

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane MIRA de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Alimentaires

Mémoire de Fin de Cycle

En Vue de l'Obtention du Diplôme d'Ingénieur d'Etat en science alimentaire

Thème

*Étude comparative de la composition phénolique et de
l'activité antioxydante de deux extraits de sommités fleuries de
Erica multiflora L*

Réalisé par

M^{elle} Brahmi Kahina
M^{elle} Guedjali Saida

Membre de jury

Présidente : M^{me} MEKHOUKHE .
Promotrice : M^{me} BOUCHEFA-GUENDOUZE N.
Co-promoteur : M^r CHERIFI C.
Examineur1 : M^{lle} BRAHMI F.
Examineur2 : M^r BOUDRIES H.

Année 2011-2012



Remerciements

*Au terme de ce modeste travail, nous tenons à exprimer nos remerciements les plus sincères, tout d'abord au « **BON DIEU** » pour la patience et la santé qui nous a été utile tout au long de notre parcours.*

*Nous tenons à remercier infiniment notre promotrice **M^{me} Bouchefa-Guendouze N** et **M^r Chérifi C** pour leurs dévouement.*

*Nous adressons aussi nos plus vifs remerciements à **M^{me} Mekhoukhe** d'avoir accepté de présider ce jury.*

*Nous tenons également à remercier **M^{lle} Brahmi F.** pour l'honneur qu'elle nous a fait d'avoir accepté d'examiner notre œuvre.*

*Nos sincères remerciements s'adressent également à **M^r Bouderies H** d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

SAIDA et KAHINA.



Dédicaces

À l'aide du bon Dieu, le tout puissant, ce travail est achevé, je le dédie à toutes

Les personnes qui me sont chères ;

À la mémoire de mes très chers grand parents que j'ai toujours aimé, que Dieu les accueillent

Dans son vaste paradis.

À la plus cher au monde qui a donnée sens a mon existence, et qui m'a soutenu nuit et jours et durant tout mon parcours. Ma très chère mère qui a consacré sa vie pour bâtir la mienne, je lui serai éternellement reconnaissant, merci

Maman.

À mes très chers frères.

À mes tantes et mes ancles.

*À ma meilleure amie **Saida** pour sa présence et son soutien depuis le premier jour de notre*

Connaissance et toute sa famille.

À ma promotrice et toute sa famille.

*À tous mes amis particulièrement : **Souhila, Noura, Sabrina, Souad, Souad.***

À toute la promotion SA (2011-2012).

Kahina



Created with

 **nitro**^{PDF} professional

download the free trial online at nitropdf.com/professional

*D*édicaces

À l'aide du bon Dieu, le tout puissant, ce travail est achevé, je le dédie à toutes

Les personnes qui me sont chères ;

À la mémoire de mes très chers grand parents que j'ai toujours aimé, que Dieu les accueillent

Dans son vaste paradis.

*Aux deux êtres les plus chers au monde qui ont donnée sens a mon existence,
et qui m'ont soutenu nuit et jours et durant tout mon parcours. Ma très chère mère qui
a consacré sa vie pour bâtir la mienne, je lui serai éternellement reconnaissant, merci*

Maman.

À celui qui m'a indiqué la bonne voie en me rappelant que la volonté fait toujours les grands

Hommes : mon père soit toujours en bonne santé et à mes cotés.

À mes très chers frères : Boussaad, Toufik et Abd lfeteh.

À mes très chers sœurs : Mnana, Nadia, Hakima, Rachida et Youna.

À mes tantes et mes ancles.

À ma meilleure amie Karina pour sa présence et son soutien depuis le premier jour de notre

Connaissance et toute sa famille.

À ma promotrice et toute sa famille.

À tous mes amis particulièrement : Souhila, Anissa, Sonia, Khadidja, Lynda, Aicha,

Katiba, Salima, Ghania, Wardia.

À toute la promotion SA (2011-2012)

Saida



Created with

 **nitro**^{PDF} professional

download the free trial online at nitropdf.com/professional

Liste des abréviations

- **TCA** : Acide trichloracétique
- **BSA** : Bovine sérum albumine
- **DPPH** : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle
- **EGA** : Equivalent Acide gallique
- **EAT** : Equivalent Acide tannique
- **EC** : Equivalent catéchine
- **EQ** : Equivalent quercétine
- **ERO** : Espèces réactive de l'oxygène
- **FeCl₃**: Chlorure ferrique
- **MS** : Matière sèche
- **SDS/ TEA** : Dodesyl sulfate de sodium/Triéthanolamine
- **IC₅₀** : concentration d'extrait inhibant 50% de radicaux

Liste des figures

Numéro de la figure	Titre des figures	Numéro de page
1	Photographie de <i>Erica multiflora</i> L	4
2	Exemple d'acide hydroxybenzoïques (a) et d'acides hydroxycinnamiques (b).	7
3	Structure de base des flavonoïdes	8
4	Structures de base des principales classes des flavonoïdes	9
5	Photographie de <i>Erica multiflora</i> L	19
6	Mécanisme de réaction du chlorure d'aluminium avec les flavonoïdes	22
7	Représentation graphique du pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium pour les deux extraits	30
8	Représentation graphique du pouvoir réducteur par le molybdate d'ammonium.	32
9	Représentation graphique du pourcentage d'inhibition du DPPH	33

Liste des tableaux

Numéro du tableau	Titre du tableau	Numéro de page
I	Les noms vernaculaires de <i>Erica multiflora</i> L	3
II	Classification de l'espèce <i>Erica multiflora</i> L	4
III	Résultats du dosage des polyphénols totaux.	27
IV	Résultats du dosage des flavonoïdes	28
V	Résultats du dosage des tanins totaux	29
VI	Résultats des IC ₅₀ (mg/mL) du pouvoir réducteur par le ferricyanure de potassium.	31
VII	Résultats des C ₅₀ (mg/mL) pour le test au phosphomolybdate d'ammonium.	32
VIII	Résultats des IC ₅₀ (mg/mL) pour le test au DPPH.	33

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les plantes

I.1. Présentation de la famille des Ericacées.....	3
I.2. Présentation du genre <i>Erica</i>	3
I.3. Présentation de l'espèce <i>Erica multiflora</i> L.....	3

Chapitre II : Généralités sur les Polyphénols

II.1. Définition.....	6
II.2. Classification des polyphénols.....	6
II.3. Propriétés des composés phénoliques.....	10

Chapitre III. Généralités sur l'activité antioxydante

III.1. Radicaux libres.....	13
III.1.1. Définition.....	13
III.1.2. Origine.....	13
III.1.3. Espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	14
III.2. Stress oxydatif.....	14
III.3. Antioxydants.....	14
III.3.1. Définition.....	14
III.3.2. Classification des antioxydants.....	14

Chapitre IV : Matériel et méthodes

IV. Matériel et méthodes.....	19
IV.1. Matériel.....	19
IV.1.1. Description du matériel végétal.....	19
IV.1.2. Site de récolte de la plante.....	19
IV.2. Méthodes.....	19
IV.2. 1. Extraction.....	19
IV.2.2. Dosage phytochimique.....	21

Chapitre V : Résultats et discussion

V.1. Analyses phytochimiques.....	27
V.2. Activités antioxydante.....	29
Conclusion	34
Références bibliographiques	35
Annexes	

Introduction

INTRODUCTION

Jusqu'au début du XXe siècle, les médicaments utilisés pour le traitement des maladies étaient des produits naturels, dérivés ou non de la matière vivante, le plus souvent des plantes ou des fragments de plantes séchées mais parfois fraîches (**Lüllmann et al., 1998**).

Les plantes médicinales sont largement étudiées grâce à leur capacité de produire des molécules d'importance thérapeutique (**Ghangal et al., 2009**). Ces molécules, appelées principes actifs, agissent directement sur l'organisme (**Iserin, 2001**).

Les plantes médicinales sont riches en métabolites secondaires (**Ghangal et al., 2009**) comme les composés phénoliques qui englobent entre autres les flavonoïdes, les acides phénoliques et les tanins (**Surveswaran et al., 2007**). Ces composés sont dotés de plusieurs activités thérapeutiques telles que l'activité antioxydante (**Choi et al., 2002**).

L'activité antioxydante des composés phénoliques dépend de leur structure, en particulier le nombre et les positions de groupes d'hydroxyle et la nature des substitutions sur les anneaux aromatiques (**Aberoumand et Deokule, 2008**).

L'extraction des principes actifs du matériel végétal est influencée par divers paramètres tels que la polarité du solvant, la procédure d'extraction et la taille des particules à extraire (**Mukhopadhyay et al., 2006**).

La technique d'extraction liquide /solide la plus largement utilisée pour l'extraction des composés phénoliques est généralement l'extraction par macération. L'extraction par micro-ondes est une technique qui a été développée pour réduire le volume des solvants nécessaires, d'améliorer le rendement de la récupération des polyphénols, de réduire le temps d'extraction et de diminuer le coût de l'opération (**Shu et al., 2003**).

Le but de ce travail consiste en une étude comparative de la composition phénolique et de l'activité antioxydante de deux extraits des sommités fleuries de *Erica multiflora L.*, l'un obtenu par macération et l'autre par micro-onde.

Cette étude est divisée en deux parties :

➤ Une synthèse bibliographique comportant des généralités sur la plante, les composés phénoliques et l'activité antioxydante.

➤ Une étude expérimentale incluant l'extraction, le dosage des composés phénoliques et l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait. Différentes méthodes ont été utilisées à

savoir, le pouvoir réducteur au ferrocyanure de potassium et au phosphomolybdate d'ammonium, et le pouvoir anti radicalaire vis-à-vis du DPPH.

CHAPITRE I

GENERALITES SUR LES PLANTES

I. Généralités sur les plantes

I.1. Présentation de la famille des éricacées

Le mot bruyère évoque certes quelques espèces ornementales d'éricacées qui poussent sur des terrains en voie d'acidification (Boullard, 1997).

Les Ericacées sont des arbres, arbustes, lianes, rarement saprophytes. Ils ont des feuilles alternées, parfois opposées ou verticillées, simples, entières à dentées-serrées, parfois enroulées, à nervations pennées. Ses fruits sont sous forme de capsule, d'une baie ou d'une drupe à plusieurs noyaux. (Judd *et al.*, 2002)

I.2. Présentation du genre *Erica*

Erica est un genre de bruyère, représentant typique de la famille des éricacées.

Le genre *Erica*. est représenté par plus de 700 espèces dans le monde, et principalement trouvé dans l'Europe, l'Afrique du sud et la méditerranée (Akkol *et al.*, 2008).

I.3. Présentation de l'espèce *Erica multiflora*

I.3.1. Noms vernaculaires

Les noms vernaculaires de l'espèce *Erica multiflora* L sont présentés dans le tableau I.

Tableau I : les noms vernaculaires de *Erica multiflora* L (Quezel *et Santa*, 1963).

Langue	Noms
Arabe et berbère	Khlanj, ariga, nuwara samal, chendak
Français	Bruyère multiflore
Anglais	Mediterranean Heath

I.3.2. Caractéristiques botaniques

Erica multiflora est appelée aussi « Bruyère à nombreuses fleurs », c'est un sous arbrisseau à feuillages persistant en forme d'aiguilles (Laura *et al.*, 2003). Chaque inflorescence se compose d'une à plusieurs centaines de fleurs. La floraison se produit de

mi-septembre à mi-décembre. Les fruits sont des capsules de plus au moins de 3 millimètres. (Vilà *et* Terradas, 1998).



Figure 1 : photographie de *Erica multiflora* L (Anonyme 1)

I.3.3. Position systématique

La classification botanique d’*Erica multiflora* L est présentée dans le tableau II

Tableau II : classification de l’espèce *Erica multiflora* L (Guignard, 2001).

Rang taxonomique	Nomenclature
Règne	Végétal
Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiosperme
Classe	Asteridée
Ordre	Ericale
Famille	Ericacées
Genre	<i>Erica</i>
Espèce	<i>Erica multiflora</i>

I.3.4. Répartition géographique

Erica multiflora est un arbuste à feuilles persistantes qui se produit typiquement sur les sols calcaires du bassin méditerranéen occidental. La croissance végétative se produit deux fois par an: au printemps (de mars à juin) et automne (de septembre à novembre) (**Vilà et Terradas, 1998**).

I.3.5. Composition chimique

L'étude phytochimique de *Erica multiflora* L a montrée qu'elle contient plusieurs principes actifs tels que les flavonoides, les tanins, les proanthocyanidines, les coumarines, les et les huiles essentielles (**Akkol, 2007 ; Harnafi et al., 2007**).

I.3.6. Usage traditionnel et propriétés thérapeutiques

Erica multiflora est employée souvent à l'est du Maroc par les sujets hyperlipidémique comme un outil thérapeutique alternatif pour traiter l'hyperlipidémie et comme un agent diurétique et antiseptique. (**Harnafi et al., 2007**)

Erica multiflora est populairement employées en tant qu'antirheumatique, astringent, dans le traitement des blessures et les morsures de serpent. (**Akkol et al., 2008**).

CHAPITRE II

GENERALITES SUR LES POLYPHENOLS

II. Généralités sur les Polyphénols

II.1. Définition

Les « polyphénols » ou « composés phénoliques » sont des produits du métabolisme secondaire des plantes (**Hennebelle *et al.*, 2004**).

Ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et biochimiques de la plante, y compris la défense contre les microbes pathogènes et les parasites et la réparation de blessure. (**Lombardo *et al.*, 2012**).

La structure de base qui les caractérise est la présence d'un ou de plusieurs noyaux aromatiques auxquels sont directement liés un ou plusieurs groupements hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction (éther, ester) (**Guignard, 1996 ; Richter, 1993**).

