

*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 de Biologie Physico-Chimique*

**Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master II en  
Biologie**

**Option : Biochimie Appliquée**

**Détermination des teneurs en substances  
bioactives et l'activité antioxydant  
des extraits de *Pistacia lentiscus*  
et *Clematis flammula***

**Réalisé par :**

M<sup>lle</sup> TALBI Narima

M<sup>lle</sup> TAZAMOUCHT Samra

**Promotrice :**

M<sup>lle</sup> CHERAFT.N

**Membres du jury :**

**Président : M<sup>me</sup> DEBBACHE.N**

**Examinatrice : M<sup>lle</sup> TAHIRI.O**

**Examinatrice : M<sup>lle</sup> BOUCHEFFA.S**

**Promotion : 2013-2014**



## Remerciements

*Nos vifs remerciements au Dieu le tout puissant pour tout.....*

*Nous tenons d'abord à remercier très chaleureusement notre promotrice M<sup>lle</sup> CHERAFT .N, qui nous a permis de bénéficier de son encadrement, ses conseils qu'elle nous a prodigués, sa patience, sa confiance ; qu'elle nous a témoignés et qui ont été déterminantes dans la réalisation de notre travail.*

*Nos remerciements s'étendent également à M<sup>lle</sup> TAHIRI, M<sup>lle</sup> AYOUNI et M<sup>me</sup> BERBOUCHA pour leurs précieux conseils et ambiance au laboratoire.*

*Nous exprimons nos remerciements à M<sup>lle</sup> BOUCHEFFA qui nous a vraiment aidées*

*Nous voudrions également remercier les membres de jury qui ont bien voulu juger ce travail :*

*M<sup>me</sup> DEBBACHE. N, qui nous a faits l'honneur de présider ce jury.*

*M<sup>lle</sup> TAHIRI. O et M<sup>lle</sup> BOUCHEFFA. S, qui ont accepté d'examiner ce travail.*

*Nos remerciements vont plus particulièrement à nos familles qui ont su nous soutenir tout au long de nos études.*

*Merci à tout le personnel du laboratoire, ainsi que toute personne de près ou de loin, qui ont contribué à la réalisation de ce travail.*

*M<sup>lles</sup> : TAZAMOUCHT SAMRA*

*TALBI NARIMA*







# Dédicaces

*À Dieu, le tout puissant pour tout.....*

*À mes chers parents : Ma mère et mon père qui m'ont supportée et m'ont aidée dans les pires moments, je leur dédie avec fierté ce mémoire qui reflète le fruit de l'éducation et de l'attention qu'ils m'ont tant réservé.*

*À mes sœurs : NABILA et son Mari ainsi que son fils ADEM pour leur amour, soins et encouragements.*

*FOUZIA qui m'a laissé un immense vide que dieu l'accueille dans son vaste paradis, même s'elle n'était plus là, son existence est éternelle dans mon cœur.*

*À mes frères : DJAMEL et YACINE pour leur soutien et leur amour.*

*À ma grande famille, chacun avec son nom. Sans oublier mes chères cousines  
LYDIA et SOUAD*

*À celui que je suis très fière de l'avoir et tous les mots du monde ne peuvent exprimer l'amour que je lui porte : mon très cher fiancé NACER, qui a été toujours à mes côtés pour me soutenir et m'encourager, que dieu le garde pour moi, et à toute sa famille ; Surtout ma belle mère MARBOUHA et mes belles sœurs : LYDIA, HANANE et ASSIA.*

*À Tous mes amis (es) surtout : MOUNA, KENZA, KINZA, KHADIDJA, NAZIHA et ABDOU, à Tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.*

*À Ma chère collègue et sœur NARIMA qui ma accompagnée durant ce travail et tout notre cursus à l'université, et à toute sa famille.*

*À Toute la promotion Biochimie Appliquée 2013-2014.*

**SAMRA (SANA)**





# Dédicace

*À Dieu, le clément et miséricordieux, pour sa Grace. Puisse Allah le tout puissant m'éclairer de sa lumière divine.*

*À la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.*

*À mon cher père qui ma appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements.*

*À mes très chères frères et sœurs : Safia et Sihame, Yacine, Abed EL Malek et Abed Rahim*

*À Mes très chères grand- mères ( Taous et Fatima) et grand- pères*

*À Ma très adorable cousine et sœur Souad*

*À mes très chères tantes et oncles et surtout mon oncle Azzedine et bien sûre sans oublier mes très adorables cousins et cousines*

*À mes très chères copines : Mouna, Faty, Kenza, kenza, khaldo, Naziha, lydia, Sissi, Rahima pour les moment sympathiques qu'on a partagés*

*À mes très bons amis qui m'ont beaucoup aidé : Ghania, Abdou, Riad , Saida, Zahra , Nesrine, Kahina*

*À Ma chère collègue et mon amie Samra qui ma accompagnée durant ce travail et toute les années d'études à l'université, bien sure sans oublier sans fiancé Nacer pour ça disponibilité.*

*À toute la promotion de biochimie appliquée 2014 (les biochichistes)*

*En fin à toute personne qui m'est chère au cœur et qui m'a aidé de près ou de loin.*

*Narima (Selma)*

# *Sommaire*

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

## *Partie théorique*

Introduction.....	1
I. Stress oxydant .....	2
I.1 Les antioxydants.....	2
I.2 Système de défense antioxydant .....	3
I.2.1 Systèmes endogène.....	3
I.2.2 Système exogène.....	3
I. 3 Méthodes de quantification des antioxydants.....	11
I.3.1 Dosage des composés phénolique.....	11
I.3.2 Dosage des vitamines.....	15
I.4 Intérêts des antioxydants.....	16
I.5 Relation structure chimique et activité antioxydant des antioxydants.....	18

## *Partie expérimentale*

II. Matériels et méthodes.....	21
II.1. Matériel végétal.....	21
II.1.1 présentation de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	21
II.1.2 Présentation de <i>Clematis flammula</i> .....	22
II.2 Méthodes .....	24

II.2.1 Préparation des extraits .....	24
II.2.2 Dosage des antioxydants .....	26
II.2.2.1 Dosage de l'acide ascorbique (la vitamine C) .....	26
II.2.2.2 Dosage des anthocyanes.....	28
II.2.2.3 Dosage des proanthocyanidines.....	31
II.2.3 Détermination des activités antioxydants.....	32
II.2.3.1 Activité scavenger du radical DPPH.....	32
II.2.3.2 Activité scavenger du radical ABTS <sup>+</sup> .....	33
II.2.3.3 Pouvoir réducteur du fer ferrique (test FRAP).....	34
II.2.3.4 Test de blanchissement de la $\beta$ -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique.....	35
II.3 Analyse statistique.....	37

## *Résultats et discussion*

III.1 Le taux d'extraction .....	38
III.2 Résultats de dosage des antioxydants.....	40
III.2.1 Acide ascorbique (vit C) .....	40
III.2.2 Anthocyanes .....	43
III-2.3 Flavonols glycosylés .....	46
III.2.4 Proanthocyanidines .....	51
III.3 Activité antioxydant .....	53
III.3.1 Activité scavenger du radical DPPH.....	53
III.3.2 Test de blanchiment de $\beta$ -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique .....	57

<b>III.3.3 Activité scavenging du radical ABTS<sup>+</sup></b> .....	<b>60</b>
<b>III.3.4 Mesure du pouvoir antioxydant par la réduction du fer ferrique (test FRAP)</b> .....	<b>65</b>
<b>III.4 Corrélations entre les teneurs en composés bioactives et l'activité antioxydant des extraits étudiés</b> .....	<b>68</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>74</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>76</b>
<b>Annexes 1</b>	
<b>Annexes 2</b>	

## Liste des abréviations

**AA** : L'acide ascorbique

**ABTS** : Acide 2,2'-azinobis (3 enthlbenzothianzoline-6-sulfonique).

**AlCl<sub>3</sub>** : Chlorure d'aluminium

**ANOVA** : One-Way Analysis of Variance

**BSA** : Sérum Albumine Bovine

**BHA**: Butylated hydroxyanisole

**Cy**: Cyanidine

**Cy-g** : 3-O-glucoopyranoside

**DHAA** : Acide déhydroascorbique DHAA

**DPPH**: 2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl

**Dp** : Delphinidine

**EDTA** : Acide éthylène diamine tetracétique EDTA

**EC** : Electrochimique

**Eq AA** : Equivalent d'acide ascorbique.

**ERO** : Espèces Réactive Oxygénés

**Fe<sup>+2</sup>** : Fer Ferreux

**Fe<sup>+3</sup>**: fer Ferrique.

**FeCl<sub>3</sub>** : chlorhydrique ferrique

**FeNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)** : l'ammonium ferrique

**FRAP**: Ferric Reducing Antioxydant Power

**HCl** : Acide chlorhydrique.

**HPLC** : Chromatographie liquide à haute performance

**H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>** : Acide phosphomolybdique

**H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>** : Acide phosphotungstique

**K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>** : ferricyanides

**KIO<sub>3</sub>** : l'iodate de potassium

**L-AA** : l'acide L-ascorbique

**mg EC/g** : milligramme Equivalent de Catéchine par gramme.

**MS** : la spectrométrie de masse

**Mv** : Malvidine

**NaONO<sub>2</sub>** : Carbonate de sodium

**Na<sub>2</sub>S** : Bisulfure de Sodium

**NO** : Monoxyde d'azote

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>** : l'oxygène singulet

**OH<sup>•</sup>** : Radical hydroxyle

**Pg** : Pelargonidine

**Pn** : Peonidine

**Pt** : Petunidine

**RMN** : Résonance magnétique nucléaire

**ROO<sup>•</sup>** : Radical peroxyde

**SDS** : dodécyl sulfate de sodium

**UV** : Ultraviolets

**vit C** : La vitamine C

**KIO<sub>3</sub>** : iodate de potassium

## Liste des figures

Fig. 1 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydants .....	3
Fig. 2 : Structure de la vitamine E.....	5
Fig. 3 : Structure chimique de la vitamine C.....	5
Fig. 4 : Exemple de structure de base des tanins condensés.....	7
Fig.5: Structure de base des flavonoïdes avec la numérotation classique.....	8
Fig. 6 : Structure générale des anthocyanes .....	8
Fig.7 : Formes chimiques d'anthocyanines selon le pH et la réaction de dégradation des anthocyanines.....	10
Fig.8 : Régénération de la vitamine E via l'action de la vitamine C.....	17
Fig.9 : Photographie de (a) feuilles, (b) fruits de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	22
Fig. 10: Photographie de <i>Clematis flammula</i> .....	23
Fig. 11 : Carte de la wilaya de Bejaia .....	24
Fig. 12 : Protocole d'extraction des composés phénoliques .....	26
Fig. 13 : Protocole de dosage de l'acide ascorbique .....	27
Fig. 14 : Protocole de dosage de la vitamine C .....	28
Fig. 15 : Protocole de dosage des anthocyanes .....	29
Fig. 16 : Protocole de détermination des teneurs en flavonols glycosides et anthocyane...30	30
Fig.17 : Protocole de dosage des proanthocyanidines avec la vanilline- HCL .....	31
Fig.18 : Protocole d'évaluation de l'activité scavenger du radical DPPH .....	32
Fig. 19 : Protocole de détermination de l'activité scavenger du radical ABTS <sup>·+</sup> .....	33
Fig. 20 : Principe de la méthode FRAP .....	34

<b>Fig. 21</b> : Protocole de détermination du Pouvoir réducteur du fer ferrique (test FRAP).....	35
<b>Fig. 22</b> : Protocole de détermination de L'activité anti-oxydante par le test de blanchissement de la $\beta$ -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique .....	36
<b>Fig. 23</b> : Teneur en acide ascorbique du matériel végétal frais et sèche des graines et feuilles de <i>P.lentiscus</i> et les feuilles de <i>C. flammula</i> .....	40
<b>Fig. 24</b> : Teneur en acide ascorbique des extraits des feuilles et graines de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	42
<b>Fig.25</b> : Teneur en acide ascorbique des extraits des feuilles de <i>Clematis flammula</i> .....	43
<b>Fig.26</b> : Teneur en anthocyanines des différents extraits de feuilles de <i>Clematis flammula</i> .....	44
<b>Fig.27</b> : Teneur en anthocyanines des différents extraits de feuilles et graines de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	45
<b>Fig.28</b> : Teneur en flavonols glycosylés des différents extraits de feuilles de <i>Clematis flammula</i> .....	47
<b>Fig.29</b> :Teneur en flavonols glycosylés des différents extraits de feuilles et graines de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	47
<b>Fig.30</b> : Teneur en anthocyanes du matériel végétal frais et poudre des graines et feuilles de <i>P.lentiscus</i> et les feuilles de <i>C. flammula</i> .....	49
<b>Fig.31</b> :Les quatre formes de la structure d'anthocyanidine.....	50
<b>Fig.32</b> : Teneur en Proanthocyanidines des extraits de feuille de <i>Clematis flammula</i> .....	51
<b>Fig.33</b> : Teneur en tannins condensés des différents extraits de feuilles et de graines de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	52
<b>Fig.34</b> : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	53
<b>Fig.35</b> : Effet anti-radicalaire contre le radical DPPH des extraits de <i>Clematis flammula</i> .....	54

<b>Fig.36 :</b> Effet anti-radicalaire contre le radical DPPH des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i> feuilles et graines .....	55
<b>Fig.37 :</b> Pourcentage d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du $\beta$ carotène des extraits de <i>Clematis flammula</i> .....	57
<b>Fig. 38 :</b> Pourcentage d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du $\beta$ -carotène des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i> feuilles et graines .....	59
<b>Fig. 39:</b> Effet scavenger contre le radical ABTS. <sup>+</sup> de tous les extraits de a) feuilles de <i>C.flammula</i> , b) feuilles de <i>P.lentiscus</i> , c) graines de <i>P.lentiscus</i> .....	61
<b>Fig.40 :</b> Activité antiradicalaire contre l'ABTS. <sup>+</sup> des extraits de feuilles de <i>Clematis flammula</i> .....	63
<b>Fig.41 :</b> Activité antiradicalaire contre l'ABTS. <sup>+</sup> des extraits de feuilles et graines de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	63
<b>Fig. 42 :</b> Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode FRAP des extraits de feuilles et graines de <i>Pistacia Lentiscus</i> .....	65
<b>Fig. 43 :</b> Pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP des extraits de feuille de <i>Clematis flammula</i> .....	67

## Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Les principaux anthocyanidines courantes	9
II	classification de <i>Pistacia lentiscus</i>	21
III	classification de <i>Clematis flammula</i>	23
IV	Taux d'extraction à partir des deux différentes parties de plantes étudiées.	38
V	La teneur des anthocyanes (mg équivalent de C3G/100g d'extrait) des extraits de feuilles et graines de <i>Pistacia lentiscus</i> et feuilles de <i>Clematis flammula</i>	44
VI	La teneur en flavonols glycosylés( mg équivalent de la cyanidine-3- glucoside/ 100g d'extrait )des extraits de feuilles et graines de <i>Pistacia lentiscus</i> et feuilles de <i>Clematis flammula</i> .	46
VII	Effet anti-radicalaire contre le radical DPPH des extraits des deux plantes	54
VIII	Présente le pourcentage d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du $\beta$ -carotène	57
IX	Activité anti radicalaire contre le cation ionique l'ABTS <sup>+</sup>	62
X	Pouvoir réducteur des extraits des feuilles et graines de <i>P.lentiscus</i>	66

# *Introduction*

*Partie*  
*Théorique*

*Partie*

*Pratique*

*Résultat*  
*&*  
*Discussion*

*Conclusion et  
perspectives*

*Références*

*Bibliographiques*

# *Annexes*

### Introduction

Depuis toujours, les plantes médicinales ont été et restent la source majeure de médicaments grâce à leur richesse en métabolites secondaires, qui se sont illustrés en thérapeutique (**Fouché et al., 2003**).

L'organisme génère en permanence des radicaux libres, qui sont des dérivés du fonctionnement normal du corps mais qui sont aussi produits en plus grande quantité lorsque le corps est agressé (cigarette, pollution, infections, etc.). A cause de leur réactivité, les radicaux libres endommagent les cellules en les oxydant (stress oxydatif) (**Thurre, 2007**). Pour faire face à ces produits oxydants délétères, le corps humain possède tout un arsenal de défenses très efficaces, que l'on qualifie d'antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (**Halliwell et Gutteridge, 1999**).

Bien que le corps soit capable de produire ses propres antioxydants, un apport nutritionnel riche en  $\beta$ -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les polyphénols, renforce la neutralisation de radicaux libres produits (**Thurre, 2007**). Et ainsi prévenir les nombreuses maladies comme le diabète, les cancers, les maladies inflammatoires, le vieillissement, les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, etc.

Deux plantes médicinales *Pistacia lentiscus* et *Clematis flammula* à forte utilisation par la population locale font l'objet de cette présente étude visant plusieurs objectifs :

- Détermination de la teneur en polyphénols, notamment les anthocyanes, les proanthocyanidines, les flavanols mais aussi le taux en vitamine C des extraits des deux plantes étudiées.
- Evaluation de l'activité antioxydant des extraits des feuilles et graines de *Pistacia lentiscus* ainsi que les feuilles de *Clematis flammula* ; par les tests de DPPH, ABTS, blanchissement du  $\beta$ -carotène couplé à la peroxydation de l'acide linoléique et le du pouvoir réducteur par la méthode FRAP.

## **I. Stress oxydant**

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants en faveur des premiers. Cette rupture d'équilibre peut provenir d'une surproduction énorme de radicaux libres ou d'une carence en un ou plusieurs des antioxydants endogènes ou exogènes (**Goudable et Favier, 1997 ; Pincemail et al., 1999 ; Bonnefont-Rousselot et al., 2002 ; Favier, 2003 ; Rock, 2003**).

Les modifications génomiques, métaboliques et fonctionnelles induites par cet état de stress oxydatif ont été impliquées dans le développement de différentes pathologies (**Pincemail et al., 2002 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006**). Pour faire face à ces produits oxydants délétères, le corps humain possède tout un arsenal de défenses que l'on qualifie d'antioxydants (**Halliwell et Gutteridge, 1999**).

### **I.1 Les antioxydants**

#### ➤ **Définition des antioxydants**

Un antioxydant est toute substance, présente à une concentration inférieure à celle du substrat oxydable, qui est capable de retarder ou de prévenir l'oxydation de ce substrat (**Halliwell et Gutteridge, 1999 ; Favier, 2003**).

Les antioxydants peuvent agir à deux niveaux : en prévenant la formation des radicaux libres oxygénés (antioxydants primaires) ou en épurant les radicaux libres oxygénés (antioxydants secondaires). En complément de cette double ligne de défense, l'organisme est en outre capable de réparer ou d'éliminer les molécules endommagées par l'attaque radicalaire (**Halliwell et Gutteridge, 1999 ; Tanguy et al., 2009**) (figure 1).

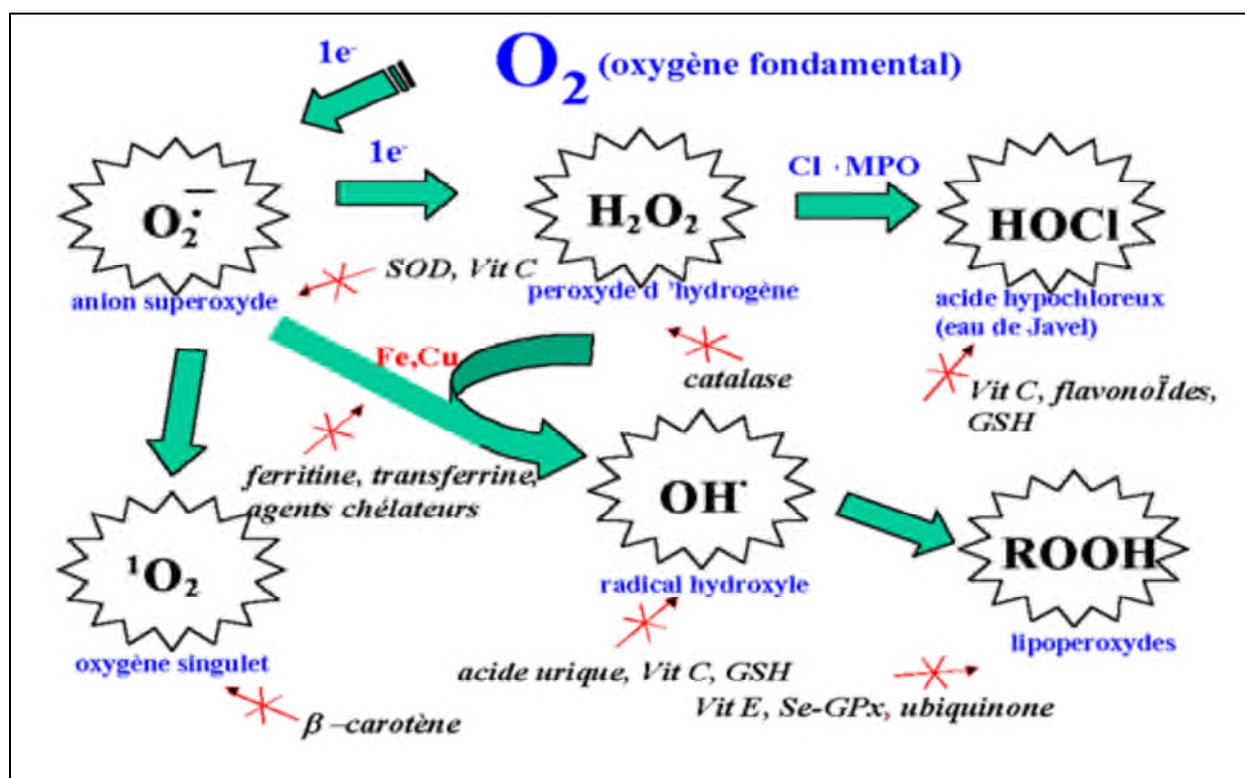
Quelques antioxydants sont synthétisés par le corps humain, d'autres tels que les vitamines et polyphénols, doivent être apportés par notre alimentation (**Pincemail et Defragne, 2004**).

#### ➤ **Rôles physiologiques des antioxydants**

L'avènement de la biologie moléculaire a montré que les antioxydants sont des molécules qui possèdent des propriétés allant bien au-delà de leur capacité à piéger les ERO (espèces réactives oxygénées). Expérimentalement, il est bien prouvé que les antioxydants présentent des activités anticancéreuses non seulement en piégeant des ERO mais aussi en augmentant la réponse immunitaire, en diminuant l'expression d'oncogènes ou en inhibant l'angiogenèse des tumeurs. Les antioxydants jouent également un rôle clé dans la régulation des signaux cellulaires (**Pincemail et al., 2002**).

## I.2 Système de défense antioxydant

L'organisme possède des systèmes de défense très efficaces, de deux types : les antioxydants enzymatiques (endogènes) et non enzymatiques (exogènes). Ces antioxydants sont d'autant plus importants que certains peuvent être utilisés en thérapeutique pour tenter de prévenir le stress oxydatif (Figure 1) (Goudable et Favier, 1997 ; Pelli et Lyly, 2003 ; Vameq et al., 2004 ; Rahman et al., 2006 ).



**Figure1** : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydants (Pincemail et al., 1999 ; Pincemail et al., 2002 ).

### I.2.1 Systèmes endogène

Les antioxydants endogènes incluent un ensemble d'enzymes à savoir : les superoxydes dismutases, la catalase, le système glutathion/glutathion peroxydase/glutathion réductase et le système glutarédoxine (peroxyrédoxine/ thiorédoxine/ thiorédoxine réductase) (Goudable et Favier, 1997 ; Vameq, et al., 2004 ; Rahman et al., 2006).

### I.2.2 Système exogène

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler la concentration d'espèces réactives de l'oxygène. Certains composés antioxydants comme les vitamines E (tocophérol), vitamines C (ascorbate), les caroténoïdes ou les polyphénols apportés par les aliments, agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables (Goudable et Favier, 1997; Favier, 2003).

### **I.2.2.1 Les vitamines**

#### **I.2.2.1.1 Définition des vitamines**

Les vitamines sont des substances organiques que l'organisme est incapable de synthétiser, elles sont nécessaires à la croissance et au métabolisme en agissant à faible doses. L'apport nutritionnel permet généralement de couvrir tous nos besoins en vitamines. Cependant, des apports insuffisants en ces substances provoquent des perturbations biologiques, traduites par des pathologies (**Brémaud, 2006**).

Treize composés répondent à cette définition et sont classiquement divisés en deux groupes en fonction de leurs propriétés physicochimiques, métaboliques et fonctionnelles : les vitamines liposolubles (A, D, E et K) et les vitamines hydrosolubles (B1, B2, PP, B5, B6, B8, B9, B12, C). Certaines vitamines sont synthétisées de manière indirecte dans l'organisme humain (**Durand et Beaudoux, 2011**). Ainsi, Notre alimentation peut apporter 13 vitamines. L'organisme produit 3 entre elles (vitamines A, D et K) à partir de précurseurs et dans certaines conditions. Les 10 autres ne sont fournies que par les aliments ingérés (**Brémaud, 2006**).

#### **I.2.2.1.2 Structure chimique, rôle et propriétés physicochimiques des vitamines**

Les vitamines constituent un groupe de molécules très hétérogène au plan chimique, elles sont plus ou moins sensibles aux agents dits « destructeurs » qui sont notamment l'oxygène, la chaleur, la lumière, les rayons UV, pH et certains métaux catalyseurs. Cette différence de sensibilité traduit l'hétérogénéité de leurs caractéristiques physico-chimiques (**Durand et Beaudoux, 2011**).

##### **➤ Les vitamines E**

La vitamine E désigne un groupe de nombreux composants présents dans la nature : Les  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - et  $\delta$ -tocophérols et tocotriénols. Ils diffèrent les uns des autres par la position des groupes méthyles sur le cycle aromatique (Figure 02) (**Pincemail et al., 1998**).

