

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université ABDERRAHMANE MIRA-Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la vie
Département de Biologie Physico-chimique

Mémoire de Master

Filière: Biologie

Option : Pharmacologie Moléculaire

Thème

Etude comparative de l'extraction assistée par micro-ondes et extraction conventionnelle : Effet sur les antioxydants de *Paronychia argentea*

Présenté par :

M^{elle} Ait Abdeslam Kahina

M^{elle} Ait Atmane Sihem

Membre de Jury

Grade et lieu

Président : M^r OUCHEMOUKH S.

M.C.B (U.A.M.B)

Promotrice : M^{me} BOULEKBECHÉ L.

M.C.B (U.A.M.B)

Co-promotrice : M^{elle} SAIT S.

Doctorante (U.A.M.B)

Examinatrice : M^{me} ABDARRAHIM S.

M.A.A (U.A.M.B)

Examineur : M^r HAMOUM M.

M.A.A (U.A.M.B)

Année 2012/2013

Remerciements

Nous remercions le bon DIEU tout puissant de nous avoir accordé volonté et patience dans l'accomplissement de ce travail.

Nos remerciements s'adressent en premier lieu à notre promotrice M^{me} BOULEKBECHÉ L. maître de conférences à l'université Bejaia, pour avoir accepté de nous encadrer et de nous diriger. Qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde gratitude. sans oublier les efforts fournis par notre co-promotrice SAÏT S. afin d'améliorer ce modeste travail.

Nos plus sincères remerciements vont également à Mr OUCHEMOUKH S. maître de conférences à l'université de Bejaia qui nous a fait le grand honneur de présider le jury et d'évaluer ce mémoire.

Nos vifs remerciements s'adressent aussi à M^{me} ABDERRAHIM S. et Mr HAMOUM M. d'avoir acceptés d'examiner ce mémoire.

Nous tenons également à remercier nos enseignants M^{elle} ADRAR S. et Mr Harfi T. qui nous ont énormément soutenues par leurs précieux conseils et encouragements.

On adresse également nos remerciements aux ingénieurs Mme MESSAOUDENE F. et Mr BOUCHENOVA F. qui nous ont ouvert les portes de laboratoire de biophysique et nous ont fourni les meilleures conditions du travail.

Ces remerciements ne seraient pas complets si n'apparaissait pas tous les membres du département physicochimique que nous avons eu l'occasion de côtoyer durant notre étude et qui contribuent, par leur bonne humeur, à créer un cadre travail agréable.

Nos remerciements vont à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A mon regretté père, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde dans son vaste paradis, repose en paix papa.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; ma très chère maman que j'aime.

A mes très chers frères Farid, Karim, Tarik et ma petite sœur Lamia à qui je souhaite beaucoup de réussites.

A toute la famille Ait Abdeslam.

A mon très cher fiancé Adel et toute sa famille.

A ma collègue et amie Sihem.

KAFINA



Dédicaces



Je dédie ce travail

*A mes parents,
Pour votre cœur qui m'a tant donné
Pour vous qui m'avez tant aimé.
A vous maman et papa que je dois ma réussite.*

*A mes chères sœurs Sabrina, Souhila, Yasmîna et mon cher
petit frère Lounes,
L'éducation est un atout pour la réussite,
Accrocher vous à vos études.
C'est la vie et l'avenir.*

*A ma famille sportive,
Le sport est mon esprit après les études,
C'est un gain de santé et d'expérience,
Un grand merci a toi mon entraîneur.*

*A ma chère collègue Kahina et sa famille
A mes grands parents,
A toute la famille AIT ATMANE,
A la promotion pharmacologie moléculaire.*

SIHEM

Sommaire

Remerciements	i
Dédicaces	ii
Sommaire	vi
Liste des tableaux	vi
Liste des figures	vii
Liste des abréviations	viii
Glossaire	ix
Introduction	1

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Description botanique et biologique de *Paronychia argentea*

I.1. Origine et définition	3
I.2. Classification de l'espèce	3
I.3. Description botanique	4
I.4. Habitat	4
I.5. Vertus thérapeutiques de <i>Paronychia argentea</i>	4
I.6. Composition chimiques	5
I.6.1. Composés phénoliques	6
I.6.2. Saponines	7

Chapitre II : Méthodes extraction des molécules actives

II.1. Extraction par méthodes conventionnelles	9
II.2. Méthode d'extraction assistée par micro-ondes (EAM)	9
II.2.1. Définition des micro-ondes	9
II.2.2. Appareillage d' EAM	10
II.2.3. Principe d'extraction assistée par micro-ondes	10
II.2.4. Facteurs influençant de l' EAM	11
II.2.5. Avantages et inconvénients de EAM	11

Chapitre III : Les antioxydants

III.1. Les antioxydants	13
III.2. Sources des antioxydants	13
III.3. Localisations cellulaires des antioxydants	14
III.4. Mécanisme d'action des antioxydants	14

Partie expérimentale

Chapitre IV: Matériel et Méthodes

IV.1. Matériel végétal.....	16
IV.2.Préparation de l'échantillon	16
IV.2.1.Lavage et Séchage.....	16
IV.2.2. Broyage et tamisage	16
IV.2.3. Détermination de l'humidité	17
IV.3. Analyses des composés phénoliques.....	17
IV.3.1. Préparation des extraits	17
IV.3.2.Dosage des composés phénoliques	18
IV.3.3.Détermination de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	20
IV.4. Analyses des saponines	24
IV.4.1.Réaction de révélation des saponines.....	24
IV.4.2.Extraction des saponines	24
IV.4.3.Activités antioxydantes des saponines	24
IV.5. Analyse statistique	24

Chapitre V : Résultats et discussion

V.1.Traitement du matériel végétal.....	26
V.1.1. Test d'humidité	26
V.1.2.Rendements d'extraction.....	26
V.2. Résultats d'analyses des polyphénols	28
V.2.1. Dosage des polyphénols	28
V.2.2. Activité antioxydantes	30
V.3. Résultats d'analyse des saponines	38
V.3.1. Révélation et rendement des saponines.....	38
V.3.2. Activité antioxydante des saponines	38
Conclusion et perspectives.....	40
Références bibliographique	41

Annexe

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Quelques avantages et inconvénients de l'extraction par micro-ondes	12
II	Teneur en composés phénoliques des différents extraits	28
III	Concentrations des extraits et du BHA qui inhibent 50% de DPPH (IC50)	31
IV	Concentrations des extraits et du Trolox qui inhibent 50% d'ABTS (IC50)	33
V	Concentration des extraits et du NA ₂ EDTA qui capte 50% de Fe ₂₊ (IC ₅₀).	35
VI	Concentration réductrice (RC _{0.5}) des extraits et du standard.	37
VII	IC50 et RC0.5 de l'activité antioxydante des saponines.	39

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Photographie de <i>Paronychia argentea</i>	3
2	Structure de base des flavonoïdes	6
3	Structure générale d'un tanin hydrolysable et un tanin condensé.	7
4	Structure chimique des saponines .Squelette aglycone(A), Stéroïdien (B)	8
5	Four à micro-ondes avec ses principaux composants	10
6	Mécanisme de rupture des parois cellulaires sous l'effet des micro-ondes.	11
7	Quelques radicaux libres.	13
8	Sites d'action des nutriments antioxydants (en rouge) et des enzymes antioxydantes (en noir)	14
9	Action préventive des antioxydants	15
10	Action secondaire des antioxydants	15
11	Photographie d'un échantillon frais de <i>Paronychia argentea</i>	16
12	Poudre et partie aérienne séchée non broyée de <i>Paronychia argentea</i>	16
13	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH).	20
14	Piégeage du radical ABTS•+ par un antioxydant donneur de H•.	21
15	Mécanisme réactionnel de formation du complexe ferrozine- (Fe ²⁺).	22
16	Mécanisme réactionnel du pouvoir réducteur	23
17	Protocole d'extraction des saponines	25
18	Taux d'humidité de <i>Paronychia argentea</i>	26
19	Extraits obtenus par les différentes méthodes d'extraction.	27
20	Taux d'extractions des différents procédés d'extraction.	27
21	Pourcentage d'inhibition du radical DPPH° par différents extraits	30
22	Pourcentage d'inhibition du radical ABTS•+ par différents extraits	32
23	Pourcentage de chélation du Fe ²⁺ différents extraits	34
24	Pouvoir réducteur des différents extraits	36
25	Résultat du test de mousse	38

Liste des abréviations

ABTS: l'acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline sulfonique

BSA: Sérum Albumine Bovine

DAM: Décoction assisté par micro onde

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

Déc: Décoction

EAG: Equivalent en acide gallique

EAT: Equivalent en acide tannique

EQ: Equivalent en quercetine

ESAM: Extraction par solvant assistée par micro-ondes

Flav: Flavonoïdes

FC :Folin-Ciocalteu

Inf: Infusion

MAE : extraction assisté par microondes

ME: macération éthanolique

MS: Matière sèche

PT: Polyphenols totaux

RL : Radicaux Libres

RNS: espèces réactives dérivées d'azote

ROS: espèces réactives dérivées de l'oxygène

SDS : Dodécyl sulfate de sodium

TEA : Triéthanolamine

Glossaire

Aglycone : La partie aglycone d'un hétéroside est la partie de la molécule constituée d'un groupement non-glucidique. Ce dernier peut être un groupement alcool, phénol, soufré ou azoté.

Athérosclérose : Epaissement de la paroi intérieure des artères

Bractées : la bractée est une pièce florale qui se trouve à la base de fleur et qui entoure la base du pédoncule.

Hypocholestérolémiant : Médicament capable de faire diminuer la quantité de cholestérol dans le sang.

Magnétron : Tube dont on se sert pour émettre des courants de fréquences très élevées à l'aide d'un champ magnétique très intense et d'un champ électrique.

Noyau pyranique : un noyau pyrane est un anneau hétérocycle à six éléments constitué de cinq atomes de carbone et un d'oxygène et contenant deux doubles liaisons

Utricule : Partie du tissu cellulaire des végétaux, petites outres pleines d'air, servant à soutenir dans l'eau les feuilles et les racines de quelques plantes

L'utilisation des plantes par l'homme est une pratique antique. La majorité des habitants du globe terrestre utilisent de très nombreuses plantes comme remède en médecine traditionnelle (Bahorun, 1997). Cependant, cette utilisation ne se base sur aucun critère scientifique, elle tient compte simplement des observations au cours des siècles. Historiquement, l'extraction est une opération très importante. L'homme a toujours cherché à exploiter les ressources naturelles dont il dispose. Cette opération était utilisée dans la préparation de produits alimentaires, pharmaceutiques, drogues, teintures ou parfums où elle prend des dénominations différentes. De la percolation à l'infusion en passant par la macération, chaque terme évoque une mise en œuvre domestique d'un procédé d'extraction solide-liquide, dont le solvant est généralement de l'eau ou de l'alcool. L'extraction végétale reste une juste association entre la maîtrise de certains paramètres et la tradition (Nguyen Van, 2010).

La qualité alimentaire ou thérapeutique d'un extrait naturel est liée à l'efficacité et à la sélectivité du procédé d'extraction utilisé. Les techniques d'extraction conventionnelle souffrent d'un faible rendement; d'une durée d'extraction trop longue au cours de laquelle des problèmes de dégradation de l'extrait peuvent survenir (l'ionisation, autoxydation). Pour contourner ces difficultés, plusieurs solutions ont été proposées : la réduction de la taille des particules par broyage, diminution du temps d'extraction et optimisation des solvants. Ces différentes solutions n'ont pas répondu de façon définitive à la problématique. Pour remédier à cette problématique, on propose dans ce travail d'étudier l'intérêt de l'extraction assistée par micro-onde qui est une technique alternative très intéressante, peu coûteuse, rapide et à rendements élevés (Hao, 2002; Jaykumar, 2011).

L'utilisation des molécules antioxydantes de synthèse est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels. Désormais, de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels sont recherchées. De nombreuses molécules possédant des propriétés anti-oxydantes ont été isolées du monde végétal, toutes de nature plus ou moins phénolique.

Leurs représentants les plus connus sont: le resvératrol (un stilbénolide rencontré dans la peau de raisin), les polyphénols du ginkgo, du thé vert, et de l'huile d'olive (Hennebelle, 2004), il a été apporté récemment que la consommation du thé vert renforce le statut antioxydatif chez l'homme et protège contre les dommages oxydatifs (Khan, 2007). Comme,

Paronychia argentea est utilisée comme un thé en Algérie (Zama *et al.*, 2007 ;Bouanani 2010), il est important d'élucider le rôle de ses extraits notamment l'activité antioxydante.

Notre étude vise à évaluer l'influence des méthodes d'extractions sur les teneurs en composés phénoliques (Polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins) et l'activité antioxydante des extraits de la partie aérienne de *Paronychia argentea*. Toutefois, l'étude de l'activité antioxydante de cette espèce n'a jamais été réalisée en détail (Zama *et al.*, 2007, Gonçalves *et al.*.,2013). C'est dans ce contexte que notre travail a pris naissance, il a été développé en deux parties:

Une partie théorique qui renferme des données scientifiques classées en trois chapitres, l'un sur la description du matériel végétal utilisé « *Paronychia argentea* » et deux autres sur les méthodes d'extractions et les antioxydants ;

Une partie expérimentale est consacrée à l'étude des différentes méthodes d'extraction, le dosage des composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins), extraction des saponines ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante différents des extraits.

I.1. Origine et définition

Paronychia vient du mot grec para, « près » et onux, « ongle » car certaines espèces peuvent guérir les inflammations autour des ongles-panaris-. *Argentea* herbe avec des bractées argentées (Gubb, 1913; Beloued, 1998).

Les noms vernaculaires de cette plante diffèrent selon les pays, en Algérie elle est appelée le thé arabe (Gubb, 1913; Zama *et al.*, 2007), en Jordanie et Palestine, cette plante est appelée rejel-hamama (Abu irmaileh et Afifi, 2003; Abou El-khair *et al.*, 2010).

Le genre *Paronychia* a été décrit en 1754 par le botaniste Phillip Miller et en 1913 *Paronychia argentea* a été désignée comme espèce. La dernière révision du genre a été entreprise en 1968 par Mohammad Chaudhri de l'Université d'Utrecht. Le genre *Paronychia* compte environ 109 espèces (Ocana *et al.*, 1997).

I.2. Classification de l'espèce

La classification botanique de *Paronychia* (Figure 1) rapporté par Carmona *et al.*, (2005); Al-Bakri et Afifi, (2007); Bouanani *et al.*, (2010); Bottger *et al.*, (2011) est la suivante :

Embranchement : Spermatophytes
Sous embranchement : Angiospermes
Classe : Dicotylédones
Ordre : Caryophyllales
Famille : Caryophyllaceae
Genre : *Paronychia*
Espèce : *Paronychia argentea*



Figure 1: Photographie de *Paronychia argentea*
"Boumraou"

I.3. Description botanique

Paronychia argentea est une plante vivace herbacée de 30 à 50 cm (Hamdan *et al.*, 2004; Afifi *et al.*, 2005). C'est une herbe couchée avec un beau feuillage à reflets argentés (Gubb, 1913). Sa période de floraison est entre Janvier et Avril (Hamdan *et al.*, 2004; Afifi *et al.*, 2005; Bouanani *et al.*, 2010). Ses tiges sont longues, articulées, garnies de rameaux courts, couchées et étalées sur la terre (De Lamarck et De Candolle, 1805).

Les feuilles de *Paronychia argentea* sont petites pouvant atteindre jusqu'à 2 cm de long et 5 mm de large, opposées, sessiles, vertes ou à la fin rougeâtres, avec des pointes aiguës (Hamdan *et al.*, 2004; Afifi *et al.*, 2005). Ses fleurs sont entourées de bractées argentées à 5 sépales verts qui se terminent par une pointe, elles n'ont pas de pétales, et possèdent 5 étamines. Les fleurs sont disposées en bouquets tout le long de la plante (De Lamarck *et al.*, 1805; Beloued, 2001), son fruit est un utricule ovoïde (De Lamarck *et al.*, 1805; Ocana *et al.*, 1997; Beloued, 2001).

I.4. Habitat

Cette plante est distribuée dans l'Amérique, l'Europe, l'Asie et le Nord de l'Afrique (Ocana *et al.*, 1997). *Paronychia Argentea* est largement distribuée à l'est de l'Algérie (Zama *et al.*, 2007), elle est rencontrée dans les pâturages, les lieux arides, les plaines et les montagnes (Beloued, 2001). Elle marque une préférence pour les sols sablo-argileux mais elle peut également se rencontrer dans les sables calcaires mobiles ou consolidés de la dune littorale (Alcaraz, 1991).

I.5. Vertus thérapeutiques de *Paronychia argentea*

➤ Usage traditionnelle

Chaque culture a des antécédents d'utilisation des plantes médicinales pour guérir les maux; toutes les études sur *Paronychia argentea* montrent que la partie aérienne est la partie utilisée en médecine traditionnelle (Abu irmaileh *et al.*, 2003; Zama *et al.*, 2007; Abou El-khair *et al.*, 2010; Cario et Vallès, 2012).

En Algérie, *Paronychia argentea* est utilisée pour traiter plusieurs troubles telles que les infections respiratoires, les douleurs abdominales et les maladies rénales tels que les

calculs rénaux et l'infection des voies urinaires (Abu irmaileh *et al.*, 2003; Bouanani *et al.*, 2010), et elle est aussi utilisée comme agent antistress (Zama *et al.*, 2007).

En Jordanie ainsi qu'en Palestine, elle est utilisée pour traiter le diabète, les maladies cardiaques et les calculs rénaux (Hamdan, 2004 ; Afifi *et al.*, 2005; Carmona *et al.*, 2005).

Au Portugal, *Paronychia argentea* est utilisée comme un analgésique, en ulcère de l'estomac, l'anorexie et la flatulence (Ferreira *et al.*, 2006). Les espagnoles l'utilisent pour traiter les troubles digestifs, l'eczéma et comme agent fébrifuge (De Santaya *et al.*, 2005). Cette herbe possède une activité antimicrobienne (Al-Bakri *et al.*, 2007; Abou Elkhair, 2010), anti hypertensive (Cario et vallés, 2012) et antioxydante (Gonçalves *et al.*, 2013).

➤ Usage pharmacologique

Une étude pharmacologique réalisée sur des rats wistar traités par l'oxalate de sodium a révélé que l'administration de l'extrait butanolique de la partie aérienne de *Paronychia argentea* a réduit considérablement la taille des calculs rénaux (Bouanania *et al.*, 2010).