Plus de 8000 structures phénoliques sont connues et sont réparties en une dizaine de classes chimiques, allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tanins (**Martin *et Andriantsitohaina*, 2002**).

II.2. Classification des polyphénols

Les composés phénoliques sont classés selon la présence des différents substituants sur leur noyaux et selon leur degré de saturation (**Guignard, 1996 ; Richter, 1993**).

Ils sont constitués de trois grandes catégories : les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins (**Ba *et al.*, 2010**).

II.2.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont constitués de deux sous-groupes, les acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques (**Balasundram *et al.*, 2005**).

II.2.1.1. Acides hydroxybenzoïques

Ils sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure de base C₆-C₁. Ils existent fréquemment sous forme d'ester ou de glucosides et peuvent également être intégrés dans des structures complexes comme certains tanins (figure 2) (**Macheix *et al.*, 2006**).

II.2.1.2. Acides hydroxycinnamiques

Ils sont dérivés de l'acide cinnamique et ont une structure de base C6-C3. Les molécules de base sont les acides coumarique, caféique, férulique et sinapique.

Ces acides sont rarement présents à l'état libre mais existent généralement sous forme d'ester ou de glucoside (figure 2) (Macheix *et al.*, 2006).

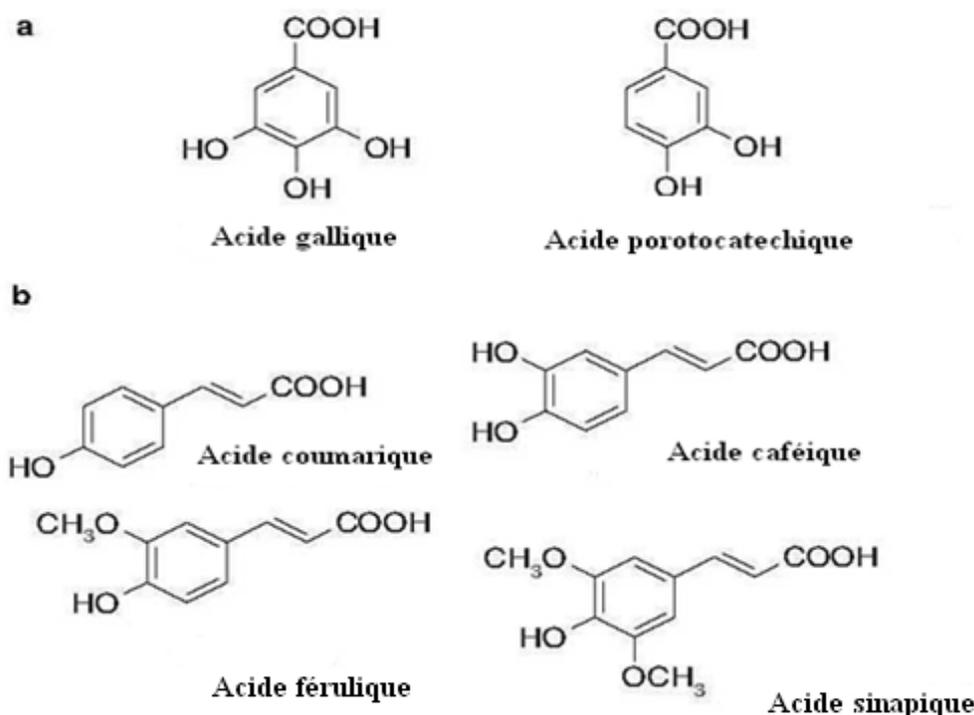


Figure 2 : exemple d'acide hydroxybenzoïques (a) et d'acides hydroxycinnamiques (b).

(Balasundram *et al.*, 2005).

II.2.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des constituants importants des fruits, des légumes et de beaucoup de préparations de fines herbes (McNulty *et al.*, 2009). Ils sont des pigments polyphénoliques qui contribuent, entre autres, à colorer les fleurs et les fruits en jaune ou en blanc (Iserin, 2001). Leurs indications thérapeutiques concernent principalement les créneaux vasculotrope, veintropes et protecteurs capillaires (phlébologie, gynécologie, ophtalmologie,...) (Anton *et wichtl*, 2003).

Les flavonoïdes ont la capacité d'empêcher la peroxydation des lipides et d'atténuer d'autres processus impliquant les espèces réactives de l'oxygène (Mellou *et al.*, 2005).

Certains flavonoïdes ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et antivirales, et des effets protecteurs sur le foie (Iserin, 2001).

Les flavonoïdes se composent de deux anneaux de benzène (A) et (B) qui sont reliés par un anneau oxygène (C) (Figure3) (Erlund, 2004). Ils sont de structure générale en C₁₅ (C₆-C₃-C₆) (Macheix *et al.*, 2006).

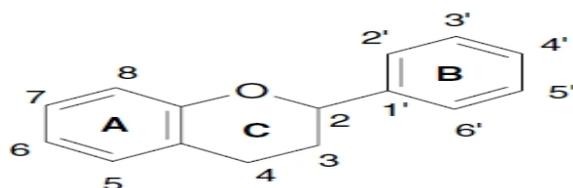


Figure 3: structure de base des flavonoïdes (Araceli *et al.*, 2009).

II.2.2.1. Classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes contenant un groupe hydroxyle en position C₃ sont classés en tant que 3-hydroxyflavonoïdes (flavonols, anthocyanidines, leucoanthocyanidines, et catéchine), et ceux qui en manquent en tant que 3-desoxyflavonoïdes (flavanones et flavones) (Figure 4). (Erlund, 2004).

La classification dans les deux familles est basée sur le mode d'hydroxylation ou de méthylation et par le type du sucre substitué sur le noyau (C), le degré d'insaturation, la présence ou absence d'une double liaison C₂-C₃ et la position du noyau (B) (Markham, 1982; Tiwari, 2001).

➤ Flavonols

Les fruits, les légumes et les boissons telles que le thé et le vin rouge sont la source la plus riche en flavonols (Aisling Aherne *et al.*, 2002).

Les flavonols sont le groupe de composés phénoliques les plus abondants et impliqués dans plusieurs fonctions physiologiques chez plusieurs végétaux (Merzlyak *et al.*, 2005).

Ces composés possèdent deux cycles benzéniques liés par une chaîne de trois carbones (C₂, C₃, C₄) (Kim *et al.*, 2006).

➤ Flavanones

Les flavanones sont les premiers produits de la voie de synthèse des flavonoïdes.

Ils sont caractérisés par l'absence de la double liaison entre C2 et C3, et par la présence d'un centre de chiralité en C2. La plupart des flavanones rencontrées dans la nature ont le cycle B lié au cycle C en C2 (**Chira et al., 2008**).

➤ Flavones

Ce sont une classe de flavonoïdes caractérisés par la présence d'une double liaison entre C2 et C3 dans l'hétérocycle du squelette du flavan. Le cycle B est attaché à C2 et généralement aucun substituant n'est attaché à C3 (**Martens et Mithofer, 2005**).

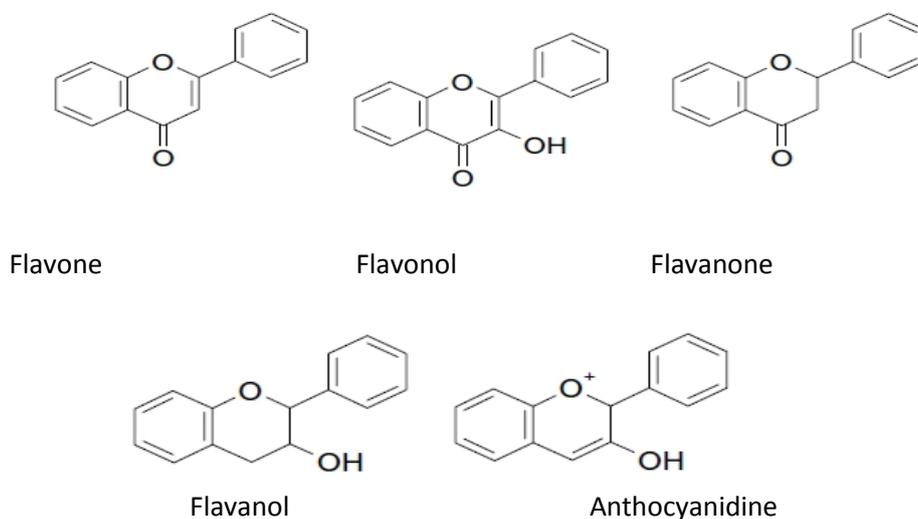


Figure 4: structures de base des principales classes des flavonoïdes (**Balasundram et al., 2005**).

➤ Anthocyanines

Anthocyanines (Anthos en grec : fleurs et kyanose : bleu), utilisé à l'origine pour décrire le pigment bleu de la *Centaurea cyanus* bleuet, sont un groupe important de pigments végétaux hydrosolubles (**Zhang et Furusaki, 1999**).

Ces pigments montrent une coloration rouge typique en solution acide. Selon le degré d'hydroxylation et de méthylation, la teinte dominante des anthocyanes varie de l'orange au violet (**Malien-Aubert et Amiot-Carlin, 2006**).

II.2.3. Tanins

Les tanins sont responsables de l'astringence de nombreux fruits et légumes et de leurs produits dérivés (**Macheix *et al.*, 2006**).

Les tanins sont un groupe hétérogène de composés phénoliques de haut poids moléculaire ayant la capacité de former des complexes avec des protéines (principalement), polysaccharides (cellulose, hémicellulose, pectine, etc.), alcaloïdes, acides nucléiques et des minéraux (**Frutos *et al.*, 2004**).

La création des complexes protéines-tannins dépend des caractéristiques biochimiques et physiques des protéines et des tannins, tels que la structure chimique, la charge de la protéine et son point isoélectrique, et également de la valeur du pH de la solution (**Adamczyk *et al.*, 2011**).

II.2.3.1. Classification des tannins

a. Tannins condensés

Ce sont des dimères, oligomères et polymères de flavan-3-ols qui, lors de l'hydrolyse acide, produisent des anthocyanes et sont donc appelés proanthocyanidines (**Lampart-szczapa *et al.*, 2003**).

b. Tannins hydrolysables

Ce sont des esters d'acide gallique ou ses dérivés, ayant un poids moléculaire moyen variant de 500 à 3000 Da (**Makkar, 2003**).

La molécule des tannins hydrolysables contient un hydrate de carbone (généralement le d-glucose) comme noyau central. Les groupes hydroxyle de ces hydrates de carbone sont estérifiés avec les groupes phénoliques tels que l'acide gallique (**Min *et al.*, 2003**).

II.3. Propriétés des composés phénoliques

Certaines plantes font partie de la pharmacopée traditionnelle asiatique depuis des siècles, mais ce n'est que récemment que les études scientifiques ont permis de confirmer ces propriétés médicinales attribuées aux polyphénols (**Ghedira, 2005**).

II.3.1. Propriétés physico-chimiques

Les polyphénols sont généralement des composés aromatiques solubles dans les solvants polaires tels que l'éthanol, le méthanol, le butanol, l'acétone, l'eau (**Benkrief *et al.*, 1990**). Les polyphénols moins polaires comme les isoflavones, les flavonones, les flavones et les flavonols sont plus solubles dans d'autres solvants tels que l'éther et le chloroforme (**Verykokidou – Vitsaropoulou *et Vajias*, 1986**).

Ces métabolites secondaires sont connus par leurs propriétés à former des complexes avec certaines molécules organiques et aussi avec certaines macromolécules, c'est le cas de l'association des tannins avec les protéines pour former des complexes insolubles (**Macheix *et al.*, 2006**).

II.3.2. Propriétés biologiques des polyphénols

Les composés phénoliques montrent un éventail de propriétés physiologiques (**Aberoumand et Deokule, 2008**) dues essentiellement à leur pouvoir antioxydant et à l'inhibition de certaines enzymes productrices de radicaux libres (**Nakayama ,1994; Cos *et al.*, 1998**).

II.3.2.1. Propriétés anti-inflammatoires

De nombreux travaux démontrent que les polyphénols possèdent des propriétés anti-inflammatoires (**Da Silva *et al.*, 1994; Galati *et al.*, 1994; Read, 1995**).

Les propriétés anti-inflammatoires des composés polyphénoliques peuvent être dues à leurs capacités d'inhiber des enzymes impliquées dans les processus inflammatoires (**Skerget *et al.*, 2005**).