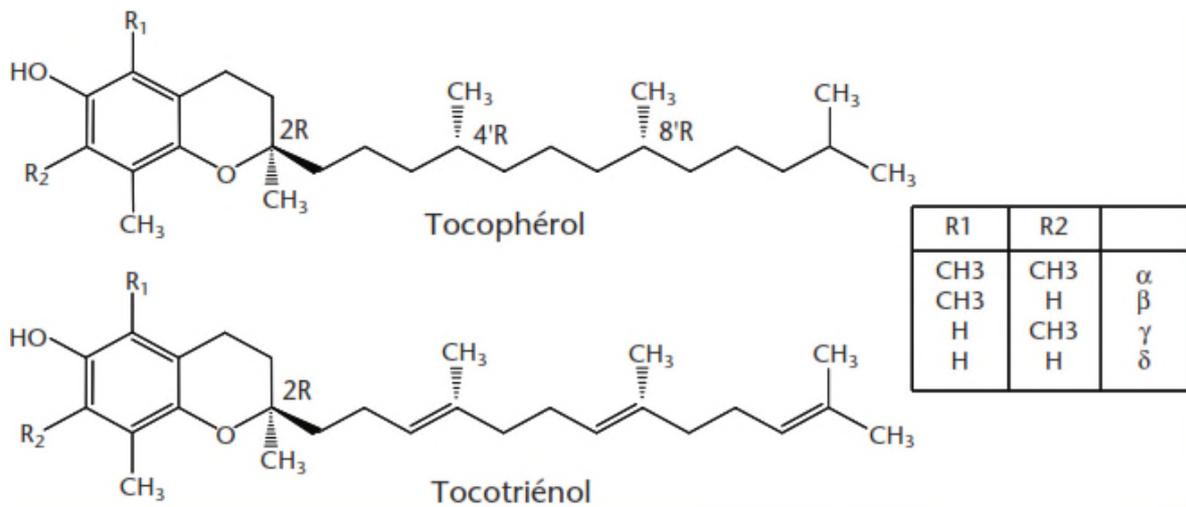


Figure 02: Structure de la vitamine E (Landrier, 2011)

➤ La vitamine C (acide ascorbique)

La Vitamine C ou l'acide L-(+)-threo-ascorbique est la vitamine la plus abondante dans les compartiments aqueux de l'organisme. Ses principales sources alimentaires sont les fruits et les légumes (Figure 3) (Nève, 2002).

Elle dérive chez les végétaux directement de D-glucose avec conversion de la séquence de la chaîne carbonée. L'acidité de la molécule et son caractère réducteur sont liés à sa structure d'ène-diol aisément oxydée en une structure bicyclique, l'acide déhydro-ascorbique. Elle est métabolisée en acide oxalique, acide thréonique et acide tartrique ; ce dernier peut être formé via l'acide thréonique ou, chez certaines familles directement (Vitaceae) (Bruneton, 1999).

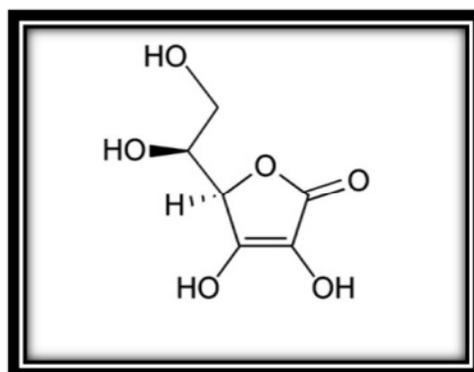


Figure 03 : Structure chimique de la vitamine C (Chepda et al., 1999).

### **I.2.2.2 Les composés phénoliques**

#### ➤ **Définition des polyphénols**

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction : éther, ester et hétéroside. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (**Bruneton, 2009**).

#### ➤ **Biosynthèse**

Les composés phénoliques sont issus de deux grandes voies d'aromagenèse : la voie la plus courante est celle qui, via le shikimate ( l'acide shikimique ), conduit des oses aux acides aminés aromatiques ( phénylalanine et tyrosine ) puis, par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acides benzoïques, acétophénonnes, lignanes et lignines, coumarines. L'autre voie commence de l'acétate et conduit à des poly  $\beta$ -cétosters de longueur variable (polyacétates) qui engendrent, par cyclisation des composés souvent polycycliques : quinones, xanthonnes,...etc (**Bruneton, 1999**).

#### ➤ **classification**

La classification s'effectue d'abord selon, la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées), ensuite selon le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, de l'hydroxylation, de méthylation...etc.) et enfin selon les liaisons possibles de ces molécules de bases avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines et autres métabolites secondaires) (**Ribereau-Gayon, 1968 ; Sarni-Manchado et Cheynier, 2006 ; Rahman et al., 2006 ; Bruneton, 2009**) donnant naissance ainsi à plusieurs classes présentées par phénols simples, flavonoïdes, tannins, anthocyanes (**Bruneton, 2009**).

#### **I.2.2.2.1 Les phénols simples**

Les phénols simples sont reconnus par des formes les plus simples qui présentent des structures chimiques ; ils sont divisés en acides benzoïques à sept atomes de carbones (C6-C1), en acides cinnamiques à neuf atomes de carbone (C6-C3) et en fin en coumarines qui possèdent un hétérocycle oxygéné à six atomes, accolé à un noyau benzoïque et qui dérivent des acides cinnamiques par cyclisation de leur chaîne latérale (**Ribereau-Gayon, 1968 ; Macheix et al., 2006**).

### I.2.2.2 Les tannins

Les tannins sont des composés phénoliques ayant des poids moléculaires compris entre 500 et 3000 Da. Deux groupes de tannins se différencient aussi bien par leur structure que par leur origine biosynthétique: tannins hydrolysables et tannins condensés (**Ribéreau-Gayon, 1968 ; Bruneton, 1999**).

#### ➤ Tannins condensés (proanthocyanidines)

Les tannins condensés sont des structures plus complexes, on les appelle également proanthocyanidines, largement présents dans le règne végétal, et que l'on rencontre dans de nombreux produits alimentaires (fruits, légumes, boissons...). Ils ne renferment pas de sucres dans leurs molécules, ils sont hydrolysés en présence d'acides forts ou d'agents d'oxydation, ils se transforment en substances rouges (**Boudjellal, 2009**). Ce sont des polymères de flavan 3-oles (catéchine) et de flavan 3,4-dioles (leucoanthocyanidines), ou un mélange des deux (**Luthar, 1992 ; Okamura et al., 1993**).

Les chaînes de polymères comptent de 2 à 20 unités environ, et il existe de nombreuses hydroxylations possibles en différents endroits de chaque monomère (figure 4). Cette diversité structurale explique les variations d'activité biologique.

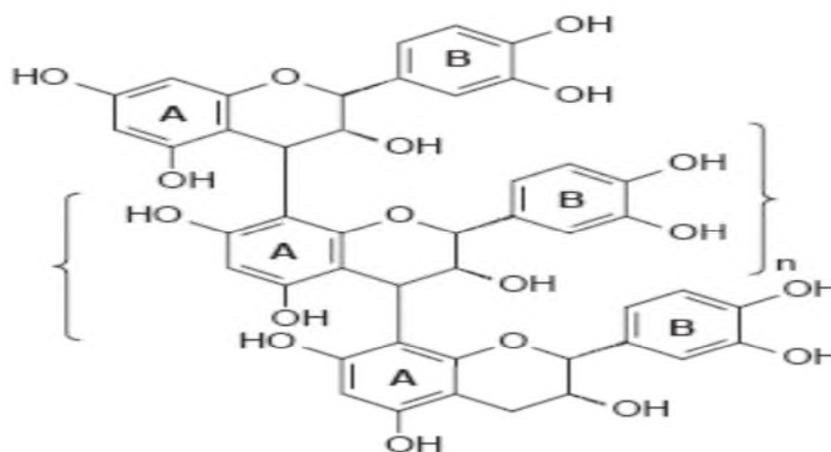


Figure 4: Exemple de structure de base des tannins condensés (**Li et al., 2004**).

#### ➤ Tannins hydrolysables

Les tannins hydrolysables ou appelés tannins pyrogalliques, sont des polyesters de glucides et d'acide-phénols. Ils sont facilement scindés par les acides ou les enzymes en ose et en un acide-phénol. Selon la nature de ces tannins, on distingue: les tannins galliques dans le cas de l'acide gallique et les tannins ellagiques dans le cas de l'acide ellagique (**Luthar, 1992 ; Bruneton, 1999**).

### I.2.2.2.3 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6 000 composés naturels. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (Ghedira, 2005). Leur structure de base est le noyau flavane qui est composé de 15 atomes de carbone arrangés dans trois noyaux (C6-C3-C6), à savoir A, B, et C (Figure 5) (Pietta, 2000).

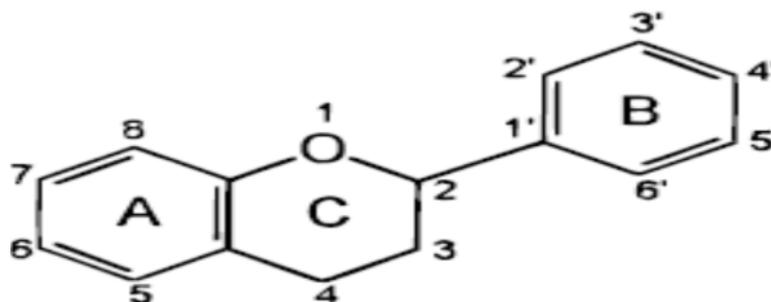


Figure 5 : Structure de base des flavonoïdes avec la numérotation classique (Pietta, 2000).

### I.2.2.2.4 Les anthocyanes

Les anthocyanines (du grec anthos = fleur et kianos = bleu) sont les colorants les plus importants des plantes vasculaires (Kong et al., 2003 ; Castañeda-Ovando et al., 2009). Ces composés sont responsables des couleurs orange, rose, rouge, violet et bleu des fleurs et fruits de certaines plantes (Derbel et Ghedira, 2005 ; Yousfi et al., 2006).

Cette coloration dépend de nombreux paramètres tels que le nombre et la structure des substituants des cycles benzéniques, l'état d'acylation, ainsi que les conditions du milieu tel que : pH, SO<sub>2</sub>, température et lumière (Kahn, 2006).

Les anthocyanes sont constituées de deux cycles phénoliques A et B reliés par un hétérocycle flavylium (Figure 6) (Kong, 2003).

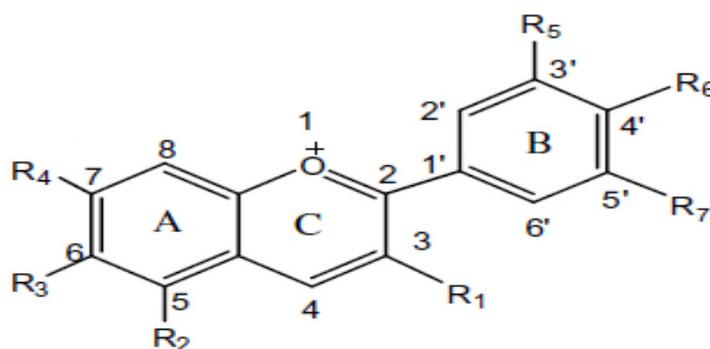


Figure 06 : Structure générale des anthocyanes (Castañeda-Ovando et al., 2009)

Les principales différences entre les anthocyanes sont le nombre de groupes hydroxylés, la nature et le nombre de sucres collés à leur structure, les carboxylates aliphatiques ou aromatiques collées au sucre dans la molécule et la position de ces attachements (Tableau I) (Kahn, 2006 ; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

**Tableau I :** Les principaux anthocyanidines courantes (Rivas-Gonzalo, 2003).

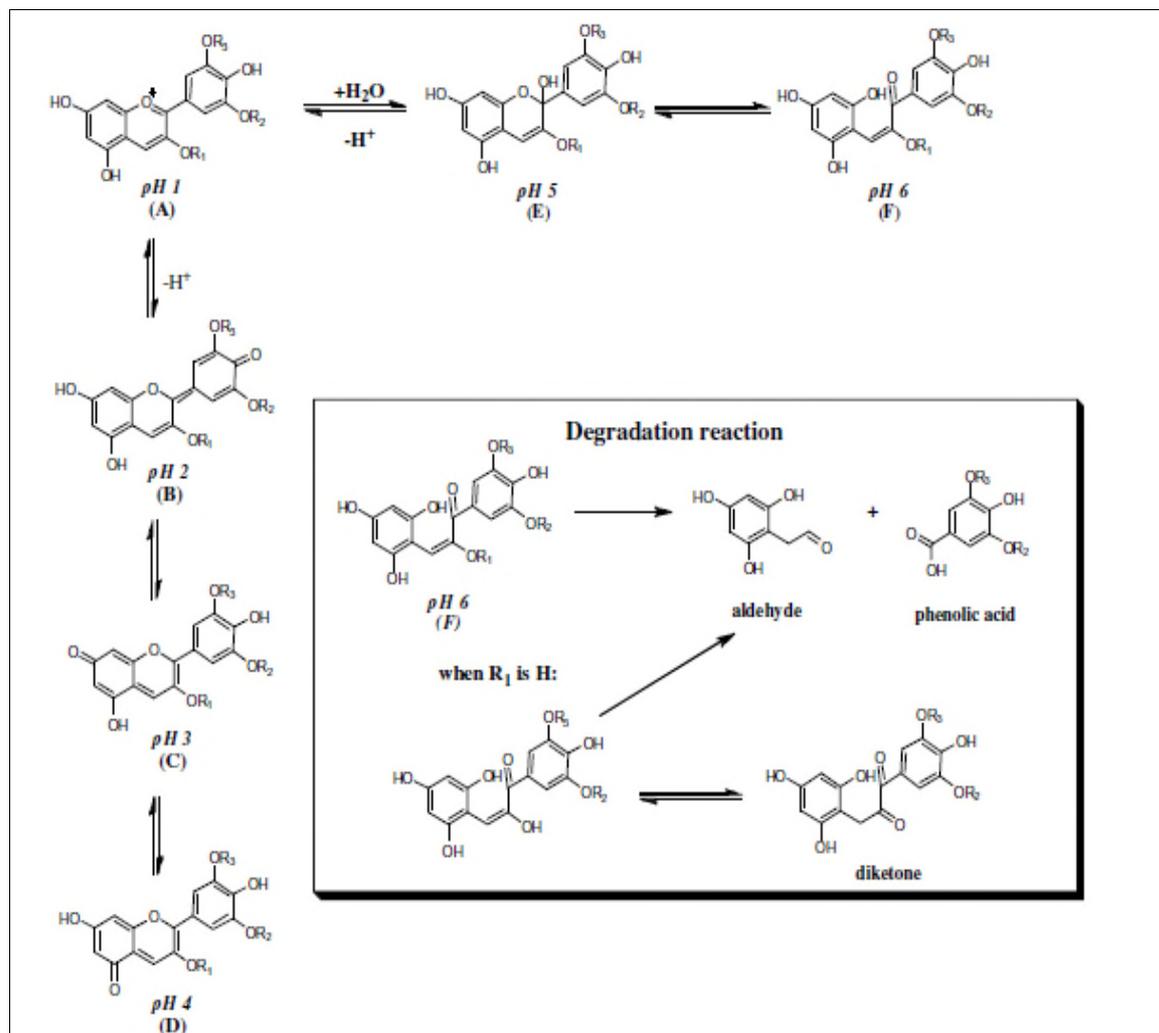
Anthocyanidines	Séquence de substitution	couleur à PH<1
<b>Anthocyanidines courantes</b>		
Pelargonidine( Pg )	3,5,7,4'-OH	Orange
Cyanidine (Cy)	3,5,7,3',4'-OH	Orange-rouge
Delphinidine ( Dp )	3,5,7,3',4',5'-OH	Bleu-rouge
Peonidine ( Pn )	3,5,7, ,4',5'-OH; 3'-OMe	Rouge
Petunidine (Pt )	3,5,7,4'-OH; 3'-OMe	Violet
Malvidine ( Mv)	3,5,7,4'-OH; 3',5'-OMe	Violet

➤ **Influence du PH sur les anthocyanes**

Les anthocyanines sont présents dans différentes formes chimiques qui dépendent du pH de la solution. A pH 1, le cation de flavylum est l'espèce prédominante qui contribue à des couleurs pourpres et rouges (figure 7A) (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

Aux valeurs du pH entre 2 et 4, les espèces bleues quinoidales sont les prédominantes (figure 7B-D). Aux valeurs du pH entre 5 et 6 seulement deux espèces sans couleur peuvent être observées (figure 7-E). A pH supérieur à 7, les anthocyanines sont dégradées selon leurs groupes de substituants (figure 7 réaction de dégradation) (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

Quatre formes structurelles des anthocyanines coexistent, aux valeurs du pH entre 4 et 6 : le cation de flavylum, une base quinoidale anhydre, une base sans couleur de carbinol et la chalcone jaune pâle. L'équilibre entre les bases et le carbinol quinoidal se produit par l'intermédiaire du cation de flavylum comme le montre la figure 7(structures de D, A et E), (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).



**Figure 7 :** Formes chimiques d'anthocyanines selon le pH et la réaction de dégradation des anthocyanines (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

### I. 3 Méthodes de quantification des antioxydants.

Il n'existe pas de méthodes permettant de doser de manière satisfaisante et simultanée l'ensemble des composés bioactives présent dans un extrait végétal non purifié. Néanmoins, une estimation rapide de leurs teneurs peut être obtenue par différentes méthodes. colorimétrique, chromatographique, enzymatiques...ect (**Macheix et al., 2005**)

#### I.3.1 Dosage des composés phénolique

##### I.3.1.1 Dosage des phénols totaux

###### A/ Méthode de Folin Ciocalteu

La procédure de dosage des phénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu est la technique la plus utilisée dont il existe une multitude de modifications qui diffèrent d'un auteur à un autre (différence dans les quantités des réactifs utilisées, la température et la durée d'incubation), néanmoins le principe de base est le même (**Naczka et Shahidi, 2004**).

Le dosage des polyphénols est basé sur l'utilisation du réactif de Folin Ciocalteu qui est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) (**Naczka et Shahidi, 2004**). Il est réduit, lors de l'oxydation des composés phénoliques, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène dans le milieu alcalin. Le complexe formé absorbe entre 725 et 750 nm. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Boizot et Charpentier, 2006**).

###### B/ Méthode du bleu prussien

Cette méthode a été décrite par Price and Butler(1977) *in* Hagermen (2002) puis modifiée plus tard par Graham (1992) *in* Hagerman (2002). Elle consiste à l'addition du sulfate d'ammonium ferrique [ $FeNH_4(SO_4)$ ], après vingt min, les ferricyanides [ $K_3Fe(CN)_6$ ] sont ajoutés puis, une couleur bleu prusse apparit dont l'intensité est en fonction du taux en composés phénolique présents, enfin une incubation à une température ambiante et la lecture d'absorbance à 720nm (**Hagerman, 2002**).

La méthode modifiée par Graham (1992) in Hagermen (2002) consiste à utiliser le chlorhydrique ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) avant le sulfate d'ammonium ferrique pour augmenter la solubilité des polyphénols présents dans l'échantillon (**Hagerman, 2002**).

Les composés monomériques, tels que la catéchine, l'acide gallique et l'acide tannique sont utilisés comme standards. (Pour les deux méthodes citées).

### **I.3.1.2 Dosage des flavonoïdes**

#### **A/ Méthode de l' $\text{AlCl}_3$ (Chlorure d'aluminium)**

Cette méthode consiste à l'ajout de l' $\text{AlCl}_3$  à l'extrait à analyser et de lire l'absorbance à 430 nm après 10 min d'incubation (**Zhishen et al., 1999 ; Naczka et Shahidi, 2004**).

Une modification de cette méthode a été proposée par **Zhishen et al.(1999)** et ceci par l'ajout de l' $\text{AlCl}_3$  et les nitrate de sodium respectivement et une lecture d'absorbance à 510 nm directement sans incubation (**Naczka et Shahidi, 2004**).

Le principe de cette méthode est basé sur la formation des complexes jaunâtres entre l' $\text{AlCl}_3$  et les flavonoïdes. Ces complexes ainsi formés présentent un maximum d'absorbance à 430nm ( **Naczka et Shahidi, 2004**). Tandis-que la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe à 510 nm. La quercétine et la rutine sont souvent utilisées comme standards (**Naczka et Shahidi, 2004**).

### **I.3.1.3 Dosage des anthocyanes**

#### **A/ Méthode avec le Bisulfure de Sodium**

Le principe de la méthode de dosage des anthocyanes est basé sur la décoloration des solutions d'anthocyanes en utilisant une solution de bisulfite de sodium. Le chercheur Jur (1967) a montré que ce phénomène était dû à l'existence d'une réaction entre le cation flavylum et l'hydrogénosulfite  $\text{HSO}_3$ . Cette réaction est équilibrée et conduit à la formation d'un produit d'addition incolore et plus ou moins stable selon le pigment. Cette méthode exclue l'interférence d'autres composés phénoliques sur ce dosage (**Bessas, 2008**)

#### **B/ Méthode différentielle du PH**

La teneur en anthocyanes totaux a été mesurée par la méthode du pH différentiel, décrit par Cheng et Breen (1991). L'absorbance de l'extrait a été mesurée à 510 nm et 700 nm dans les

tampons à pH 1,0 (l'acide hydrochlorique- chlorure de potassium, 0,2 M) et 4,5 (acétate de sodium -l'acide-acétate, 1 M). La Teneur en anthocyanes a été calculée en utilisant un coefficient d'extinction molaire de cyanidine-3-glucoside (**Pantelidis et al., 2007 ; Pas'ko et al., 2009 ; Fabani et al., 2013**).

Grace aux différentes propriétés physico-chimiques des anthocyanes, d'autres méthodes de quantification de ces composés s'inscrivent en plus de celles citées en haut, notamment la spectrofluométrie (**Rivas-Gonzalo, 2003**). La résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectrométrie de masse (MS) (**Nicoue Eugene, 2010**).

#### **I.3.1.4 Dosage des tannins**

##### **A/ Dosage des tannins totaux : méthode de la BSA (Sérum Albumine Bovine)**

Les teneurs en tannins totaux ont été estimées selon le protocole développé par Hagerman et Butler (1978). Le principe de cette méthode est fondé sur le pouvoir des tannins (hydrolysables et condensés) à faire précipiter les protéines, la BSA préparée dans un tampon d'un PH de 4,9 et ceci après l'ajout d'un détergent (SDS / TEA) et le  $FeCl_3$ . Elle peut être appliquée sur divers extraits végétaux (**Hagerman, 2000**).

La méthode est basée sur l'obtention d'un complexe coloré  $Fe^{++}$ -phénols qui peut être mesuré par spectrophotométrie à 510 nm. Les résultats ont été exprimés en mg équivalent d'acide tannique (**Hagermen et Butler, 1978 ; Amessis-Ouchemoukh et al., 2014**).

##### **I.3.1.4.1 Dosage des tannins hydrolysables**

###### **A/ Méthode avec l'iodate de potassium (ellagitannins et gallotannins)**

Diverses approches ont été employées pour l'analyse quantitative des tannins hydrolysables dans les extraits végétaux, la méthode la plus utilisée est basée sur la réaction entre l'iodate de potassium ( $KIO_3$ ) et les tannins hydrolysables. Cette réaction a été décrite pour la première fois par Haslam (1965). Plus tard utilisée par Bate-Smith (1978) pour un but analytique (**Naczka et Shahidi, 2004**).

Le principe de cette méthode est basé sur la réaction entre le méthyle gallate, formé après hydrolyse des tannins hydrolysables, avec l'iodate de potassium formant un complexe de couleur rouge en présence d'un acide fort dont l'absorbance est mesurée à 525 nm (**Naczka et Shahidi, 2004**). L'acide gallique est utilisé comme standard.

#### **B/ Méthode avec les carbonates de sodium ( ellagitannins)**

Cette méthode a été décrite par Wilson et Hagermen (1990) *in* Hagermen (2002) pour l'analyse quantitative des ellagitannins. Son principe est basé sur l'hydrolyse par l'acide nitrique des tannins hydrolysables présents dans un extrait préparé dans la pyridine en acide ellagique à 100°C pendant dix heures. L'addition de carbonate de sodium (NaONO<sub>2</sub>) qui réagit avec l'acide ellagique formera des complexes colorés dont l'absorbance est mesurée à 538 nm. L'acide ellagique est utilisé comme standard (**Hagermen, 2002**).

L'utilisation d'une grande quantité de la pyridine est l'inconvénient de cette méthode en raison de sa toxicité (**Naczka et Shahidi, 2004**). Il faut aussi respecter le temps d'incubations (05 min) puisque au-delà de 5 min la couleur change et peut fausser les résultats (**Hagermen, 2002**).

#### **C/ Méthode avec la rhodanine (gallotannins)**

C'est une méthode décrite par Inoue et Hagermen (1988) *in* Hagermen(2002), elle est spécifique aux gallotannins. Elle consiste à hydrolyser les tannins présents dans l'échantillon par l'acide sulfurique 4N puis les placer à 100°C pendant 26 heures. Enfin l'ajout de la rhodanine forme des complexes colorés avec l'acide gallique dont l'absorbance est mesurée à 520 nm. L'acide gallique est utilisé comme standard (**Moyo et al., 2010**).

### **I.3.1.4.2 Dosage des tannins condensés (proanthocyanidines)**

#### **A/ Méthode du butanol –HCL**

Le principe de cette méthode est fondé sur la capacité à former des complexes les ions ferriques du sulfate d'ammonium ferrique FeNH<sub>4</sub> (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ajoutés à l'échantillon à analyser, avec les anthocyanes obtenus après hydrolyse des proanthocyanidines par le butanol-HCL. L'absorbance est ensuite mesurée à 550 nm après une incubation à 50 min à 30°C. (**Hagermen, 2002**).