La toxicité aigue n'a révélé aucun symptôme toxique ou décès lors du traitement des rats wistar pendant 14 jours avec l'extrait aqueux et butanolique de *Paronychia argentea*. La DL50 est supérieure à 2000 mg / kg de poids corporel et 40 mg / kg de poids corporel, respectivement. La toxicité subaigüe n'a révélé aucune altération biochimique, hématologique et morphologique (Bouanani *et al.*, 2010).

I.6. Composition chimiques

L'analyse phytochimique de la partie aérienne de *Paronychia argentea* a révélé la présence de plusieurs composés (Abou El-khair *et al.*, 2010), ces composés ont non seulement un grand rôle fonctionnel dans les plantes, mais également un rôle très important en pharmacologie (Luthar, 1992 ; Liu *et al.*, 2011).

I.6.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des végétaux, et participent à leur défense contre les agressions environnementales. Ils regroupent un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules, qui présentent dans leur structure au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles

(OH) (Hennebelle *et al.*, 2004). Les polyphénols sont divisés en plusieurs catégories et les plus connus sont les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins (Edeas, 2007).

➤ Flavonoïdes

Le nom flavonoïde dérive du mot « *Flavus* » en latin, qui signifie jaune (Malesev et Kuntic, 2007). Ils sont formés d'un squelette de base à 15 carbones (C₆-C₃-C₆) (Figure 2), et dérivent de l'enchaînement benzo- γ -pyrone. Ce groupe comprend principalement trois familles de composés: les flavonols, les anthocyanes et les flavan-3-ols, qui se différencient par le degré d'oxydation du noyau pyranique central (Ghedira, 2005).

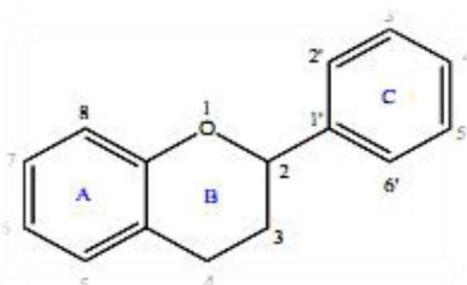


Figure 2 : Structure de base des flavonoïdes (Ghedira, 2005).

La propriété des flavonoïdes la mieux décrite est leur activité antioxydante par leur capacité à piéger les radicaux libres (Ghedira, 2005; Zama *et al.*, 2007). Ils ont aussi d'autres activités telles que: l'activité antihépatotoxique, antiallergique, anti-inflammatoire, anti-ulcérogène et anticancéreuse (Ghedira, 2005 ; Zama *et al.*, 2007).

➤ Tanins

Leur nom vient du mot français « tan » qui signifie l'écorce du chêne vert et d'autres arbres utilisés dans le tannage (Frutos *et al.*, 2004). Les tanins sont des composés phénoliques (Figure 3), solubles dans l'eau et ayant des poids moléculaires compris entre 500 et 3000 (Sereme *et al.*, 2010). Ils ont la capacité de former des complexes plus ou moins stables principalement avec les protéines, les polysaccharides, les alcaloïdes, les acides nucléiques et les minéraux. Ils sont divisés en deux grands groupes: les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Luthar, 1993; Decruyenaere *et al.*, 1996; Sereme *et al.*, 2010).

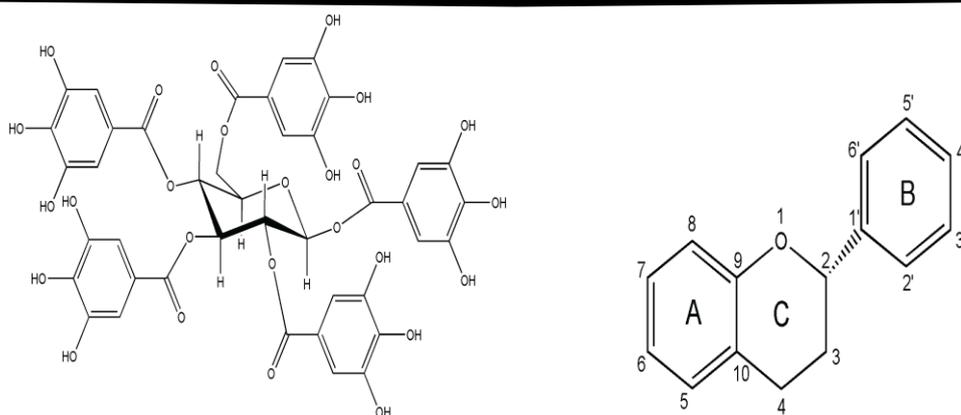


Figure3: Structure générale d'un tanin hydrolysable (Gauche) et un tanin condensé (Droite) (Sereme *et al.*, 2010).

Les tannins ont plusieurs propriétés biologiques telles que la propriété antibactérienne, anti tumorale, anti inflammatoire et antioxydante. Ce sont également des agents de conservation naturelle et aseptiques. Cependant, les tannins présentent des propriétés indésirables telles que l'inhibition des enzymes digestives (alpha amylase et les protéases) (Luthar, 1992).

I.6.2. Saponines

Saponine est un mot dérivé du latin « sapo », qui signifie savon car ses composés moussent une fois agités avec de l'eau (Bottger *et al.*, 2011). Les saponines constituent une importante classe de métabolites secondaires d'origine végétale, de masse moléculaire entre 600 à 2000 Daltons et de structure complexe (Li *et al.*, 2006 ; Bottger *et al.*, 2011).

Les saponines sont des hétérosides complexes (Figure 4) qui sont classées en deux groupes en fonction de la nature de leur squelette aglycone : le premier groupe est constitué de saponines stéroïdiennes, le deuxième est constitué de saponines triterpénoïdes (Oakenfull, 1981 ; Sparg *et al.*, 2004). Les saponines brutes apparaissent sous forme de poudre blanche, avec un goût amer, et provoquent facilement des étternuements (Bottger *et al.*, 2011).

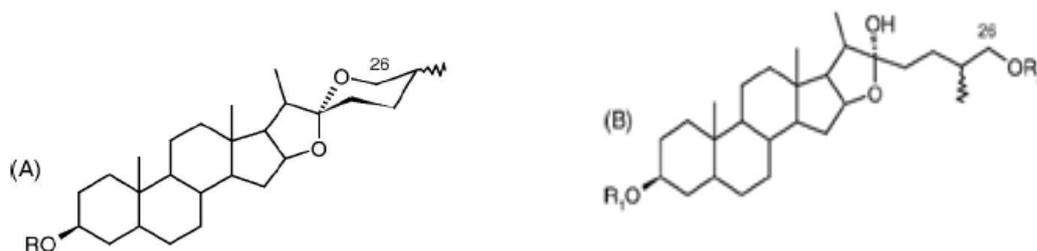


Figure 4 : Structure chimique des saponines. Squelette aglycone (A), Stéroïdien (B)
(Amzal, 2010).

Compte tenu de leur diversité chimique, les saponines présentent de multiples propriétés, parmi lesquelles : les propriétés hémolytiques qui sont généralement attribuées à leur interaction avec les stérols de la membrane érythrocytaire (Huhman *et al.*, 2002 ; Mali, 2003 ; Bottger *et al.*, 2011). Elles sont douées d'une activité molluscicide, anti-inflammatoire (Sparg *et al.*, 2004), antivirale, antifongique, herbicide, antihépatotoxique (Bottger *et al.*, 2011) hypocholestérolémiant (Huhman *et al.*, 2002; Arslan *et al.*, 2012) et antitumorale (Huhman *et al.*, 2002 ; Man *et al.*, 2010 ; Arslan *et al.*, 2012).

Les saponines peuvent avoir un effet « antinutritionnel » dans l'alimentation humaine et animale et avoir des effets toxiques. D'une manière générale, les saponines, comme les glycosides, présentent une faible biodisponibilité orale, mais elles peuvent être hydrolysées dans le système digestif et provoquer une toxicité systémique dépendante de la structure et de l'absorption de l'aglycone. Traditionnellement, elles ont été utilisées en tant que détergents, piscicides et molluscicides en plus de leurs applications industrielles en tant qu'agents moussants et tensioactifs (Caulier *et al.*, 2011).

Plusieurs méthodes sont mises au point dans le but d'extraire les molécules d'intérêt à partir de matrices végétales cas des composés phénoliques.

II.1. Extraction par méthodes conventionnelles

Les techniques conventionnelles sont des méthodes anciennes utilisées pour retirer des plantes, divers substances phytochimiques. Elles regroupent plusieurs méthodes différentes (Nguyen Van, 2010) :

➤ **Infusion** : L'infusion est une méthode d'extraction des principes actifs ou des arômes d'un végétal par dissolution dans un liquide initialement bouillant qui se refroidi (Nguyen Van, 2010).

➤ **Décoction** : La décoction est l'opération dans laquelle le solide est mis à bouillir dans un liquide en vue d'extraire les parties solubles (Nguyen Van, 2010).

➤ **Macération** : La macération est une méthode d'extraction liquide-solide à température ambiante pendant une durée de 30 min à 48 h. Cette méthode permet l'extraction douce des principes actifs, surtout lorsqu'ils sont thermolabiles. L'inconvénient principal de ce mode de préparation est le risque de contamination bactérienne du produit final en l'absence d'ébullition (Nguyen Van, 2010).

Cependant, les méthodes conventionnelles sont consommatrices de temps et de solvants (Mandal *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010). C'est pour cette raison que la mise en œuvre des techniques alternatives reste un point primordial.

Ces dernières années, l'utilisation de micro-ondes pour l'extraction des constituants de la matière végétale a montré un intérêt considérable. Les premiers chercheurs à utiliser un micro onde domestique au laboratoire sont Samra *et al.* (1975) et ce n'est qu'en 1986 que la première publication de cette technique est apparue (Eskilsson et Bjorklund, 2000; Kaufmann et Christen 2002; Mandal *et al.*, 2007).

II.2. Méthode d'extraction assistée par micro-ondes (EAM)

II.2.1. Définition des micro-ondes

Les micro-ondes (Mo) sont des ondes électromagnétiques, possédant un champ électrique et magnétique perpendiculaires l'un par rapport à l'autre, avec une fréquence situées entre 300 MHz et 300 GHz.

Les micro-ondes domestiques et industrielles sont généralement utilisées à une fréquence de 2.45 GHz, ayant une puissance de 600 à 1000 Watts et une longueur d'onde de 12,2 cm (Kaufmann et Christen 2002 ; Mandal *et al.*, 2007; Jain *et al.*, 2009). Les micro-ondes sont positionnées sur le spectre électromagnétique entre les infrarouges et les rayons X, les longueurs d'ondes associées s'étalent de 1 cm à 1 m (Jain *et al.*, 2009).

II.2.2. Appareillage d'EAM

Un four micro-ondes est constitué de trois éléments principaux (Eskilsson et Bjorklund, 2000; Mandal *et al.*, 2007):

- Un générateur de micro-ondes, aussi nommé magnétron, qui génère les microondes à partir d'énergie électrique;
- Un guide d'ondes métalliques qui propage les micro-ondes du magnétron à l'échantillon;
- Une cavité dans laquelle le réacteur sera placé.

En outre, de nombreux éléments peuvent être ajoutés et adaptés en fonction des besoins de l'expérience (Figure 5).

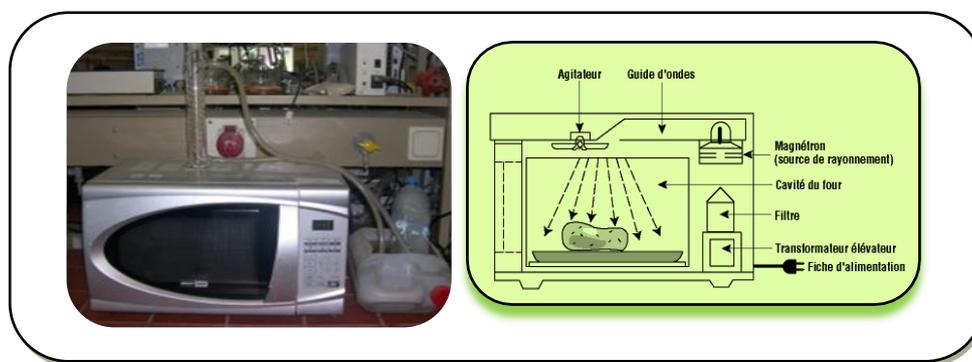


Figure 5 : Four à micro-ondes avec ses principaux composants.

II.2.3. Principe d'extraction par solvant assistée par micro-ondes

Extraction par solvant assistée par micro-ondes (ESAM) consiste à traiter sous micro-ondes un solide, sec ou humide, en contact avec un solvant partiellement ou totalement transparent aux micro-ondes. Ce procédé a pour vocation d'être une méthode d'extraction utilisable pour un grand nombre de matrices solides telles que les végétaux.

Dans ESAM, la matière végétale utilisée est généralement sèche. Toutes fois les cellules des matières contiennent toujours des petites traces d'humidité.

Cette humidité ciblée par les radiations Mo, une fois chauffée par l'énergie s'évapore et produit une pression énorme sur les parois des cellules qui finissent par se rompre (Figure 6).

Cette rupture libère les constituants des cellules vers le solvant organique. Ce phénomène peut être intensifié par l'usage d'un solvant polaire (Berteaud et Delmotte, 1993 ; Gatidou, *et al.*, 2004; Zhou et Lui, 2006; Desai, *et al.*, 2011).

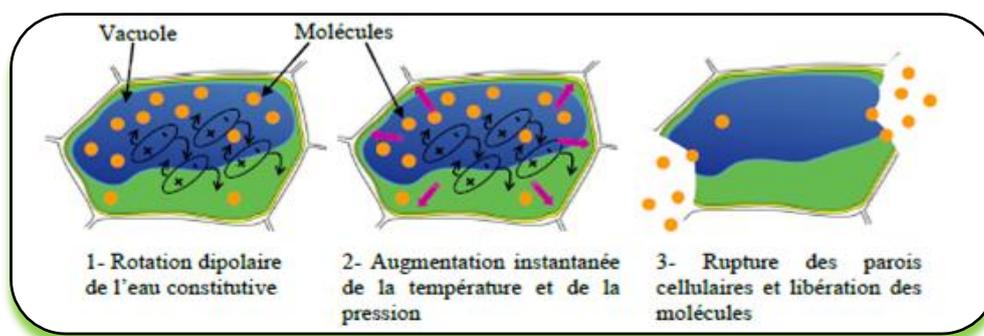


Figure 6 : Mécanisme de rupture des parois cellulaires sous l'effet des micro-ondes (Michel, 2011).

II.2.4.Facteurs influençant l'EAM

Le rendement d'extraction peut être influencé par certains facteurs (Eskilsson et Bjorklund, 2000; Gatidou *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010) tels que :

- **La nature et le volume du solvant** : Le choix du solvant dépend de la solubilité de la matrice, de l'interaction matrice-solvant et surtout de la capacité du solvant à absorber les micro-ondes. Le volume du solvant doit être suffisant pour garantir que l'échantillon est bien immergé au cours du processus d'extraction;
- **Le temps d'extraction** : Le temps d'extraction est extrêmement court. En augmentant la durée d'extraction, un risque de dégradation peut se produire;
- **La température d'extraction** : Une augmentation de la température induit une diminution de la viscosité des solvants et par conséquent une meilleure diffusion de celui-ci dans les parties internes de la matrice;
- **La puissance d'irradiation** : Elle est généralement minimisée pour éviter d'atteindre des températures d'extraction trop élevées et à l'inverse, augmentée pour diminuer le temps d'extraction;
- **La nature de la matrice** : La présence d'eau dans les échantillons améliore les taux de récupération des composés cibles (Eskilsson et Bjorklund, 2000; Gatidou *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010).

II.2.5. Avantages et inconvénients de l'EAM

L'extraction micro-ondes est une technique puissante très utile dans l'industrie, grâce à ses avantages économiques par rapport aux techniques d'extraction classiques (Ben Chanaa *et al.*, 1994). Mais cette technique présente aussi quelques inconvénients (Eskilsson et Bjorklund, 2000 ;Hao *et al.*, 2002; Gatidou *et al.*, 2004; Mandal *et al.*, 2007; jain *et al.*, 2009) (Tableau 1).

Tableau I: Quelques avantages et inconvénients de l'extraction micro-ondes.

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Réduction significative des temps d'extraction; ➤ Réduction du volume de solvant utilisé; ➤ Amélioration du rendement d'extraction; ➤ Utile pour les constituants thermolabiles. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Le solvant à utiliser doit être capable d'absorber l'énergie des micro-ondes ; ➤ La quantité d'échantillon à traiter est limité ; ➤ De faibles rendements d'extraction peuvent être obtenus lorsque des solvants apolaires ou volatils sont utilisés.

L'intérêt des antioxydants est loin d'être récent, puisqu'ils sont depuis longtemps exploités dans l'industrie agroalimentaire en tant que conservateurs pour empêcher notamment le rancissement des matières grasses surtout les acides gras poly insaturés (Hennebelle, 2004). Ces dernières années, la recherche des antioxydants naturels efficaces sans ou présentant moins d'effets secondaires pour remplacer les synthétiques a augmenté considérablement.

III.1. Les antioxydants

Les antioxydants sont des molécules qui peuvent prévenir les dommages oxydatifs grâce à leur capacité à capter les radicaux libres (Kalander *et al.*, 2012). Ces derniers sont des espèces chimiques très réactives qui cherchent à se stabiliser (Figure 7) (Albert *et al.*, 2003).

Ils entraînent un stress oxydant quand ils sont en excès ce qui conduit à un déséquilibre entre la production des espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) et d'azote (RNS) par les systèmes oxydants et leur élimination par les systèmes antioxydants (Benhammou *et al.*, 2009). Ce phénomène entraîne des dommages au niveau de la structure des protéines, des lipides et des acides nucléiques (Ghedira 2005; Benhammou 2009; Hennebelle, 2004). L'accumulation de ces lésions au cours du temps contribue au vieillissement cellulaire accéléré (Hennebelle, 2004). Plusieurs pathologies peuvent se développer telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer, l'athérosclérose, le diabète et l'Alzheimer (Rakic *et al.*, 2007).