II.3.2.2. Propriétés anti-cancérigènes

Les flavonoïdes et autre phénols peuvent jouer un rôle préventif dans le développement du cancer (**Kähköen *et al.*, 1999**) en inhibant les réactions oxydatives, en bloquant les

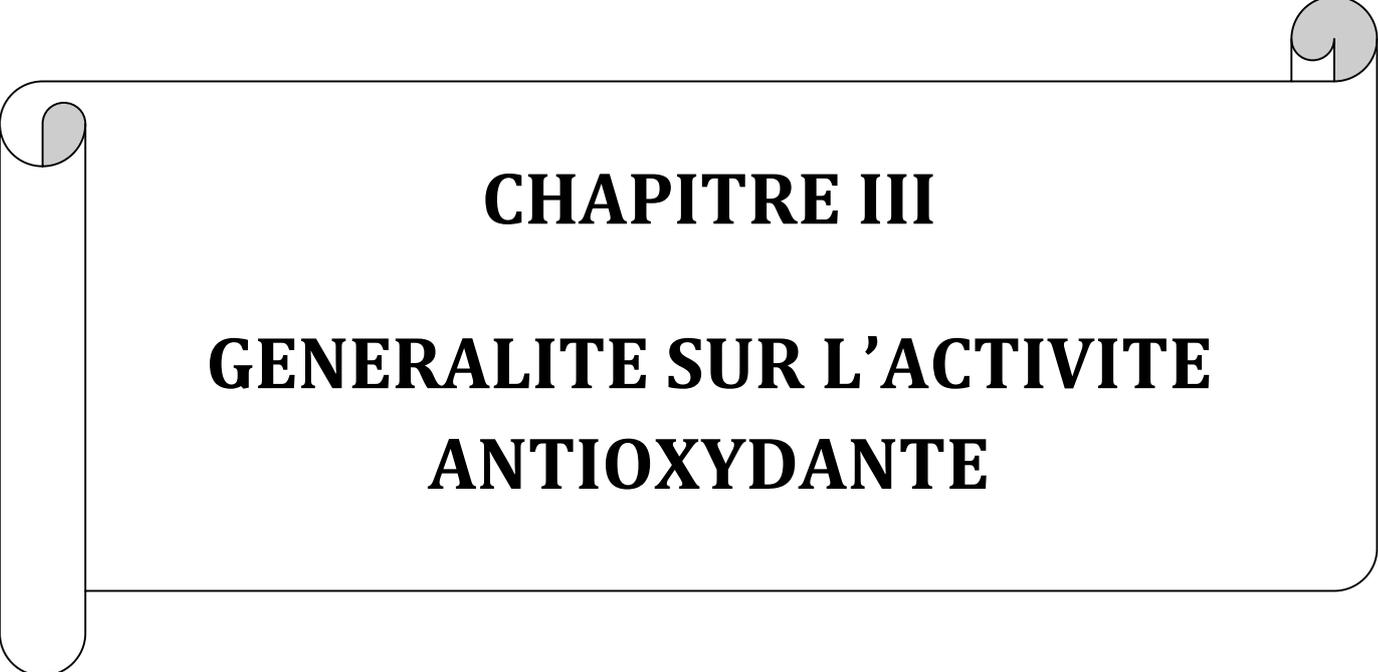
radicaux libres et en empêchant la formation d'ADN anormal (**Nissiotis et Tassoula-Margari, 2002**).

Les composés phénoliques sont impliqués dans ces activités via plusieurs mécanismes en agissant à différents niveaux des réactions radicalaires. Soit par la chélation des métaux, ou par inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres (**Petti et Scully, 2009**).

II.3.2.3. Propriétés antioxydantes

L'activité antioxydante des composés phénoliques est la mieux connue et provient de leur haute réactivité. Ils agissent comme donneurs de protons ou d'électrons et piègent les radicaux libres (**Ghedira, 2005**).

La structure des composés phénoliques est l'élément déterminant de leur activité. Pour les acides phénoliques, l'activité antioxydante augmente proportionnellement avec le degré d'hydroxylation (**Balasundram et al., 2006**).



CHAPITRE III

**GENERALITE SUR L'ACTIVITE
ANTIOXYDANTE**

III. Généralités sur l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des composés phénoliques dépend de leur structure, en particulier du nombre et des positions des groupes hydroxyles ainsi que de la nature des substitutions sur les cycles aromatiques (**Balasundram *et al.*, 2006**).

L'activité antioxydante des composés phénoliques est due à leur capacité à piéger les radicaux libres, de donner les atomes d'hydrogène ou l'électron (**Aberoumand *et Deokule*, 2008**)

III.1. Radicaux libres

III.1.1. Définition

Les radicaux libres sont des atomes, ou un groupe d'atomes, avec un nombre impair d'électrons non appariés sur la couche externe (**Pelli *et Lyly*, 2003**). La tendance des électrons non appariés à interagir avec les autres molécules ou atomes voisins pour reformer des liaisons covalentes, procure aux radicaux libres une très grande instabilité (**Cheeseman *et Slater*, 1993 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

Dans les situations normales, les radicaux libres sont produits en faible quantité qui est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense de l'organisme (**Favier, 2003**). Ils sont produits en quantité accrue lors de certains processus pathologiques comme les brûlures ou les infections (**Pincemail, 1999**) et peuvent être une source de lésions de l'ADN, des lipides, des membranes cellulaires et des protéines (**Despor *et Couratier*, 2002**).

III.1.2. Origine

Les radicaux libres peuvent avoir une double origine

III.1.2. 1.Exogène

Les radicaux libres peuvent être d'origine exogène comme les produits des radiations (rayons X et lumière (UV) et des polluants de l'air (N, NO₂) (**Tessier *et Marconnet*, 1995**).

III.1.2. 2.Endogène

Dans ce cas les radicaux libres résulteraient d'un emballement de notre métabolisme au niveau de la chaîne respiratoire, c'est-à-dire au contact entre l'oxygène et certaines protéines du système respiratoire ; une production d'anion superoxydes se produit ainsi lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Goussard, 1999 ; Favier, 2003**).

III.1.3. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

L'appellation espèces réactives de l'oxygène (ERO) inclut les radicaux libres issus de la réduction partielle de l'oxygène : radical superoxyde (O_2°), radical hydroxyle (OH°), ainsi que certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui peut être généré par des réactions enzymatiques et non enzymatiques dans la cellule et dans la membrane cellulaire (**Gwinner et Gröne, 2000**).

De part leur nature instable, les ERO sont toxiques. Des dénaturations de protéines, des inactivations d'enzymes, une oxydation du glucose, des cassures au niveau de l'ADN avec possibilité de mutation et des processus de peroxydation lipidique peuvent alors apparaître avec des conséquences souvent irréversibles pour la cellule. En raison de leur capacité à endommager les cellules, les tissus et les organes, les ERO sont impliqués dans un grand nombre de pathologies, tant aiguës que chroniques (**Hansen et al., 2006**).

III.2. Stress oxydatif

Le stress oxydant représente l'incapacité pour l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces réactives oxygénées (ERO), en raison de l'existence d'un déséquilibre entre la production de ces substances et la capacité de défense des antioxydants (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**). Le stress oxydant, principale cause initiale de plusieurs maladies, cancer, diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Favier, 2003**).

III.3. Antioxydants

III.3.1. Définition

Un antioxydant est une substance qui est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation d'un substrat, tout en étant présent à faible concentration par rapport à ce substrat oxydable (**Deaton et Marlin, 2003 ; Jin Heo et al., 2007**).

III.3.2. Classification des antioxydants

Les antioxydants peuvent être répartis en deux classes :

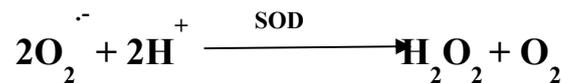
III.3.2.1. Antioxydants endogènes

Les antioxydants endogènes sont des enzymes dont les plus connues sont produites dans le corps humain (**Mates, 2000**).

Cette ligne de défense est constituée de trois enzymes. Il s'agit de la super oxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) (Ivanova *et* Ivanov, 2000).

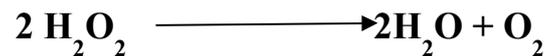
- **La superoxyde dismutase**

La superoxyde dismutase ou SOD est une enzyme qui exerce une action cellulaire protectrice en catalysant la réaction de dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (McCord *et* Fridovich, 1969).



- **La Catalase**

C'est une enzyme qui existe en forte concentration dans le foie et les globules rouges. Son rôle est d'accélérer la réaction spontanée qui transforme l'eau oxygénée en eau et en dioxygène et d'éviter ainsi la formation de radical hydroxyle (Cheeseman *et* Slater, 1993)



- **Glutathion peroxydase (GPX)**

Cette enzyme catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau ou les peroxydes organiques à leurs alcools stables correspondants en oxydant le glutathion réduit (GSH) pour donner sa forme oxydée (GSSG), tandis que la glutathion réductase (GRD) a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur (Ré *et al.*, 2005 ; Rocher *et al.*, 2006)



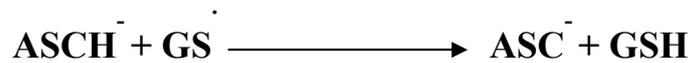
III.3.2.2. Antioxydants naturels

Les antioxydants naturels sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures que l'organisme puise par l'alimentation. Les principaux antioxydants naturels sont l'acide ascorbique, les tocophérols ainsi que le β-carotène et pour la plupart sont des composés phénoliques (Bossokpi, 2003).

Ces composés pouvant être des substances lipo ou hydrosolubles, vont piéger les ERO sous une forme peu réactive (piégeurs de radicaux libres ou scavenger) (Ré *et al.*, 2005).

✓ Acide ascorbique

La vitamine C est une vitamine hydrosoluble qui n'est pas synthétisée par l'organisme humain et doit être apportée par l'alimentation. Elle intervient dans la formation du tissu conjonctif, des os, des dents, et dans l'assimilation du fer et des acides aminés (Wang *et al.*, 2000). L'action de la vitamine C est très controversée quand à son effet protecteur ou activateur face à la toxicité de l'oxygène. Selon le pH et la présence de métaux de transition, la vitamine C peut prendre une forme réduite ou oxydée. Le passage de l'une à l'autre se fait par l'intermédiaire d'un radical libre, le radical ascorbyle, et en présence de glutathion/glutathion-réductase (Gardés *et al.*, 2003).



✓ Vitamines E (tocophérol)

Les tocophérols sont une classe de composés phénoliques de nature lipophile qui sont localisés surtout dans la membrane externe des mitochondries et dans celle du réticulum endoplasmique. Le tocophérol majeur retrouvé dans les tissus humains est l' α -tocophérol (Lee *et al.*, 2003).

Le rôle essentiel de la vitamine E est de capter les radicaux peroxydes lipidiques (ROO \cdot) qui propagent les chaînes de peroxydation. La partie active de la molécule étant la fonction phénol réductrice (α -TH), celle-ci perd facilement un atome d'hydrogène et se transforme en radical α -tocophérol (α -T), tandis que le radical peroxyde est réduit en une molécule d'hydroperoxyde (Gardés *et al.*, 2003).



✓ Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles synthétisés par les plantes et les microorganismes et présents dans beaucoup d'aliments particulièrement dans les fruits et légumes (El-Agamey *et al.*, 2004).

Ils sont très nombreux et représentent la principale source alimentaire de rétinol en plus de leur activité de provitamine A, les caroténoïdes possèdent une forte activité antioxydante, notamment le β -carotène. Ces molécules sont des piégeurs efficaces des molécules d'oxygène

singulet $^1\text{O}_2$, fournissant ainsi une protection contre les lésions de la peau induites par les rayons ultraviolets (Lee *et al.*, 2003; Gardés *et al.*, 2003).

✓ Sélénium

Le sélénium est un oligoélément essentiel pour la santé, en particulier l'immunité, les fonctions reproductrices des animaux, et la protection du corps contre le stress oxydant, puisque c'est un composant des séléno-protéines, y compris des séléno-enzymes telles que la glutathion peroxydase. L'insuffisance de sélénium dans le régime alimentaire a été liée à plusieurs maladies à savoir, la maladie cardiaque coronaire, les infections de la grippe, l'hypertension, l'épilepsie, la progression rapide du SIDA, la leucémie et d'autres cancers (Sánchez *et al.*, 2010).

✓ Composés phénoliques

➤ Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont une classe de composés phénoliques présentant des propriétés antioxydantes et chélatrices de métaux. Leurs effets cardioprotecteurs proviennent de la capacité d'empêcher la peroxydation des lipides et la formation des radicaux libres (Heim *et al.*, 2002). En plus, il a été rapporté que les flavonoïdes inhibent plusieurs enzymes telles que la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase, enzymes liées aux inflammations (Nagao *et al.*, 1999).

➤ Tanins

Les tanins sont un groupe hétérogène de composés phénoliques de haut poids moléculaire ayant la capacité de former des complexes avec les protéines (principalement), polysaccharides, les alcaloïdes, les acides nucléiques et les minéraux (Frutos *et al.*, 2004 ; Cheynier *et Sarni-Manchado*, 2006).

De nombreux tanins, particulièrement des tanins hydrolysables, inhibent la peroxydation des lipides. *In vitro*, ils sont montrés être des piègeurs de radicaux et des inhibiteurs de la formation de l'ion superoxyde (Bruneton, 1999).

➤ Anthocyanes

Ils sont un groupe important de pigments végétaux hydrosolubles (Zhang *et Furusaki*, 1999). Le pouvoir antioxydant des anthocyanes dépend du nombre et de l'arrangement des groupements hydroxyles, de l'ampleur des conjugaisons structurales et également de la

présence des substituants donneurs et accepteurs d'électrons dans la structure globale (Lapornik *et al.*, 2005).

➤ **Coumarines**

Les coumarines sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capturer les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Les conditions structurales requises pour l'activité antiperoxydante des coumarines sont similaires à celles signalées pour les flavonoïdes (Bossokpi, 2003).

CHAPITRE IV

MATERIEL ET METHODES

IV. Matériel et méthodes

IV.1. Matériel

IV.1.1. Description du matériel végétal

Ce sont les sommités fleuries de l'espèce *Erica multiflora* L qui ont fait l'objet de cette étude. Les fleurs de *Erica multiflora* sont blanchâtres ou rose très foncées et sont groupées dans des inflorescences situées à la position terminale des branches (figure 5).



Figure 5 : photographie de *Erica multiflora* L.

IV.1.2. Site de récolte de la plante

L'échantillon a été récolté au 9 novembre 2010. La récolte a été faite dans la région d'Aite-Guendouze (Commune de Boukhelifa) située à quelques Kilomètres de la ville de Bejaia. Il a été récolté dans un endroit propre et loin de la pollution.