La catéchine est recommandée comme standard. La reproductibilité de cette méthode dépend de la concentration du HCL, la température et le temps d'incubation, la présence d'ions métalliques qui oxydent les anthocyanes et aussi le degré de polymérisation des proanthocyanidines (**Naczka et Shahidi, 2004**).

## **B/ Méthode de la vanilline-HCL**

Cette méthode est largement utilisée pour l'estimation des taux en tannins condensés dans les extraits végétaux. Elle est spécifique aux flavans-3-ol et les proanthocyanidines (**Naczka et Shahidi, 2004**). La vanilline qui est un aldéhyde aromatique, interagit spécifiquement avec les flavan3-ol et avec les unités terminales des proanthocyanidines (tannins condensés) et le complexe formé présente une coloration rouge dont l'absorbance est mesurée à 500 nm dans l'UV/ visible (**Hagermen, 2002**). Cette méthode est très recommandée pour le dosage des tannins condensés pour sa simplicité, sa sensibilité et sa spécificité (**Naczka et Shahidi, 2004**).

## **I.3.2 Dosage des vitamines**

### **I.3.2.1 Dosage de la vitamine C**

Un grand nombre de méthodes a été annoncé pour la détermination du taux d'acide ascorbique à savoir : titrimétrie, voltamétrie, potentiométrie, fluorométrie, spectrophotométrie (**Hossu et al., 2006**).

## **A/ Analyse enzymatique de l'acide Ascorbique**

Les méthodes enzymatiques emploient soit l'acide ascorbique oxydase ou peroxydase ; l'acide ascorbique Oxydase (EC. 1.10.3.3) est fortement spécifique pour oxyder l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique grâce à la réaction de ces derniers avec le fer ferrique et le réactif complexo-métrique, 2,4,6 tris (2-pyridyl) - S-triazine. L'absorbance est déterminée à 593 nm (**Washko et al., 1992**).

Ce système a été employé pour mesurer la quantité d'acide ascorbique dans les jus, les fruits et le plasma. L'avantage de ces analyses est que la déprotéinisation d'échantillon peut être inutile, mais un inconvénient est que l'acide déhydroascorbique doit être mesuré par une autre technique. La diminution d'absorbance à 510 nm dépend de la concentration en acide ascorbique dans l'échantillon (**Washko et al., 1992**).

**B/ Analyses fluorométriques de l'acide Ascorbique et de l'acide déhydroascorbique**

La détermination fluorométrique dépend des groupes cétone présents dans l'acide déhydroascorbique. Ce qui est alors condensé avec de l'o-phenylenediamine pour former un dérivé de quinoxaline qui est un fluorophore.

Quand un échantillon contenant l'acide ascorbique et l'acide déhydroascorbique est combiné avec de l'o-phénylènediamine, l'acide déhydroascorbique est épuisé par la réaction, Puisque l'équilibre entre l'acide ascorbique et l'acide déhydroascorbique est perturbé, plus l'acide déhydroascorbique pourrait former, ce qui pourrait alors réagir avec de l'o-phénylènediamine pour former plus de dérivé de quinoxaline (**Washko et al., 1992**).

**C/ Méthode Spectrophotométriques / colorimétriques de l'acide Ascorbique**

Les méthodes spectrophotométriques dans le domaine visible sont recommandées pour le dosage d'acide ascorbique des produits de multi-vitamine à cause de leur spécificité de certains d'entre eux. Szepesy (1966) recommande le dosage à 240-245 nm dans le médium neutre en présence du cyanure de potassium (**Hossu et al., 2006**).

La majorité des méthodes spectrophotométriques est fondée sur leurs propriétés de réduction et d'oxydation grâce à la présence de plusieurs atomes donateurs capables de former des complexes avec les métaux : le fer (III), le zinc(II), le manganèse(II), le cadmium(II) (**Hossu et al., 2006**).

**D/ Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) de l'acide Ascorbique**

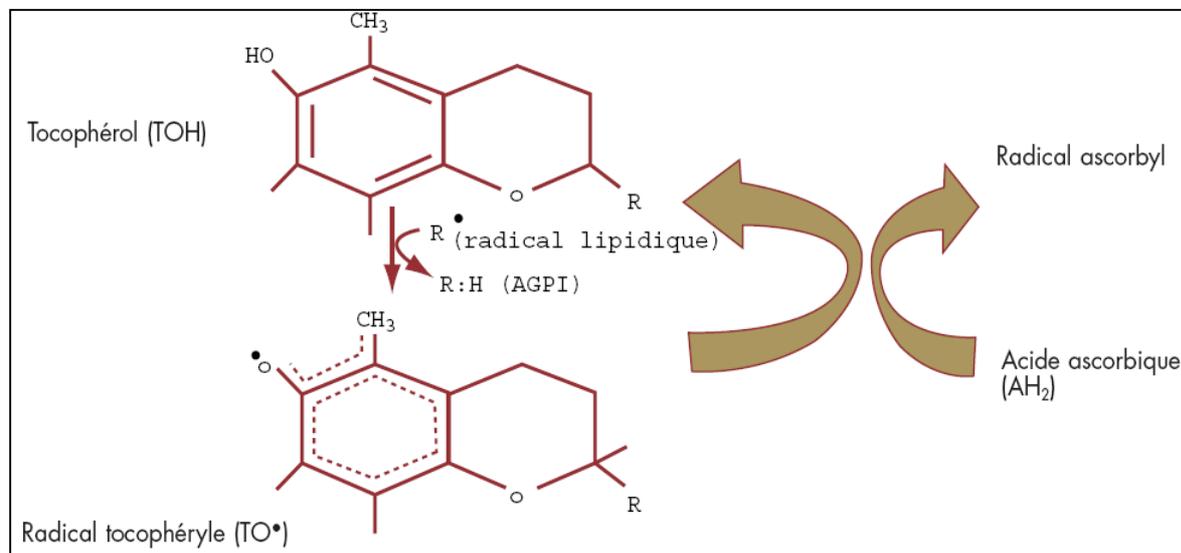
En raison des difficultés avec d'autres méthodes, des analyses de l'HPLC pour l'acide ascorbique et l'acide déhydroascorbique ont été développées. Dans l'HPLC les analytes sont séparées par chromatographie sur colonne et dosées en utilisant des détecteurs de post-column. La détection ultraviolets (UV) et électrochimique (EC) sont les deux techniques les plus appliquées mais l'HPLC par l'UV reste le système le plus simple pour mesurer l'acide ascorbique dans les échantillons biologiques. Celle-ci est possible en raison du spectre optique de l'absorbance de la vitamine (265-266 nm) (**Washko et al., 1992**).

## I.4 Intérêts des antioxydants

### I.4.1 La vitamine C

L'acide L-ascorbique (AA) est la forme biologique active principale de la vitamine C. Au sein de l'organisme, c'est un cofacteur enzymatique impliqué dans un certain nombre de réactions physiologiques. Elle est impliquée dans la synthèse du collagène et des globules rouges et joue un rôle de promoteur de l'absorption du fer (Spínola *et al.*, 2013).

Elle est le prototype des antioxydants hydrosolubles (Spínola *et al.*, 2013). L'effet antioxydant de cette vitamine a été démontré *in vitro*. Cette vitamine protège ainsi les biomembranes et les lipoprotéines en piégeant les radicaux dans la phase aqueuse avant qu'ils initient la peroxydation lipidique (Goudable et Alain, 1997 ; Chanforan, 2010). Cela s'effectue par le piégeage du radical hydroxyle ( $\text{OH}^\bullet$ ) et le radical peroxyde ( $\text{ROO}^\bullet$ ), ou en réagissant avec l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ), par oxydation de l'acide ascorbique, en acide déhydro-ascorbique, ou par réduire le radical tocophéryle (Figure 8) (Goudable et Alain, 1997 ; Gardé- albert *et al.*, 2003 ; Herna, 2006)



**Figure 08 :** Régénération de la vitamine E via l'action de la vitamine C (Pincemail *et al.*, 1998).

Par ailleurs, l'acide ascorbique intervient dans la stimulation des défenses de l'organisme, le métabolisme du cholestérol et des sels biliaires, dans la synthèse des prostaglandine, dans diverses réactions de détoxication, ainsi qu'elle favorise l'absorption du Fe alimentaire (Berger, 1995 ; Rietjens *et al.*, 2002 ; Brémaud, 2006).

#### I.4.2 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont connus par leurs propriétés pharmacologiques notamment, antivirales, antimicrobiennes et anticancéreuse (**Narayana et al., 2001 ; Seyoum et al., 2006**), antiallergiques, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, anti-tumorales et hépato-protectrices (**Middleton et al., 2000**).

Les anthocyanines ont de nombreuses propriétés pharmacologiques incluant l'effet sur la perméabilité et la fragilité des vaisseaux capillaires, l'agrégation des plaquettes de sang et l'effet sur le collagène. Les anthocyanes affectent l'adhérence des plaquettes directement et indirectement à travers des effets sur le métabolisme de la prostaglandine (**Nicoué Eugène, 2010**).

Une autre propriété significative des anthocyanes est leur activité antioxydante, qui joue un rôle essentiel dans la prévention des maladies neuronales et cardio-vasculaires (**Lila, 2004**), du cancer et du diabète (**Castañeda-Ovando et al., 2009**). Cette dernière est expliquée en partie par le piégeage des radicaux libres, la diminution de la peroxydation des lipides et la chélation des métaux (**Kong et al., 2003 ; Nicoué Eugène, 2010**).

**Derbel et Ghedira, 2005** ont rapporté l'effet de ces composés sur l'inhibition de la production du monoxyde d'azote (NO<sup>•</sup>) à partir des polynucléaires neutrophiles au cours de la phase précoce de l'inflammation. Et sur l'effet inhibiteur sur les enzymes protéolytiques de dégradation du collagène, ce qui explique leurs propriétés vasoprotectrices et anti-oedémateuses et anti-inflammatoires (**Derbel et Ghedira, 2005**).

Par ailleurs. Un effet protecteur des altérations oxydatives à été noté pour le cyanidol qui forme un complexe de pigmentation avec la molécule d'ADN (**Derbel et Ghedira, 2005**).

Les travaux de Fimognari et al. (2004) ont également indiqué que la cyanidine 3-O-glucopyranoside (Cy-g) possède une activité anti-génotoxique *in vitro* (**Fimognari et al., 2004**).

#### I.5 Relation structure chimique et activité antioxydante des antioxydants.

Dans certaines conditions physiologiques s'applique la théorie « tout antioxydant peut devenir pro-oxydant », comme en présence de fer, l'acide ascorbique a un effet pro-oxydant, L'alpha tocophérol à fortes concentrations et les flavonoïdes comme la quercétine et la myricétine peuvent également présenter des propriétés pro-oxydantes (**Heim et al., 2002; Rietjens et al., 2002**)

A cet effet, des besoins d'analyses qualitatives et quantitatives de ces antioxydants dans des matériaux végétaux les plus divers n'ont fait que grandir, émanant chaque jour d'un plus grand nombre de biologistes aux intérêts très multiples.

De nombreuses études ont établi la relation entre la quantité, la structure chimique des métabolites secondaires et leur pouvoir antioxydant. Cependant, aucune conclusion n'a été prononcée sur la relation quantité /activité antioxydante.

Les résultats obtenus ont montré clairement que l'activité des composés phénoliques dépend essentiellement de leur structure, l'hydroxylation, l'O-méthylation et glycosylation, la fonction 4-oxo et la double liaison entre C2 et C3 et enfin la polymérisation (**Heim et al., 2002 ; Es-Safi et al., 2007**).

#### **A/ Les groupements hydroxyles**

L'activité antioxydante des polyphénols et leurs métabolites *in vitro* dépend de l'arrangement de leurs groupements fonctionnels. En effet, le piégeage des radicaux libres est principalement attribué à la haute réactivité des substituants hydroxyles (**Tapas et al., 2008**).

Il a été démontré que les groupements hydroxyles des flavonoïdes aux positions 3,5,7 génèrent une grande activité scavenging des radicaux libres (**Tapas et al., 2008**). Quand à la présence de groupement OH dans la position 5 et 7 du cycle A, ainsi qu'aux positions 3' et 4' du cycle B comme le catéchol et la position 3' dans le cycle C s'embent essentiels à l'inhibition de la peroxydation lipidique (**Cook et Sammam, 1996**).

Par ailleurs, Tsuda et al., (1998, 1999) ont rapporté que la capacité antioxydante est influencée par le nombre d'hydroxyles sur le cycle B, de sorte que la delphinidine et la cyanidine sont les plus efficaces des anthocyanes connues **Tsuda et al., (1998, 1999)**.

#### **B/ La double liaison C2 et C3 et la fonction 4-oxo**

L'une des différences de structure entre les flavonoïdes est la présence ou l'absence de la double liaison entre C2 et C3 et la fonction 4-oxo (**Heim et al., 2002 ; Es-Safi et al., 2007**). Les flavones qui possèdent une double liaison montrent une grande activité scavenger de radicaux libres par comparaison à celle des flavonones (**Rice-Evans, 1996 ; Heim et al., 2002**).

Aussi, Van Acker et ses collaborateurs ont rapporté qu'une partie du catéchol dont il existe une combinaison entre la double liaison C2-C3 et la fonction 4-oxo semble une structure essentielle pour une grande activité antioxydante (**Es-Safi et al., 2007**).

Cependant, d'autres études montrent que cela n'est pas appliqué pour les flavonols qui présentent une augmentation significative de l'effet antioxydant suite à la présence de la double liaison C2-C3 en combinaison avec la présence du groupement OH en position 3 (**Es-Safi et al., 2007**).

#### **C/ L'ométhylation**

La suppression de l'activité antioxydant, par de l'O-méthylation pourrait refléter les effets stérique qui perturbent la planarité. Par ailleurs, l'obstruction stérique des groupements 3'-4'-catéchol par la 4'-O-méthylation compromet significativement sa capacité antioxydante (**Heim et al., 2002**).

#### **D/ La glycosylation**

Les flavonoïdes aglycones ont un grand potentiel antioxydant comparé à leurs correspondants glycosylés (**Heim et al., 2002**). En effet, la comparaison de la naringénine avec naringosides montre que la glycosylation du groupe 7-OH diminue largement l'activité. Des effets similaires sont observés quand l'hespéritine est comparée avec son dérivé glycosylé (l'hespéridine) (**Rice-Evans, 1996 ; Marfak, 2003**).

#### **E/ Le degré de polymérisation**

Les tannins présentent d'une manière significative une plus grande propriété scavenging du radical superoxyde que les tannins trimères et tétramères. Ainsi l'efficacité des proanthocyanidines vis-à-vis de beaucoup d'espèces radicalaires est attribuée à leur grand degré de polymérisation (**Heim et al., 2002**).

L'objectif de notre travail est d'évaluer l'activité antioxydante des extraits des graines et feuilles de *Pistacia lentiscus* ainsi les feuilles de *Clematis flammula* par les tests de DPPH, ABTS<sup>+</sup>, blanchissement du  $\beta$ -carotène couplé à la peroxydation de l'acide linoléique et le pouvoir réducteur par la méthode FRAP, après avoir déterminé leurs teneurs en vitamines C, en proanthocyanidines, en anthocyanes et flavonols.

## II. Matériels et méthodes

### II.1. Matériel végétal

#### II.1.1 présentation de *Pistacia lentiscus*

##### II.1.1.1 Description botanique et répartition géographique

*Pistacia lentiscus* est un arbuste ou un arbre ligneux qui appartient à la famille des Anacardiaceae. Elle peut atteindre jusqu'à 3 ou 4 m. C'est une espèce dioïque (fleurs males et femelles), toujours verte sclérophylle, avec une forte odeur de résine. Les feuilles sont pennées persistantes et de petite taille (4-5 mm diamètre) (Zohary, 1952).

Les fruits femelles ont des ovaires uni et tri-carpelles et les fruits males ont 8 à 10 étamines (Verdu et Garcia-Fayos, 1998), graines drupes en fin d'été et en automne. La couleur des fruits est fortement associée à la viabilité des semences: fruits noirs contiennent généralement des graines viables alors que les rouges contiennent des graines non viables (avorté).

Le pistachier lentisque est très commun dans le bassin méditerranéen, il se trouve à l'état sauvage, dans les maquis et les garrigues dans tout type de sols, bien qu'il préfère les terrains siliceux. En Algérie, le lentisque se trouve sur le long du tell et dans les zones forestières (More et White, 2005).

##### II.1.1.2 Classification taxonomique

La classification de *Pistacia lentiscus* est établie par Ansari et al. (2012) :

**Tableau II** : Classification de *Pistacia lentiscus*

<b>Règne</b>	<i>Plantae</i>
<b>Division</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Ordre</b>	<i>Sapindales</i>
<b>Famille</b>	<i>Anacardiaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Pistacia</i>
<b>Espèce</b>	<i>Pistacia lentiscus</i> L.

➤ **Nom vernaculaire**

**Anglais :** Chios mastic tree.

**Allemand :** Mastixbaum.

**Français :** Arbre au mastic, Lentisque.

**Espagnol :** Lentisco.

**Arabe :** Derw, darw

**Berber:** Tidekt, Tidekst (Torkelson, 1996; Feidemann, 2005).



(a)



(b)

**Figure 9:** Photographie de (a) feuilles, (b) fruits de *Pistacia lentiscus*

### II.1.1.3 Utilisations

*Pistacia lentiscus* est connue pour ses propriétés médicinales depuis l'antiquité (Palevitch et Yaniv, 2000). Les feuilles possèdent des propriétés astringentes, diurétiques, analgésiques et antipyrétiques (Bellakhdar, 1978, 1997; El Ouafi, 1997). Les feuilles et l'écorce sont employées en décoction ou en poudre, dans le traitement des maux du ventre, de l'intestin, des diarrhées et de diabète (Bellakhdar, 1978, 1997; El Ouafi, 1997; Ouelmouhoub, 2005).

### II.1.2 Présentation de *Clematis flammula*

#### II.1.2.1 Description botanique

*Clematis flammula* (Clematite flammette) est une plante ligneuse qui peut atteindre deux à cinq mètres de longueur. C'est une liane qui se développe en s'accrochant par les pétioles de ses feuilles. Ces derniers sont bipennés, ovales à lancéolés, les fleurs sont de couleurs blanches agréablement odorantes comportant généralement quatre à cinq sépales pétaloïdes, les fruits étant aplatis et orangés (Bernard, 1997).

### II.1.2.2 Classification

**Tableau III** : classification de *Clematis flammula*

Règne	Plantea-végétal
<i>Division</i>	Magnoliophyta-
<i>Classe</i>	Magnoliopsida-dicotylédones
<i>Ordre</i>	Renunculales
<i>Famille</i>	Renonculaceae
<i>Genre</i>	Clematis
<i>Espèce</i>	<i>Clematis flammula</i>

➤ **Nom vernaculaire**

**Arabes** : Sebneq, Nard barda, Yasmine barri.

**Berbères** : Azenzou,Zenzoou

**Noms commun** : Clématite.



**Figure 10:** Photographie de *Clematis flammula* (originale)

### II.1.2.3 Utilisations

*Clematis flammula* appelée Clématite odorante, flammette (**Maarc et al., 2008**) est utilisée pour le traitement des rhumatismes articulaires, des blessures superficielles et les brûlures, mais lorsqu'elle est utilisée en dose excessives ou pendant une longue durée, elle provoque des brûlures c'est pour cela qu'elle est nommée « Clématite brûlante » (**Kosotova et al.,2006**).

## II.2 Méthodes

### II.2.1 Préparation des extraits

#### II.2.1.1 Récolte des plantes

La récolte des deux plantes *Clematis flammula* et *Pistacia lentiscus* a été effectuée dans la région de Sidi Ayad, de la commune de Sidi Aich, wilaya de Bejaïa (Figure 11), durant le mois de mai et Juillet 2013 respectivement, pour les feuilles, en décembre de la même année pour les graines de *P. lentiscus*.



Figure 11: Carte de la wilaya de Bejaia

#### II.2.1.2 Séchage, broyage, tamisage

Les différentes parties des plantes *Clematis flammula* et *Pistacia lentiscus*, ont été séchées à une température ambiante dans un endroit ombragé et aéré, elles ont été ensuite broyées à l'aide d'un broyeur électrique et tamisées jusqu'à l'obtention d'une poudre fine de diamètre < 63µm pour les feuilles et une pâte pour les fruits de *Pistacia lentiscus*.

#### II.2.1.3 Extraction

Dans cette étude une extraction sélective à plusieurs solvants a été entreprise selon le protocole de **Chiang et al. (1994)**, avec quelques modifications *in* **Atmani et al. (2009)**

Les broyats obtenus des feuilles des deux plantes étudiées (*Clématite*, *lentisque*), ainsi que celui des graines de la *Pistacia* ont été macérées dans l'éthanol à un rapport (1 :4 p/v)

pendant 24heurs. Après décantation, les surnageants ont été versés dans des cristallisoirs sous la hotte afin de subir un séchage. Après l'évaporation totale, la pesée de l'extrait a été prise après stabilisation du poids sec. Les étapes suivantes sont résumées dans la figure 12.

Le pourcentage d'extraction de chaque étape est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = [(P_1) - (P_0) / E] 100$$

**P<sub>1</sub>** : Poids d'extrait après évaporation (g).

**P<sub>0</sub>** : Poids vide du cristalliseur ou boite de pétri (g).

**E** : Poids de la poudre ou de l'extrait sec de la phase précédente (g).

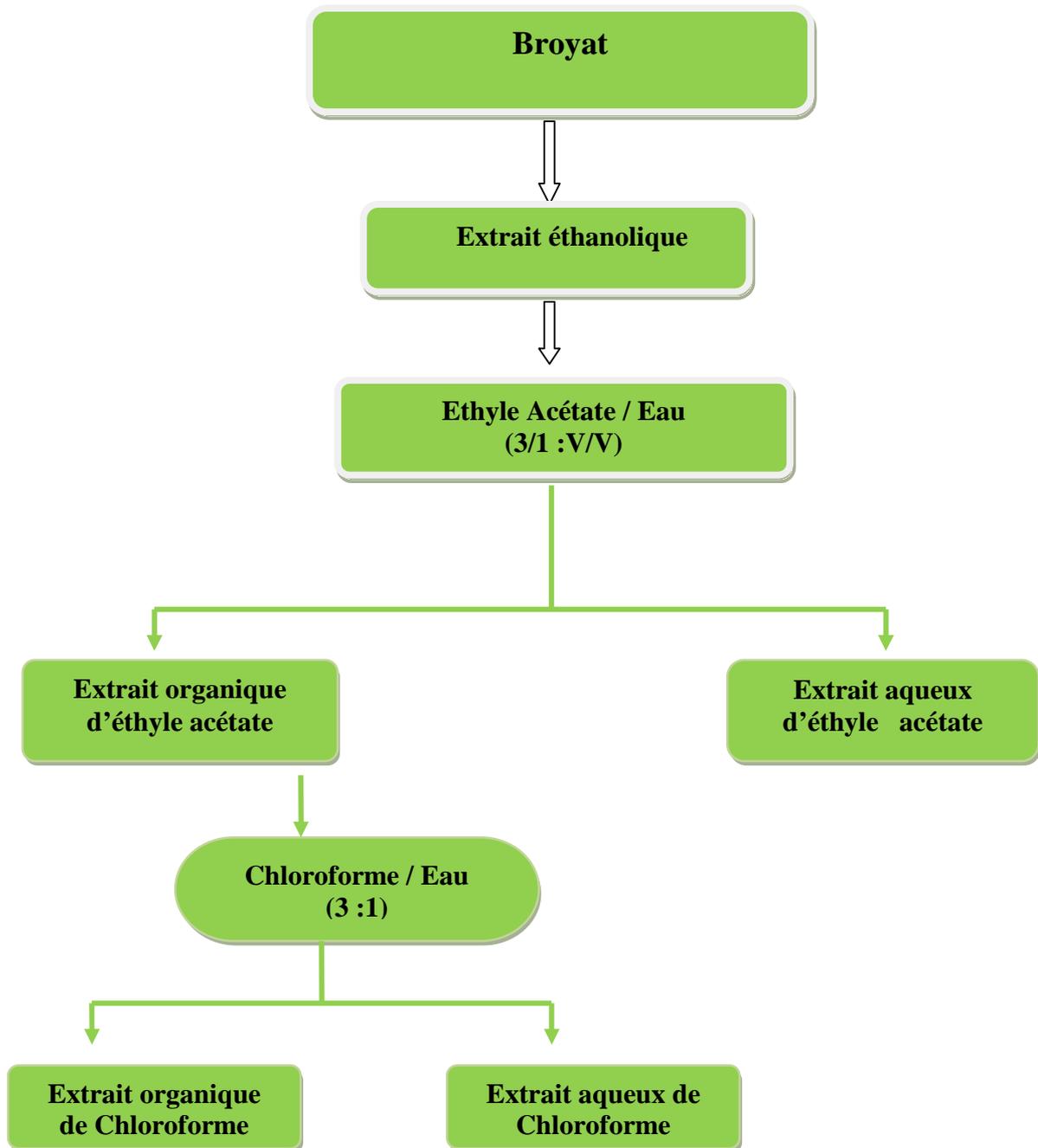


Figure 12: Protocole d'extraction des composés phénoliques (Chiang et al., 1994).

