide gallique qui est un élément principal de la structure des tannins hydrolysables (Haslam, 1994)



**Figure 4: Exemple de quelques acides phénoliques de la série benzoïques (Pawlowska *et al.*, 2006 ).**

La teneur en acides hydroxybenzoïques dans les plantes est très faible, à l'exception de certains fruits rouges, radis noirs et oignons qui peuvent contenir jusqu'à plusieurs dizaines de milligrammes par kilogramme de poids frais. Les acides hydroxybenzoïques sont souvent des composants de structures complexes comme les tannins.

Les acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique sont souvent estérifiés. Les plus courants (Figure 5) sont l'acide cinnamique, l'acide caféique, l'acide ferrulique, l'acide *p*-coumarique et l'acide sinaptique (Haslam, 1994 ).



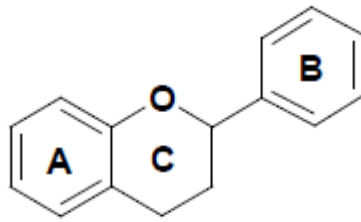
**Figure 5 : Exemple de quelques acides phénoliques de la série cinnamique**

#### **b) Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6 000 composés naturels quasiment universels chez les plantes vasculaires (Erlund, 2004). Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (Havsteen, 2002).

L'ensemble des flavonoïdes ont un élément structural de base commun en C15 (C6-C3-C6) (figure 6). Selon leur structure moléculaire, ils peuvent être divisés en diverses

classes (Tableau I). Les principaux groupes sont les flavanols, les flavones, les flavanones, les flavanols, les isoflavones et les anthocyanidines (Macheix *et al.*, 2006 , Mohammadi, 2012).



**Figure 6 : Structure de base des flavonoïdes.**

Les plus répandus des composés flavonoïdiques sont les flavones et flavonols 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 (Birt *et al.*, 2001 ; Havsteen, 2002).

Les flavonoïdes peuvent se présenter sous forme d'aglycones (entités dépourvues de reste osidique) ou d'hétérosides portant un ou plusieurs résidus osidiques (Ghedira, 2005).

Tableau I : principales classes de flavonoïdes (Bougandoura , 2011).

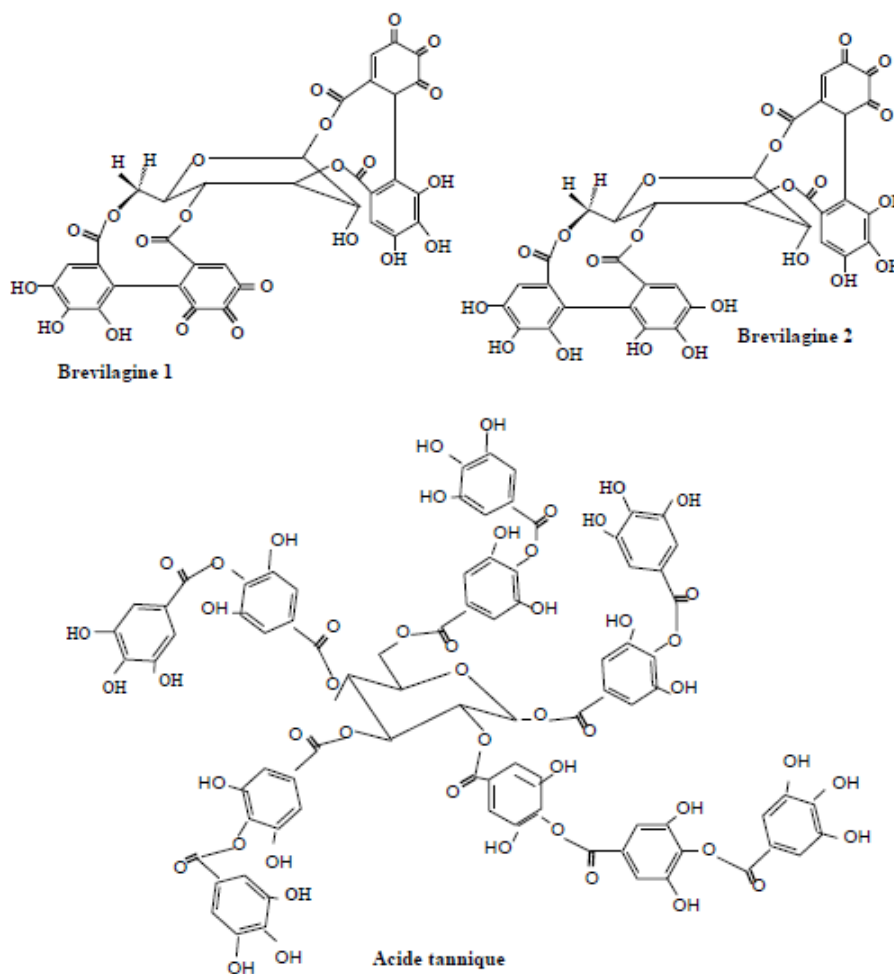
Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH <sub>3</sub>	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myricétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidzeine

## c) Les tannins :

Par définition, les tanins sont des composés phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les protéines. Les tannins peuvent être divisés en deux groupes principaux en fonction de leurs structures (Hagermane, 2002) .

**-Les tannins hydrolysables**

Ce sont des esters formés d'acide gallique et des molécules de glucose (Figure 7). Plus précisément, un glucose se lie à plusieurs molécules d'acide gallique. Ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique (enzymatique) et libérer une partie non phénolique (souvent du glucose) et une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique, soit un dimère de ce même acide – l'acide ellagique (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).



**Figure 7 : Structure de quelques tannins hydrolysables (Gorger *et al.*, 1994).**

**- Les tannins condensés (proanthocyanidines)**

Ce sont des oligomères ou des polymères de flavane-3 ol dérivés de la (+) catéchine ou de ses nombreux isomères (Macheix, 2005) et constituent la classe des tannins catéchiques (Figure 8). Contrairement aux tannins hydrolysables, ils sont résistants à l'hydrolyse et seules des attaques chimiques fortes permettent de les dégrader. Ils ont la propriété de complexer les protéines du derme, d'où leur utilisation dans le tannage des peaux. Les polymères donnent



une structure hérissée d'OH phénoliques capable de former des liaisons stables avec les protéines (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

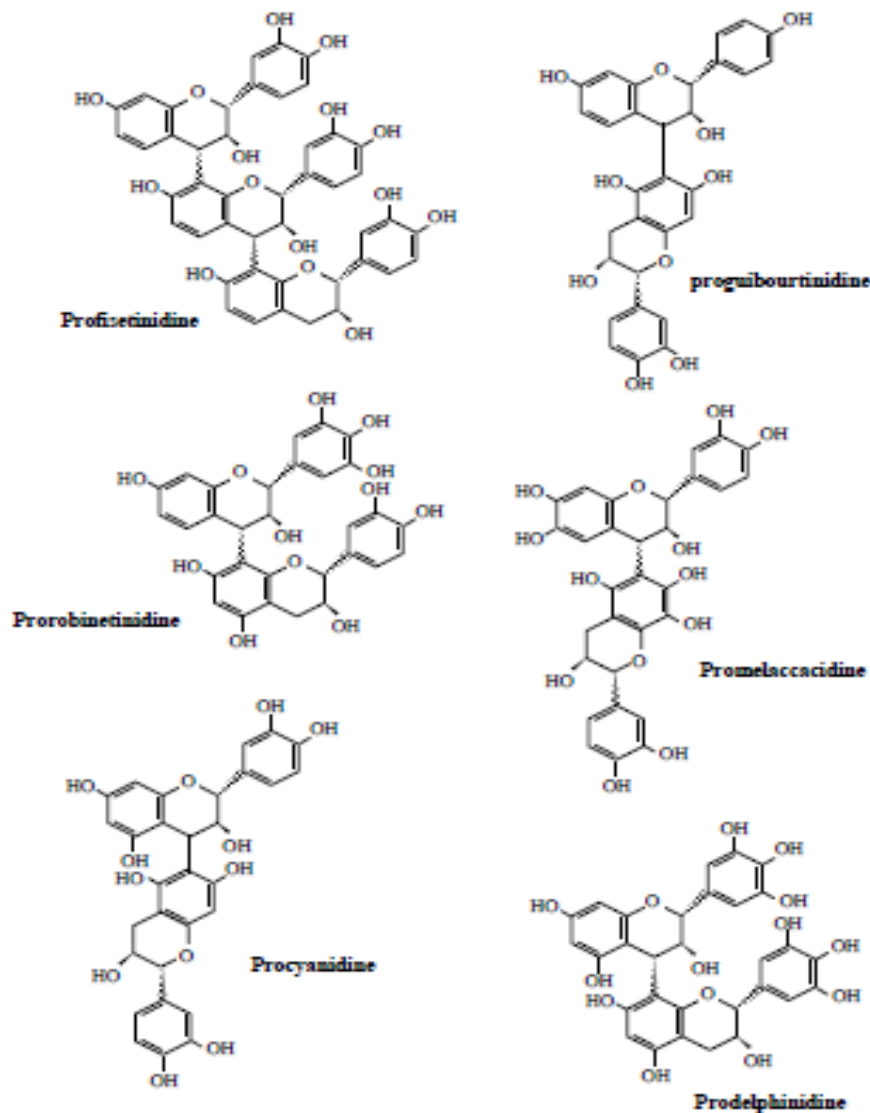


Figure 8 : Structures de quelques proanthocyanidines (Seigler *et al.*, 1986 ; König *et al.*, 1994 ).

#### d) les Stilbènes

Les stilbènes sont caractérisés structurellement par la présence de noyau 1,2diphénylène avec des hydroxyles substitués dans les cycles aromatiques. Ces molécules existent sous forme de monomères ou d'oligomères. Le représentant le plus connu est le trans-resveratrol (Xiuzhen *et al.*, 2007).

### **I.2.2. Biosynthèse des composés phénoliques**

Du point de vue biosynthétique, les composés phénoliques peuvent être engendrés par deux voies métaboliques: la voie du shikimate, la plus courante, qui conduit entre autre à la formation des acides phénoliques, flavonoïdes et lignines et la voie des polyacétates qui est à l'origine de composés polycycliques tels que les coumarines, les xanthones et les quinones (Machaeix et al.,2006).

#### **-La voie de l'acide malonique**

La glycolyse et la  $\beta$ -oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl CoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (Fleeger et Flipse, 1964 ).

#### **-la voie de l'acide shikimique**

Cette voie conduit à la formation du précurseur immédiat des phénols par désamination de la phénylalanine. La séquence biosynthétique qui suit, dénommée séquence des phénylpropanoïdes, permet la formation des principaux acides hydroxycinnamiques. Les formes actives de ces derniers avec le coenzyme A permettent d'accéder aux principales classes des composés phénoliques suite à des transformations :

- ❖ vers les acides de la série benzoïque (acides gallique, protocatéchique...) par Béta-oxydation. L'acide gallique lui-même, par combinaison avec des sucres simples, conduit aux tannins hydrolysables (tannins galliques et ellagiques)
- ❖ vers les esters de type chlorogénique par estérification avec un acide alcool (acide quinique, tartrique, shikimique...)
- ❖ vers les coumarines, par cyclisation interne des molécules suivie de modifications complémentaires (glycosilations, prénylations...).
- ❖ vers les lignines par réduction, formation des monolignols puis polymérisation oxydative initiée dans la paroi cellulaire par les peroxydases et éventuellement les laccases (Sarni- Manchado et Cheynier, 2006).

### **I.2.3. Les propriétés antioxydantes des composés phénoliques**

Les composés phénoliques ont été en grande partie étudiés pour leur forte capacité antioxydante. Leur intervention se fait à différents niveaux : piégeage de radicaux libres, chélation de métaux et inhibition de certaines enzymes.

La relation entre la structure chimique des composés phénoliques et leur activité antioxydante a reçu un intérêt considérable dans la recherche. Il a été observé que l'activité antioxydante dépend essentiellement du nombre des radicaux hydroxyles et de leurs positions à l'intérieur de la structure des composés phénoliques (Xiuzhen, 2007).

### I.2.3.1. Le piégeage des radicaux libres

Les propriétés antioxydantes des polyphénols sont souvent associées à leur forme radicalaire. En effet, leur structure chimique aromatique permet une délocalisation électronique importante, donc une stabilisation de leur forme radicalaire. Cette propriété leur confère la capacité de piéger les radicaux et les ERO (radicaux superoxydes, hydroxyle, peroxydes et alkoxydes) (Hennebelle *et al.*, 2004 ; Pastre, 2005). Le piégeage des radicaux libres par les polyphénols est illustré dans la figure 9.

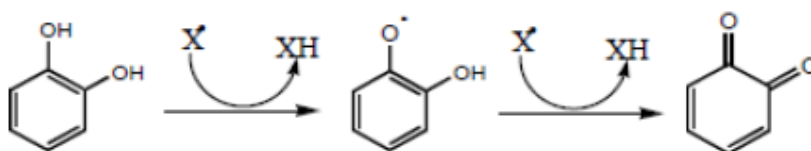


Figure9: Piégeage des radicaux libres par les poly phénols (Marfak, 2003).

### I.2.3.2. La chélation des métaux

La production de radicaux hydroxyles très réactifs à partir de l'espèce moins réactive  $H_2O_2$  via la réaction de Fenton a comme origine les ions métalliques comme le fer ou le cuivre (Macheix *et al.*, 2005).

Les composés phénoliques ont la propriété de chélater les métaux à forte charge positive (tels que le  $Cu^{2+}$ , le  $Fe^{3+}$  et l' $Al^{3+}$ ). En complexant les ions métalliques, ces composés forment des complexes stables (Figure 10) En occupant tous les emplacements, ils sont alors capables d'inhiber la réaction de Fenton et ainsi empêcher la production d'ERO ou leur interaction avec les intermédiaires lipidiques (Lee *et al.*, 2004, Macheix *et al.*, 2006).

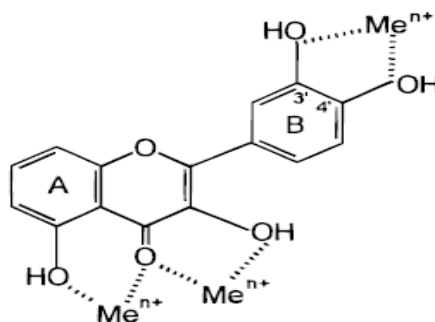


Figure 10 : Chélation des métaux de transition par les flavonoïdes (Pietta, 2000).

### I.2.3.3. La complexation des protéines

L'une des propriétés majeures des polyphénols, particulièrement les tannins, est leur capacité à lier et précipiter les protéines en formant des complexes. Un exemple simple de conséquence de cette complexation est l'astringence qui est due à des interactions entre les polyphénols et les protéines salivaires. L'interaction tannins-protéines (Figure 11) débute par des liaisons hydrophobes entre les deux molécules, rapidement complétées par un réseau de liaison hydrogène et par des liaisons ioniques. Le complexe ainsi formé précipite lorsqu'il est suffisamment hydrophobe (Dangles., 2006) :

- ❖ Liaisons hydrogènes entre les groupements phénols et différents groupes récepteurs (-NH-, -CO-, -OH) des protéines ou d'autres polymères ;
- ❖ Liaisons ioniques entre des groupements anioniques des phénols et des groupes cationiques des protéines ;
- ❖ Interactions hydrophobes, provenant entre les résidus d'acide aminé peu polaires et les cycles aromatiques des polyphénols (Richard *et al.*, 2006).

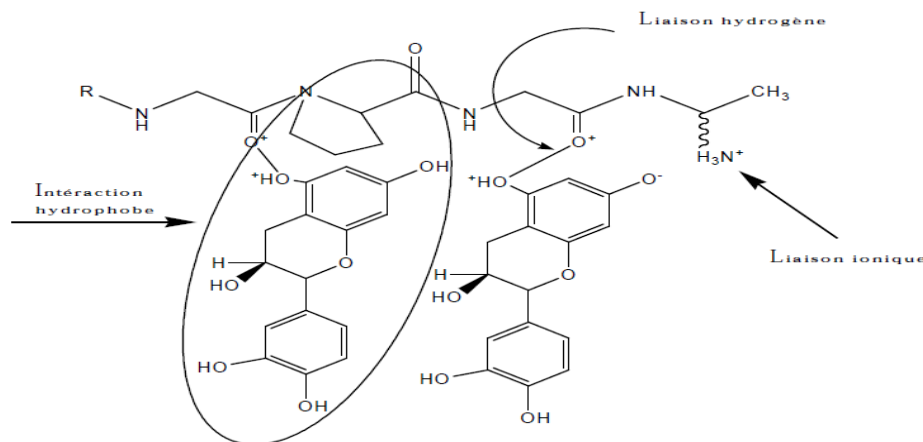


Figure 11 : Les différents types de liaison des polyphénols avec les protéines (Simon,2003).

### I.2.4. Intérêts des composés phénoliques

#### -Chez les plantes

En plus de leur rôle structural (lignine), les composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes, seraient impliqués dans la défense des plantes contre les agressions extérieures (rayon UV, microorganismes). Ils assurent aussi la pigmentation des fleurs, des fruits et des graines pour attirer les pollinisateurs et les disperseurs de graines (Stalikas, 2007).

**-Dans le domaine cosmétique**

L'intérêt des composés phénoliques dans le domaine cosmétique est lié aux propriétés antioxydantes, leur pouvoir anti-inflammatoire, leurs effets antimicrobiens. Ces composés luttent contre le vieillissement cutané en tant que molécules anti-radicalaires.

**-Dans le domaine Agroalimentaire**

Berset et Bondini (2000) posent le problème de la place des polyphénols dans l'alimentation et soulignent leurs différentes fonctionnalités à savoir :

- Action sur la qualité sensorielle des aliments, flaveur, saveur et couleur.
- Action sur la sécurité alimentaire, rôle antioxydant et antibactériens.

Plusieurs auteurs se sont intéressés à l'activité antioxydante des polyphénols. Chimi *et al.* (1988) au cours de leurs études ont mis en évidence le rôle des composés phénoliques dans la préservation de la qualité de l'huile.

**Les colorants phénoliques**

La contribution des polyphénols dans la coloration des végétaux et leur abondance a suscité l'intérêt des industries agroalimentaires, surtout après les interdictions imposées pour certains colorants synthétiques à cause de leur toxicité. Les principaux colorants naturels sont présentés par :

- La curcumine extrait de curcuma responsable de la couleur jaune.
- La bétacyanine extraite principalement de la betterave est responsable de la coloration violette.
- Les anthocyanes et bétacyanines sont les seuls pigments naturels rouges hydrosolubles pouvant remplacer les colorants synthétiques dans de nombreuses applications (Malien-Aubert et Amiot-Carlin, 2006).

**I.2.5. Les composés phénoliques et la santé**

L'organisme humain ne peut pas assurer la biosynthèse de tous les antioxydants en particulier ceux de nature phénolique. L'ingestion des composés phénoliques dans la ration journalière est un facteur nutritionnel important. Les composés phénoliques sont présents dans la plupart des organes des végétaux (graines, fruits, feuilles ou autre organes) et se trouvent plus au moins transformés dans les produits industriels issus de ces végétaux (jus de fruits, bière, vin, thé, chocolat, huile d'olive et dérivés de céréales).

Les poly phénols agissent pour inhiber l'oxydation des LDL par l'augmentation de la vasodilatation, diminution de la pression sanguine et inhibition de la synthèse d'endothéline1 (un peptide vasoconstricteur responsable des maladies vasculaires).

De nombreux flavonoïdes sont impliqués dans l'inhibition de l'agrégation des plaquettes sanguines et leur adhérence sur les parois des vaisseaux(Malien-Aubert et Amiot-Carlin, 2006).

## **II. Radicaux libres et stress oxydant**

Un radical libre est une espèce chimique qui possède un électron (ou plus) non apparié dit « célibataire » sur son orbital externe. C'est un intermédiaire réactionnel instable à courte durée de vie, qui se stabilise en arrachant un électron à une autre espèce. De ce fait, ils sont capables de dégrader par oxydation des molécules stables qui deviennent, à leur tour, instables et entraînent alors la propagation de ce phénomène par une cascade de réactions d'oxydoréduction chimique (Judde, 2004).

### **II.1. Nature des radicaux libres dans le système biologique**

La majorité des espèces radicalaires dans le corps est dérivée de l'oxygène, certaines peuvent être dérivées de l'azote ( $\bullet\text{NO}$ ) qui possède un électron partagé entre son atome d'azote et son atome d'oxygène (Benammar, 2011).

Les espèces radicalaires, dérivées de l'oxygène ou de l'azote, ont un rôle physiologique important en agissant à faibles concentrations comme des messagers secondaires capables de réguler le phénomène d'apoptose qui est un suicide programmé des cellules, évitant ainsi leur évolution vers un état cancéreux (Slater *et al.*, 1995).

#### **II.1.1. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)**

L'oxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant de la matière organique. Lors de la réduction de l'oxygène en eau, 2 à 3 % de l'oxygène sont transformés en espèces réactives de l'oxygène (ERO, radicaux libres) particulièrement réactionnelles (Koppenol, 2001 ; Lesgards, 2000).

Dans une première étape, le radical libre anion superoxyde est formé, ce qui conduit par la suite à la production d'autres comme le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulet, le radical hydroxyle. De part leur nature instable, les ERO sont toxiques et interagissent avec toute une série de substrats biologiques importants (Pincemail *et al.*, 2002).

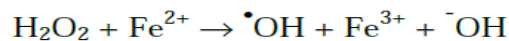
##### **II.1.1.1. L'anion-radical superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ )**

L'anion superoxyde est une ERO primaire, formée par l'acquisition d'un électron par l'oxygène moléculaire. Radical ayant la réactivité la plus faible parmi les radicaux libres du stress oxydant, il est généré à partir de différentes sources dans les conditions physiologiques et physiopathologiques. Il est cependant hautement réactif avec certains métaux de transition comme le cuivre, le fer et le manganèse (Abreu *et al.*, 2010).

### II.1.1.2. Le peroxyde d'Hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Bien que le peroxyde d'hydrogène ne puisse être considéré comme un radical au sens propre, cette molécule dérivée de l'oxygène joue un rôle central dans le phénomène du stress oxydant. Tout système produisant le radical superoxyde générera par voie de conséquence du peroxyde d'hydrogène. Ainsi, les cellules phagocytaires produisent et relarguent de grandes quantités d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au cours de l'inflammation (Mulier *et al.*, 1998).

Le peroxyde d'hydrogène est généralement considéré comme une espèce réactive de l'oxygène relativement faible mais hautement réactive, capable de réagir avec les ions partiellement réduits Fe<sup>2+</sup> et Cu<sup>+</sup> pour former le radical hydroxyl dans la réaction de Fenton (Wardman et Candeias, 1996) :



### II.1.1.3. Le radical hydroxyle (HO•)

Comme indiqué précédemment, le radical hydroxyle est formé à partir du peroxyde d'hydrogène au cours de la réaction de Fenton. Le radical HO• est considéré comme l'ERO la plus réactive, inactivant la pyruvate-déshydrogénase de la mitochondrie, dépolymérisant le mucus du tractus gastro-intestinal ou induisant directement des atteintes oxydatives à l'ADN (Lubec, 1996).

### II.1.1.4. Les radicaux peroxydes

Les radicaux peroxydes sont des radicaux secondaires issus de l'addition de l'oxygène sur les radicaux centrés sur le carbone (R•).

Plusieurs modes d'actions sont décrits pour les propriétés oxydantes des radicaux peroxydes : transfert de charge (arrachement d'un électron) ou d'un atome d'hydrogène (arrachement d'un atome H), addition sur les doubles liaisons (réactions intramoléculaires ou intermoléculaires). Les radicaux RO<sup>2•</sup> peuvent également se décomposer avant d'avoir réagi avec un substrat en donnant des radicaux superoxydes (Gardès-Albert *et al.*, 2005).

### II.1.1.5. L'oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)

L'oxygène singulet est produit en présence de rayonnement UV ou par les leucocytes. Il est à l'origine du vieillissement cutané, de la cataracte, de la dégénérescence musculaire liée à l'âge et de certains cancers de la peau (Saulnier *et al.*, 1995).

### II.1.2. Les espèces réactives de l'azote

Par analogie avec les espèces réactives de l'oxygène, les métabolites dérivés de l'azote sont nommés espèces réactives de l'azote ; il s'agit du monoxyde d'azote (•NO) et du peroxyde d'azote (ONOO<sup>-</sup>). Le monoxyde d'azote est produit de manière endogène lors du



métabolisme de l'arginine «dans des conditions physiologiques et physiopathologiques (Rao, 2004). Le monoxyde d'azote lui-même se caractérise par une diffusion élevée, une réactivité limitée et une demi-vie qui n'excède pas quelques secondes, il n'est donc pas particulièrement délétère pour les structures cellulaires (Blanc *et al.*, 2005). Cependant, le  $\bullet\text{NO}$  peut interagir rapidement avec l'anion superoxyde et produire du peroxyde d'azote beaucoup plus réactif et délétère que ses précurseurs (Murphy *et al.*, 1998).

Le peroxyde d'azote a une demi-vie plus longue et traverse facilement les membranes lipidiques. Il oxyde les lipides composant les membranes mitochondriales, altère les canaux sodiques et favorise la perméabilité vasculaire et la formation d'œdème (Kruidenier *et al.*, 2002). Très néfaste pour les protéines et les gènes, il est impliqué dans la polyarthrite rhumatoïde (Potterat, 1997 ; Hennebelle, 2006).

## **II.2. Rôles physiologiques des radicaux libres**

Le rôle des ERO est très complexe car ils peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration. Dans des conditions normales, elles sont générées en faible quantité et jouent un rôle de messagers secondaires capables, notamment, de réguler le phénomène de l'apoptose ou d'activer des facteurs de transcription. Ils sont impliqués dans le processus de fécondation, au cours duquel les spermatozoïdes sécrètent de grandes quantités d'ERO pour percer la paroi membranaire de l'ovule (Haleng *et al.*, 2007), la défense immunitaires contre les agents pathogènes ,la régulation de la dilatation capillaire et le fonctionnement de certains neurones,notamment ceux de la mémoire (Pincemail *et al.*, 2002 ; Valko *et al.*, 2007 ).

## **II.3. Effets néfastes associés aux radicaux libres**

Les radicaux libres sont à l'origine de réactions en chaîne qui conduisent à des destructions cellulaires. Leurs cibles essentielles sont l'ADN, les membranes cellulaires mais aussi toutes les molécules pouvant être déstabilisées (Pastre,2005).

Les cibles biologiques les plus vulnérables à cet endommagement oxydatif sont l'acide désoxyribonucléique (ADN) (modification des bases, cassure des brins) les protéines (modifications structurales et fonctionnelles) et les lipides (peroxydation lipidique) (Hu *et al.*, 2005).

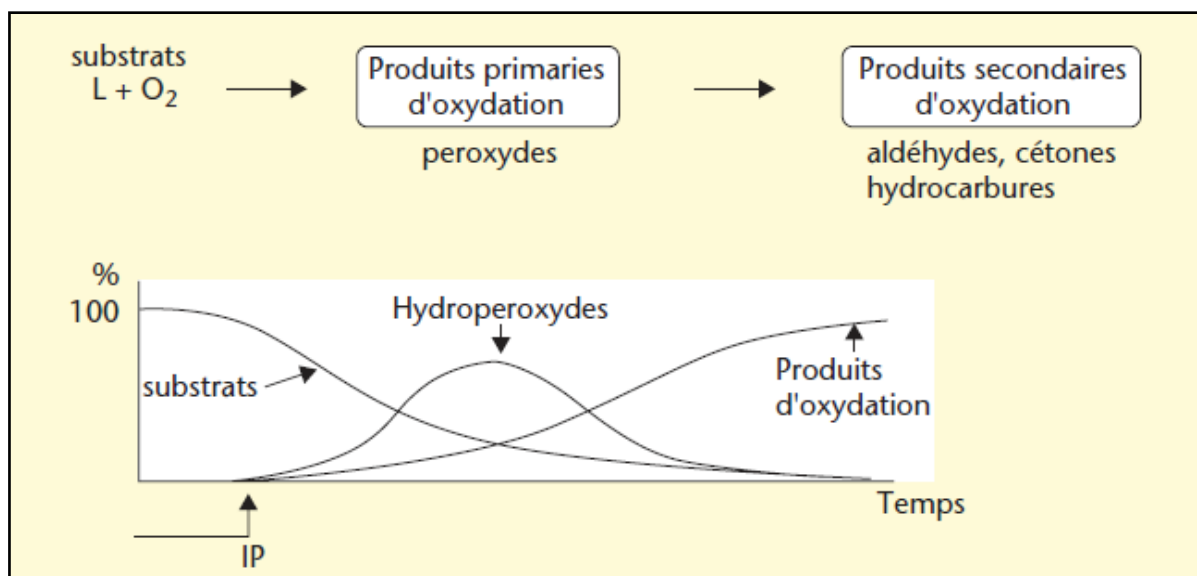
### **II.3.1. Oxydation des composés lipidiques**

Les acides gras polyinsaturés ainsi que les phospholipides membranaires sont les cibles privilégiées des attaques oxydatives. Les membranes sont plus particulièrement

visées par le radical hydroxyle capable d'arracher un atome d'hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Cette réaction de peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne car le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué. Ce processus génère des hydro-péroxydes qui peuvent continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes et en alcanes (éthane, éthylène, pentane). Le radical peroxyde peut, quant à lui, libérer différents aldéhydes toxiques dont le malondialdéhyde (MDA) (Kruidenier *et al.*, 2002; Théron *et al.*, 2005(a) ; Valko *et al.*, 2006).

Le rancissement oxydatif est un phénomène purement chimique et spontané dès lors que des acides gras insaturés sont en présence d'oxygène atmosphérique ; à ce stade, la lumière ou la température, facteurs accélérateurs, ne sont pas des éléments nécessaires et suffisants pour déclencher des phénomènes d'oxydation. Ce phénomène chimique se caractérise également par son caractère évolutif (dû à la succession, dans le temps, de différentes réactions chimiques, conduisant à plusieurs familles de produits réactionnels intermédiaires et finaux), irréversible et altératif. Parmi les produits de dégradations, les composés aldéhydiques volatils jouent un rôle clé car ils sont responsables des saveurs de « rance ». Judde (2004) note que la réaction d'oxydation est souvent associée à la notion de rancissement chimique aldéhydique (à distinguer du rancissement butyrique ou du rancissement cétonique, qui sont des phénomènes enzymatiques d'hydrolyse).

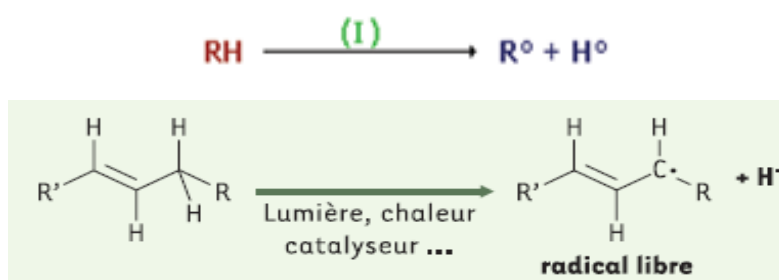
L'oxydation des lipides est une réaction auto catalytique. Il s'agit d'un enchainement de réactions radicalaires dont la cinétique suit une courbe exponentielle croissante (Figure 12), comportant trois phases distinctes.



**Figure 12 : Représentation simplifiée de la cinétique de formation et de décomposition des hydroperoxydes et de la cinétique de formation des produits secondaires d'oxydation (Judde, 2004).**

### -Phase d'initiation

C'est une phase lente qui correspond à la phase de déclenchement où se forme un premier radical libre (Figure 13). Pour Judde (2004) et Marc *et al.* (2004), l'arrachement du proton est facilité tant par la chaleur (agitation moléculaire) que les rayonnements ou les catalyseurs (métaux tels que Cu, Fe, Co, Mn, Ni, ...).



**Figure 13 : Formation de radicaux libres (Judde, 2004).**

### -Phase de propagation

La phase de propagation ou la phase rapide, correspond à la formation d'un radical peroxy (Figure 14) qui réagit avec une autre molécule et conduit à un néoradical libre et un hydroperoxyde. Les hydroperoxydes instables se scindent en composés plus courts (Judde, 2004).

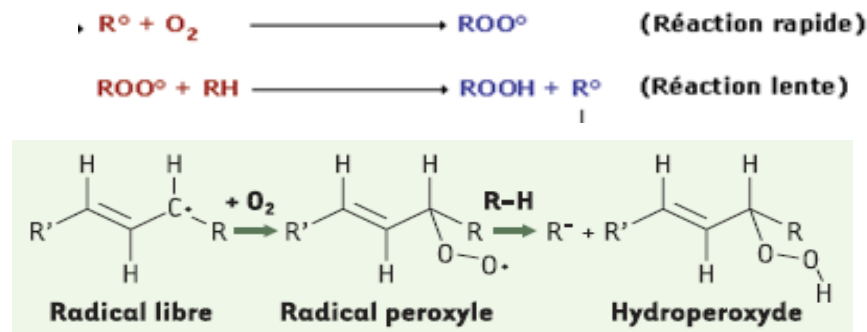


Figure 14 : Phase de propagation (Judde, 2004).

### -Phase de terminaison

Elle correspond à la disparition des peroxydes et à l'accumulation des composés secondaires d'oxydation, c'est-à-dire, à l'oxydation complète du substrat. Elle se traduit par l'évolution des hydroperoxydes en composés secondaires d'oxydation par deux voies principales :

- une voie dite de scission, conduisant par coupure à la libération de composés volatils (chaînes carbonées courtes et moyennes), notamment aldéhydiques, responsables des saveurs très faibles ;
- une voie dite de remaniement, conduisant, suite à différents types de pontage intra ou inter acides gras, ou suite à l'apparition de fonctions oxydées (fonctions cétone, époxy, hydroxy) sur les acides gras, à la formation d'acides gras oxydés, de triglycérides oxydés, de polymères de triglycérides oxydés. À ce stade dit de rancissement, la saveur de rance est perceptible, et peut être accompagnée par d'autres conséquences d'ordre fonctionnel (aspect, couleur, texture) et d'ordre physiologique (altérations des acides gras essentiels et des vitamines liposolubles) (Marc *et al.*, 2004 ; Judde, 2004).

### II.3.2. Oxydation de l'ADN

Les ADN nucléaire et mitochondrial sont également des cibles de espèces réactives oxygénées. Selon Valko *et al.* (2006), les altérations les plus communes sont l'hydroxylation des bases puriques et pyrimidiques et du squelette désoxyribose provoquant le clivage des brins et des mutations génétiques. Ces altérations de la molécule d'ADN peuvent conduire, selon les mêmes auteurs, soit à l'arrêt de l'induction de la transcription ou de la transduction des voies de signalisation, soit à des erreurs de réplication, soit à une instabilité génomique et l'ensemble est associé au phénomène de carcinogenèse.

Les espèces réactives de l'azote peuvent également induire des oxydations de l'ADN et le monoxyde d'azote ou le peroxydinitrite peuvent oxyder la chromatine (Kruidenier *et al.*, 2002; Valko *et al.*, 2006). Comme pour les autres composés, la majorité des altérations oxydatives de l'ADN sont induites par le radical hydroxyle. Lorsque le peroxyde d'hydrogène échappe aux enzymes de régulation, il gagne le noyau de la cellule et réagit avec les ions  $Fe^{2+}$  et  $Cu^+$  associés à la chromatine produisant ainsi *in situ* le radical hydroxyle qui attaque l'ADN proche (Kruidenier *et al.*, 2002).

### **II.3.3. Oxydation des protéines**

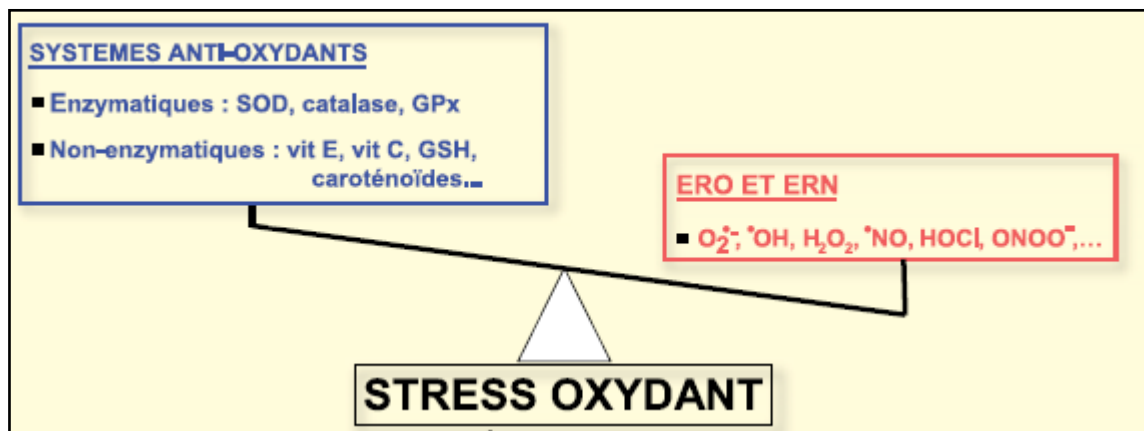
Les radicaux libres peuvent réagir avec les différents acides aminés et donc altérer la structure des protéines (Pastre, 2005). Une modification structurale mineure d'une protéine peut induire une forte variabilité dans le fonctionnement de celle-ci. Comme pour les lipides, c'est le radical hydroxyle qui est le plus réactif pour induire des altérations oxydatives des protéines introduisant de nouveaux groupes fonctionnels comme des fonctions hydroxyles ou carbonyles qui contribuent aux altérations des fonctions des protéines. L'oxydation induit également des modifications de conformation ainsi que des phénomènes de fragmentation (Kruidenier *et al.*, 2002; Valko *et al.*, 2006).

### **II.4. Le stress oxydant**

En situation physiologique, il y a un équilibre parfait entre la production d'ERO et les systèmes de défenses antioxydantes. Il faut souligner que les ERO peuvent d'ailleurs jouer un rôle physiologique important comme dans la phagocytose des bactéries par les cellules polymorpho-nucléaires (Swain *et al.*, 2002). Dans certaines situations, cette production augmente fortement, entraînant un stress oxydatif que l'on définit comme un déséquilibre entre la génération des ERO et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (Figure 15), ce qui a pour conséquences l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour les cellules (Gutteridge, 1993; Aravodis, 2005). Ce déséquilibre est à l'origine de nombreux facteurs, notamment les polluants présents dans l'air que nous respirons et l'eau et les aliments que nous consommons. Les rayons ultraviolets du soleil, d'autres radiations, la fumée de tabac et l'exercice excessif sont également des facteurs qui augmentent considérablement la présence des radicaux libres dans notre système (Favier, 2003).