Après nettoyage, séchage, broyage et tamisage, les poudres dont le diamètre est inférieur à 125 μm ont subi deux types d'extraction.

IV.2. Méthodes

IV.2. 1.Extraction

L'extraction des composés phénoliques à partir de la matière végétale dépend de leur structure chimique, de la méthode d'extraction, de la granulométrie de la poudre et du type de solvant utilisé (Vercauteren et al., 1996).

Cette étape consiste à extraire le maximum de molécules contenues dans toutes les parties de la plante en utilisant des solvants.

Les solvants jouent un rôle capital dans l'extraction des composés phénoliques en assurant le transfert de phase du produit à extraire (**Vercauteren, 1996**).

Il faut également tenir compte des propriétés physiques déterminant la capacité du solvant à pénétrer dans une matrice poreuse. Il s'agit du pouvoir extractant qui est défini par la capacité du solvant à pénétrer et à diffuser dans la structure végétale de telle sorte qu'il rencontre et entraîne les molécules cibles (**Ben Amor, 2008**).

IV.2.1.1. Extraction par micro-onde

Les premiers travaux utilisant les micro-ondes pour extraire des composés organiques ont été publiés par Ganzler et al., (1986). Depuis cette date, l'extraction végétale assistée par micro-ondes a été le fruit de nombreuses recherches (**Lucchesi, 2005**).

a. Définition

L'extraction par microonde est une technique qui a été développée pour réduire le volume des solvants utilisés, améliorer le rendement de la récupération des polyphénols et pour réduire le temps et le coût de l'extraction (**shu et al., 2003**).

b. Principe d'extraction par micro-onde

Dans le but d'étudier les dommages cellulaires qui sont produit lors de l'extraction par micro-onde, **Mandal et Mandal (2010)** ont examiné par microscope électronique les échantillons de feuilles de *Gymnema sylvestre* avant et après extraction aux micro-ondes. Les changements observés ne diffèrent pas considérablement entre les deux échantillons. Cependant, la surface des échantillons traités par micro-onde été très endommagée suivie d'un élargissement des pores cellulaires. Par conséquent, le traitement aux micro-ondes affecte la structure des cellules par l'élévation de la température et l'augmentation interne de la pression.

Selon **Mandal et al. (2007)** le matériel végétal utilisé pour l'extraction contient de l'eau et comme l'énergie de micro-onde est absorbée et par la suite transformée en chaleur, l'eau s'évapore et cela génère une pression à l'intérieur des parois cellulaires. Cette dernière qui entraîne la rupture des cellules et la sortie des composés phénoliques dans le solvant.

c. Procédés d'extraction

Le procédé d'extraction par macération est comme suit:

- 5g de la poudre de la plante sont ajoutés à 100 mL d'eau distillée ;
- Le mélange est soumis à une agitation mécanique à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 24 heures, à la température ambiante et à l'abri de la lumière afin d'éviter les phénomènes d'oxydation;
- la solution macérée est ensuite filtrée sous vide ;
- le filtrat obtenu est conservé dans un réfrigérateur pour une utilisation ultérieure.

Le procédé d'extraction par micro-onde est comme suit:

- 5g de la poudre de la plante sont ajoutés à 100 ml d'eau distillée ;
- chauffer le produit à l'aide d'un four a micro onde pendant 4 min ;
- refroidir directement ;
- La solution est ensuite filtrée sous vide ;
- Le filtrat obtenu est conservé dans un réfrigérateur pour une utilisation ultérieure.

IV.2.2. Dosage phytochimique

IV.2. 2.1. Dosage des polyphénols totaux

• Principe

La méthode analytique utilisée pour le dosage des phénols totaux est celle de Folin Ciocalteu.

Le réactif de Folin Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Lors de l'oxydation, il est réduit en un mélange d'oxyde bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) (**Ribéreau-Gayon, 1968**). La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait analysé (**Madi, 2010**).

• Mode opératoire

La concentration des composés phénoliques totaux dans l'extrait est déterminée selon la méthode décrite par **Bramorski et al., (2010)** comme suit :

- 100 μL de chaque extrait est mélangé à 2 mL d'eau distillée, puis 500 μL du réactif de Folin-Ciocalteu est ajouté;
- laisser réagir pendant deux minutes, puis ajouter 1.5 mL de la solution de mon carbonate de sodium (20%).
- incuber à l'obscurité pendant deux heures à la température ambiante ;
- lire les absorbances au spectrophotomètre (de marque SpectroScan 50) à 765 nm.

La concentration des composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique (**annexe I.1**).

IV.2. 2.2. Dosage des flavonoïdes

• Principe

Les flavonoïdes contiennent certains groupements structuraux susceptibles de former par chélation des complexes jaunâtres avec les métaux notamment le fer et l'aluminium (figure 6). L'ion métallique intervenant dans la formation de ces complexes, sous forme de M^{++} , s'uni à deux oxygènes de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (figure 4) (**Ribereau Gayon, 1968**).

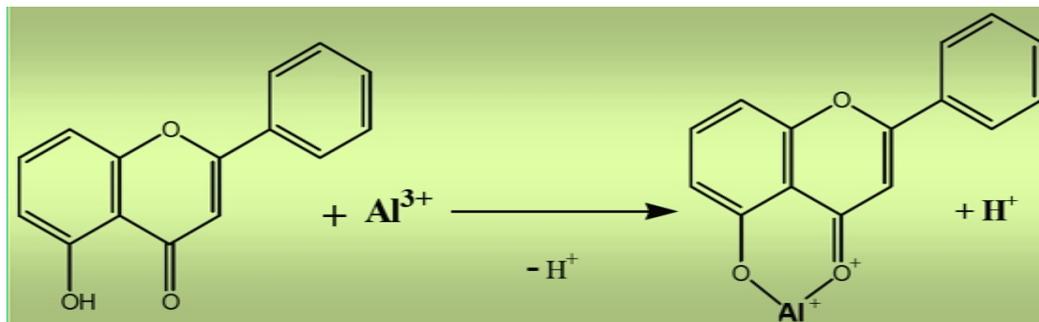


Figure 6 : mécanisme de réaction du chlorure d'aluminium avec les flavonoïdes (**Ribereau-Gayon, 1968**).

• Mode opératoire

La teneur en flavonoïdes de l'extrait étudié est évaluée selon la méthode décrite par **Djeridane et ses collaborateurs (2006)**.

- 1 mL de chaque solution d'extrait a été ajouté à un volume égal d'une solution méthanolique de chlorure d'aluminium (2%), le mélange a été vigoureusement agité ;

- l'absorbance est lue à **430** nm après 15 minutes d'incubation à la température ambiante.

La concentration en flavonoïdes est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage réalisée avec la quercétine (**annexe I.2**).

IV.2.2.3. Dosage des tanins totaux

- **Principe**

Les tanins ont la propriété de précipiter les protéines. La combinaison entre les tanins et les protéines se fait par l'intermédiaire de liaisons hydrogène entre les groupements OH et NH₂ des protéines, et les groupements hydroxyles des tanins (**Guignard, 2001**).

La protéine solubilisée à son pH isoélectrique se lie aux tanins de l'échantillon, formant ainsi un complexe protéine-tanins qui est simple à précipiter. Il est alors possible de déterminer la quantité de tanins précipités en ajoutant au culot une solution de chlorure ferrique (FeCl₃) (**Harbertson et al., 2010**).

Avec cette méthode, les tanins donnent des précipités bleu noir ou brun verdâtre (**Bruneton, 1999**). L'intensité de la couleur est proportionnelle à la teneur en tanins dans l'échantillon (**Harbertson et al., 2010**).

- **Mode opératoire**

L'estimation quantitative des tanins contenus dans les deux extraits est réalisée par la méthode de **Hagerman et Butler (1978)** qui repose sur la formation d'un complexe tanins-BSA. Elle est décrite comme suit :

- 0.5 mL de l'extrait est ajoutée à 0.5 mL de la solution de BSA, après agitation et incubation de 24 heures à 4°C, le mélange est centrifugé à 14000 tours / minutes pendant 15 minutes ;
- le surnageant est ensuite jeté et le précipité est dissout dans 2 mL de la solution SDS/TEA ;
- 0.5 mL de chlorure ferrique (FeCl₃) est ajouté ;
- la lecture de l'absorbance est effectuée au spectrophotomètre à **510 nm**.

La quantification des tanins est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide tannique.

IV .2.3. Détermination de l'activité antioxydante

Trois tests ont été utilisés pour l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait d'*Erica multiflora* à savoir : le test au DPPH, et le pouvoir réducteur au phosphomolybdate d'ammonium et au ferricyanure de potassium.

IV.2.3.1. Test au DPPH

- **Principe**

Cette méthode est basée sur le piégeage du radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) par les antioxydants. Quand une solution de DPPH est mélangée avec une substance qui peut donner un atome d'hydrogène, il y aura conversion du radical à la forme réduite (**Sharif Ali et al., 2008**).

La solution alcoolique de DPPH° est d'une couleur violette foncée, qui disparaît en présence du piègeur du radical dans le système réactif, et quand l'électron impair de l'azote dans le DPPH est appaillé (**Jing Deng et al., 2011**).

L'efficacité d'un antioxydant peut être définie par sa capacité à fixer des radicaux libres, et à arrêter ainsi la propagation de la réaction en chaîne (**Molyneux, 2004**).

- **Mode opératoire**

Le protocole d'évaluation de l'activité antioxydante par le test au DPPH est donné selon **Bougatf et al.,(2009)** comme suit :

- 0,15 mL de la solution de DPPH° est ajouté à 1 mL de chaque mélange eau-extrait à différentes concentrations ;
- 1mL de méthanol est ajouté;
- le mélange est ensuite soumis à une agitation au vortex, puis mis à incubation pendant 30 minutes à l'obscurité à la température ambiante;
- lire les absorbances à **517 nm**.

IV.2.3.2. Pouvoir réducteur

a. Pouvoir réducteur au phosphomolybdate d'ammonium

- **Principe**

La méthode utilisant le phosphomolybdate d'ammonium est un test antioxydant important basé sur la réduction de Mo^{+6} en Mo^{+5} par un composé antioxydant. Ceci conduit à la formation d'un complexe de phosphate / Mo^{+5} de couleur verte avec une absorption maximale à 695nm (Nagavani *et al.*, 2010 ; Stancheva *et al.*, 2011).

- **Mode opératoire**

La méthode adoptée pour l'évaluation du pouvoir réducteur au phosphomolybdate d'ammonium est décrite par Silici *et al.* (2010) selon le protocole suivant :

- les tubes à essai préparés contiennent 0.2 mL de l'extrait de la plante et 2 mL du solvant réactif (un mélange d'acide sulfurique à 0,6 M, de phosphate de sodium à 28 mM et de molybdate d'ammonium à 4 mM) ;
- après agitation au vortex, les mélanges sont mis à incubation pendant 90 minutes à une température de 90° C ;
- l'absorbance est lue à **695 nm** contre un blanc.

b. Pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium

- **Principe**

Le pouvoir réducteur des deux extraits a été mesuré par la méthode d'Oyaizu (1986) (Benhammou *et al.*, 2009), selon laquelle la réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} a été déterminée en mesurant l'absorbance du complexe bleu.

La réduction de l'ion Fe^{3+} est toujours utilisée comme indicateur des substrats donneurs d'électrons (Ferreira *et al.*, 2007). La présence de réducteurs dans les extraits cause la réduction du complexe Fe^{3+} /ferricyanure en fer ferreux (Ferreira *et al.*, 2007).

- **Mode opératoire**

Le protocole de détermination du pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium est décrit d'après Benhammou *et al.* (2009) comme suit :

- 1mL de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) est ajouté à un volume de 0.5 mL de chaque extrait, puis 1mL de ferricyanure de potassium (1%) est ajouté;

- après agitation, les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20 minutes, puis 1 mL d'acide trichloracétique (1%) est ajouté;
- après une centrifugation de 10 minutes à 3000 tours/minutes, 1 mL du surnageant a été transféré dans un tube à essai et additionné de 1 mL d'eau distillée et de 0.2 mL de la solution de chlorure ferrique (0,1%) ;
- l'absorbance a été lue à **700 nm**.

CHAPITRE V

RESULTATS ET DISCUSSIONS

V. Résultats et discussion

V.1. Analyses phytochimiques

V.1.1. Teneur en polyphénols totaux

Après l'ajout du réactif de Folin-Ciocalteu et du monocarbonate de sodium aux extraits, une couleur bleu est obtenue dont l'intensité varie en fonction de la teneur de ces composés dans les extraits.

La valeur moyenne de la teneur en polyphénols totaux est déterminée en mg d'équivalent d'acide gallique par g de matière sèche (tableau III).

Tableau III : résultats du dosage des polyphénols totaux.

	Concentration en mg d'équivalent d'acide gallique / g de MS	
	Extrait obtenu par macération	Extrait obtenu par micro-onde
Essai 1	10,60	13,52
Essai 2	10,93	13,38
Essai 3	10,80	14,11
Moyenne	10,78 ± 0,17	13,67 ± 0,39

D'après les résultats obtenus, la teneur moyenne en polyphénols totaux de l'extrait obtenu par micro-onde est de **13,67 ± 0,39 mg d'EAG par g de MS**, elle est plus élevée que celle de l'extrait obtenu par macération qui est de **10,78 ± 0,17 mg d'EAG par g de MS**.

Selon les travaux effectués par **Harnafi et ses collaborateurs (2007)** sur les fleurs sèches de *Erica multiflora* L, l'extrait obtenu par infusion présente une teneur en polyphénols totaux de **104.66 ± 1.15 mg d'EAG / g de MS**. Ce résultat est largement plus élevé par rapport à celui trouvé dans ce présent travail. Ceci pourrait être du à la différence dans la méthode d'extraction, la région de la de récolte et à la période de la récolte de la plante.