## II.2.2 Dosage des antioxydants

### II.2.2.1 Dosage de l'acide ascorbique (la vitamine C) :

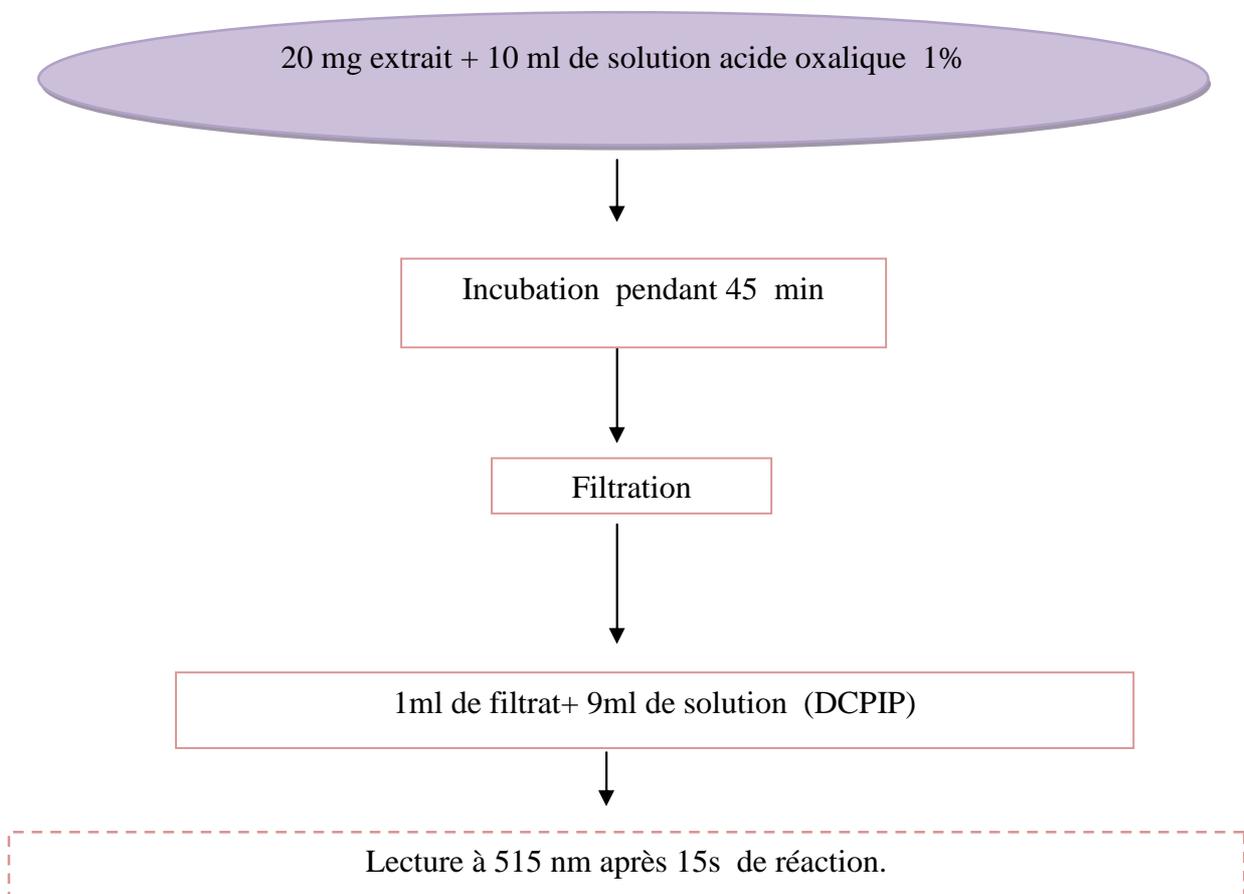
#### A/ Principe

L'estimation de la teneur en acide ascorbique est réalisée selon la méthode décrite par Klein et Perry(1982) rapportée par Mau et al.(2005) avec quelques modifications.

Ce dosage est basé sur le principe d'oxydoréduction. Le dichlorophénol-indophenol (DCPIP) permet d'oxyder la vitamine C en milieu acide. Cette solution, de couleur bleue à  $\text{PH} > 7$ , devient rose à  $\text{PH} < 7$  après réduction de cette molécule. Ainsi le virage au rose de la solution à titrer traduit la présence de vitamine C. La quantité de 2,6-DCPIP utilisée permet de déterminer la quantité de la vitamine C dans l'échantillon (Aké et al., 2006).

Deux protocoles ont été proposés pour le dosage de l'acide ascorbique, l'un pour les extraits suivant le protocole de Mau et al. (2005) ; et l'autre pour les poudres suivant le protocole de Singh et al. (2010).

### B/ Mode opératoire 01:

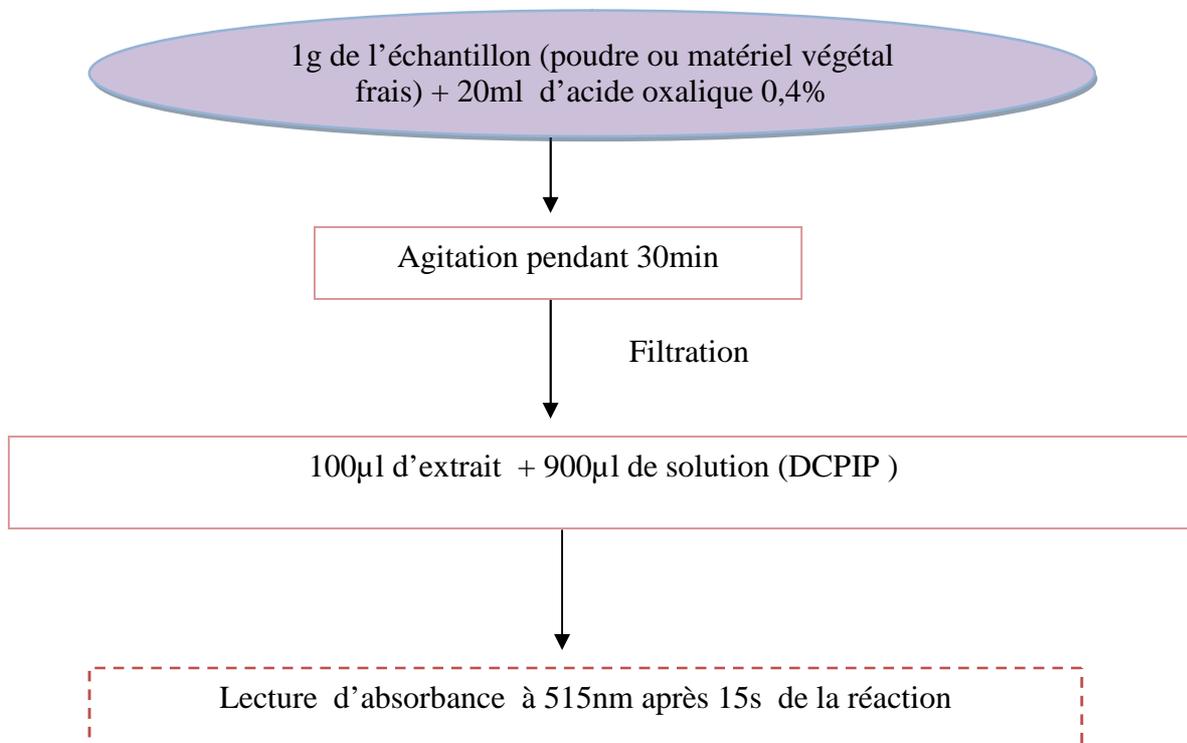


**Figure 13 :** Protocole de dosage de l'acide ascorbique (Mau et al., 2005)

La concentration en acide ascorbique est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la vitamine C et sont exprimées en milligramme d'équivalent Acide ascorbique par 100 gramme d'extrait (mg EAA/100g extrait) (annexe 1). Chaque mesure a été réalisée en 3 répliques.

**C/ Mode opératoire 02 :**

La teneur en acide ascorbique des échantillons de plante a été estimée par la méthode de **Singh et al. (2010)**.



**Figure 14:** Protocole de dosage de la vitamine C (**Singh et al., 2010**).

Le contenu d'acide ascorbique a été rapporté par mg EAA/100g matière sèche. Chaque mesure a été réalisée en trois répliques.

**II.2.2.2 Dosage des anthocyanes :**

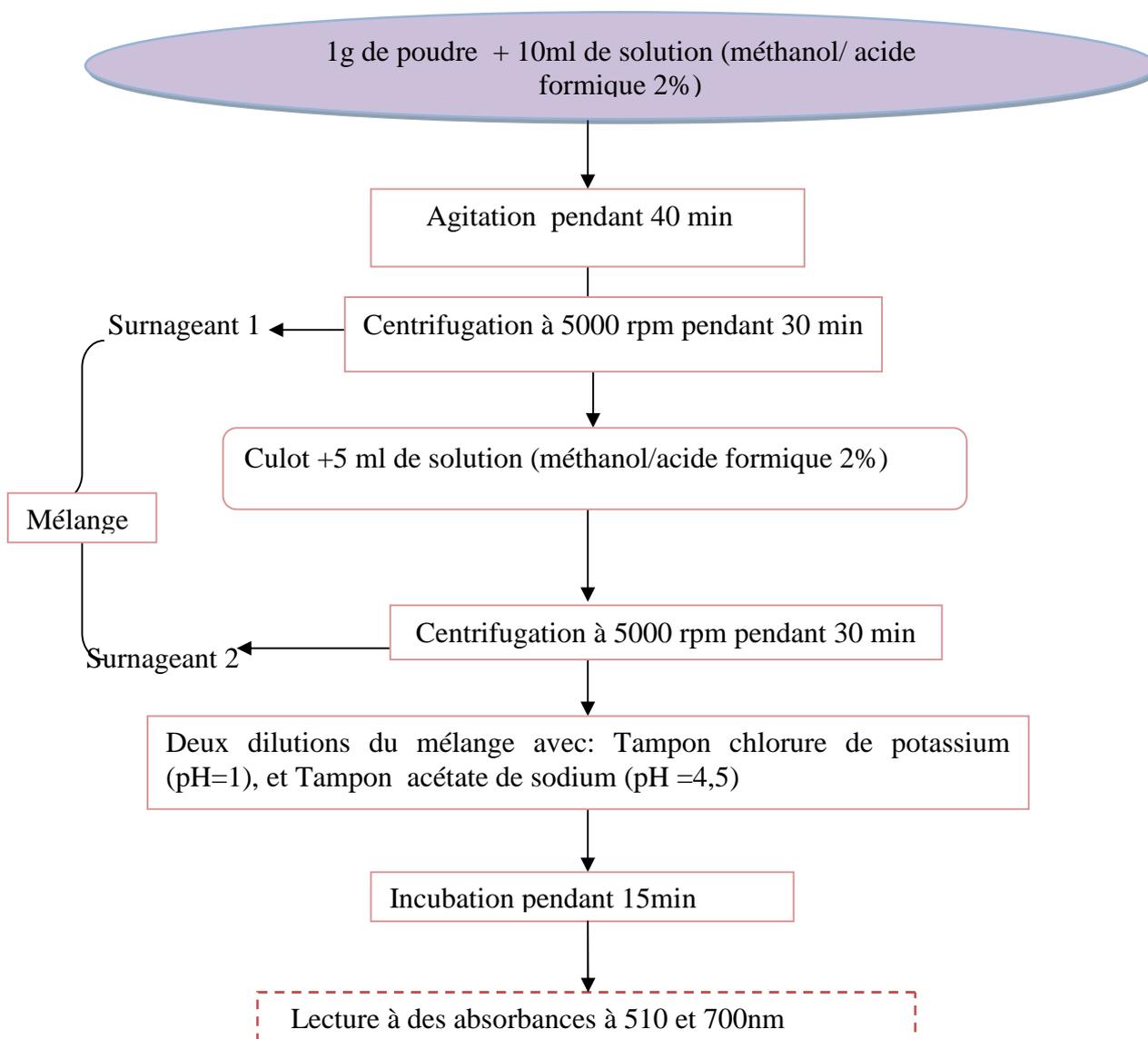
Deux méthodes ont été proposées pour le dosage des anthocyanes, par la méthode du pH différentielle suivant le protocole de **Jakobek et al. (2007)**; l'autre méthode suivant le protocole de **Ganjewala et al. (2008)** qui détermine la teneur en anthocyanines et les flavonols glycosides.

## II.2.2.2.1 Méthode du PH différentiel

## A/ Principe

La teneur des anthocyanes a été mesurée par la méthode du PH différentiel rapportée par **Jakobek et al.(2007)** et **Wang et al.(2008)**, avec quelques modifications. Cette méthode utilise les transformations structurales réversibles que subissent les anthocyanes en fonction du pH (à pH1 et pH 4,5 c'est la forme flavylium et la forme incolore hémiacétale qui prédominent, respectivement).

## B/ Mode opératoire 1 :



**Figure 15:** Protocole de dosage des anthocyanes (**Jakobek et al., 2007**).

La teneur en anthocyanines est exprimée en mg équivalent de cyanidine -3-glucoside par 100g de matière sèche en utilisant un coefficient d'extinction molaire( $\epsilon$ ) de cyanidine-3-glucoside (Jakobek et al., 2007) ; (Annexe 1), selon la formule suivante :

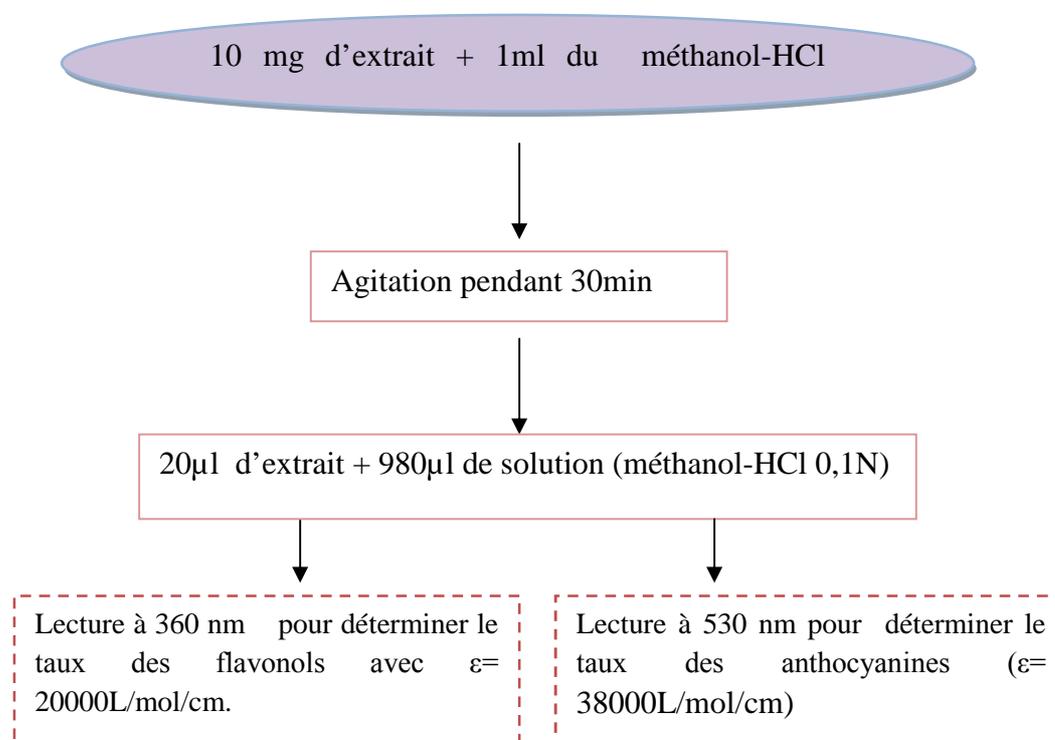
$$C \text{ (mg/l)} = A \cdot MM \cdot FD \cdot 1000 / \epsilon \cdot L \quad \text{où } A = (A_{510} - A_{700})_{pH1} - (A_{510} - A_{700})_{pH4.5}$$

MM :(poids moléculaire)= 449,2g/mole de cyanidine-3-glucoside ;  $\epsilon$  (coefficient d'extinction molaire)=26900L mole/cm ; FD : Facteur de dilution ; L (longueur de la cuve)=1cm.

#### II.2.2.2 Détermination des teneurs en anthocyanines et flavonols glycosides

Le dosage des anthocyanines et flavonols glycosides a été déterminé selon le procédé décrit par Ganjewala et al. (2008) avec quelques modifications. Les résultats sont déterminés en équivalent mg de quercitine 3-glucoside/100g Matière Sèche en utilisant le coefficient d'extinction de 38000L/mol/cm pour les anthocyanines et celui de flavonols (20000L/mol/cm), pour le taux des flavonols glycosides ( Figure16).

##### A/ Mode opératoire



**Figure 16:** Protocole de détermination des teneurs en flavonols glycosides et anthocyanes (Ganjewala et al., 2008).

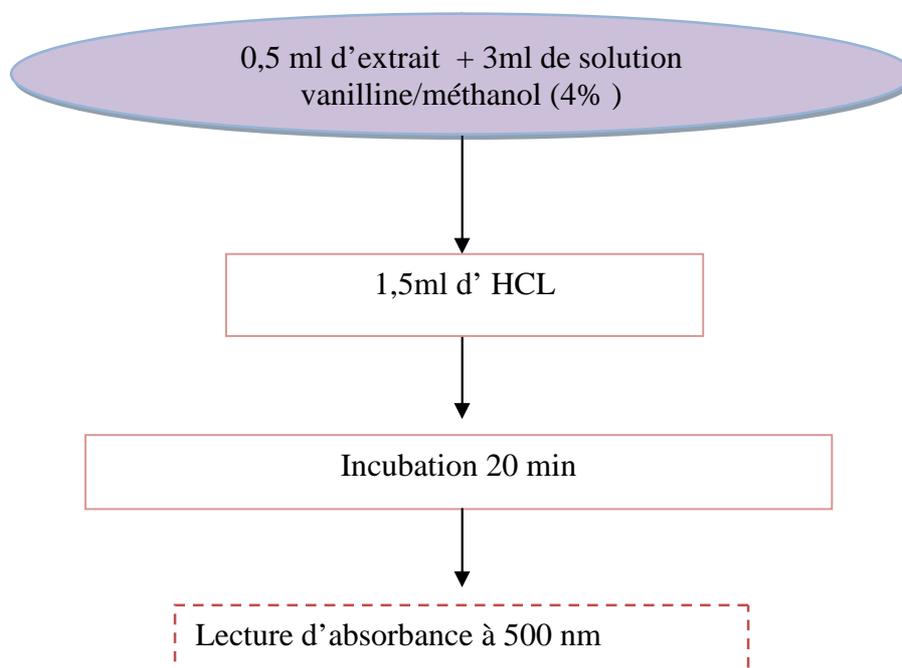
### II.2.2.3 Dosage des proanthocyanidines

Le contenu en proanthocyanidines des extraits de deux plantes étudiées a été déterminé par la méthode de la vanilline-HCL décrite par (Melo et al. 2006) (figure 17).

#### A/ Principe

Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré mesuré à 500 nm. La réactivité de la vanilline avec les tanins n'implique que la première unité du polymère (Ba et al., 2010).

#### B/ Mode opératoire :



**Figure 17:** Protocole de dosage des proanthocyanidines avec la vanilline- HCL (Melo et al., 2006).

Ainsi, les taux en proanthocyanidines des extraits sont exprimés en milligramme d'équivalent catéchine par rapport à un gramme d'extrait sec (mg EC/g d'extrait) à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que les extraits (annexe 1). Chaque mesure a été réalisée en 3 répliques.

### II.2.3 Détermination des activités antioxydants

Les activités antioxydant des extraits de *Clematis flammula* et de *Pistacia lentiscus* ont été déterminées en utilisant plusieurs méthodes :

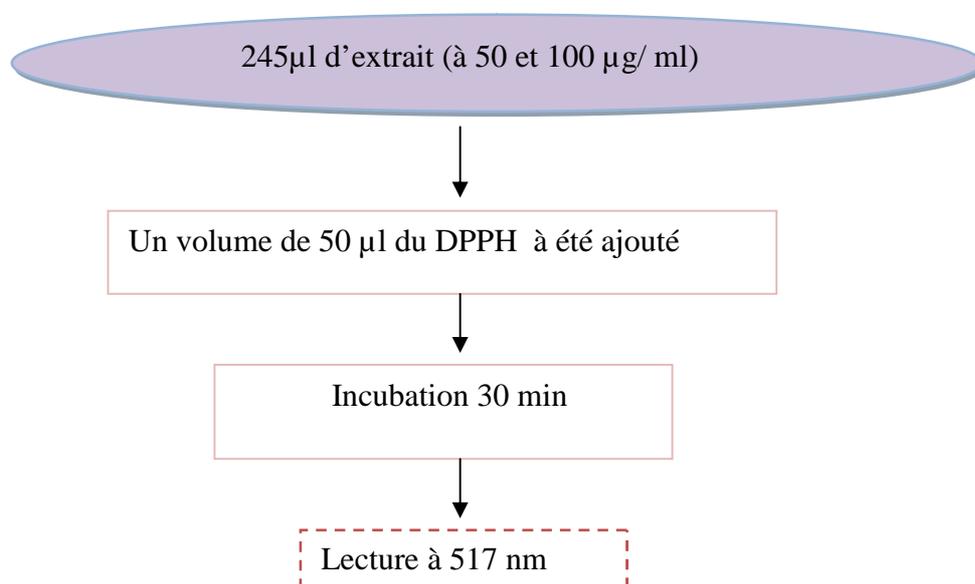
#### II.2.3.1 Activité scavenger du radical DPPH

##### A/ Principe

Le DPPH (2,2-diphenyle-1-picrylhydrazyl) est un radical libre, stable ou accepteur d'hydrogène de couleur violet intense (Cavar *et al.*, 2009). Ce radical perd sa coloration native quand il se lie avec des substances antioxydantes. La forme réduite du DPPH confère à la solution une couleur jaune (Gadow *et al.*, 1997). Le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration découle, de la nature, de la concentration et de la puissance des principes actifs présents (Thaipong *et al.*, 2006 ; Moyo *et al.* 2010 ; Bougandoura & Bendimerad, 2012 ).

##### B/ Mode opératoire

L'activité scavenger du radical DPPH est déterminée selon le protocole de Maisuthisakul *et al.* (2007).



**Figure 18:** Protocole d'évaluation de l'activité scavenger du radical DPPH (Maisuthisakul *et al.*, 2007) .

Chaque test est fait en trois répliques. Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH est calculé comme suit :

$$\% \text{ scavenging de DPPH} = (A_t - (A_E - A_B)) * 100$$

$A_t$  = Absorbance du témoin.

$A_E$  = Absorbance de l'extrait.

$A_B$  = Absorbance du blanc.

### II.2.3.2 Activité scavenger du radical ABTS<sup>•+</sup>

#### A/ Principe

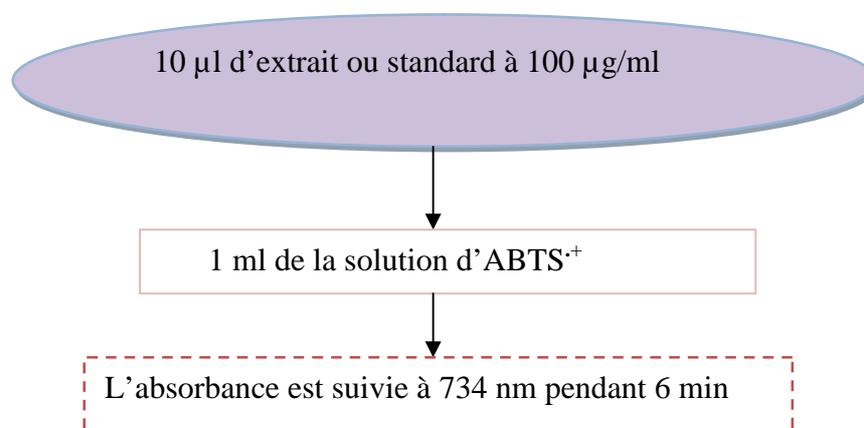
Dans ce test, le principe repose sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS<sup>•+</sup> qui a une coloration bleue et qui se transforme en une solution incolore (Thaipong *et al.*, 2006). Le radical ABTS<sup>•+</sup> est généré de la molécule stable d'ABTS avec le persulfate de potassium selon la réaction suivante (Re *et al.*, 1999):



La décroissance de l'absorbance causée par l'antioxydant reflète sa capacité à scavenging le radical libre (Re *et al.*, 1999).

#### B/ Mode opératoire

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'effet scavenger des extraits des deux plantes *C.flammula* et *P.lentiscus* contre le cation ABTS<sup>•+</sup> est celle décrite par Re *et al.* (1999). Au préalable, une solution d'ABTS<sup>•+</sup> a été préparée avec l'ABTS (2,45mM) et le persulfate de potassium (7mM) après incubation à l'obscurité pendant 16h et à température ambiante, cette solution est ensuite diluée avec de l'éthanol jusqu'à obtention d'une absorbance de  $0,7 \pm 0,02$  à 734 nm.



**Figure 19:** Protocole de détermination de l'activité scavenger du radical ABTS<sup>•+</sup> (Re *et al.*, 1999).

Le pourcentage d'inhibition est calculé comme suit :

$$\% \text{ scavenger du cation ABTS}^{\bullet+} = [(m - A) / A_0] \times 100$$

$A_0$  : Absorbance de la solution de l'ABTS<sup>•+</sup> sans extrait/standard (0,07).

$A$  : Absorbance de la solution de l'ABTS<sup>•+</sup> avec extrait/standard (à 6min ).

### II.2.3.3 Pouvoir réducteur du fer ferrique (test FRAP)

#### A/ Principe

La méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power) est un dosage colorimétrique basé sur le transfert d'électrons. Il évalue la réduction du fer c'est-à-dire le passage de fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) en fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) en présence d'un antioxydant (Cao, 1998; Cao et Prior, 1998 ;Pellegrini et al., 2003; Thaipong et al., 2006).

La méthode FRAP mesure l'aptitude des composés antioxydant à réduire, en milieu acide, le complexe incolore du 2, 4, 3- tripyridyltriazine-ferrique ( $Fe^{3+}$ - TPTZ ), à la forme tripyridyltriazine-ferreux ( $Fe^{2+}$ - TPTZ) de couleur bleu intense, qui absorbe à 593 nm, selon la réaction suivante : (Benzie et Strain, 1996 ; Antolovitch et al., 2001 ; Maksimovic et al., 2005 ; Prior et al., 2005 ).