Le stress oxydatif est impliqué dans de très nombreux désordres et maladies : athérosclérose (Ko *et al.*, 1998; Harriison *et al.*, 2003), la cancérogenèse (Hussain *et al.*, 2003; Klaunig et Kamendulis, 2004), l'arthrite, l'asthme, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, le mongolisme (Cavin, 1999), les maladies cardiovasculaires, arthrose,

cataracte, le diabète, chute de cheveux et le vieillissement ( Pastre et Priymenko, 2007 ; Surveswaran *etal.*, 2007).



**Figure 15 : Déséquilibres entre la production des espèces réactives de l’oxygène et les capacités antioxydantes de l’organisme (Bonnefont-Rousselot, 2007).**

**GPx** : glutathion peroxydase

**GSH** : glutathion réduit

**SOD** : superoxide dismutase

## II.5. Les antioxydants

Les antioxydants sont des composés très divers qui regroupent des protéines à activité enzymatique (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase, etc.) et non enzymatique (séquestrant de métaux) et des petites molécules liposolubles (vitamine E, carotène) ou hydrosolubles (vitamine C). Une définition large du terme antioxydant donnée par Halliwell (1999) comme : « toute substance qui, présente à faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l’oxydation de ce substrat ».

Les antioxydants sont des substances qui sont capables de supprimer, retarder ou empêcher les processus d’oxydation. Les antioxydants de synthèse sont de moins en moins utilisés dans les denrées alimentaires, les antioxydants naturels leur étant préférés. De nombreuses études portent sur la recherche de molécules naturelles ayant des propriétés antioxydantes. Ainsi, les sources d’antioxydants naturels sont nombreuses et variées : extrait d’herbe, poudre de miel, extraits de fruits, de légumes, de thé, ... (Pszczola, 2001).

### **II.5.1. Rôle des antioxydants**

#### **-Dans les aliments**

Les antioxydants sont utilisés depuis de nombreuses années en agroalimentaire pour préserver les aliments de l'action oxydante de l'oxygène moléculaire, notamment les lipides, très sensibles à ce phénomène (Beddowes *et al.*, 2003 ; Céu, 2003).

#### **-Pour l'Homme**

Présent dans l'air pour environ une partie sur cinq, l'oxygène est indispensable à la vie de la plupart des êtres vivants. Il possède deux électrons non appariés et ceci explique sa grande réactivité. Cependant, la plupart des réactions oxydatives qu'il est susceptible de provoquer spontanément dans un organisme humain sont extrêmement lentes et il est, donc, peu toxique par lui-même. Mais sous l'action des radiations ionisantes, de rayon UV, de métaux de transition (fer, cuivre, etc.) ou au cours de certaines réactions enzymatiques, des formes hautement réactives de l'oxygène apparaissent (ERO). Les organismes vivants en aérobiose possèdent des systèmes de défense ; ainsi à l'état physiologique, il existe un déséquilibre entre la production exagérée des radicaux libres ou par une diminution des défenses antioxydantes, on parle alors d'un stress oxydatif (Lhuillier, 2007 ; Marfak, 2011). Les antioxydants ont un rôle : lutter contre ce stress oxydatif et protègent l'organisme contre l'effet délétère de ces radicaux (Gardès-Albert *et al.*, 2003).

### **II.5.2. Défense de l'organisme contre le stress oxydatif**

Pour protéger ses tissus contre les effets nocifs des radicaux libres, l'organisme possède des mécanismes de riposte anti-radicalaire polymorphe, à la fois préventive et curative (Halliwell, 1994). Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation d'un substrat.

Il existe en plus, des composés endogènes synthétisés par les cellules et qui jouent le rôle de piègeurs (« scavenger » pour les Anglo-saxons) ; le plus important est le glutathion réduit (GSH) qui protège non seulement contre les radicaux libres, mais aussi contre les peroxydes ou le radical monoxyde d'azote. Des antioxydants exogènes apportés par l'alimentation participent à la neutralisation des radicaux libres qui sont hydro- ou liposolubles tels que l'acide ascorbique, l' $\alpha$ -tocophérol, le  $\beta$ -carotène et les flavonoïdes (Favier, 2003).

Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d'antioxydants dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou

extracellulaires. Indépendamment de leur localisation, les antioxydants peuvent agir de deux manières : en prévenant la formation de radicaux libres oxygénés (antioxydants primaires) ou en épurant les radicaux libres oxygénés (antioxydants secondaires). En complément de cette double ligne de défense, l'organisme est en outre capable de réparer ou d'éliminer les molécules endommagées (Benammar, 2011).

### **II.5.3. Les antioxydants enzymatiques**

Les antioxydants enzymatiques représentent la composante la plus importante des systèmes de défense cellulaire contre les attaques oxydatives. Ces enzymes sont hautement conservées et présentes chez l'ensemble des mammifères. Les principaux systèmes enzymatiques comprennent la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase (Figure 16).

#### **II.5.3.1. Les superoxydes dismutases (SOD)**

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des métalloenzymes (à cuivre et à manganèse) qui catalysent la dismutation des superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène (Fridovich, 1978 ; Halliwell *et al.*, 1999).

#### **II.5.3.2. La catalase (CAT)**

La catalase (CAT) est une enzyme hémique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Elle est essentiellement présente dans les érythrocytes (Valko *et al.*, 2006). Son activité est plus importante dans les globules rouges, les hépatocytes et les reins (Théron *et al.*, 2005b).

#### **II.5.3.3. La glutathion peroxydase (GPx)**

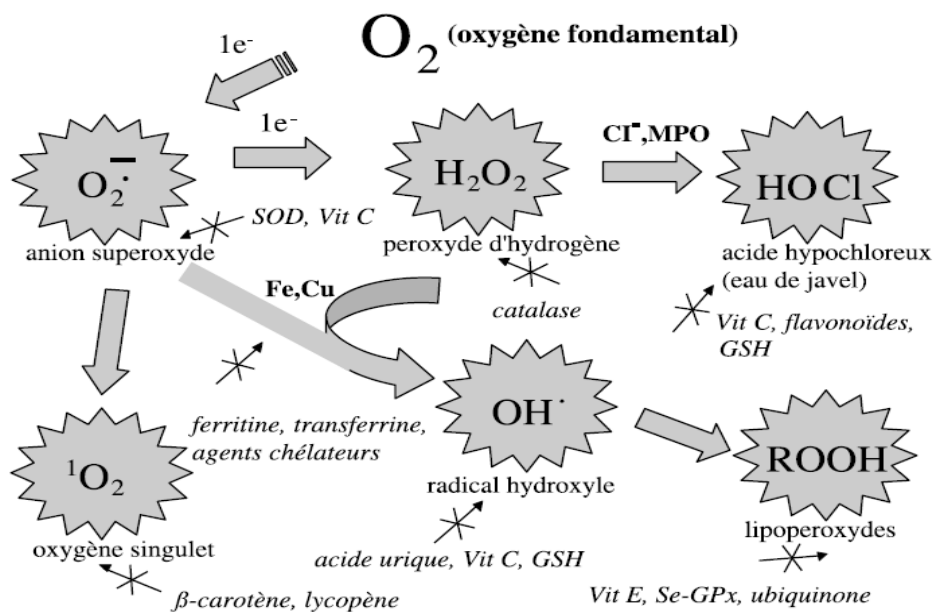
Ce sont des enzymes sélénium dépendantes, capables de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes lipidiques par oxydation du glutathion réduit (GSH). La GPx présente une meilleure affinité pour le peroxyde d'hydrogène que la CAT mais n'en est pas spécifique et peut réagir avec des hydroperoxydes d'esters de cholestérol ou de phospholipides membranaires, de lipoprotéines ou d'ADN. Par contre, la GPx est spécifique de son cofacteur ; le glutathion (Théron *et al.*, 2005b; Valko *et al.*, 2006; Brigelius-Flohe *et al.*, 2009).

#### **II.5.3.4. La Glutathion réductase**

Le glutathion réductase (GR) est une flavoprotéine qui permet de régénérer le glutathion réduit GSH à partir de sa forme oxydée (GSSG). Cette enzyme est donc indispensable au maintien de l'activité de la glutathion oxydase et empêche une accumulation du glutathion



oxydé qui provoque diverses perturbations métaboliques dont l'inhibition de la synthèse protéique (Albrecht *et al.*, 1994).



**Figure 16 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydantes (Pincemail *et al.*, 2002).**

#### II.5.4. Les antioxydants non-enzymatiques

Parmi les antioxydants non-enzymatiques, on distingue des composés endogènes et des composés exogènes. Ces derniers (vitamines C et E, polyphénols, ...) sont principalement apportés à l'organisme par l'alimentation. Les polyphénols, présents en grande quantité dans les fruits, les légumes et les extraits végétaux seront présentés dans le second chapitre du présent manuscrit.

Les antioxydants non-enzymatiques endogènes sont présents dans les cellules. La plupart sont des agents hydrosolubles tels que le glutathion, l'acide urique, la bilirubine et l'ubiquinol (coenzyme Q réduit).

##### II.5.4.1. Le glutathion

Le glutathion (GSH) est un tri peptide (acide glutamique-cystéine-glycine) il est essentiellement présent sous forme réduite. Le GSH joue son rôle d'antioxydant en tant que substrat d'enzymes antioxydantes telles que les glutathion peroxydases (GPx), mais également par ses propriétés intrinsèques. En effet, le glutathion prévient l'oxydation des groupements thiols grâce à son pouvoir réducteur. Il peut également chélater les ions cuivreux

Cu<sup>+</sup> et limiter ainsi leur participation à la réaction de Fenton (Kruidenier *et al.*, 2002; Théron *et al.*, 2005).

#### **II.5.4.2. La bilirubine**

C'est un produit terminal de la dégradation de l'hème et résultant du catabolisme de l'hémoglobine. Il s'agit d'un composé non hydrosoluble à pH physiologique qui se lie à l'albumine empêchant ainsi sa pénétration dans les tissus riches en lipides comme le cerveau. La bilirubine est un piègeur d'oxygène singulet et de radicaux peroxydes RO<sub>2</sub><sup>•</sup> et protège ainsi l'albumine et les acides gras qui y sont associés des attaques radicalaires (Théron *et al.*, 2005).

#### **II.5.4.3. L'acide urique**

C'est produit par oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine par la xanthine oxydase et la xanthine déshydrogénase. Au pH physiologique, il est majoritairement présent sous la forme ionisée (urate) pouvant interagir avec les radicaux hydroxyles et conduisant à la formation de l'espèce radicalaire UrH<sup>•-</sup> stable. Celle-ci est à son tour réduite par l'ascorbate régénérant l'urate. L'urate protège les protéines de la nitration en réagissant avec le peroxy-nitrite. Il peut également chélater les ions métalliques et donner des chélates peu réactifs sur le plan catalytique (Simic *et al.*, 1989; Whiteman *et al.*, 2002).

#### **II.5.4.4. Le coenzyme Q**

C'est un composé hydrophobe qui joue un rôle essentiel dans la chaîne mitochondriale de transport d'électrons. Il est également présent dans d'autres membranes cellulaires et dans les lipoprotéines où il joue un rôle d'antioxydant. L'ubiquinol (forme réduite du coenzyme Q) contenu dans les LDL (low density lipoprotein) joue un rôle important dans leur résistance à l'oxydation. Cependant son rôle en tant qu'antioxydant peut-être discuté dans la mesure où le coenzyme Q peut être à l'origine de la production d'anion superoxyde dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Beyer, 1994; Théron *et al.*, 2005).

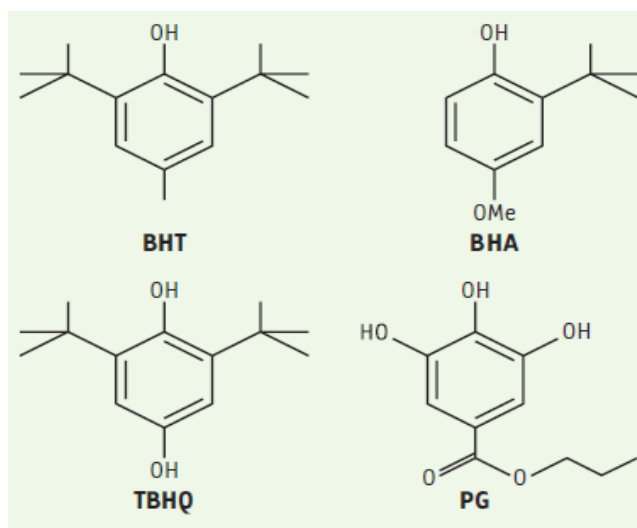
### **II.6. Classification des antioxydants**

Les antioxydants sont classés selon leur origine en antioxydants naturels ou synthétiques et selon leur mode d'action en antioxydants primaires ou secondaires.

#### **II.6.1. Antioxydants synthétiques**

Ce sont des substances synthétisées chimiquement. Dans l'industrie alimentaire, ces antioxydants (Figure 17), tels que le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), la gallate propylée (PG) et le tétra-butylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matières de

substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture (Lisu *et al.*, 2003).

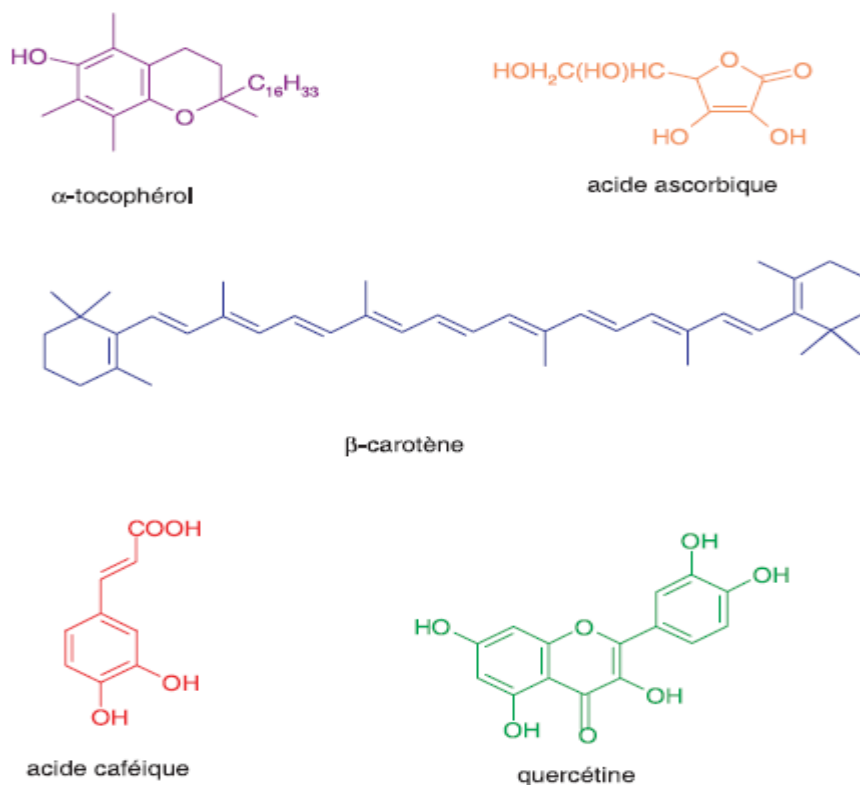


**Figure 17 : Quelques antioxydants synthétiques (Marc *et al.*, 2004).**

### II.6.2. Antioxydants naturels

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydant. Elles incluent la bêta carotène, l'albumine, l'acide urique, les œstrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E, etc. Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité (Svoboda et Ampson, 1999).

Dans ce type d'antioxydants on peut trouver les caroténoïdes, les vitamines, les polyphénols, les oligoéléments (Figure 18).



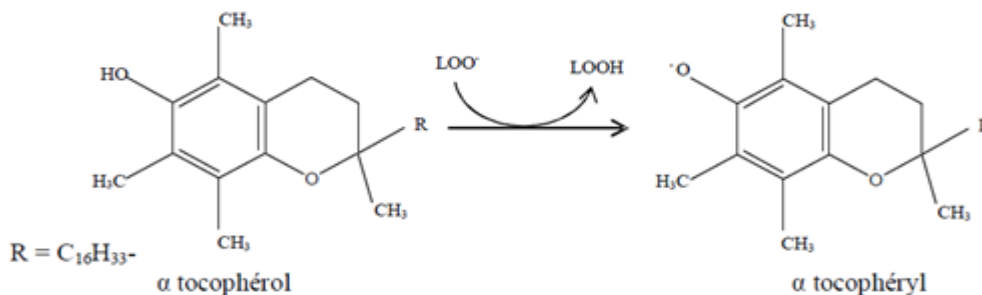
**Figure 18 : Quelques composés naturels possédant des propriétés antioxydantes (Gardès-Albert et al., 2003).**

### II.6.2.1. Les vitamines

Certaines vitamines ont des propriétés antioxydantes dont la vitamine E et C.

#### a) α-Tocophérol

La vitamine E présente un effet «scavenger» sur les radicaux peroxyde et alkoxyde (Figure 19). Elle réagit particulièrement dans les biomembranes. Les tocophérols sont des donateurs d'hydrogène lors de la peroxydation lipidique évitant ainsi toute propagation. Le radical tocophéryl (Toc-O•) généré est plus stable que les radicaux peroxyde et alkoxyde ((Niki *et al.*, 1985 ; Pincemail, 1998 ; Hensley *et al.*, 2004).



**Figure 19: Effet scavenger de l'α-tocophérol sur le radical peroxyde (Pincemail, 1998).**

### b) L'acide ascorbique

L'acide ascorbique, ou vitamine C, est un cofacteur de plusieurs mono- et bi-oxygénases et oxydases et maintient les ions métalliques des sites actifs des enzymes sous la forme réduite. La vitamine C, excellent piègeur des radicaux libres, peut protéger divers substrats biologiques (protéines, acides gras, ADN) de l'oxydation (Figure 20). Elle joue aussi un rôle fondamental, en régénérant la vitamine E à partir de sa forme radicalaire tocophéryl (Carr et Frei, 1999 ; Walingo, 2005).

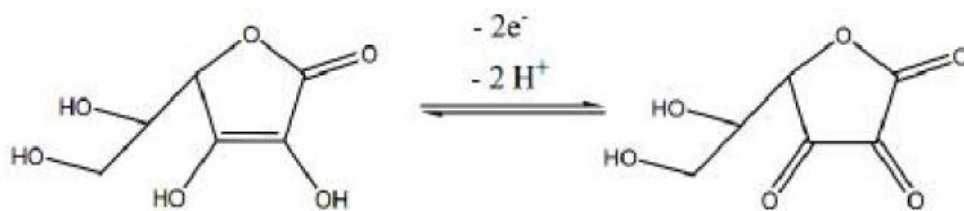


Figure 20 : oxydation de l'acide ascorbique(Walingo, 2005)

#### II.6.2.2. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles ayant une chaîne centrale hautement polyinsaturée. La structure de base des caroténoïdes est formée d'une longue chaîne hydrocarbonée en C18 alternant simples et double liaisons portant quatre groupements méthylés et de cycles C6, situés à chacune des extrémités de cette chaîne.

Les caroténoïdes peuvent être de couleur rouge, jaune ou orange et sont largement distribués dans la nature. Plus de 700 caroténoïdes naturels sont identifiés jusqu'à présent dont 50 peuvent être absorbés et métabolisés par le corps humains. Les caroténoïdes peuvent chimiquement être scindés en deux classes principales :

- **Les caroténoïdes** : Ce sont des composés qui contiennent uniquement du carbone et de l'hydrogène et ont habituellement une couleur orange et rouge tels que le  $\beta$ -carotène et le lycopène.
- **Les xanthophylles** (xantho en grec signifie jaune) Ce sont des molécules qui renferment des atomes d'oxygène dans leur structure (lutéine, zéaxanthine) (Krinsky, 1989 ; Rao, 2006).

L'activité antioxydante des caroténoïdes est due à leur propriété de céder un électron (Faulks et Southon, 2000 ; McGarvey *et al.*, 2001) ou un proton (Beutner *et al.*, 2001 ;

McGarvey *et al.*, 2001) aux radicaux libres ainsi que leur capacité à piéger l'oxygène singulet (Faulks et Southon, 2000 ; McGarvey *et al.*, 2001).

### II.6.2.3. Les oligoéléments

Les oligo-éléments sont des composés essentiels au métabolisme des macronutriments (glucides, lipides, protéides) et contribuent de manière importante au fonctionnement des enzymes antioxydantes, comme cofacteurs. Parmi les oligoéléments qui présentent des propriétés antioxydantes se trouvent le sélénium et le zinc (Cabrera *et al.*, 2006).

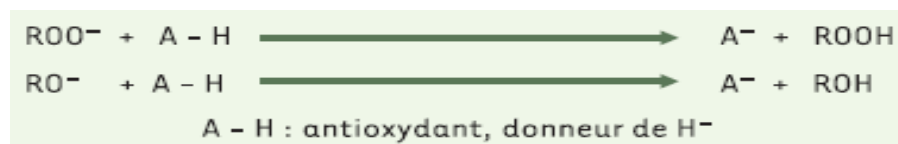
### II.6.2.4. Les composés phénoliques.

### II.6.3. Antioxydants primaires

Les antioxydants primaires (piégeage de radicaux) qui permettent l'interruption de la chaîne auto catalytique. Ces antioxydants transforment les radicaux en composés plus stables et bloquent la phase de propagation (Figure 21). Les composés phénoliques naturels : tocophérols, ou de synthèse : butylhydroxytoluène (BHT), gallate de propyl appartiennent à cette classe d'antioxydants (Kortenska *et al.*, 2002).

Les antioxydants primaires (radicalaires ou vrais), qui permettent l'interruption de la chaîne auto catalytique :  $AH + R^{\bullet} \rightarrow A^{\bullet} + RH$ .

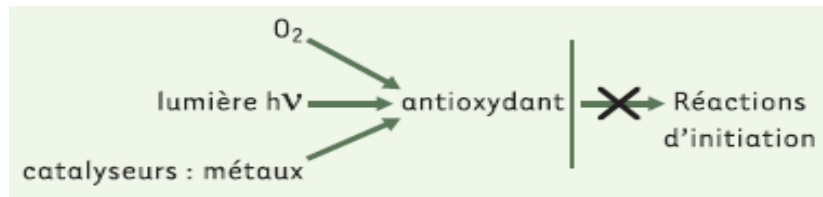
Le radical ( $A^{\bullet}$ ) dérivé de l'antioxydant se convertit en produit stable. La stabilité du radical  $A^{\bullet}$  peut s'expliquer par sa conversion en composés non radicalaires :  $A^{\bullet} + A^{\bullet} \rightarrow A-A$  ou  $A^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow A-R$  (Kim et Lee, 2004).



**Figure 21 : Neutralisation des radicaux libres par mécanisme donneur de proton (Marc *et al.*, 2004).**

### II.6.4. Antioxydants secondaires

Les antioxydants secondaires ou préventifs qui assurent l'inhibition de la production des radicaux libres (Figure 22) et peuvent intervenir par différents mécanismes; la protection contre les rayons UV, comme les carotènes. D'autres chélatent des métaux promoteurs d'oxydation type fer et cuivre, comme l'acide citrique et les lécithines) ou enfin en séquestrant l'oxygène comme l'acide ascorbique (Gordon, 1990).



**Figure 22 : Action des antioxydants secondaires (Marc *et al.*, 2004).**

### **II.6.5. Les antioxydants synergiques**

Ce sont des molécules qui améliorent l'action de certains antioxydants, ce qui se traduit souvent par un accroissement de la période de protection. Parmi eux se trouvent les acides lactiques. L'efficacité des antioxydants peut être augmentée par l'utilisation d'un mélange d'antioxydants de type I et II. L'association de ces deux types d'antioxydants permet d'inhiber les phases d'initiation et de propagation de l'oxydation des lipides (Jude, 2004).

### III. Données générales sur le laurier et la sauge

#### III.1. Dénomination et classification botanique

Le laurier, ou laurier-sauce, a pour nom scientifique *Laurus nobilis* L. Le nom latin *Laurus*, d'origine celte signifie « toujours vert » et fait allusion au feuillage persistant de la plante. Ces feuilles sont largement utilisées et connues comme assaisonnement et herbe médicinale depuis les périodes antiques grecque et romaine (Demir *et al.*, 2004).

La sauge tire son nom scientifique *Salvia officinalis* L. de l'importance de son rôle en phytothérapie : *Salvia* vient de *salvare* qui, en latin, signifie « guérir ». Elle agit contre les maux de gorge et les troubles de la digestion ; elle est légèrement stimulante. Sa saveur est chaude, amère et astringente (Iserin, 2001). Environ 900 espèces sont identifiées dans le monde (Maksinovic *et al.*, 2007, ; Longaray *et al.*, 2007).

La place des deux plantes dans la systématique est synthétisée dans le Tableau II.

**Tableau II: Classification botanique de *Salvia officinalis* L. et *Laurus nobilis* L.**

	<i>Laurus nobilis</i> L. (Ballabio et Goetz, 2010).	<i>Salvia officinalis</i> L. (Gausson <i>et al.</i> , 1982).
<b>Règne</b>	Plantae	Plantae
<b>Sous-règne</b>	Tracheophyta = Tracheobionta (Cormophyta)	Tracheophyta = Tracheobionta (Cormophyta)
<b>Division</b>	Magnoliophyta	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida	Magnoliopsida
<b>Ordre</b>	Lurales	Lamiales
<b>Famille</b>	Lauraceae	Lamiaceae
<b>Genre</b>	Laurus	Salvia

Les plantes sont connues et désignées sous différentes appellations (Tableau III).



Tableau III : Dénomination des plantes utilisées.

	<i>Laurus nobilis</i> L. (Ballabio et Goetz, 2010)	<i>Salvia officinalis</i> L. (Djerroumi et Nacef ,2004)
<b>Français</b>	Laurier sauce, laurier noble, laurier d'Apollon	Sauge
<b>Kabyle</b>	Thassalt	/
<b>Arabe</b>	Rand	Salamia, souekennebi
<b>Anglais</b>	Sweet bay,	Sage

### III.2. Description botanique des deux plantes

Laurier (Figure 23a) est un arbuste ou arbre aromatique de 2 à 10m de haut à tige droite grise dans sa partie basse et verte dans sa partie haute. Les feuilles de forme lancéolée sont alternées, coriaces, persistantes, à bord ondulée, ayant une couleur vert-foncée sur leur face supérieure et plus claire sur la face inférieure. Les fleurs, jaunes, groupées par 4 à 5 en petites ombelles, apparaissent en Mars - Avril. C'est une plante dioïque (fleurs mâles et femelles sur des pieds séparés). Le fruit est une petite baie ovoïde, noir violacée et nue (Rivera et Obon, 1995 ; Demir *et al.*, 2004 ; Beloued, 2005 ;).

La sauge (Figure 23b) est une plante vivace à tige ligneuse à la base, formant un buisson dépassant parfois 80cm. Les feuilles sont épaisses, rugueuses finement, crénelées, persistantes, opposées, ridées, de forme ovale et de couleur glauque, .A l'aisselle des feuilles supérieures naissent des fleurs bleu-violacées, groupées en épis. Les fruits sont en forme de tétrakènes (Djerroumi et Nacef, 2004 ).



Figure 23 : Photos du Laurier (a) et de la sauge (b).

### III.3. Origine et distribution des deux plantes

Les deux plantes sont originaires du bassin méditerranéen. Le laurier pousse dans les lieux humides et ombragés, mais également dans les jardins, où il est cultivé. Hors des régions méditerranéenne, le laurier est très sensible au gel et souvent cultivé en bacs. Actuellement, la plante est largement cultivée dans beaucoup de pays comme plante ornementale et pour la production commerciale tels que la Turquie, l'Algérie, la France, la Grèce, le Maroc, l'Amérique centrale et les Etats-Unis Méridionaux (Demir *et al.*, 2004; Barla *et al.*, 2007).

La sauge affectionne les lieux ensoleillés ; et est cultivée par semis au printemps. Les plantes sont remplacées tous les 3 ou 4 ans. Aujourd'hui, la plante est cultivée intensivement en Europe occidentale, aux USA et en Russie pour ses feuilles au goût piquant (Djerroumi et Nacef, 2004).

### III.4. Utilisation des deux plantes

A côté de ses vertus culinaires bien connues, le laurier présente aussi des propriétés médicinales connues depuis l'Antiquité. Il a des applications importantes en médecine traditionnelle et fait l'objet d'un sujet de recherche scientifique intéressant (Smic *et al.*, 2003). Le laurier est principalement utilisé, par voie orale, dans le traitement symptomatique des troubles de l'appareil digestif supérieur tels que le ballonnement épigastrique, lenteur de la digestion, éructations et flatulence (Iserin, 2001).

L'extrait aqueux est utilisé dans la médecine traditionnelle turque en tant qu'antihémorroïdal, antirhumatismal, diurétique et comme un antidote dans des morsures de serpent (Kivçak et Mert, 2002).

L'huile essentielle obtenue à partir des feuilles de laurier a été employée pour le soulagement des hémorroïdes et des douleurs rhumatismales. En outre, l'huile essentielle est employée par l'industrie cosmétique en parfumerie et dans la fabrication des savons. Elle compte parmi les meilleurs moyens d'éloigner les insectes gênants (Demir *et al.*, 2004 ; Beloued, 2005).

L'huile (beurre) de laurier est utilisée en application externe pour ses propriétés cicatrisantes et antirhumatismeales, en pommade contre les inflammations cutanées. En usage interne, elle est traditionnellement utilisée contre l'apoplexie, comme dépuratif du sang, contre la grippe et autres symptômes respiratoires (Ballabio et Goetz, 2010).

La sauge,est une herbe aromatique, utilisée pour assaisonner les plats pour son goût piquant et puissant, légèrement amer et camphré (Djerroumi et Nacef, 2004 ; Durling, 2007).

C'est l'une des plantes les plus utilisées en médecine traditionnelle, vu ses importantes propriétés. Elle est indiquée comme un stimulant pour les sujets anémiques, stressés et déprimés. Elle régularise aussi le cycle menstruel, la transpiration et les bouffées de chaleur. cette plante est également utilisée pour traiter l'asthme (Iserin, 2001 ;Djerroumi et Nacef, 2004).

Les infusions de la sauge sont appliquées pour le traitement de plusieurs maladies de la circulation sanguine, les troubles digestifs et les problèmes du système nerveux (Radulescu *et al.*,2004) ;elle est d'ailleurs préconisée pour les étudiants en période d'examen.

En usage externe, elle est appliquée en gargarisme contre les inflammations de la bouche, mal de gorge, abcès, ainsi que pour le nettoyage et la cicatrisation des plaies (Iserin, 2001 ;Djerroumi et Nacef, 2004).

## **Partie expérimentale**

## **I. Matériel et méthodes**

### **I.1. Récolte et préparation des échantillons**

#### **I.1. 1. Origine des échantillons**

Les feuilles de *Laurus nobilis* L. et *Salvia officinalis* L. sont utilisées comme matériel végétal. Les feuilles *Laurus nobilis* L. proviennent de la forêt d'Akfadou (Wilaya de Béjaia). La collecte a été faite au mois de Février 2013. Les feuilles de *Salvia officinalis* L. ont été récoltées au début de Mars 2013 à Bejaia.

Après la récolte, les feuilles sont débarrassées de toutes les impuretés (débris de tiges, rameaux, etc.) et légèrement rincées de la poussière, puis étalées pour le séchage .

#### **I.1. 2. Séchage**

Il se fait à l'air libre dans un endroit sec, ventilé et ombragé pendant 45 jours (pour la sauge) et un mois (pour le laurier). Le taux d'humidité du matériel végétal est déterminé juste après la récolte et au cours du séchage. Ce dernier est arrêté lorsque la teneur en eau est inférieure à 10% ;

La teneur en eau a été déterminée en introduisant 10g (P1) de l'échantillon dans une coupelle placée dans une étuve réglée à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant (deux pesées consécutives ne doivent pas différer pas entre elles de 5mg). La teneur en eau (%) du matériel végétal est donnée par la formule suivante:

$$\text{Teneur en eau (\%)} = (P - P1) / P \cdot 100$$

**P** : masse en g de la prise d'essai avant séchage.

**P1** : masse en g de la prise d'essai après séchage.

Le taux de matière sèche est donné par la formule suivante :

$$\text{Taux de matière sèche (\%)} = 100 - \text{teneur en eau (\%)}$$

Poids sec est déterminé par la formule suivante

$$\text{Poids sec} = \text{taux de matière sèche} \times P / 100.$$

#### **I.1.3. Broyage**

Les feuilles sèches ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique.

#### **I.1.4. Tamisage**

Les poudres de feuilles obtenues après broyage ont été tamisées à l'aide d'un tamis de 0.5mm de diamètre des mailles. La poudre ainsi obtenue est conservée dans des bocaux en verre (préalablement séchés) et à l'abri de la lumière.

## **I.2. Composition chimique globale**

La matière minérale est déterminé par incinération au four à 550°C pendant 4 à 5 heures. Les matières grasses sont extraites au Soxhlet (AOAC, 1975). La cellulose brute est le résidu organique obtenu après deux hydrolyses successives (acide H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> puis alcalines NaOH) selon la méthode de WEENDE. Les matières azotées sont déterminées par la méthode de Kjeldahl (quantité d'azote 6,25). Les sucres solubles sont déterminés selon la méthode de Dubois *et al.* (1956) (modes opératoires en annexe 1).

## **1.3. Extraction et dosage des composés phénoliques**

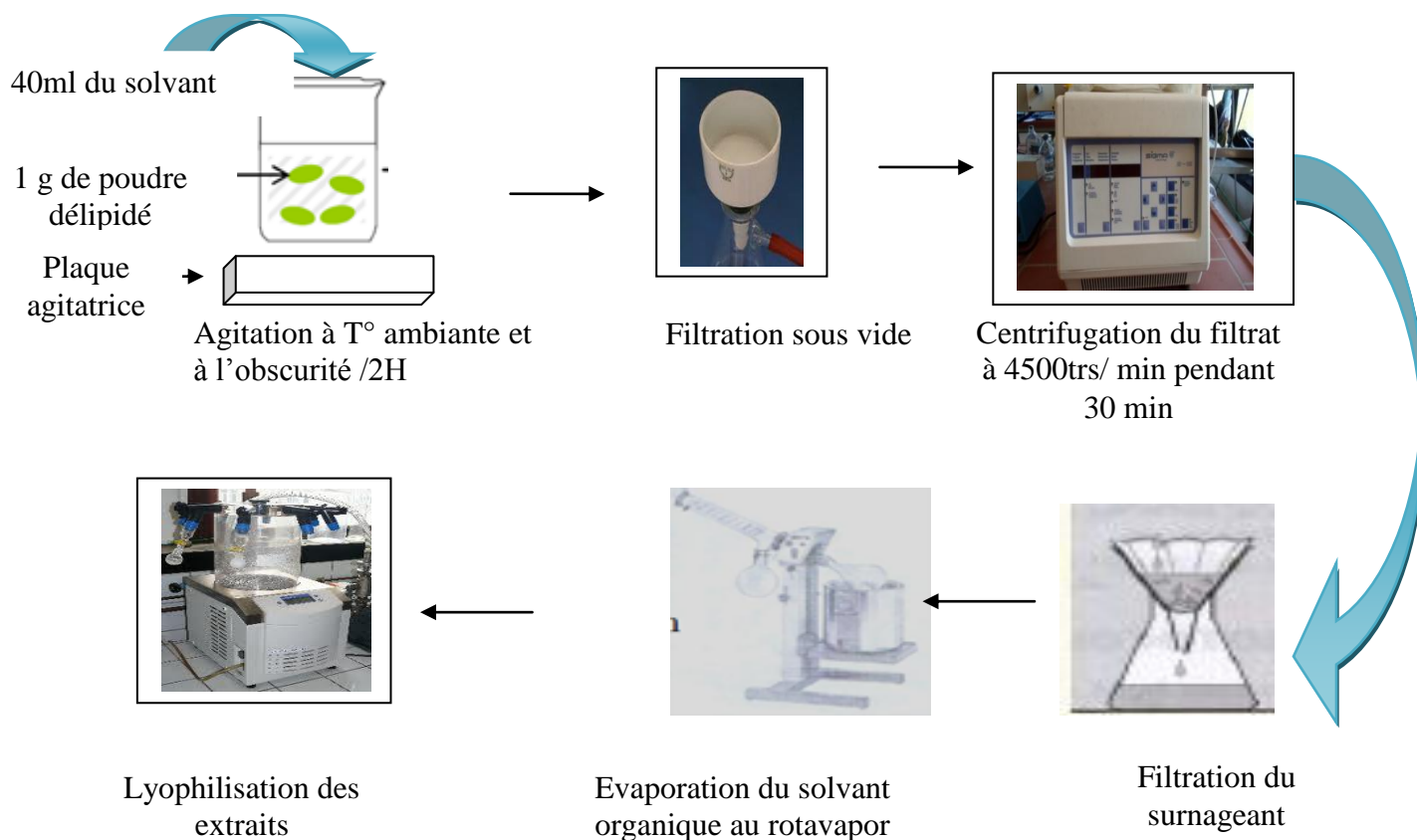
### **1.3.1. Extraction**

L'extraction des composés phénoliques (Figure 24) est réalisée par macération selon la méthode d'Oomah *et al.* (2010) ; quatre solvants d'extraction ont été utilisés : eau distillée, Ethanol 60%, Ethanol 80% et Ethanol 100% .

#### **Principe**

Quand une matrice est au contact d'un solvant, les composants solubles dans le matériel migrent vers le solvant. Ainsi, l'extraction est un transfert du principe actif de la matrice vers le solvant selon un gradient de concentration (Handa, 2008).

## Mode opératoire



**Figure 24 : Protocole d'extraction des composés phénoliques (Oomah *et al.*, 2010).**

Les extraits lyophilisés sont pesés et conservés à sec jusqu'à utilisation.

Le rendement d'extraction de chaque extrait est calculé par la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = \left[ \frac{P_f}{P_i} \right] * 100$$

**P<sub>f</sub>** : Poids de l'extrait après lyophilisation(g).

**P<sub>i</sub>** : Poids de l'échantillon initial(g).

### I.3.2. Dosage des composés phénoliques

Pour quantifier les différents composés phénoliques : la méthode de Skerget *et al.* (2005) est utilisée pour déterminer la teneur en phénols totaux solubles. Pour les flavonoïdes, la technique utilisée est celle de Lamaison et Carnet (1990) citée par Bahri-Sahloul (2009). La méthode décrite par Hagerman et Butler (1978) est utilisée pour déterminer la teneur en tanin précipité par la BSA. Le dosage des tanins condensés est réalisé selon la méthode décrite par Desphande *et al.* (1986). La teneur en tanins

hydrolysables est réalisée selon la méthode au chlorure ferrique citée par Mole et Waterman (1987).

### I.3.2.1. Dosage des phénols totaux solubles

#### Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu, mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), est réduit en présence de polyphénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). La coloration bleue produite est proportionnelle au taux de composés phénoliques présents dans le milieu réactionnel (Ribéreau-Gayon, 1968 ; Lapornik *et al.*, 2005).