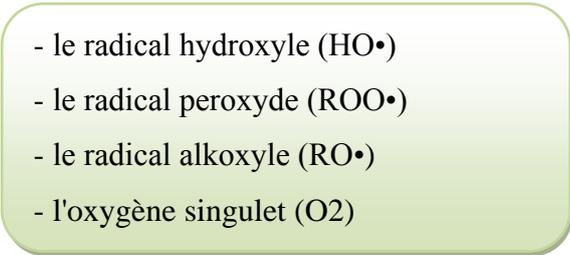
- 
- le radical hydroxyle (HO•)
 - le radical peroxyde (ROO•)
 - le radical alkoxyde (RO•)
 - l'oxygène singulet (O₂)

Figure 7 : Quelques radicaux libres (Albert *et al.*, 2003)

III.2. Sources d'antioxydants

Il existe deux systèmes de défenses antioxydants, ils peuvent être d'origine endogènes ou exogènes (Aliments) (Pincemail et Defraigne, 2004):

- L'apport exogène est apportée par la consommation des fruits et des légumes riches en vitamines C et E, en caroténoïdes, en ubiquinones, en flavonoïdes,

➤ L'origine endogène est représentée par le système enzymatique (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase) ou protéique (ferritine, transferrine, albumine) cellulaires.

A ces deux principales sources s'ajoutent d'autres oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs indispensables à l'activité de certaines enzymes antioxydantes.

III.3. Localisations cellulaires des antioxydants

Les antioxydants peuvent être classés en molécules liposolubles ou hydrosolubles. Selon leurs caractéristiques physico-chimiques, ils auront une localisation cellulaire préférentielle (Figure 8), les membranes cellulaires pour les substances liposolubles et le cytosol et/ou le milieu extracellulaire pour les substances hydrosolubles (Pastre, 2005).

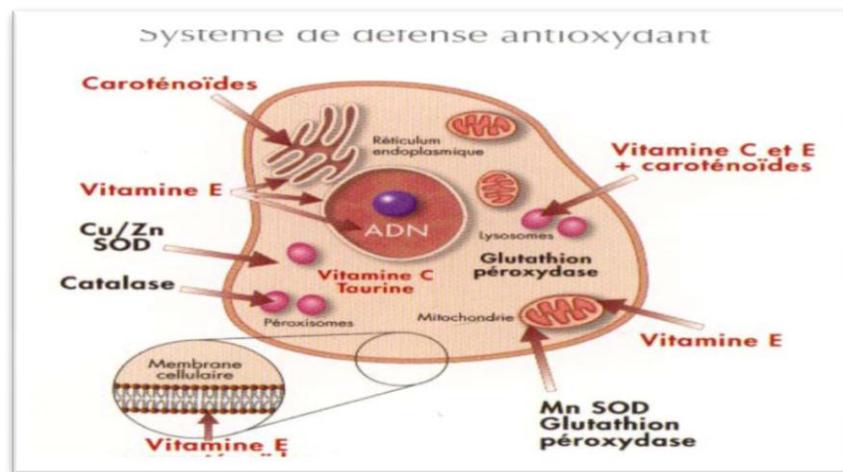


Figure 8: Sites d'action des nutriments antioxydants (en rouge) et des enzymes antioxydantes (en noir) (Pastre, 2005).

III.4. Mécanisme d'action des antioxydants

Selon leur mode d'action, on distingue deux types d'antioxydants (Marc *et al.*, 2004 ; Rolland, 2004):

➤ Antioxydants primaires

Les antioxydants primaires tels que : la catalase le glutathion. Ces antioxydants préviennent la production de ROS en limitant la phase d'initiation des réactions d'oxydation. Ils agissent donc en prévention (Figure 9).

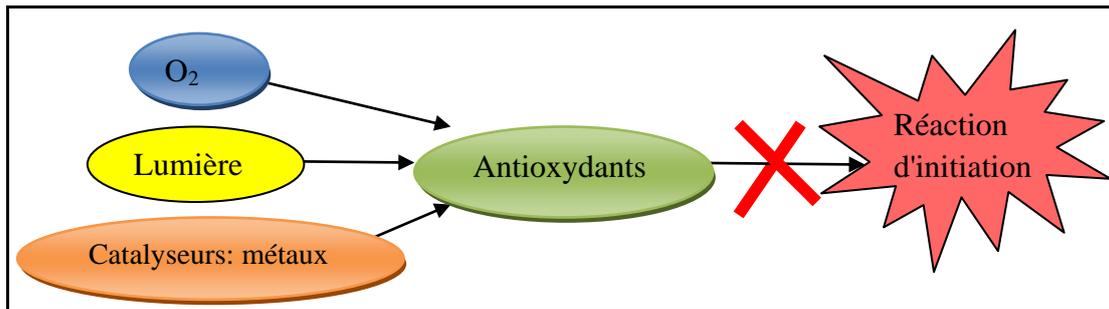


Figure 9 : Action préventive des antioxydants (Marc *et al.*, 2004 ; Rolland, 2004).

➤ Antioxydants secondaires

Les antioxydants secondaires tels que: les tocophérols, sont des agents qui transforment les radicaux libres en composés plus stables et bloquent la phase de propagation (Figure 10). Un tel effet résulte d'une structure de donneurs de H• souvent aromatique.

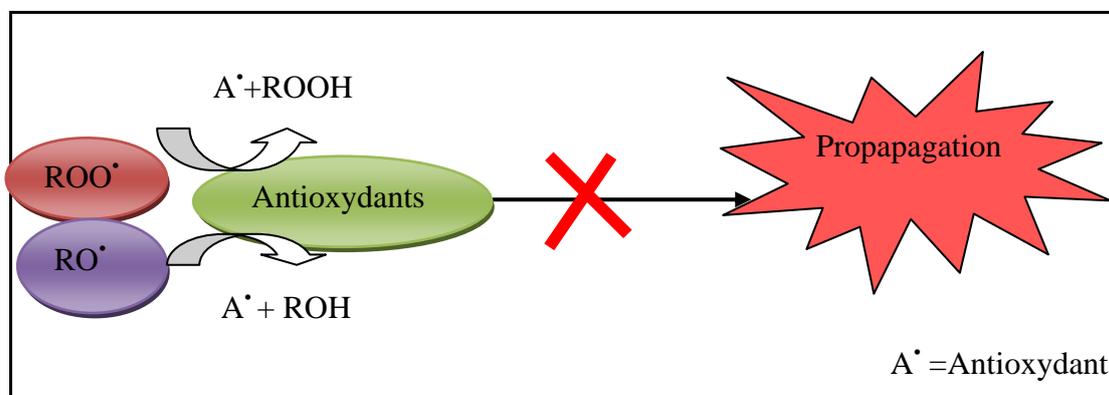


Figure 10: Action secondaire des antioxydants (Marc *et al.*, 2004 ; Rolland, 2004).

De nombreuses molécules possédant des propriétés anti-oxydantes ont été isolées du monde végétal, toutes de nature plus ou moins phénolique. Leurs représentants les plus connus sont: le resvératrol (un stilbénoloïde rencontré dans la peau de raisin), les polyphénols du ginkgo, du thé vert, et de l'huile d'olive (Hennebelle, 2004).

D'après Zama *et al* (2007), le chloropyriphoséthyle (CE) qui est un pesticide organophosphoré largement utilisé peut modifier le système antioxydant endogène tel que l'enzyme superoxyde dismutase (SOD), les enzymes de glutathion, ce qui aboutira à un stress oxydatif dans les tissus. Des études ont montré que *Paronychia argentea* peut prévenir l'oxydation causée par le CE en augmentant l'activité de glutathion réduit, l'enzyme SOD et en diminuant la peroxydation lipidique.

IV.1. Matériel végétal

Notre étude est réalisée sur la partie aérienne de *Paronychia argentea* (Figure11) qui a été récoltée au mois d'Avril 2013 au niveau de Boumraou situé à 14 km d'Amizour wilaya de Bejaia. Cette plante a été identifiée au laboratoire de Physiologie Végétale et d'Ecologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abderrahmane Mira de Bejaïa.



Figure11: Photographie d'un échantillon frais de *Paronychia argentea*

IV.2.Préparation de l'échantillon

IV.2.1.Lavage et Séchage

La partie aérienne de la plante récoltée a été lavée deux fois à l'eau du robinet et une troisième fois à l'eau distillée, puis séchée à l'air libre.

IV.2.2. Broyage et tamisage

Une partie de l'échantillon séché a été utilisée telle qu'elle est et l'autre a été broyée à l'aide d'un broyeur électrique puis tamisée à l'aide d'un tamiseur pour obtenir une poudre dont le diamètre est inférieur à 250 μm (Figure12). La poudre obtenue a été conservée à température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité dans un bocal en verre opaques, préalablement séché à l'étuve, pour des utilisations ultérieures.



Figure 12 : Poudre et partie aérienne séchée non broyée de *Paronychia argentea*

IV.2.3. Détermination de l'humidité

Le test d'humidité a été effectué selon la procédure Doymaz *et al.*, (2004): 3 échantillons de 10 g sont portés à 105°C pendant 4h. La teneur en eau est calculée par la formule suivante :

$$\text{Taux d'humidité (\%)} = \frac{10-M}{10} \times 100$$

M: masse de l'échantillon après 4 h de séchage à 105°C.

IV.3. Analyses des composés phénoliques

IV.3.1. Préparation des extraits

Dans la présente étude cinq extractions ont été réalisées :

- Extraction par infusion (Inf)
- Extraction par décoction (Dec)
- Extraction par macération à éthanol (ME)
- Extraction éthanolique assisté par microonde (EEAM)
- Extraction par décoction assisté par microonde (DAM)

Pour effectuer ces différentes extractions nous avons choisis deux types de solvants; l'eau de robinet pour préparer Inf, Dec, DAM (ce sont les différentes formes de consommation de la plante) et l'éthanol puisque c'est un solvant efficace (utilisé comme référence), moins toxique et plusieurs études ont été réalisées avec l'éthanol 70% pour extraire les polyphénols (Wang *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012).

➤ **Extraction par infusion (Inf)**

Cette extraction est réalisée selon la méthode décrite par Katalinic *et al.*, (2006) avec quelques modifications. 250 ml d'eau bouillante sont ajoutés à 5 g de la plante séchée, l'infusion a duré 20 min.

➤ **Extraction par décoction (Dec)**

Cette extraction est réalisée selon la méthode décrite par Ferreira *et al.*, (2006) avec quelques modifications. 250 ml d'eau froide sont ajoutés à 5 g de la plante séchée, porter le tout à ébullition pendant une durée de 20 min.

➤ **Extraction par macération à l'éthanol (ME)**

Cette extraction est réalisée selon la méthode décrite par Diouf *et al.*, (2009) avec quelques modifications. 5 g de poudre sont traités avec 250 ml d'éthanol, le mélange est soumis à une agitation mécanique pendant 40 min à température ambiante.

➤ **Extraction assisté par microonde (EAM)**

Cette extraction a été effectuée selon la méthode de Raffiee *et al.*, (2011) avec quelques modifications. Elle est réalisée dans un four à micro-ondes (domestique) modifié. Vu le manque d'un système intégré de mesure de la température, cette dernière est prise après chaque fin d'extraction par un thermomètre. La puissance est fixée à 500 MHz (puissance moyenne). Deux types d'extractions ont été effectués :

- **Décoction assistée par microonde (DAM)** qui consiste à mettre 5 g de la partie aérienne sèche dans 250 ml d'eau, ensuite le mélange a été placé au milieu du four sur un plateau tournant et a été exposé à un rayonnement de micro-ondes pendant 10 min.
- **Macération éthanolique assistée par microonde (EEAM)** qui consiste à mettre 5 g de la poudre dans 250 ml d'éthanol à 70%, ensuite la préparation est mise dans le four microonde pour une durée de 2 min

La solution obtenue après chaque extraction a été filtrée avec un papier filtre, puis concentrée. Les extraits secs obtenus sont pesés pour estimer le rendement d'extraction (Wang *et al.*, 2008) comme suit :

$$\text{Le taux de matière extraite (\%)} = [(P_1)-(P_0)/E \times 100]$$

Ou :

P₁ : poids du bécher contenant l'extrait après évaporation (g) ;

P₀ : poids du bécher vide (g) ;

E : poids de l'échantillon (g).

Les extraits ont été reconstitués dans de l'éthanol 70%. Tous les extraits ont été conservés à 4 °C jusqu'à leur utilisation ultérieure.

IV.3.2. Dosage des composés phénoliques

➤ **Détermination de la teneur en composés phénoliques totaux**

La teneur en composés phénoliques a été déterminée via le test de Folin-Ciocalteu (FC) basé sur la réduction d'un complexe jaune de molybdotungstane par les composés phénoliques donnant une coloration bleu au produit de la réaction (Cicco *et al.*, 2009).

La teneur en composés phénoliques est déterminée selon la méthode décrite par Owens et Johns (1999). 2.5 ml d'extrait (5mg /ml) de la plante sont mélangés avec 22.5 ml d'eau distillée et 500 µl du réactif de Folin-Ciocalteu. Après 3 min d'agitation, 1.5 ml de la solution de carbonate de sodium (200 g/ l) sont ajoutés à chaque tube. Un blanc, contenant tous les réactifs, excepté l'échantillon, est préparé dans les mêmes conditions. Après 1 heure d'incubation à l'obscurité, la lecture a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 760 nm. La teneur des polyphénols totaux est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par g de matière sèche d'échantillon (mg EAG/g MS), par référence à une courbe d'étalonnage (Annexe N° 2, A).

➤ **Détermination de la teneur en flavonoïdes**

Cette méthode est basée sur la formation d'un complexe jaunâtre suite à la chélation de métaux Al^{3+} , utilisés sous forme de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$), par les groupements OH des flavonoïdes (Ribéreau-Gayon, 1968 ; Bahorun *et al.*, 1996 ; Djeridane *et al.*, 2006).

Les flavonoïdes contenus dans les extraits de *Paronychia argentea* sont quantifiés par la méthode de Djeridane *et al.*, (2006) : 2 ml d'une solution méthanolique de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$ à 2%) sont additionnés à 2 ml d'extrait (3 mg/ml). Le mélange est vigoureusement homogénéisé et laissé reposer pendant 15 min à l'obscurité. Les absorbances sont lues au spectrophotomètre à 430 nm contre un blanc contenant 2 ml de solvant et 2 ml de la solution $AlCl_3$. Les résultats sont rapportés en mg équivalent de quercetine par g de matière sèche (mg EQ / g MS) (Annexe N°2, B).

➤ **Détermination de la teneur en tannins**

Dans la présente étude, nous avons utilisé le protocole de précipitation des protéines (BSA), proposé par Hagerman et Butler (1978), pour estimer le contenu en tannins totaux.

Cette méthode qui utilise le Sérum Albumine Bovine (BSA), est basée sur l'aptitude des tannins à précipiter les protéines formant ainsi un complexe insoluble tannins-BSA. Ce précipité, une fois dissout dans une solution alcaline (SDS/TEA), forme un complexe ion ferriques- polyphénols de couleur bleue-vert-violacée, qui est mesurée au spectrophotomètre à 510 nm (Ribereau-Gayon, 1968 ; Paris et Hurbeille 1981 ; Vaithyanathan et Kumar 1993).

2 ml de la solution de BSA (1mg/ml) sont ajoutés à 1 ml de solution d'extrait (3.2 mg/ml). Après 24 heures d'incubation à 4°C, une centrifugation est réalisée à 3000 tours /min pendant 15 min. Le culot récupéré est dissout dans 4 ml de la solution SDS/TEA pendant 15 min, puis additionné à 1 ml de chlorure de fer ($FeCl_3$). Le mélange réactionnel est agité

vigoureusement avant d'être laissé au repos à l'abri de la lumière pendant 15 min. Les absorbances des échantillons sont lues à 510 nm contre un blanc contenant le même mélange réactionnel à l'exception de l'extrait. Les résultats sont rapportés en mg équivalent acide tannique par gramme de matière sèche (mg EAT/g MS) (Annexe N°2, C).

IV.3.3. Détermination de l'activité antioxydante *in vitro*

Vue la complexité du processus oxydatif, plusieurs approches ont été utilisées pour évaluer la capacité antioxydante de *Paronychia argentea*. L'activité antioxydante des extraits a été évaluée à des différentes concentrations par 4 tests :

➤ Activité antiradicalaire contre le radical DPPH

Le diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre, stable et caractérisé par une couleur violette dont l'intensité est mesurée à 515 nm (Brand-Williams *et al.*, 1995). La substance antioxydante agit en transférant un électron ou un atome d'hydrogène ce qui conduit à la réduction du DPPH au cours de la réaction et à un changement de coloration jaune pâle (figure13). Ce passage, de la première forme à la deuxième, est accompagné d'une diminution de l'absorbance qui peut exprimer le pourcentage de réduction de DPPH (Molyneux, 2004 ; Villano *et al.*, 2007 ; Kouamé *et al.*, 2009).

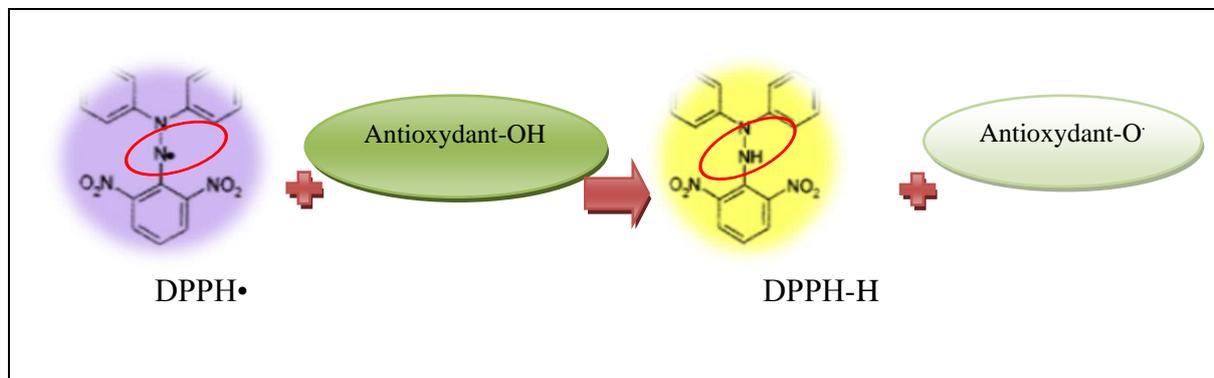


Figure 13 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH) (Villano *et al.*, 2007 ; Kouamé *et al.*, 2009).