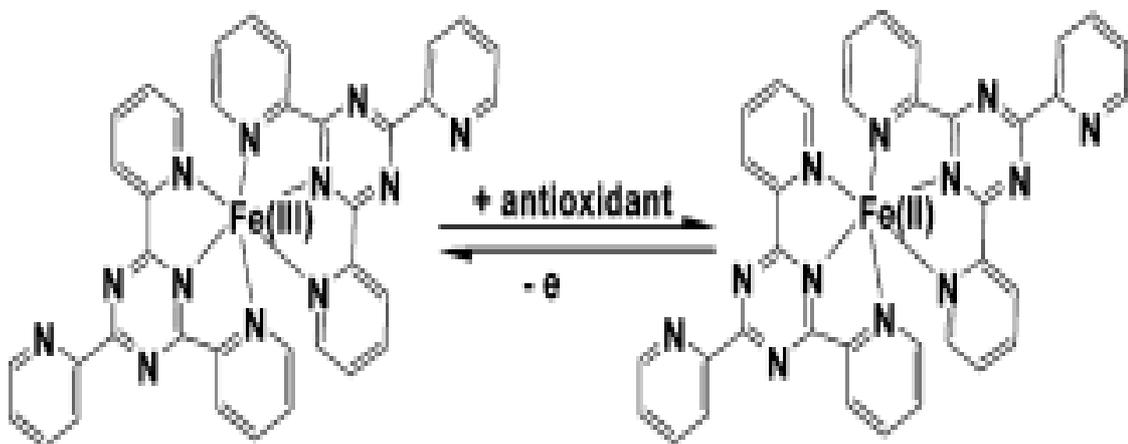
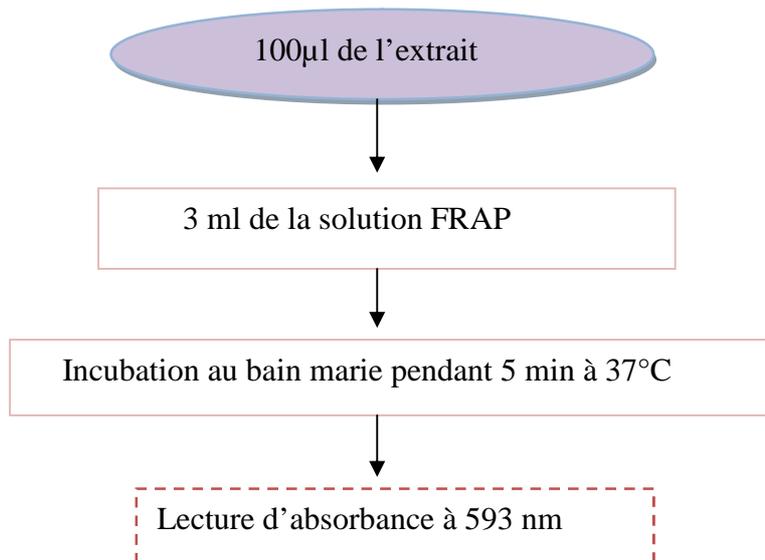


Figure 20: Principe de la méthode FRAP (Prior et al., 2005)

**B/ Mode opératoire**

Le pouvoir réducteur des extraits des deux plantes ; *Pistacia Lentiscus* et *Clematis flammula* a été déterminé selon la méthode développée par **Maksimovicé et al.(2005)**. Une solution FRAP a été préparée avec une solution tampon d'acétate de 300mM, (pH 3,6) avec TPTZ (10mM) et FeCl<sub>3</sub>-6H<sub>2</sub>O (20mM) avec un rapport de 10 :1 :1.



**Figure 21:** Protocole de détermination du Pouvoir réducteur du fer ferrique (test FRAP) (Maksimovicé et al., 2005).

Le même test a été réalisé sur une molécule de référence, l'acide ascorbique, afin de réaliser une courbe d'étalonnage pour calculer l'équivalence en milligramme d'acide ascorbique par gramme d'extrait (mg d'AA sc/ g d'extrait) (Annexe 1). Tous les tests ont été effectués en trois répliques.

### II.2.3.4 Test de blanchissement de la $\beta$ -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique

**A/ Principe**

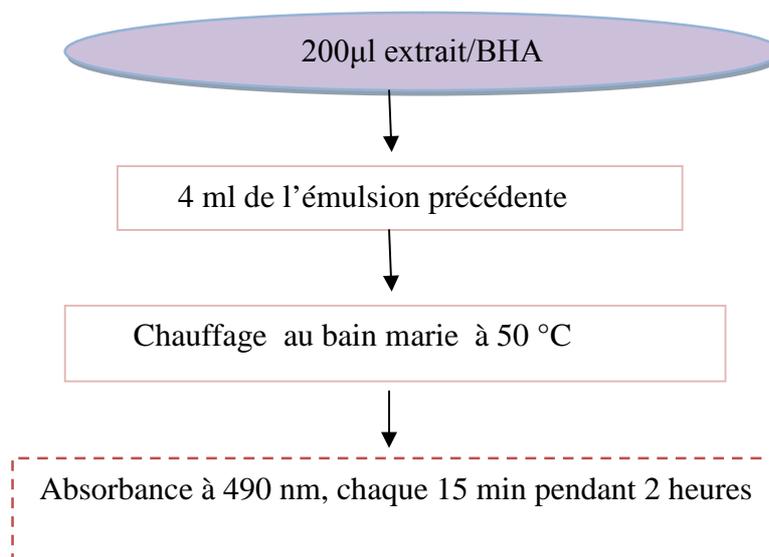
Cette technique de spectrophotométrie dans l'ultraviolet a initialement été développée par Marco, puis légèrement modifiée par Miller. Elle consiste à mesurer, à 470 nm, la décoloration du *b*-carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. La dispersion de l'acide linoléique et du *b*-carotène dans la phase aqueuse est assurée par du Tween. L'oxydation de l'acide linoléique est catalysée par la chaleur (50

°C) de manière non spécifique. L'addition d'antioxydants purs ou sous forme d'extraits végétaux induisent un retard de la cinétique de décoloration du *b*-carotène. Cette méthode spectrophotométrique est sensible, rapide et simple (Laguerre et al., 2007).

### B/ Mode opératoire

Dans ce test la capacité anti-oxydante des extraits est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du  $\beta$ -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique selon la méthode décrite par Turkoglu et al. (2006).

L'émulsion de  $\beta$ - carotène /acide linoléique est préparée par solubilisation de 0,5 mg de  $\beta$ -carotène dans 1 ml du chloroforme, 25 $\mu$ l de l'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 sont additionnés, le chloroforme est complètement évaporé à 40°C, par la suite 100 ml d'eau distillée sont ajoutés, l'émulsion résultante est agitée vigoureusement.



**Figure 22:** Protocole de détermination de L'activité anti-oxydante par le test de blanchissement de la  $\beta$ -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique (Turkoglu et al., 2006).

L'activité anti-oxydante des extraits est calculée selon l'équation suivante :

$$AA = 100 \times [1 - (AE_0 - AE_{120}) / (AC_0 - AC_{120})]$$

**AA:** Activité antioxydant.

**AE<sub>0</sub>** : Absorbance à 490 nm d'échantillons testés à  $t = 0$  min

**AE<sub>120</sub>** : Absorbance à 490 nm d'échantillons testés à  $t = 120$  min.

**AC<sub>0</sub>** : Absorbance à 490 nm du contrôle à  $t = 0$  min.

**AC<sub>120</sub>** : Absorbance à 490 nm du contrôle à  $t = 120$  min.

### **II.3 l'analyse statistique**

L'analyse statistique des résultats est effectuée avec l'application « ANOVA » (STATISTICA) et la comparaison des données est significative à la probabilité  $P < 0,05$ .

Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ), chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart type ( $n=3$ ).

### III.1 Le taux d'extraction

L'extraction de principes actifs à partir de la matière végétale, notamment le cas des polyphénols, suscitent actuellement beaucoup d'intérêt grâce à leur pouvoir antioxydant (Mahmoudi et al., 2013).

Le protocole d'extraction des composés phénoliques appliqué dans cette étude, est celui préconisé par Chiang et al.(1994), avec quelques modifications. Cette méthode est basée sur le degré de solubilité des différents composés phénoliques dans des solvants de nature chimique et de degré de polarité variable. Le tableau suivant présente les taux d'extraction obtenus.

**Tableau IV :** Taux d'extraction à partir des différentes parties de plantes étudiées.

Plantes		<i>Pistacia lentiscus</i>		<i>Clematis flammula</i>
Parties / extraits		Feuille	Graine	Feuille
Taux d'extraction	Ethanolique	17.96%	5.87%	13.65%
	Organique éthyle acétate	16.17%	35.88%	19.44%
	Aqueux éthyle acétate	59.09%	38.62%	57.63%
	Organique chloroforme	32.45%	67.04%	74.77%
	Aqueux chloroforme	54.056%	13.39%	16.95%

D'après les résultats représentés dans le tableau IV, on remarque que les taux d'extraction sont variés en fonction de la partie de plante à une autre, et d'un solvant à un autre.

En effet le taux d'extraction dans la première étape en utilisant l'éthanol, est relativement faible dans les extraits des graines de *Pistacia lentiscus* (5.87%), alors que le rendement de l'extrait éthanolique des feuilles de *P. lentiscus* et *C. flammula* sont relativement proches avec 17.96% et 13.65%, respectivement.

Nos résultats sont proches de ceux rapportés par Berboucha et *al.* (2010) ayant appliqué le même protocole d'extraction sur les deux parties de *Pistacia lentiscus*. Néanmoins un taux d'extraction élevé (20,3%) a été exhibé par l'extrait éthanolique des feuilles de *C. flammula* a été noté par Atmani et *al.* (2011), Cette différence peut être justifiée par les dimensions des particules, ainsi que l'origine des échantillons.

Concernant les deux autres étapes d'extraction, on a constaté que le taux le plus élevé est au niveau des phases aqueuses pour les parties de *Pistacia lentiscus* étudiées, sauf pour les graines où la phase organique de chloroforme note un taux de 67,04%.

Pour la *Clematis flammula*, on remarque que le rendement d'extraction est plus élevé au niveau de la phase organique de chloroforme et aqueux éthyle acétate (74.77% et 57.63%), respectivement.

Les différences de taux d'extraction sont dues probablement à de divers facteurs notamment l'environnement, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, le lieu de séchage, la température, le pH, la durée de séchage, les parasites et la méthode d'extraction (Nazck et Shahidi, 2006; Atmani et *al.* ; 2009 ; Cherbal et *al.*; 2012 ). La solubilité des composés phénoliques est influencée par le type de solvant utilisé et le degré de leurs polymérisations (Nacz et Shahidi, 2004). Cependant, ces derniers sont le plus souvent combinés à d'autres substances (protéines, polysaccharides, terpènes, chlorophylle, composés inorganiques...) (Monpon et *al.*, 1996).

Il est difficile de comparer les résultats avec ceux de la bibliographie, le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. La méthode d'extraction affecte également tout le contenu total en composés bioactifs et l'activité antioxydant (Lee et *al.*, 2003).

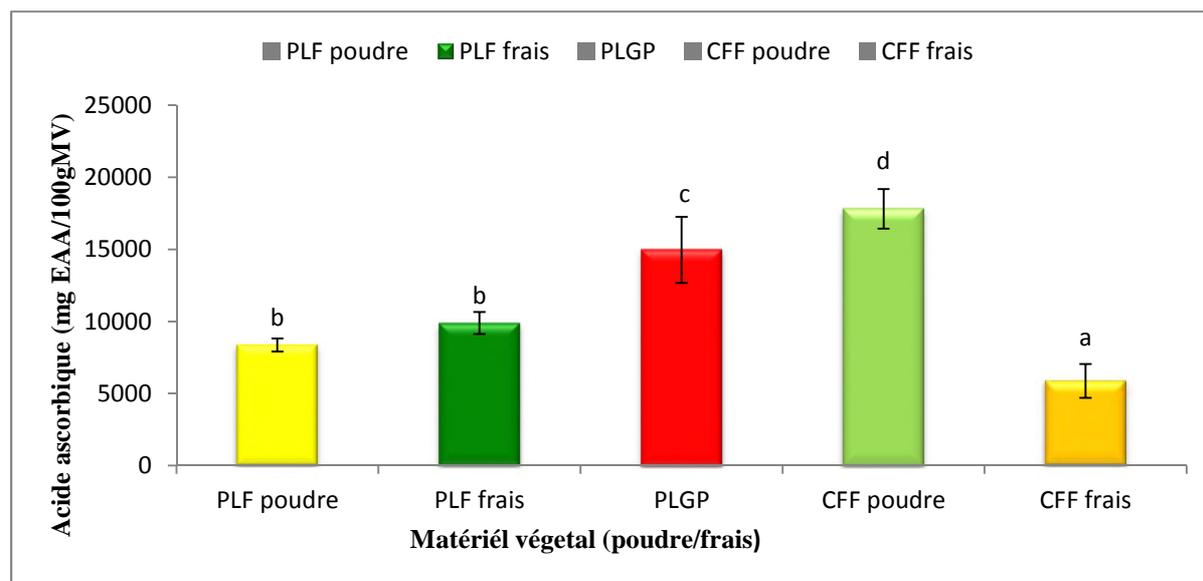
## III.2 Résultats de dosage des antioxydants

### III.2.1 Acide ascorbique (vit C)

Le dosage de la vitamine C a été réalisé suivant deux méthodes, une avec les poudres, matériel végétal frais (MV) et l'autre avec les extraits.

#### III.2.1.1 Teneur en acide ascorbique dans la matière végétale (MV frais) et les poudres

La figure suivante montre la teneur en acide ascorbique en utilisant les poudres, matériel végétal frais (MV).



**Figure 23:** Teneur en acide ascorbique du matériel végétal frais et poudre des graines et feuilles de *P.lentiscus* et les feuilles de *C. flammula*. PLF : *Pistacia lentiscus* feuille, PLG: *Pistacia lentiscus* graine, CFF : *Clematis flammula* feuille.

Les résultats de dosage de vitamine C dans les trois parties étudiées (feuilles et graines de *P.lentiscus* et feuilles de *C.flammula*) dans les différents états , c'est-à-dire , la poudre et le matériel végétal frais, ont montré une différence significative sauf entre les échantillons des feuilles de *P. lentiscus* ( $p < 0,05$ ) ; d'où les teneurs en acide ascorbique des deux plantes étudiées peuvent être classées comme suit : CFF poudre > PLG poudre > PLF frais > PLF poudre > CFF frais.

La poudre de feuille de *C. flammula* a donné le taux le plus élevé en vit C avec  $17801,87 \pm 1373,77$  mg Eq AA/100g MV et les feuilles fraîches de la même plante ont montré les teneurs les plus faibles avec  $5873,77 \pm 1167,24$  mg EAA/100g MV.

Concernant *Pistaccia lentiscus*, les résultats indiquent que la pate des graines est la plus riche en vit c ( $14966,91 \pm 2293,69$  mg EAA/100g MV) comparativement aux deux états de feuilles.

Mélo *et al.* (2006) ; Muller *et al.* (2010) ont indiqué que les fruits et légumes sont riches en acide ascorbique, qui peuvent fournir une source potentielle d'antioxydant diététique (**Mélo *et al.*, 2006 ; Muller *et al.*, 2010**).

Il est bien connu que l'acide ascorbique est un composé thermolabile, sensible, ainsi son extraction avec le rendement élevé et sans n'importe quelle décomposition a fait l'objet de plusieurs études. En effet, une étude comparative du contenu en acide ascorbique, avec deux méthodes ; celle de congélation et de séchage de la vit C a été faite par Nojavan *et al.* (2008). Ils ont conclu que la méthode de congélation empêche l'oxydation et la dégradation de l'acide ascorbique (**Nojavan *et al.*, 2008**).

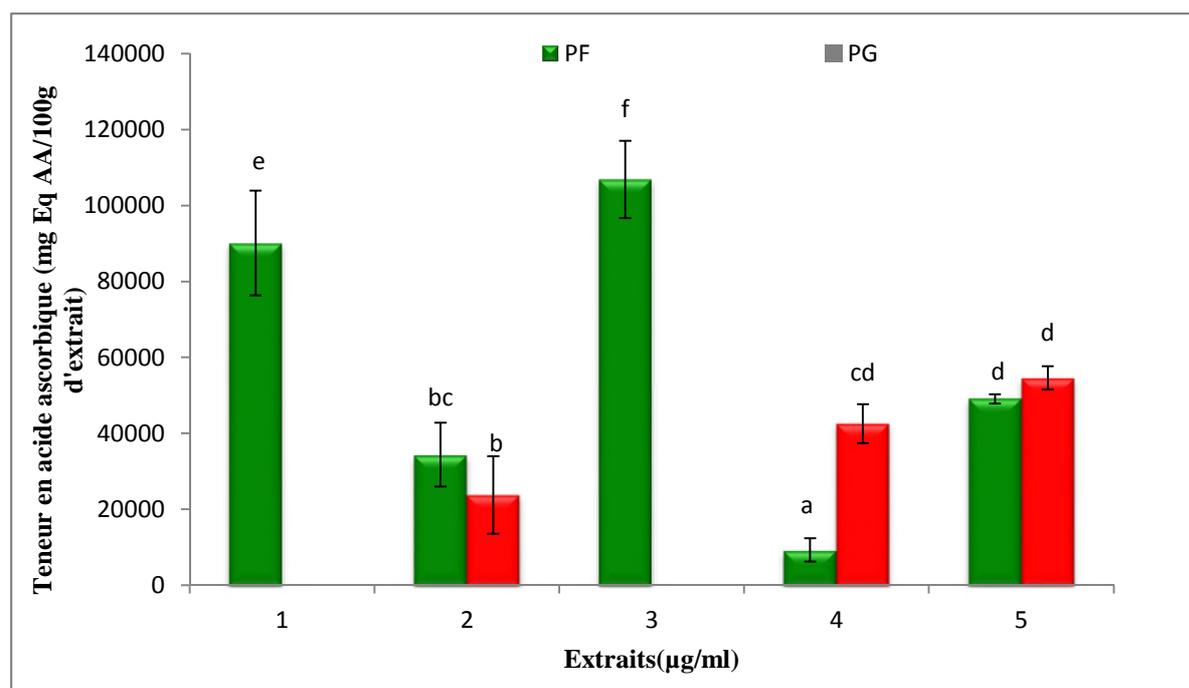
Le contenu en vitamine C diminue nettement après de courtes périodes de stockage aux différentes températures.

Dans l'étude de stabilité à long terme, l'acide ascorbique s'est avéré stable plus de 12 mois de stockage au  $-80^{\circ}\text{C}$  (**Valente *et al.*, 2014**). La dégradation de la vitamine C observée au cours de cette étude est due à la nature très instable de ce composé. La structure de l'acide ascorbique comporte une fonction ène-diol très oxydable ; sa dégradation résulte, entre autre, d'une oxydation favorisée d'une part, par la présence d'air (**Lingani-Sawadogo *et al.*, 2005**).

### III.2.1.2 Teneur en acide ascorbique dans les extraits

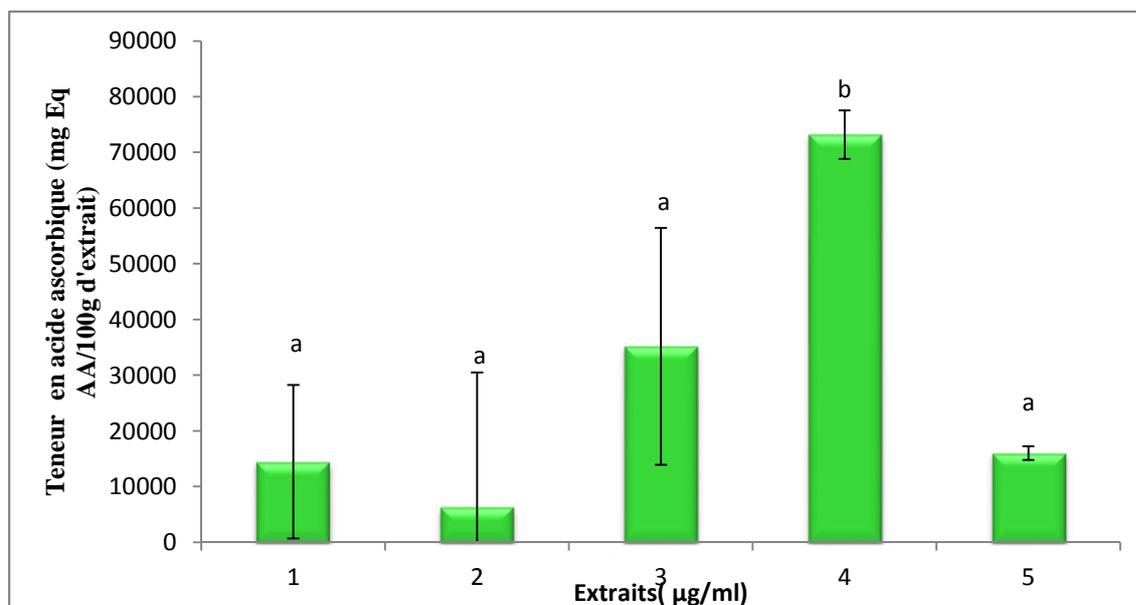
Les résultats de dosage de vitamine C des extraits de feuilles et graines de *P. lentiscus* sont illustrés dans la figure (24) qui sont exprimés en mg EAA/ 100g d'extrait.

L'analyse statistique révèle que tous les extraits des feuilles de *P.lentiscus* montrent des différences significatives ( $P < 0,05$ ). La teneur la plus élevée est enregistrée au niveau des extraits éthanolique et aqueux d'éthyle acétate avec  $90134,80 \pm 13796,97$  mg EAA/ 100g d'extrait et  $106883,17 \pm 10204,24$  mg EAA/ 100g d'extrait, respectivement. La plus faible teneur est enregistrée au niveau de la phase organique chloroforme avec  $9252,45 \pm 3063,72$  mg EAA/100g d'extrait.



**Figure 24:** Teneur en acide ascorbique des extraits des feuilles et graines de *Pistacia lentiscus*, 1: Extrait éthanolique ; 2 : Extrait éthyle acétate, 3 : Extrait aqueux d'éthyle acétate, 4 : Chloroforme, 5 : Aqueux de chloroforme, PF : *Pistacia* Feuille, PG : *Pistacia* Graine.

Concernant les graines de *P.lentiscus*, l'analyse statistique montre des différences significatives entre les extraits éthyle acétate, chloroforme et aqueux de chloroforme, ( $23754,08 \pm 10185,83$  ;  $4254,93 \pm 5102,12$  ;  $54595,58 \pm 3063,72$  mg EAA/ 100g d'extrait), respectivement. Aucune teneur en acide ascorbique des extraits éthanolique et aqueux d'éthyle acétate. **Sarker et al.(2005)** ont montré que l'activité d'un extrait est probablement due à la présence de synergie entre ces composants, qui, lorsqu'ils sont séparés deviennent inactifs individuellement.



**Figure 25** : Teneur en acide ascorbique des extraits des feuilles de *Clematis flammula*, 1: extrait éthanolique ; 2 : extrait éthyle acétate, 3 : extrait aqueux d'éthyle acétate, 4 : chloroforme, 5 : aqueux de chloroforme.

Selon la figure (25), On ne remarque aucune différence significative ( $P < 0.05$ ) entre les taux en vitamine C dans les extraits de feuilles de *C. flammula*, à l'exception de l'extrait chloroforme, qui enregistre la teneur la plus élevée en acide ascorbique avec une valeur de  $73182,18 \pm 4347,18$  mg EAA/100g d'extrait.

Ces résultats sont meilleurs par rapport à ceux trouvés par **Mélo et al.(2006)** où les teneurs en acide ascorbique de quelques fruits et légumes sont  $226.77 \pm 3.33$  (mg  $\cdot 100g^{-1}$ ) pour les pommes et  $1.49 \pm 0.85$  (mg  $\cdot 100g^{-1}$ ) pour le concombre.

### III.2.2 Anthocyanes

Les anthocyanes sont l'un des plus grand groupe de composés phénoliques dans l'alimentation humaine doués d'une capacité antioxydant très importante qui, peut être à l'origine de leurs autres propriétés biologiques (**Contessa et al., 2013**).

#### III.2.2.2 Teneur en anthocyanes et flavonols glycosylés dans les extraits

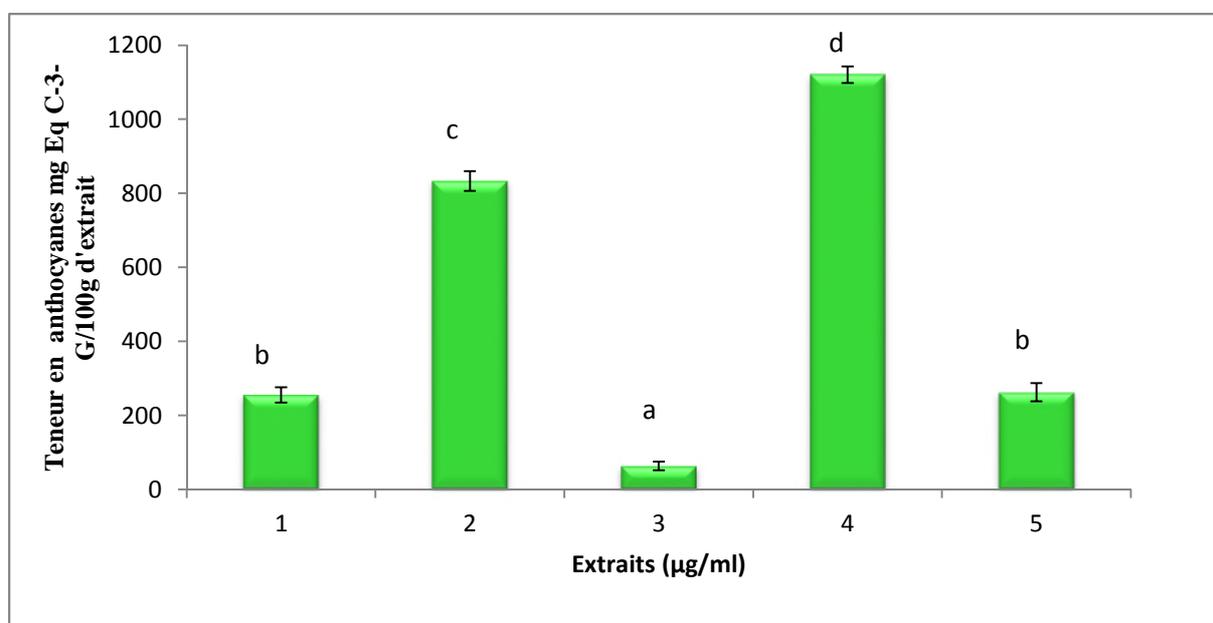
##### ➤ Les anthocyanes

Le tableau suivant résume les résultats du dosage des anthocyanes des extraits des feuilles de *C. flammula* ; *P.lentiscus* et les graines exprimés en mg C3G/ 100g d'extrait.