#### Mode opératoire

500 $\mu$ l d'extrait sont mélangés avec 2.5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu. Après 5 min, 2 ml de carbonate de sodium (75 g/l) sont ajoutés. Le mélange est incubé à 50°C pendant 5 min ; après refroidissement l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 760 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions.

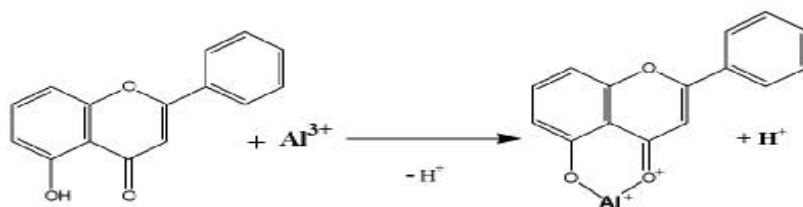
Les concentrations en composés phénoliques sont déterminées par référence à une courbe d'étalonnage obtenue avec de l'acide gallique utilisé comme standard (annexe2).

Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique (EqAG) par g de matière sèche (mg EqAG/g MS).

### I.3.2.2. Dosage des flavonoïdes

#### Principe

Cette méthode spectrophotométrique est basée sur la capacité des flavonoïdes à se complexer avec le chlorure d'aluminium (Figure 25). Il résulte de cette réaction une coloration jaunâtre avec un maximum d'absorption à 430nm.



**Figure25 : Réaction du Chlorure d'Aluminium avec les flavonoïdes (Ribéreau- Gayon, 1968).**

#### Mode opératoire



2ml de chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$ ) à 2% sont ajoutés à 2ml d'extrait. Le mélange est homogénéisé et incubé à température ambiante pendant 10 min à l'abri de la lumière. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à 430nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions.

La teneur en flavonoïdes est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage obtenue avec de la Quercétine utilisée comme standard (annexe2). Les résultats sont exprimés en mg équivalent de Quercétine par g de matière sèche (mg EqQ/gMS).

### I.3.2.3. Dosage des tanins condensés

#### Principe

Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés dans un milieu acide pour produire un complexe (Figure 26) rouge mesuré à 500 nm (Hagerman,2002).

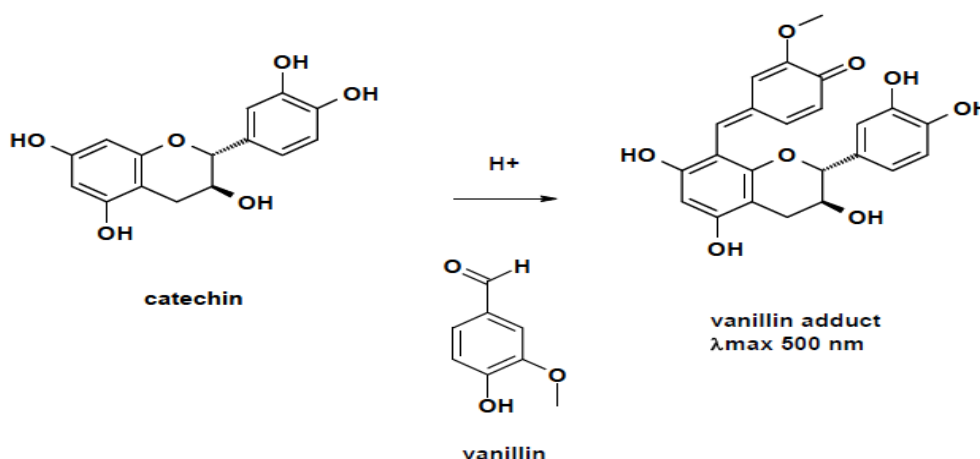


Figure26 : réaction de la vanilline avec la catéchine (Hagerman,2002).

#### Mode opératoire

A 1ml d'extrait, sont ajoutés 5ml de vanilline-HCl. Après homogénéisation, les tubes sont incubés à 30°C pendant 20 min. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à 500nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions.

La teneur en tanins condensés est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage obtenue avec de la catéchine utilisée comme standard(annexe2). Les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme de matière sèche (mg EqCat/g MS).

**I.3.2.4. Dosage des tanins hydrolysables****Principe**

Les tanins hydrolysables réagissent avec le chlorure ferrique et donnent une coloration bleue mesurée par spectrophotométrie (Mamadou,2002).

**Mode opératoire**

3. 5ml du chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$  à 0.01M dans HCl à 0.001M) sont ajoutés à 1ml d'extrait. Après homogénéisation, l'absorbance est mesurée à 660 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions.

La teneur en tannins hydrolysables est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage obtenue avec de l'acide tannique (annexe2). Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide tannique/g de matière sèche (mg Eq AT/gMS).

**I.3.2.5. Dosage des tanins précipités par la BSA****Principe**

Le dosage des tanins précipités est basé sur la formation d'un complexe tanins-protéines. Le précipité est dissout dans un détergent ; les composés phénoliques réagissent avec le chlorure ferrique pour former un chromatophore qui absorbe à 510nm (Hagerman 2002).

**Mode opératoire**

Un mélange constitué de 1ml d'extrait et 1ml de BSA (2mg/ml préparée dans un tampon acétate pH 4.9, 0.2M), est incubé à 4°C pendant 24 h. Au culot obtenu après centrifugation à 14000 tr/mn pendant 15 mn, sont ajoutés 4ml de SDS/TEA et 1 ml de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$  à 0.01M dans l'HCl 0.01M). Après 15min d'incubation à température ambiante, l'absorbance est lue à 510 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions.

La teneur en tanins précipités par la BSA de l'extrait est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage obtenue avec de l'acide tannique (annexe2). Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide tannique par gramme de matière sèche (mg EqAT / g MS).

**I.4. Mise en évidence de la présence d'autres métabolites secondaires dans les extraits**

- La détection des saponines est réalisée au moyen du test de Yadav et Agarwala (2011). A 1ml d'extrait, sont ajoutés 3ml d'eau distillée. Après agitation pendant 2min la formation d'une mousse persistante indique la présence des saponines.

- La présence d'Alcaloïdes est révélée par la méthode d'Amana (2007).Quelques gouttes du réactif de Bouchardat sont ajoutées à 2ml d'extrait.La formation d'un précipité brun-noir, brun-terne ou jaune-brun indique la présence de ces métabolites dans le milieu.

- La méthode d'Aziman *et al.* (2012) permet de mettre en évidence la présence de terpénoïdes. A 2.5ml d'extrait est ajouté 1ml de chloroforme. Après homogénéisation, 1.5 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré sont ajoutés au mélange. La formation d'une couleur brun-rouge à l'interface indique la présence de ces composés.

### **I.5. Fractionnement par CCM des extraits**

Lorsque la plaque sur laquelle est déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. Les composés se déplacent donc de la phase stationnaire à la phase mobile. Chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front de solvant. Cette vitesse dépend, d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile.

#### **-Supports utilisés**

Des plaques en verre (20 cm sur 20cm) sont préalablement nettoyées au méthanol (afin d'éliminer toute substance étrangère susceptible d'être présente) et séchées. Le gel de silice (60%) est répandu uniformément sur les plaques en verre à l'aide d'un étaleur pour avoir une épaisseur de 0.5 mm. Les plaques sont séchées à l'air libre, puis activées dans une étuve réglée à 110°C pendant 30 minutes. Les dépôts sont effectués en bas de la plaque à 1cm du bord inférieur. Les différents dépôts sont espacés de 1cm en laissant 1.5cm aux deux extrémités latérales.

#### **-Systèmes d'élution utilisés**

Sept systèmes d'élution (Tableau IV) ont été testés afin de choisir le système le plus adéquat pour la séparation des composés bioactifs des extraits des deux plantes.

**Tableau IV: Systèmes d'élution testés**

Systèmes d'élution		Référence
Acétate d'éthyle /Acide formique/Acide Acétique/eau	100 :11 :11 :26	Ramu <i>et al.</i> (2012)
Dichlorométhane /Méthanol /Eau	75 :25 :2	Emam <i>et al.</i> (2010 )
Toluène/Acétate d'éthyl /Acideformic	70:30:1	Ciesla <i>et al.</i> (2010)
Butanol/Acide acétique /Eau	60 :15 :25	Yakhlef (2010)
Dichlorométhane /Méthanol/Eau	85 :15 :1.5	Pharmacopée européenne (2008)
Dichlorométhane /Méthanol /Eau	70 :25 :7	
Dichlorométhane /Méthanol/Eau	74 :25 :3	
Dichlorométhane /Méthanol/Eau	72 :25 :4	

La préparation de la cuve a eu lieu une heure avant les manipulations. Une quantité de 60ml d'éluant est versée dans la cuve chromatographique. Cette dernière est fermée hermétiquement pour assurer une saturation de l'atmosphère de la cuve en vapeurs de l'éluant.

A l'issue des essais préliminaires, nous avons retenu le mélange Dichlorométhane-Méthanol-Eau (75:25:2, v/v) et le système Acétate Ethyle Acide formique-Acide acétique-Eau (100 :11/11/26 : V/V) pour les extraits de feuilles des deux plantes.

### **I.5.1. Identification des fractions**

#### **-Dépôt de l'échantillon**

20µl de chaque extrait reconstitué (10 mg/ml) sont déposés à l'aide d'une micropipette (en évitant l'étalement du produit). 10 µl de standards (rutine, quercétine, acide caféique et acide tannique, acide rosmarinique, acide ferrulique, acide p-coumarique) préparés à raison de 1mg/ml sont également déposés.

**-Développement, élution et identification**

Les plaques chargées d'échantillons sont séchées à l'air libre et déposées dans la cuve qui est fermée immédiatement à l'aide d'un couvercle adhésif. Lorsque l'élution atteint presque le bord supérieur à 1cm, les plaques sont retirées de la cuve et le front du solvant est marqué à l'aide d'un crayon.

Une fois le développement du chromatogramme effectué, la plaque est séchée sous hotte. L'observation des différents spots est réalisée à l'œil nu, sous UV(254 nm ou 365 nm) ou après révélation chimique.

**-Révélation par des méthodes chimiques**

Ces méthodes consistent à mettre en contact de la plaque un réactif plus ou moins spécifique qui donne un produit coloré par réaction chimique avec les substances à révéler.

**-Réactif à la Vanilline sulfurique**

Une solution composée de 1 g de vanilline, 2 ml d'acide sulfurique dans 100 ml méthanol est préparée. Après pulvérisation, la plaque CCM est chauffée à 110°C pendant 5 minutes à 10min environ. Plusieurs colorations apparaissent en fonction du type de composés (Lhuilier,2007).

**-Réactif chlorure d'aluminium AlCl<sub>3</sub> :**

Après pulvérisation de la plaque avec le chlorure d'aluminium (1 g AlCl<sub>3</sub> dans 100 ml de méthanol), les flavonoïdes apparaissent avec une couleur jaunâtre à l'œil nu et bleue , jaune, orange sous UV 365nm (Roger *et al* .,2011).

- Une fois les spots repérés et délimités, le rapport frontal (RF) de chaque constituant est déterminé comme suit:

$$\text{Le rapport frontal (RF)} = h / H$$

h: Distance parcourue par le constituant

H: Distance parcourue par le solvant

### **1.5.2. Test du pouvoir anti-radicalaire du DPPH sur plaque CCM**

La méthode Cuendet *et al.* (1997) citée par Ferrari (2002) est appliquée pour évaluer l'effet scavenger du radical DPPH sur plaque CCM.

Les plaques CCM développées et séchées sont vaporisées par une solution méthanolique de DPPH à 0,2 %. Après un temps de réaction optimal de 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière, les composés à propriété anti-radicalaire sont localisés par l'apparition de zones jaunes sur fond violet.

### **1.5.3. Récupération de fractions chromatographiques**

Notre objectif est de tester *in vitro* l'activité antioxydante de diverses fractions. Pour refléter le contenu des extraits bruts, nous avons utilisé en CCM 1ml d'extrait (concentration initiale) déposé en forme de bande fine sur des plaques (couche de silice de 1mm d'épaisseur). L'élution et le développement des plaques sont menés comme précédemment.

Des taches correspondantes à différentes fractions ont été délimitées et récupérées en même temps que la silice à l'aide d'une spatule. Une quantité de méthanol absolu (1ml) est ajoutée à ce mélange (fraction + gel de silice) et l'ensemble est agité puis laissé reposer à température ambiante. Le surnageant correspondant à la fraction souhaitée est séparé de la silice par centrifugation (4600 tours par mn pendant 15 mn) et conservé à 4°C.

### **1.6. Etude *in vitro* de l'activité antioxydante**

Elle est réalisée au moyen de quatre tests. L'effet scavenger du radical DPPH est mesuré selon la méthode de Brand-Williams (1995) et le pouvoir réducteur est évalué selon la méthode d'Oyazu *et al.* (1986) reprise par Hinneburg *et al.* (2006). Nous avons utilisé également le test de chélation du fer ferreux selon la méthode de Zhao *et al.* (2006) cité par Bourgou *et al.* (2008). Ainsi que le test du blanchiment du  $\beta$ -carotène selon la méthode de Miller (1971) cité par Boudjou *et al.* (2013)

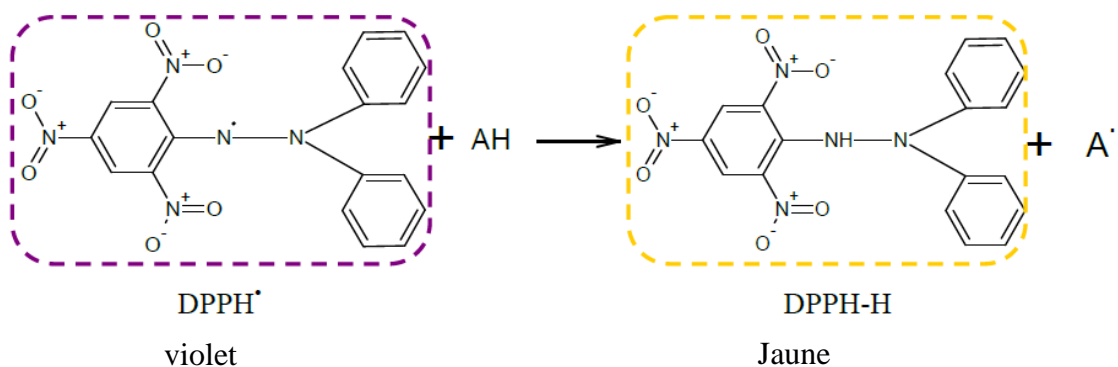
Tous les extraits lyophilisés ont fait l'objet de chacun de ces tests après reconstitution dans le méthanol.

Les fractions d'extraits bruts ne sont testées que pour l'effet scavenger du DPPH et le pouvoir réducteur du fer.

### I.6.1. pouvoir anti-radicalaire du DPPH•

#### Principe

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH). Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radicalaire) en acceptant un atome d'hydrogène (Figure 27).



**Figure 27 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH) .**

#### Mode opératoire :

Un volume de 50  $\mu\text{l}$  d'extrait brut est ajouté à 1,950 ml de la solution méthanolique du DPPH (65  $\mu\text{mol/l}$ ) fraîchement préparée. L'absorbance à 515 nm est mesurée après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière. Un témoin positif avec l'acide ascorbique et BHT est réalisé dans les mêmes conditions.

La capacité antioxydante de nos échantillons a été exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH• suivant l'équation:

$$\% \text{Inhibition} = \frac{\text{Ablanc} - \text{Aéchantillon}}{\text{Ablanc}} \times 100$$

A :absorbance

Ainsi, plus la perte de couleur est rapide plus le donneur d'hydrogène est considéré comme un antioxydant fort.

La concentration (IC50) en extrait brut permettant de réduire 50 % du DPPH est déterminée en traçant la courbe de pourcentage de réduction en fonction de la concentration par le biais du logiciel graph pad.

### **I.6.2. Le pouvoir réducteur du fer**

#### **Principe :**

La présence d'un composé réducteur dans les échantillons entraîne la réduction du fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) du complexe ferricyanure en fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ). Cette réduction se traduit par le virage de la couleur jaune du ferricyanure de potassium vers la couleur bleu verte dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur (Li *et al.*, 2009).

#### **Mode opératoire:**

200µl d'extrait sont mélangés avec 500µl de tampon phosphate à 0.2 M, pH6.6 et 500µl d'une solution aqueuse de ferricyanure de potassium [ $K_3Fe(CN)_6$ ] à 1%. Le mélange est incubé à 50°C pendant 20min. A ce mélange, 500µl d'une solution aqueuse d'acide trichloracétique (TCA à 10 %) sont rajoutés. Après centrifugation à 500tpm pendant 10 min. 1 ml de surnageant est mélangé avec 1 ml de l'eau distillée et 200µl de chlorure ferrique  $FeCl_3$  (0.1%, P/V). L'absorbance est lue à 700nm. Un témoin positif avec l'acide ascorbique est réalisé de la même manière.

L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique une augmentation de la réduction du fer.

La concentration (IC50) en extrait brut permettant d'avoir une ABS de 0.5 (Jabri-Karoui *et al.*, 2012) est déterminée en traçant une courbe des absorbances (ABS) en fonction de la concentration par le biais du logiciel graph pad.

### **I.6.3. Test du blanchiment du $\beta$ -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique**

#### **Principe :**

Dans ce test, la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du  $\beta$ -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique (Liyana-Pathirana et Shahidi, 2006).

#### **Mode opératoire :**

Préparation de l'émulsion du  $\beta$ -carotène : Une quantité de 2 mg de  $\beta$ -carotène est dissoute dans 10 ml de chloroforme. 1 ml de l'émulsion du  $\beta$ -carotène est ajouté à un mélange de 400µl Tween 80 et 40 µl d'acide linoléique. Cette solution est évaporée à 40°C jusqu'à la disparition du chloroforme. 100 ml de l'eau distillée sont ajoutés au mélange précédent et la solution résultante est agitée vigoureusement.



Dans des tubes à essai, 4 ml de l'émulsion  $\beta$ -carotène/acide linoléique est additionnée à 400 $\mu$ l des solutions méthanoliques de l'extrait ou de l'antioxydant de synthèse BHT. Après homogénéisation, l'absorbance est mesurée immédiatement à 470 nm, ce qui correspond à t=0min.

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant (contrôle négatif dans lequel l'échantillon est remplacé par le méthanol) est suivie à 470 nm à des intervalles de temps réguliers (20min) pendant 2 heures.

Le taux de dégradation (DR) est mesuré à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Taux de dégradation du } \beta\text{-carotène} = \ln (A_{t=0} / A_{t=t}) * 1/t$$

$A_{t=0}$  absorbance initiale (470 nm) à temps 0 min ;

$A_{t=t}$  est l'absorbance (470 nm) à 10, 20, 30, 40,50,60,80,100 et 120 min

t est le temps en min.

La moyenne des taux pour les différents moments étaient calculés pour donner une seule valeur pour l'échantillon. L'activité antioxydante (AA) est calculée en% d'inhibition par rapport au control en utilisant l'équation suivante:

$$\% \text{ Inhibition} = [(\text{taux de dégradation du contrôle} - \text{taux de dégradation de l'échantillon})/\text{taux de dégradation du contrôle}] \times 100$$

#### **I.6.4. Chélation du fer ferreux**

##### **Le principe :**

Le principe de ce test est la complexation des ions ferreux avec un composé ligand : 3-(2-pyridyl)-5, 6-diphényl-1, 2, 4 triazine-4',4''-disulfonate de sodium (ferrozine). Le complexe ferrozine-fer II de couleur violette présente un maximum d'absorption à 562 nm.

##### **Mode opératoire :**

A 50 $\mu$ l de FeCl<sub>2</sub> (2mM) sont ajoutées 100 $\mu$ l d'extrait. La réaction est initiée avec 100 $\mu$ l de ferrozine (5mM) et 2,75ml d'eau distillée. Le mélange est homogénéisé et incubé pendant 10min à température ambiante et l'absorbance est lue à 562 nm. Un témoin positif avec l'EDTA est réalisé de la même manière. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la

formule suivante : %Inhibition =  $\frac{A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{blanc}}} \times 100$

- A : Absorbance

### **I.7. Analyse statistique des résultats**

Toutes les déterminations sont menées en triple .Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  écart type.

Les résultats sont traités par l'analyse de (un ou deux facteurs) de la variance (ANOVA)suivie d'une comparaison multiple des moyennes grâce au logiciel statistica version 5.5.

## II. Résultats

### II.1. Composition chimique

Nos échantillons frais montrent un taux d'humidité élevés: 70.6% pour la sauge contre 41.6% pour le laurier. Nos données analytiques montrent des différences de composition significatives ( $P < 0.05$ ) entre les deux plantes (Figure 28). Le laurier se caractérise par une plus grande richesse ( $P < 0.05$ ) que la sauge en cellulose (20.52 contre 15.5g/100MS), en sucre (9.07 contre 6.15g Eq glucose/100gMS), en protéines (12.08 contre 7.36g/100MS) et en matières grasses (12.51 contre 9.57 g/100MS). Seules les matières minérales sont présentes en plus forte quantité dans la sauge (13.25 contre 4.37 g/100g pour le laurier).

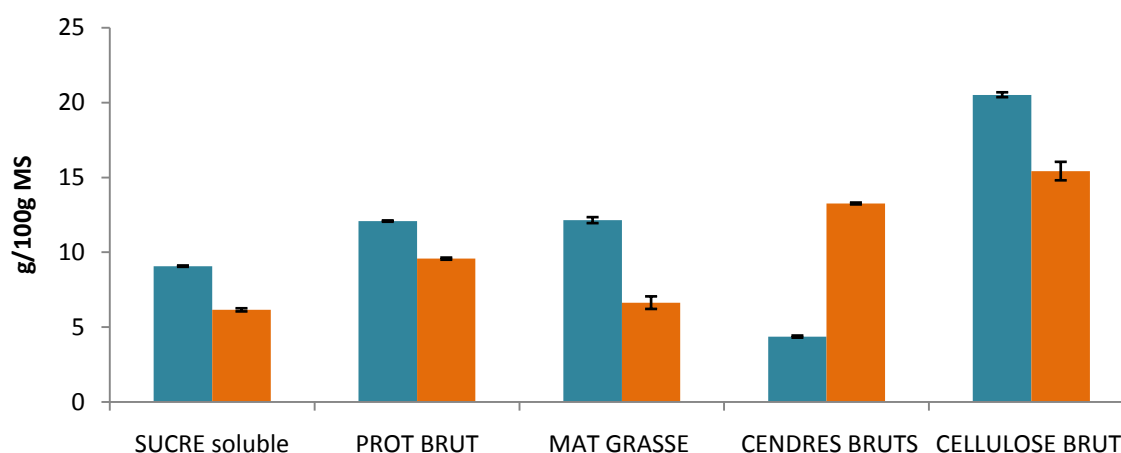


Figure 28 : Composition chimique globale de la sauge (■) et du laurier (■)

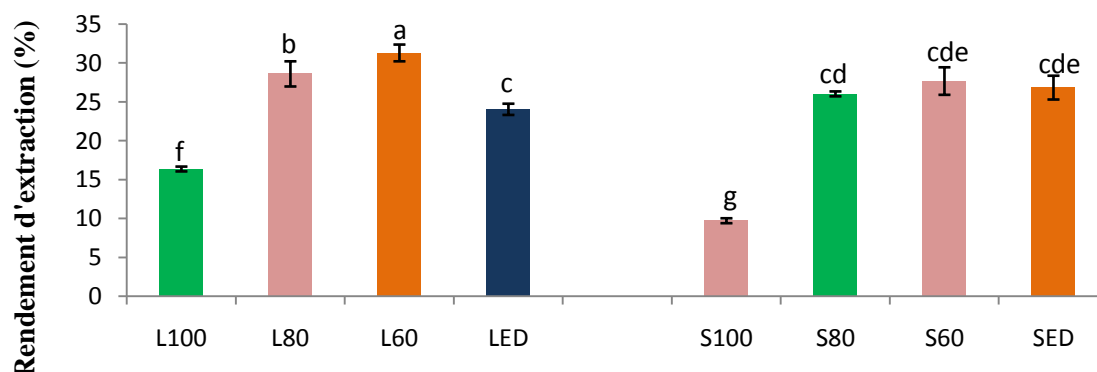
### II.2. Le rendement d'extraction

Les rendements d'extraction (Figure 29) varient de 9.7% à 31.5% et dépendent ( $p < 0.05$ ) des facteurs mis en jeu.

Pour chacune des deux plantes, la substitution partielle ou totale de l'éthanol par l'eau distillée s'accompagne d'une augmentation du rendement d'extraction de 8 à 48% pour le laurier et de 3 à 65% pour la sauge.

La présence de l'éthanol dans le solvant induit un rendement plus élevé pour le laurier, par contre l'utilisation de l'eau distillée seule s'accompagne d'un rendement plus élevé dans la sauge par rapport au laurier.

Le rendement le plus élevé est enregistré pour les feuilles de laurier extraites avec de l'éthanol 60% alors que pour la sauge, nous ne notons pas de différence significative ( $p > 0.05$ ) entre les extraits aqueux et hydro-alcooliques.



**Figure 29 : Taux d'extraction des composés phénoliques**

- LED : Extrait aqueux du laurier, L60 : Extrait éthanolique 60% du laurier, L80 : Extrait éthanolique 80% du laurier, L100 : extrait éthanolique pur du laurier, SED : Extrait aqueux de sauge, S60 : Extrait éthanolique 60% de sauge, L80 : Extrait éthanolique 80% de sauge, L100 : extrait éthanolique pur de sauge.
- Les barres verticales représentent les écarts types
- Les mêmes lettres ne présentent pas de différences significatives entre elles ( $p > 0,05$ ).

### II.3. Teneur en composés phénoliques :

L'expérimentation a mis en jeu deux facteurs : le facteur plante (sauge et laurier) et le facteur solvant d'extraction (eau distillée, éthanol 60%, éthanol 80% et éthanol 100%).

#### II.3.1. Teneur en phénols totaux solubles :

Les résultats de dosage des phénols totaux solubles obtenus (Figure 30) révèlent une variabilité de teneur entre les différents extraits.

L'analyse de la variance de la teneur montre un effet significatif ( $P < 0.05$ ) du facteur solvant et une interaction entre les deux facteurs étudiés (plante et solvant).

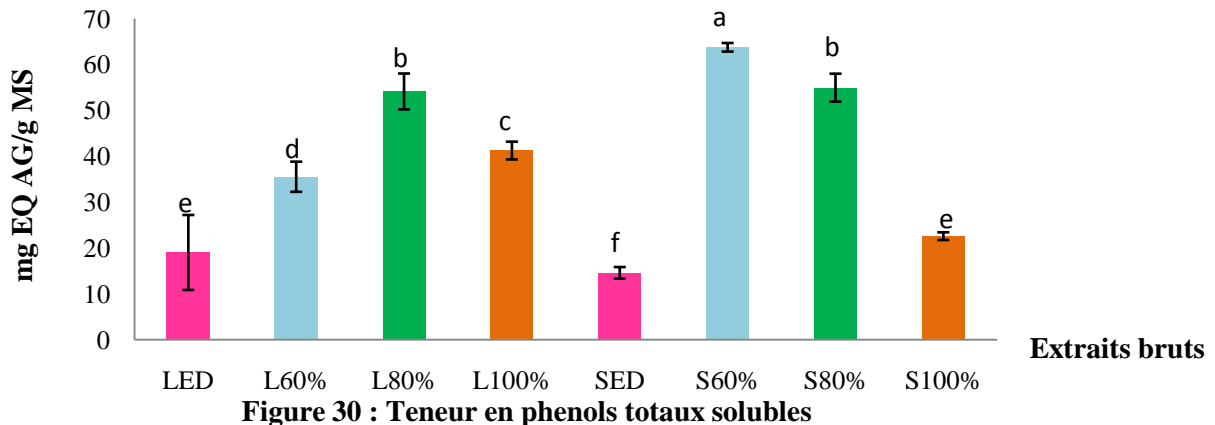


Figure 30 : Teneur en phénols totaux solubles

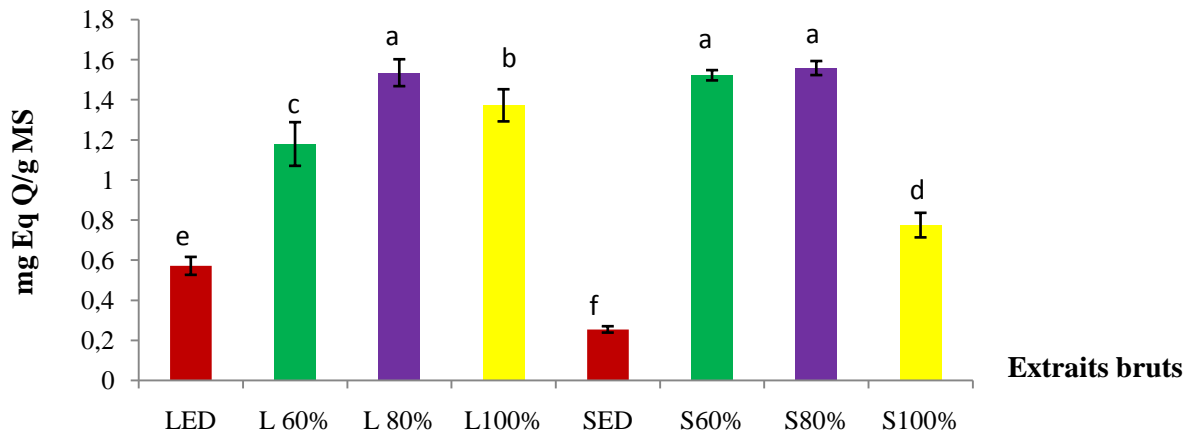
- LED : Extrait aqueux du laurier, L60 : Extrait éthanolique 60% du laurier, L80 : Extrait éthanolique 80% du laurier, L100 : extrait éthanolique pur du laurier, SED : Extrait aqueux de sauge, S60 : Extrait éthanolique 60% de sauge, L80 : Extrait éthanolique 80% de sauge, L100 : extrait éthanolique pur de sauge.
- Les barres verticales représentent les écarts types
- Les mêmes lettres ne présentent pas de différences significatives entre elles ( $p > 0,05$ ).

La substitution partielle ou totale de l'eau s'accompagne d'une meilleure solubilisation des phénols totaux solubles de chacune des deux plantes. Nous relevons des augmentations de 16 à 184 % pour le laurier et 16 à 338 % pour la sauge. Nous notons aussi que l'optimum d'extraction est atteint avec l'éthanol 80% pour le laurier et l'éthanol 60% pour la sauge.

La comparaison multiple des moyennes classe ces dernières en six groupes homogènes. C'est l'extrait éthanolique de sauge (S60%) qui affiche la plus forte teneur en phénols totaux solubles (63.76 mg Eq AG/g MS) suivi du L80 et S80 (54.12 et 54.95 mg EqAG/gMS respectivement ;avec  $P > 0.05$ ).

### II.3.2. Teneur en flavonoïdes

L'analyse statistique des résultats illustrés dans la Figure 31 montre que les teneurs en flavonoïdes des extraits dépendent aussi bien du facteur plante que du solvant d'extraction ( $p < 0.05$ ).



**Figure 31: Teneur en flavonoïdes**

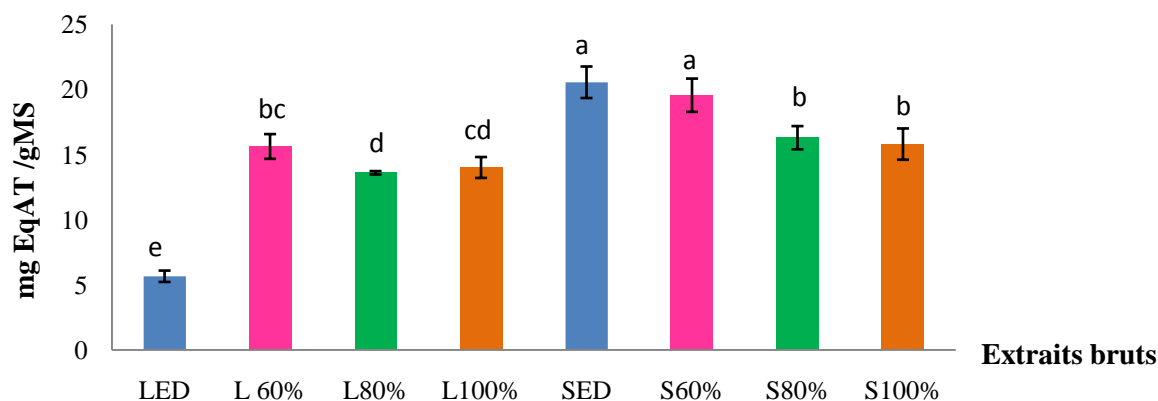
- LED : Extrait aqueux du laurier, L60 : Extrait éthanolique 60% du laurier, L80 : Extrait éthanolique 80% du laurier, L100 : extrait éthanolique pur du laurier, SED : Extrait aqueux de sauge, S60 : Extrait éthanolique 60% de sauge, L80 : Extrait éthanolique 80% de sauge, L100 : extrait éthanolique pur de sauge.
- Les barres verticales représentent les écarts types
- Les mêmes lettres ne présentent pas de différences significatives entre elles ( $p > 0,05$ ).

L'incorporation de l'éthanol dans le solvant d'extraction augmente de 106% à 512% la solubilisation des flavonoïdes des plantes utilisées avec des plus fortes améliorations de solubilisation notées pour la sauge.

Les extraits L80, S60 et S80 sont les plus riches en flavonoïdes. Ces teneurs varient de 1,52 à 1,52 mg EqQ/g MS. Ce sont les extraits aqueux qui donnent les plus faibles teneurs (0,25 et 0,5752 mg EqQ/gMS) pour la sauge et laurier respectivement.

### II.3.3. Teneur en Tanins hydrolysables :

Les résultats présentés dans la Figure 32 montrent que la sauge est plus riche en tanins hydrolysables que le laurier quelque soit le solvant utilisé.



**Figure 32 : Teneur en tanins Hydrolysables**

- LED : Extrait aqueux du laurier, L60 : Extrait éthanologique 60% du laurier, L80 : Extrait éthanologique 80% du laurier, L100 : extrait éthanologique pur du laurier, SED : Extrait aqueux de sauge, S60 : Extrait éthanologique 60% de sauge, L80 : Extrait éthanologique 80% de sauge, L100 : extrait éthanologique pur de sauge.
- Les barres verticales représentent les écarts types
- Les mêmes lettres ne présentent pas de différences significatives entre elles ( $p > 0,05$ ).

L'extrait aqueux du laurier renferme la plus faible quantité (5.65mgEq AT/gMS) en tanins hydrolysables alors que pour la sauge, la teneur la plus élevée (20.54mgEq AT/gMS) est observée en milieu aqueux .

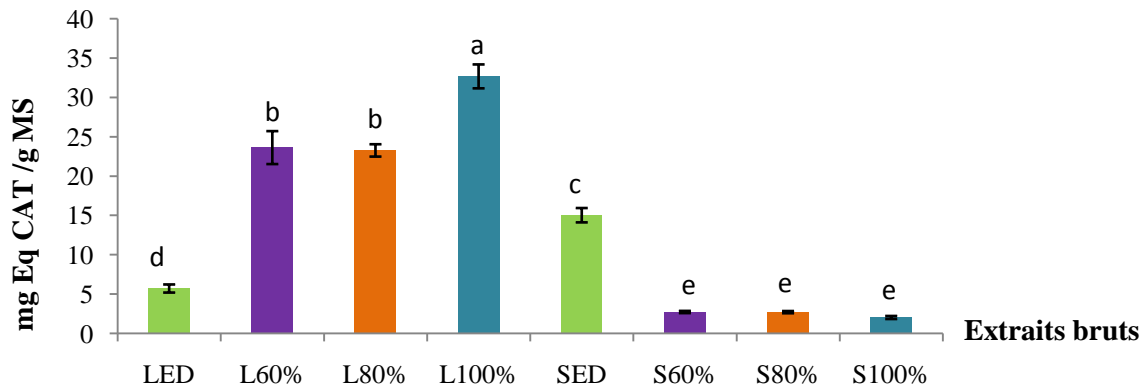
Les solvants ont le même effet sur l'évolution de la teneur en tanins hydrolysables dans les deux plantes. L'extrait éthanologique 60% contient la quantité la plus élevée dans laurier (15.61mg EqAT/gMS) ; cette dernière est 2.76 et 1.11 plus élevée que celle d'extrait aqueux et éthanologique 100% respectivement.

Pour la sauge, l'extrait aqueux et éthanologique60% sont 1.30 et 1.23 fois plus riches que l'extrait éthanologique100%.

### II.3.4. Teneur en Tanins condensés

La variabilité des teneurs en tanins condensés (Figure 33) traduit un effet significatif ( $p < 0.05$ ) des deux facteurs : plante et solvant, pour le laurier la présence d'éthanol s'accompagne d'une augmentation de teneur en tanins condensés (1.5 à 470 %) alors que pour la sauge, nous notons le phénomène inverse (baisse de 0.65-448%) par rapport à l'extrait aqueux.

Ce sont les extraits éthanoliques du laurier qui présentent les teneurs les plus élevées (23.26 à 32.66 mgEq CAT/gMS). Nous notons que le SED est plus riche que le LED (15 contre 5.72 mgEq CAT/gMS respectivement).



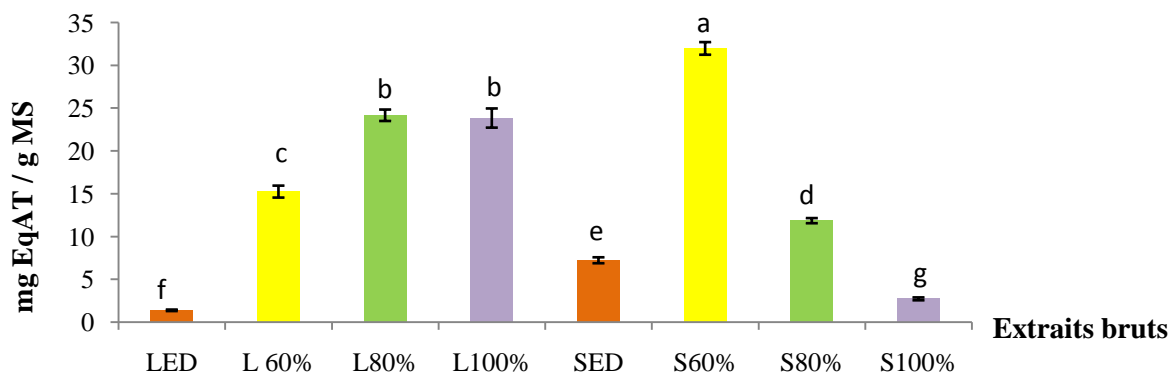
**Figure 33: Teneur en tanins condensés**

- LED : Extrait aqueux du laurier, L60 : Extrait éthanolique 60% du laurier, L80 : Extrait éthanolique 80% du laurier, L100 : extrait éthanolique pur du laurier, SED : Extrait aqueux de sauge, S60 : Extrait éthanolique 60% de sauge, L80 : Extrait éthanolique 80% de sauge, L100 : extrait éthanolique pur de sauge.
- Les barres verticales représentent les écarts types
- Les mêmes lettres ne présentent pas de différences significatives entre elles ( $p > 0,05$ ).