Le protocole utilisé dans cette méthode est celui de Milardović *et al.* (2006). Il consiste à mélanger 2,9 ml de la solution DPPH (0.2mM) avec 0,1 ml de chaque extrait à différentes concentrations (50, 150, 200, 250 µg/ml); la mesure de la réaction de réduction de la solution du DPPH a été réalisée à 515 nm après une incubation de 30 min. La capacité antioxydante de nos échantillons a été exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH• suivant l'équation ci-dessous, en comparaison à un standard de référence BHA.

$$\%d'inhibition\ du\ DPPH.\ =\ [(Abs_{515}\ \text{contrôle} - Abs_{515}\ \text{échantillon}) / Abs_{515}\ \text{contrôle}] \times 100$$

- $A_{\text{contrôle}}$ correspond à l'absorbance du contrôle après 30 min ;
- $A_{\text{échantillon}}$ correspond à l'absorbance de l'échantillon après 30 min ;

Ainsi plus la perte de couleur est rapide plus le donneur d'hydrogène est considéré comme un antioxydant fort. L'activité d'un antioxydant est caractérisée aussi par une grandeur appelée l'IC50 (Concentration de l'antioxydant qui permet l'inhibition de 50% du signal de référence). Il est à noter que plus la IC50 est petite plus l'antioxydant a une activité plus importante.

➤ **Activité antiradicalaire contre le radical $ABTS^{\circ+}$**

Cette méthode a été décrite pour la première fois par Miller and Rice-Evans en 1993 (Prior and Cao., 1999; Van den Berg *et al.*, 2000), elle consiste en la réduction du radical cation 2,2'- azobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique acide) plus connu sous le nom de $ABTS^+$ (figure14) de coloration bleu-verte en le transformant en $ABTS$ incolore par piégeage d'un proton. Ce dernier est mis en solution aqueuse avec le persulfate de potassium pour générer le radical, ce radical $ABTS^{\circ+}$ stable, présente une absorbance maximale à 734 nm (Marc *et al.*, 2004; Nenadis *et al.*.,2004).

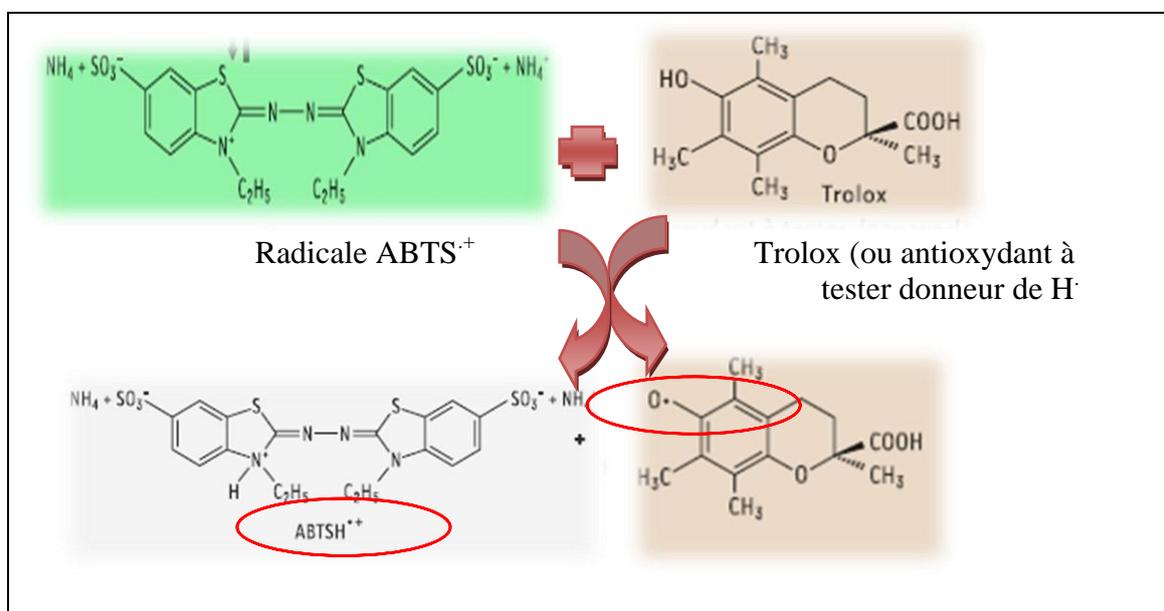


Figure 14 : Piégeage du radical $ABTS^{\bullet+}$ par un antioxydant donneur de H^{\bullet} (Marc *et al.*., 2004; Nenadis *et al.*.,2004).

Le pouvoir anti-radicalaire contre le radical cationique $ABTS^{\circ+}$ a été déterminé selon la méthode de Katalinic *et al.*, (2006). Les radicaux libres d' $ABTS^{\circ+}$ sont fondamentalement créés en mélangeant la solution ABTS à 7 mM avec 2.45 mM $K_2S_2O_8$ dans l'obscurité pendant 16 h, à la température ambiante. Avant toute utilisation, la solution d' $ABTS^+$ a été diluée avec de l'éthanol 70% pour obtenir une absorbance de $0,700 \pm 0,020$ à 734 nm.

Un volume de 20 μ l de chaque extrait à différentes concentrations (50, 100,150, 200, 250, 300 μ g/ml) est additionné à un volume de 2 ml de solution ABTS +. La décoloration par rapport au témoin, contenant l'ABTS+ et le solvant (éthanol), est mesurée au spectrophotomètre à 734 nm après 6 min d'incubation à l'obscurité. Le Trolox a été utilisé comme standard de référence. L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical ABTS +. Selon la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition de l'ABTS}^+ = \left[\frac{(\text{Abs}_{734} \text{ contrôle} - \text{Abs}_{734} \text{ échantillon})}{\text{Abs}_{734} \text{ contrôle}} \right] \times 100$$

- Abs_{734} contrôle: correspond à l'absorbance du contrôle après 6 min d'incubation ;

- A_{734} échantillon :correspond à l'absorbance de l'échantillon après 6 min d'incubation.

L'activité d'un antioxydant est caractérisée aussi par une grandeur appelée l'IC50 (Concentration de l'antioxydant qui permet l'inhibition de 50% du signal de référence).

➤ Chélation du fer ferreux

Le test de chélation des métaux mesure la capacité et l'efficacité des antioxydants à empêcher la ferrozine de chélater les ions de fer ferreux (Fe^{2+}) (Stokey, 1970). La Ferrozine agit comme un agent chélateur et forme un complexe violet avec Fe^{2+} (figure15) donnant une absorbance maximale à 562 nm (Le *et al.*, 2007).

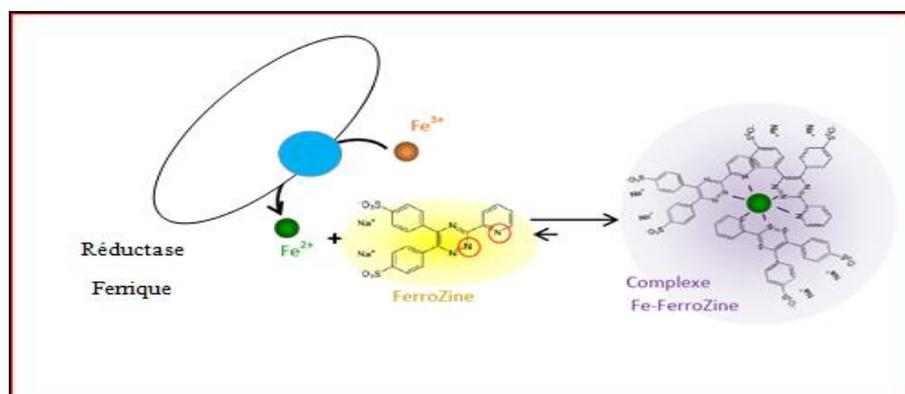


Figure15: Mécanisme réactionnel de formation du complexe ferrozine- Fe^{2+} (Stokey, 1970).

L'activité de chélation d'ion du fer ferreux (Fe^{2+}) des extraits a été évaluée par la diminution de l'absorbance à 562 nm du complexe ferrozine- Fe^{2+} , selon le protocole de Bourgou *et al.* (2007), qui consiste à mélanger 500 μl d'extraits a différentes concentrations (50, 100, 150, 200, 250, 300 $\mu\text{g/ml}$), 100 μl de FeCl_2 à 0,6 mM, 900 μl de méthanol et 100 μl de ferrozine à 5 mM sont ajoutés après 5min. Le mélange est incubé pendant 10 min à température ambiante permettant ainsi la complexation du fer résiduelle et la formation d'un chromophore rouge (Fe (II)-Ferrozine) ayant un maximum d'absorption à 562 nm. Le contrôle négatif contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester qui est remplacé par un volume égal d'éthanol.

L'effet séquestrant des échantillons *vis-à-vis* du fer est exprimé en comparaison avec un standard de référence qui est le Na_2EDTA et en pourcentage de chélation selon l'équation suivante :

$$\% \text{Chélation} = \left[\frac{\text{Abs}_{562} \text{ contrôle} - \text{Abs}_{562} \text{ échantillon}}{\text{Abs}_{562} \text{ contrôle}} \right] \times 100$$

- Abs_{562} contrôle : correspond à l'absorbance du contrôle après 6 min d'incubation.
- Abs_{562} échantillon : correspond à l'absorbance de l'échantillon après 6 min d'incubation.

➤ Pouvoir réducteur

Le pouvoir mesure la capacité d'un antioxydant à réduire le fer ferrique Fe^{3+} (FeCl_3) en fer ferreux Fe^{2+} (FeCl_2) en présence d'un agent chromogène ferricyanure de potassium $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Ceci se traduit par le virage de la couleur jaune de ferricyanure de potassium vers une couleur bleu verte (Figure 16) dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur de l'antioxydant (Chung *et al.*, 2006).

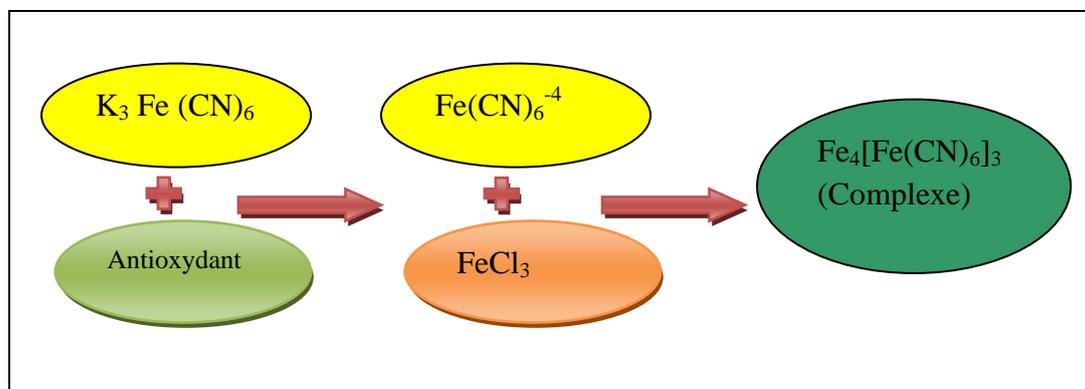


Figure 16 : Mécanisme réactionnel du pouvoir réducteur (Chung *et al.*, 2006).

Le pouvoir réducteur des extraits des cinq plantes a été déterminé selon la méthode décrite par Goncalves *et al.*, (2013). Un volume de 250 µl de chaque extrait, à différentes concentrations (50, 100,150, 200, 250, 300 µg/ml), est ajouté à 250 µl de tampon phosphate (pH 6.6, à 0,2M), suivi de 250 µl de Ferricyanure de Potassium ($K_3Fe(CN)_6$) à 1% et après agitation, le mélange est soumis à l'incubation à 50°C pendant 20 min. 250 µl d'acide trichloracétique à 10% sont additionnés au mélange et centrifuger à 3000 tr/min pendant 10 min. Un volume de 50 µl du surnagent est ajouté à 200 µl d'eau distillée, puis 10 µl de chlorure ferrique à (0.1%) est ajouté au mélange. Les absorbances ont été lues à 700 nm, les résultats ont été estimés en comparaison avec la quercetine qui est un standard de référence. L'augmentation de l'absorbance indique l'augmentation du pouvoir réducteur.

IV.4. Analyses des saponines

IV.4.1. 1.Réaction de révélation des saponines

Les saponines ont été mises en évidence par le test de mousse, qui consiste à mettre 10 ml de chacun des extraits aqueux dans un tube à essai, en agitant pendant 15 s. Après 15 min d'incubation, une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence de saponines (Békro *et al.*, 2007).

IV.4.2. Extraction des saponines

L'extraction des saponines a été réalisée selon la méthode décrite par Kwada et Tella. (2009) (Figure17). L'extrait obtenu a été reconstitué dans l'éthanol 50 %.

IV.4.3.Activité antioxydante des saponines

La capacité antioxydante des saponines contenues dans *Paronychia argentea* a été évaluée par les quatre tests cités précédemment à différentes concentrations.

V. Analyse statistique

Une analyse descriptive des résultats de trois essais a été réalisée à l'aide du logiciel Microsoft Office Excel 2010 (moyenne, écart types et corrélations). Une étude statistique a été faite par l'analyse de la variance (ANOVA) en utilisant le test LSD, à un facteur au seuil $p < 0.05$ avec le logiciel STATISTICA 5.5 Fr, pour déterminer l'effet des méthodes d'extraction sur les teneurs en composés phénoliques et l'activité antioxydante et la mise en évidence des différences significatives ou non entre les extraits.

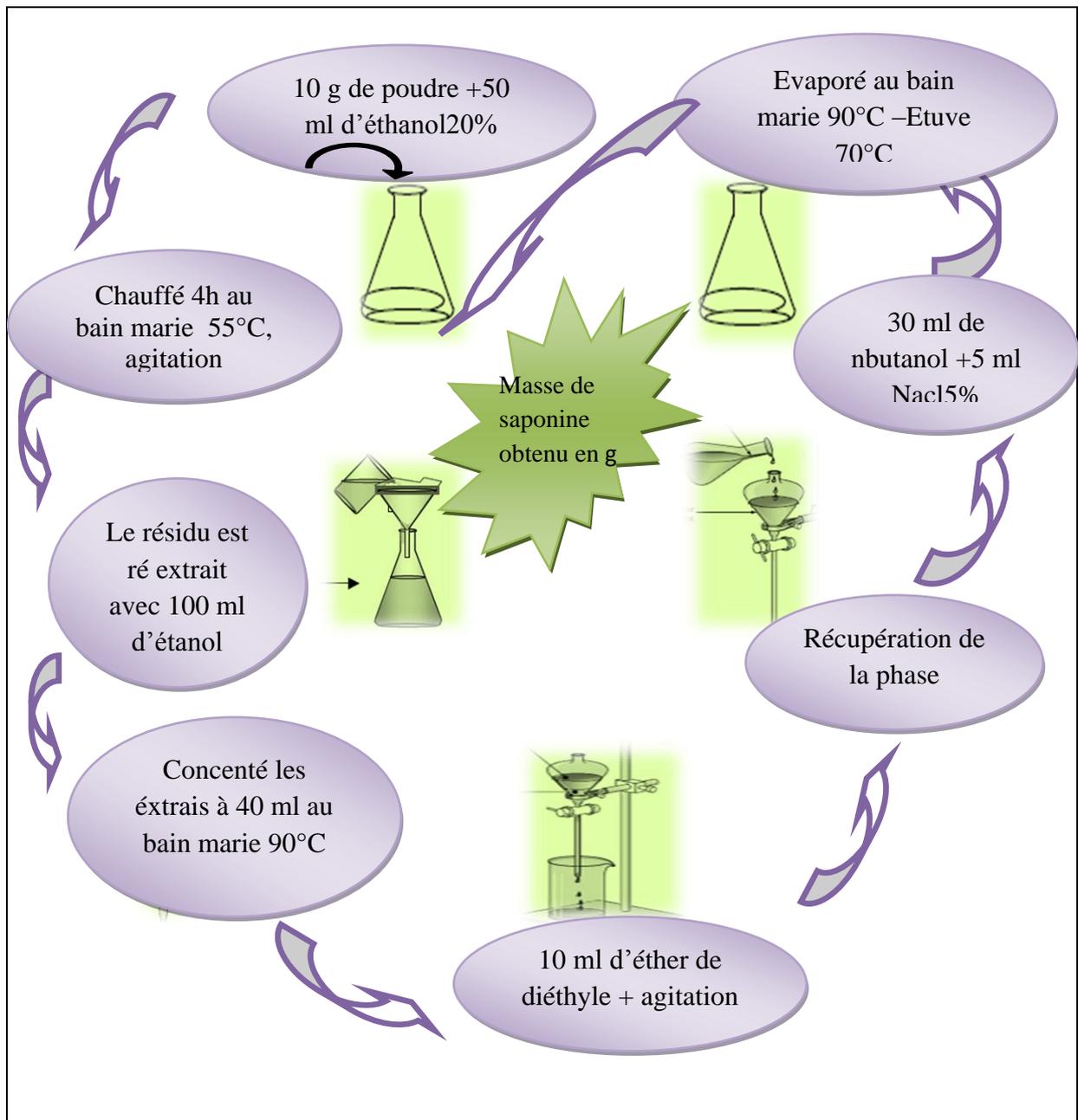


Figure 17 : Protocole d'extraction des saponines (Kwada et Tella, 2009).

V.1. Traitement du matériel végétal

V.1.1. Test d'humidité

L'humidité et la matière sèche sont deux paramètres complémentaires importants pour connaître la teneur en eau, et pouvoir estimer le rendement après séchage.

Paronychia argentea a révélé un taux d'humidité important qui est de 65.7% (Figure18). Cela signifie que plus de la moitié de la plante fraîche est constituée d'eau.

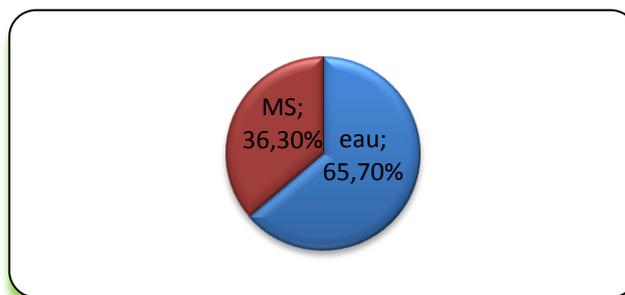


Figure 18: Taux d'humidité de *Paronychia argentea*

Le taux élevé d'humidité est une source de dégradation des antioxydants, l'eau peut affecter la solubilité lors de l'extraction et même la stabilité des composés actifs. Ces inconvénients peuvent être éliminés par un séchage rapide, aussitôt après la récolte du végétale (Ribéreau-Gayon, 1968; Abou el khair *et al.*, 2010). Cependant, la présence d'eau dans la plante peut être bénéfique pour l'opération d'EAM, l'eau améliore la récupération des composés ciblés dans des solvants non polaires et même sans solvants (Guatidou, *et al.*, 2004).