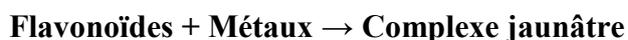
Sutivisedsak et al .(2010) ont montré dans une étude réalisée sur les haricots, que les teneurs en composés phénoliques obtenues après extraction au micro-ondes à 100°C étaient deux fois à trois fois supérieure à celles obtenues par des méthodes conventionnelles à la

même température en utilisant l'eau comme solvant d'extraction. Selon, **Inglett et al. (2010)** les radiations du micro-onde peuvent détruire les structures cellulaires plus efficacement que la chaleur du bain Marie et libérer ainsi plus de composés phénoliques. Alors que dans une extraction liquide/solide conventionnelle le processus est un peu différent, le solvant diffuse dans les cellules et les composés phénoliques sont extraits par solubilisation.

Cependant, il existe une autre théorie concernant le mécanisme d'extraction des composés phénoliques par micro-ondes. Cette théorie rapportée par **Chen et al. (2007)** stipule que l'élévation de la température diminue la tension superficielle et la viscosité du solvant ce qui améliore sa pénétration dans la matrice. De plus, la capacité du solvant à solubiliser les analytes est augmentée par l'élévation de la température.

V.1.2. Teneur en flavonoïdes

Après l'ajout de AlCl_3 aux deux extraits, une couleur jaune verdâtre est obtenue dont l'intensité varie en fonction de la concentration de l'extrait en flavonoïdes. Cette coloration est due à la formation d'un complexe qui résulte de la fixation des ions (Al^{3+}) aux groupements hydroxyles des flavonoïdes, selon la réaction suivante



Les résultats obtenus sont portés dans le tableau IV.

Tableau IV : résultats du dosage des flavonoïdes

	Concentration en ug d'EQ / g de MS	
	Extrait obtenu par macération	Extrait obtenu par micro-onde
Essai 1	8.6	10
Essai 2	8.8	10
Essai 3	8.6	10
Moyenne	8.6 ± 0.01	10 ± 0,00

Les résultats du dosage des flavonoïdes de l'extrait obtenu par macération est de **8.6 ± 0.01 ug d'EQ /g de MS** qui est inférieur à celui de l'extrait obtenu par micro-onde qui est de **10 ± 0,00 ug d'EQ /g de MS**.

La teneur moyenne en flavonoïdes obtenu pour les deux extraits est inférieure à celle trouvée par **Harnafi et ses collaborateurs (2007)**, qui est de **0,13 ± 0,01 mg d'EQ/g de MS**. Cela pourrait être attribué entre autre à la différence dans le mode d'extraction, la région et la saison de la récolte de la plante, et à l'âge de la plante.

V.1.3. Teneur en tanins totaux

L'ajout du chlorure ferrique qui réagit avec les tanins donnent des précipités de couleur bleus noir ou brun verdâtre. Son intensité varie en fonction de la concentration de l'extrait en tanins.

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau V.

Tableau V : résultats du dosage des tanins totaux

	Concentration en mg EAT / g de MS	
	Extrait obtenu par Macération	Extrait obtenu par Micro-onde
Essai 1	129,44	163,89
Essai 2	118,33	159,44
Essai 3	121,67	164,44
Moyenne	123,14 ± 5,70	162,6 ± 2,74

D'après les résultats obtenus, la teneur moyenne en tanins totaux dans l'extrait obtenu par micro-onde est de **162,6 ± 2,74 mg d'équivalent acide tannique/g de matière sèche** qui est plus importante que celle de l'extrait obtenu par macération qui est de **123,14 ± 5,70 mg d'équivalent acide tannique/g de matière sèche**.

Selon une étude menée par **Harnafi et ses collaborateurs (2007)**, la teneur moyenne en tanins de *Erica multiflora* L est évaluée à **51,33 ± 6,36 mg d'EAT/g de MS**. Cette teneur est inférieure à celle trouvée dans ce travail et cette différence pourrait être due à la saison et la région de la récolte.

V.2. Activité antioxydante

V.2.1. Pouvoir réducteur

V.2.1.1. Pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium

La couleur jaune du milieu réactionnel vire vers une couleur verte dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur de chaque extrait.

La présence des antioxydants dans l'échantillon testé entraîne la réduction du complexe Fe^{3+} en Fe^{2+} .

Les résultats du test du pouvoir réducteur par le ferricyanure de potassium sont présentés dans la **figure 7**.

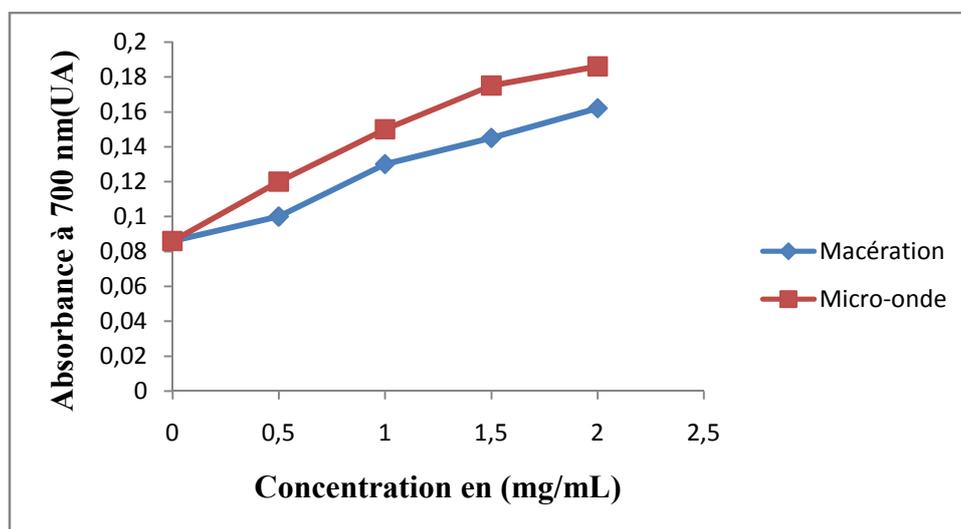


Figure 7 : représentation graphique du pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium pour les deux extraits.

D'après la courbe représentée dans la **figure 7**, plus la concentration de l'extrait augmente, plus l'absorbance augmente. Par conséquent, l'augmentation du pouvoir réducteur.

Le pouvoir réducteur de l'extrait obtenu par micro-onde est légèrement plus élevé en comparaison avec celui de l'extrait obtenu par macération. Donc les antioxydants extraits par la méthode de micro-onde exercent une activité antioxydante légèrement plus élevée que celle de l'extrait obtenu par macération.

Selon **Ferreira *et al.* (2007)**, le pouvoir réducteur est souvent employé pour évaluer la capacité d'un antioxydant à céder un atome d'hydrogène ou un électron. Plusieurs études

ont montré une corrélation directe entre l'activité antioxydante et le pouvoir réducteur de certains composés bioactifs.

Les résultats obtenus montrent que l'activité antioxydante des extraits des sommités fleuries augmente avec l'augmentation de la puissance du micro-ondes puis diminue légèrement après 225 W. Cette diminution est due à une oxydation ou à une destruction des composés phénoliques par la chaleur générée par la puissance élevée des micro-ondes. Selon **Inglett et al. (2010)**, les extractions par micro-ondes à des températures élevées augmentent en général les teneurs en composés phénoliques mais pas nécessairement l'activité antioxydante des extraits. **Lyazid et al. (2007)** ont démontré par une étude sur 22 composés phénoliques exposés à des radiations du micro-ondes une faible destruction de ces composés jusqu'à 125°C, une dégradation de 5 à 39% à 150°C et une dégradation des deux tiers à 175°C.

La valeur IC_{50} a été déterminée pour chaque méthode d'extraction (**annexe II.1**).

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau VI.

Tableau VI : résultats des IC_{50} (mg/mL) du pouvoir réducteur par le ferricyanure de potassium.

	Extrait obtenu par Macération	Extrait obtenu par Micro-onde
IC_{50} (mg/mL)	10,527	7,992

D'après **Saheedeh et al. (2007)**, il existe une relation entre l'activité réductrice de l'ion Fe^{3+} et la teneur en polyphénols totaux ; l'extrait contenant la plus grande quantité en polyphénols totaux à le meilleur pouvoir réducteur.

V.2.1.2. pouvoir réducteur au phosphomolybdate d'ammonium

La couleur de l'extrait vire vers une couleur vert claire après l'ajout du molybdate d'ammonium et l'intensité de cette couleur dépend de la concentration de l'extrait.

Ce test donne un aperçu sur la capacité des molécules antioxydantes contenues dans les extraits végétaux à réduire le Mo^{+6} en Mo^{+5} .

Les résultats du test du pouvoir réducteur par le molybdate d'ammonium sont présentés dans la **figure 8**.

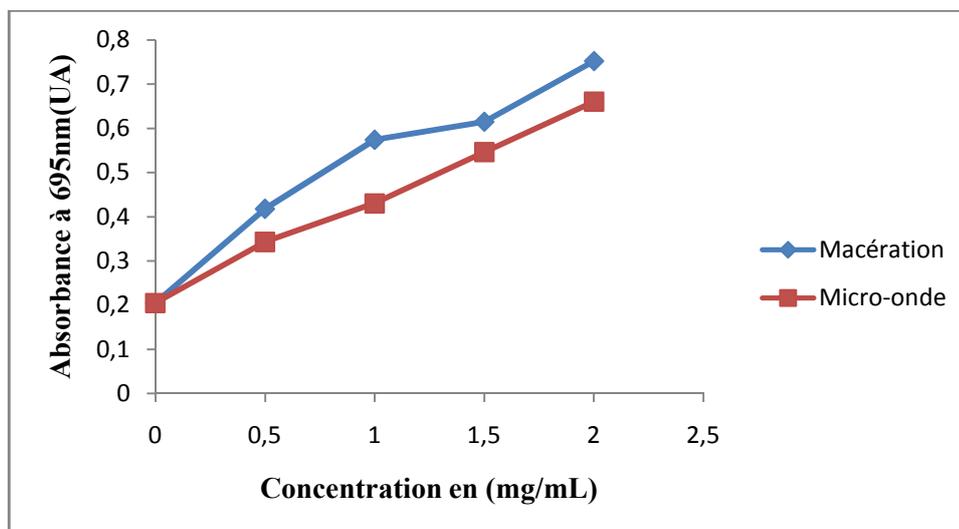


Figure n° 8 : représentation graphique du pouvoir réducteur par le molybdate d'ammonium.

Cette figure montre qu'au fur et à mesure que la concentration de l'extrait augmente, l'absorbance augmente et donc le pouvoir de réduire le molybdate sous sa forme Mo^{6+} en forme Mo^{5+} augmente aussi.

D'après la **figure 8**, l'extrait obtenu par micro-onde présente un pouvoir réducteur plus élevé que celui obtenu par macération.

La valeur de IC_{50} a été évaluée pour chaque méthode d'extraction (**Annexe II.2**) ; et les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau VII .

Tableau VII : résultats des C_{50} (mg/mL) pour le test au phosphomolybdate d'ammonium.

	Extrait obtenu par Macération	Extrait obtenu par Micro-onde
IC_{50} (mg/mL)	1,283	0,950

Les résultats des IC_{50} obtenus révèlent que le pouvoir réducteur du molybdate d'ammonium le plus important est observé avec l'extrait obtenu par micro-onde.

V.2.2. Test au DPPH

En présence d'antioxydants, la couleur du DPPH change du violet vers le jaune. Le radical DPPH est piégé et son absorbance diminue une fois qu'il rencontre un substrat donneur de(H)

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration (**figure9**).

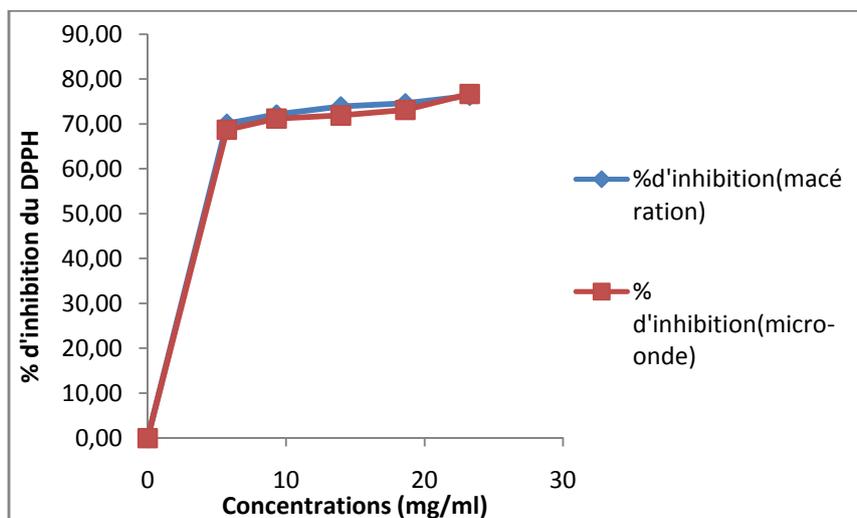


Figure n°9 : représentation graphique du pourcentage d'inhibition du DPPH

La figure10 montre que l'augmentation de la concentration de chacun des extraits engendre une augmentation du pourcentage d'inhibition du DPPH et que l'activité inhibitrice du radical DPPH est similaire pour les deux extraits.

La valeur IC_{50} a été déterminée pour chaque méthode d'extraction (**Annexe II.3**), et elle est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH (**Bougatet et al., 2009**). Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : résultats des IC_{50} (mg/mL) pour le test au DPPH.