### II.3.5. Teneur en tanins précipités par la BSA :

Le dosage des tanins précipité par la BSA de chacun des extraits montre une variabilité de teneurs (Figure 34).

L'extrait aqueux du laurier se caractérise par la plus faible teneur en tanins précipitant (1.36 mg EqAT/gMS) ; la plus grande teneur étant observée dans l'extrait éthanolique 60 % de sauge (31.97 mgEqAT/gMS).



**Figure 34 : Teneur en tanins précipités par la BSA**



- LED : Extrait aqueux du laurier, L60 : Extrait éthanolique 60% du laurier, L80 : Extrait éthanolique 80% du laurier, L100 : extrait éthanolique pur du laurier, SED : Extrait aqueux de sauge, S60 : Extrait éthanolique 60% de sauge, L80 : Extrait éthanolique 80% de sauge, L100 : extrait éthanolique pur de sauge.
- Les barres verticales représentent les écarts types
- Les mêmes lettres ne présentent pas de différences significatives entre elles ( $p > 0,05$ ).

L'analyse statistique de nos résultats montre un effet hautement significatif ( $P < 0,05$ ) aussi bien de la plante que du solvant.

L'extrait aqueux de sauge est 5.3 fois plus riche en tanins précipités par la BSA que celui du laurier alors que l'extrait éthanolique 100 % du laurier 8.82 fois plus riche que celui de la sauge. L'extrait éthanolique 60% de la sauge renferme une quantité en tanins précipités par la BSA soit 2.09 fois plus élevée que celui du laurier obtenu avec le même solvant. Nous observons le phénomène inverse pour les extraits de ces mêmes plantes obtenu avec l'éthanol 80%.

Les teneurs en phénols non précipités par la BSA varient d'un extrait à un autre. Elles sont de 2.89 à 6.06 mg EqAG /g MS pour la sauge et 6 à 16.79 mg Eq AG/g MS pour le laurier. La Figure 35 montre que ces teneurs représentent 5.8 à 26.9% des phénols totaux solubles de sauge, et de 14.05 à 40.5% des phénols totaux solubles du laurier.

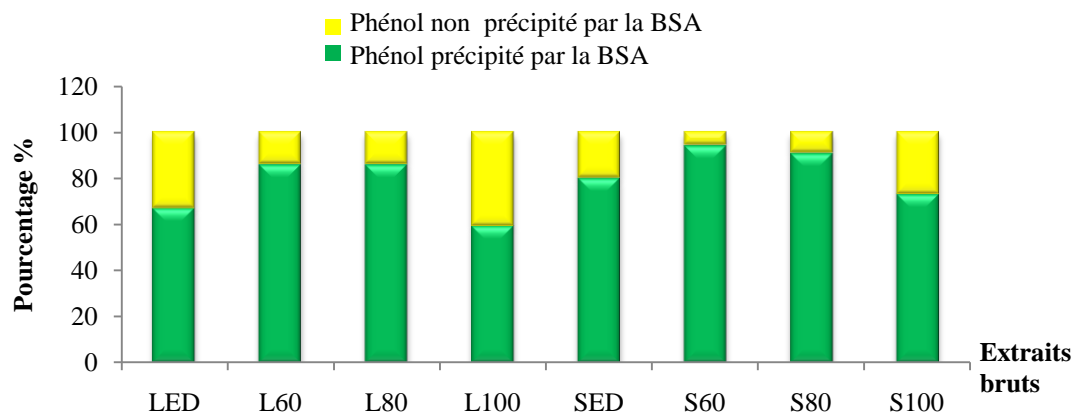


Figure 35: Teneur en phénols précipité par la BSA en % de PTS .

- LED : Extrait aqueux du laurier, L60 : Extrait éthanolique 60% du laurier, L80 : Extrait éthanolique 80% du laurier, L100 : extrait éthanolique pur du laurier, SED : Extrait aqueux de sauge, S60 : Extrait éthanolique 60% de sauge, L80 : Extrait éthanolique 80% de sauge, L100 : extrait éthanolique pur de sauge.

## II.4. Résultats du Screening chimique:

Le résultat du criblage phytochimique qualitatif est résumé dans le Tableau V. Divers composés bioactifs sont identifiés dans les extraits : les saponines (Figure 36 a et b). Les extraits du laurier (Figure 36a) ont donné des quantités de mousse beaucoup plus importantes que ceux de sauge (Figure 36b). Les extraits éthanoliques purs des deux plantes semblent contenir moins de saponines que les autres extraits.

Tableau V : Résultats du screening phytochimique des extraits.

	Saponines	Alcaloïdes	Terpénoïdes
LED	++	+/-	-
L60%	++	+	+
L80	++	+	+
L100%	+	+	+
SED	+	-	-
S60%	+	-	+
S80%	+	-	+
S100%	+/-	-	+

+ : présence de composé ; ++ : présence en abondance, - : absence de composé, +/- : réaction louche

LED : Extrait aqueux du laurier, L60 : Extrait éthanolique 60% du laurier, L80 : Extrait éthanolique 80% du laurier, L100 : extrait éthanolique pur du laurier. SED : Extrait aqueux de sauge, S60 : Extrait éthanolique 60% de sauge, L80 : Extrait éthanolique 80% de sauge, L100 : extrait éthanolique pur de sauge.

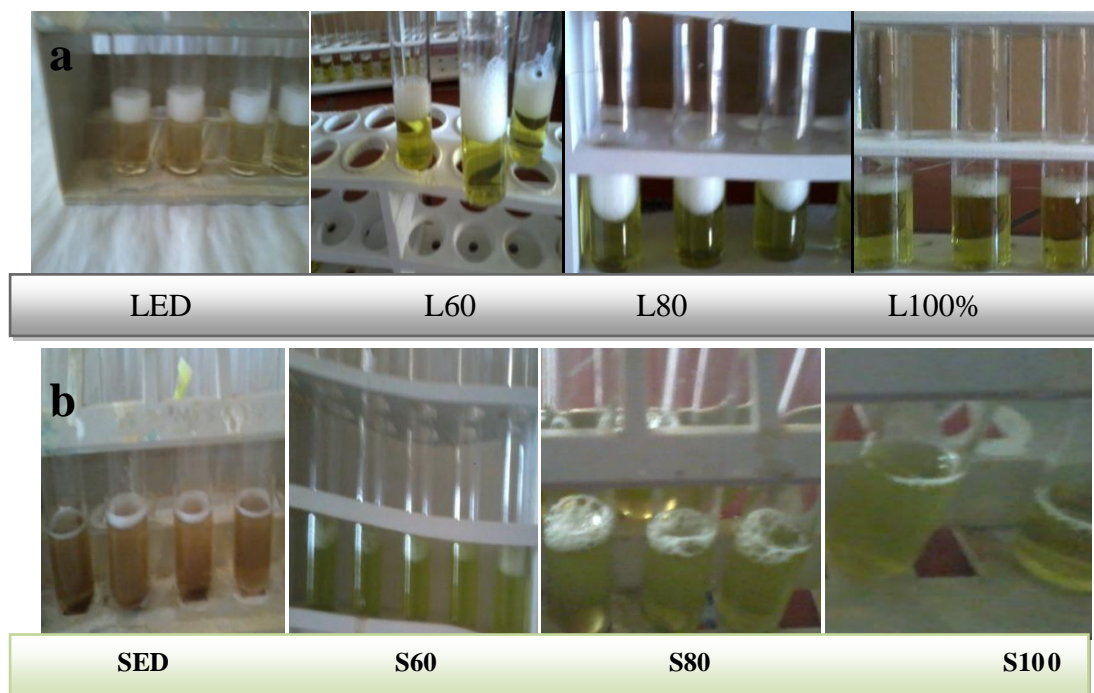
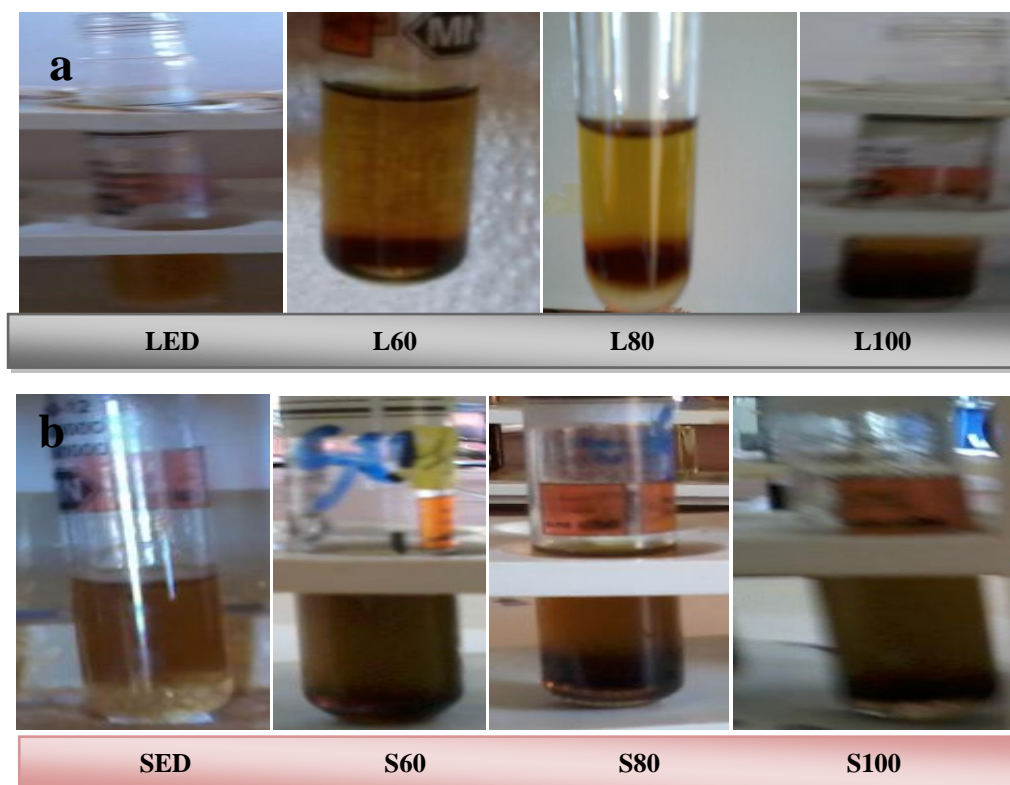


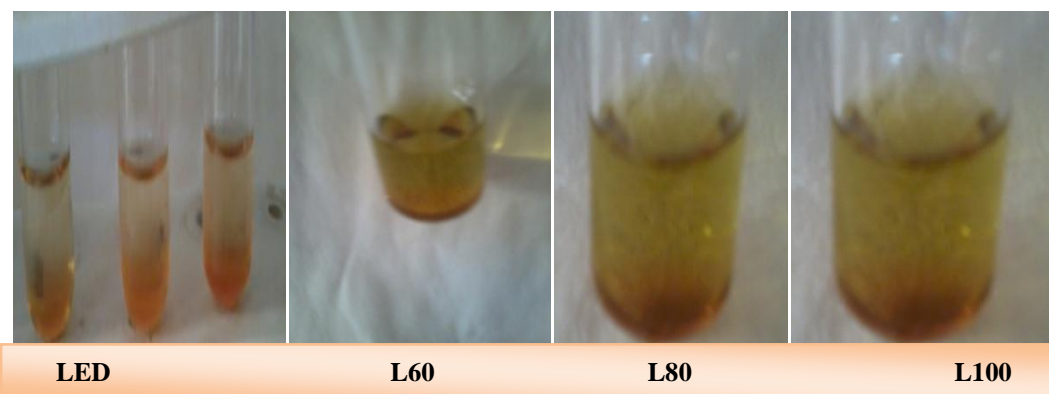
Figure 36 :Mise en évidence des saponines dans les extraits du laurier(a)et de Sauge(b).

Les terpénoïdes sont détectés dans les extraits éthanoliques des deux plantes (Figure 37).



**Figure 37 : Mise en évidence des terpénoïdes dans les extraits du laurier(a) et de sauge(b)**

Les alcaloïdes sont uniquement détectés dans les extraits du laurier (Figure 38)



**Figure 38 : photos de mise en évidence des alcaloïdes dans les extraits du Laurier.**

## II.5. Fractionnement des composés par CCM

Pour identifier les familles moléculaires présentes dans les extraits bruts, un criblage phytochimique par CCM a été réalisé. C'est une technique appréciée en phytochimie car elle

fournit une empreinte chromatographique des extraits étudiés et un grand nombre d'échantillons peut être analysé simultanément. De plus, des révélateurs spécifiques aux familles moléculaires ou à des activités biologiques peuvent être appliqués après la séparation, indiquant directement la présence ou non de molécules bioactives (Marston, 2011).

Dans notre cas, nous avons utilisé différents systèmes phase mobile associée à différents révélateurs moléculaires dans le but d'identifier des composés éventuels contenus dans ces extraits. Le Rapport frontal (RF) des molécules a été calculé, pour une phase stationnaire et une phase mobile données, il correspond au rapport entre la distance parcourue par le composé et celle parcourue par l'éluant. Un RF faible est caractéristique d'une molécule qui a peu migré (donc proche de la ligne de dépôt), alors qu'un RF élevé est caractéristique d'une molécule qui a fortement migré (proche du front de migration), avec une forte affinité pour la phase mobile.

Pour chacune des plantes de cette étude (*Laurus nobilis* et *Salvia officinalis*), nous disposons de quatre extraits nommés LED (extrait aqueux du laurier), L60 (extrait éthanolique 60% du laurier), L80 (extrait éthanolique 80% du laurier) et L100 (extrait éthanolique 100% du laurier) pour le laurier et SED (extrait aqueux de sauge), S60 (extrait éthanolique 60% de sauge), S80 (extrait éthanolique 80% de sauge) et S100 (extrait éthanolique 100% de sauge) pour la sauge.

### **II.5.1 Analyse des chromatogrammes par CCM**

L'analyse chromatographique des différents extraits a mis en évidence la présence de spots dont le nombre varie en fonction des échantillons testés et du système d'éluion utilisé. Ces spots se distinguent entre eux par la valeur du rapport frontal (RF) et leur coloration avant et après révélation.

#### **II.5.1.1. Caractérisation dans le système Acétate d'éthyle**

Les résultats illustrés par le Tableau VI mettent en évidence 10 fractions notées FA1 à FA10 inégalement réparties entre les différents extraits : six fractions sont observées pour le laurier contre six pour la sauge. Seules les fractions FA1, FA3 sont communes aux deux plantes.

Pour le laurier la fraction FA1 se retrouve uniquement dans les extraits éthanoliques, il en est de même pour FA1, FA7 et FA10 pour la sauge. Ces fractions se caractérisent par une valeur de RF variable (0.37 à 0.99) et des colorations différentes.

Le criblage chimique en CCM a permis de mettre en évidence la présence de fractions non phénoliques révélées par le test de la vanilline-acide sulfurique et de Libermann et Burchard. Il s'agirait des stéroïdes (FA1 et FA3) et de terpènes (FA10).

Les stéroïdes invisibles à l'œil nu et sous UV (254nm), affichent une coloration bleu-vert (FA1 et FA3) et des valeurs de RF variables (0.37 et 0.53). Ces composés se caractérisent tous par une fluorescence sous UV à 365 nm avec le réactif de Libermann et Burchard.

Les terpènes (RF de 0,99) révélés uniquement dans les extraits ethanoliques de sauge (S60, S80 et S100), sont de couleur grisâtre (œil nu et sous UV 254 nm) et violet (après révélation à la vanilline-acide sulfurique).

Les fractions phénoliques révélées par les différents tests CCM regroupent deux classes de composés :

- Des fractions de type flavonoïdes (FA4 et FA5) mises en évidence par le test avec le chlorure d'Aluminium (coloration jaune à l'œil nu). Ces fractions sont observées uniquement avec les extraits de sauge.
- Des fractions de type tanin (FA6, FA8, FA9) qui apparaissent après révélation à la vanilline-acide sulfurique en rouge-rose. Elles sont présentes uniquement dans chacun des extraits du laurier. Ces fractions se distinguent entre elles par des valeurs de RF allant de 0.81 à 0.99.

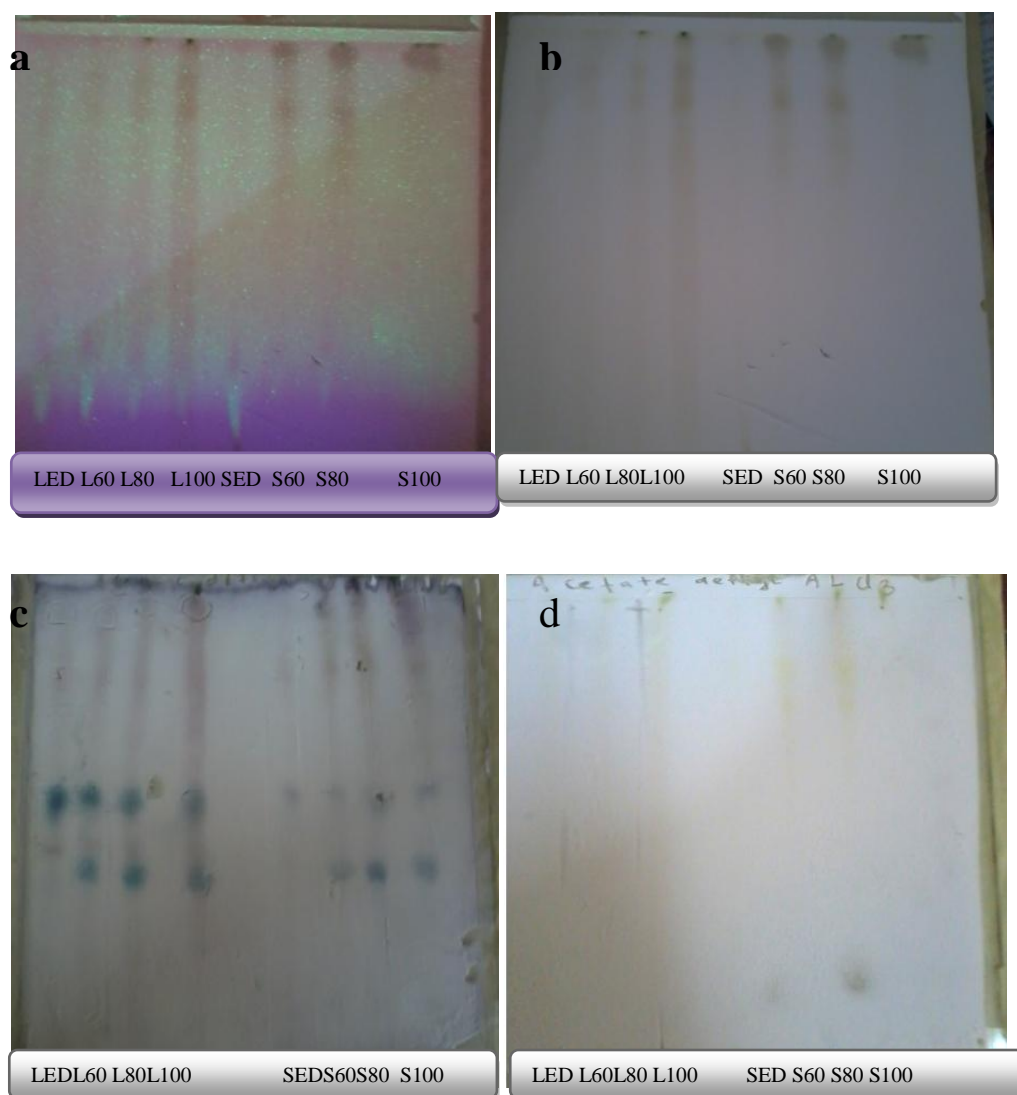
**Tableau VI** : Résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits du laurier et de sauge dans le système Acétate d'éthyle /acide formique/acide acétique /eau

	RF	Œil nu	Sous UV254	Vanilline-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	AlCl <sub>3</sub>	Lieberman Burchard	LED	L60	L80	L100	SED	S60	S80	S100	Composé probable
FA1	0.37	Invisible	Invisible	Bleu-vert clair		Fluorescente sous UV 365	-	+	+	+	-	+	+	+	Stéroïde
FA2	0.43	Invisible	Invisible	mauve			+	+	+	+	-	-	-	-	Non identifié
FA3	0.53	Invisible	invisible	Bleu-vert		Fluorescente sous UV 365	+	+	+	+	trace	Trace	Trace	trace	Stéroïde
FA4	0.76	Beigeclair	Brun clair	Vert pistache	Jaune		-	-	-	-	-	+	+	-	Flavonoïde
FA5	0.81	Beige	Brun	Vert pistache clair	Jaune foncé		-	-	-	-	+	+	+	-	Flavonoïde
FA6	0.81	Beige	Brun	Rosâtre foncé			+	+	+	+	-	-	-	-	Tanin
FA7	0.83	Invisibles	Invisible	Mauve			-	-	-	-	-	+	+	+	Non identifié
FA8	0.86	Beige	Marron-verdâtre	Rose clair			+	+	+	+	-	-	-	-	Tanin
FA9	0.99	Beige	Mauve clair	rouge			+	+	+	+	-	-	-	-	Tanin
FA10	0.99	Gris	Gris clair	Violet			-	-	-	-	-	+	+	+	Terpène

+ : présence ; - : absence.

LED : extrait aqueux du laurier ; L60 : extrait éthanolique 60% du laurier ; L80: extrait éthanolique 80% du laurier, L100: extrait éthanolique 100% du laurier. SED: extrait aqueux de sauge ; S60: extrait éthanolique 60% de sauge ; S80: extrait éthanolique 80% de sauge, S100: extrait éthanolique 100% de sauge.

Les résultats d'éluition à l'acétate d'éthyle des extraits bruts par CCM sont présentés dans la Figure 39.



**Figure 39:**Chromatogrammes des extraits de sauge photographiés sous la lampe UV à 254nm (a) , à la lumière du jour (b), après révélation avec la vanilline –acide sulfurique (c)et après révélation avec le AlCl<sub>3</sub> (d) .

Nous avons notés que tous les standards utilisés sont totalement entrainés par l'éluant (acétate d'éthyle).

**II.5.1.2. Caractérisation dans le système dichlorométhane/méthanol/eau (75/25/2)**

Le Tableau VII résume les principales caractéristiques (RF et coloration) des standards utilisés. Nous notons une variabilité de la valeur du RF (0.022 à 0.89) et de la couleur des spots obtenus.

**Tableau VII: Résultats de la chromatographie sur couche mince des standards utilisés sur gel de silice, dichlorométhane/méthanol/eau (75/25/2).**

<b>Standard</b>	<b>RF</b>	Couleur à l'œil nu	Couleur Sous UV 365nm
Acide Tannique	0.022	Beige	Gris clair
Acide Rosmarinique	0.22	Gris clair	Vert pistache
Rutine	0.36	Jaune	Mauve foncé
Acide Caféique	0.38	Beige	Bleu fluorescent
Acide Ferrulique	0.53	Invisible	Fluorescence bleu clair
Acide p-Coumarique	0.55	Beige clair	Mauve
Catéchine	0.76	Orange clair	Rose clair
Quercétine	0.89	Jaune	Violet foncé

L'élution des plaques par le dichlorométhane /méthanol/eau (75/25/2) révèle la présence de 81 spots répartis en 21 fractions (numérotés de FD1 à FD21) selon la valeur du RF et la coloration (Tableau VIII).



**Tableau VIII:** Résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits de sauge et laurier dans le système dichlorométhane/méthanol/eau (75/25/2).

	RF	œil nu	UV365	AlCl <sub>3</sub>	Vanilline-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Lieberman Burchard	LED	L60	L80	L100	SED	S60	S80	S100	Composé probable
FD1	0	Jaune	Fluorescence jaune	jaune	miel		-	-	-	-	+	+	+	+	Flavonoïde
FD2	0	Crème orangé	brun		Rouge foncé		+/-	+	+	+	-	-	-	-	Tanin
FD3	0.022	beige	Gris clair		Rose clair		-	+	+	+	-	-	-	-	Acide tannique
FD4	0.055	Beige	mauve	Jaune	Gris		-	-	-	-	+	+	+	+	Flavonoïde
FD5	0.22	invisible	invisible		Bleu-vert	Fluorescence sous UV 365 nm	+/-	+	+	+	-	-	-	-	Stéroïde
FD6	0.22	Gris-clair	Vert pistache				-	-	-	-	-	+	+	+	Acide Rosmarinique
FD7	0.29	Invisible	Brun clair		Rose		+/-	+	+	+	-	-	-	-	Tanin
FD8	0.36	Invisible	invisible		Bleu-vert	Fluorescence sous UV 365 nm	+	+	+	+	+	+	+	+	Stéroïde
FD9	0.36	Jaune	Mauve foncé	Jaune fluorescent sous UV365 nm			-/+	+	+	+	-	-	-	-	Rutine

FD10	0.38	beigeclair	Bleu fluorescent				-	-	-	-	-	+	+	-	Acide caféique
FD11	0.444	Jaune	Brun	Jaune			-	-	-	-	-	+	+	+	Flavonoïde
FD12	0.48	Jaune	Brun	Jaune fluorescent sous UV 365nm			-	+	+	+	-	-	-	-	Flavonoïde
FD13	0.53	Invisible	Fluorescence bleu clair				-	-	-	-	-	+	+	+	Acide Ferrulique
FD14	0.55	beige clair	mauve		Crevette		+	+	+	+	-	-	-	-	Acide p-Coumarique
FD15	0.63	Invisible	invisible	Jaune			-	-	-	-	-	+	+	+	Flavonoïde
FD16	0.67	invisible	Invisible		Rosâtre		-	-	-	-	-	+	+	+	Tanin
FD17	0.78	invisible	Brun	Jaune fluorescent sous UV 365nm			+	+	+	+	-	-	-	-	Flavonoïde
FD18	0.83	invisible	Brun	Jaune			-	+	+	+	-	-	-	-	Flavonoïde
FD19	0.89	Jaune pâle	Violet	Jaune sous UV 365 Jaune à l'œil nu			-	+	+	+	-	+	+	+	Quercétine

FD20	0.93	invisible	Brun	Orange sous UV Jaune à l'œil nu			-	+	+	+	-	+	+	+	Flavonoïde
FD21	0.96	verte	Rose	-	Violet		-	-	-	-	-	+	+	+	Terpène

+ : présence du composé.

- : absence du composé.

+/- : réaction louche.

LED : extrait aqueux du laurier ; L60 : extrait éthanolique 60 du laurier ; L80 : extrait éthanolique 80 du laurier, L100 : extrait éthanolique 100 du laurier ;

SED : extrait aqueux de sauge ; S60 : extrait éthanolique 60 de sauge ; S80 : extrait éthanolique 80 de sauge, S100: extrait éthanolique 100 de sauge.

L'analyse globale des données obtenues sur plaque CCM (à l'œil nu, sous UV et après révélation chimique) met en évidence la présence de stéroïdes (FD5 et FD8) aussi bien chez le laurier que la sauge ; cette dernière se caractérise aussi par la présence de terpènes (FD21). Les 18 fractions restantes sont de nature phénolique et se répartissent comme suit :

- Deux fractions phénoliques communes aux deux plantes : FD19 et FD20.
- huit fractions propres au laurier : FD2, FD3, FD7, FD9, FD12, FD14, FD17 et FD18.
- huit fractions propres à la sauge : FD1, FD4, FD6-FD10, FD11, FD13, FD15 et FD16.

Malgré des RF différents, 10 fractions affichent la couleur caractéristique des flavonoïdes particulièrement après révélation au chlorure d'Aluminium (FD1, FD4, FD9, FD11, FD12, FD15, FD17, FD18, FD19, FD20).

Sur les 10 fractions de type flavonoïdes relevées, seules deux ont été identifiées : la fraction FD9 se caractérise par un RF (0.36) et une coloration jaune (à l'œil nu et après révélation avec le  $AlCl_3$ ) et s'identifie à la rutine utilisée comme standard. Elle est observée uniquement dans les extraits de laurier.

La fraction FD19, présente aussi bien chez la sauge que le laurier, affiche les mêmes caractéristiques que le standard quercétine (RF=0.89). Elle n'est présente que dans les extraits obtenus en présence d'éthanol.

Les huit autres fractions sont inégalement réparties entre les deux plantes :

- Une fraction non identifiée FD20 présente aussi bien dans les extraits du laurier que de la sauge : RF=0.93
- Des fractions présentes seulement chez la sauge : FD1 (RF=0), FD4 (RF=0.055), FD11 (0.444), FD15 (0.63).

Des fractions recensées uniquement chez le laurier : FD12 (0.48), FD17 (0.78), FD18 (0.83).

Les fractions FD2 et FD7 (Laurier) et FD16 (Sauge) s'apparentent à des tannins. Le RF varie de 0 (FD2) à 0.67 (FD16). Seules les fractions FD2 ne migrent pas. Notons que la fraction FD16 n'est observée que pour les extraits éthanoliques de sauge.

La fraction FD3 détectée dans les extraits éthanoliques du laurier, présente les mêmes caractéristiques de l'acide tannique (beige à l'œil nu et gris clair sous UV 365nm et RF égale à 0,022).

La fraction FD6 de RF (0.22) détectée dans les extraits éthanoliques de sauge caractérisée par une couleur gris-clair à l'œil nu et vert pistache sous UV 365nm, présente les mêmes caractéristiques que l'acide rosmarinique.

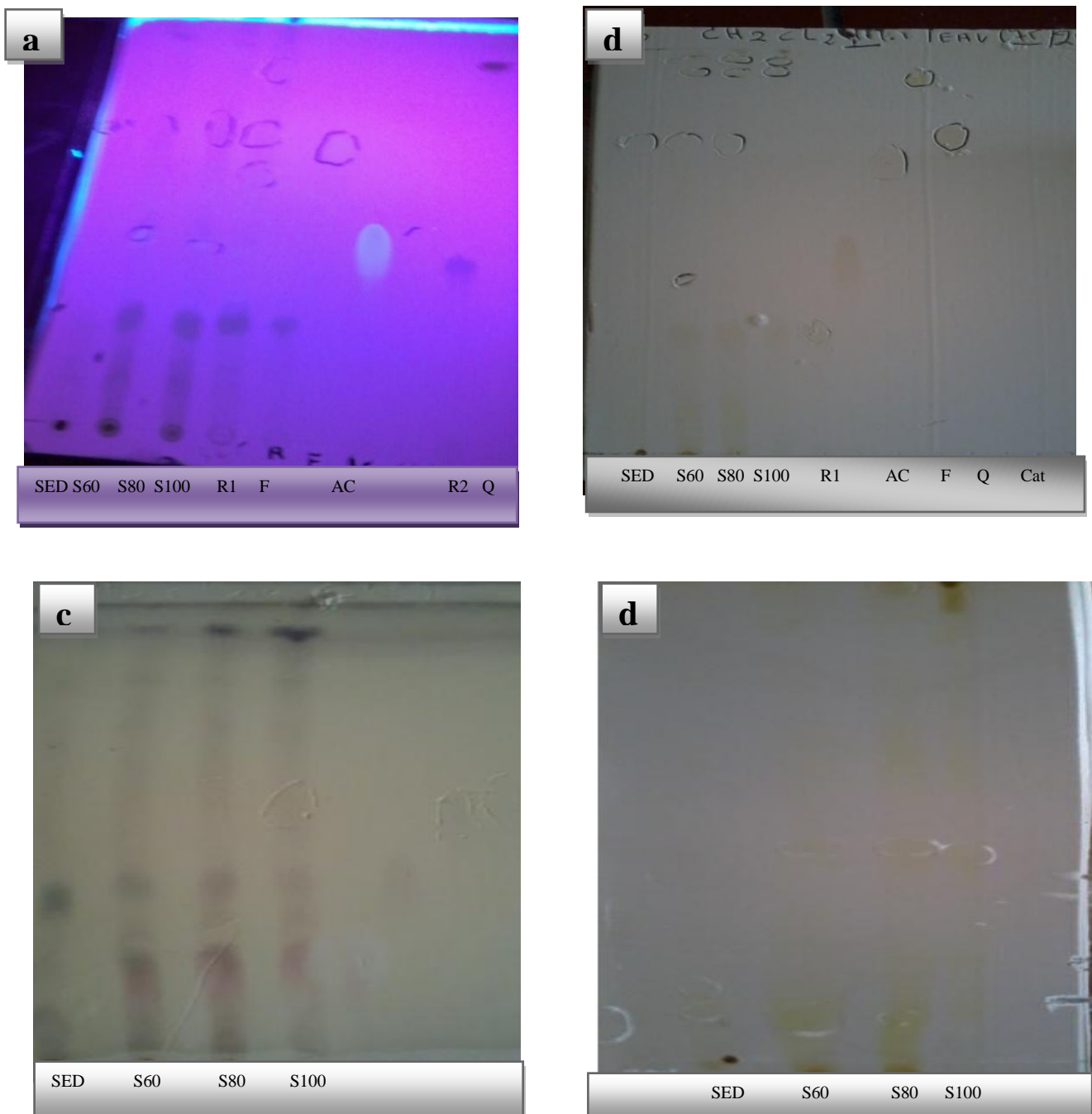
La Fraction FD10 détectée dans les extraits S60 et S80 de sauge présente les mêmes caractéristiques que l'acide caféique (une Fluorescence bleu claire sous la lampe UV 365nm et un RF égale à 0,38).

La fraction FD13 de RF (0,53) détectée dans les extraits éthanolique de sauge caractérisée par une fluorescence bleu clair sous UV 365nm, présente les mêmes caractéristiques que l'acide ferrulique.

La fraction FD14 de RF (0,55) détectée dans les extraits du laurier, caractérisée par une couleur mauve sous UV 365nm, présente les mêmes caractéristiques que l'acide p - coumarique .

Les extraits éthanoliques des deux plantes semblent contenir plus de composés que les extraits aqueux. Les résultats montrent une grande variabilité en teneur des molécules entre les extraits aqueux et éthanoliques pour une même plante.

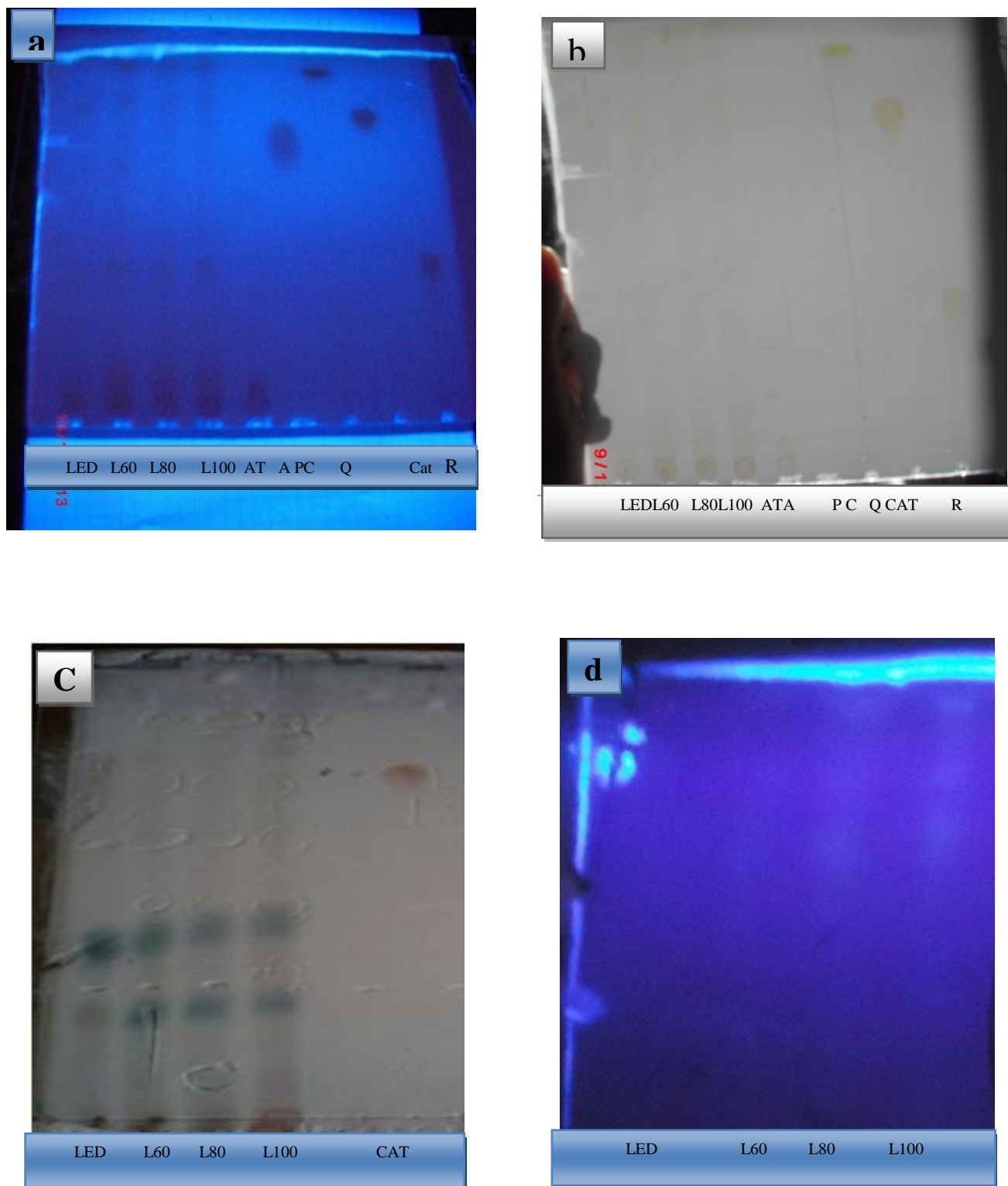
Les résultats d'élution au dichlorométhane/méthanol/eau des extraits bruts par CCM sont présentés dans les Figures 40(sauge) et 41(laurier ).