V.1.2. Rendements d'extraction

L'extraction des principes actifs à partir de la matière végétale, suscite actuellement beaucoup d'intérêt en raison du pouvoir antioxydant élevé de ces substances notamment les polyphénols (Bonnaillie *et al.*, 2012).

Dans la présente étude, l'éthanol 70% a été choisi comme solvant d'extraction pour la macération, par micro-ondes et l'eau pour l'infusion et la décoction (Figure19).

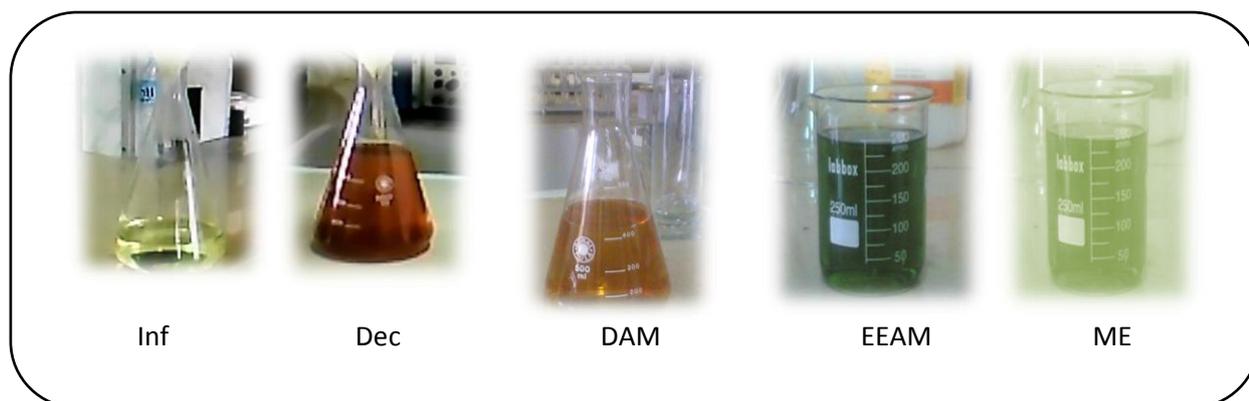


Figure 19: Extraits obtenus par les différentes méthodes d'extraction.

Le rendement d'extraction des différentes méthodes utilisées sont illustrés dans la figure 20.

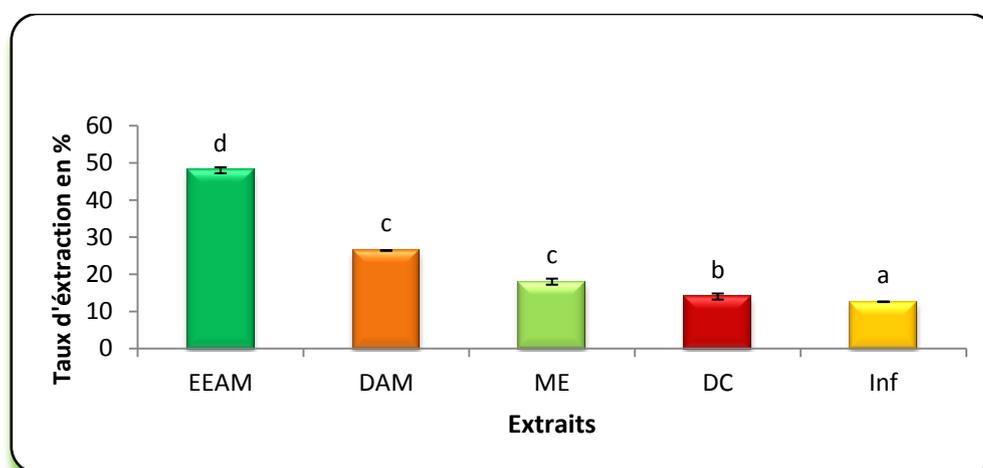


Figure 20: Taux d'extractions des différents procédés d'extraction. *Les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement. ($P < 0.05$), $a < b < c < d$. Les barres verticales représentent les écarts types.*

Les valeurs obtenues montrent une variabilité des rendements entre les différentes techniques d'extraction, ce qui est confirmé par l'analyse statistique ($p < 0.05$) (Annexe N° 3). L'extraction assistée par micro-onde (EEAM, DAM) a donné les rendements les plus élevés (48%, 26,4%, respectivement) comparativement à ceux de l'extraction conventionnelle (Extrait éthanolique, Décoction, Infusion.) qui ont donné de faibles taux d'extraction (18%, 14%, 12,6%, respectivement).

Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Rafiee *et al.* (2011) lors d'une EAM des polyphénols du thé. Les résultats rapportés par Abou el khair *et al.* (2010) sur *Paronychia argentea* concernant les rendements des méthodes conventionnelles sont de 2,2% pour la

macération éthanolique, 6.3% pour la macération aqueuse froide et 2.9% pour la macération au chloroforme. Ces résultats sont largement inférieurs à ceux obtenus dans la présente étude.

Wang *et al* (2008) rapportent dans leur étude sur des herbes chinoises que le rendement d'extraction dépend du processus utilisé, car les constituants des cellules se libèrent par rupture des parois cellulaires vers le solvant organique, un phénomène qui s'intensifie par l'usage d'un solvant polaire (Li *et al.*, 2012). La taille des particules végétales joue un rôle important dans l'extraction des composés phénoliques. Il est généralement admis que sous une forme broyée, la matière végétale présentera une plus grande surface de contact avec le solvant, permettant ainsi d'accélérer sa solubilité (Escribano-Bailon et Santos-Buelga, 2003 ; Bonnaillie *et al.*, 2012).

V.2. Résultats d'analyses des polyphénols

V.2.1. Dosage des polyphénols

➤ Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins

Les composés phénoliques sont l'objet de nombreuses études à cause de leur action bénéfique sur la santé (Richard *et al.*, 2001). La teneur en composés phénoliques totaux de chaque extrait est exprimée en milligrammes équivalent acide gallique par gramme d'extrait. La quantification des flavonoïdes est exprimée en milligrammes équivalent quercétine par gramme d'extrait et la quantification des tannins est exprimée en milligramme équivalent acide tannique par gramme d'extrait. Les résultats sont regroupés dans le tableau II.

Tableau II: Teneur en composés phénoliques des différents extraits.

Extraits	Phénols Totaux mg EAG/g MS	Flavonoïdes mg EQ/g MS	Tannins mg EAT/g MS
Inf	0.29±0.03 ^a	0.96±0.01 ^a	Traces
Dec	0.46±0.01 ^b	1.67±0.04 ^b	Traces
DAM	0.26± 0.19 ^a	0.93±0.02 ^a	Traces
EEAM	0.75±0.17 ^d	4.75±0.3 ^d	Traces
ME	0.56±0.25 ^c	3.24±0.03 ^c	Traces

Dans la même colonne les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement. $P < 0.05$, $a < b < c < d$.

Les résultats obtenus montrent que la teneur en composés phénolique de *Paronychia argentea* varie d'un extrait à un autre. L'extrait éthanolique obtenu par micro-ondes renferme la plus grande quantité de polyphénols totaux (0.75 ± 0.17mg EAG /g MS) au même titre que la teneur en flavonoïdes (4.75±0.3mg EQ/g MS). La plus faible teneur en composés

phénoliques est observée dans le cas de l'extrait obtenu par décoction et infusion qui sont respectivement de 0.26 ± 0.19 mg EAG/gMS et 0.29 ± 0.03 mg EAG/g MS pour les polyphénols totaux et de 0.93 ± 0.02 mg EQ/g MS et 0.96 ± 0.01 mg EQ/g MS pour les flavonoïdes.

L'analyse statistique montre une différence significative ($p < 0.05$) entre les teneurs en composés phénoliques des différents extraits (Annexe N°4, A, B, C).

Les polyphénols du thé se décomposent à haute température (Wang *et al.*, 2010), cela peut expliquer la faible teneur en composés phénoliques de l'extrait obtenu par décoction. dans l'extrait DAM, l'eau possède une constante diélectrique très élevée (Annexe N°1) ce qui conduit à une grande absorption de micro-ondes, augmentation de la température, et enfin dégradation des composés phénoliques (Mandal *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). L'éthanol 70% empêche la dégradation des composés actifs dans la ME et augmente leur solubilité dans la macération éthanolique assistée par microondes. Concernant la pauvreté de l'infusé en composés phénoliques, elle peut s'expliquer par la constatation de Goncalves. (2013) à travers une comparaison de la teneur en composés phénoliques d'une infusion froide (124.44 ± 2.62 μ mol EAG/ g MS) avec une infusion chaude (223.88 ± 3.8962 μ mol EAG/g MS), cette dernière a marqué une quantité très importante. Donc la solubilisation des composés phénoliques par l'eau nécessite une température appropriée, cela explique la faible teneur de l'infusé par rapport au décocté.

Les teneurs en composés phénoliques obtenues semblent beaucoup plus importantes que celles obtenues par Abou El-khair *et al.* (2010) qui a rapporté, suite à une analyse phytochimique de la partie aérienne de *Paronychia argentea*, la présence de tannins et de composés réducteurs plus importante que les flavonoïdes, l'extrait aqueux est dépourvu de composés phénoliques, même l'utilisation du chloroforme n'a révélé que la présence de triterpènes et de quelques traces d'huiles essentielles.

D'après nos résultats *Paronychia argentea* est riche en flavonoïdes, ce qui correspond aux résultats rapportés par Al Bakri et Affifi (2007) qui ont révélé la présence de flavonoïdes dans *Paronychia argentea* supérieure à celle des polyphénols totaux, une information qui a été déjà prouvée par Afifi. (2005) sur l'existence de trois types de flavonoïdes : isorhamnentine, quercétine et luteoline.

Les différences observées entre les résultats des différents travaux et ceux obtenus dans la présente étude peuvent être liées selon Li *et al.* (2006) à la méthode d'extraction, le degré de maturation des plantes et les conditions de l'environnement, en plus du réactif adopté

pour le dosage ou également au standard. Le temps d'extraction est aussi un facteur très important dans la quantification des composés phénoliques. Ce temps peut être soit court (quelques minutes) ou très long jusqu'à 24 heures (Naczki et Shahidi, 2004 et Chan *et al.*, 2009). De longues durées d'extraction augmentent le risque d'oxydation des polyphénols ce qui entraîne de mauvaises estimations de ces derniers (Naczki et Shahidi, 2004).

V.2.2. Activité antioxydante

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et de la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (Popovici *et al.*, 2009).

➤ Activité antiradicalaire contre le radical DPPH[•]

La méthode est basée sur la capacité des composés à agir en tant que piègeurs de radical en donnant un atome d'hydrogène (Laib, 2011). Le test est largement utilisé au niveau de l'évolution des extraits hydrophiles en provenance de thé vert. Du point de vue méthodologique le test au radical libre DPPH[•] est recommandé pour des composés contenant des groupes SH-, NH- et OH- (Popovici *et al.*, 2009).

Pour se renseigner sur le pouvoir de réduction du radical et la puissance des extraits étudiés, nous avons testé une gamme de concentrations pour chaque extrait. Les résultats exprimés en pourcentage d'inhibition sont illustrés dans la figure 21.

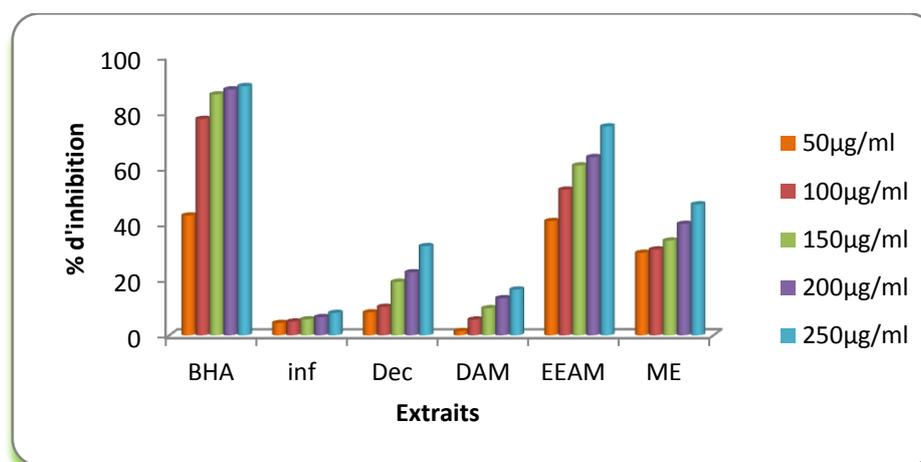


Figure 21: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH[•] par différents extraits.

Les résultats montrent que les extraits possèdent un pouvoir de neutralisation des radicaux libres de manière concentration-dépendante avec un effet maximal de 75 % observé à la concentration de 250 µg/ml avec l'extrait obtenu par micro-ondes suivi de ME (47%), décoction (32%), DAM (16.4%), tandis que le plus faible pourcentage d'inhibition est obtenu par l'infusion (8%). Cette variation du pouvoir antiradicalaire est confirmée statistiquement ($p < 0.05$) (Annexe N°4, A) par la présence d'une différence significative entre les procédés par lesquels les extraits testés sont obtenus.

La concentration qui inhibe 50% (IC₅₀) du radical libre DPPH de chaque extrait a été déterminée et les résultats sont montrés dans tableau III.

Tableau III: Concentrations des extraits et du BHA qui inhibent 50 % de DPPH* (IC₅₀)

Extraits	IC ₅₀ (µg/ml)
BHA	81.48 ± 0.23
Macération éthanolique assistée par microonde (EEAM)	136.64±0.28 ^a
Extraction par macération à l'éthanol (ME)	266.55±0.18 ^b
Décoction	419.56±0.34 ^c
Décoction assistée par microonde (DAM)	651.49±0.37 ^d
Infusion	1438.47±0.25 ^e

Dans la même colonne les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement. $P < 0.05$, $a < b < c < d < e$

Les IC₅₀ sont inversement proportionnelles à l'effet scavenger dont les valeurs faibles reflètent un effet antiradicalaire important (Maisuthisakul *et al.*, 2008). Les résultats obtenus montrent nettement que l'extrait obtenu par la macération éthanolique assistée par micro-ondes ne nécessite pas une concentration élevée (136.64±0.28 µg/ml) pour piéger 50% du radical DPPH, en comparaison avec d'autres extraits, alors que l'extrait obtenu par infusion nécessite une concentration élevée (1438.47±0.25µg/ml).

L'étude statistique ($p < 0.05$) des IC₅₀ des extraits a révélé des différences significatives entre les extraits étudiées (Annexe N°5, A).

Nous avons constaté une corrélation positive et linéaire entre les teneurs en flavonoïdes, polyphénols totaux et le pouvoir antiradicalaire contre le DPPH avec un coefficient de corrélation de 0.964 et 0.859 (Annexe N°6, A, B). Ces résultats montrent la contribution des flavonoïdes dans l'activité antiradicalaire de la plante étudiée. D'après

Ghedira, (2005) les flavonoïdes possèdent une forte activité antioxydante : Flavonoïde (OH) + R. → flavonoïde (O.) + RH. Les flavonoïdes seuls avec une certaine structure, particulièrement la position hydroxyle dans la molécule, peuvent agir en tant que donneurs de protons et d'électrons (Ghasemi *et al.*, 2009), ce qui a permis d'obtenir de bonnes corrélations avec ces derniers.

Ferreira *et al.*, (2006) rapportent dans leur étude sur *Paronychia argentea* provenant du Portugal que le % d'inhibition de DPPH de deux extraits issus de l'extraction conventionnelle (Extraction par macération à l'éthanol et Décoction) est respectivement de 8% , 9% (100 µg/ml) comparativement aux résultats de notre plante qui a donné un % d'inhibition de DPPH important pour une même concentration (30.8%, 10.2%), cela est peut être due à l'origine géographique ainsi qu'au stade de maturité ce qui jouent un rôle important dans la composition phénoliques de plante étudié.

➤ **Activité antiradicalaire contre le radical ABTS+**

Le test ABTS est un excellent paramètre pour déterminer l'activité antioxydante des composés donneur d'hydrogène (Marc *et al.*, 2004). Les résultats du pouvoir antiradicalaire des extraits, exprimés en pourcentage d'inhibition du radical ABTS+ (figure22), indiquent que tous les extraits possèdent la capacité de piéger le radical ABTS+ et leur capacité diffère significativement ($p < 0,05$) entre les procédés d'extractions (Annexe N°5, B).

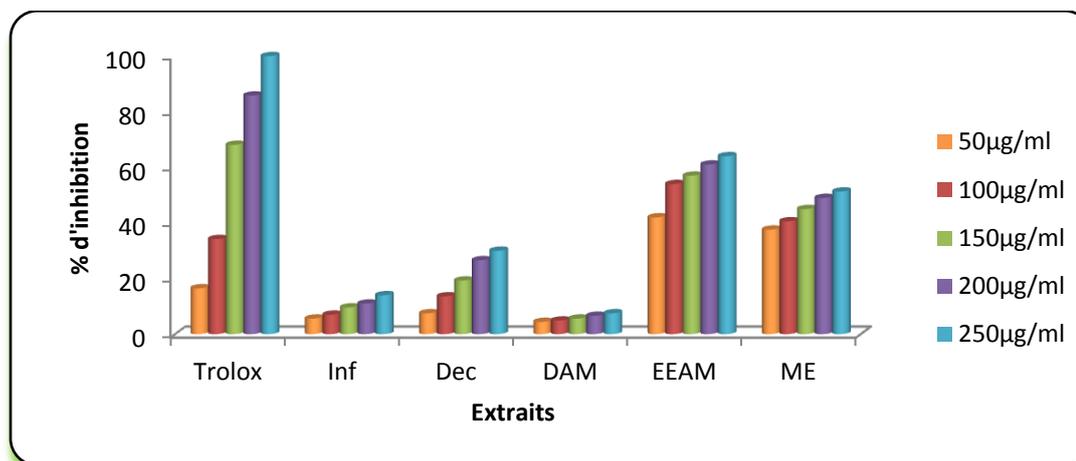


Figure22: Pourcentage d'inhibition du radical ABTS•+ par les différents extraits.