**Tableau V :** Teneur en anthocyanes (mg équivalent de C3G/100g d'extrait) des extraits des feuilles et graines de *Pistacia lentiscus* et feuilles de *Clematis flammula*

La teneur en anthocyanes (mg équivalent de la cyanidine-3- glucoside/ 100g d'extrait)			
Extraits	<i>Pistacia lentiscus</i>		<i>Clematis flammula</i>
	Feuilles	Graines	Feuilles
Éthanol	108,25± 26,57	1624,37± 24,88	255,11 ± 20,55
Acétate d'éthyle	306,54 ± 56,03	189,42 ± 38,28	833,06± 26,69
Aqueux acétate d'éthyle	116,09± 8,08	1082,58 ± 1,76	262,75±11,56
Chloroforme	486,80±27,55	225,07 ± 44,52	1120,26± 22,52
Aqueux chloroforme	95,73 ± 9,33	235,25 ± 45,82	262,75 ± 24,25

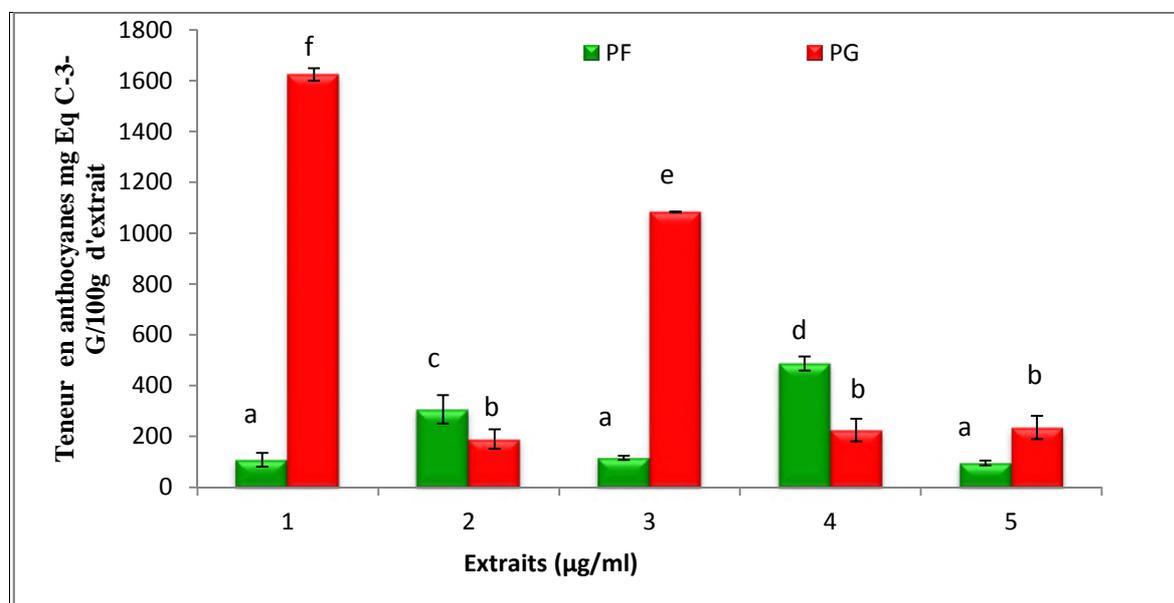
Les résultats de dosage des anthocyanes des feuilles de *Clematis flammula* dans les extraits sont significativement différents à l'exception de l'extrait éthanolique et l'extrait aqueux de chloroforme qui ne présentent aucune différence significative à ( $p < 0,05$ )



**Figure 26:** Teneur en anthocyanines des différents extraits de feuilles de *Clematis flammula*. 1.Extrait erthanolique ,2: Extrait éthyle acétate, 3: Extrait aqueux d'éthyle acétate, 4: Extrait du chloroforme, 5: Extrait aqueux de chloroforme.

D'après la figure 26, on remarque que l'extrait chloroforme présente la teneur la plus élevée puis celui de l'éthyle acétate avec des valeurs ( $1120,26 \pm 22,52$ ;  $833,06 \pm 26,69$  mg C3G/ 100g extrait), respectivement. La plus faible teneur des feuilles de *C. flammula* est notée par l'extrait aqueux d'éthyle acétate ( $63,14 \pm 11,56$  mg C3G/ 100g extrait)

Ces résultats sont meilleurs par rapport à ceux trouvés par N'Guessan et al. (2011), où les teneurs en anthocyanes de quelques plantes étudiées, les feuilles de *F. macrophylla* de la famille des rutaceae qui présente la teneur la plus élevée de  $1,07 \pm 0,03$  mg/g (N'Guessan et al. 2011).



**Figure 27 :** Teneur en anthocyanines des différents extraits de feuilles et graines de *Pistacia lentiscus*. 1. extrait éthanolique, 2 : Extrait éthyle acétate, 3 : Extrait aqueux d'éthyle acétate, 4 : Extrait du chloroforme, 5 : Extrait aqueux de chloroforme.

Les résultats montrent clairement que la teneur la plus importante en anthocyanines est obtenue par l'extrait éthanolique des graines de *P. lentiscus*, avec  $1624,37 \pm 24,88$  mg C3G/ 100g d'extrait, suivi par l'aqueux d'éthyle acétate ( $1082,58 \pm 1,76$  mg C3G/ 100g d'extrait).

Une étude réalisée par **Luigia et ses collaborateurs (2008)** sur les fruits de *Pistacia lentiscus* a rapporté une teneur de  $0,05$  µg/kg de fruits en anthocyanes. Ces mêmes auteurs ont démontré la dominance de ces deux anthocyanes à savoir monoglucoside et delphinidine dans ces fruits.

Les plus faibles teneurs sont révélées au niveau des extraits de feuilles à savoir les extraits : aqueux de chloroforme, éthanolique, aqueux éthyle acétate avec  $95,73 \pm 9,33$  ;  $108,25 \pm 26,57$  ;  $116,09 \pm 8,08$  mg C3G/ 100g d'extrait, respectivement ; et ne montrent aucune différence significative entre eux. Même constatation a été notée pour les extraits des gaines de *P.lentiscus*, à savoir, l'extrait éthyle acétate ,chloroforme et aqueux de chloroforme ( $189,42 \pm 38,28$  ;  $225,07 \pm 44,52$  ;  $235,25 \pm 45,82$  mg C3G/ 100g d'extrait) , respectivement .

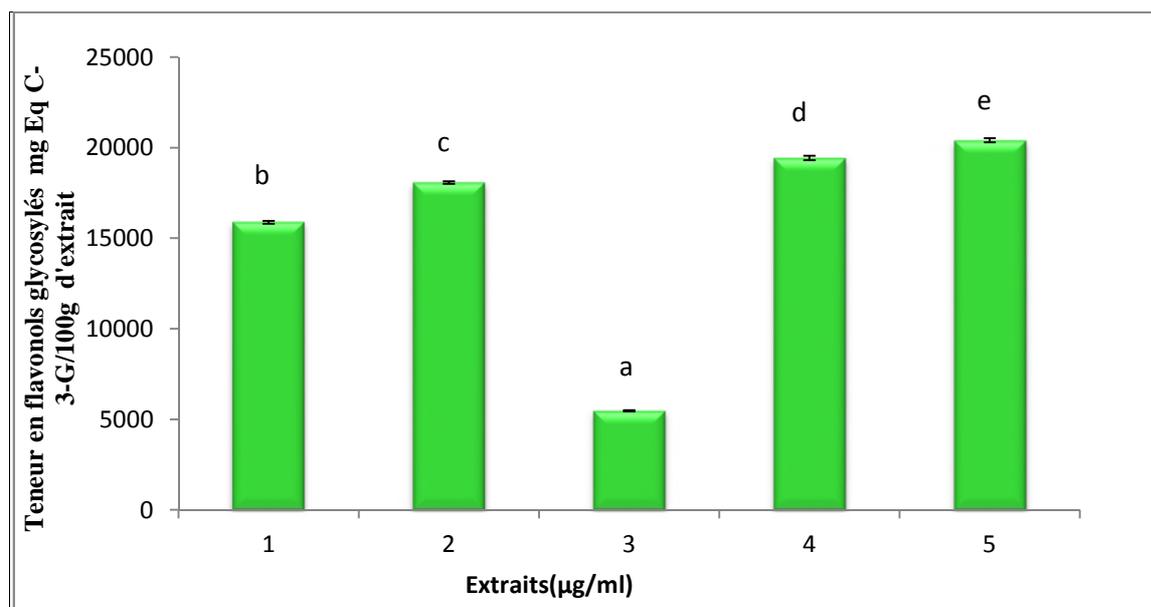
➤ **Les flavonols glycosylés**

Les résultats de dosage des flavonols glycosylés sont illustrés dans le tableau suivant :

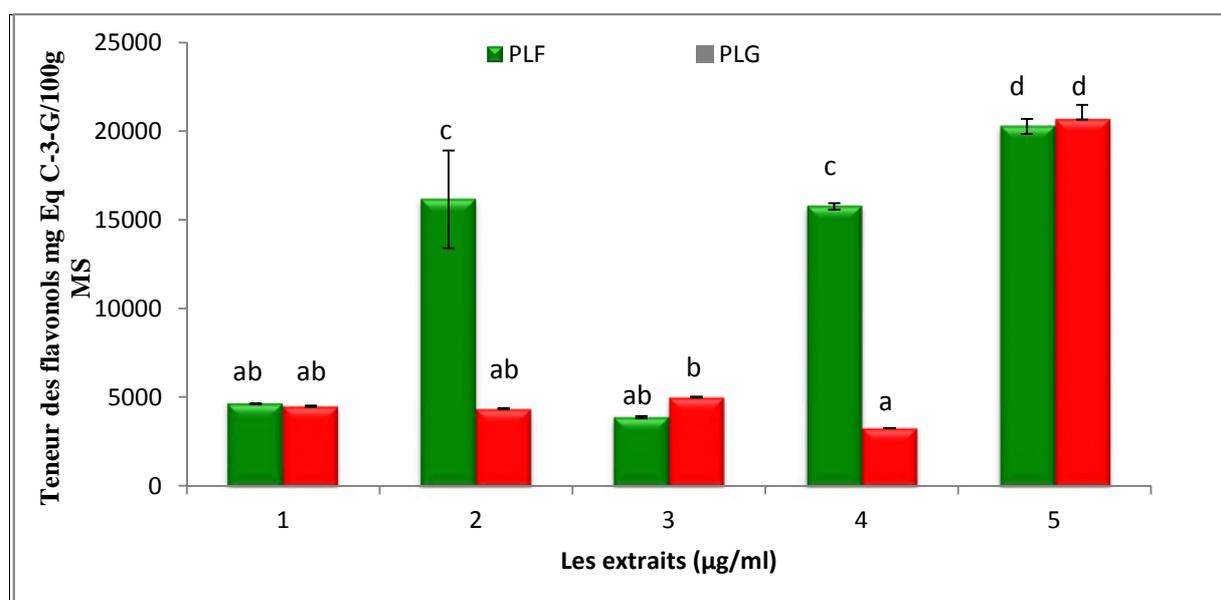
**Tableau VI:** La teneur en flavonols glycosylés( mg équivalent de la cyanidine-3- glucoside/ 100g d'extrait ) des extraits de feuilles et graines de *Pistacia lentiscus* et feuilles de *Clematis flammula*.

La teneur en flavonols glycolysés en mg équivalent de la cyanidine-3- glucoside/ 100g d'extrait			
Extraits	<i>Pistacia lentiscus</i>		<i>Clematis flammula</i>
	Feuilles	Graines	Feuilles
<b>Ethanol</b>			
<b>Acétate d'éthyle</b>	$4626,58 \pm 26,60$	$4460,17 \pm 60,42$	$15882,48 \pm 80,43$
<b>Aqueux acétate d'éthyle</b>	$16153,38 \pm 2748,63$	$4326,66 \pm 52,02$	$18072,9 \pm 70,93$
<b>Chloroforme</b>	$3868,065 \pm 64,20$	$4974,88 \pm 50,60$	$5466,37 \pm 38,65$
<b>Aqueux chloroforme</b>	$15758,64 \pm 174,27$	$3237,25 \pm 8,86$	$19435,14 \pm 129,28$
	$20271,06 \pm 423,72$	$20650,32 \pm 839,24$	$20402,64 \pm 114,54$

Le dosage quantitatif des flavonols glycosylés des différents extraits de feuilles de *Clematis flammula* a révélé qu'ils renferment des teneurs notables en flavonols glycosylés ; . marquant ainsi une différence significative entre tous les extraits ( $p < 0,05$ ) par l'ordre suivant : aqueux chloroforme > chloroforme > éthyle acétate > éthanol > aqueux éthyle acétate. Avec des valeurs,  $20402,64 \pm 114,54$  ;  $19435,14 \pm 129,28$  ;  $18072,9 \pm 70,93$  ;  $15882,48 \pm 80,43$  ;  $5466,37 \pm 38,65$  mg Eq C-3-G /100g d'extrait, respectivement.



**Figure 28:** Teneur en flavonols glycosylés des différents extraits de feuilles de *Clematis flammula*. 1: extrait éthanolique, 2: Extrait éthyle acétate, 3: Extrait aqueux d'éthyle acétate, 4: Extrait du chloroforme, 5: Extrait aqueux de chloroforme.



**Figure 29:** Teneur en flavonols glycosylés des différents extraits de feuilles et graines de *Pistacia lentiscus*. 1: extrait éthanolique, 2: Extrait éthyle acétate, 3: Extrait aqueux d'éthyle acétate, 4: Extrait du chloroforme, 5: Extrait aqueux de chloroforme.

Comme le montre la figure 29, les extraits de graines et feuilles de *P. lentiscus* sont concentrés principalement au niveau des phases aqueuses chloroforme avec des taux plus élevés  $20650,32 \pm 839,24$  ;  $20271,06 \pm 423,72$  mg C3G/ 100g d'extrait, respectivement. Ceci peut être dû à la présence d'une fraction osidique qui rend ces flavonoïdes très solubles dans

l'eau (**Havesteen, 2002**). Cela s'accorde bien avec plusieurs travaux réalisés sur cette plante affirmant sa richesse en flavonoides dont les flavones (lutéoline) (**Djeridane et al., 2007**), (le tricine et chrysoérol), les flavonols (le myricétine, la quercétine et kaempférol) et des anthocyanines (delphidine 3-O-glycoside et cyanidine 3-O-glucoside) (**Benhammou et al., 2008**).

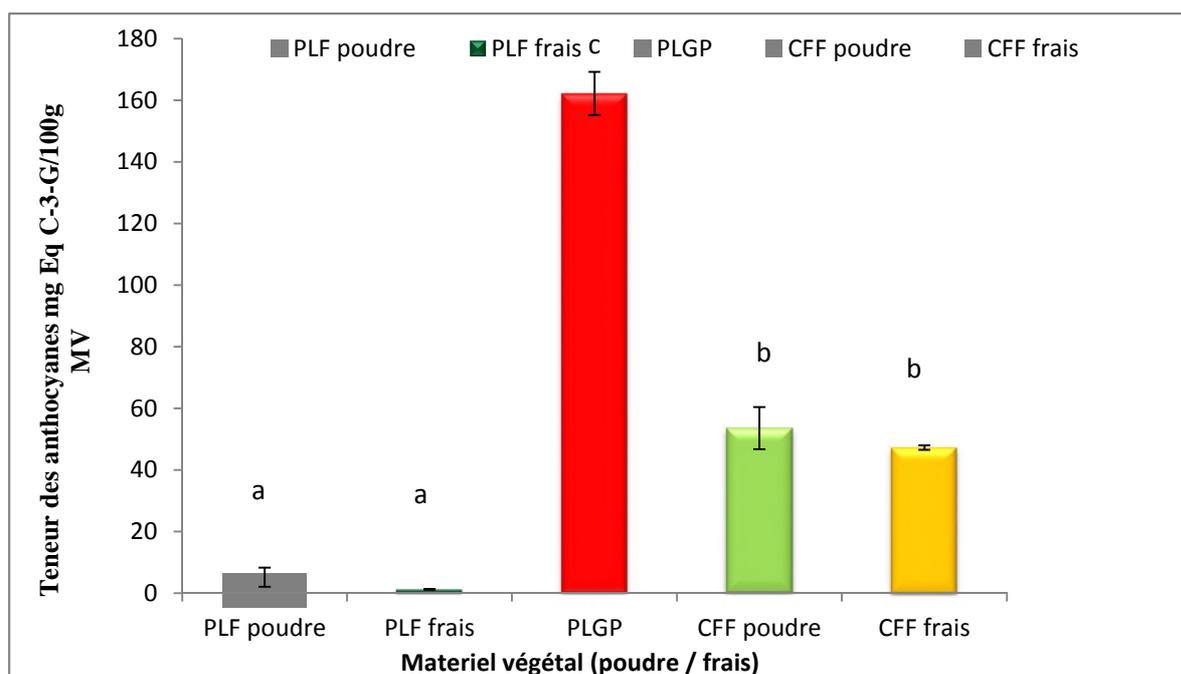
Les autres extraits de feuilles ont montré des teneurs notables allant de : aqueux chloroforme > éthyle acétate > chloroforme > éthanol > aqueux éthyle acétate avec (20271,06 ± 423,72 ; 16153,38 ± 2748,63 ; 15758,64 ± 174,27 ; 4626,58 ± 26,60 ; 3868,065 ± 64,20 mg C3G/ 100g d'extrait), respectivement. Cependant les teneurs marquées par les extraits de graines se sont avérées pauvres en flavonols chloroforme (4460,17 ± 60,42), aqueux éthyle (4974,88 ± 50,60 acétate, éthyle acétate (4326,66 ± 52,02), éthanol (4460,17 ± 60,42 mg C3G/ 100g d'extrait), respectivement.

### III.2.2.3 Les résultats du dosage des anthocyanes par la méthode pH différentiel

Les anthocyanines sont dosées chimiquement à l'aide de la méthode du pH différentiel, qui repose sur la modification de la coloration des anthocyanines en fonction du pH. Cette méthode utilise les transformations structurelles réversibles que subissent les anthocyanines en fonction du pH. Cette méthode permet une mesure précise et rapide de tous les anthocyanes, même en présence d'autres composés (**Malien-Aubert et Amiot-Carlin, 2006**).

L'extraction des anthocyanines est généralement effectuée avec un solvant légèrement acide, car ces pigments sont instables en milieu neutre ou légèrement alcalin (**Ribéreau-Gayon, 1968**). L'acide le plus utilisé est l'acide chlorhydrique; l'acide acétique et l'acide formique sont aussi recommandés. L'utilisation de l'acide est très importante en déterminant l'efficacité d'extraction et il est nécessaire pour obtenir la forme de cation flavylium qui est rouge et stable dans un milieu fortement acide. Cependant, l'acide peut causer l'hydrolyse partielle des parties acyles des anthocyanines acylées (**Escribano-Bailon et Santos-Buelga, 2003**).

Les résultats de dosage des anthocyanes du matériel végétal des deux plantes sont exprimés en mg C3G/ 100g MV.



**Figure 30 :** Teneur en anthocyanes du matériel végétal frais et poudre des graines et feuilles de *P.lentiscus* et les feuilles de *C. flammula*. PLF : *Pistacia lentiscus* feuille, PLG: *Pistacia lentiscus* graine, CFF : *Clematis flammula* feuille.

D'après analyse statistique, on remarque que la teneur la plus élevée est présentée par la poudre des graines de *P.lentiscus* avec une teneur de  $162,14 \pm 7,04$  mg C3G/ 100g MS. Par ailleurs, aucune différence significative n'a été notée entre les teneurs en anthocyanes de Matériel végétal frais et sec des feuilles de *Clematis flammula* ( $1,18 \pm 0,10$  mg C3G/ 100g matériel végétal frais,  $5,17 \pm 3,10$  mg C3G/ 100g Matériel végétal sec, respectivement) et entre ceux de feuilles (frais, poudre) de *Pistacia lentiscus*, marquant les taux les plus faibles avec ( $1,18 \pm 0,10$ ;  $5,17 \pm 3,10$  mg C3G/ 100g Matériel végétal), respectivement.

La faible teneur en anthocyanines dans la *P.lentiscus* feuilles fraîches/ poudre peut être due à la sensibilité de la méthode d'analyse utilisée. Une étude a été réalisée sur 3 variétés cultivées de *Pistacia vera*, en appliquant la même méthode, montre des teneurs pour chaque variété :  $0,7 \pm 0,1$ ,  $0,9 \pm 0,1$  et  $1,2 \pm 0,3$  g cyanidine 3-glucoside/100 g MV, respectivement. (Fabani et al., 2013). Autres études réalisées par Jakobek et al. (2007), ont montré qu'une teneur en anthocyane est très riche dans les fruits aronia (4341 mg/kg).

Cette variation en taux d'anthocyane d'une plante à une autre, selon plusieurs études, dépend des facteurs génétiques et physiologiques tels que le génotype et le degré de maturité,

les variations sont dues à la différence de variétés, de saisons et les conditions de croissance telles que la température, le sol et la lumière (Tripoli *et al.*, 2007 ; Cam *et al.*, 2009)

La lumière exerce deux effets opposés sur les anthocyanines : *in vivo* au sein de la plante elle favorise leur biosynthèse alors qu'*in vitro* dans les extraits ou les produits, elle accélère leur dégradation (oxydation) (Malien-Aubert et Amiot-Carlin, 2006). Ainsi , la stabilité des anthocyanes augmente avec le nombre de groupements methoxyles sur le cycle B et diminue avec l'augmentation du nombre de groupements hydroxyles. Ainsi, parmi les anthocyanes les plus rencontrés, les plus stables sont la malvidine, suivie de la peonidine, la petunidine et la cyanidine (Nicoue Eugene, 2010).

Cette instabilité peut être dûe aux:

- Problèmes de stabilité, puisque les anthocyanes réagissent avec l'acide ascorbique, les métaux, les sucres, l'oxygène, la lumière, de la température et les enzymes qui synthétisent des polymères et produits de dégradation (Francis, 1992).
- La sensibilité au pH est également un inconvénient, car ils décolorent essentiellement aux valeurs de pH supérieures à 4,0 (Francis, 1992).

En général les anthocyanes sont plus stables à pH acide. La glycosylation et l'acylation des sucres augmentent aussi la stabilité et, donc les diglycosides d'anthocyane sont plus stables que leurs monoglycosides correspondants (Rivas-Gonzalo, 2003).

La figure (28) résume l'effet du pH sur la structure des l'anthocyanidines. La forme rouge AH<sup>+</sup> est la plus importante et aussi la plus stable; ainsi, toute tentative visant à augmenter la stabilité de la couleur en réduisant la dépendance de pH doivent nécessairement impliquer le maintien du composé sous la forme AH<sup>+</sup> (Francis, 1992).