**Figure 40: Chromatogrammes des extraits de sauge photographiés sous la lampe UV à 365nm (a) à la lumière du jour (b), après révélation avec la vanilline –acide sulfurique (c) et après révélation avec le  $AlCl_3$  (d).**

R1 :acide rosmarinique ,F :acide ferrulique ,AC :acide cafeique ,R2 :rutine ,Q :quercetine ,cat :catéchine

LED : extrait aqueux du laurier ; L60 : extrait éthanolique 60 du laurier ; L80 : extrait éthanolique 80 du laurier,  
L100 : extrait éthanolique 100 du laurier ; SED : extrait aqueux de sauge ; S60 : extrait éthanolique 60 de sauge ;  
S80 : extrait éthanolique 80 de sauge, S100: extrait éthanolique 100 de sauge



**Figure 41 :Chromatogrammes des extraits du laurier photographiés sous la lampe UV à 365nm (a) à la lumière du jour (b), après révélation avec la vanilline –acide sulfurique (c) et après révélation avec l’AlCl3 (d).**

AT :acide tannique, APC : Acide p-coumarique, Q :quercétine, Cat :catéchine, R :rutine

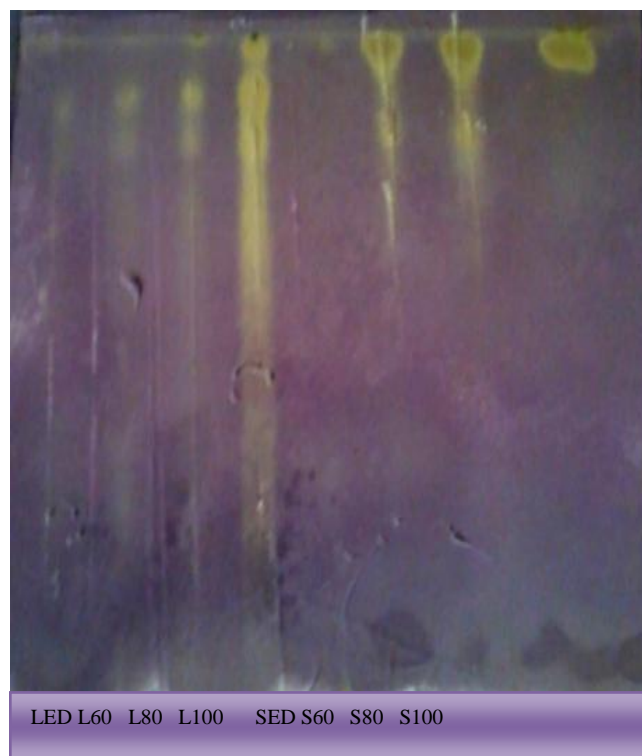
LED : extrait aqueux du laurier ; L60 : extrait éthanolique 60 du laurier ; L80 : extrait éthanolique 80 du laurier, L100 : extrait éthanolique 100 du laurier ; SED : extrait aqueux de sauge ; S60 : extrait éthanolique 60 de sauge ; S80 : extrait éthanolique 80 de sauge, S100: extrait éthanolique 100 de sauge

### II.5.1.3. Test du DPPH sur plaque CCM

La révélation de la plaque par la solution méthanolique de DPPH est une CCM de criblage qui permet l'obtention de renseignements supplémentaires sur l'activité antioxydante des différents composants des extraits testés. L'apparition de taches jaunes sur fond violet traduit la présence de composés actifs capables de réduire le radical DPPH.

Le traitement au DPPH des plaques CCM éluées à l'acétate d'éthyle (Figure 42), le traitement avec la solution de DPPH, révèle quelques constituants à activité anti-radicalaire. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas pu mettre en évidence des activités franches des différentes fractions. Nous relevons un mélange de spots jaunes et de bandelettes jaunâtres selon l'extrait de plante considéré.

Pour la sauge, les fractions FA10(RF 0.99) .FA8(RF 0.86) et FA4 (RF0.76) sont visualisées sous forme de spots jaunes alors que pour le basilic, nous observons un spot plus diffus des fractions FA6 (RF 0.81) et FA8 (RF 0.86). D'autres constituants à activité anti-radicalaire apparaissent mais plus sous forme de bandelettes plus ou moins marquées.



**Figure 42: Test de l'activité anti-radicalaire au DPPH sur plaque CCM (10mg/ml) .**



LED : extrait aqueux du laurier ; L60 : extrait éthanolique 60 du laurier ; L80 : extrait éthanolique 80 du laurier, L100 : extrait éthanolique 100 du laurier ; SED : extrait aqueux de sauge ; S60 : extrait éthanolique 60 de sauge ; S80 : extrait éthanolique 80 de sauge, S100: extrait éthanolique 100 de sauge

Sur les plaques CCM obtenues après élution au dichlorométhane (Figure 43), nous avons noté pour chacune des deux plantes trois phénomènes :

- Mise en évidence de spots de couleur jaune intense sur la ligne de base au niveau des fractions qui n'ont pas migré. Ils sont relevés pour tous les extraits testés.
- Présence de zones d'activités franches contre le DPPH de couleur jaune sur un fond violet. Cette observation relevée uniquement pour les extractions en présence d'éthanol, est à l'actif des fractions FD6(sauge) et FD9 (laurier) assimilées selon leurs RF 0,22 et 0,36 respectivement à de l'acide rosmarinique et de la rutine.
- Apparition de bandelettes de couleur jaunâtre et clairsemées le long de la ligne de migration de chacun des quatre extraits des deux plantes.



**Figure43 : Test de l'activité anti-radicalaire au DPPH sur plaque CCM(10mg/ml).**

LED : extrait aqueux du laurier ; L60 : extrait éthanolique 60 du laurier ; L80 : extrait éthanolique 80 du laurier, L100 : extrait éthanolique 100 du laurier ; SED : extrait aqueux de sauge ; S60 : extrait éthanolique 60 de sauge ; S80 : extrait éthanolique 80 de sauge, S100: extrait éthanolique 100 de sauge

Les neufs fractions testés pour leur activité antioxydante (activité anti-radicalaire du DPPH et le pouvoir réducteur du fer) sont présentées dans le Tableau IX.

Tableau IX : Les fractions récupérées pour l'activité antioxydantes.

Plante	Système d'éluion	Fraction	RF	Composé probable
Sauge	Système Dichlorométhane	FD4	0.055	Flavonoïde
Sauge		FD5	0.22	Acide Rosmarinique
Sauge		FD13	0.53	Acide ferrulique
Sauge		FD16	0.67	Tanin
Sauge	Système Acétate d'éthyle	FA4	0.76	Flavonoïde
Sauge		FA5	0.81	Flavonoïde
Laurier	Système Dichlorométhane	FD9	0.36	Rutine
Laurier		FD14	0.55	Acide p-Coumarique
Laurier		FD19	0.89	Quercétine

## II.6. Résultats d'activité antioxydante *in vitro* :

### II.6.1. Activité anti radicalaire du DPPH :

#### II.6.1.1. Activité anti-radicalaire du DPPH des extraits bruts:

La réduction du radical libre DPPH par les extraits dépend aussi bien de la plante que du solvant d'extraction utilisé ( $P < 0.05$ ). Les résultats obtenus sont illustrés dans la Figure 44.

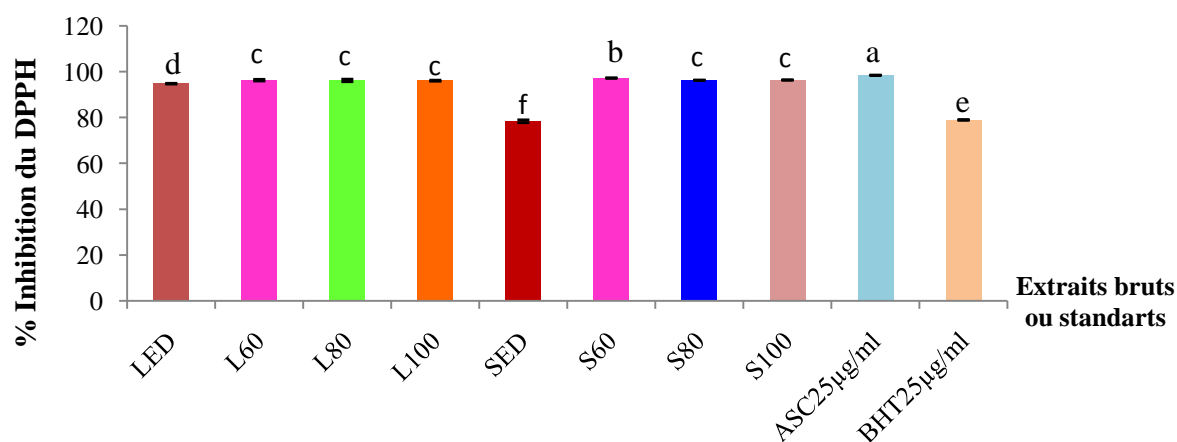


Figure 44 : Activité antiradicalaire du DPPH des extraits bruts

- LED : Extrait aqueux du laurier, L60 : Extrait éthanolique 60% du laurier, L80 : Extrait éthanolique 80% du laurier, L100 : extrait éthanolique pur du laurier, SED : Extrait aqueux de sauge, S60 : Extrait éthanolique 60% de sauge, L80 : Extrait éthanolique 80% de sauge, L100 : extrait éthanolique pur de sauge.
- Les barres verticales représentent les écarts types
- Les mêmes lettres ne présentent pas de différences significatives entre elles ( $p > 0,05$ ).

Nos résultats expérimentaux montrent que l'activité anti-radicalaire de l'acide ascorbique (98.51%) est supérieure à celle du BHT (79.10%) utilisé à une concentration de 25 µg/ml. Pour les autres extraits, elle est supérieure à celle de la BHT.

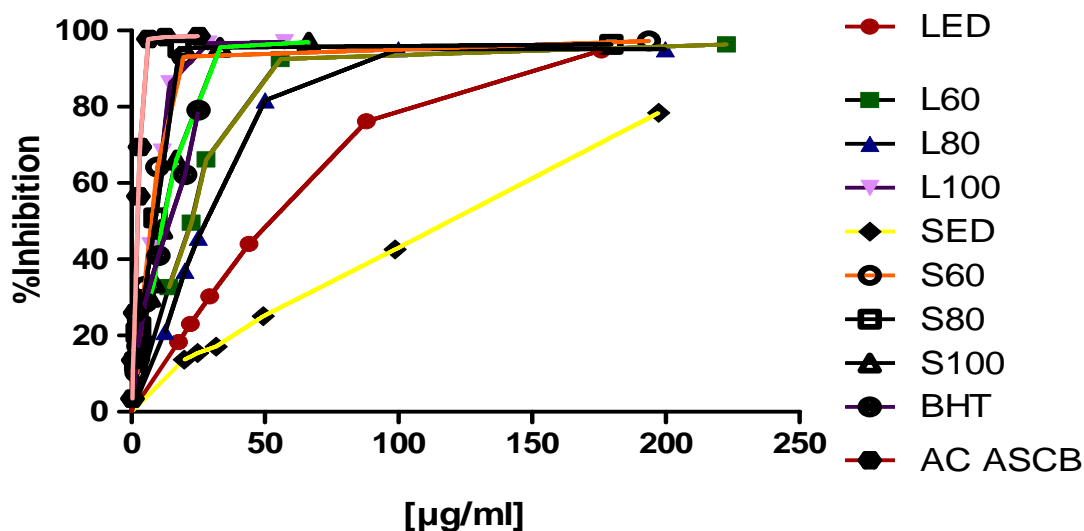
Dans nos conditions expérimentales, seul l'extrait aqueux SED présente une activité (78.42%) inférieure ( $P < 0.05$ ) à celle du BHT. Quoique supérieure ( $P < 0.05$ ) à celle du BHT, l'activité des autres extraits demeure inférieure à celle enregistrée avec l'acide ascorbique ( $p < 0,05$ ).

La réduction du radical libre DPPH dépend de l'extrait utilisé ( $P < 0.05$ ). La comparaison multiple des moyennes révèle la présence de six groupes homogènes : trois extraits de laurier (L100, L80 et L60) et deux extraits de sauge (S80 et S100) manifestent un effet scavenger similaire (96.13 à 96.41%).

La Figure 45 montre l'effet de la concentration des extraits sur le pouvoir anti-radicalaire.

Les extraits de laurier (L100) et de sauge (S60, 80 et 100) manifestent une augmentation brusque du pourcentage d'inhibition du DPPH suivie d'un plateau. Nos données analytiques montrent que l'optimum de l'effet scavenger des extraits est atteint dans les faibles concentrations avec L100, S60, S80 et S100. Ces concentrations s'élèvent à 28.6 µg/ml pour L100 et varient de 17.94 à 55.64 µg/ml pour les extraits de sauge.

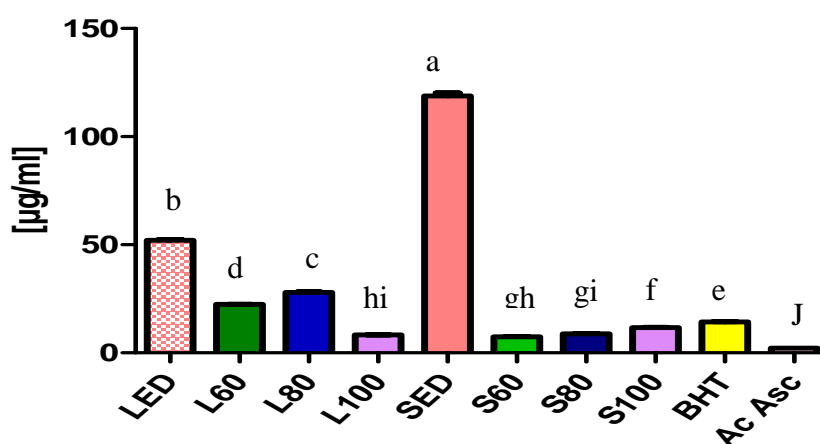
A l'exception de SED (optimum non atteint dans nos conditions), les autres extraits affichent une augmentation plus modérée avec l'élévation des concentrations d'extraits.



**Figure 45: Effet de la concentration des extraits et standards sur l'activité anti radicalaire du DPPH**

- LED : Extrait aqueux du laurier, L60 : Extrait éthanolique 60% du laurier, L80 : Extrait éthanolique 80% du laurier, L100 : extrait éthanolique pur du laurier, SED : Extrait aqueux de sauge, S60 : Extrait éthanolique 60% de sauge, L80 : Extrait éthanolique 80% de sauge, L100 : extrait éthanolique pur de sauge.

Les IC<sub>50</sub> déterminées (Figure 46) montrent que ce sont les extraits éthanoliques de sauge et L100 de laurier qui présentent des IC<sub>50</sub> les plus faibles. Donc un pouvoir anti radicalaire plus élevé.



**Figure 46: IC<sub>50</sub> des différents échantillons contre le radical DPPH**

- LED : Extrait aqueux du laurier, L60 : Extrait éthanolique 60% du laurier, L80 : Extrait éthanolique 80% du laurier, L100 : extrait éthanolique pur du laurier, SED : Extrait aqueux de sauge, S60 : Extrait éthanolique 60% de sauge, L80 : Extrait éthanolique 80% de sauge, L100 : extrait éthanolique pur de sauge.

- Les barres verticales représentent les écarts types

- Les mêmes lettres ne présentent pas de différences significatives entre elles ( $p > 0,05$ ).

Les IC 50 de tous les extraits sont plus grandes que celle de l'acide ascorbique. Quatre extraits (L100,S60,S80,S100) se caractérisent par une IC50 inférieure ( $P < 0,05$ ) à celle du BHT (14.25 $\mu$ g/ml) pris comme standard également : il s'agit des extraits S100 (11.7 $\mu$ g/ml), S80 (8,8 $\mu$ g/ml), S60 (7.5 $\mu$ g/ml) et L100 (8.25 $\mu$ g/ml).

Les IC50 des extraits aqueux des deux plantes sont plus élevés que celles des autres extraits ; leur pouvoir anti radicalaire est aussi plus faible que les autres extraits éthanoliques. L'IC50 de l'extrait aqueux de sauge (118.9 $\mu$ g/ml) est de 2.28 fois plus grand que celle du laurier (52  $\mu$ g/ml). L'activité anti radicalaire est inversement proportionnelle à la valeur IC50.

#### **II.6.1.2. Activité anti radicalaire du DPPH des fractions:**

Le criblage chimique en CCM a mis en évidence 118 spots repartis en 31 fractions au total. L'activité antioxydante des fractions a concerné uniquement celles qui sont de nature phénoliques qui sont au nombre de neuf. Leur codification en fonction de la plante, du solvant et d'éluant est rapportée dans le Tableau X.

L'activité antioxydante de ces fractions est comparée à celle de différents standards (composés purs du commerce).

Nous distinguons les groupes de fraction suivants :

**Sauge** : quatre fractions obtenues après élution au dichlorométhane.

**Sauge** : deux fractions obtenues après élution à l'acétate d'éthyle.

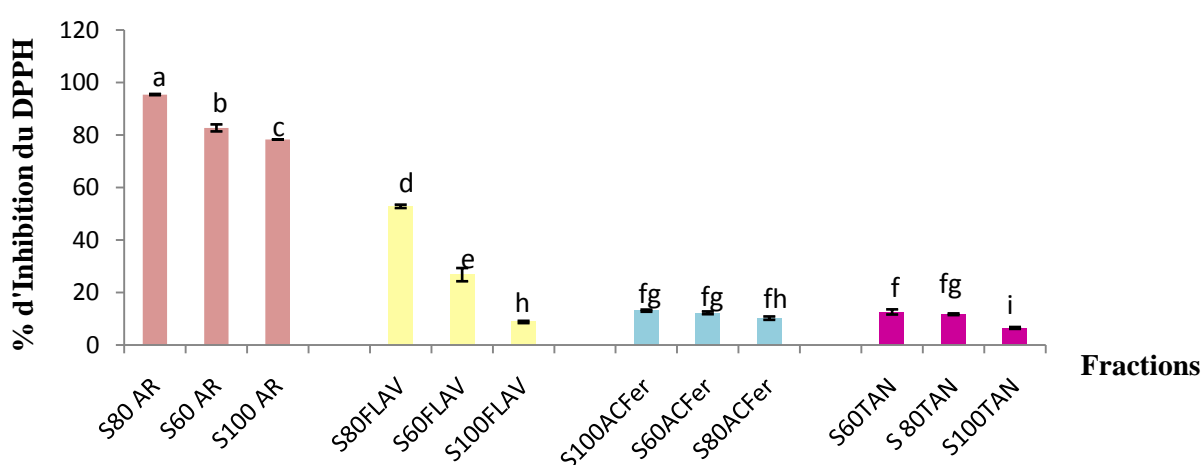
**Laurier** : Trois fractions obtenues après élution au dichlorométhane

Tableau X: Codification des fractions utilisées dans l'activité antioxydante des différents extraits.

Plante	Système	Fraction	RF	Composé probable	Codification des fractions dans les différents extraits			
					Eau distillé	Ethanol 60	Ethanol 80	Ethanol 100
sauge	Dichlorométhane	FD4	0.055	Flavonoïde		S60 FLAV	S80 FLAV	S100 FLAV
sauge	Dichlorométhane	FD5	0.22	Acide Rosmarinique		S60 AR	S80 AR	S100 AR
sauge	Dichlorométhane	FD13	0.53	Acide Ferrulique		S60 AcFer	S80 AcFer	S100 AcFer
sauge	Dichlorométhane	FD16	0.67	Tanin		S60 TAN	S80 TAN	S100 TAN
Sauge	Acétate d'éthyle	FA4	0.76	Flavonoïde		S60 RF=0.76	S80 RF=0.76	
Sauge	Acétate d'éthyle	FA5	0.81	Flavonoïde		S60 RF=0.81	S80 RF=0.81	
Laurier	Dichlorométhane	FD9	0.36	Rutine	LED Rut	L60 RUT	L80 RUT	L100 RUT
Laurier	Dichlorométhane	FD14	0.55	Acidep-Coumarique	LED APC	L60 APC	L80 APC	L100 APC
Laurier	Dichlorométhane	FD19	0.89	Quercétine	LED Q	L60 Q	L80 Q	L100 Q

### II.6.1.2.1. Activité anti-radicalaire du DPPH des fractions de sauge dans le système dichlorométhane :

L'activité antiradicalaire comparée des fractions issues des extraits de sauge (l'éluion au dichlorométhane) est résumée dans la Figure 47. Ce sont les fractions assimilées à l'acide rosmarinique qui manifestent les forts pouvoirs inhibiteurs du DPPH (78.24 à 95.36%). Ce dernier varie de 8.72 à 52.78% pour la fraction type flavonoïde (RF=0.055). Le pourcentage d'inhibition du DPPH par les fractions d'acide ferrulique (RF=0.53) et tanin (RF=0.67) est faible et oscille entre 6.44% et 13.03%.



**Figure 47 : Activité anti-radicalaire du DPPH des fractions de sauge (dichlorométhane).**

Les mêmes lettres ne présentent pas de différences significatives entre elles ( $p > 0,05$ ).

La comparaison de l'activité des différentes fractions à celle des standards utilisés et de l'extrait correspondant est illustrée par la Figure 48 (a-b-c).

Globalement, toutes les fractions testées affichent un pouvoir anti-radicalaire du DPPH inférieur ( $P < 0.05$ ) aussi bien à celui de l'extrait brut correspondant qu'à ceux des standards utilisés.

La seule particularité relevée concerne la fraction rosmarinique de l'extrait S80. Quoique inférieur de peu, celui de l'extrait brut S80 (96.35%), nous notons que le pouvoir anti-radicalaire (95.36%) de cette fraction (S80AR) est comparable à celui de l'acide rosmarinique (0.1 mg/ml), acide tannique (1mg/ml) et catéchine (0.1mg/ml) (95.10%) et supérieur à celui de l'acide ferrulique, rutine (93.93% et 94.28% respectivement).

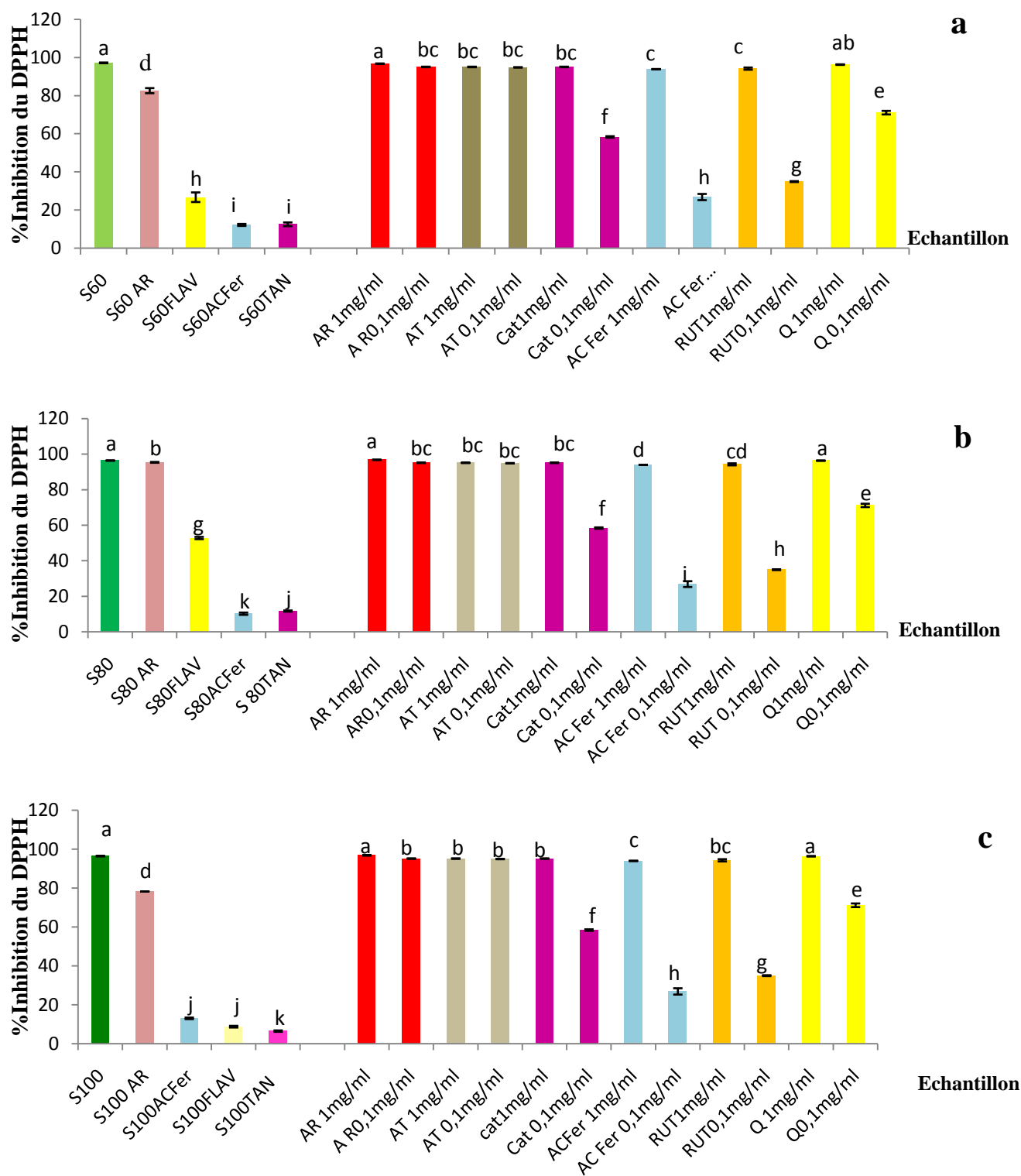


Figure 48 : Activité antiradicalaire du DPPH des fractions S60 (a), S80 (b) et S100(c) dans le système dichlorométhane.

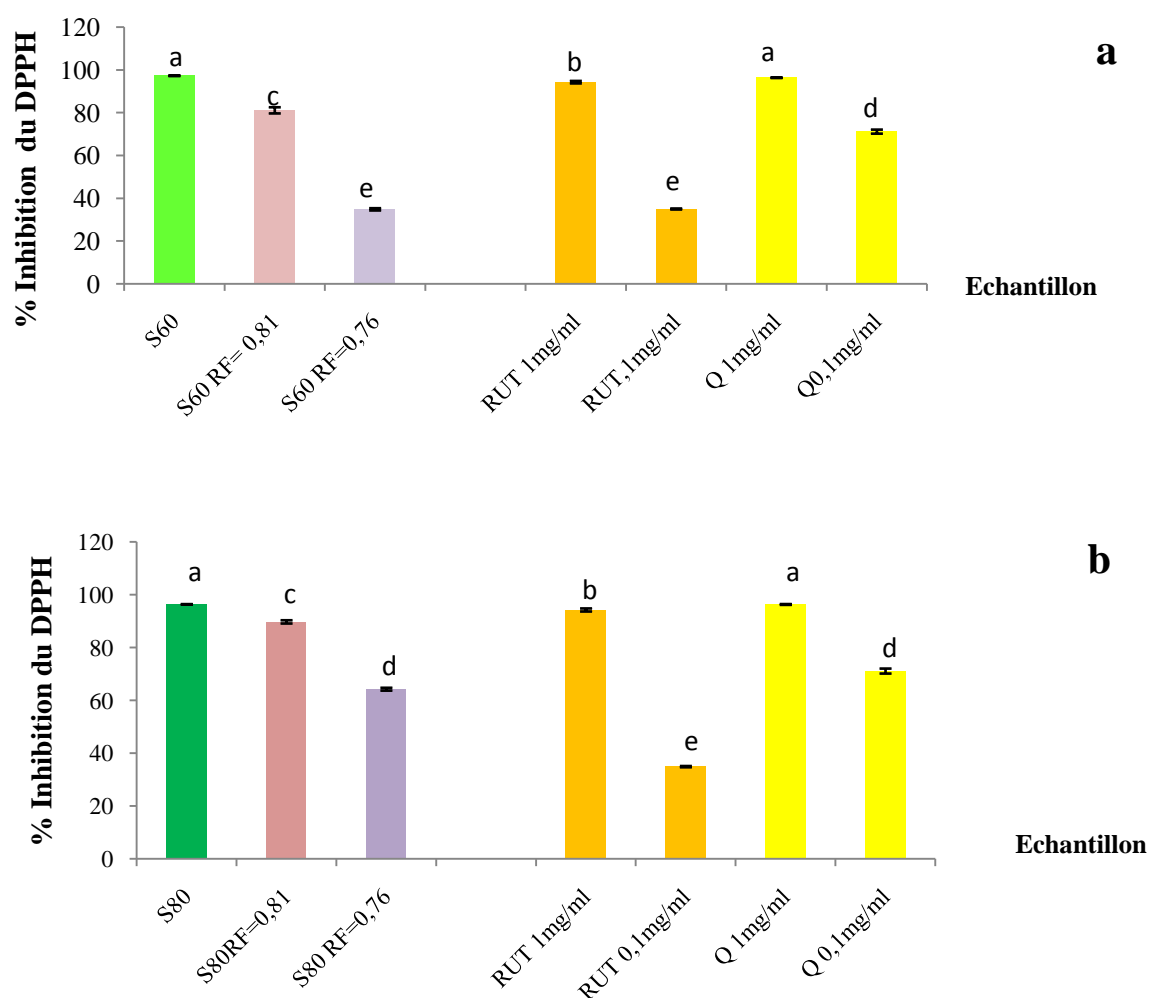
Les mêmes lettres ne présentent pas de différences significatives entre elles (p>0,05).



### II.6.1.2.2. Activité anti-radicalaire du DPPH de fraction de sauge dans le système acétate d'éthyle

Chacune des deux fractions de type flavonoïdes (RF=0.76 et 0.81) isolées de chacun des extraits S60 et S80 présentent une activité plus faible que celles de l'extrait brut correspondant et des standards (quercétine et rutine) utilisés à raison de 1mg/ml (Figure 49a et b).

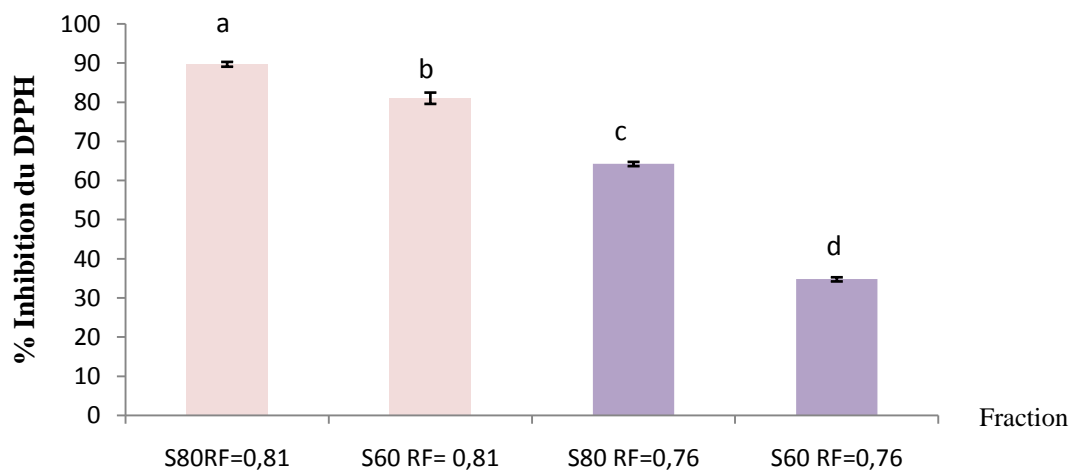
La fraction S60 flavonoïde (RF=0.81) est plus active que ces mêmes standards aux doses de 0.1 mg/ml, alors que la fraction avec RF= 0.76 se compare à l'activité de la rutine (0.1 mg/ml).



**Figure 49: Activité antiradicalaire du DPPH par les fractions de S60 (a) et S80 (b) dans le système Acétate d'éthyle.**

Les mêmes lettres ne présentent pas de différences significatives entre elles ( $p > 0,05$ ).

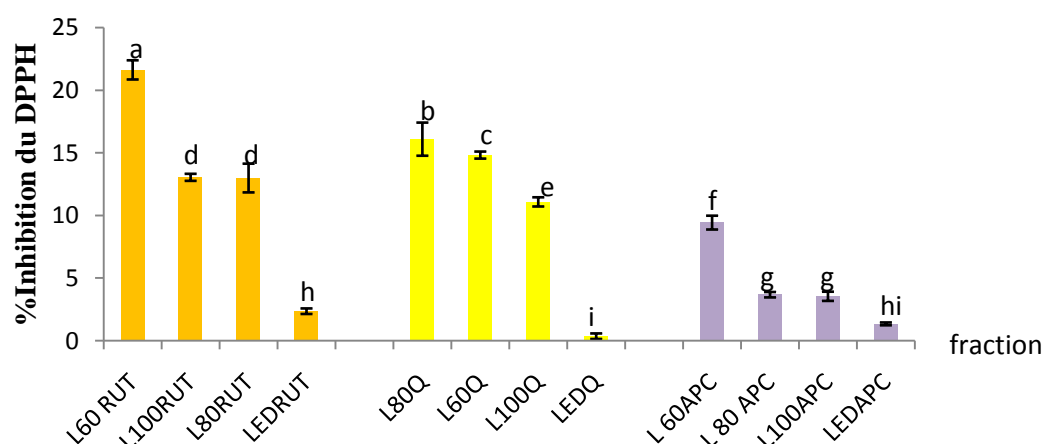
L'activité de ces fractions varie en fonction du solvant d'extraction et du RF correspondant. Les fractions à RF de 0.81 plus actives que celles à RF de 0.76 (Figure 50). Pour un même RF, les fractions issues des extraits S80 présentent un pouvoir inhibiteur du DPPH supérieur ( $P < 0.05$ ) à celles obtenues à partir des extraits S60.



**Figure 50: activité anti-radicalaire du DPPH des fractions de sauge dans le système Acétate d'éthyl.**

### II.6.1.2.3. Activité anti radicalaire du DPPH des fractions de laurier dans le système dichlorométhane:

L'activité anti- radicalaire du DPPH comparé des trois fractions issues des extraits de laurier est résumée dans la Figure 51.



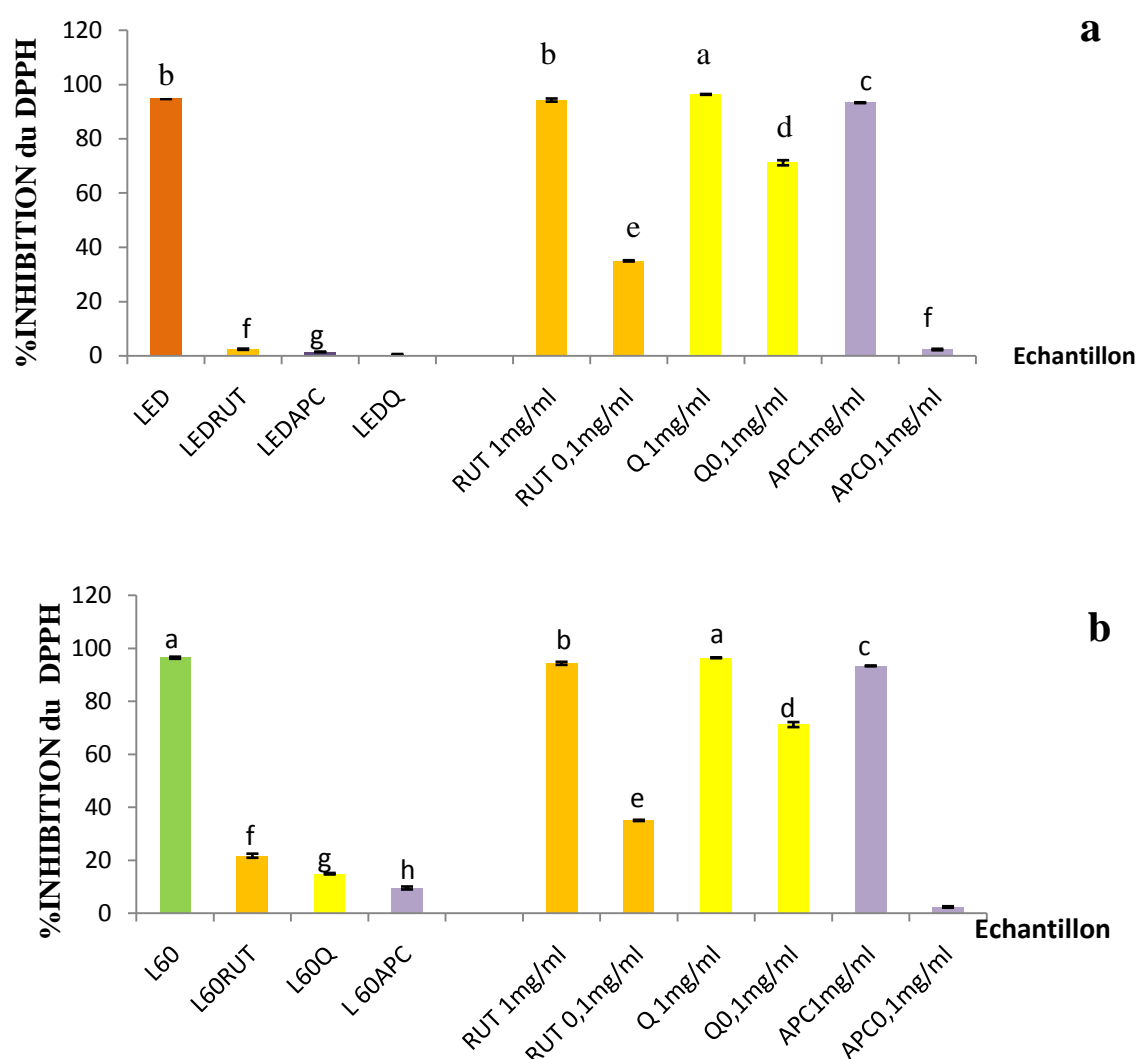
**Figure 51: activité anti-radicalaire du DPPH de fraction du laurier**

Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p > 0.05$ ).

Les fractions assimilées à la rutine et quercétine manifestent une activité anti-radicalaire du DPPH faible mais plus élevée que celles des autres fractions.