	Extrait obtenu par Macération	Extrait obtenu par Micro-onde
IC_{50} (mg/mL)	7,43640	7,79820

D'après **Bougatet et al. (2009)**, une faible valeur d' EC_{50} indique une grande capacité d'inhibition du radical DPPH.

D'après les résultats présentés dans la figure 10, l'extrait obtenu par macération présente presque le même pouvoir anti radicalaire comparé à celui obtenu par micro-onde

CONCLUSION

Conclusion et perspectives

Le travail réalisé avait pour objectif le dosage des composés phénoliques et l'étude de l'activité antioxydante de deux extraits de *Erica multiflora L*, l'un obtenu par macération et l'autre par micro-onde.

Les valeurs du dosage des composés phénoliques montrent que les deux extraits contiennent respectivement des teneurs de **13.67±0.39 mg d'équivalent d'acide gallique par g de matière sèche** et **10.78±0.17 mg d'équivalent d'acide gallique par g de matière sèche** en polyphénols totaux, **10.17±0.14 ug d' d'équivalent quercétine /g de matière sèche** et **8.64 ug d'équivalent quercétine /g de matière sèche** en flavonoïdes et **162.592±2.740 mg d'équivalent d'acide tannique/g de matière sèche** et **123.146±5.7mg d'équivalent d'acide tannique / g de matière sèche** en tanins totaux.

L'étude de l'activité antioxydante par le pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium et au phosphomolybdate d'ammonium a confirmé que l'extrait obtenu par micro-onde à un pouvoir réducteur important en le comparant à celui obtenu par macération.

En revanche, l'activité antioxydante par le test au DPPH révèle que les deux extraits possèdent une activité antiradicalaire similaire.

Ce travail reste préliminaire, donc il est souhaitable de :

- ✓ Généraliser l'étude sur d'autres composés phénoliques.
- ✓ Elaborer une étude statistique pour une interprétation plus objective.
- ✓ faire des recherches approfondies (par le fractionnement afin de déterminer les composés responsables de l'activité antioxydante).
- ✓ réaliser des études sur d'autres parties de la plante.
- ✓ déterminer d'autres activités des extraits à savoir l'activité antiinflammatoire.
- ✓ Caractérisation des composés phénoliques par des techniques avancées (HPLC).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Aberoumand A et Deokule S.S. (2008). Comparison of Phenolic Compounds of Some Edible Plants of Iran and India. *Pakistan Journal of Nutrition*. 7 (4): 582-585.

Adamczyk B., Adamczyk S., Smolander A et Kitunen V. (2011). Tannic acid and Norway spruce condensed tannins can precipitate various organic nitrogen compounds. *Soil Biology & Biochemistry*. 43 : 628-637.

Aisling Aherne S., O'Brien N.M et PhD. (2002). Dietary Flavonols: *Chemistry, Food Content, and Metabolism*. 18: 75-81.

Akkol E.K., Yesilada E et Guvenc A. (2008). Valuation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Erica* species native to Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*. 116 : 251–257.

Anonyme1. <http://www.visoflora.com/photos-nature/bruyere-multiflore-erica-ultiflora.html>.

Anton R et Wichtl M. (2003). Plantes thérapeutiques (tradition, pratique officinale, science et thérapeutique). 2^{ème} édition. TEC et DOC : Lavoisier, Paris. P:XXXIX.

Araceli C-O., Hernandez P.L., Hernandez E.P., Jose R. et Andres G-V. 2009. Chemical studies of anthocyanins. *Food Chemistry*. 113: 859–871.

B

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

Balasundram N., Sudram K. et Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by products: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chemistry*. 99 : 191–203.

Ben Amor B. (2008). Maitrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs ; texturation par détente instantanée contrôlée Dic., Université de la Rochelle, p. 5.

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

Benkrief R., Brum-Bousquet M., Tillequin F. et Koch M. (1990). Alcaloides et flavonoides des parties aériennes de *Hammada articulata* sp. *Scoparia*. *Annales Pharmaceutiques Française*. 48 (4) : 219-224.

Boskou D. (2008). Phenolic Compounds in Olives and Olive Oil *in* Olive oil: minor constituents and Health. Ed. CRC Press. pp 11-44.

Bossokpi I P L. (2003). Etude des activités biologiques de fagara. Thèse de Doctorat. Université de Bamako. Mali. P : 127.

Bougatef A., Hajji M., Balti R., Lassoued I., Triki-Ellouz Y et Nasri M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*. 114: 1198–1205.

Boullard.B (1997). Ericacées. Plantes et champignons Ed. ESTEM. PP : 305.

Bramorski A., da Rosa Cherem A., Mezdri T., Soares Melo S., Deschamps F C., Gonzaga L V., Rockenbach I et Fett R. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of *Gaylussacia brasiliensis* (camarinha) grown in Brazil. *Food Research International*.44:2134-2138.

Bruneton J. (1999). Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. 3^{ème} édition. TEC et DOC : Lavoisier, Paris. ISBN 2-7430- 0315-4 : 227-387.

C

Cheeseman K et Slater H. (1993). An introduction to free radicals biochemistry. *British Medical Bulletin*. 49: 481-493.

Chen L., Ding L., Yu A., Yang R., Wang X., Li J., Jin H et Zhang H. (2007). Continuous determination of total flavonoids in *Platycladus orientalis* (L.) Franco by dynamic microwave-assisted extraction coupled with on-line derivatization and ultraviolet–visible detection. *Analytica Chimica Acta*. 596: 164–170.

Cheyrier V., Souquet JM., Fulcrand H., Sarni P. et Moutounet M. 1998. Stabilisation tanins –anthocyanes données générales. *IPV-INRA*. Page : 4.

Chira K., Suh J.H., Saucier C. et Teissédre P. L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*. 6: 75–82.

Choi C.W., Kim S.C., Hwang S.S., Choi B.K., Ahn H.J., Min Y. L., Sang H. P et Kim S.K. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science* .163 :1161- 1168

Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J. P., Cimangma K., Poel B.V. , Pieters L., lietinck A. J. et Berghe D.V. (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxyde scavengers. *Journal of National Product*. 61:71-76.

D

Da Silva E.J.A., Oliveira A.B et Lapa A.J. (1994). Pharmacological évaluation of the antiinflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, duartin and claussequinone, in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol*. 46 (2): 118-122.

Deaton C.M. et Marlin D.J. (2003). Exercice-associated oxidatif stress. *Clinical Techniques in Equin Practice*. 2(3) :276-291.

Despor J.C. et Couratier P. (2002). Stress oxydant et maladies neurodégénératives Oxydative stress in neurodegenerative diseases. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 16(4) : 253-259.

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

E

El-Agamey A., Lowe M.G., McGarvey D.J., Mortensen A. Phillip M.D., Truscott G. et Young A.J. (2004). Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 430:37–48.

Erlund I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*. (24) 851–874.

F

Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.

Ferreira I C.F.R., Baptista P., Vilas-Boas M et Barros L. (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*. 100: 1511–1516.

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

G

Galati E.M., Monforte M.T., Kirjavainen S., Forestieri A.M, Trovato A et Tripodo M.M. (1994). Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid (Note I): antiinflammatory and analgésie activity. *Farmaco*. 40 (11): 709-712.

Gardés A. M., Bonnefont D. R., Abedinzadeh Z. et Jore. D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène : comment l'oxygène peut-il devenir toxique? *L'actualité chimique*. 91-95.

Ghangal R., Raghuvanshi S et Chand Sharma P. (2009). Isolation of good quality RNA from a medicinal plant seabuckthorn, rich in secondary metabolites. *Plant Physiology and Biochemistry*. 47 : 1113–1115.

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

Goussard J.P. (1999). Les radicaux libres et antioxydants. *Denis RICHE in Guide nutritionnel des sports d'endurance*. 1-11.

Guignard J. L. (1996). Les composés phénoliques. *Biochimie végétale*. Edition Masson. Paris. pp : 167-231.

Guignard J. L. (2001). Abrégé de botanique. Systématique moléculaire .Ed. 12. Masson : 290.

Gwinner, W et Gröne, H. J. (2000). Role of reactive oxygen species in glomerulonephritis. *Nephrology Dialysis Transplantation*.15 (8):1127-1132.

H

Hagerman et Buttlar. (1978). Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of agriculture Food and chemistry*. 26(4): 809-812.

Hansen J.M., Go Y.M., Jones D.P (2006) - Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annu. Rev.Pharmacol. Toxicol.*46: 215–234.

Harbertson J., Kennedy J et Doug A. (2010). Tannin in Skins and Seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot noir Berries during Ripening. *American Journal of Enology and Viticulture* 53(1): 54-59.

Harnafi H., Bouanani N.H., Aziz M., Caid H.S.; Ghlim N. et Amrani S. (2007). The hypolipidaemic activity of aqueous *Erica multiflora L* flowers extract in triton WR-1339 induced hyperlipidaemic rats: A comparison with fenofibrate. *Journal of Ethnopharmacology*. 190(1):156-160.

Heim K.E., Tagliaferro A.R. et Bobilya D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 13: 572-584.

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

I

Inglett G.E., Rose D.J., Chen D., Stevenson D.G. et Biswa A. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of extracts from whole buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Mönch) with or without microwave irradiation. *Food Chemistry*. 119: 1216–1219.

Ivanova, E. et Ivanov, B. (2000). Mechanisms of the extracellular antioxidant defend. *Bulgarian Academy of Sciences*. 4: 49-59.

Iserin P. (2001). Encyclopédie des plantes médicinales (identification, préparation, soins). 2^{ème} édition. ISBN: 2-03-560252-1.P :14

J

Jin Heo H., Jun Kim Y., Chung D. et Kim D. (2007). Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chemistry*. 104: 87-92.

Jing Deng., Cheng W et Guangzhong Y. (2011). A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*. 125: 1430–1435.

Judd W.S., Camphell C.S., Kellogg E.A. et Stevens P.F. (2002). Botanique systématique. Une perspective phylogénique. Ed 1. Deboeck université .PP : 351.

Κ

Kähköen M. P., Hopia A. I., Vuorela H. J., Rauha J., Pihlaja K., Kujala., T. S. et Heinonen M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 47: 3954-3962.

Kim J.D., Liu L., Guo W et Meydani M. (2006). Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 17:165–176.

Koechlin-Ramonatxo C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique et Métabolisme*.20(4) :165-177.

Λ

Lampart-szczapa E., Korczak J., Nogala-Kaluka M et Zawirska-wojtasiak R. (2003).Antioxidant properties of lupin seed products. *Food chemistry*.83(2) :279-285.

Lapornik, B., Prošek, M. et Golc Wondra A. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*. 71: 214-222.

Laura L., Joseph P et Marc E. (2003). Ecophysiological Responses of two Mediterranean shrubs, *Erica multiflora* and *Globularia alypum*, to experimentally drier and Werner condition. (33): 262-268.

Lee K.W., Kim Y. J., Kim D-O., Lee H. J et Lee C.Y. (2003). Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 4-8.

Lombardo S., Pandino G., Ierna A et Mauromicale G. (2012). Variation of polyphenols in a germplasm collection of globe artichoke. *Food Research International*. (46) 544–551.

Lucchesi M. E. (2005). Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et application à l'extraction des huiles essentielles, thèse doctorat : Université de la Reunion, France. 146 p.

Lüllmann H., Mohr K et Ziegler A. (1998). Atlas de poche de pharmacologie. 2^{ème} édition. Paris. ISBN 2-257-12119-8. P: 4.

Lyazid A., Palma M., Brigui J. et Barroso C. G. (2007). Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography*. 1140: 29–34.

M

Macheix J.J., Fleurit A. et Sarni-Manchado P. (2006). Composés phénoliques de la plante-Structure, biosynthèse, répartition et rôle. In **Sarni-Manchado P. et Cheynier V.** Les polyphénols en agroalimentaire. Tec et Doc. Lavoisier. Paris. ISBN:2-7430-0805-9. (1) 3-5.

Madi A, 2010, Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques, Université Mentouri Constantine. P : 20-22.

Makkar H.P.S. (2003). Effect and fate of tannins in ruminant animals adaptation to tannins as strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*. 49 :241-256.

Malien-Aubert C. et Amiot-Carlin M.J. (2006). Pigments phénoliques, structure, stabilité, marché des colorants naturels et effet sur la santé. In Sarni-Manchado P. et Cheynier V. Les polyphénols en agroalimentaire. Tec et Doc. Lavoisier. Paris. ISBN:2-7430-0805-9. (9)301-302.

Mandal V. et Mandal S. C. (2010). Design and performance evaluation of a microwave based low carbon yielding extraction technique for naturally occurring bioactive triterpenoid: Oleanolic acid. *Biochemical Engineering Journal*. 50: 63–70.

Mandal V., Mohan Y. et Hemalatha S. (2007). Microwave-assisted extraction – An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews*. 1(1): 7–18.

Markham K.R. (1982). Techniques of flavonoids identification. Academic Press (London) Chap. 1 et 2: 1-113.

Martens. et Mithofer A. (2005). Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry*. 66: 2399–2407.

Martin S. et Andriantsitohaina R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium. *Annales de cardiologie et d'angéologie*. 51 : 304–315.

Matés J.M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicologie*. 153: 83-104.

McCord J. M. et Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase, an enzyme function for erythrocyte (Hemocytin). *Journal of Biological Chemistry*. 244(22):49-55.