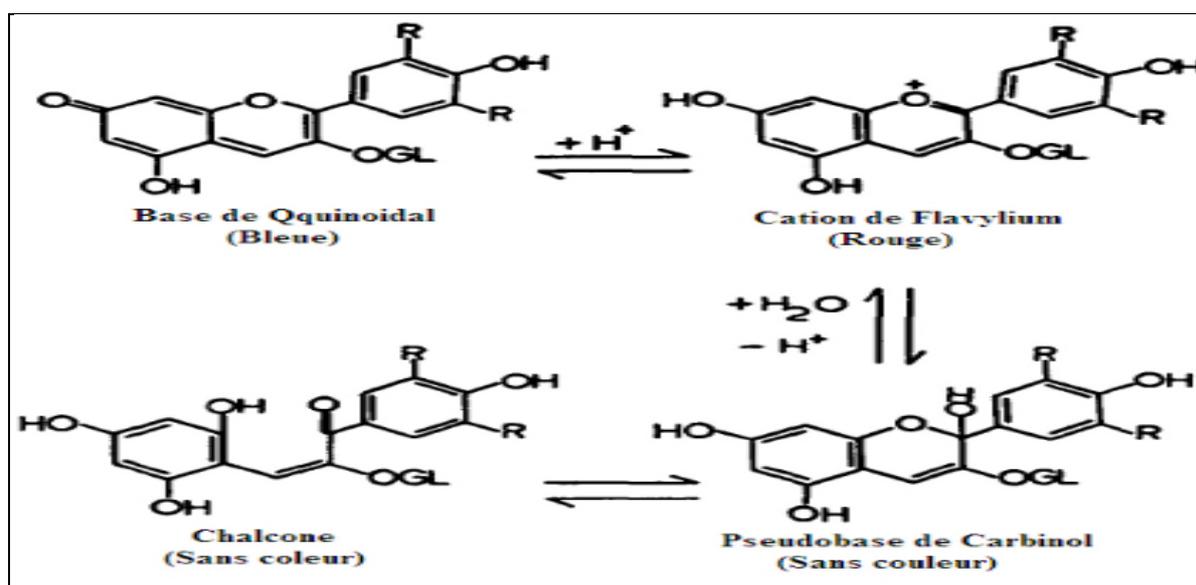
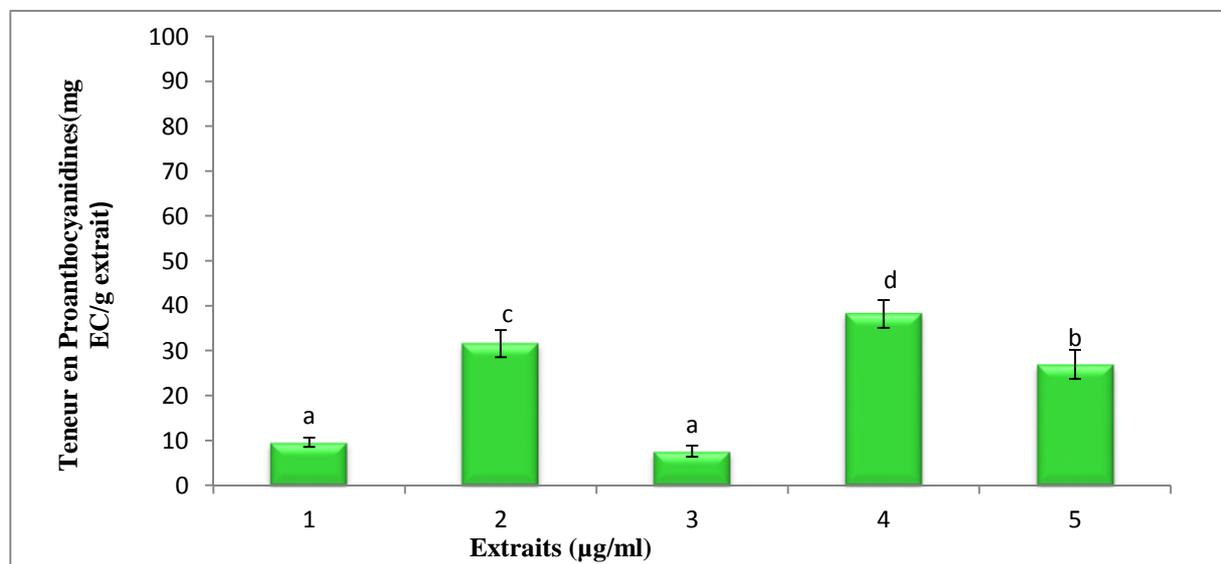


Figure 31 : Les quatre formes de la structure d'anthocyanidines (Francis, 1992).

### III.2.3. Proanthocyanidines

La figure suivante présente les résultats de dosage des proanthocyanidines des extraits de feuilles de *Clematis flammula*, exprimés en mg EC/g d'extrait.



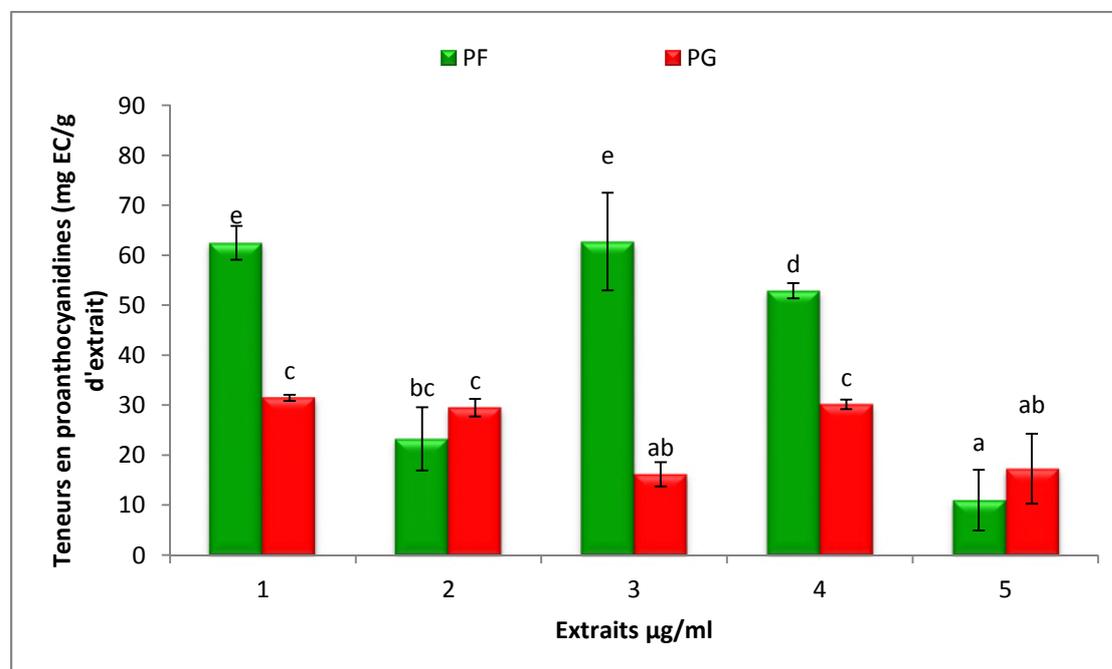
**Figure 32:** Teneur en Proanthocyanidines des extraits de feuille de *Clematis flammula*; 1 : Extrait éthanolique, 2 : Extrait éthyle acétate, 3 : Extrait aqueux acétate d'éthyle, 4 : Extrait du chloroforme, 5 : Extrait aqueux du chloroforme.

L'étude statistique révèle qu'il existe une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre les teneurs en proanthocyanidines des extraits aqueux du chloroforme, éthyle acétate et chloroforme. La teneur la plus élevée est enregistrée par l'extrait du chloroforme avec  $38,16 \pm 3,06$  mg EC/g d'extrait. Cependant, aucune différence significative n'a été enregistrée entre les extraits éthanolique et l'aqueux acétate d'éthyle, enregistrant les teneurs les plus faibles,  $9,57 \pm 1,05$  mg EC/g d'extrait ;  $6,84 \pm 1,27$  mg EC/g d'extrait, respectivement.

Une étude à été faite sur le fruit frais de *Myrciaria dubia* qui a présenté une teneur 27.69 (mg/100 g MF) ( **Fracassetti et al .,2013**)

Ces résultats montrent la richesse des phases organiques des extraits de feuilles de *Clematis flammula* en proanthocyanidines. Cela peut être expliqué du fait que, les proanthocyanidines différent entre eux par le degré d'hydroxylation du cycle B monomère qui les constitue et qui sont habituellement liés par des liaisons C-C et occasionnellement par C-O-C, entre le C4 de l'unité supérieure et le C18 de l'unité inférieure (**Williamson et al., 2010**).

Concernant les résultats du dosage des tannins condensés des extraits de *Pistacia lentiscus*, l'analyse statistique montre une différence significative entre les extraits des deux parties de *P.lentiscus* ( $p < 0.05$ ).



**Figure 33:** Teneur en tannins condensés des différents extraits de feuilles et de graines de *Pistacia lentiscus*. ; 1 : Extrait éthanolique, 2 : Extrait éthyle acétate, 3 : Extrait aqueux acétate d'éthyle, 4 : Extrait du chloroforme, 5 : Extrait aqueux du chloroforme. PF : *Pistacia* Feuille ; PG : *Pistacia* Graine.

Pour les graines de *P.lentiscus*, les extraits éthanoliques, éthyle acétate et organique du chloroforme ont noté les teneurs les plus élevées sans aucune différence significative ( $p < 0,05$ ) avec  $31,47 \pm 0,61$  ;  $29,48 \pm 1,73$  ;  $30,13 \pm 0,96$  mg EC/g d'extrait), respectivement.

Les phases aqueuses d'acétate d'éthyle et celle du chloroforme, présentent des valeurs faibles à ( $P < 0,05$ ) avec ( $16,14 \pm 2,44$  ;  $17,25 \pm 6,99$  mg EC/g d'extrait), respectivement.

L'extrait aqueux éthyle acétate et l'extrait éthanolique des feuilles de *Pistacia lentiscus*, ont montré les meilleurs taux en proanthocyanidine ( $P < 0,05$ ) avec ( $62,73 \pm 9,76$  ;  $62,50 \pm 3,39$  mg EC/g d'extrait), respectivement ; suivis par l'extrait organique de chloroforme avec  $52,89 \pm 1,52$  mg EC/g d'extrait). La teneur la plus faible est représentée par la phase aqueuse du chloroforme avec  $10,98 \pm 6,08$  mg EC/g.

En outre, Ces différences peuvent être dues à la vanilline qui est un aldéhyde aromatique, qui interagit spécifiquement avec les flavan3-ol et avec les unités terminales des proanthocyanidines (tannins condensés) (Hagermen, 2002), ou bien due aux raisons

multiples y compris, étape de maturité, cultivar ou des différences variétales, étape de croissance, la partie de la plante utilisée, et autres facteurs qui déterminent la variation quantitative de ces phytochimiques (Mélo *et al.*, 2006).

### III.3 Résultats de l'activité antioxydant des extraits

#### III.3.1 Activité scavenger du radical DPPH

L'activité antioxydant des extraits exprime leur capacité à réduire les radicaux libres. Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ( $\alpha,\alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques (Popovici *et al.*, 2009). Ce radical libre présente une coloration violet foncé, lorsqu'il est piégé par les antioxydants, il apparaît sous sa forme réduite de couleur jaune pâle (figure 34) dont l'intensité est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons) (Molyneux, 2004 ; Popovici *et al.*, 2009)

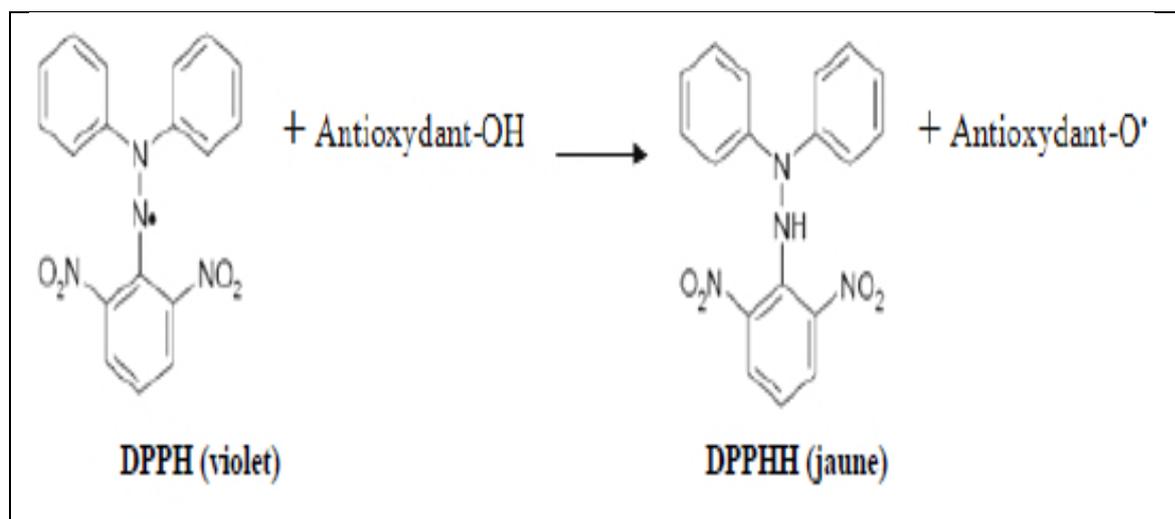


Figure 34 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (Molyneux, 2004)

Les résultats de activité anti-DPPH de tous les extraits des plantes ont exhibé un effet pro-oxydant à une concentration de 100 $\mu$ g/ml ; à cet effet, une dilution de moitié des extraits a été réalisée, dont les pourcentages d'effet anti-radicalaire contre le radical DPPH sont présentés dans le tableau VII.

Tableau VII : Effet anti-radicalaire contre le radical DPPH des extraits des deux plantes.

Effet anti-radicalaire contre le radical DPPH			
Extraits	<i>Pistacia lentiscus</i>		<i>Clematis flammula</i>
	Feuilles	Graines	Feuilles
Éthanol	91,36± 0,64	72,86 ± 1,36	19,20± 1,34
Acétate d'éthyle	92,53± 1,85	94,53± 2,15	16,76± 0,90
Aqueux acétate d'éthyle	93,63± 0,25	86,5 ± 4,25	29,63± 7,48
Chloroforme	84,13 ±1,81	10,63 ± 5,36	15,89 ± 9,58
Aqueux chloroforme	93,23± 0,57	92,36 ± 0,72	71,80 ± 4,3

L'analyse statistique indique que tous les extraits ont une bonne activité contre le radical DPPH et présentent des différences significatives selon la plante et le solvant utilisé ( $p < 0,05$ ) Tableau VII, Figures (35et 36).

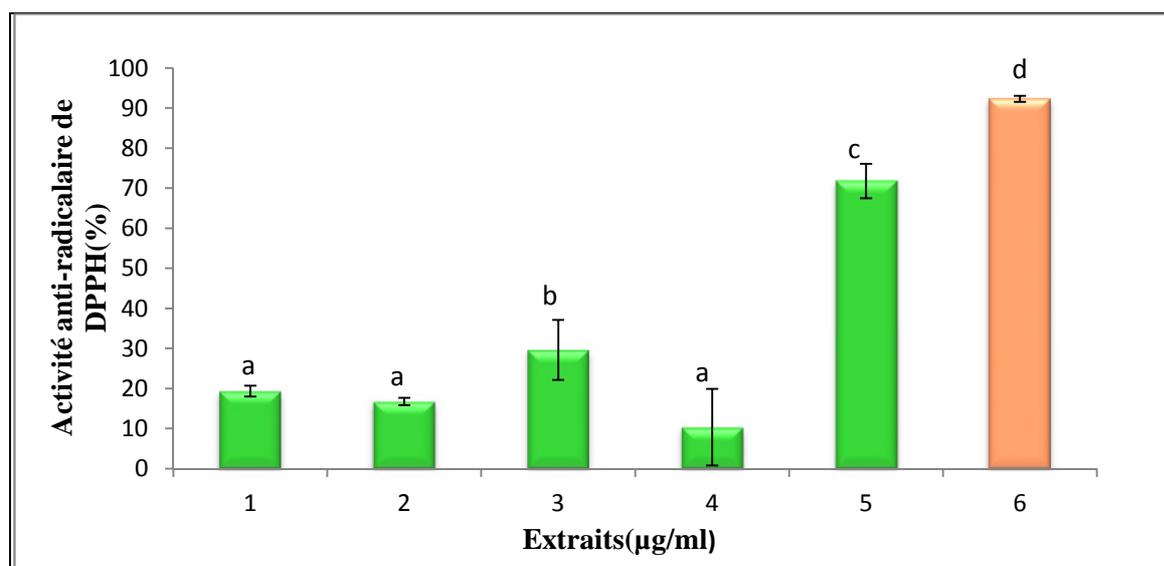
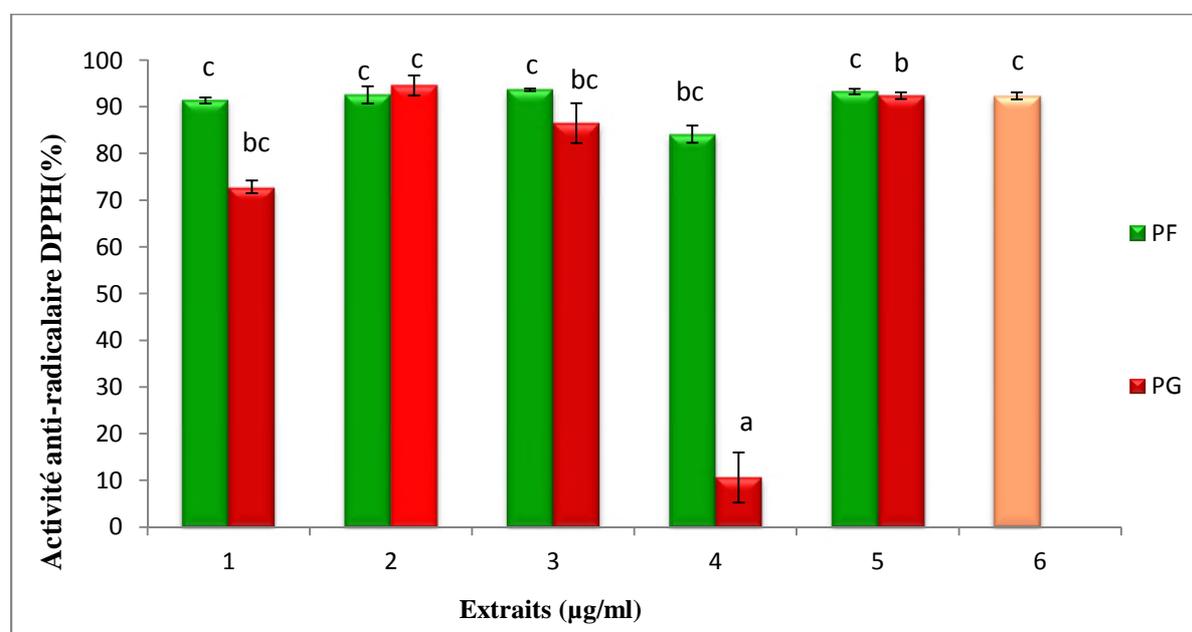


Figure 35 : Effet anti-radicalaire contre le radical DPPH des extraits de *Clematis flammula* à une concentration de 50 µg/ml 1 : Ethanol, 2 : Ethyle acétate, 3 : Aqueux d'éthyle acétate, 4 : Chloroforme, 5 : Aqueux de Chloroforme, 6 : Acide gallique.

Selon la figure (35) , Les résultats montrent clairement que, la phase aqueuse de chloroforme de feuilles de *Clematis flammula* a présenté le pourcentage d'inhibition du radical DPPH le plus élevé avec  $71,80 \pm 4,3\%$  et suivi de celui de la phase aqueuse d'éthyle acétate avec  $29,63 \pm 7,48\%$ , mais qui restent inférieurs au pourcentage exhibé par la molécule de référence, acide gallique ( $92,33 \pm 0,75\%$ ).

Ces deux valeurs sont très significatives par rapport aux autres extraits qui ont noté des activités faibles sans aucune différence significative ( $P < 0,05$ ) avec  $19,20 \pm 1,34\%$ ,  $16,76 \pm 0,90\%$  et  $15,89 \pm 9,58\%$ , pour l'extrait éthanolique, éthyle acétate et Chloroforme, respectivement. Ceci est probablement dû à leur richesse en composés phénoliques et flavonoïdes riches en groupement OH responsables de cette capacité à piéger les radicaux libres. (Popovici et al., 2009)

Nos résultats sont similaires aux résultats obtenus par Atmani et ces collaborateurs (2009), où seule la phase aqueuse de chloroforme qui a enregistré une bonne activité anti DPPH à une concentration de  $100 \mu\text{g/ml}$  avec  $89,9\%$ , et moins de  $50\%$  pour tous les autres extraits des feuilles de *Clematis flammula*.



**Figure 36** : Effet anti-radicalaire contre le radical DPPH des extraits de *Pistacia lentiscus* feuilles et graines à des concentrations de  $50 \mu\text{g/ml}$ , 1 : Ethanol, 2 : Ethyle acétate, 3 : Aqueux d'éthyle acétate, 4 : Chloroforme, 5 : Aqueux de Chloroforme, 6 : Acide gallique.

PF : *Pistacia* feuilles, PG : *Pistacia* graines .

Pour les extraits de la deuxième plante, la figure (36) montre que la majorité des extraits des feuilles de *P. lentiscus* ne présentent aucune différence significative avec la molécule de référence acide gallique ( $92,33 \pm 0,75\%$ ). Même remarque pour l'extrait éthyle acétate des graines ( $p < 0,05$ ) exhibant un effet supérieur à  $80\%$ , où les extraits de feuilles à savoir, éthanolique, éthyle acétate, aqueux acétate d'éthyle, aqueux de chloroforme montrent des pourcentages scavenger de ( $91,36 \pm 0,64$  ;  $92,53 \pm 1,85$  ;  $93,63 \pm 0,25$  ;  $93,23 \pm 0,57$ ), respectivement.

Pour les graines, l'extrait acétate d'éthyle avec une valeur de  $(94,53 \pm 2,15)$  note la capacité anti DPPH la plus élevée suivie de celle de l'extrait aqueux de chloroforme avec  $(92,36 \pm 0,72)$ . Le pourcentage le plus faible est exhibé par l'extrait de chloroforme avec  $(10,63 \pm 5,36)$ .

**Luigia et ses collaborateurs (2008)** ont rapporté une bonne activité anti-radicalaire contre DPPH des fruits de *Pistacia lentiscus* avec 92% à une concentration de 0,005 mg/ml. suggérant que cette activité scavenger est probablement due à la présence du monoglucoside de delphinidine, qui possède l'activité scavenger la plus élevée parmi les anthocyanines présentes dans les fruits de *Pistacia lentiscus*.

Nos résultats sont similaires aux résultats obtenus par Atmani et ces collaborateurs (2009), pour les feuilles de *P.lentiscus*, où tous les extraits ont montré une activité scavenger élevée (90%), équivalente à celle de la norme, BHA (89%), à l'exception de l'extrait de chloroforme.

Une autre étude réalisée par **Topçu et al., 2007** sur l'extrait méthanol de *Pistacia terebinthus turcka*, démontre une activité de 90% à une concentration deux fois supérieure à celle utilisée dans cette étude (100µg/ml).

Ce bon pouvoir antioxydant est fort probablement dû aux composés phénoliques présents dans les fruits et les feuilles de *Pistacia lentiscus*, et qui sont connus comme substances antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires par transfert d'un proton ou d'un électron (**Kelly et al., 2002 ; Popovici et al., 2009 ; Benhammou et al., 2013**).

La capacité anti-radicalaire (capacité à fixer des radicaux libres, donc à arrêter la propagation de la réaction en chaîne) ne peut être mesurée directement, mais par contrôle de l'effet de la réactivité. Plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, rapport Antioxydant/DPPH•, type de solvants, pH) et le profil phénolique en particulier. (**Popovic et al., 2009**).

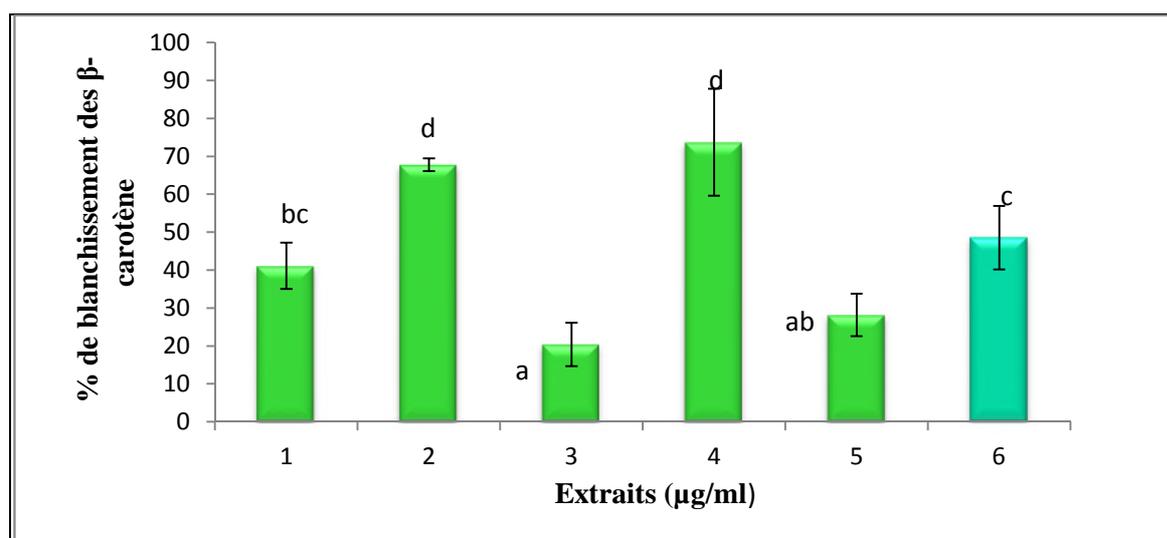
### III.3.2. Test de blanchissement de $\beta$ -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique

**Tableau VIII :** Pourcentage d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du  $\beta$ -carotène

% d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du $\beta$ -carotène.			
Extraits	<i>Pistacia lentiscus</i>		<i>Clematis flammula</i>
	Feuilles	Graines	Feuilles
Éthanol	64,07±4,84	46,29± 15,43	41,11± 6,11
Acétate d'éthyle	70,37± 1,69	59,25 ± 6,31	67,77± 1,69
Aqueux acétate d'éthyle	77,40± 15,03	55,92 ±8,33	20,37± 5,70
Chloroforme	109,25±11,34	40,74 ± 3,84	73,70± 14,06
Aqueux chloroforme	46,29 ± 8,81	47,03± 6,31	28,14± 5,59

Les résultats de l'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du  $\beta$ -carotène par les extraits de *Clematis flammula*, les feuilles et graines de *Pistacia lentiscus* sont présentés dans le tableau VIII et les figures (37,38).

Les extraits de ces deux plantes présentent des différences significatives selon le solvant d'extraction utilisé ( $p < 0,05$ ).



**Figure 37:** Pourcentage d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du  $\beta$ carotène des extraits de *Clematis flammula* à une concentration de 100  $\mu$ g/ml, 1 : Ethanol, 2 : Ethyle acétate, 3 : Aqueux d'éthyle acétate, 4 : Chloroforme, 5 : Aqueux de Chloroforme, 6 : BHA.