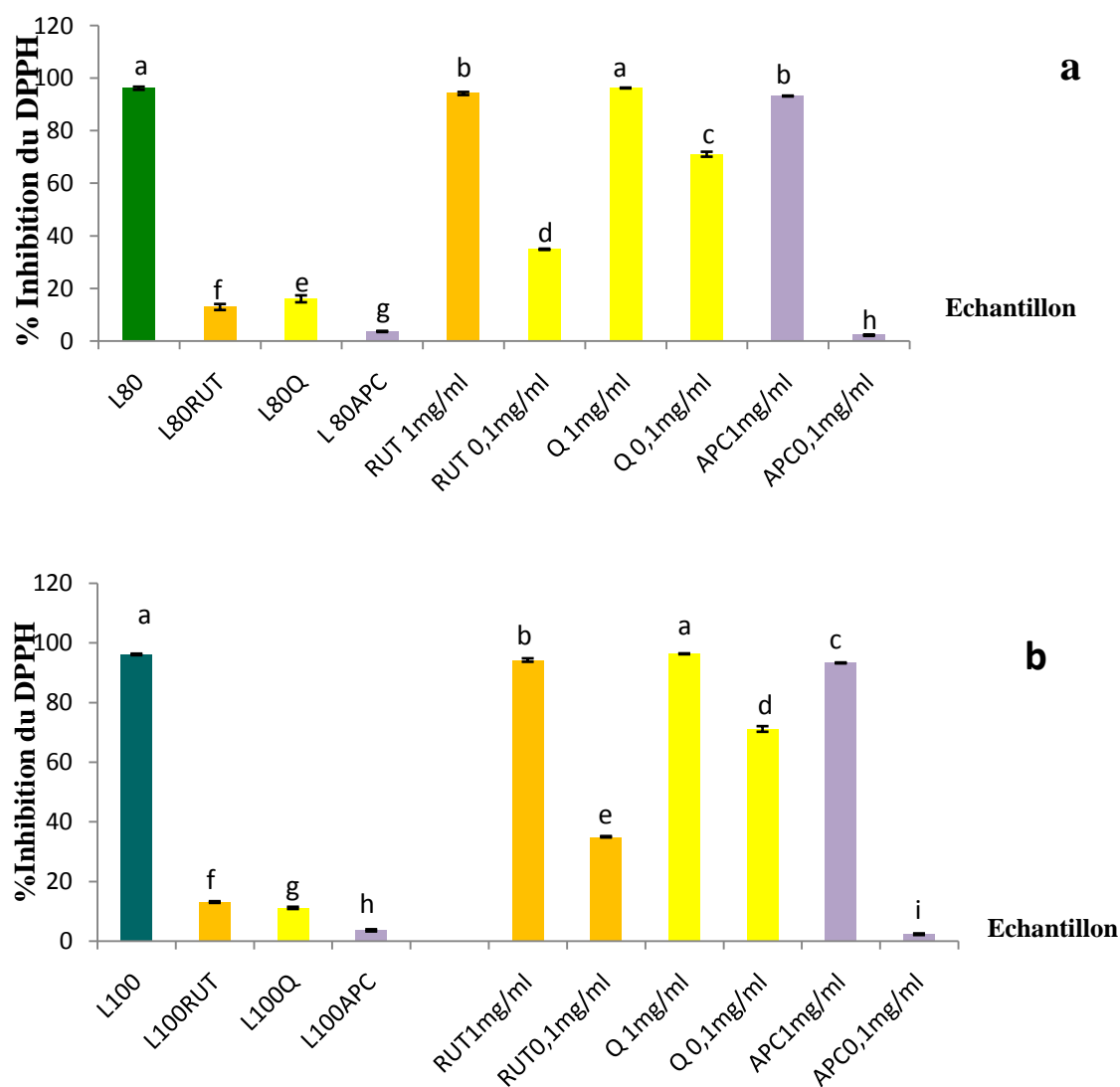
Le pouvoir anti-radicalaire des fractions issues de l'extrait aqueux est très faible ( $P < 0.05$ ) comparé aux autres extraits.

Nos données analytiques montrent un faible pouvoir inhibiteur du DPPH de ces fractions : il varie de 1.35% à 21.6%. Quelle que soit la fraction considérée, l'activité demeure nettement inférieure ( $p < 0.05$ ) à celui des standards utilisés ou de l'extrait brut d'origine (Figure 52a et b et 53a et b). Cet effet scavenger de ces fractions représente moins de 22% de celui noté pour les standards et extraits bruts correspondants.



**Figure 52: activité-radicalaire du DPPH des fractions LED(a) et L60(b) dans le système dichlorométhane.**

Les mêmes lettres ne présentent pas de différences significatives entre elles ( $p > 0,05$ ).



**Figure 53: Activité anti-radicalaire du DPPH des fractions L80 (a) et L100 (b) dans le système dichlorométhane.**

Les mêmes lettres ne présentent pas de différences significatives entre elles ( $p > 0,05$ ).

## II.6.2. Pouvoir Réducteur du Fer :

### II.6.2.1. Pouvoir Réducteur du Fer des extraits bruts :

Nos données analytiques (Figure 54) montrent que tous les extraits testés manifestent un pouvoir réducteur. Dans nos conditions expérimentales, le pouvoir réducteur des extraits est inférieur à celui de l'acide ascorbique pris comme témoin.

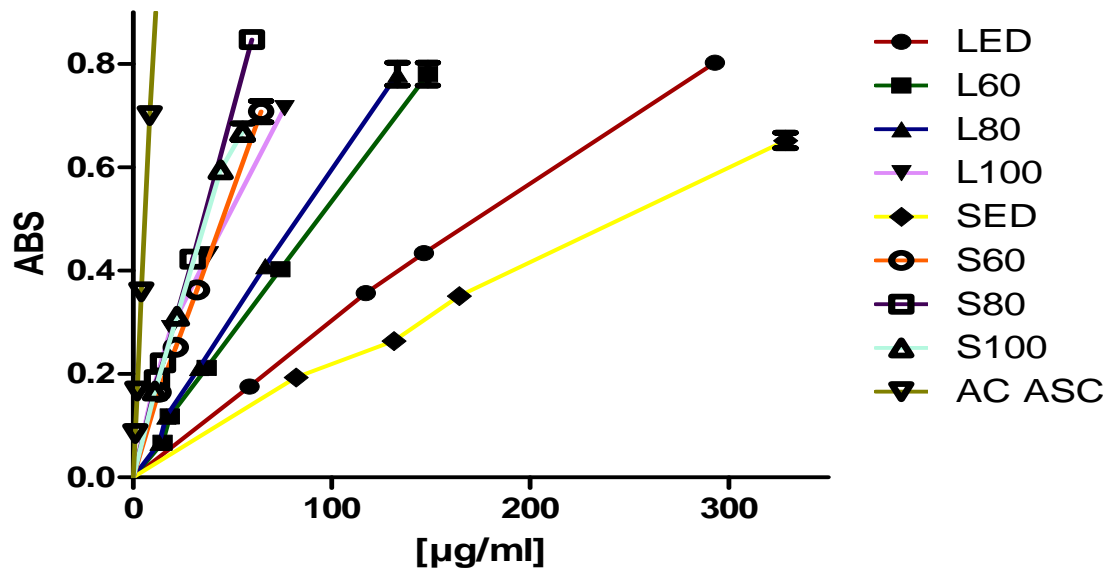


Figure 54 : Effet de la concentration extraits et standards sur le pouvoir réducteur du fer

▪ LED : Extrait aqueux du laurier, L60 : Extrait éthanolique 60% du laurier, L80 : Extrait éthanolique 80% du laurier, L100 : extrait éthanolique pur du laurier, SED : Extrait aqueux de sauge, S60 : Extrait éthanolique 60% de sauge, L80 : Extrait éthanolique 80% de sauge, L100 : extrait éthanolique pur de sauge.

Nos résultats révèlent que les extraits éthanoliques 60, 80 et 100% pour la sauge et 100% pour laurier augmentent brusquement le pouvoir réducteur dans les faibles concentrations ; nous notons une augmentation progressive du pouvoir réducteur pour les extraits aqueux des deux plantes. L'amélioration du pouvoir réducteur est observée avec l'augmentation de la proportion de l'alcool dans le solvant d'extraction. La capacité à réduire le fer de 50 % des extraits (Figure 55) varie de 35.37 µg/ml à 245.44 µg/ml et dépend aussi bien de la plante que du solvant d'extraction utilisé.

Les valeurs de l'IC<sub>50</sub> des extraits testés sont supérieures à celles de l'acide ascorbique (IC<sub>50</sub> de 5.88 µg/ml).

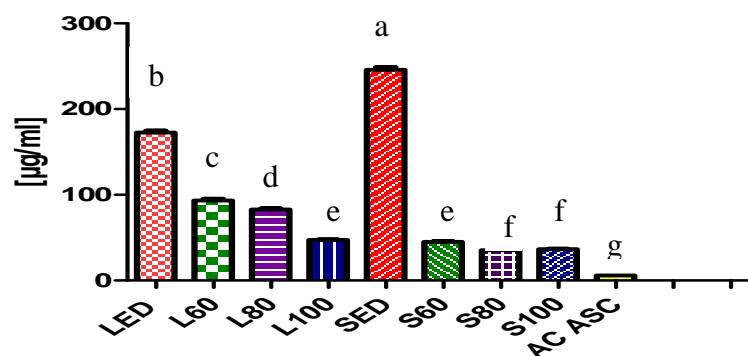


Figure 55 : Concentration réductrice de 50% du fer

- LED : Extrait aqueux du laurier, L60 : Extrait éthanolique 60% du laurier, L80 : Extrait éthanolique 80% du laurier, L100 : extrait éthanolique pur du laurier, SED : Extrait aqueux de sauge, S60 : Extrait éthanolique 60% de sauge, L80 : Extrait éthanolique 80% de sauge, L100 : extrait éthanolique pur de sauge.
- Les barres verticales représentent les écarts types
- Les mêmes lettres ne présentent pas de différences significatives entre elles ( $p>0,05$ ).

L'efficacité de réduction du fer est inversement proportionnelle à l'IC<sub>50</sub>. Les extraits éthanoliques 80 et 100 de sauge présentent une IC<sub>50</sub> similaire ( $p>0,05$ ) et les IC<sub>50</sub> des extraits éthanoliques 100 et 60 du laurier et sauge respectivement ne présentent pas de différence significative entre eux.

### II.6.2.2. Pouvoir réducteur du Fer des fractions :

#### II.6.2.2.1. Pouvoir réducteur du Fer de fraction de sauge récupéré dans le dichlorométhane:

Le pouvoir réducteur des différentes fractions d'extraits de sauge (Figure 56), varie de 0.012 à 2.69. Les plus fortes valeurs sont en faveur de la fraction rosmarinique ; le pouvoir réducteur de cette dernière varie de 1.24 (S100) à 2.69 (S80). La Figure 57-b montre que le pouvoir réducteur de cette dernière fraction (S80) est comparable à celui de l'acide rosmarinique (1 mg/ml), alors que celui de S100 est similaire ( $p>0,05$ ) à celui de l'acide rosmarinique (0.1 mg/ml).

Nous avons testé également les fractions assimilées à des flavonoïdes (FD4), tanins (FD16) et à l'acide ferrulique (FD13). Elles manifestent toutes (Figure 57-a et 58a-b) un pouvoir réducteur nettement inférieur ( $p<0,05$ ) à celui des standards correspondants utilisés à la faible concentration (0.1 mg/ml).

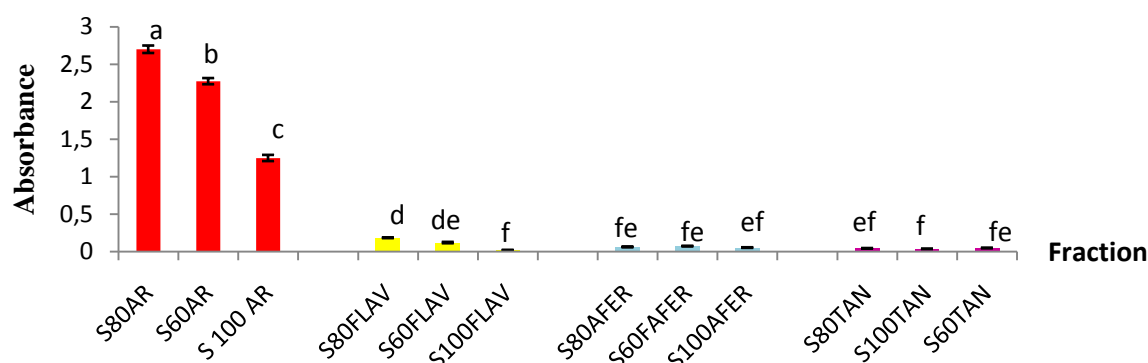


Figure 56: Pouvoir réducteur du fer des fractions de sauge dans le dichlorométhane.

Les memes lettres ne présentent pas de différences significatives entre elles ( $p>0,05$ ).

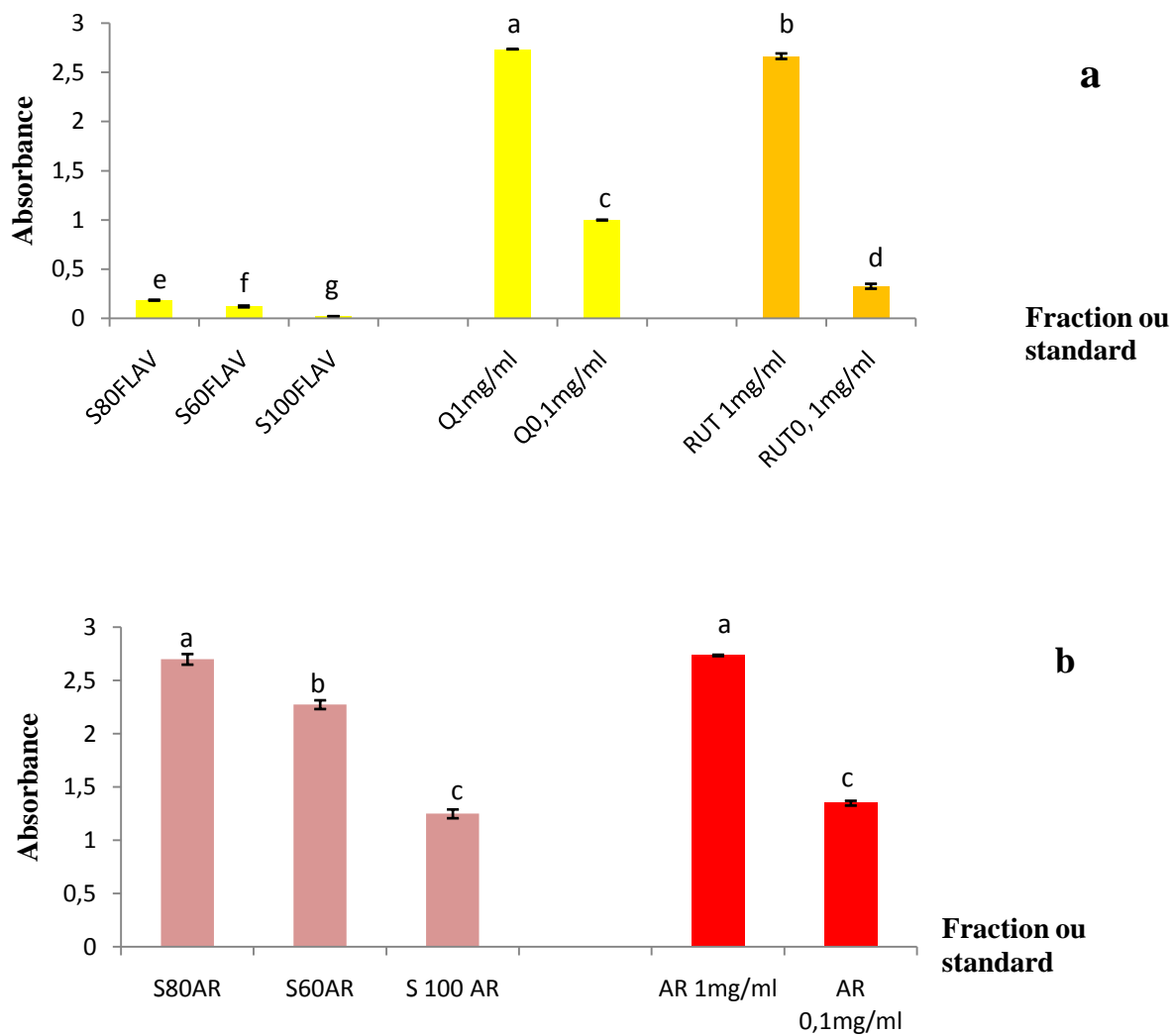
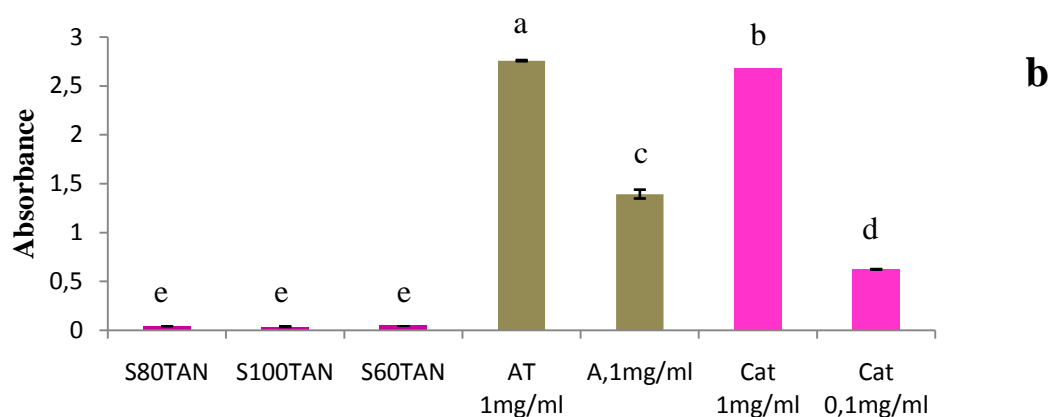
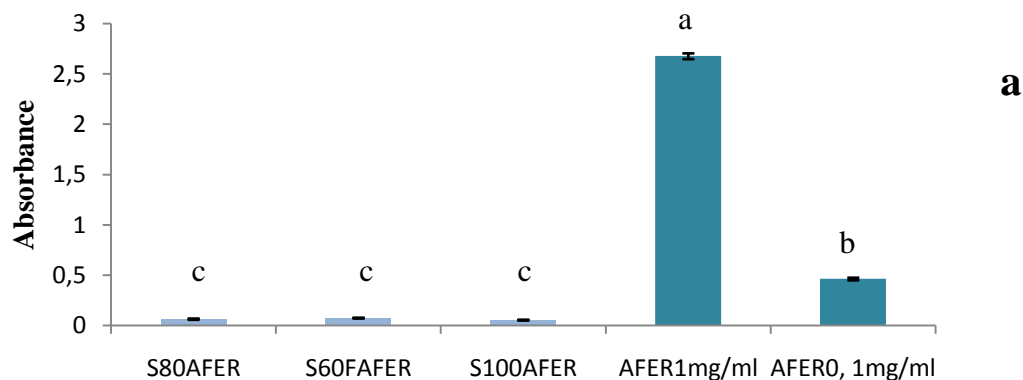


Figure 57 : Pouvoir réducteur du fer des fractions flavonoides (a) et Acide rosmarinique (b) de sauge dans le dichlorométhane.

Les memes lettres ne présentent pas de différences significatives entre elles ( $p > 0,05$ ).



**Figure58 : Pouvoir réducteur des fractions Acide férulique (a) et tanin (b) de sauge dans le dichlorométhane.**

Les memes lettres ne présentent pas de différences significatives entre elles ( $p>0,05$ ).

#### II.6.2.2.2. Pouvoir réducteur des fractions de sauge récupérées dans le système Acétate d'éthyle :

Les fractions testées (FA4 et FA5) proviennent aussi bien des extraits S60 que S80. Pour un même extrait, les fractions à RF élevé (Figure 59) manifestent ( $p<0.05$ ) une plus grande activité (1.03 à 1.44 contre 0.73 à 1.03). Pour une même valeur RFI' extrait S80 donne les fractions les plus actives.



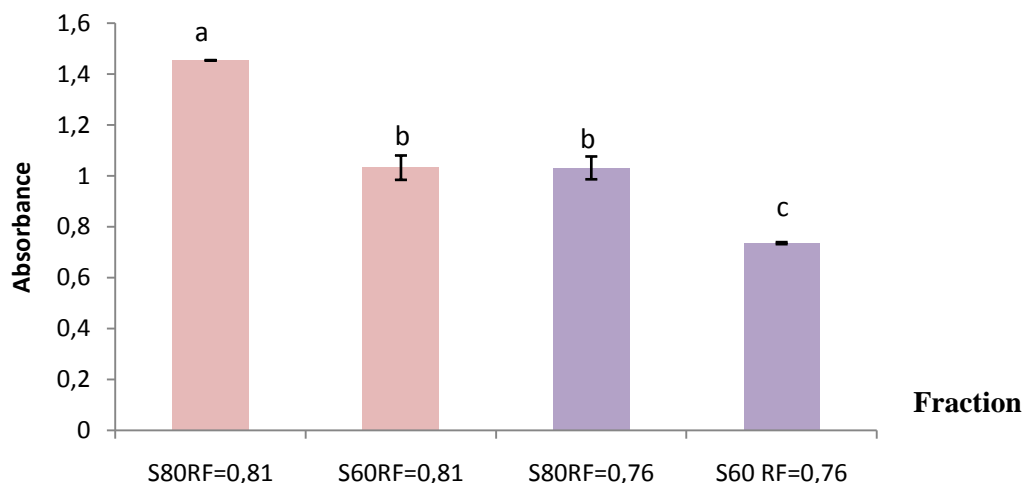


Figure 59 : Pouvoir réducteur des fraction de sauge (Acétate d'éthyl).

Les memes lettres ne présentent pas de différences significatives entre elles ( $p > 0,05$ ).

La comparaison du pouvoir réducteur de ces fractions à celui de la rutine et de quercétine (Figure 60), dépend de la concentration des standards utilisés ; à raison de 1 mg/ml, le pouvoir réducteur des standards est nettement plus élevé ( $p < 0,05$ ). La diminution de cette concentration à 0.1 mg/ml s'accompagne d'un pouvoir réducteur de la rutine inférieur à celui des fractions testées. Nous notons que les fractions S80 RF 0.81, S80 RF 0.76 et S60 RF 0.81 affichent une aptitude à réduire le fer, comparable ou supérieure à celle de la quercétine (0.1 mg/ml).

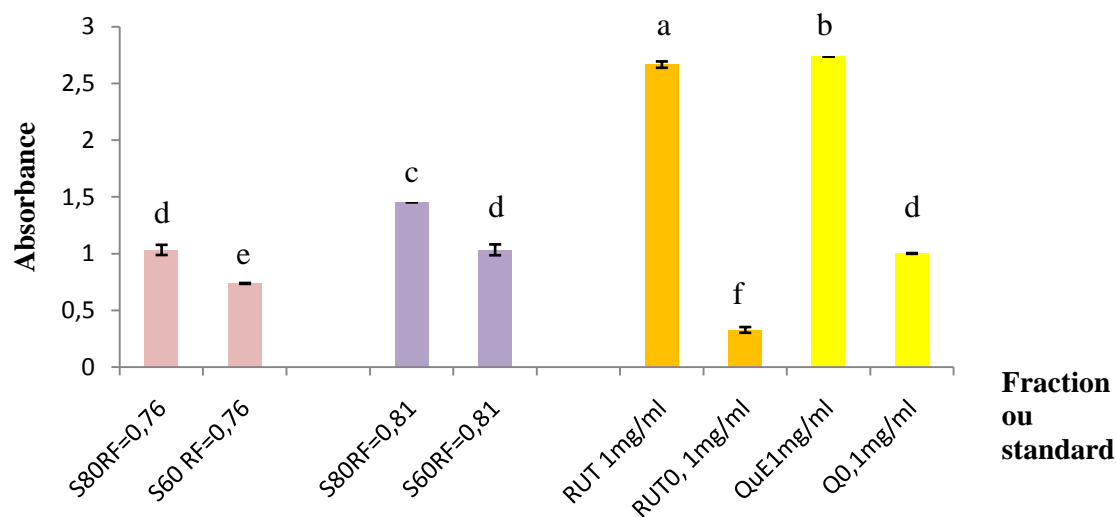


Figure 60 : Pouvoir réducteur des fractionsde sauge (Acétate d'éthyl) comparé à celui de la rutine et de la quercétine

Les memes lettres ne présentent pas de différences significatives entre elles ( $p > 0,05$ ).

### II.6.2.2.3. Pouvoir réducteur de fraction du laurier :

Le pouvoir réducteur des différentes fractions (Figure 61) dépend ( $p < 0.05$ ) aussi bien du solvant d'extraction utilisé que de la nature de la fraction considérée.

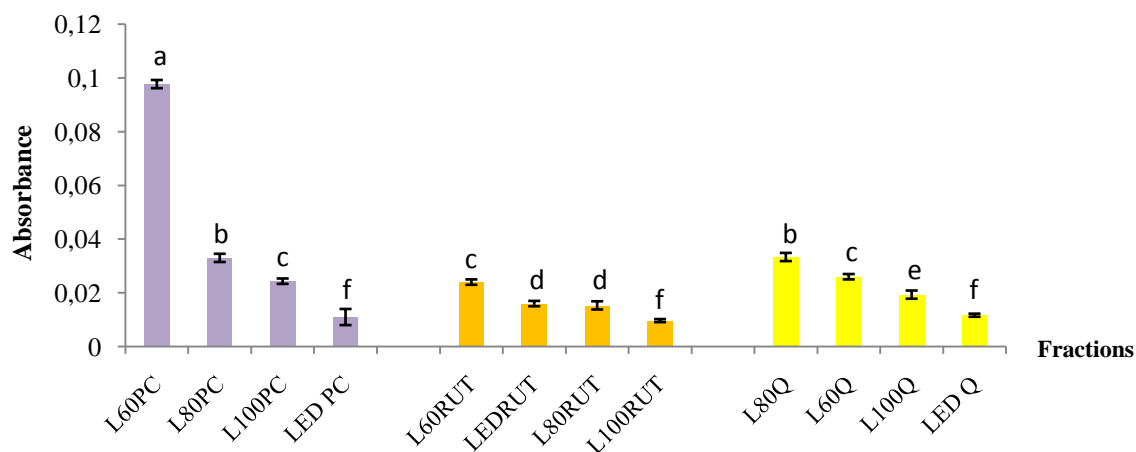
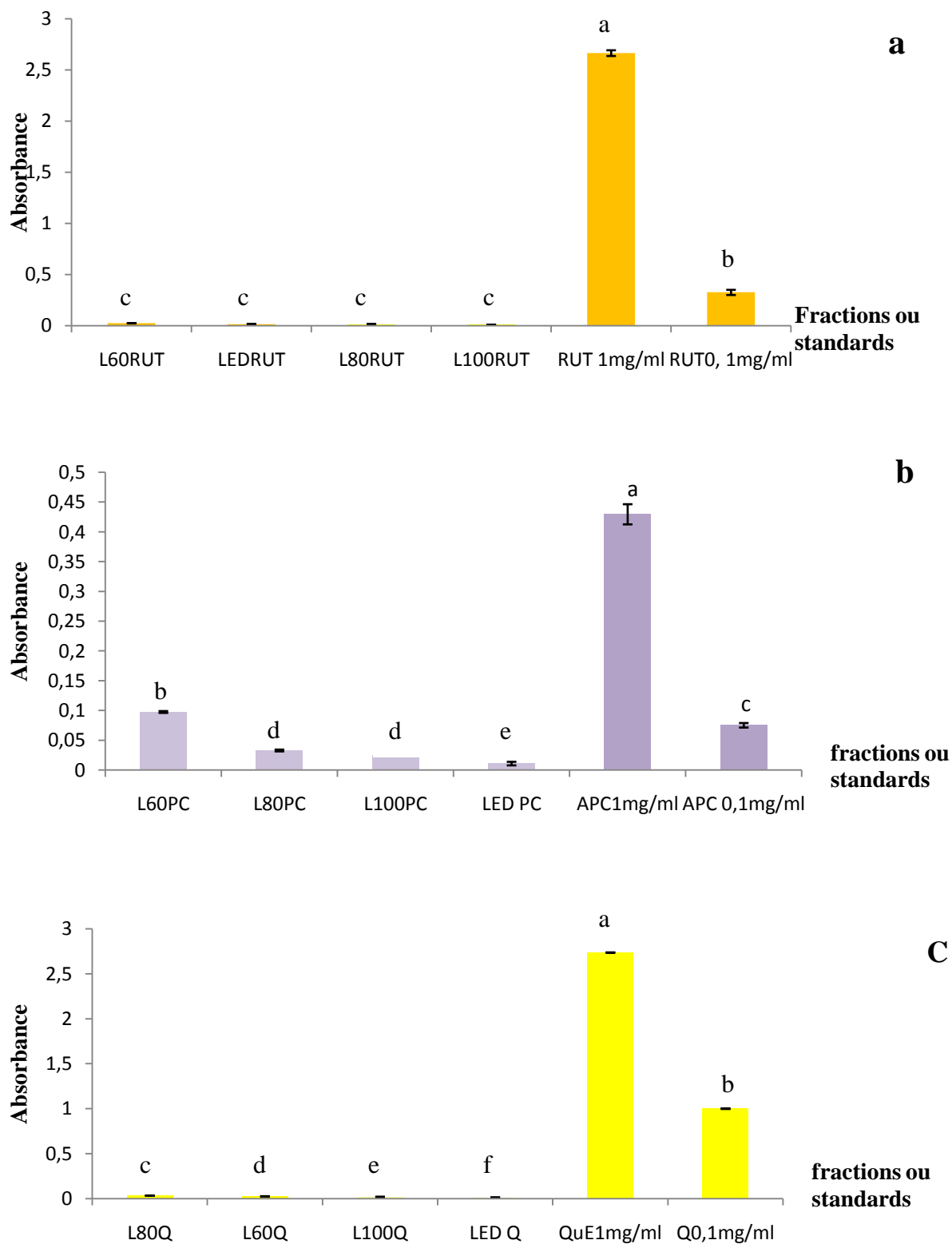


Figure 61: Pouvoir réducteur des fractions de laurier (Dichlorométhane).

Les memes lettres ne présentent pas de différences significatives entre elles ( $p > 0,05$ ).

Le pouvoir réducteur des fractions varie de 0.011 à 0.097 , comparé à celui des standards correspondant (utilisés aux concentrations de 0.1 et 1 mg/ml). La réduction du fer par ces fractions est très faible ( $p < 0.05$ ) (Figure 62a-b et c). Seule la fraction L60 PC donne un pouvoir réducteur supérieur ( $p < 0.05$ ) à celui de l'acide p-coumarique utilisé à 0.1 mg/ml.

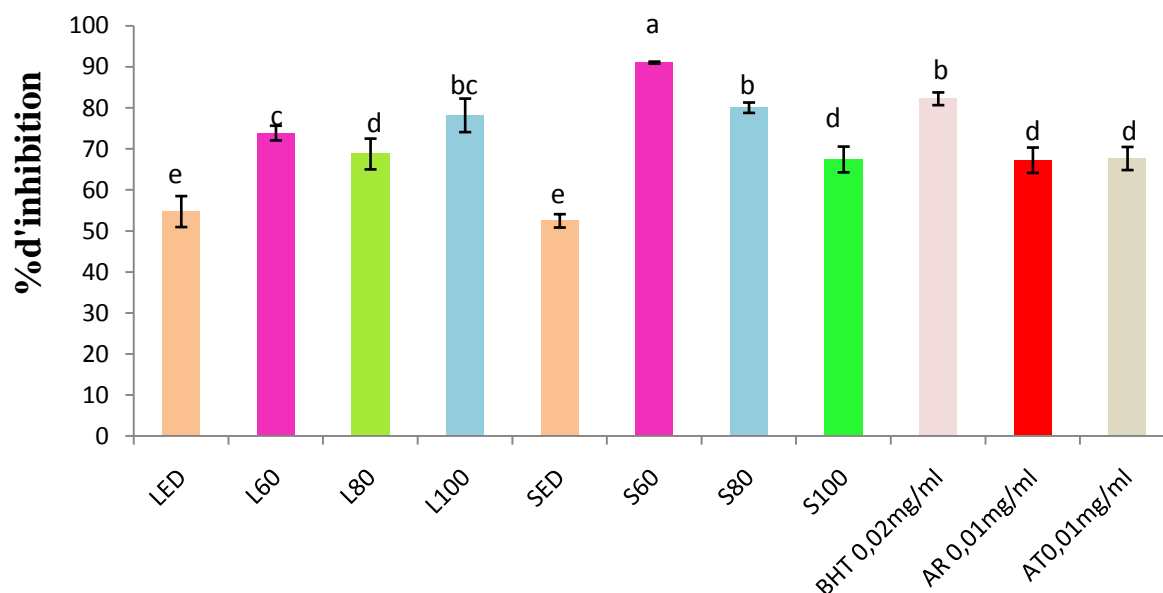


**Figure 62: Pouvoir réducteur des fractions rutine (a), acide p-coumarique (b) et quercétine (C) de laurier dans le dichlorométhane.**

Les memes lettres ne présentent pas de différences significatives entre elles ( $p > 0,05$ ).

### II.6.3. Test de blanchiment du $\beta$ -carotène

L'inhibition du blanchiment du  $\beta$ -carotène varie de 52.47% à 91.03% et dépend ( $P < 0.05$ ) aussi bien de la plante que du solvant d'extraction utilisé. Les résultats obtenus sont illustrés par la Figure 63.



**Figure 63 : Inhibition de blanchiment du  $\beta$ -carotène**

- LED : Extrait aqueux du laurier, L60 : Extrait éthanolique 60% du laurier, L80 : Extrait éthanolique 80% du laurier, L100 : extrait éthanolique pur du laurier, SED : Extrait aqueux de sauge, S60 : Extrait éthanolique 60% de sauge, L80 : Extrait éthanolique 80% de sauge, L100 : extrait éthanolique pur de sauge.
- Les barres verticales représentent les écarts types
- Les mêmes lettres ne présentent pas de différences significatives entre elles ( $p > 0,05$ ).

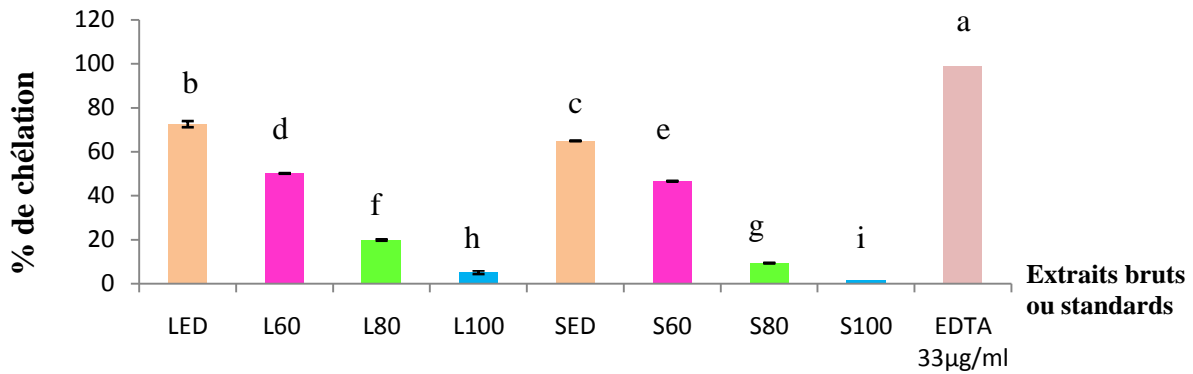
L'extrait de sauge 60 (91.03%) s'est révélé meilleur que la BHT. Nous notons que l'activité des extraits éthanoliques S80 (80.04%) et L100 (78.18 %) est similaire ( $P > 0.05$ ) à celle du BHT (82.22%). Tous les autres extraits présentent une activité inférieure à celle du BHT.

L'activité des extraits 80 de laurier et S100 est similaire ( $P > 0.05$ ) à celle de l'acide rosmarinique et d'acide tannique.

Le BHT manifeste une activité nettement ( $P < 0.05$ ) supérieure à celle des deux autres standards (acide rosmarinique et acide tannique) utilisés : 82.22% d'inhibition avec le BHT contre 67.3% environ pour l'acide rosmarinique et l'acide tannique.

#### II.6.4. Chélation du fer ferreux:

Le pouvoir chélateur du fer par les extraits varie de 1.65 à 72.52 % et dépend ( $p < 0,05$ ) aussi bien de la plante que du solvant d'extraction utilisé. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 64.



**Figure 64 : Pouvoir chélateur du fer ferreux**

- LED : Extrait aqueux du laurier, L60 : Extrait éthanolique 60% du laurier, L80 : Extrait éthanolique 80% du laurier, L100 : extrait éthanolique pur du laurier, SED : Extrait aqueux de sauge, S60 : Extrait éthanolique 60% de sauge, S80 : Extrait éthanolique 80% de sauge, L100 : extrait éthanolique pur de sauge.
- Les barres verticales représentent les écarts types
- Les mêmes lettres ne présentent pas de différences significatives entre elles ( $p > 0,05$ ).

Nos données montrent que le pouvoir chélateur de l'EDTA 33 µg/ml est supérieur à celui de tous les extraits.

Nous notons que l'incorporation de l'eau dans l'éthanol s'accompagne d'une augmentation du pouvoir chélateur des extraits pour les deux plantes. L'incorporation de 20% et 40% d'eau dans le solvant entraîne une augmentation de 283% et 862 % respectivement ; la substitution totale de l'éthanol par l'eau induit une augmentation de 1291.2 % du pouvoir chélateur de l'extrait du laurier.

Pour la sauge, l'incorporation de 20% et 40% d'eau dans le solvant provoque une augmentation de 465.71% et 2711.3% respectivement ; la substitution totale par l'eau de l'éthanol s'accompagne d'une augmentation de 3814.5 du pouvoir chélateur.

## **II.7. Corrélations**

Le Tableau XI traduit les corrélations entre les différentes variables étudiées. Les données rapportées relèvent en effet une corrélation entre chacun des différents tests et les teneurs en composés phénoliques. Les diverses corrélations rapportées diffèrent entre elles par le niveau de signification. Nous notons une corrélation hautement significative entre l'inhibition du blanchiment du  $\beta$ -carotène et la teneur en phénols totaux solubles ( $R=0.847$ ), en flavonoïdes ( $R=0.840$ ) et en tanins ( $R=0.796$ ).

Les concentrations IC50 du pouvoir réducteur de fer sont significativement corrélées avec chacune des trois classes des composés phénoliques dosés (phénols totaux solubles, flavonoïdes et tanins). Nos données suggèrent que l'essentiel de cette activité est due majoritairement aux flavonoïdes des extraits ; en effet, nous notons une bonne corrélation entre l'IC50 du test DPPH et les teneurs en phénols totaux solubles ( $R=0.656$ ) et les tanins ( $R=0.564$ ), mais plus faible que celle avec les teneurs en flavonoïdes ( $R=0.799$ ).

Pour la chélation du fer, nous avons enregistré une corrélation négative avec la teneur en flavonoïdes ( $R= - 0.548$ ) et la teneur en phénols non attachés aux protéines ( $R= - 0.507$ ).

Nous notons des corrélations hautement significatives aussi bien pour IC50 du DPPH que IC50 du pouvoir réducteur avec le  $\beta$ -carotène ( $R=0.785$  et  $0.812$  respectivement). Une corrélation hautement significative s'établit à  $R= 0.966$  entre les deux IC50 calculés.