McNulty J., Nair J.J., Bollareddy E., Keskar K., Thorat A., Denis J., Crankshaw D.J., Holloway A.C., Khan G., Wright G.D et Ejim L. (2009). Isolation of flavonoids from the heartwood and resin of *Prunus avium* and some preliminary biological investigations. *Phytochemistry*. 70 : 2040–2046

Mellou F, Lazari D, Skaltsa H, Tselepis A.D, Kolisis F.N, et Stamatis H. (2005). Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. *Journal of Biotechnology*. 116: 295–304.

Merzlyak M.N., Solovchenko A.E., Smagin A.I. et Gitelson A.A. (2005). Apple flavonols during fruit adaptation to solar radiation: spectral features and technique for non-destructive assessment. *Journal of Plant Physiology*. 162 : 151-160.

Min B.R., Barry T.N., Attwood G.T et McNabb W.C. (2003). The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 106 : 3–19

Molyneux L. (2004). Use of DPPH to estimate antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science Technology*. 26 (2):211-219.

Mukhopadhyay S., Luthria D.L et Robbins R. J. (2006). Optimization of extraction process for phenolic acids from black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) by pressurized liquid extraction. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 86:156–162.

N

Nagao A., Seki M. et Kobayashi H. (1999). Inhibition of xanthine oxydase by flavonoids. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 63 (10):1787-1790.

Nagavani V et Raghava R T. (2010). Evaluation of antioxidant potential and qualitative analysis of major polyphénols by RP HPLC in *Nymphaea nouchali*, Brum flowers, *international Journal of Pharmacy and pharmaceutical Sciences*. Vol 2, Suppl.

Nakayama, T. (1994). Suppression of hydroperoxyde-induced cytotoxicity by polyphenols. *Cancer Research*. 54: 1991-1993.

Nissiotis M. et Tasioula-Margari M. (2002). Changes in antioxidant concentration of virgin olive oil during thermal oxidation. *Food Chemistry*. 77: 371–376.

O

Oyaizu, M . (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*. 44:307-315.

P

Pelli K. et Lyly M. (2003). Les antioxydants dans l'alimentation. *Biotechnology Finland*. 3:1-28.

Petti S. et Scully C. (2009). Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of dentistry*. (3 7) : 41 3 – 42 3.

Pincemail J., Meurisse M., Limet R. et Defraigne J. (1999). Méthodes d'évaluation du stress oxydatif chez l'Homme : importance en matière de prévention. *Cancérologie* .1-4.

Q

Quezel P et Santa S (1963) - Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales. *Edition CNRS*. p : 2-59.

R

Ré D. B., Nafia I., Nieoullon A., Kerkerian Le Goff L. et Had-Aissouni L. (2005). Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate ? Implications sur la survie neuronale. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*. 24 : 502–509.

Read M.A. (1995). Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents vascular. *Am. J. Pathol.* 147 (2): 235-237.

Ribereau-Gayon, 1968, Notions générales sur les composés phénoliques in : les composés phénoliques des végétaux. Ed. DUNOD, p.1-27.

Richter, G. (1993). Les composés phénoliques métabolisme des végétaux, (physiologie et biochimie), Edition Dunod, P 331-339.

Rocher B., Le Goff J., Peluhet L., Briand M., Manduzio H., Gallois J., Devier M. H., Geffard O., Gricourt L., Augagneur S., Budzinski H., Pottier D., André V., Lebailly P. et Cachot J., 2006. Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. *Aquatic Toxicology.* 79 : 65–77.

S

Saheedeh A.D et Urooj A. (2007). Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica L.*) leaves. *Food Chemistry.* 102 :1233–1240.

Sánchez C., López-Jurado M., Aranda P. et Llopis J. (2010). Plasma levels of copper, manganese and selenium in an adult population in southern Spain: Influence of age, obesity and lifestyle factors. *Science of the Total Environment.* 408 : 1014–1020.

Sharif Ali S., Kasoju N., Luthra A., Singh A., Sharanabasava H et Sahu-Bora U. (2008, Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International.* 41: 1–15.

Shu Y.Y., Lai T. L., Lin H-S., Yang T. C et Chang C-P. (2003). Study of factors affecting on the extraction efficiency of polycyclic aromatic hydrocarbons from soils using open-vessel focused microwave-assisted extraction. *Chemosphere* .52 : 1667–1676.

Silici S., Sagdic O et Ekici L. (2010).Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Rhododendron honeys. *Food Chemistry.* 121: 238–243.

Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., RiznerHras A., Simonic M. et Knez Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry.* 89:191-198.

Stancheva I., Geneva M., Yonova P et Markovska Y. (2011). Accumulation of Cd, Pb and Zn in *Tribulus terrestris L.* Grown on Industrially Polluted Soil and Plant Antioxidant Response, *Advances in Environmental Biology.* 5(2): 300-306.

Surveswaran S., Cai Y-Z., Corke H et Sun M. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry* .102 : 938–953.

Sutivisedsak N., Cheng H.N., Willett J.L., Lesch W.C., Tangsrud R.R. et Biswas A. 2010. Microwave-assisted extraction of phenolics from bean (*Phaseolus vulgaris L.*). *Food Research International*. 43: 516–519.

T

Tessier F et Marconnet P. (1995). Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science et Sports*. 10 :1-13.

Tiwari A. K. (2001). Imbalance in antioxidant defence and human diseases: Multiple approach of natural antioxidant therapy. *Current Science*. 81(9):1179-1187.

V

Vercauteren J., Chèze C et Triaud J. (1996). Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. Polyphénols 96, Ed. INRA, p. 31-43.

Verykokidou – Vitsaropoulou E et Vajias C. (1986). Methylated flavones from *Teucrium polium*. *Planta Medica*. 5 : 343-432.

Vilà M et Terradas J, (1998). Neighbour effects on *Erica mzdiflora* (Ericaceae) reproductive performance after clipping. *Acta Oecologica*. 19 (2) : 139- 145.

W

Wang B. S., Chen Y. J., Liu S. H. and Lin-Shiau S. Y. (2000). An increase in free radical production by means of an anion channel blocker DIDS in mouse peritoneal neutrophils. *Proceedings of the National Science Council Republic of China*, 24(4) : 178-186.

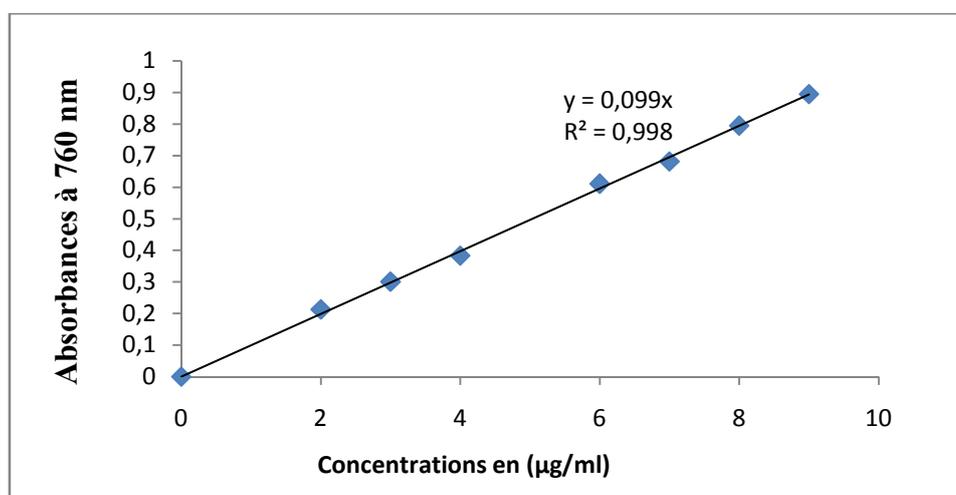
Z

Zhang W. et Furusaki S. (1999),production of anthocyanins by plant cell cultures. *Biotecnol.bioprocess.eng*:231-252.

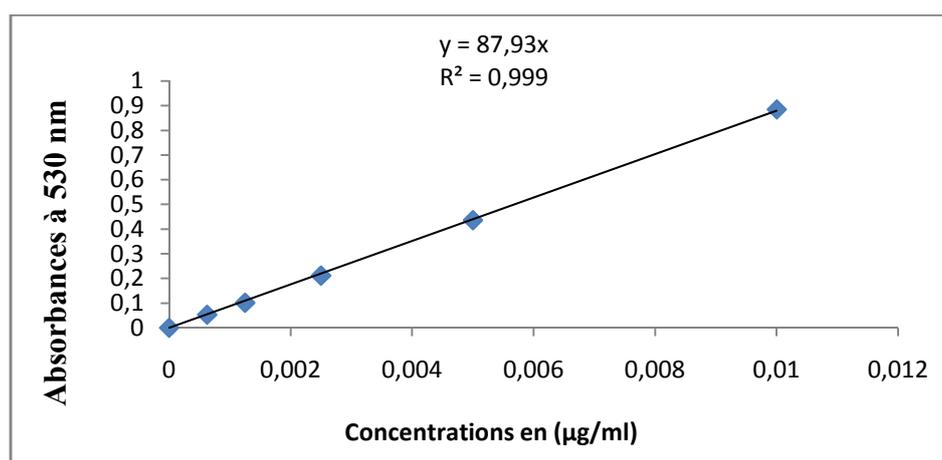
Annexe

Annexes I : Les courbes d'étalonnage

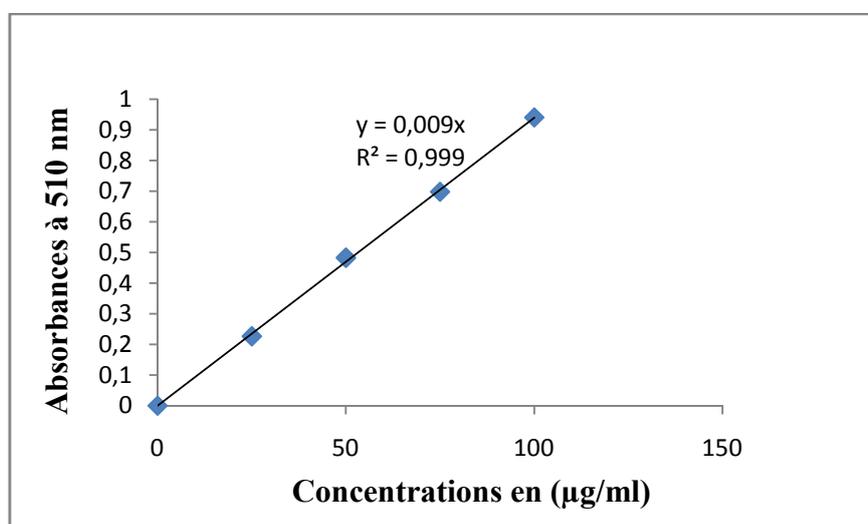
1-Courbe d'étalonnage du dosage des polyphénols totaux



2-Courbe d'étalonnage du dosage des flavonoïdes



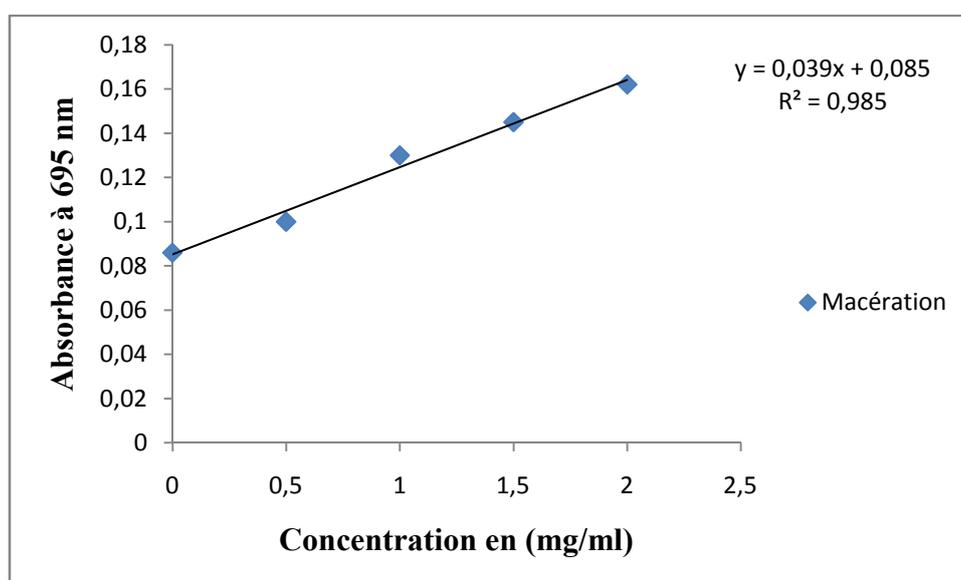
3-Courbe standard des tanins totaux



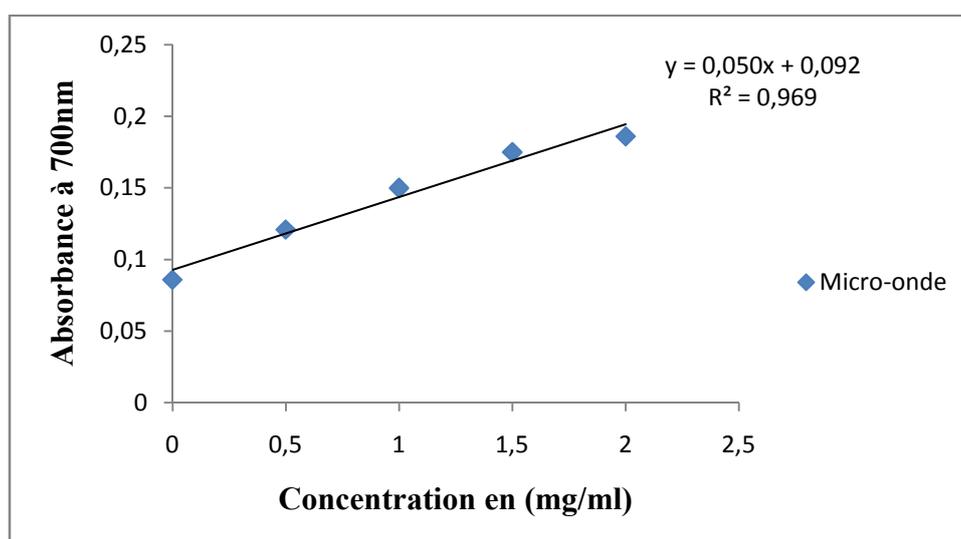
Annexe II : Les courbes représentantes les EC₅₀