A la même concentration de 250 µg/ml, les résultats montrent que l'extrait obtenu par la macération éthanolique assistée par micro-onde est le plus actif, il enregistre un pourcentage d'inhibition de 64% suivi de l'extrait obtenu par macération à l'éthanol 51.3%

qui présente la moitié de l'activité antioxydante du standard (Trolox), l'extrait obtenu par la décoction présente un pourcentage d'inhibition de 30%, tandis que l'infusion et DAM montrent une faible aptitude à neutraliser le radical ABTS•+ qui est de 14%, 7.5%, respectivement.

Les résultats du test ABTS, sont légèrement différents de ceux obtenus avec le test DPPH.

Tableau IV: Concentrations des extraits et de Trolox qui inhibent 50% d' ABTS•+ (IC50).

Extraits	IC50 (µg/ml)
Trolox	89.53± 0.08
Macération éthanolique assistée par microonde (EEAM)	141.86±0.07 ^a
Décoction	403.09±0.06 ^c
Extraction par macération à l'éthanol (ME)	201.25±0.1 ^b
Infusion	956.25±0.1 ^d
Décoction assistée par microonde (DAM)	1889.31±0.05 ^e

Dans la même colonne les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement. $P < 0.05$, $a < b < c < d < e$

Le tableau IV montre les IC50 des extraits obtenus sur le radical ABTS+, ces valeurs sont inversement proportionnelles à l'effet scavenger dont les valeurs faibles reflètent un effet antiradicalaire important. L'étude statistique révèle des différences significatives entre les échantillons. Les IC50 montrent que l'extrait obtenu par macération éthanolique assistée par micro-onde est plus actif (IC50=141.86±0.07 µg/ml)

Des corrélations ($p < 0,05$) positives sont enregistrées entre les différents antioxydants présents dans les extraits analysés. Les coefficients sont de $r=0,945$ pour les polyphénols totaux, $r=0.960$ pour les flavonoïdes (Annexe N°7, A, B), cela signifie que les polyphénols totaux et les flavonoïdes contribuent dans l'activité antiradicalaire de *Paronychia argentea* plus précisément dans la réduction des radicaux cationiques.

➤ Test de chélation de fer ferreux

La ferrozine « monosodium salt hydrate of 3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-*p,p'*-disulfonic acid » est un réactif qui réagit avec les Fer divalents pour former un complexe stable (Stokey, 1970, Viollier *et al.*, 2000).

La capacité des extraits à chélater le Fe^{2+} a été évaluée et exprimée en pourcentage de chélation (Nisha *et al.*, 2009). La capacité chélatrice de Fe^{2+} des extraits est présentée sur la figure 23.

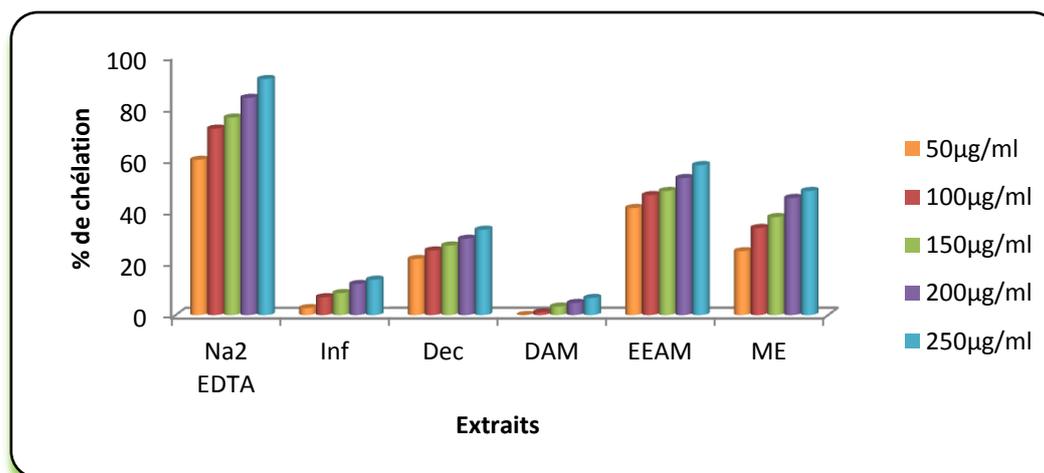


Figure 23: Pourcentage de chélation du Fe^{2+} par différents extraits

Les résultats obtenus montrent que les différents extraits et le standard interfèrent d'une manière dose dépendante avec la formation du complexe (Fe^{2+} -Ferrozine), suggérant qu'ils possèdent une activité chélatrice en capturant l'ion ferreux avant qu'il soit complexé avec la Ferrozine.

Pour une concentration de 250 µg/ml l'extrait obtenu par macération éthanolique assistée par micro-onde a donné le plus grand pourcentage de chélation qui est de 58% et le plus faible a été observé pour l'extrait obtenu par décoction assistée par microonde qui est de 6.6% à une même concentration.

Nous avons observé une différence entre la capacité inhibitrice de nos extraits, ce qui est dus essentiellement aux méthodes d'extraction cela est confirmé par l'analyse statistique ($p < 0.05$), (Annexe N°5, C).

L'EEAM présente une valeur d'IC50 égale à 170.15 ± 0.05 (tableau V), cela signifie qu'il présente la plus grande activité antioxydante en comparaison à d'autres extraits, mais elle est nettement supérieure à celle du standard ($NA_2EDTA 75.76 \pm 0.2$).

Tableau V : Concentration des extraits et du NA₂EDTA qui capte 50% de Fe²⁺ (IC₅₀).

Extraits	IC50 (µg/ml)
NA ₂ EDTA	75.76 ± 0.2
Macération éthanolique assistée par microonde (EEAM)	170.15±0.05 ^a
Extraction par macération à l'éthanol (ME)	239.31±0.15 ^b
Décoction	377.69±0.14 ^c
Infusion	874.25±0.09 ^d
Décoction assistée par microonde (DAM)	1808.06±0.04 ^e

Dans la même colonne les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement. $P < 0.05$, $a < b < c < d < e$

Il existe une corrélation positive et linéaire entre les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et la capacité chélatrice avec $r=0.964$, $r=0.901$, respectivement (Annexe N°8, A, B), cela signifie que les polyphénols totaux et les flavonoïdes contribuent dans l'activité chélatrice de *Paronychia argentea*.

De plus, la capacité chélatrice d'un composé phénolique dépend de la disponibilité d'un certain nombre de groupements fonctionnels convenablement orientés (Van Acker *et al.*, 1996). Donc un échantillon riche en composés phénoliques ne pourrait pas chélater les métaux de transition si ses polyphénols ne disposent pas de groupements fonctionnels nécessaires pour l'activité chélatrice, par exemple un groupement catéchol se lie fortement au fer contrairement à un groupement phénol, de même la conjugaison d'un composé phénolique avec un glucide entraîne la perte de l'activité chélatrice (Wong *et al.*, 2006).

➤ Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est la capacité d'un extrait à donner un électron et à réduire le Fer (Gulçin *et al.*, 2011). Les composés antioxydants causent la réduction de fer ferrique Fe⁺³ en fer ferreux Fe⁺² par leur capacité réductrice. Le complexe vert est formé par l'addition de FeCl₃ à la forme ferreux (Fe⁺²) (Koksal *et al.*, 2011).

Le pouvoir réducteur des extraits étudiés, est déterminé par la mesure de l'absorbance à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance indique une augmentation du pouvoir réducteur (Ribeiro *et al.*, 2008). L'histogramme obtenu dans la figure 24, indique que l'absorbance augmente au fur et à mesure que la concentration en extrait s'élève.

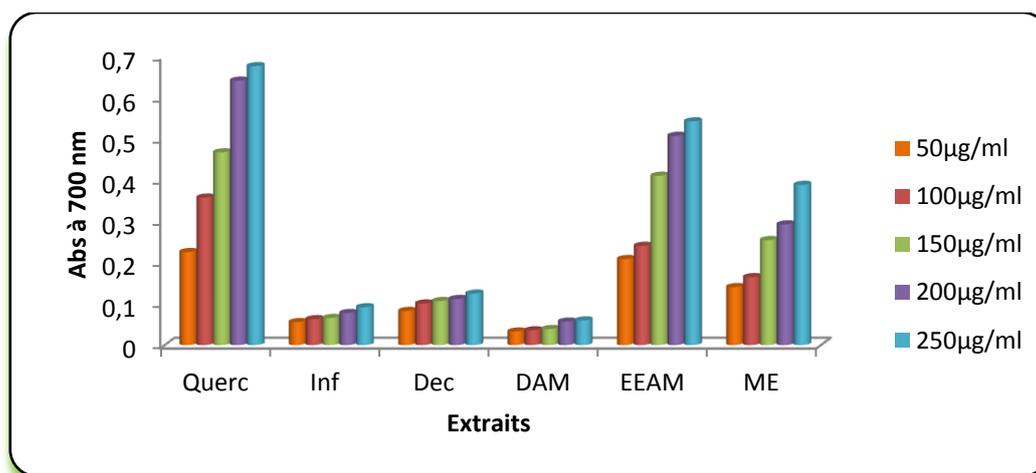


Figure 24 : Pouvoir réducteur des différents extraits

Le pouvoir réducteur des extraits (Figure 24) de notre plante est dose-dépendant. Ce pouvoir varie d'un extrait à un autre et le potentiel antioxydant le plus fort a été enregistré pour l'extrait obtenu par la macération éthanolique assistée par microonde où l'absorbance élevée a été notée (0,453 nm), tandis que l'extrait obtenu par décoction assistée par micro-ondes a exprimé le pouvoir le plus faible dont l'absorbance est de 0.060 nm. L'étude statistique a confirmé cette différence entre les extraits (Annexe N°5, D).

Le pouvoir réducteur de l'espèce *Paronychia argentea* est probablement dû à la présence de groupements hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électrons. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants.

La capacité réductrice (RC0.5) de nos extraits indique que c'est l'extrait obtenu par la macération éthanolique assistée par micro-ondes qui possède la RC0.5 la plus faible (224.94 ± 0.05) proche de celle de la quercétine qui est de $176.72 \pm 0.15 \mu\text{g/ml}$ (tableau VI), elle enregistre, ainsi, le pouvoir réducteur le plus élevé par rapport aux autres extraits issus de d'autres méthodes d'extraction.

Tableau VI : Concentration réductrice (RC_{0,5}) des extraits et du standard.

Extraits	RC0.5 (µg/ml)
Quercétine	176.72 ± 0.15
Macération éthanolique assistée par microonde (EEAM)	224.94±0.05 ^a
Extraction par macération à l'éthanol (ME)	354.86±0.07 ^b
Décoction	1147.27±0.25 ^c
Infusion	1587.67±2.08 ^d
Décoction assistée par microonde (DAM)	2442.83±1.76 ^e

Dans la même colonne les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement. $P < 0.05$, $a < b < c < d < e$

Le pouvoir réducteur enregistre des coefficients de corrélations positifs ($p < 0,05$) entre les différents antioxydants présents dans les extraits analysés. Les coefficients sont de 0.908 pour les polyphénols totaux et de 0.985 pour les flavonoïdes (Annexe N°9, A,B).

Discussion générale

Plusieurs auteurs ont rapporté une corrélation linéaire proportionnelle entre la composition en polyphénols et l'activité antioxydante des extraits végétaux. Shan et ses collaborateurs (2005) suggèrent, en se basant sur une corrélation linéaire positive, que la meilleure activité antioxydante est attribuée à la meilleure teneur en composés phénoliques.

Les tests de l'activité antioxydante étudiés utilisent deux mécanismes d'action des antioxydants sur les radicaux libres qui sont les transferts d'hydrogènes utilisés pour les test anti radicalaire (ABTS, DPPH) et le transfert d'électrons qui est spécifique au pouvoir réducteur et chélation du fer ferreux (Ferrozine).

En se basant sur les résultats des quatre tests chimiques, l'extrait obtenu par macération éthanolique assistée par micro-onde est donc désigner comme le plus intéressant en termes de capacité antioxydante, fortement liée à la présence de composés phénoliques, cela signifie que la méthode d'extraction par micro-ondes est une technique très prometteuse pour l'extraction des polyphénols (Rafiee, 2011). Cependant, l'extrait obtenu par décoction assistée par micro-ondes a toujours donnée de faible activité antioxydante cela est forcément due au solvant d'extraction utilisé.

Les extraits aqueux (Décoction, Infusion, Décoction assistée par microonde) montrent que la meilleur méthode d'extraction est la décoction ce qui correspond aux résultats rapportés

par Armoskaite *et al.*, (2011) qui confirment que la décoction du thé vert présente une activité antioxydante meilleur que celle de l'infusion.

V.3. Résultats d'analyse des saponines

V.3.1. Révélation et rendement des saponines

- D'après le test de mousse nous avons constaté l'apparition d'une mousse persistante à une hauteur de 1.2 cm (figure26) et qui persiste pendant 1 min, ceci indique une existence des saponines dans l'espèce *Paronychia argentea* ce que a été confirmé aussi par Abou Elkhair, *et al.* (2010).



Figure 25 : Resultats du test de mousse

- Le rendement des saponines obtenues est de 6.63% bien que Bogtter et Melzig(2011) indique que son rendement peut aller jusqu'à 20%.

V.3.2. Activité antioxydante des saponines

D'après les résultats obtenus on constate que le pourcentage d'inhibition du radical DPPH et le radical ABTS à une concentration de 1 mg/ml est de 37.1%, 31.9%, respectivement. On a constaté que les saponines ont le même effet inhibiteur sur les deux radicaux libres (DPPH, ABTS). La capacité des saponines à donner un électron et à réduire le fer ferrique Fe^{+3} en fer ferreux Fe^{+2} est de 31.20% pour le test de ferrozine et de 0.176 nm pour le pouvoir réducteur toujours à une concentration de 1 mg/ml. Les résultats obtenus dans le tableau VII montrent que les saponines de *Paronychia argentea* présentent à forte concentration (1 mg/ml) une activité antioxydante, Elle est relativement faible par rapport à l'activité antioxydante des extraits phénoliques.

Les concentrations des saponines qui inhibent 50% de radical DPPH est de $1243.85 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$.

Tableau VII: IC50 et RC0.5 de l'activité antioxydante des saponines.

Tests	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)
DPPH	1243.85 ± 0.06
Ferrozine	1908.33 ± 0.16
ABTS	2166.58 ± 0.26
Test	RC0.5 ($\mu\text{g/ml}$)
PR	4957.17 ± 1.04

L'objectif de ce travail visait la mise au point d'un procédé d'extraction des polyphénols à partir d'une source naturelle (*Paronychia argentea*) par des techniques conventionnelle et extraction assistée par micro-ondes. Une simple analyse des saponines de cette plante a été également entreprise.

Les résultats de l'extraction par les différentes méthodes ont révélé des rendements d'extraction différents. L'extrait éthanolique obtenu par micro-ondes et décoction par micro-ondes ont présenté les meilleurs rendements.

Les teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes varient d'un extrait à un autre, les plus grandes teneurs ont été observées avec l'extrait éthanolique obtenu par micro-ondes.

L'évaluation des propriétés antioxydantes des extraits révèle que les extraits éthanoliques obtenus par micro-ondes (EEAM) sont plus actifs, suivi de l'extrait éthanolique (ME), décoction, infusion et enfin décoction par micro-onde (DAM).

Les saponines ont été révélées par le test de la mousse, puis elles sont extraites pour subir le test de l'activité antioxydante. Les résultats du pouvoir antioxydant sont très faibles comparativement à ceux obtenus avec l'extrait phénolique.

Cependant et malgré l'importance des résultats obtenus, différents axes de recherche peuvent être proposés:

- Réaliser des tests *in vivo* pour une meilleure évaluation de l'activité antioxydante de cette plante;
- Etudier l'activité antimicrobienne des extraits ainsi que leurs principaux composés phénoliques individuels;
- Compléter ces développements en évaluant l'extraction assistée par micro onde sous atmosphère pressurisé. C'est une technique simple et rapide qui s'inscrit dans une démarche de chimie verte, évitant l'utilisation de solvants organiques toxiques pour l'environnement et la santé humaine.
- Quantifier et caractériser les saponines de cette plante par des méthodes plus performantes.

A

Abou Elkhair, E., Fadde, H., Abou Mohsen, U. (2010). Antibacterial Activity and Phytochemical Analysis of Some Medicinal Plants from GAZA Strip-Palestine . *Journal of Al Azhar University-Gaza (ICBAS Special Issue)*, **12** : 45-54.

Abu-Irmaileh, B.E., Afifi U.F. (2003). Herbal medicine in Jordan with special emphasis on commonly used herbs *Journal of Ethnopharmacology*, **89**: 193–197.

Afifi, F.U., Al-Khalidi, B., Khalil, E. (2005) . Studies on the in vivo hypoglycemic activities of two medicinal plants used in the treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine following intranasal administration. *Journal of Ethnopharmacology*, **100**: 314–318.

Al-Bakri, A.G., Afifi, F.U. (2007). Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *Journal of Microbiological Methods*, **68**: 19–25.

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

Alcaraz, C. (1991). La tetraclinaie sur terra rossa en sous-etage semi_aride superieur chaud. *Mediterránea Ser. Biol.*, **13**: 91-104 .

Amzal, H.(2010). *Étude de l'activité antioxydante des saponines du tourteau de l'arganier.* Thèse de docteur de biochimie-pharmacologie, Université de Rabat. 182P.

Armoskaite, V., Ramanauskiene, K., Maruska, A., Razukas, A., Dagilyte, A., Baranauskas, A., Briedis, V.(2011). The analysis of quality and antioxidant activity of green tea extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**(5) 811-816.

Arslan, I., Celik, A., Chol, J.H. (2012). A cytotoxic triterpenoid saponin from under-ground parts of *Gypsophila pilulifera* Boiss.& Heldr. *Fitoterapia*, **83**: 699–703.

B

Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, T., Gazin, TC., Pinkas, M., Luycky, M., Gazin, M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arznein Forsch/Drug Res*,1-6.

Beckman, K.B., Ames, B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological Review*, **78**:165-581.

Bekro, Y.A., Mamyrbekova, J.A., Boua, B., Trabi, F.H., Ehile E. (2007). Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpinaceae). *Sciences & Nature*, **4**: (2) 217 - 225.

Beloued, A. (1998) *étymologie des noms de plantes du bassin méditerranée*. office des publications universitaires : 64 - 63.