Tableau XI: La matrice de corrélation

Variables	PTS	FLAV	TANCOND	TAN HYD	TAN précipité par BSA	PTS non attaché	TAN exprimé mg EQ AG	%Chélation	DPPH ANTIOX	B-carotène %	IC50 (µg/ml) DPPH	IC 50 P Réducteur
PTS	1											
FLAV	<b>0,938***</b>	1										
TANCOND	0,014	0,176	1									
TAN HYD	0,243	0,109	-0,042	1								
TAN précipité par BSA	<b>0,828***</b>	<b>0,768***</b>	0,375	0,356	1							
PTS non attaché	0,094	0,289	<b>0,642**</b>	-0,327	0,268	1						
TAN exprimé mg EQ AG	<b>0,972***</b>	<b>0,864***</b>	-0,138	0,319	<b>0,759***</b>	-0,143	1					
%Chélation	-0,387	<b>-0,548**</b>	-0,114	-0,139	-0,208	<b>-0,507*</b>	-0,265	1				
DPPH ANTIOX	<b>0,574**</b>	<b>0,722***</b>	-0,061	-0,385	0,342	0,323	<b>0,494*</b>	<b>-0,481*</b>	1			
B-carotène %	<b>0,847***</b>	<b>0,840***</b>	-0,027	0,350	<b>0,746***</b>	0,195	<b>0,796***</b>	<b>-0,460*</b>	<b>0,636**</b>	1		
IC50 (µg/ml) DPPH	<b>-0,656***</b>	<b>-0,799***</b>	0,040	0,128	<b>-0,437*</b>	-0,372	<b>-0,564**</b>	<b>0,661***</b>	<b>-0,947***</b>	<b>-0,785***</b>	1	
IC50 P Réducteur	<b>-0,681***</b>	<b>-0,804***</b>	0,066	-0,072	<b>-0,458*</b>	-0,343	<b>-0,595**</b>	<b>0,791***</b>	<b>-0,846***</b>	<b>-0,812***</b>	<b>0,966***</b>	1

(\*) : La corrélation est significative ( $p < 0.05$ ).

(\*\*) : La corrélation est très significative ( $p < 0.01$ ).

(\*\*\*) : La corrélation est très hautement significative ( $p < 0.001$ ).

### III. Discussion général

L'objectif du présent travail est d'évaluer d'une part le contenu en composés phénoliques de la sauge et du laurier et d'autre part le potentiel antioxydant d'extraits bruts et de fractions (isolées par CCM) de ces deux plantes.

La présence de diverses classes de composés phénoliques (phénols totaux solubles, flavonoïdes, tanins hydrolysables, tanins condensés, ...) révélée par les différents tests s'accorde avec les données de la littérature.

Globalement, les teneurs en phénols totaux solubles du laurier et de la sauge s'intègrent dans l'intervalle des valeurs rapportées par Cosio *et al.* (2006) et Dorman et Hiltunen (2011) pour le laurier (16 à 107 mgAG/gMS) et Cosio *et al.* (2006) et Stagos *et al.* (2012) pour la sauge (23 à 184mgAG/gMS). La comparaison avec les données de la littérature n'est pas aisée, tant divers facteurs (végétal, saison, climat, variété, procédé d'extraction, etc.) peuvent influencer.

L'extraction a pour but de faire diffuser dans la phase liquide les composés phénoliques présents dans la matière végétale (Ryan *et al.*, 2002, Escibano Baillon-Buelga, 2003).

Dans nos conditions expérimentales, l'eau n'est pas un solvant efficace pour l'extraction des poly phénols de la sauge et du laurier. En accord avec Nwuha (2000), nous avons noté que l'incorporation de l'éthanol à l'eau améliore la solubilité des composés bioactifs. L'utilisation d'un solvant binaire s'accompagne d'une augmentation globale de l'extraction des PTS de 86 à 184% pour le laurier et de 277 à 388% pour la sauge ; pour les flavonoïdes de ces mêmes plantes, cette amélioration varie de 106 à 168% et 498 à 512% respectivement. Nos données traduisent des différences de solubilité des composés dosés et corroborent les résultats de nombreux auteurs (Turkmen *et al.*, 2006; Durling *et al.*, 2007; Dragovic-Uzelac *et al.*, 2012; Mokhtarpour *et al.*, 2014) travaillant sur différents substrats (sous produits de pistache, sauge, sauge, thé). Les systèmes de solvants binaires sont plus performants et favorables dans l'extraction des composés phénoliques de plantes que les systèmes de solvants purs (Nawaz *et al.*, 2006; Turkmen *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007; Yang and Zhang, 2008). De telles différences peuvent être attribuées à leur degré de polymérisation ou à leur implication dans d'autres structures moléculaires formant ainsi des complexes insolubles (Caecace *et Mazza*, 2002 et Falleh *et al.*, 2008) ou la diversité structurale des composés phénoliques (Naczki *et Shahidi*, 2006). Les améliorations notées avec l'éthanol aqueux seraient dues à sa polarité plus élevée que celle de l'éthanol pur.



Une variabilité des teneurs et caractéristiques en tanins a été notée dans nos échantillons. Les tanins de la sauge se sont avérés plus solubles dans l'eau distillée (20.5 mg EqAT/gMS) que dans les solvants renfermant de l'éthanol (15.8 à 19.55 mg EqAT/gMS). Pour le laurier nous observons le phénomène inverse. Ces différences qui sont en accord avec Bonnaillie *et al.*, (2012), suggèrent la présence dans les extraits aqueux de sauge de flavonoïdes polymères et de non flavonoïdes plus polaires, plus solubles dans l'eau. Comme le soulignent Turkmen *et al.* (2006) les solvants utilisés pourraient ne pas solubiliser et extraire les mêmes composés phénoliques.

La présence et la variabilité des composés solubilisés par les différents solvants utilisés est confirmée par les résultats du criblage chimique obtenus sur plaques CCM. Cette dernière repose sur la valeur du RF et de la coloration avant et après révélation. Ribereau Gayon (1965) rapporte que les valeurs du RF sont propres à chaque CP et système d'élution.

Les 118 spots révélés sont inégalement répartis entre les deux systèmes d'élution (37 pour l'acétate d'éthyle contre 81 dans le dichlorométhane). Le système Dichlorométhane /méthanol/eau (75 /25/2) a permis de mettre en évidence un profil chromatographique dans lequel de nombreuses fractions ont été bien séparées. Stéroïdes, terpenoïdes, flavonoïdes, acides phénoliques et tanins sont les principaux constituants des différents extraits révélés par nos tests sur CCM. La présence de telles substances, rapportée par de nombreux auteurs, corrobore nos résultats de dosage.

L'identification de trois acides phénoliques dans les extraits de sauge (Acide rosmarinique, acide ferrulique et d'acide caféique) et des acides p-coumarique et tannique chez le laurier s'accorde avec les données de Dragović-Uzelac *et al.* (2012), Roby *et al.* (2013), Smic *et al.* (2003) et Muñiz-Márquez *et al.* (2013). L'acide rosmarinique est connu comme l'acide phénolique majoritaire chez la sauge (Bandoniène *et al.*, 2005; Shanet *et al.*, 2005). Quercétine (Laurier et Sauge) et Rutine (Laurier) sont les seuls flavonoïdes identifiés avec des RF respectifs de 0.89 et 0.36 et dont la présence est déjà rapportée par Skerget *et al.* (2005), Yakhlef *et al.* (2011) et Roby *et al.* (2013). Le nombre limité de standards utilisés ne nous a pas permis d'identifier les différentes fractions assimilées à des flavonoïdes (FD1, FD4, FD11, FD12, FD15, FD17, FD18 et FD20) ou à des tanins (FD2, FD7 et FD16).

Ces constituants phénoliques ne sont pas présents dans tous les extraits. De telles différences suggèrent une variabilité aussi bien qualitative que quantitative des molécules extraites; ces dernières se caractériseraient par des différences de solubilité et de structure chimique.

L'application de la solution DPPH sur les plaques a montré que tous les extraits testés possèdent une activité anti oxydante. Ce potentiel antioxydant varie d'un extrait à un autre et d'une fraction à une autre. Dans les plantes, les composés phénoliques sont des constituants très importants en raison de leur capacité scavenger due à leurs groupement hydroxyles (Elmastas *et al.*, 2006). L'une des propriétés chimiques des composés phénoliques est leur propriété réductrice en agissant comme donneur d'hydrogène ou d'électron ce qui leur confère leur capacité à piéger les radicaux libres (Rice-Evans *et al.*, 1997).

Ces observations sur plaques sont confortées par nos résultats d'activités anti oxydantes mesurées *in vitro* au moyen du test de DPPH et du pouvoir réducteur du fer. Les extraits de *laurus nobilis* ont montré une activité de piégeage des radicaux DPPH de 94.82 à 96.35% contre 78.42 à 97.26 % pour *Salvia officinalis*. Les valeurs de l'IC50 varient de 8.25 à 52.1 µg/ml pour le laurier et 7.5 à 118.8 µg/ml pour la sauge. De même les différents extraits ont manifesté un pouvoir réducteur élevé ; l'IC50 varie de 35.37 à 245.4 µg/ml. Des résultats similaires sont enregistrés par Then *et al.* (2004), Elmastas *et al.* (2006) et Muñiz-Márquez *et al.*, (2013).

L'analyse statistique de nos données montre une corrélation hautement significative ( $p < 0,05$ ) entre l'activité anti-radicalaire d'une part et les teneurs en PTS (0,57) et flavonoïdes (0,72) d'autre part. Une corrélation linéaire fortement significative est obtenue par Shan *et al.* (2005), entre l'activité antioxydante et de la teneur en composés phénoliques de différentes plantes dont le laurier et la sauge. En accord avec Then *et al.* (2004) et Elmastas *et al.* (2006), nous avons relevé que les valeurs de l'IC50 pour le pouvoir réducteur sont hautement corrélées ( $P < 0,05$ ) avec la teneur en flavonoïdes (-0,804) et PTS (-0,681).

Nos résultats, similaires à ceux de Lu *et al.* (2011), traduisent l'implication des composés phénoliques dans le pouvoir antioxydant des extraits testés. Huang *et al.* (2005) attribuent cet effet à leur haut degré d'hydroxylation qui se manifeste par leur grande capacité à donner des protons et stabiliser le radical DPPH. Les résultats d'activité anti oxydante des fractions testées confortent cette hypothèse. Ces dernières ont toutes affichées un effet scavenger et un pouvoir réducteur appréciables qui varient d'une fraction à une autre. L'acide rosmarinique, composé majoritaire de la sauge, manifeste l'activité anti oxydante la plus élevée. Selon Wang *et al.* (1998) l'acide rosmarinique (88% réduction du DPPH) et lutéoléine-7-O- $\beta$ -glucopyranoside (62% réduction du DPPH) sont les composés phénoliques des extraits de sauge les plus actifs. Pour le laurier, la participation des constituants phénoliques isolés diffère selon le test considéré, les fractions rutine et

quercétine affichent l'activité anti-radicalaire du DPPH la plus élevée alors que pour le pouvoir réducteur nous notons un effet plus marqué de l'acide p-coumarique. Pour Shan *et al.*, (2005), la catéchine joue un rôle très important en augmentant l'activité scavenger des radicaux dans les espèces de Lauracées. Nos données ont montré que les extraits aqueux expriment une activité anti oxydante inférieure à celle des extraits éthanoliques. Comme le soulignent Larson (1988) Shahidi et Wanasundara (1992), l'activité antioxydante des composés naturels dépend non seulement de la quantité de molécules spécifiques présentes dans la matrice, mais aussi de facteur structural, tels que le nombre et les positions des groupements hydroxyles dans la molécule et l'activité peut être renforcée par l'encombrement stérique (Nakatani *et al.*, 2000).

Le coefficient de corrélation entre les poly phénols (PTS et flavonoïdes) et l'inhibition du blanchiment du  $\beta$ -carotène est hautement significatif ( $p < 0,05$ ) et indique que 70% à 72% de cette activité est due à la contribution de ces constituants (PTS et flavonoïdes) et qu'ils sont les antioxydants dominants dans ces extraits. Ces derniers bloquent la réaction en chaîne de la peroxydation des lipides principalement par la neutralisation des radicaux peroxyd intermédiaires qui sont produits (Haslam, 1996). Cette activité dépend également de la capacité des antioxydant à céder des protons (Tian *et al.*, 2009). Les corrélations hautement significatives ( $p < 0,05$ ) entre les trois tests d'activité antioxydante (inhibition du blanchiment du  $\beta$ -Carotène, activité anti-radicalaire du DPPH et le pouvoir réducteur) suggèrent l'implication des mêmes composés. Divers travaux ont montré que l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide ferrulique, l'acide p-coumarique et la catéchine possèdent de forte corrélation positive entre les activités du piégeage des radicaux (DPPH, ABTS+) et la puissance de réduction (Tsai *et al.*, 2007).

La capacité chélatrice des métaux par des composés phénoliques dépend de leur structure chimique, du nombre et de la localisation des groupements hydroxyles (Santoso *et al.*, 2004). Nous avons noté que la capacité des extraits phénoliques pour chélater le fer est bien inférieure à celle de l'EDTA utilisé à une concentration 33  $\mu$ g/ml. Dans le présent travail, la corrélation entre l'activité chélatrice des extraits et leurs teneur en phénols totaux solubles et flavonoïdes est faible ( $R^2$  de 0.150 et 0.301 respectivement). Les résultats similaires rapportés par Zhao *et al.* (2008). Meziti *et al.* (2012), suggèrent que les composés phénoliques des extraits testés pourraient ne pas être les principaux chélateurs du fer.

En accord avec les données Wang *et al.* (2009), nous avons relevé que tous les extraits aqueux ont montré une capacité de chélation du fer ferreux sensiblement plus élevée que

celle des extraits éthanoliques .La présence de saponines dans les extraits aqueux participerait à l'expression du pouvoir chélateur de ces derniers (Ashraf *et al.*, 2013) .

En accord avec Lai et Lim(2011), *les* corrélations faibles et variables relevées entre l'activité antioxydante primaire élevée des extraits (activité anti-radicalaire du DPPH, blanchiment du  $\beta$ -caroten et pouvoir réducteur) et leur activité antioxydante secondaire ( chélation des métaux) suggèrent la mise en jeu de différents mécanismes d'action des composés phénoliques de nos extraits. Un composé phénolique peut agir de manière synergique, additive ou antagoniste pour inhiber les espèces réactives. En outre, la présence de glycosylation sur la molécule peut diminuer son activité anti oxydante (Velazquez et Zevallos ,2009). Miliauskas *et al.* (2004) ont montré qu'un antioxydant efficace dans un test n'est pas forcément efficace dans un autre ; par conséquent, la connaissance du profil phénolique de *Laurus nobilis* et *Salvia officinalis* fournirait des informations précises sur la relation entre l'activité antioxydante et les composés phénoliques.

# **Conclusion**

### Conclusion

La présence de différentes classes de composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes et tanins) dans les extraits de feuilles du laurier et sauge est mise en évidence aussi bien par les dosages que par le fractionnement chromatographique sur couche mince (CCM).

La teneur en phénols totaux solubles varie de 19 à 54mg EqAG/g MS pour le Laurier et de 14 à 63,76 mg EqAG/g MS pour la sauge ; pour les flavonoïdes elle varie respectivement de 0,57 à 1,53 mg EqQ/gMS et 0,25 à 1,55 mgEqQ/gMS et pour les tanins elle varie de 1,36 à 24,16 mg Eq AT/gMS et 7,21 à 31,97 mg Eq AT/gMS respectivement.

La variabilité du contenu en acides phénoliques, flavonoïdes et tanins des différents extraits dépend aussi bien de la plante que du solvant d'extraction.

Pour la sauge, trois acides phénoliques sont identifiés .L'acide rosmarinique(fraction majoritaire ) et l'acide ferulique sont révélés dans chacun des trois extraits obtenus en présence d'éthanol alors que l'acide caféique est solubilisé uniquement par les solvants binaires .Des fractions de types flavonoïde, seule la quercétine est identifiée dans les trois extraits éthanoliques. Ces derniers renferment des tanins non identifiés .

Pour le laurier, l'acide p-coumarique est le seul acide phénolique identifié dans tous les extraits .Ces dernier renferment différents tanins ; l'acide tannique n'est présent que dans les extraits éthanoliques .Des différents flavonoïdes diversement relevés dans les extraits, seules la rutine (tous les extraits) et la quercétine (extrait éthanolique) ont été identifiés.

Les différents extraits testés ont manifesté une activité anti oxydante mesurée *in vitro* par les tests du DPPH, pouvoir réducteur et inhibition du  $\beta$ -carotène.

Les extraits bruts éthanoliques des deux plantes se caractérisent par un fort pouvoir anti radicalaire du DPPH ; l'IC<sub>50</sub> varie de 7.48 à 27.93 contre 52 .10 à 118.87  $\mu$ g/ml pour les extraits aqueux. Pour le pouvoir réducteur, cette valeur oscille entre 35.37 et 93.25 $\mu$ g/ml pour les extraits à l'éthanol contre 172.63 à 245.44  $\mu$ g/ml pour les extraits aqueux. L'inhibition du blanchiment du  $\beta$ -carotène est comprise entre 67.43 et 91% contre 52.47 à 54.73% pour les extraits à l'eau distillée.

Aussi bien pour le laurier que la sauge, nos données ont montré l'implication des mêmes composés phénoliques aussi bien dans l'activité anti radicalaire que le pouvoir réducteur et l'inhibition du blanchiment du  $\beta$  carotène. Les phénols totaux solubles et les flavonoïdes se caractérisent par un haut niveau de participations dans l'activité anti oxydante des extraits.

Pour le pouvoir chélateur du fer, les extraits aqueux manifestent une activité nettement plus élevée (64.9 à 72.52% contre 1.65 à 50% pour les extraits à l'éthanol). Cette activité est très faiblement corrélée aux teneurs en composés phénoliques ( $R^2$  de 0.15 à 0.30) respectivement pour les phénols totaux solubles et flavonoïdes.

D'autres composés présents dans le laurier et la sauge participeraient aux activités antioxydantes mesurées : les saponines dans la chélation des métaux et les terpènes dans le pouvoir réducteur et l'activité anti radicalaire.

Nos données analytiques ont montré que *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* représentent des sources appréciables en composés phénoliques et en antioxydants.

### **Perspectives :**

- Détermination du rapport optimum Eau/Ethanol dans le solvant d'extraction.
- Identification et quantification des différents constituants phénoliques.
- Identification, quantification et caractérisation des constituants non phénoliques solubilisés par les solvants d'extraction.
- Evaluation du potentiel antimicrobienne des extraits de sauge et laurier
- Utilisation *in vivo* des extraits et effets sur la qualité nutritionnelle, hygiénique et organoleptique des aliments.

## **Références bibliographiques**



« A »

- Abreu I. A., et Cabelli D. E. 2010.**Superoxide dismutase-a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica Biophysica Acta*. 1804: 263-274.
- Adom K. K., et Liu R. H. 2002.** Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* .50(21): 6182–6187.
- Albrecht R. 1994.** Aspect nutritionnels de la protection anti-radicalaire. *Médecine et Nutrition*. 111(1): 19-24.
- Amana K. 2007.**Les anacardiaceae du togo: Études botaniques, Écologiques et propriétés antifongiques.Thèse de Doctorat de l'Université de Reims Champagne-Ardenne. 182.
- Andjelkovic M., Camp J. V., Meulenaer B. D., Depaemelaere G., Socaciu C.,Verloo M., et Verhe R.2006.**Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chemistry*. 98(1): 23–31.
- AOAC. 1975.** Official Methods of Analysis.12 Ed. Association of official Analytical chemists. AOAC Washington,D.C.
- Aravodis E. 2005.** Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* .4 (2): 128-133.
- Arimboor R., Kumar K. S., et Arumughan C. 2008.**Simultaneous estimation of phenolic acids in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) using RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* .47(1): 31-38.
- Ashraf M.F. M., Aziz A., Stanlas J., Ismail I., et Abdul Kadir M. 2013.**Assessment of antioxidant and cytotoxicity activities of saponin and crude extracts of *Chlorophytum borivilianum*.*The ScientificWorld Journal*: 1-7.
- Awika J. M., Rooney L. W., et Waniska R. D. 2004.** Properties of 3-deoxyanthocaninns from sorghum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 4388.
- Aziman N., Abdullah N.,Noor Z.M., Zulkifli K. S., et Kamarudin W. S. S. W. 2012.**Phytochemical constituents and *in vitro* bioactivity of ethanolic aromatic herb extracts.*Sains Malaysiana*. 41(11): 1437–1444.

« B »

- Badiaga M. 2011.** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia smith* une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse Doctorat en chimie organique de l'Université de Bamako. 132.

- Bahri-Sahloul R., Ammar S., Fredj R. B., Saguem S., Grec S., Trotin F., et Skhiri F. H. 2009.** Polyphenol contents and antioxidant activities of extracts from flowers of two *crataegus azarolus L.* Varieties. Pakistan Journal of Biological Sciences. 12: 660-668.
- Ballabio R., et Goetz P. 2010.** Huile de graine/fruit de laurier. Phytothérapie 8: 141-144.
- Bandoniene D., Murkovic<sup>1</sup> M., et Venskutonis P. R. 2005.** Determination of rosmarinic acid in sage and borage leaves by high-performance liquid chromatography with different detection methods. Journal of Chromatographic Science. 43:372-376.
- Barla A., Topçu G., Öksüz S., Tümen G., et Kingston D. G. I. 2007.** Identification of cytotoxic sesquiterpenes from *Laurus nobilis L.* Food Chemistry. 104: 1478-1484.
- Bates R. G., et Robinson R. A. 1966.** Chemical physics of ionic solutions. Ed. John Wiley and Sons. New York. 211.
- Beddowes E. J., Faux S. P., et Chipman J. K. 2003.** Chloroform, carbon tetrachloride and glutathione depletion induce secondary genotoxicity in liver cells via oxidative stress. Toxicology. 187(2): 101-115.
- Bekro J. A. M., Konan K. M., Békro Y-A., Djié Bi M. G., Zomi Bi T. J., Mambo V., et Boua B. B. 2008.** Phytochemicals of the extracts of four medicinal plants of Cote d'Ivoire and assessment of their potential antioxidant by thin layer chromatography. European Journal Publishing. 24(2): 219-228.
- Bellow S. 2012.** Etude des composés phénoliques impliqués dans la réponse des feuilles de vigne au mildiou. Thèse doctorat en biologie de l'université Paris Sud. 117.
- Beloued A. 2005.** Plantes médicinales d'Algérie. Ed. Office des Publications Universitaires. Alger. 124.
- Benammar C. E. 2011.** Effets antioxydants et immuno-modulateurs d'une plante médicinale nord africaine, *Zizyphus lotus L.* (Sedra): étude des différents extraits. Thèse de Doctorat en Biologie moléculaire et cellulaire à l'Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen. 84.
- Benkiki N. 2006.** Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Ruta montana*, *Marticaria pubescens* et *Hypericum perforatum*. Thèse de Doctorat d'Etat en Chimie à l'Université El Hadj Lakhdar Batna. 188.
- Berset C., Bondini L. 2000.** Rôles des polyphénols en alimentation et santé humaine. Industries Alimentaires Et Agricoles. 12: 20-24.
- Beutner S., Bloedorn B., Frixel S., Blanco I. H., Hoffmann T., Martin H.D. Mayer B., Noack P., Ruck C., Schmidt M., Schülke I., Sell S., Ernst H. Haremza S., Seybold G., Sies H., Stahl W., et Walsh R. 2001.** Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The

role of  $\beta$ -carotene in antioxidant functions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81: 559-568.

**Beyer R. E. 1994.** The relative essentiality of the antioxidative function of coenzyme Q- the interactive role of DT-diaphorase. *Molecular Aspects of Medicine*. 15: 117-129.

**Bimakr M., Rahman R. A., Taip F. S., Ganjloo A., Salleh L. M. D., Selamat J., Hamide A., Zaidul I. S. M. 2011.** Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food and Bioproducts Processing*. 89: 67-72.

**Birt D. F., Hendrich S., et Weiqun W. 2001.** Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*. 90: 157-177.

**Blanc M., Moinard C., et Cynober L. 2005.** Monoxyde d'azote. In : « Radicaux libres et stress oxydant ». Ed. Lavoisier. Paris. 25-43.

**Bonnaillie C., Salacs M., Vassilova E., et Saykova I. 2012.** Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.). *Revue de génie industriel*. 7 :35-45.

**Bonnefont-Rousselot D. 2007.** Stress oxydant et vieillissement. *Spectra Biologie*. 157: 23-26.

**Boudjellal K. 2009.** Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de *l'Elaeagnus angustifolia* L. Mémoire Magister en biologie de l'Université Elhadj Lakhthar de Batna. 57.

**Boudjou S., Oomah B. D., Zaidi F., et Hosseinian F. 2013.** Phenolics content and antioxidant and anti-inflammatory activities of legume fractions. *Food Chemistry*. 138: 1543–1550.

**Bougandoura N. 2011.** Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales *Satureja calamintha* (nabta) et *Ajugaiwa* L. (chendgoura) de l'ouest d'Algérie. Mémoire de Magister en Biologie à l'Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen. 83.

**Bourgou S., Ksouri R., Bellila A., Skandrani I., Falleh H., Marzouk B. 2008.** Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *Comptes Rendus Biologies* 331: 48–55.

**Brand-Williams W., Cuvelier M. E., et Berset C. 1995.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*. 28: 25-30.

- Cacace J. E., et Mazza G. 2002.** Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. *Journal of Agricultural and Food chemistry*. 50 (21): 5939-5946.
- Carbrera C., Artacho R., et GimenezR. 2006.** Beneficial effects of green tea. *Journal of American College of Nutrition*. 25: 79-99.
- Carr A. C., et Frei B. 1999.** Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *American Journal for Clinical Nutrition*.69: 1086-1107.
- Cavin A. L. 2007.** Contribution à la connaissance taxonomique et chimique de fruits africains du genre *Detarium* (Fabaceae-Caesalpinioideae) : *D .microcarpum* Guill. Et Perr. Et des formes comestibles et toxiques de *D. senegalense* J.F.Gmel. Thèse de Doctorat. Université de Genève. 277.
- Céu S. M., Gaspar J., Duarte SilvaI., Leao D., et Rueff J. 2003.**Induction of chromosomal aberrations by phenolic compounds-possible role of reactive oxygen species. *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 540(1): 29-42.
- Chimi H., Sadik A., Tutour L. B., et Rahmani M. 1988.** Contribution à l'étude comparative des pouvoirs antioxydants dans l'huile d'olive du tyrosol ,de l'hydroxytyrosol, de l'acide caféique , de l'oleuropéine et du BHT .*Revue Française des Corps Gras* . 35 (8-9): 339-344.
- Chow P. S., et Landhäusser S. M. 2004.** A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. *Tree Physiology*. 24: 1129 –1136.
- Ciesla L., Hajnos M., Staszek D., Wojtal V., Kowalska T., etWaksmundzka-Hajnos M. 2010.** Validated binary high-performance thin-layer chromatographic fingerprints of polyphenolics for distinguishing different *salvia* species. *Journal of Chromatographic Science*. 48: 421-427.
- Clark J. 1996.** Tocopherols and sterols from soybeans. *Lipid Technology*. 8: 111-114.
- Cosio M. S., Buratti S., Mannino S., et Benedetti S. 2006.** Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family. *Food Chemistry*. 97: 725–731.
- Cowan M. M., 1999.** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*.12 (4): 564-582.

- Dai J., et Mumper R. J. 2010.** Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 15: 7313-7352.
- Dall'Acqua S., Cervellati R., Speroni E., Costa S., Guerra M. C., Stella L., Greco E., et Innocenti G. 2009.** Phytochemical composition and antioxidant activity of *Laurus nobilis* L. leaf infusion. *Journal of Medicinal Food*. 12 (4): 869-876.
- Dangles O. 2006.** Propriétés chimiques des polyphénols. In: « Les polyphénols en agroalimentaire ». Ed. Lavoisier. 29-50.
- Demir V., Guhan T., Yagcioglu A.K., et Ddegirmencioglu A. 2004.** Mathematical modeling and the determination of some quality parameters of air-dried bay leaves. *Biosystems Engineering*. 88(3): 325-335.
- Deshpande S. S., Cheryan M., et Salunkhe D. K. 1986.** Tannin analysis of food products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 24: 401-449.
- Djerroumi A., et Nacef M. 2004.** 100 plantes médicinales d'Algérie. Ed. Palais du livre. 131.
- Dordevic S., Cakic M., et Amr S. 2000.** the extraction of apigenin and luteolin from the sage *salvia officinalis* l. from Jordan. *Scientific Journal Facta Universitatis Series: Working and Living Environmental Protection*. 1(5): 87-93.
- Dorman H. J. D., Peltoketo A., Hiltunen R., et Tikkanen M. J. 2003.** Characterisation of the antioxidant properties of deodorised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*. 83(2): 255-262.
- Dorman H. J. D., Bachmayer O., Kosar M., et Hiltunen R. 2004.** Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*. 52 (4): 762-770.
- Dorman H. J. D., et Hiltunen R. 2011.** Antioxidant and pro-oxidant in vitro evaluation of water-soluble food-related botanical extracts. *Food Chemistry*. 129: 1612-1618.
- Dragović-Uzelac V., Garofulić I. E., Jukić M., Penić M., et Dent M. 2012.** The Influence of Microwave Assisted Extraction on the Isolation of Sage (*Salvia officinalis* L.) polyphenols. *Food Technology and Biotechnology*. 50(3) 377-383.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., et Smith F. 1956.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28(3): 350-356.

**Durling E. N., Owen J. C., John B. G., Rosmary F. W., Kevin A. M., Yeap L. F., et Nigel B.P. 2007.** Extraction of phenolic and essential oil from dried sage (*salvia officinalis*) using ethanol-water mixture. Food Chemistry. 101: 1417- 1424.

« E »

**Elmastaş M., Gülçin İ., Işildak Ö., Küfrevioğlub Ö. İ., İbaoglua K., et Aboul-Eneinc H. Y. 2006.** Radical Scavenging Activity and Antioxidant Capacity of bay leaf extracts. Journal of the Iranian Chemical Society .3(3): 258-266.

**Emam A. M., Mohamed A. M., Diab Y. M., et Megally N. Y. 2010.** Isolation and structure elucidation of antioxidant compounds from leaves of *Laurus nobilis* and *Emex spinosus*. Drug Discoveries and Therapeutics. 4(3): 202-207.

**Erlund I. 2004.** Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. Nutrition Research. 24: 851-74.

**Escribano-Bailon M T., et Santos-Buegla C. 2003.** Polyphenol extraction from foods. In: “method in polyphenols analysis”. Royal Society of Chemistry. 1-16.

« F »

**Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. et Abdelly C. 2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. Comptes Rendus Biologies. 331(5):372–379.

**Faulks R. M., et Southon S. 2000.** Carotenoids, metabolism and disease. In: «Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods » Ed. CRC Press. 143-156.

**Favier A. 2003.** Le stress oxydant .Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L’Actualité Chimique. 108-115.

**Ferrari J. 2002.** Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l’une d’elles: *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich. Thèse de Doctorat en Sciences de l’Université de Lausanne. 228.

**Ferreira A., Proença C., Serralheiro M. L. M., et Araújo M. E. M. 2006.** The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. Journal of Ethnopharmacology. 108: 31-37.

**Fleeger J. L., et Flipse I. J. 1964.** Metabolism of bovine semen XIII. Malonic acid metabolism by bovine spermatozoa. Journal of Dairy Science. 47 (5): 535-538.

« G »

**Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., et Jore D. 2003.** Espèces réactives de l'oxygène: Comment l'oxygène peut-il devenir toxique?. L'actualité chimique. 91-96.

**Gardès-Albert M., et Jore D. 2005.** Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l'oxygène. In : « Radicaux libres et stress oxydant ». Ed. Lavoisier. Paris.1-23

**Gaussen H., Deuroy J. F., et Ozenda P. 1982.** Précis de botanique II. In : « les végétaux supérieurs ». Ed. Masson.215-408.

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

**Gordon M. H. 1990.** The mechanism of antioxidant in vitro. In: "Food antioxidants". Ed. Hudson B.J.F. 1-18.

**Gorger C., Scholz E., et Rimpler H. 1994.** Ellagitannins from *Alchemilla xanthochlora* and *Potentilla erecta*. Planta Medica. 6: 384-385.

**Guillon Y. 2012.** Diversité des composés terpéniques volatils au sein du genre *Lavandula*: aspects évolutifs et physiologiques.Thèse de doctorat de l'Université de Saint-Etienne. 210.

« H »

**Hagerman A. E., et Butler L. G., 1978.** Protein precipitation method for the quantitative determination of tannin. Journal Agriculture and Food Chemistry. 26 (4): 809-812.

**Hagerman A. E. 2002.** Tannin chemistry. Tannin Handbook. 86: 104 -105.

**Haleng J., Pincemail J., Defraigne J-O., Charlier C., et Chapelle J-P. 2007.** Le stress oxydant.Revue Médicale de Liège.62 (10): 628-638.

**Halliwell B. 1999.** How to characterize a biological antioxidant free radical. Research Communication. 9: 1-32.

**Handa S. S. 2008.** An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. In: "Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants". United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology Trieste Italy. 21-54.

**Harrisson D., Griendling K. K., Landmesser U., Hornig B., et Drexler H. 2003.** Role of oxidative stress in atherosclerosis. The American Journal of Cardiology. 91: 7-11.

**Haslam E.1994.** Natural polyphenols (vegetable tannins): Gallic acid metabolism. Journal of Natural Products. 11: 41-66.

**Haslam E. 1996.** Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products*. 59(2): 205-215.

**Havsteen B. H. 2002.** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*. 96: 67-202.

**Hennebelle T. 2004.** Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de la lamelles productrices d'antioxydants: *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbénacées). Thèse de Doctorat en Chimie organique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille. 304.

**Hensley K., Benaksas E. J., Bolli R., Comp P., Grammas P., Hamdheydari L. B., Mou S., Pye Q. N., Stoddard M. F., Wallis G., Williamson K. S., West M., Wechter W. J., et Floyd R. A. 2004.** New perspectives on vitamin E:  $\gamma$ -tocopherol and carboxyethyl hydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Radical Biology and Medicine*. 36 (1): 1-15.

**Hinneburg I., Dorman H. J. D., Hiltunen R. 2006.** Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry* 97: 122–129.

**Huang D., Ou B., et Prior R. L. 2005.** The Chemistry behind antioxidant capacity assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 1841–1856.

**Hu S. G., Li L., et He X. W. 2005.** Solid-phase extraction of esculetin from the ash bark of chinese traditional medicine by using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*. 1062: 31-37.

**Hussain S. P., Hofseth L. J., et Harris C. C. 2003.** Radical causes of cancer. *Nature*. 3: 276-285.

« I »

**Iserin P. 2001.** Encyclopédie des plantes médicinales. 2ème Ed. Larousse. Londres. 131-226.

**Itoh T., Tamura T., et Matsumoto T. 1973.** Sterol composition of 19 vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 50: 300-303.

« J »

**Jabri-Karoui I., Bettaieb I., Msaada K., Hammami M., et Marzouk B. 2012.** Research on the phenolic compounds and antioxidant activities of Tunisian *Thymus capitatus*. *Journal of Functional Foods*. 4: 661 –669.



**Judde A. 2004.** Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique: mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications ?. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*. 11(6): 414 -418.

« K »

**Kim D. k., et Lee C. Y. 2004.** Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 44: 253–273.

**Kim S. J., Murthy H. N., Hahn E. J., Lee H. L., et Paek K. Y. 2007.** Parameters affecting the extraction of ginsenosides from the adventitious roots of ginseng (*Panax ginseng*, C.A. Meyer). *Separation and Purification Technology*. 56 (3): 401-406.

**Kivçak B., et Mert T. 2002.** Preliminary evaluation of cytotoxic properties of *Laurus nobilis* leaf extracts. *Fitoterapia*.73: 242-243.

**Klaunig J. E., et Kamendulis L. M. 2004.** The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 44: 239-267.

**Ko F. N., Cheng Z. J., Lin C. N., et Teng C. M. 1998.** Scavenger and antioxidant properties of prenylflavones isolated from *Artocarpus heterophyllus*. *Free Radical Biology and Medicine*. 25: 160-168.

**Kone D. 2009.** Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes-extraction, identification d'alcaloïdes-caractérisation, quantification de polyphénols: étude de leur activité antioxydante. Thèse de Doctorat en Chimie Organique de l'université Bamako en cotutelle avec l'université Paul Verlaine de Metz. 134.

**Konig M., Scholz E., Hartmann R., Lehmann W., et Rimpler H. 1994.** Ellagitannins and complex tannins from *Quercus patroae* bark. *Journal of Natural Products*. 57: 1411-1415.

**Koppenol W. H. 2001.** The Haber-Weiss cycle, 70 years later. *Redox Report*. 6: 229–234.

**Kortenska V. D., Yanishlieva N. V., Kasaikina O. T., Totzeva I. R., Boneva M. I., et Russina I. F. 2002.** Phenol antioxidant efficiency in various lipid substrates containing hydroxy compounds. *European Journal of Lipid Sciences and Technology*. 104:513-519.

**Krinsky N. I. 1989.** Antioxidant function of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine*. 7(6): 617- 635.

**Kruidenier L., et Verspaget H. W. 2002.** Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease-radicals or ridiculous?. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*.16: 1997-2015.

- Lai H. Y., et Lim Y. Y. 2011.** Evaluation of antioxidant activities of the methanolic extracts of selected ferns in Malaysia. *International Journal of Environmental Science and Development*. 2(6): 442-447.
- Lapornik B., Prosek M., et Wondra A. G. 2005.** Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*. 71: 214-222.
- Lee J., Koo N., et Min D. B. 2004.** Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safty*. 3:21-33.
- Leitao C L. 2011.** Etude de composés à intérêt technologique et fonctionnel dans la bière. Thèse de Doctorat de l'université de Strasbourg. 154.
- Lesgards J. F. 2000.** Contribution à l'étude du statut antioxydant de l'homme: aspects chimiques et biochimiques .Thèse de doctorat en Chimie et Biochimie à l'Université Paul Cezan, Marseille. 108.
- Lhuillier A. 2007.** Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia hook Fexoliver*, *Agauria polyphlia baker (Ericaceae)*, *Tambourissatrichophylla baker (Monimiaceae)* et *Embelia concinna baker (Myrsinaceae)*. Thèse de Doctorat en Sciences des Agro ressources à l'Institut national Polytechnique de Toulouse. 200.
- Li H., Wang X., Li Y., Li P., et Wang H. 2009.** Polyphenolic compounds and antioxydant properties selected Chine wines. *Food Chemistry*. 112: 454-460.
- Lisu W., Jui-Hung Y., Hsiao-Ling L., et Wul M. J. 2003.** Antioxidant effect of methanol extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbo nucifera* Gertn). *Journal of Food and Drug Analysis*. 11(1): 60-66.
- Longaray Delmare A.P., Ivete T. M. P., Liane A., Luciana A. S., et Sergio E. 2007.** Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* and *Salvia triloba* cultivated in south Brazil. *Food chemistry*. 100: 603-608.
- Lu M., Yuan B., Zeng M., et Chen J. 2011.** Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in china. *Food Research International*. 44: 530–536.
- Lubec G. 1996.** The hydroxyl radical: from chemistry to human disease. *Journal of Investigative Medicine*. 44: 324-346.
- Luigia L., et Giuseppe V. 2005.** Anthocyanins from Bay (*Laurus nobilis* L.) Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(20): 8063–8067.

**Liyana-Pathirana C. M., et Shahidi F. 2006.** Antioxidant properties of commercial soft and Hard winter wheats (*Triticum aestivum* L) and their milling fractions. Journal of the Science of Food and Agriculture 86: 477–485.