II.1.Représentation d'EC 50 pour le pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium

II.1.1.Extrait d'*Erica multiflora* par macération

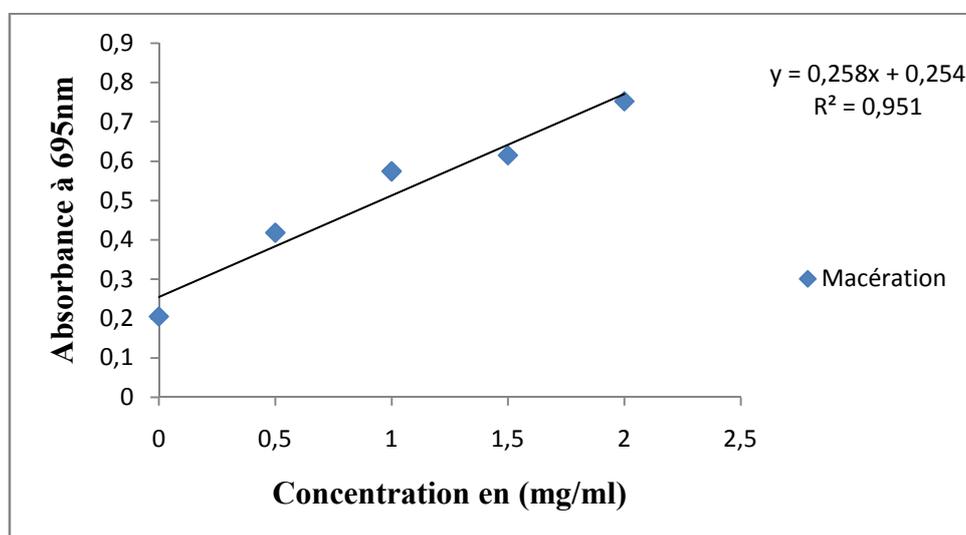


II.1.2.Extrait d'*Erica multiflora* par micro-onde

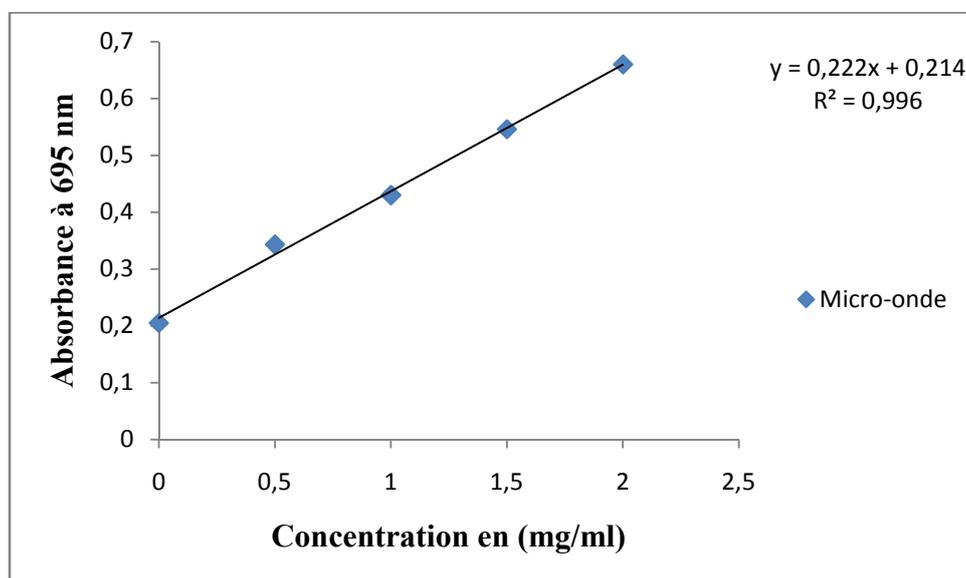


II.2. Représentation d'EC₅₀ du pouvoir réducteur au phosphomolybdate d'ammonium

II.2.1. Extrait d'*Erica multiflora* par macération

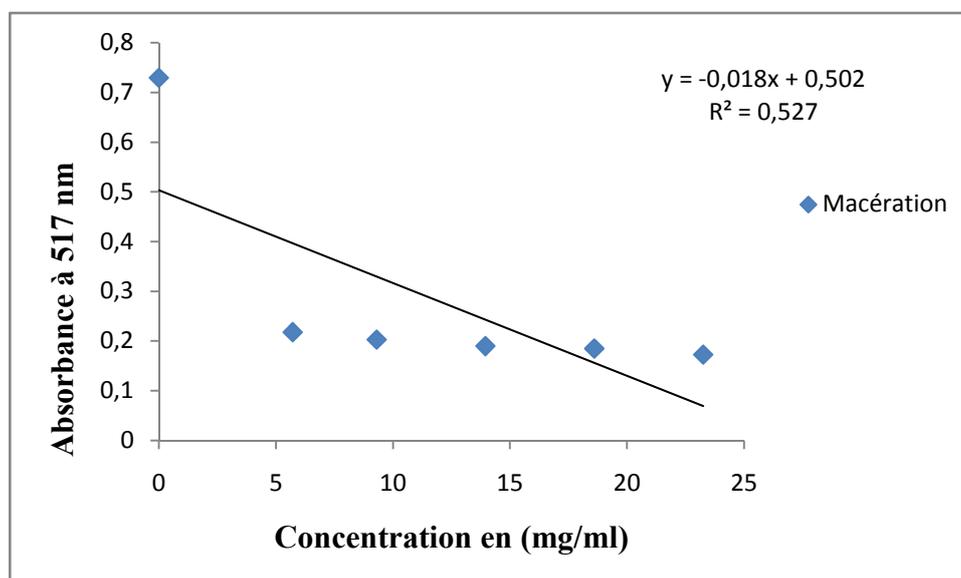


II.2.2. Extrait d'*Erica multiflora* par micro-onde

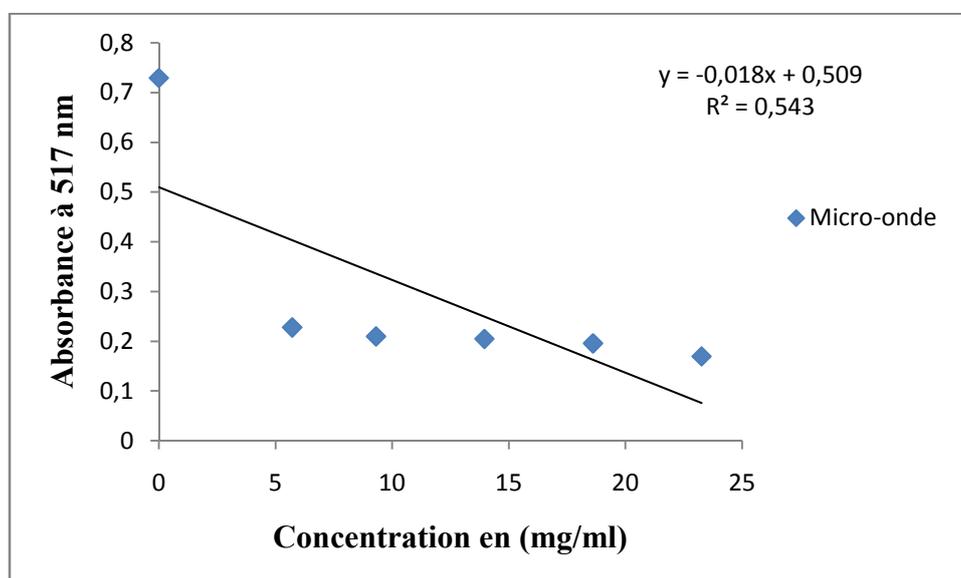


II.3. Représentation d'EC₅₀ du DPPH

II.3.1. Extrait d'*Erica multiflora* par macération



II.3.2. Extrait d'*Erica multiflora* par micro-onde



Liste des réactifs

Réactifs	Solutions préparés
Chlorure ferrique (0,1%) PM=270,33 g/mol	Peser 0,1 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ Ajusté jusqu'à 100 mL d'eau distillée.
Monocarbonate de sodium (20%) PM=105,99 g/mol.	Peser 20 g Ajusté jusqu'à 100 mL d'eau distillée.
Chlorure de potassium (pH=1) PM=74,54 g/mol, molarité=0,025 M	Peser 0,18635 g de KCl Ajusté jusqu'à 100 mL d'eau distillée.
Acétate de sodium (pH=4,5) PM=82,03 g/mol, molarité=0,4 M.	Peser 3,2812 g de CH_3COONa Ajusté jusqu'à 100 mL d'eau distillée.
Réactif molybdate : mélange de : Acide sulfurique (PM=98,07 g/mol; M=0,6 M) Phosphate de sodium (PM=156,01 g/mol ; molarité=28 mM) Molybdate d'ammonium (PM=1235,86 g/mol; molarité=4 mM)	3,313 mL d' H_2SO_4 0,4368 g de $\text{H}_2\text{NaO}_4\text{P} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,4943 g de $\text{H}_2 \text{4MO}_7\text{N}_6\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ Mélanger le tous puis Ajusté jusqu'à 100 mL d'eau distillée.
Tampon phosphate (0.2 M, pH=6,6)	1,115 g de k_2HPO_4 . 1,809 g de $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$. Ajouter 100 mL d'eau distillée
Ferricyanure de potassium PM=329,39 g/mol,	1g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ Ajouter 100 mL d'eau distillée.

Acide trichloracétique TCA (1%) PM=163,39 g/mol	1g de TCA (CCl_3COOH) 100 mL d'eau distillée.
Chlorure d'aluminium (pH=1) PM=241,43 g/mol	Peser 1 g d' $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ Ajuster avec 50 mL de méthanol
Dodecyl sodium sulfate/triethanolamide (SDS/TEA) (5%), pH=9,4	5 g de $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{NaH}_2\text{SO}_4$ 5 mL de TEA Ajouter 100 mL d'eau distillée.
Chlorure ferrique PM=270,33 g/mol	0,05 g de FeCl_3 Ajouter 50 mL d'eau distillée
Tampon A	1,122 mL d'acide acétique glacial, ajouté 100 mL d'eau distillée 1,6 g de NaOH, ajouter 20mL d'eau distillée 0,994 g de NaCl, ajuster avec la solution de NaOH jusqu'à un pH=4,9
Solution de BSA	1 mg de BSA 10 mL de Tampon A
DPPH	Peser 0,0197 g de DPPH Ajouter 50 mL de méthanol

Résumé

Erica multiflora L fait partie de la grande famille des plantes médicinales largement utilisé en médecine traditionnelle. Leur multiple propriété pharmacologique est due à leur richesse en substances actives qu'il renferme. Ce travail a porté sur l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante de deux extraits de la plante, l'un obtenu par macération et l'autre par micro-onde. Les résultats du dosages des composés phénoliques de l'extrait ont montré que l'espèce *Erica multiflora* riche en tannins totaux avec des teneurs de 162.592 mg d'EAT / g de MS par micro-onde et 123.146 mg d'EAT / g de MS par macération, suivi des poly phénols totaux avec des teneurs de 13.672 mg d'EC/g de MS par micro-onde et 10.778 mg d'EC/g de MS et elle contient des teneurs faible en flavonoïdes 0.01017 mg d'EQ/g de MS par micro-onde et 0.00864 mg d'EQ/g de MS par macération.

L'évaluation du pouvoir réducteur par la méthode au ferricyanure de potassium et au molybdate d'ammonium, a révélé que l'extrait d'*Erica multiflora* a une activité antioxydante meilleure avec la méthode d'extraction par micro-onde, par contre l'activité inhibitrice du radical DPPH est presque similaire par les deux méthodes d'extraction.

Mots clés : *Erica multiflora*, pouvoir réducteur, DPPH, composés phénoliques.

Abstract

Erica multiflora L belonged to the big family of the medicinal plants largely used in traditional medicine. Their multiple pharmacological property is due to their wealth of active substances which it contains. This work concerned the phytochimic study and the evaluation of the antioxydant activity of two extracts of the plant, one obtained by maceration and the other by microwave. The results of proportionings of the phenolic compounds of the extract showed that the species of *Erica multiflora* is rich in total tannins with contents of 162.592 mg of EAT/g of dry mater per microwave et 123.146 mg of EAT/g of dry mater by maceration, follow-up of the total phenols with contents of 13.672 mg of EC/g of dry mater by microwave et 10.778 mg of EC/g of dry mater and it contains contents weak of flavonoïdes 0.01017 mg of EQ/g of dry mater by microwave and 0.00864 mg of EQ/g of dry mater by maceration.

The evaluation of the reducing power by the phosphomolybdate of ammonium and ferricyanure of potassium, revealed that the extract of *Erica multiflora* has a better antioxydant activity with the method of extraction per microwave, on the other hand the inhibiting activity of radical DPPH is almost similar by the two methods of extraction.

Key words: *Erica multiflora*, reducing power, DPPH Phytochimique, phenolic compounds.