Beloued, A. (2001) *Plantes médicinales d'Algérie*. office des publications universitaires : 190-191.

Ben Chanaa, M., Lallemand, M., Mokhlisse, A. (1994). Pyrolysis of Timahdit, Morocco, oil shales under microwave field. *Fuel*, **73** (10) 1643-1649.

Benhammou, N., Bekkara, A.F., Panovska, K.T. (2009). Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compound of *Atriplex halimus*. *C. R. Chimie*, **12** : 1259–1266.

Berteaud, A.J., Delmotte, M. (1993). Les micro-ondes : de la cuisine à l'industrie. La recherche, **24** :286-294.

Bidie, F., N'guessan, B.B., Yapo, AF., David, J., Djaman, AJ. (2011). Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences & Nature*, **8** (1): 1 - 11.

Bonnaillie, C., Salacs, M., Vassilova, E., 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.

Bouanani, S., Henchiri, C., Migianu-Griffoni, E., Aouf, N., Lecouvey, M. (2010). Pharmacological and toxicological effects of *Paronychia argentea* in experimental calcium oxalate nephrolithiasis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **129**: 38–45.

Bourgou, S., Ksouri, R., Bellila, A., Skandrani, I., Falleh, H., Marzouk, B. (2007). Phenolic composition and biological activities of tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *C. R. Biologies*, **331**: 48-55.

Bottger, S., Melzig, M.F. (2011). Triterpenoid saponins of the Caryophyllaceae and Illecebraceae family. *Phytochemistry Letters*, **4** : 59–6.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaften and Technologie*, **28**: 25-30.

C

Carmona, M.D., Llorach, R., Obon, C., Rivera, D. (2005). Zahraa', a Unani multicomponent herbal tea widely consumed in Syria: components of drug mixtures and alleged medicinal properties. *Journal of Ethnopharmacology*, **102**: 344–350.

Carrió, E., Vallès, J. (2012). Ethnobotany of medicinal plants used in Eastern Mallorca (Balearic Islands, Mediterranean Sea). *Journal of Ethnopharmacology*, **141**:1021–1040.

Cavero, S., Garcia-Risco, M.R., Marin, F.R., Jaime, L., Santoyo, S., Senorans, F.J., Reglero, G., Ibanez E. (2006). Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano. Chemical and functional characterization via LC–MS and in vitro assays. *J. of Supercritical Fluids*, **38**: 62–69.

Caulier, G., Dyck, S.V., Gerbaux, P., Eeckhaut, I., Flammong, P. (2011). Etude sur la diversité des saponines parmi les holothuries de la famille des holothurioides (holothuriidae). *La Beche-de-mer*, **31**: 48-54.

Chan, S. W., Lee, C.Y., Yap, C.F., Wan, Aid, W.M., Ho, C.W. (2009). Optimization of extraction conditions for phenolic compounds from limanpurut (*Citrus lystrix*) peels. *International. Food Research Journal*, **16**: 203-213.

Chang, H.Y., Ho, Y.L., Sheu, M.J., Lin, Y.H., Tseng, M.C., Wu, S.H., Huang, G.J., Chang, Y.S. (2007). Antioxidant and free radical scavenging activities of *Phellinus merrillii* extracts. *Bot. Stud.*, **48**: 407-417

Chung, Y., Chien, C., Teng, K., Chou, T. (2006). Antioxidant and mutagenic properties of *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb and Zucc. *Food Chemistry*, **97**:418-425.

Cicco, N., Lanorte, M.T., Paraggio, M., Viggiano, M., Lattanzio, V. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, **91**: 107–110.

D

De Billerbeck, G.V., Roques, C., Vanière, P., Marquier, P. (2002). Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygiènes*, **3** : 248-25.

Decruyenaere, V., Remond, D., Zimmer, N., Poncet, C., Jebri, A., Thewis, A. (1996) Effet des tanins de chhaignier sur la digestion in sacco et in vivo des matières azotées chez les ruminants. *Renc. Rech. Ruminants*, **3** : 93 - 96.

De Lamarck, J.B., De Candolle, A.P. (1805). *Flore Française: ou descriptions succinctes de toutes les plantes qui croissent naturellement en France, disposées selon une nouvelle méthode d'analyse et précédées par un exposé des principes élémentaires de la botanique* : Dersay 3 /3 : 404-405.

De Santayana, M.P., Blanco, E., Morales, R. (2005). Plants known as tèn Spain: An ethnopharmaco-botanical review. *Journal of Ethnopharmacology*, **98** : 1–19.

Desai, J.V., Thomas, R., Kamat, S.D., Kamat, D.V. (2011). Microwave Assisted Extraction of Saponins from *Centella asiatica* & Its In Vitro Anti-Inflammatory Study . *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*, **1**(4) : 330-334.

Diouf, N.P., Stevanovic, T., Boutinb, Y. (2009).The effect of extraction process on polyphenol content, triterpene composition and bioactivity of yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton) extracts . *Industrial Crops and Products*, **30** : 297–303

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, **97** : 654–660.

Doymaz, I., Gorel, O., Akgun, N.A. (2004). Drying characteristics of the solid by product of olive oil extraction. *Biosystems Engineering*, **88** (2): 213-219.

E

Edeas, M. (2007). Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytotherapie*, **5**: 264–270 .

Escribano-Bailon, M. T., Santos-Buelga, C. (2003). Polyphenols extraction from foods. In: « Method in polyphénol analysis». Edition Royal Society of Chemistry, Cambridge, *United King Dom*, 1- 16.

Eskilsson, C.S., Bjorklund, E. (2000).Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, **902**: 227–250.

F

Ferreira, A., Proenc, C., Serralheiro, M.L.M., 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.

Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F.J., Mantecón, A.R. (2004). Review. Tannins and ruminant nutrition. Spanish. *Journal of Agricultural Research*, **2**(2) 191-202.

J

Jain, T., Jain, V., Pandey, R., Vyas, A., Shukla, S.S. (2009). Microwave assisted extraction for phytoconstituents – An overview . *Asian J. Research Chem*, **2**(1):19-25.

Jaykumar, V.D., Rency, T., Kamat, S.D., Kamat, D.V. (2011). Microwave Assisted Extraction of Saponins from *Centella asiatica* & Its In Vitro Anti-Inflammatory Study. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*, **1**(4) 330-334.

H

Hagerman, A.E., Bulter, L.G. (1978). Protein précipitation method for the quantitative détermination of tanin. *Journal agriculture and Food chemistry*, **26**(04): 809-812.

Hamdan, Afifi, F.U. (2004). Studies on the in vitro and in vivo hypoglycemic activities of some medicinal plants used in treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine .*Journal of Ethnopharmacology*, **93** : 117–121.

Hao, J., Han, W., Huang, S., Xue, B., Deng, X. (2002). *Microwave-assisted extraction of artemisinin from Artemisia annua L.* Separation and Purification Technology, **28**: 191–196.

Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif .*Phytothérapie*, **1**: 3-6.

Huhman, D.V., Sumner, L.W. (2002). Metabolic profiling of saponins in *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* using HPLC coupled to an electrospray ion-trap mass spectrometer .*Phytochemistry*, **59**: 347–360.

G

Gatidou, G., Zhou, J.L., Thomaidis, N.S. (2004). Microwave-assisted extraction of Irgarol 1051 and its main degradation product from marine sediments using water as the extractant followed by gas chromatography–mass spectrometry determination. *Journal of Chromatography A*, **1046**: 41–48.

Ghasmi, K., Ghasmi, y., Ali Ebrahimzadeh, M. (2009). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak. J. Pharm. Sci.*, **22**(3) 277-281.

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

Glua, G.H., Sokmena, M., Bektas, E., Dafererac, D., Sokmenb, A., Demira, E., Ahina, H.S. (2013). Automated and standard extraction of antioxidant phenolic compounds of *Hyssopus officinalis* L. ssp. *Angustifolius*. *Industrial Crops and Products*, **43** : 427– 433.

Gonçalves, S., Gomes, D., Costa, P., Romano, A. (2013). The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, **43**: 465– 471.

Gubb, S.A. (1913) .la flore algérienne naturelle et acquise : Bailliére tindall & cox, p.255.

Gulçin, I., Bursal, E. (2011). Polyphenol contents and in vitro antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of Kiwifruit (*Actinidiadeliciosa*). *Food Research International*, **44**: 1482-1489.

K

Kalender, Y., Kayaa, S., Durakb, D., Uzuna, F.G., Demira, F. (2012). Protective effects of catechin and quercetin on antioxidant status, lipid peroxidation and testis-histoarchitecture induced by chlorpyrifos in male rats. *environmental toxicology and pharmacology*, **33**: 141– 148.

Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem*, **94**: 550-557.

Kaplan, A. (2008). Pollen morphology of some Paronychispecies (Caryophyllaceae) from Turkey. *Biologia* 63/, **1** : 53-60.

Khan, N., Mukhtar, H. (2007). Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences* **81**:519– 533

Kaufmann, B., Christen, p. (2002). Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwave-assisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction. *Phytochemical Analysis* **13**: 105–113.

Koksal, E., Bursal, E., Dikici, E., Tozoglu F., Gulcin, I. (2011). Antioxidant activity of *Melissa officinalis* leaves. *Journal of Medicinal Plant Research*, **5** (2): 217-222

Kouamé, J., Gnoula, C., Palé, E., Bassolé, H., Guissou, I. P., Simporé, J., Nikiéma, J.B. (2009). Etude des propriétés cytotoxiques et anti-radicalaires d'extraits de feuilles et de galles de *Guiera senegalensis* J. F. Gmel (Combretaceae). *Science et technique, Sciences de la santé*, **32**:1-2.

Kwada, A.Y., Tella, I.O. (2009). Determination of infochemicals and the phytochemical screening of the foliage and stem-bark of *Senna siamea* (lam.) in Yola, Adamawa State. *Journal of Medicinal Plants Research* **3**:(9) 630-634.

L

Laib, I., Barkat, M. (2011). composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle des fleurs seches de *Lavandula officinalis*. *Agriculture*, **2**: 89-101.

Le, K., Chiu, F., Ng, K.(2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, **105**: 353–363.

Leong, L.P., Shui, G. (2002). An investigation of antioxydant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem.*, **76**: 69-75.

Li, H., Deng, Z., Wuc, T., Liu, D., Loewen, S., Tsao, R. (2012). Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chemistry*, **130** : 928–936.

Liu, D., Vorobiev, E., Savoie, R., Lanoisellé, L.J. (2011). Intensification of polyphenols extraction from grape seeds by high voltage electrical discharges and extract concentration by dead-end ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, **81**: 134–140.

Luthar, Z. (1992). Polyphenol classification and tannin content of buckwheat seeds (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Fagopyrum*, **12**: 36 - 42.

M

Maisuthisakul, P., Pasuk, S., Ritthiruangde j.P. (2008). Relationship between antioxidant proprieties and chemical composition of some Thai plants. *Journal of Food Composition and Analysis*, **21**:229-240.

Malesev, D., Kuntic, V. (2007) . Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the serbian chemical society*, **72** (10) : 921-939.

Mali, S., Borges, R.M. (2003). Phenolics, fibre, alkaloids, saponins, and cyanogenic glycosides in a seasonal cloudforest in India. *Biochemical Systematics and Ecology* **31** :1221–1246.

Man, S., Gao, W., Zhang Y., Huang, L., Liu, C.(2010).Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents .*Fitoterapia*, **81** : 703–714.

Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. (2007).*Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research.* *Pharmacognosy Reviews*, **1**(1):7-18.

Marc, F., Deglène-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M.(2004).Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Medecine/Science*, **20** : 458-63.

Milardovic, S., Ivekovic, D., Bozidar, S.G. (2006). *A nouvel amperometric method for antioxydant activity determination using DPPH free radical.* *Bioelectrochemistry*, **68**: 175-180.

Michel, T.(2011). *Nouvelles methodologie d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molecules bioactives de l'argousier (Hippophae rhamnoides).* These de docteur de Chimie Analytique - Phytochimie. école Doctorale sciences et technologique, 283p.

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxydant activity. *Journal of Science Technology*, **26** (2): 211-219.

Munteanu, F., Basto, C., Gubitz, G.M., Cavaco-Paulo, A. (2007). Staining of wool using the reaction products of ABTS oxidation by Laccase: Synergetic effects of ultrasound and cyclic voltammetry. *Ultrasonics Sonochemistry*, **14** : 363–367.

N

Naczk, M., Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, **1054**: 95-111.

Nenadis N, Wang LF, Tsimidou M, Zhang HY. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS⁺ assay. *J Agric Food Chem*, **52**(15):4669-4674.

Nguyen van, C. (2010). *Maîtrise de l'aptitude technologique des oléagineux par modification structurelle ; applications aux opérations d'extraction et de transestérification in situ*. These de Docteur de UFR Pôle Sciences et Technologie, Université de Rochelle, 170p.

Nisha, P., Abdul Nazar, P., Jayamurthy P. (2009). A comparative study on antioxidant activities of different varieties of *Solanum melongena*. *Food and Chemical Toxicology*, **47**:2640-2644.

O

Oakenfull, D. (1981). Saponins in food. *Food Chemistry*, **6**: 19-40.

Ocana, E.M., Fernandez, I., Pastor, J. (1997). Fruit and seed morphology in *paronychia* Miller from south-west Spain . *Lagasalia*, **19** (1-2): 521-528.

Owen, L.P., Johns, T. (1999). Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*, **64** :149–160.

P

Paris, M., Hurbeille, M. (1981). Abrégé de matière médicinale, pharmacognosie : *TEC ET DOC* : 1-10.

Pastre, J.O.C. (2005). *Interer de la supplementation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques*. Thèse de docteur vétérinaire, université de toulouse3, 116 p.

Pincemail, J., Defraigne, J.O. (2004). Les antioxydants, un vaste réseau de défense pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène. Symposium « Antioxydants et alimentation ». *Institut Danone*, 1-2.

Popovici, C., Saykova, I., Tylkowski, B.(2009).Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, **4** : 25-39.

Prior, R.L., Cao, G.(1999) . In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Frees Radicals in biology and Medicine*, .**27**:1173-1181.

R

Rafiee, Z., Jafari, M.S., Alami, M., Khomeiri, M. (2011). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparraison with macération .*The Journal of Animal & Plant Sciences*, **21**(4): 738-745.

Rakic, S., Petrovic, S., Kukic, J., Jadranin, M., Tesevic, V., Povrenovic, D., Siler-Marinkovic, S.(2007).Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia . *Food Chemistry*, **104** : 830–834.

Rebereau-Gayon, P.(1968). Les composés phénoliques des vegetaux. *Dunod*, 1-201.

Ribeiro S.M.R., Barbosa L.C.A., Queiroz J.H., Knodler M. et Schieber A. (2008). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food Chemistry*, **110**: 620-626.

Richard, T., Vergé, S., Vercauteren J., Monti, J.P. (2001). Étude de l'interaction taninprotéine par RMN et modélisation moléculaire. Deuxième journée scientifique de l'UFR des sciences pharmaceutiques. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, **140** : 127-166.

Rolland, Y. (2004). Antioxydants naturels végétaux. *OCL*, **11**(06): 1-4.

S

Sereme, A., Millogo-Rasolodimby, J., Guinko, S., Nacro, M. (2010). Anatolie et concentration des tannins des plantes tanniferes du BURKINA FASO. *Journal des sciences*, **10**: 24 – 32.

Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M., Corke H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and food chemistry*,**53**:7749-7759.

Sparg, S.G., Light, M.E., Van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, **94**: 219-243.

Stokey, L.L. (1970). Ferrozine-A New Spectrophotometric Reagent for Iron .*Analytical chemistry*, **42**: (7) 779-781.

V

Vaithyanathan, S., Kumar, R. (1993). Relationship between protein-precipitating capacity of fodder tree leaves and their tannin content Animal .*Feed Science and Technology*, **44** : 281-287.

Van Acker, S., Ben Derg, D., Tromp, M., Griffioen, S., Bennekom, W., Van Der Vijgh W., Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*, **20** (3) 331-342.

Van Den berg, R., Haenen, G.R., Van Den berg, H. (2000). The predictive value of the antioxidant capacity of structural related flavonoids using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food chemistry*, **41**:1738-1744.

Villano D, Fernandez-Pachon MS, Moya ML, Troncoso AM, Garcia- Parilla MC. (2007) Radical scavenging ability of phenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* **71**: 230–235.

Viollier, E., Inglett, P.W., Hunter, K., Roychoudhury, A.N., Van Cappellen, P.(2000). The ferrozine method revisited: Fe(II)/Fe(III) determination in natural waters. *Applied Geochemistry*, **15** : 785-790.

W

Wang, L., Qin, P., HU, Y. (2008), Study on the microwave-assisted extraction of polyphenols from tea. *Front. Chem. Eng. China* **4**(3): 307–313.

Wang, LY., Xi, G.S., Zheng, C.Y., Miao, S.F.(2010).Microwave-assisted extraction of flavonoids from Chinese herb Radix puerariae (Ge Gen).*Journal of Medicinal Plants Research*, **4**(4): 304-308.

Wang, J.X., Xiao, X.H., Li, G.K. (2008). Study of vacuum microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds and pigment from Chinese herbs. *Journal of Chromatography A*, **1198–1199**: 45–53.

Wong, S.P., Leong, L.P. (2006) Antioxidant activities of aqueous extracts of selected tropical plants. *Food Science and Technology Programme*.