« M »

**Macheix J. J., Fleuriet A., et Sarni-Manchado P. 2006.** Composés phénoliques dans la plante-structure, biosynthèse, répartition et rôles. In: « Les polyphénols en agroalimentaire ». Ed. Tec &Doc. Lavoisier. 1-26.

**Mahakunakorn P., Tohda M., Murakami Y., Matsumoto K., et Atanabe H. 2004.** Antioxidant and free radical scavenging activity of Choto-san and its related constituents. Biological Pharmaceutical Bulletin. 27: 38-46.

**Maksimovic M., DAnijela V., Mladen M., Marija E. S., Sabaheta A., et Sonja S. Y. 2007.** Effet of the environmental condition on essential oil profile in two dinaric *Salvia* species: *Salvia brachydon vandas* and *Salvia officinalis* L. Biochemical Systematics and Ecology. 35:473-478.

**Malien-Aubert C., et Amiot-Carlin M. 2006.** Pigments phénoliques-structures, stabilité, marché des colorants naturels et effets sur la santé. In: « les polyphénols en agroalimentaire ». Ed. Tec &Doc. Lavoisier. Paris. 295-339.

**Mamadou B. 2002.** Actions pharmacologiques des tanins. Thèse de Doctorat en Pharmacie de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar. 57.

**Marc F., Davin A., Deglène-Benbrahim L., Ferrand C., Baccaunaud M., et Fritsch P. 2004.** Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. Médecine/Sciences. 20(4): 458-463.

**Marfak A. 2003.** Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides. Thèse de Doctorat de l'université de Limoges. 186.

**Marongiu B., Porcedda S., Piras A., Rosa A., Deiana M., et Dessi A. 2004.** Antioxidant Activity of Supercritical Extract of *Melissa officinalis* Subsp. *Officinalis* and *Melissa officinalis* Subsp. *Inodora*, Phytotherapy Research .18: 789-792.

**Marston A . 2011.** Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. Journal of Chromatography A. 1218(19) :2676-2683.

**Martha E. G. P. 2008.** Caractérisation de composés phénoliques des extraits de ramilles du bouleau jaune: Etude de leur capacité antioxydante. Thèse de Doctorat de l'université de Laval. 115.

- McGarvey D. J., El-Agamey A., et Cantrell A. 2001.** Nanosecond laser flash photolysis and time-resolved resonance raman spectroscopy of carotenoid neutral radicals. Central Laser Facility Annual Report. 92-93.
- Meziti A., Meziti V., Boudiaf K., Benboubetra M., et Bouriche H. 2012.** Polyphenolic Profile and Antioxidant Activities of *Nigella Sativa* Seed Extracts *In Vitro* and *In Vivo*. World Academy of Science. Engineering and Technology. 64 :24-32.
- Miliauskas G., Venskutonis P. R., et Van Beek T. A. 2004.** Screening of radical scavenging.
- Mohammedi Z. 2012.** Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales de la région nord et sud ouest de l'Algérie. Thèse de Doctorat en Biologie de l'Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. 170.
- Mokhtarpour A., Naserian A. A., Valizadeh R., Danesh Mesgaran M., et Pourmollae F. 2014.** Extraction of Phenolic Compounds and Tannins from Pistachio By-products. Annual Research and Review in Biology .4(8): 1330-1338.
- Mole S., et Waterman P. G. 1987.** A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies II. Techniques for biochemically defining tannins. Oecologia. 72: 148-156.
- Moure A., Cruz J. M et Franco D. 2001.** Natural antioxidants from residual sources. Food Chemistry 72: 45-171.
- Mulier B., Rahman I., Watchorn T., Donaldson K., MacNee W., et Jeffery P. K. 1998.** Hydrogen peroxide-induced epithelial injury: the protective role of intracellular nonprotein thiols (NPSH). European Respiratory Journal .11: 384-391.
- Muñiz-Márquez D. B., Martínez-Ávila G. C., Wong-Paz J. E., Belmares-Cerda R., Rodríguez-Herrera R., Aguilar C. N. 2013.** Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. Ultrasonics Sonochemistry 20: 1149–1154.
- Murphy M. P., Packer M. A., Scarlett J. L., et Martin S. W. 1998.** Peroxynitrite: a biologically significant oxidant. General Pharmacology.31: 179-186.

« N »

- Naczk M., et Shahidi F. 2006.** Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 1523-1542.
- Nagy T. O., Solar S., Sontag G., et Koenig J. 2011.** Identification of phenolic components in dried spices and influence of irradiation. *Food Chemistry*. 128 (2): 530–553.
- Nakatani N. 2000.** Phenolic antioxidants from herbs and spices. *Biofactors* 13(1-4), 141-146.
- Nawaz H., Shi J., Mittal G. S., et Kakuda Y. 2006.** Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*. 48(2): 176-181.
- Ncube N. S., Afolayan A. J., et Okoh A. I. 2008.** Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology* 7(12): 1797-1806.
- Niki E., Kawakami A., Saito M., Yamamoto Y., Tsuchiya J., et Kamiya Y. 1985.** Effect of phytyl side chain of Vitamin E on its antioxidant activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 260(4): 2191-2196.
- Nwuha V. 2000.** Novel studies on membrane extraction of bioactive components of green tea in organic solvents. *Journal of food Engineering*. 44: 233-238.

« O »

- Oomah B. D., Caspar F., Malcolmson L. J., et Bellido A. S. 2010.** Phenolics and antioxidant activity of lentil and pea hulls. *Food Research International*. 44: 436-441.

« P »

- Paabo M., Bates R. G., et Robinson R. A. 1966.** Dissociation of Acetic Acid-d<sub>3</sub> in Aqueous Solution and Related Isotope Effects from 0 to 50°. *The Journal of Physical Chemistry*. 70(2) 540-543.
- Papas A. M. 1998.** Vitamin E: Tocopherols and Tocotrienols. In: « Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health ». Ed. CRC Press. 189-210.

- Pastre J. O. C. 2005.** Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de Doctorat à l'Université de Paul-Sabatier de Toulouse. 117.
- Pastre J., et Priymenko N. 2007.** Intérêt des antioxydants de l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 158(4): 180-189.
- Patrakar R., Mansuriya M., et Patil P. 2012.** Phytochemical and Pharmacological Review on *Laurus Nobilis*. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*. 1(2): 2277-5005.
- Pawlowska A. M., De Leo M., et Braca A. 2006.** Phenolics of *Arbutus unedo L.* (Ericaceae) fruits: Identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (26): 10234-10238.
- Penchev P. I. 2010.** Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse de Doctorat en Génie des procédés et de l'Environnement à l'Institut national polytechnique de Toulouse. 239.
- Pietta P. G. 2000.** Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. 63:1035-1042.
- Pharmacopée européenne. 2008.** Monographie 6ème édition. 1878.
- Pincemail J., Defraigne J. O., Limet R., et Meurisse M. 1998.** Antioxydants et prévention des maladies cardiovasculaires. La vitamine C. *Medi-Sphere*. 99: 1-3.
- Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., et Defraigne J-O. 2002.** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante *Physiological action of antioxidant defences*. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 16: 233-239.
- Potterat O. 1997.** Antioxydant and free radical scavengers of natural origin. *Current Organic Chemistry*. 1: 415-440.
- Pszczola D. E. 2002.** Beefing up innovation for meat and poultry ingredients. *Food Technology*. 56(3): 54-66.

« R »

- Radulescu V., Silvia C., et Eliza O. 2004.** Capillary gas chromatography-mass spectrometry of volatile and semi volatile compound of *salvia officinalis*. *Journal of Chromatography A*. 1027: 121-126.
- Ramu G., Mohan G. K., Jayaveera K. N., Dhanapal S. P., et Senthilkumar G. 2012.** Preliminary phytochemical and antioxidant study of hydroalcoholic extracts from selected genera of Indian Lamiaceae. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 685-688.

- Rao C. V. 2004.** Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. *Mutation Research*.555: 107-119.
- Rao A. V., Ray M. R., et Rao L. G. 2006.** Lycopène. *Advances in Food and Nutrition Research*. 51: 99-164.
- Rasmy N. M., Hassan A. A., Foda M. I., et El-Moghazy M. M. 2012.** Assessment of the antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L.) extracts on the shelf life of mayonnaise. *World Journal of Dairy and Food Sciences* 7(1): 28-40.
- Ribeiro M. A., Bernardo-Gil M. G., et Esquivel M. M. 2001.** *Melissa officinalis* L.: study of antioxidant activity in supercritical residues. *Journal of Supercritical Fluids*. 21: 51 –60.
- Ribereau–Gayon P. 1968.** Notion générale sur les composés phénoliques. In : « Les composés phénoliques des végétaux ». Ed. Dunod. 1-40.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., et Paganga, G. 1996.** Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20(7): 933–956.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J., et Paganga G. 1997.** Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*. 2(4): 152-158.
- Richard T., Lefeuvre D., Descendit A., Quideau S., et Monti J. P. 2006.** Recognition characters in peptide-polyphenol complex formation. *Biochemical and Biophysical Acta*. 1760:951-958.
- Rivera D., et Obon C. 1995.** The ethnopharmacology of Maderia and Porto Santo Islands. A Review. *Journal of Ethnopharmacology*. 46: 73-93.
- RobyM. H. H., Sarhan M. A., Selim K. A. H., et Khalel K. I. 2013.** Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris*L.), sage (*Salvia officinalis*L.), and marjoram (*Origanum majorana*L.) extracts. *Industrial Crops and Products*. 43: 827–831.
- Roger K. G., Christelle A. N., Akhanovna M. B. J., et Yves-Alain B. 2011.** CCM d’extraits sélectifs de 10 plantes utilisées dans le traitement traditionnel du cancer du sein en Côte d’Ivoire. *European Journal of Scientific Research*. 63(4): 592-603.
- Ryan D., Antholovich M., Prenzler P. D., Robard K., et Lavee S. 2002.** Biotransformations of phenolic compound in *olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*. 92: 147-176.

- Sabir M. A., Sosulski F. W., et Finlayson A. J., 1974.** Chlorogenic acid-protein interactions in sunflower. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 22: 575-578.
- Saiga A., Tanabe S., et Nishimura T. 2003.** Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(12): 3661–3667.
- Santoso J., Yoshie-Stark Y., et Suzuki T. 2004.** Anti-oxidant activity of methanolextracts from Indonesian seaweeds in an oil emulsion model. *Fisheries Science*. 70(1): 183–188.
- Sarni-Manchado P., et Cheynier V. 2006.** Structures phénoliques et goût. In : « les polyphénols en agroalimentaire ». Ed. Tec & Doc. Lavoisier. Paris. 89-134.
- Savova M., Kolusheva Stourza T. A., et Seikova I. 2007.** The use of group contribution method for predicting the solubility of seed polyphenols of *Vitis Vinifera L.* *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*. 42: 295-300.
- Saulnier L., Vigouroux J., et Thibault J. F. 1995.** Isolation and caractérisation of fenuloylated oligosacharides from maize bran. *Carbohydrate Research*. 272: 241-253.
- Seigler D. S., Seilheimer S., Keesy J., et Huang H. F. 1986.** Tannins from four common *Acacia* species of Texas and northeastern Mexico. *Economic Botany*. 40(2): 220-232.
- Shahidi F., Janitha P.K., et Wanasundara P. 1992.** Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 32: 67-102.
- Shan B., Cai Y. Z., Sun M., et Corke H. 2005.** antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(20): 7749–7759.
- Simic G. M., et Jovanovic S.V. 1989.** Antioxidation mechanisms of uric acid. *Journal of the American Chemical Society*. 111(15): 5778-5782.
- Simon C. 2003.** Structure et dynamique de protéines de la salive humaine en interaction avec les tanins du vin de Bordeaux. Thèse de Doctorat en Sciences Chimiques de l'Université de Bordeaux. 188.
- Škerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hraš A., Simonič M., et Knez Ž. 2005.** Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. 89: 191-198.
- Slater A. F., Stefan C., Nobel I., Van Den Dobbelen D. J., et Orrenius S. 1995.** Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicology Letters*. 82/83: 149-153.



- Smic M., Kundakovic T., et Kovacevic N. 2003.** Preliminary assay on the antioxidant activity of *Laurus nobilis* extracts. *Fitoterapia*.74: 613-616.
- Stagos D., Portesis N., Spanou C., Mossialos D., Aligiannis N., Chaita E., Panagoulis C., Reri E., Skaltsounis L., Tsatsakis A. M., et Kouretas D. 2012.** Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food and Chemical Toxicology*. 50: 4115–4124.
- Stalikas C. D.2007.** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*. 30: 3268–3295.
- Stöckigt J., Sheludko Y., Unger M., Gerasimenko I., Warzecha H., et Stöckigt D. 2002.** High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic –electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Review Journal of Chromatography A*. 967: 85–113.
- Surveswaran S., Cai Z. Y., Cark H., et Sun M. 2007.** Systematic evaluation of natural phenolic antioxidant from 133 indian medicinal plants. *Food Chemistry*. 102: 938-953.
- Svoboda K. P., et Hampson J. B. 1999.** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidants, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. In: « Plant Biology Department ». Ed. SAC Auchincruive. Scotland. UK. 1-17
- Swain S. D., Rohn T. T., et Quinn M. T.2002.** Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. *Antioxidants and Redox Signaling*. 4: 69-83.

« T »

- Then M., Szöllösy R., Vásárhelyi-Perédi K., Szentmihályi K. 2004.** Polyphenol, mineral element content and total antioxidant power of sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. *Acta horticulturae*. 629: 123-130.
- Thérond P., et Blache D. 2005 a.** Cibles lipidiques des radicaux libres dérivés de l'oxygène et de l'azote-Effets biologiques des produits d'oxydation du cholestérol et des phospholipides. In : « Radicaux libres et stress oxydant ». Ed. Lavoisier. Paris.113-146.
- Thérond P., et Bonnefont-Rousselot D. 2005 b.** Systèmes antioxydants endogènes. In : « Radicaux libres et stress oxydant ». Ed. Lavoisier. Paris. 87-111.
- Tian F., Li B., Ji B., Yang J., Zhang G., Chen Y., et Luo Y. 2009.**Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. *Food Chemistry*. 113(1): 173-179.

**Tsai M. C., Song T. Y., Shih P. H., et Yen G. C. 2007.**Antioxidant properties of water soluble polysaccharides from *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. Food Chemistry. 104: 1115-1122.

**Turkmen N., Sari F., et Velioglu Y. S. 2006.** Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. Food Chemistry. 99(4): 835-841.

« V »

**Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., et Mazur M.2006.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions.160: 1-40.

**Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D., Mazur M., et Telser J. 2007.**Free radicals and antioxydants in normal physiological functions and human diseases. International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 39: 44-84.

**Van de Braak S. A. A. J., et Leijten, G. C.J .J. 1999.**Essential oils and oleoresins: a survey in the Netherlands and other major markets in the European Union. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries. Rotterdam. 116.

**Velázquez J. D. A., et Zevallos L.C. 2009.**Correlations of antioxidant activity against phenolic content revisited: a new approach in data analysis for food and medicinal plants. Journal of Food Science.74: 107-113.

**Vincken J. P., Heng L., De Groot A., et Gruppen H. 2007.** Classification and occurrence in the plant kingdom. Phytochemistry 68: 275-297.

« W »

**Walingo M. 2005.** Role of vitamin C (ascorbic acid) on human health. African Journal of Food Agriculture and Nutritional Development. 5: 11-14.

**Wang M., Li J., Rangarajan M., Shao Y., LaVoie E. J., Huang T. C., et Ho C.T. 1998.** Antioxidative Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis*). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46:4869-4873.

**Wang T., Jónsdóttir R., et Ólafsdóttir G. 2009.** Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. Food Chemistry 116: 240–248.

**Wardman P., et Candeias L. P. 1996.** Fenton Chemistry: An Introduction. Radiation Research. 145(5): 523-531.

**Whiteman M., Ketsawatsakul U., et Halliwell B. 2002.** "A reassessment of the peroxy nitrite scavenging activity of uric acid." Annals of the New York Academy of Sciences. 962: 242-259.

**Wojdylo A., Oszmiański J., et Czemerys R. 2007.** Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry. 105: 940-949.

**Wong S. P., Leong L. P., et William Koh J. H. 2006.** Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. Food Chemistry. 99: 775-783.

« X »

**Xu B. J., et Chang S. K. 2007.** A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. Journal Food Science. 72: 159-166.

**Xiuzhen H., Shen T., et Hongxiang L. 2007.** Dietary polyphenols and their biological significance. International Journal. Molecular Sciences. 8: 950-988.

« Y »

**Yadav R., et Agarwala M. 2011.** Phytochemical analysis of some medicinal plants. Journal of Phytology. 3(12): 10-14.

**Yakhlef G. 2010.** Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de *Thymus vulgaris* L. et *Laurus nobilis* L. Mémoire Magister en biochimie appliqué de l'université de Batna. 81.

**Yakhlef G., Laroui S., Hambaba L., Aberkane M-C., et Ayachi A. 2011.** Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle. Phytothérapie. 9: 209-218.

**Yang Y., et Zhang F. 2008.** Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. Ultrasonics Sonochemistry. 15(4): 308-313.

**Yildirim A., Mavi A., et Kara A. A. 2001.** Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49(8): 4083-4089.

« Z »

**Zenk M. H., et Juenger M. 2007.** Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry Review*. 68: 2757-2772.

**Zeyada N. N., et Zeitoun M. A. M., et Barbary O. M. 2007.** Extraction ,identification and evaluation of antioxidant activity in some herbs and spices. *Journal of Food Science and Technology*. 4(2): 27-39.

**Zhao H., Fan W., Dong J., Lu J., Chen J., Shan L., Lin Y., et Kong W. 2008.** Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. *Food Chemistry*. 107: 296-304.

**Zheng W., et Wang S. Y. 2001.** Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 49(11): 5165-5170.

# **Annexes**

**Annexe 1 : mode opératoire de la détermination de la composition chimique**

**-Détermination de la teneur en cendre:**

Le taux d'humidité de la poudre végétale est déterminé en même temps que le dosage.

2g(P) de l'échantillon broyé sont introduit dans des creusets placés dans un four à moufle à 550°C pendant 5 Heures. Après refroidissement dans un dessiccateur ; le poids des creusets avec les cendres (p2) est pesé.

Les résultats sont exprimés en g de cendre /100 g du poids sec et sont calculé selon la formule suivante :

$$Tc (\%) = \frac{P2-P1}{P} \times 100$$

Tc : teneur en cendre (%).

P1 : poids du creuset vide (g).

P2 : poids du creuset + échantillon après l'incinération. (g)

P : poids de l'échantillon (g).

**- Détermination de la teneur en cellulose brute**

La teneur en eau des 2 échantillons est déterminée en même temps que l'extraction de la cellulose brute.

1 g(P<sub>0</sub>) environ de poudre est introduit dans un ballon contenant 100ml d' H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,255 N), chauffé sous reflux pendant exactement 30 minutes à partir du début de l'ébullition. Après filtration sur papier filtre, le résidu est rincé 3 fois avec l'eau distillée chaude. Puis le résidu est repris dans 100ml de solution NaOH(0,313 N) et bouillis ; après 30 minutes d'ébullition le contenu du ballon est filtré sur creuset ( porosité 3) , puis rincé trois fois avec l'eau distillée chaude suivis d'un rinçage avec l'eau distillée froide. Le résidu subit 3 lavages avec 25ml d'acétone avant d'être séché à 100°C jusqu'à un poids constant. Le résidu sec est pesé (P<sub>1</sub>) puis incinéré à 550°C pendant 5h et repesé (P<sub>2</sub>) après refroidissement dans un dessiccateur.

$$\% \text{ Cellulose brute} = \frac{P2-P1}{P0} \times 100$$

**P<sub>0</sub>** : poids sec d'échantillon

**P<sub>1</sub>** : poids du résidu sec

**P<sub>2</sub>** : poids du résidu après incinération à 550°C

**-Détermination de la teneur en matière grasse :**

3 g du matériel végétal sont introduites dans une cartouche du Soxhlet. Le solvant (éther de pétrole) est introduit dans l'extracteur jusqu'à ce qu'il siphonne dans le ballon puis chauffé pour démarrer l'extraction. L'extraction est arrêtée lorsque le liquide

entourant la cartouche devient clair, cette couleur indique que le solvant n'extrait plus rien du solide. Le contenu du ballon (solvant plus matières solubilisées) est ensuite traité à l'aide du Rotavapor pour éliminer le solvant et sécher à l'étuve à 105°C pendant 4 heures, puis le résidu est pesé pour déterminer la quantité de la matière grasse.

**-Détermination de la teneur en protéines brut**

Le pourcentage en azote totale est déterminé avec un appareil Nitrogen analyser. La teneur en protéines bruts est déterminée selon la formule suivante

$$\% \text{ protéine brut} = \% \text{ N} \times 6,25$$

**-Extraction et dosage des Sucres solubles :**

**Extraction**

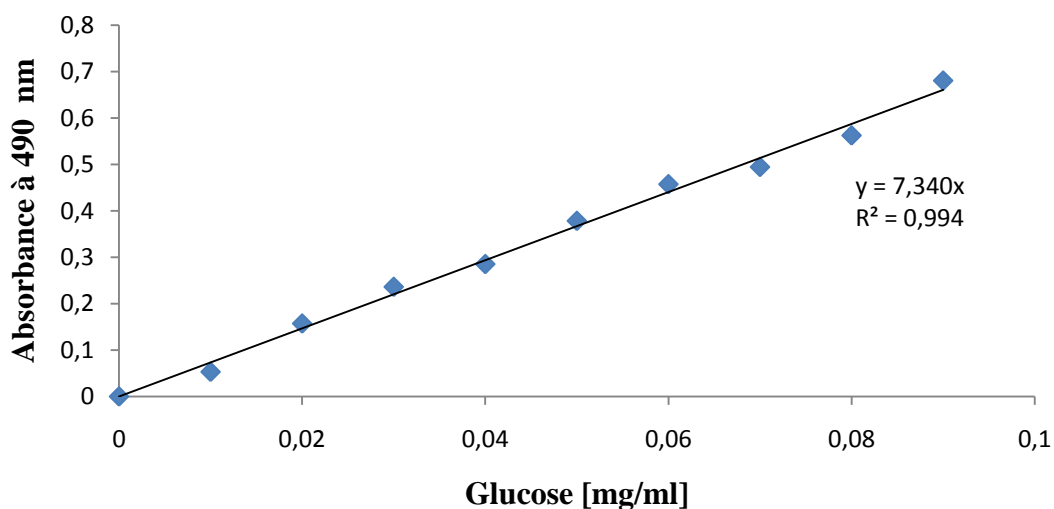
50 mg de poudre végétale est extraite trois fois avec 5 ml d'Ethanol 80 %(V/V), en faisant bouillir les tubes fermés dans un bain marie à 95°C pendant 10 min. Après chaque extraction les tubes ont été centrifugés à 2500 tr /min pendant 15 min ; les surnageants des trois extractions sont filtrés et les trois filtrats sont combinés (Chow et Landhäuser, 2004).

**Dosage :**

1 ml d'extrait est introduit dans un tube, auquel sont ajoutés 1ml de solution de phénol (5%, p/v) et 5 ml d'acide sulfurique (96 %).Après agitation, les tubes sont maintenus pendant 5 minutes à 100 °c. Après, un séjour de 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité l'absorbance est lue à 490 nm, la coloration est stable pendant 3 à 4 heures.

La teneur en sucre est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage (Figure1) obtenue avec le Glucose utilisé comme standard.

Les résultats sont exprimés en g équivalent de Glucose /100g de matière sèche (Eq g Glucose /100g MS).



**Figure 1: Dosage des sucres solubles**

## Annexe 2 : Courbe d'étalonnage

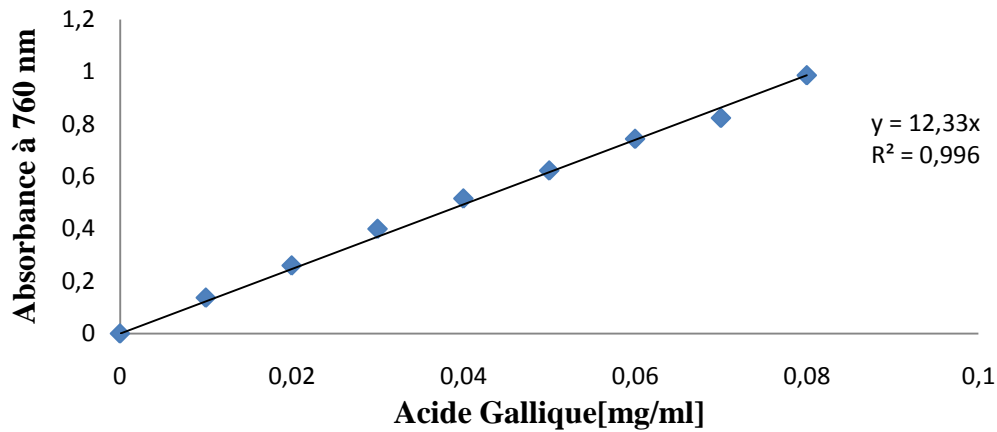


Figure 02: Dosage des phénols totaux solubles

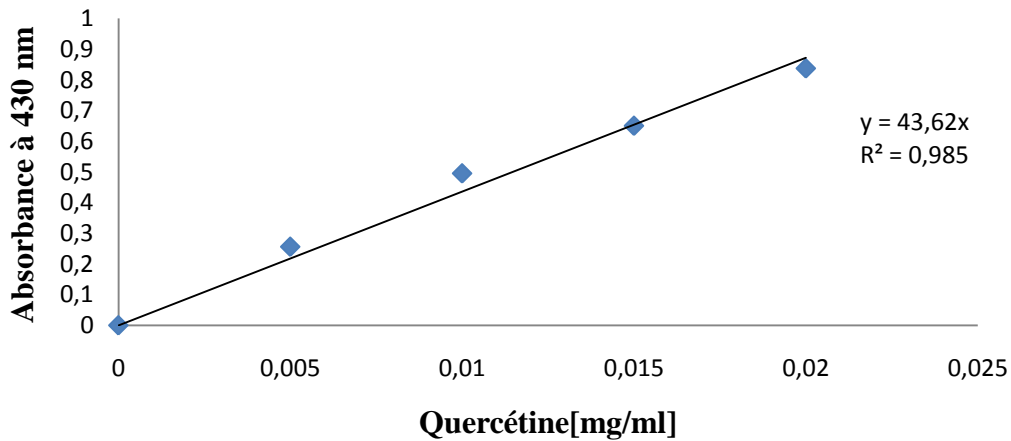


Figure 3 : Dosage des flavonoïdes

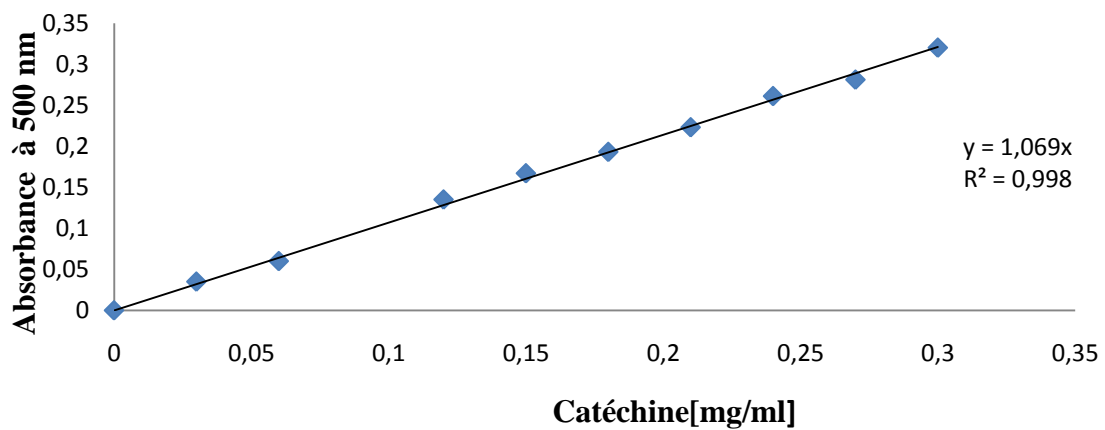


Figure 4: Dosage des tanins condensés



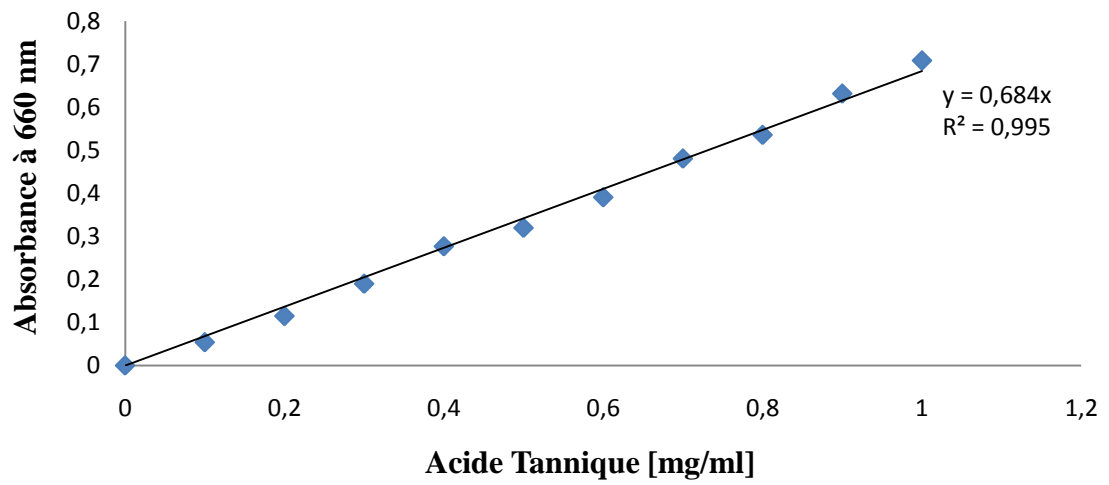


Figure 5 : Courbe d'étalonnage des tanins hydrolysables

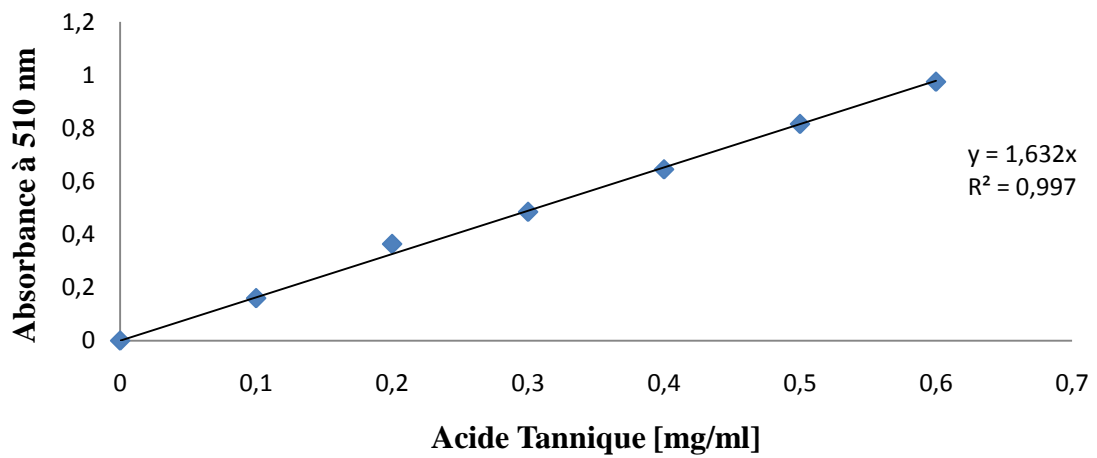


Figure6 : Courbe d'étalonnage des Tanins attachés à la BSA

**Annexe 3 : préparation des solutions**

<b>Solution</b>	<b>Réactifs</b>
Folin ciocalteau 1/10	10 ml de folin ciocalteau à +90ml d'eau distillée
Tampon Acétate (0,2M acide acétique et 0,17M NaCl)	11.4 ml D'acide acétique +9.86 g NaCl +800ml eau distillé le pH est ajusté à 4.9 avec NaOH (4N) le volume est ajusté à 1L avec l'eau distillée.
NaOH (4N)	160g NaOH dans un litre d'eau distillée.
HCl (0,01M)	0.085ml d'HCl 36% est ajusté à 1litre avec l'eau distillée.
FeCl <sub>3</sub> (0,01M dans HCl 0,01 M)	Dissoudre 1,62gde FeCl <sub>3</sub> dans 1litre HCl à 0,01 M
BSA	1mg de BSA dans 1ml du tampon acétate
Solution SDS /TEA	-50ml Triéthanolamine + 10g SDS ajuste à 1 L avec l'eau distillée.
Solution de phénol 5% (p/v)	5 g de phénol sont dissout dans 100ml d'eau distillée, la solution doit être incolore et limpide, stable à température ambiante.
Ferrozines 5mM	0,123g ferrozines dans 50 ml d'eau distillé
FeCl <sub>2</sub> à 2mM	0,025g de FeCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O dans 100ml d'eau distillé
Vanilline-Acide sulfurique (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	1g vanilline +2ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> dans 1000 ml de methanol
Solution DPPH (65µM/l)	0,0024 g DPPH dans 100 ml methanol pur
Ferricyanure de potassium ( K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> )1%	1g de K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> dans 100mld'eau distillée

Acide trichloracétique(TCA) 10%	10g de TCA dans 100ml d' eau distillée.
Chlorure ferrique (FeCl <sub>3</sub> ) à 0,1%	0.1g de FeCl <sub>3</sub> dans 100 ml d'eau distillée.
Soude (NaOH ) à 0.313N	12.5 g NaOH dans 1000ml d'eau distillée.
Acide sulfurique (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) à 0.255N	7ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 96-98% ajustés à 1000ml avec l'eau distillée.
Chlorure d' Aluminium (ALCl <sub>3</sub> 2%,P/V)	2g ALCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O dans 100ml de méthanol
Vanilline a 5.8 % (P/V)	5.8g de vanilline dans 100ml de méthanol
HCl 24%	24ml d'HCl concentré ajusté à 100 ml avec du méthanol.
Réactif vanillineHCl	Ça préparation est faite juste avant utilisation en mélangeant à volume équivalant la solution de vanilline à 5,8% et la solution d'HCl 24%.
Réactif de Bouchardat	2g d'iode bisublimé (I <sub>2</sub> ) + 2 g de KI dans 100ml d'eau distillée
Tampon phosphate (0,2M, pH 7)	0.68 g de KH <sub>2</sub> PO <sub>2</sub> dans 100 ml d'eau distillée. 0.87g de K <sub>2</sub> HPO <sub>2</sub> dans 100 ml d'eau distillée. la solution acide est ajuster avec la solution basique jusqu'à l'obtention d'un pH 7.
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> à 7.5%	7.5 g dans 100 ml de l'eau distillée
Réactif de Liebermann et Burchard	5 ml d'acétique anhydride +5 ml d'acide sulfurique concentré + et 50 ml d'éthanol (Préparé à basse température et juste avant utilisation ).

## Résumé

Les plantes aromatiques sont utilisées depuis l'antiquité comme source d'assaisonnement ou comme remède en médecine traditionnelle. Le but de ce travail est d'évaluer d'une part la teneur en composés phénoliques de *Salvia officinalis* (Lamiaceae) et *Laurus nobilis* (Lauraceae) et du potentiel antioxydant d'extraits bruts éthanoliques et aqueux et de quelques fractions (isolées par CCM) de ces deux plantes d'autre part. La teneur en composés phénoliques dépend aussi bien de l'extrait que de la plante, les extraits hydro-alcooliques révélant une teneur en composés phénoliques plus élevée que les autres extraits. Le criblage phytochimique sur plaque CCM a permis de mettre en évidence la présence des acides phénoliques, flavonoïdes et tanins dans les extraits des deux plantes. Ce criblage phytochimique montre une grande variabilité en teneur des molécules entre les extraits aqueux et éthanoliques pour une même plante. Les extraits éthanoliques ont montré un pouvoir anti radicalaire du DPPH, réducteur du fer et inhibiteur du blanchiment de la  $\beta$ -carotène plus importants que les extraits aqueux. Ces derniers ont révélé le plus grand pouvoir chélateur du fer pour les deux plantes étudiées. Les fractions Rosmarinique et flavonoïque de sauge ont manifesté la plus grande activité antioxydante.

**Mots clés :** *Laurus nobilis* L., *Salvia officinalis*, composés phénoliques, Extrait brut, fraction, antioxydant, activité antioxydante, CCM.

### Abstract :

Herbs have been used since antiquity as a source seasoning or as a remedy in traditional medicine. The purpose of this study was to evaluate both the phenolic content of *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae) and *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) and the antioxidant potential of aqueous and éthanoliques crude extracts and fractions (isolated by TLC) both of these plants in the other hand. The content of phenolic compounds depends on both the extract and plant, hydro- alcoholic extracts revealed a higher content of phenolic compounds than other extracts. The phytochemical screening on TLC plate has highlighted the presence of phenolic acids, flavonoids and tannins in the extracts of the both plants. This phytochemical screening shows great variability in content of molecules between the aqueous and ethanol extracts of the same plant. The ethanol extracts showed anti-radical power of DPPH, reducing power of iron and inhibitor of bleaching  $\beta$ -carotene greater than the aqueous extracts. The latter showed the greatest power of iron chelating for both plants studied. Rosmarinic acid and flavonoid fractions of sage showed the highest antioxidant activity.

**Key words:** *Laurus nobilis* L., *Salvia officinalis* L., phenolic compounds, Crude extract, fraction, antioxidant, antioxidant activity, TLC.

## المخلص

يعود استخدام النباتات العطرية كتوابل أو علاج في الطب التقليدي الي العصور القديمة. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم كل من المحتوى الفينولي لنبتتين عطريتين *Laurus nobilis* L. و *Salvia officinalis* L من جهة و النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات الايثانولية والمائية الخامة وبعض الأجزاء المعزولة من هذه الأخيرة على لوح CCM من جهة اخرى. أوضحت النتائج ان المحتوى الفينولي تابع للنبتة و العصارة. في ضوء الفحص الكيميائي النباتي على لوح CCM تبين احتواء كل من النبتتين على الأحماض الفينولية، الفلافونويدات و الطانات، لقد اظهر هذا الفحص تباين كبير في المحتوى من المركبات بين المستخلصات الايثانولية والمائية لنفس النبتة. نتائج النشاط المضاد للأكسدة بين أن المستخلصات الايثانولية الخامة أبرزت نشاط ارجاع الجذر الحر DPPH والحديد وكبح ابيض  $\beta$ -carotene اكبر من نشاط المستخلصات المائية. في حين ان هذه الأخيرة اظهرت اعظم قوة لخلب الحديد. إن الجزيئات الروزمارينية و الفلافونويدية للنبتة *Salvia officinalis* اظهرت نشاط مضاد للأكسدة كبير.

**الكلمات الرئيسية:** *Salvia officinalis* L., *Laurus nobilis* L., المركبات الفينولية, مضادات الأكسدة, نشاط مضاد للأكسدة, جزيئات, المستخلصات الخامة, CCM.