Z

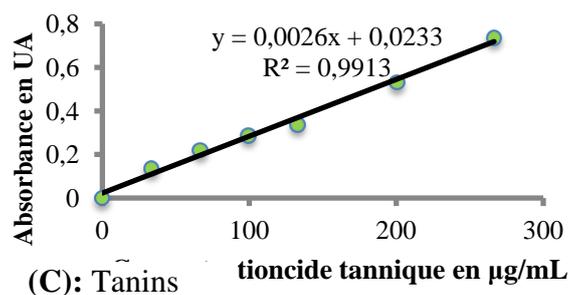
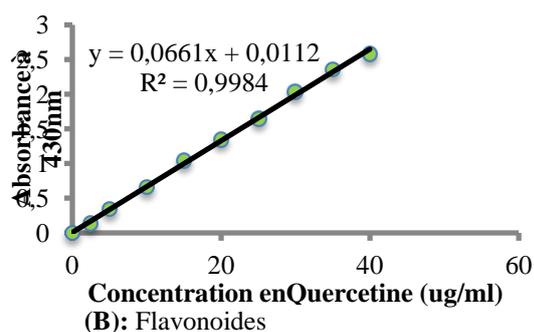
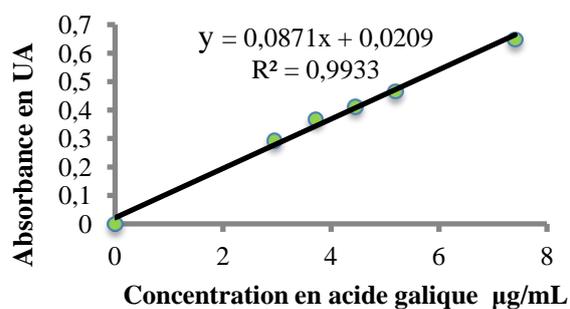
Zama, D., Meraihi, Z., Tebibel, S., Benayssa, W., Benayache, F., Benayache, S., Vlietinck, A. (2007). Chloropyrifos-induced oxidative stress and tissue damage in the liver, kidney, brain and fetus in pregnant rats: the protective role of the butanolic extract of *Paronychia argentea* L. *Indian Journal of Pharmacology*, **39**: 145–150.

Zhou, H., Lui, C. (2006). Extraction assistée par microonde de solanésol des feuilles de tabac. *J. chromatography A*, **1129** :135-139.

Annexe N°1 : valeurs de constante diélectrique (ϵ') et du facteur de perte diélectrique (ϵ'') pour les solvant plus communément utilisés (Tripti Jain 2009, Thomas Michel, 2011).

Solvant	ϵ'	ϵ''
Hexane	1.89	<0.1
Heptane	1.92	0
Dichlorométhane	8.9	1.14
2-Propanol	19.9	1.66
Acetone	20.7	2.69
Ethanol	24.3	1.69
Méthanol	32.6	2.87
Acetonitrile	37.5	3.44
Eau	78.3	1.87

Annexe N°2 : Courbes d'étalonnages pour le dosage des polyphénols



Annexe N°3 : Analyse statistique des rendements sous l'effet des extraits

Test LSD; variable REND (sihem memoire.sta)					
Suite...					
Groupes homogènes, alpha = ,05					
EFFET PRINC.: EXTRAITS					
EXTRAITS	Moy.	1	2	3	4
Inf {1}	12,33333	xxxx			
Dec {2}	13,76667		xxxx		
DAM {3}	27,13333			xxxx	
ME {5}	27,13333			xxxx	
EEAM {4}	47,83333				xxxx

Annexe N°4 : Analyse statistique des teneurs en composés phénolique sous l'effet des extraits

Suite...		Groupes homogènes, alpha = ,05 EFFET PRINC.:EXTRAITS				
EXTRAITS	Moy.	1	2	3	4	
DAM {3}	,260000	xxxx				
Inf {1}	,293333	xxxx				
Dec {2}	,464000		xxxx			
ME {5}	,561000			xxxx		
EEAM {4}	,748000				xxxx	

(A): Polyphénols totaux

Suite...		Groupes homogènes, alpha = ,05 EFFET PRINC.:EXTRAITS				
EXTRAITS	Moy.	1	2	3	4	
DAM {3}	,930000	xxxx				
Inf {1}	,963000	xxxx				
Dec {2}	1,666667		xxxx			
ME {5}	3,240000			xxxx		
EEAM {4}	4,750000				xxxx	

(B): Flavonoïdes

Suite...		Groupes homogènes, alpha = ,05 EFFET PRINC.:EXTRAITS			
EXTRAITS	Moy.	1	2	3	
Inf {1}	,066333	xxxx			
DAM {3}	,069000	xxxx			
Dec {2}	,181000		xxxx		
ME {5}	,255667		xxxx		
EEAM {4}	,392000			xxxx	

(C): Tanins

Annex 5 : Analyse statistique de l'activité antioxydant des extraits

Suite...		Groupes homogènes, alpha = ,05 EFFET PRINC.:EXTRAITS					
EXTRAITS	Moy.	1	2	3	4	5	
EEAM {4}	136,640	xxxx					
ME {5}	265,587		xxxx				
Dec {2}	419,560			xxxx			
DAM {3}	651,490				xxxx		
Inf {1}	1438,470					xxxx	

(A): Activité antiradicalaire au DPPH

Test LSD; variable IC50ABTS (newh.sta)						
Suite...		Groupes homogènes, alpha = ,05 EFFET PRINC.:EXTRAITS				
EXTRAITS	Moy.	1	2	3	4	5
EEAM {4}	141,860	xxxx				
ME {5}	202,250		xxxx			
Dec {2}	403,090			xxxx		
Inf {1}	956,250				xxxx	
DAM {3}	1889,310					xxxx

(B): Activité antiradicalaire à ABTS

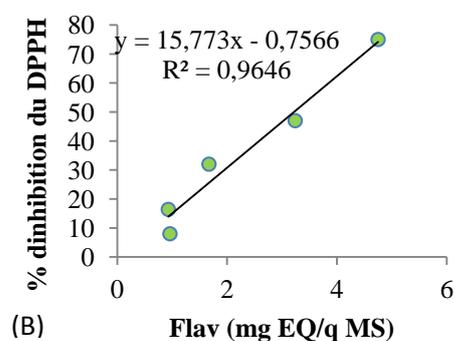
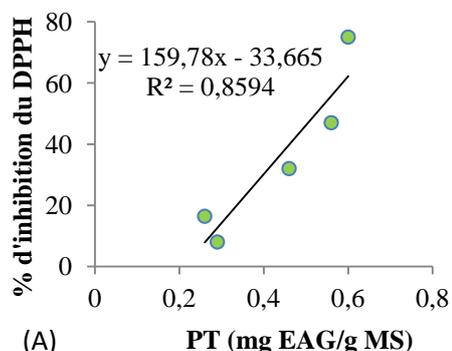
Test LSD; variable IC50FERO (newh.sta)						
Suite...		Groupes homogènes, alpha = ,05 EFFET PRINC.:EXTRAITS				
EXTRAITS	Moy.	1	2	3	4	5
EEAM {4}	170,150	xxxx				
ME {5}	239,310		xxxx			
Dec {2}	377,690			xxxx		
Inf {1}	874,250				xxxx	
DAM {3}	1808,060					xxxx

(C): Activité chélatrice du fer (Ferrozine)

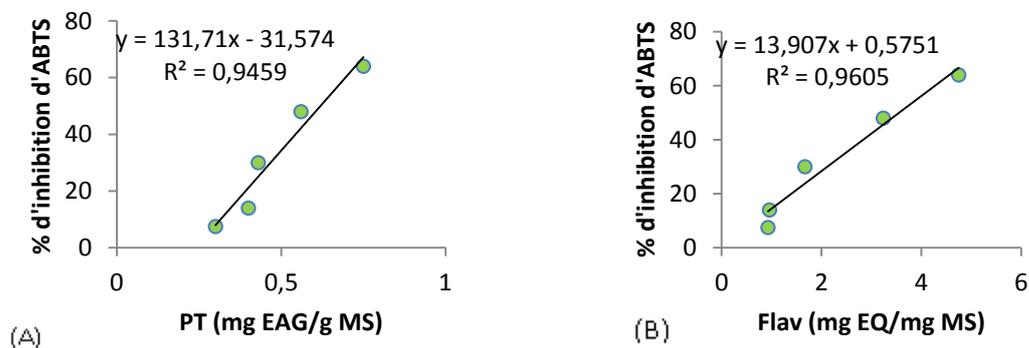
Test LSD; variable IC50_PR (newh.sta)						
Suite...		Groupes homogènes, alpha = ,05 EFFET PRINC.:EXTRAITS				
EXTRAITS	Moy.	1	2	3	4	5
Inf {1}	158,670	xxxx				
EEAM {4}	224,940		xxxx			
ME {5}	354,860			xxxx		
Dec {2}	1147,270				xxxx	
DAM {3}	2442,830					xxxx

(D): pouvoir réducteur

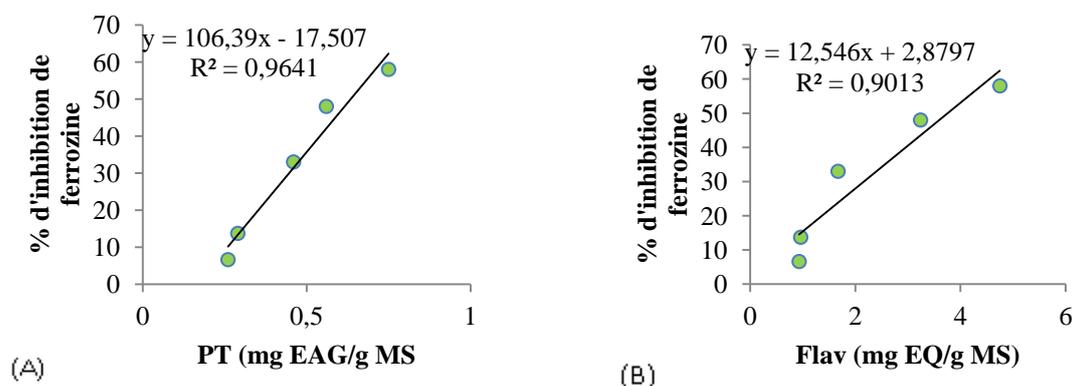
Annexe N°6: Corrélations entre le pourcentage d'inhibition du radical DPPH[•] et les teneurs en antioxydant dosés, polyphénols totaux (A) et en flavonoïdes (B).



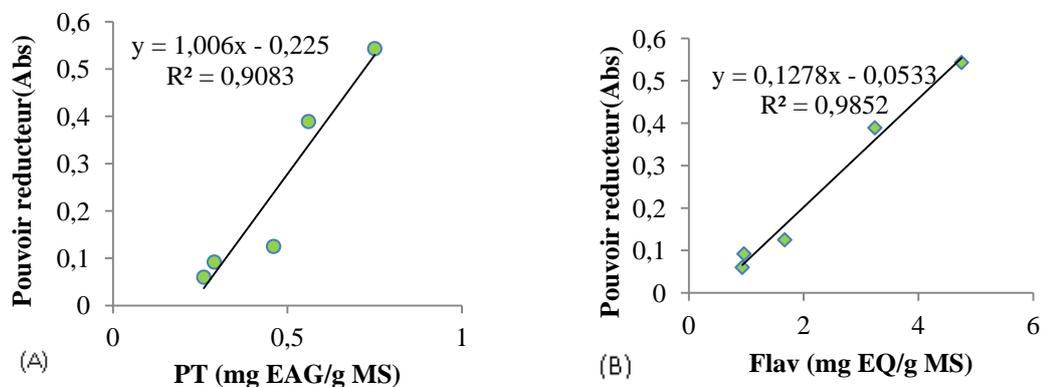
Annexe N°7: Corrélation entre l'activité antiradicalaire à ABTS et les teneurs en polyphénols totaux (A) et en flavonoïdes (B) des extraits



Annexe N°8: Corrélation entre l'activité réductrice de ferrozine et les teneurs en polyphénols totaux (A) et en flavonoïdes (B) des extraits



Annexe N°9: Corrélation entre le pouvoir réducteur et les teneurs en polyphénols totaux (A) et en flavonoïdes (B) des extraits



Annexe N° 10: Appareillage utilisé dans l'étude**Matériels leur marque**

Spectrophotomètre VIS (UNICO[®] 1100
SPECTROPHOTOMETRE)
four à microonde (MAXIPOWER)
étuve (BRINDER)
four à moufle (RETSH As 200)
Centrifugeuse (MIKRO120)
Balance électriques (RADWAG : PS 600/C/2)
P mètre (HANNA Instrument)
tamiseur électrique (
broyeur électrique (INKA[®] basic)

Annexe N°11 : Préparation des différentes solutions utilisées.

Solution	Réactif	Conservation
Solution de carbonate de sodium (NaCO ₃)	-20g / 100ml d'eau distillée	Température ambiante
Solution de Chlorure d'aluminium (AlCl ₃)	-2g / 100 ml d'éthanol	Température ambiante
Solution BSA	-1mg de BSA / 1ml de tampon A	4°C.
Tampon A	-1.14ml d'acide acétique -0.986g de Na Cl /80ml d'eau distillée -Le PH ajusté à 4.9 avec NaOH et ajuster à 100ml avec de l'eau distillée.	Température ambiante
SDS/TEA	-0.5g de SDS -2.5ml de TEA -ajusté à 50ml d'eau distillée	Température ambiante
Chlorure ferrique (Fe Cl ₃)	-0.415 ml de HCL (1N) -0.81g de FeCl ₃ - ajusté à 500 ml avec de l'eau distillée	Température ambiante
Solution de DPPH	-3.5mg de DPPH / 150 méthanol	Température ambiante

Solution du radical ABTS ^o	-154mg d'ABTS/40ml d'eau distillée -26.4mg de persulfate de potassium dans 40ml d'eau distillée -incubation pendant 16h à l'abri de la lumière	Température ambiante
Ferrozine	-15mg/6ml de méthanol	Température ambiante
<i>chlorure ferreux</i> FeCl ₂	- 1mg/10ml d'eau distillée	Température ambiante
Tampon P	- 8.5ml de la solution KH ₂ PO ₄ - 91.5 ml de la solution K ₂ HPO ₄ - PH ajusté à 6.9	Température ambiante
solution NaHP ₂ O ₄ (0.1M)	-1.36g de NaHP ₂ O ₄ -100ml d'eau distillée	Température ambiante
solution Na ₂ HPO ₄ (0.2M)	-3.484g de Na ₂ HPO ₄ -100ml d'eau distillée	Température ambiante
Ferricyanure de potassium (K ₃ Fe(CN) ₆) 1%	-0.1 g de K ₃ Fe(CN) ₆ - 10ml d'eau distillée	Température ambiante
Acide trichloroacétique (TCA)	-1g de TCA -10ml d'eau distillée	Température ambiante

Annexe N°12: les produits chimiques utilisés

Produit	Provenance
Acide acétique 100%	Prolabo
Acide gallic (C ₇ H ₆ O ₅ H ₂ O)	Biochem Chemopharma
Dichlorure ferrique (fecl2)	Biochem Chemopharma
Hydroxyde de sodium (NaOH)	Biochem Chemopharma
Carbonate de sodium (CNa ₂ O ₃)	Biochem Chemopharma
Chlorure d'aluminium (AlCl ₃ , ₆ H ₂ O)	Biochem Chemopharma
Chlorure de sodium (Nacl)	Biochem Chemopharma
Ethanol (C ₂ H ₂ O ₂)	Biochem Chemopharma
Folin Ciocalteu	Prolabo
Méthanol (CH ₄ O)	Biochem Chemopharma
DPPH : 2,2-diphényl-1-pcrylhydrazyl (C10H12N5O8)	Sigma Aldrich
Trolox	Sigma Aldrich
Quercetine (C ₁₅ H ₁₀ O ₇ H ₂₀)	Sigma Aldrich
BHA : Butyl hydroxyanisole	Aldrich Chemistry

Persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$)	Sigma Aldrich
ABTS : 2,2'- azobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique acide ($C_{18}H_{26}N_6O_6S_4$))	Sigma Aldrich
1-butanol ($C_4H_{10}O$)	Sigma Aldrich
Ferrozine $C_{20}H_{13}N_4NaO_6S_2$)	Aldrich Chemistry
Chlorure ferrique ($FeCl_3$)	Biochem Chemopharma
Sodium dihydrogen phosphate anhydrous(NaH_2PO_4)	Biochem Chemopharma
Disodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4)	Biochem Chemopharma
TCA : Acide trichloro acétique ($C_2HCl_3O_2$)	Sigma Aldrich
Ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$)	Biochem Chemopharma
Na_2EDTA : Acide dissodium Ethylnediamine tétraacetic	Biochem Chemopharma

Résumé

L'objectif de cette étude est la détermination de l'effet des méthodes d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante de *Paronychia argentea*. Deux techniques ont été choisies, une technique conventionnelle (infusion, décoction et macération éthanolique) et une nouvelle technique qui est l'extraction assistée par micro-ondes (deux solvants : éthanol et l'eau).

Les résultats de l'extraction nous révèlent que le rendement le plus élevé est obtenu par une extraction éthanolique assistée par micro-ondes (48%). L'analyse quantitative réalisée par des méthodes spectrophotométriques montre que l'extrait éthanolique assisté par micro-ondes de *Paronychia argentea* se distingue des autres extraits par les meilleures teneurs en polyphénols totaux et les flavonoïdes (4.75 ± 0.3 mg EQ/ g MS ; 0.75 ± 0.17 mg EAG/ g MS, respectivement). Les résultats de l'activité antioxydante indiquent que l'extrait éthanolique assisté par micro-ondes a donné la meilleure activité.

L'extraction des saponines a été effectuée après le test de révélation de la mousse (hauteur de 1.2cm), le rendement d'extraction de ces métabolites est de 6.63%. Leur activité antioxydante est très faibles comparativement à celle obtenue avec les extraits phénoliques.

Mots clés: *Paronychia argentea*, Extraction conventionnelle, Extraction micro-ondes, polyphénols, saponines, Activité antioxydante.

Abstract

The objective of this study is to determine the effect of extraction methods on phenolic content and antioxidant activity of *Paronychia argentea* collected from Amizour (Bejaia), we selected five techniques, three conventional extraction (infusion, decoction and ethanolic maceration) and the other of which is extracted by microwave assisted with two solvents water and ethanol(70%).

The different extraction methods results reveal that the higher extraction yield is that obtained by ethanol extraction assisted by microwave (48%). The quantitative analysis by spectrophotometric methods shows that *Paronychia argentea* contain significant amounts of flavonoids, significant levels of polyphenols with faint traces of tannins. The ethanol extract assisted by microwave differs from other extracts by the best levels of phenolic compound, flavonoids with 4.75 ± 0.3 mg EQ / g DM), total polyphenols 0.75 ± 0.17 mg EAG / g DM.

The results of antioxidant activity (reduction of $FeCl_3$ and ferrozine), radical scavenging (DPPH • and ABTS•+) obtained indicate that the ethanol extract assisted by microwave gave the highest antioxidant activity compared to other extracts tested.

A separate analysis of the saponins s' extraction was performed (6.63% yield), after the positive foam test (1.2cm height) and their antioxidant activity was tested using the same tests mentioned above. The results of antioxidant activity are very low compared to phenolic compounds.

Key words: *paronychia argentea*, Conventional extraction, microwave extraction, Phenolic compound, Antioxidant activity, saponins, antioxidant activity.