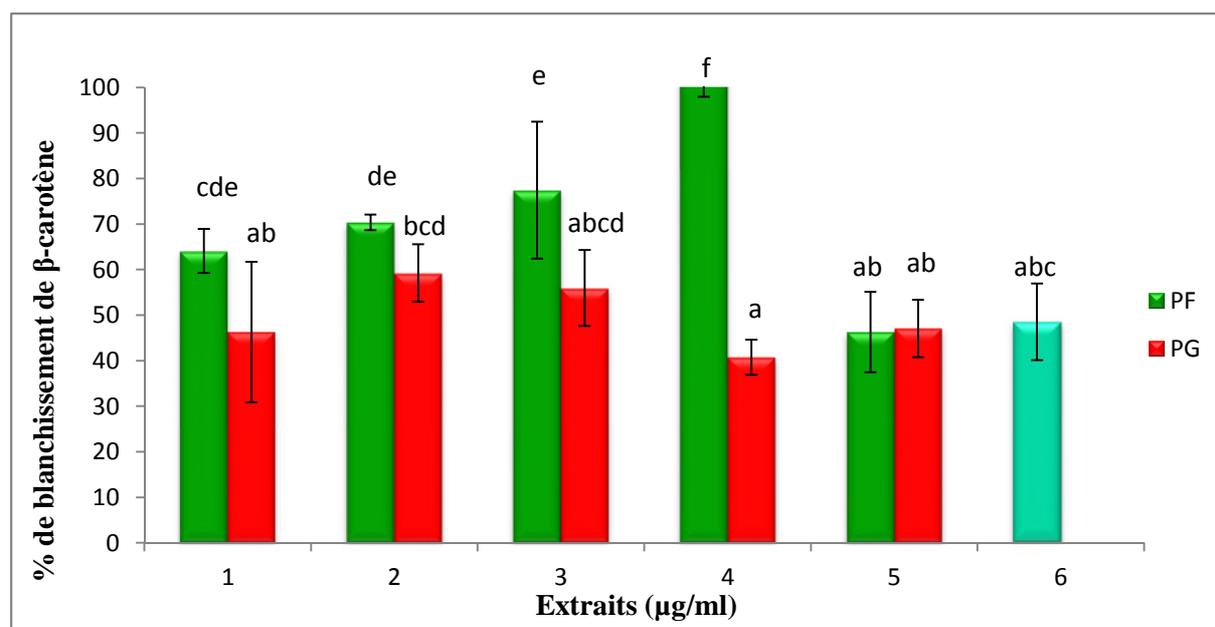
D'après la figure (37), le pourcentage d'inhibition le plus élevé de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du  $\beta$ -carotène est noté au niveau des phases organique des extrait *Clematis flammula* chloroforme et éthyle acétate avec ( $73,70 \pm 14,06\%$  et  $67,77 \pm 1,69\%$ ), respectivement. Ces pourcentages sont supérieurs même à celui de la molécule de référence BHA ( $48,51 \pm 8,38\%$ ). En plus, on remarque que les extraits aqueux présentent les plus faibles activités avec  $20,37 \pm 5,70\%$  pour l'extrait aqueux éthyle acétate et  $28,14 \pm 5,59\%$  pour aqueux de chloroforme, respectivement.

Dans le système  $\beta$ -carotène/acide linoléique un paramètre semble intervenir; la polarité de l'extrait. On peut donc expliquer l'activité des extraits apolaires par le paradoxe des phénomènes polaires comme il est décrit par **Frankel et ses collaborateurs (1994)**.

Etant donné que le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène est similaire à un système d'émulsion de lipides dans l'eau, **Frankel et Meyer (2000)** ont proposé que les antioxydants apolaires exposent des propriétés antioxydants plus importantes car ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi de prévenir la formation de radicaux lipidiques et l'oxydation du  $\beta$ -carotène. Alors que les antioxydants polaires restent dilués dans la phase aqueuse et sont ainsi moins efficaces dans la protection des lipides.

La figure suivante présente les résultats d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du  $\beta$ -carotène par des extraits de feuilles et graines de *Pistacia lentiscus* à une concentration de  $100\mu\text{g/ml}$  et la molécule de référence BHA.

D'après les résultats obtenus dans la figure (38), on remarque que le pourcentage de blanchissement de la  $\beta$ -carotène varie d'une manière significative entre tous les extraits ( $p < 0,05$ ).



**Figure 38:** Pourcentage d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du  $\beta$ -carotène des extraits de *Pistacia lentiscus* feuilles et graines à une concentration de 100  $\mu$ g/ml, 1 : Ethanol, 2 : Ethyle acétate, 3 : Aqueux d'éthyle acétate, 4 : Chloroforme, 5 : Aqueux de Chloroforme, 6 : BHA .

Pour les extraits de feuilles, tous les extraits (chloroforme, aqueux éthyle acétate, éthyle acétate, éthanol) présentent une bonne activité avec ( $109,25 \pm 11,34$  ;  $77,40 \pm 15,03$  ;  $70,37 \pm 1,69$  ;  $64,07 \pm 4,84$ ), respectivement ; supérieure même à celle de la molécule pure, BHA ( $48,51 \pm 8,38\%$ ), sauf l'extrait aqueux de chloroforme avec ( $46,29 \pm 8,81$ ) qui a noté une capacité antioxydant presque similaire à celle de BHA ( $48,51 \pm 8,38\%$ ).

Le test de blanchissement de la  $\beta$ -carotène de *Pistacia lentiscus* ne révèle pas des différences significatives entre l'extrait éthanolique et l'aqueux de chloroforme des graines ( $p < 0,05$ ). Comme le montre la figure 38, les pourcentages de cette activité varient entre ( $46,29 \pm 15,43$  ;  $47,03 \pm 6,31$ ), respectivement.

L'extrait organique et aqueux d'éthyle acétate ( $59,25 \pm 6,31$  ;  $55,92 \pm 8,33$ ), respectivement, présentent un effet supérieur à celui de BHA ( $48,51 \pm 8,38\%$ ).

Un extrait qui retarde ou inhibe le blanchissement du  $\beta$ -carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant secondaire (Liyana-Pathirana *et al.*, 2006). Selon plusieurs auteurs, le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du  $\beta$ -carotène paraît très utile comme un modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques (Ferreria *et al.*, 2006).

A cet effet, on peut dire que nos résultats sont en accord avec ceux de Atmani et al. (2009), testant la peroxydation lipidique (acide linoléique), où les taux d'inhibition de peroxydation lipidique sont notés par les extraits organiques de feuilles de *Clematis flammula* à savoir l'extrait chloroforme et acétate d'éthyle avec 99% et 97.4%, respectivement.

### III.3.3 Activité scavenging du radical ABTS<sup>•+</sup> :

L'ABTS est l'une des molécules les plus exploitées dans les études des activités anti-radicales. L'activité antioxydant totale d'une molécule est déduite de sa capacité à inhiber le radical cationique ABTS<sup>•+</sup> de coloration bleue en le transformant en ABTS incolore, en présence de proton issu d'un antioxydant (Re et al., 1999).

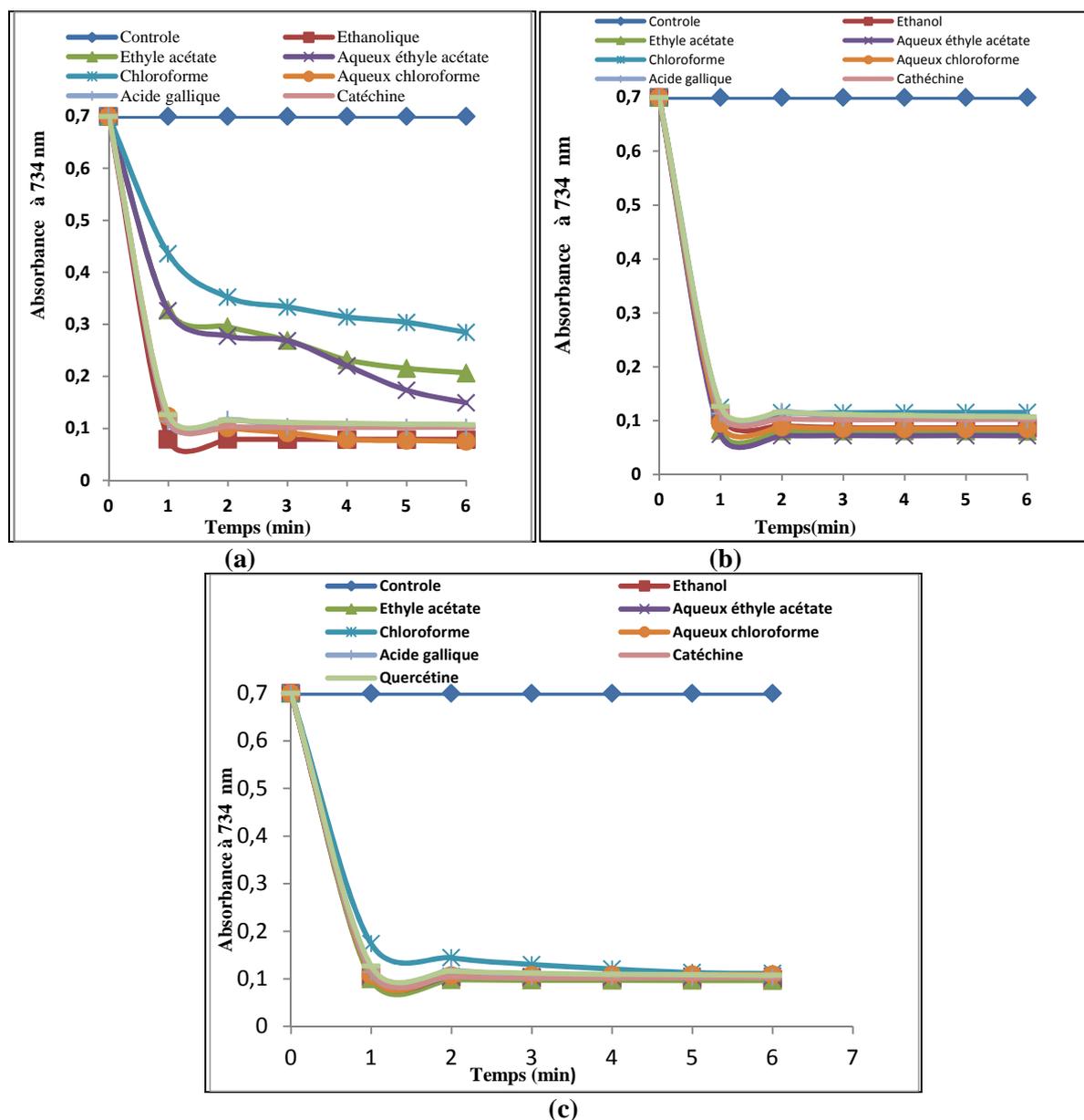
#### ➤ La cinétique de l'activité anti radicalaire ABTS<sup>•+</sup>

Le suivi de la cinétique de l'activité anti ABTS<sup>•+</sup>, en fonction du temps et cela pendant 6 minutes, a permis d'obtenir la figure (39).

Cette dernière représente la variation des absorbances des extraits de *Clematis flammula* (feuilles) et *Pistacia lentiscus* (feuilles et fruits) et molécule de référence testés en présence du radical cationique. La diminution de l'absorbance indique une bonne activité anti-radicalaire.

Les représentations de la figure (39) indiquent que toutes les absorbances sont largement inférieures à celle du contrôle (0,7 nm), ce qui traduit une grande activité scavenging de ce radical.

Aussi on remarque la stabilité de l'absorbance du radical ABTS<sup>•+</sup>, après la première minute, en présence de tous les extraits des deux plantes étudiées et molécules de références, sauf pour les trois extraits d'éthyle acétate, aqueux éthyle acétate et chloroforme de feuilles de *C.flammula* qui exhibent une diminution de l'absorbance tout au long des 6 min.



**Figure 39 :** Effet scavenger contre le radical ABTS.+ de tous les extraits de a) feuilles de *C.flammula*, b) feuilles de *P.lentiscus*, c) graines de *P.lentiscus* et certaines molécules de référence à 100µg/ml en fonction du temps.

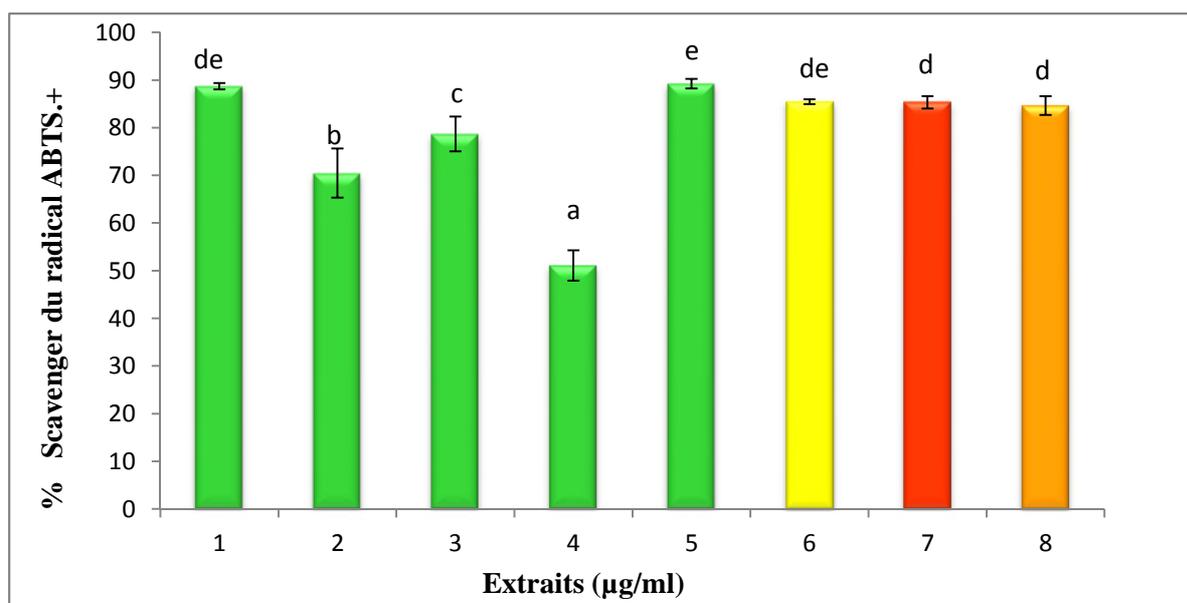
Dans ce modèle de réaction, les composés les plus actifs des extraits testés réagissent immédiatement avec le radical pendant la première minute de la réaction, où le taux d'inhibition est maximal. Alors que les polyphénols les moins actifs réagissent avec le radical pendant la deuxième phase dite lente qui est caractérisée par la stabilisation des absorbances, ce point qui définit la totalité de l'activité scavenging exprimée en pourcentage (Djeridane et al.,2006 ; Samath et al., 2008 ; Bhourri et al.,2010)

Les résultats de l'activité scavenging contre le radical ABTS<sup>+</sup>, exprimés en pourcentage d'inhibition, sont illustrés dans le tableau IX et les figures (40 et 41).

**Tableau IX** : Activité anti radicalaire contre le cation ionique l'ABTS<sup>+</sup>

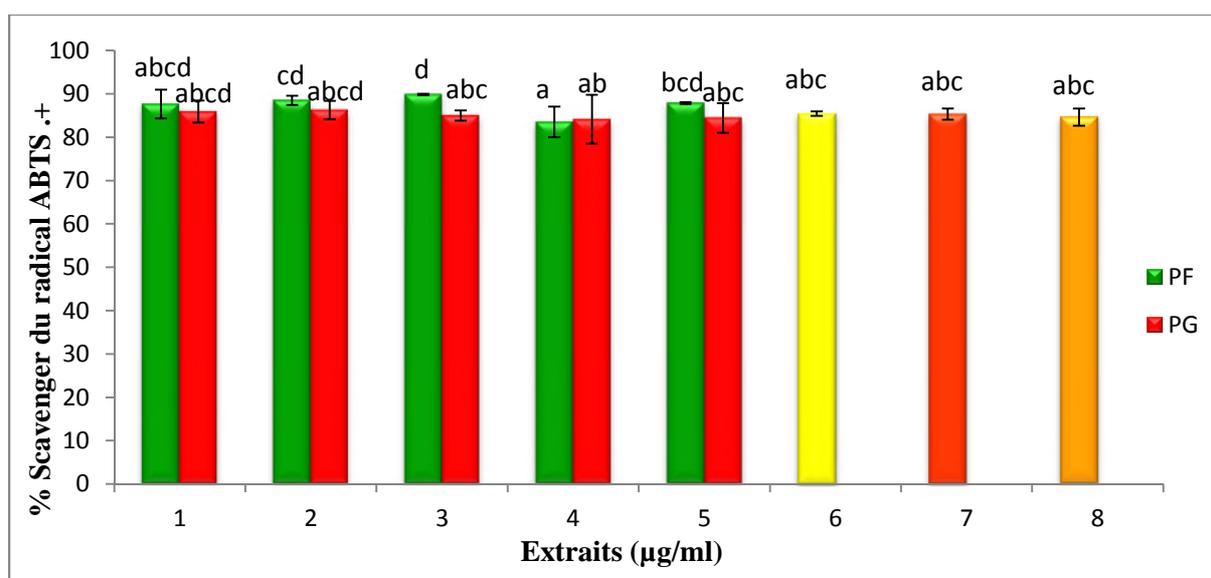
Effet anti –radicalaire contre l'ABTS <sup>+</sup> (%)			
Extraits	<i>Pistacia lentiscus</i>		<i>Clematis flammula</i>
	Feuilles	Graines	Feuilles
Éthanol	87,67 ± 3,32	85,89 ± 2,53	88,71 ± 0,67
Acétate d'éthyle	88,50 ± 1,04	86,25 ± 1,04	70,48 ± 5,17
Aqueux acétate d'éthyle	89,89 ± 0,14	85,00 ± 1,21	78,69 ± 3,19
Chloroforme	83,52 ± 3,5	84,14 ± 5,60	51,10 ± 3,19
Aqueux chloroforme	87,88 ± 0,21	84,45 ± 3,42	89,43 ± 1,02

D'après les résultats obtenus ; on a remarqué que tous les extraits de *Clematis flammula* notent une bonne activité antiradicalaire supérieure à 50%. Les meilleurs effets scavenger de cation ABTS<sup>+</sup> ont été enregistrés par l'extrait aqueux chloroforme et l'extrait éthanolique avec 89.43 ± 1.02% et 88.71 ± 0.671%, respectivement, comparativement aux trois standards testés, l'acide gallique, catéchine et quercitrine avec des valeurs 85,43 ± 0,51% ; 85,33 ± 1,31% et 84,64 ± 1,97%, respectivement, (p < 0.5), à la même concentration (100 µg/ml).



**Figure 40 :** Activité antiradicalaire contre l'ABTS<sup>•+</sup> des extraits de feuilles de *Clematis flammula* à une concentration de 100 µg/ml, 1: Ethanol, 2: Ethyle acétate, 3: Aqueux d'éthyle acétate, 4: Chloroforme, 5: Aqueux de Chloroforme, 6: acide gallique, 7: Catéchine, 8: Quercétine.

Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par Atmani et al (2011), où les valeurs les plus élevées en TEAC ont été marquées par l'extrait aqueux chloroforme et éthanolique ( $10.46 \pm 0.5$  ;  $8.3 \pm 0.3$  mmoles trolox/g extrait). Cela peut être expliqué par le fait que ces deux extraits renferment des composés phénoliques capables d'interagir avec le radical ABTS<sup>•+</sup> par transfert de proton (Re et al., 1999).



**Figure 41 :** Activité antiradicalaire contre l'ABTS<sup>•+</sup> des extraits de feuilles et graines de *Pistacia lentiscus* à des concentrations de 100 µg/ml, 1: Ethanol, 2: Ethyle acétate, 3: Aqueux d'éthyle acétate, 4: Chloroforme, 5: Aqueux de Chloroforme, 6: acide gallique, 7: Catéchine, 8: Quercétine.

L'analyse statistique indique que tous les extraits de plante *Pistacia lentiscus* ont une bonne activité contre le radical cationique ABTS<sup>•+</sup>; ainsi l'étude statistique révèle une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre les extraits des feuilles par rapport aux extraits des graines.

Les meilleures activités anti ABTS<sup>•+</sup> des extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* ont été obtenues par l'extrait aqueux d'éthyle acétate ( $89,89 \pm 0,14\%$ ) suivi par les aqueux d'éthyle acétate et chloroforme qui présentent un pourcentage de  $88,50 \pm 1,04\%$  et  $87,88 \pm 0,21\%$ , respectivement. Par la suite, les graines de *Pistacia* avec l'éthyle acétate, éthanol dont les pourcentages d'inhibition sont ( $86,25 \pm 1,04\%$  et  $85,89 \pm 2,53\%$ ), respectivement.

Par ailleurs, les extraits chloroforme de *Pistacia* feuilles et graines ont montré un faible pourcentage d'inhibition ( $83,52 \pm 3,5\%$  et  $84,14 \pm 5,60\%$ ), respectivement par rapport aux trois standards utilisés (acide gallique  $85,43 \pm 0,51\%$ ; catéchine  $85,33 \pm 1,31\%$ ; quercétine  $84,64 \pm 1,97\%$ ).

Dans la littérature, beaucoup d'auteurs ont mené des recherches afin d'expliquer le mécanisme de la réduction de l'ABTS<sup>•+</sup> par les composés phénoliques (Cai *et al.*, 2006 ; Heo *et al.*, 2007).

En effet, ils ont pu démontrer que les flavonoïdes les plus actifs sont ceux qui renferment des groupements 3'- 4' dihydroxy sur le cycle B et/ou un groupement 3 OH sur le cycle C (Amic *et al.*, 2003).

(Nakagawa *et al.*, 2005 ; Osman *et al.*, 2006) ont rapporté que l'oxydation de la catéchine par le radical cationique l'ABTS<sup>•+</sup> se produit au niveau du cycle aromatique A ; cela est dû au fait que la partie de phloroglucinol de ce cycle pourrait facilement former des liens d'hydrogène avec les radicaux.

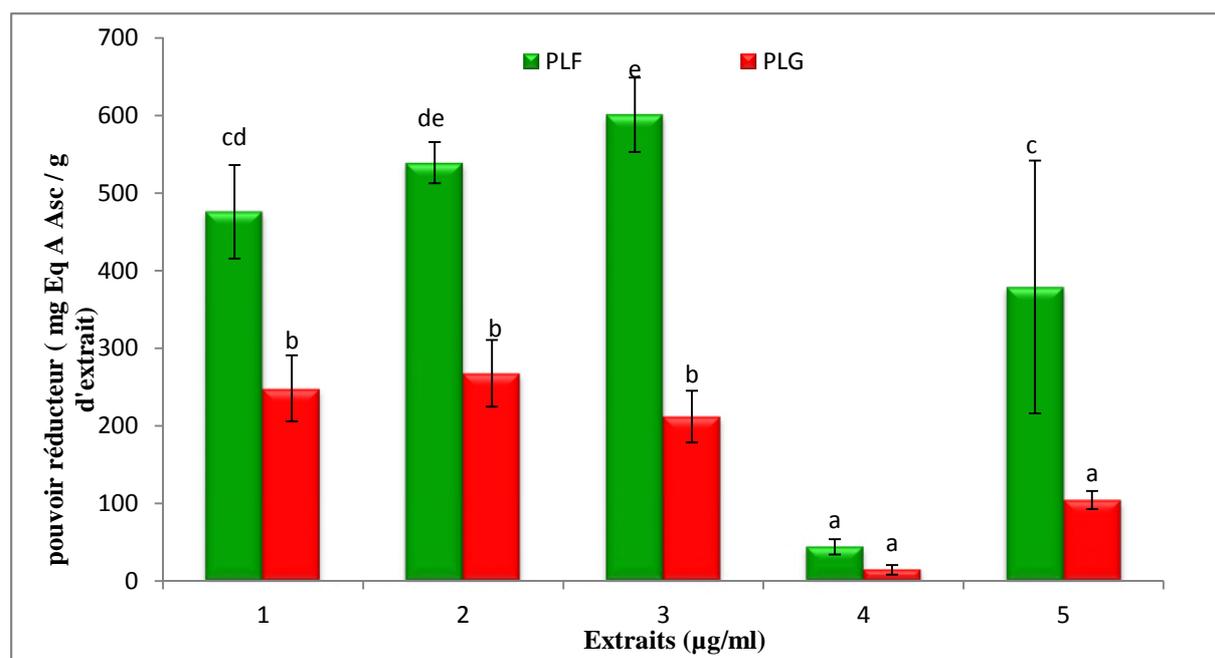
### III.3.4 Mesure du pouvoir antioxydant par la réduction du fer ferrique (test FRAP)

La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe<sup>3+</sup>/ complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, Fe<sup>2+</sup> peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleue dans le milieu réactionnel à 593 nm (Bouguandoura & Bendimerad, 2012 ; Benhammou *et al.*, 2013 ; Martorana *et al.*, 2013).

Dans cette présente étude, le pouvoir réducteur des extraits de feuilles et de graines de *Pistacia lentiscus* a été déterminé, par la mesure de l'habilité des extraits à réduire le  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$ . Les taux de réduction sont exprimés en mg d'équivalent d'acide ascorbique /g d'extrait, sont illustrés dans la figure (42).

Les résultats statistique révèlent qu'il y a une différence significative entre les différents extraits de la plante étudiée ( $P < 0,05$ ).

La figure (42) illustre que tous les extraits des feuilles et graine de *Pistacia lentiscus* présentent une activité réductrice, à l'exception de l'extrait organique du chloroforme qui enregistre de très faible pouvoir réducteur, avec une valeur de  $43,98 \pm 9,88$  mg Eq ASC/g extrait;  $14,39 \pm 6,21$  mg Eq ASC/g extrait, respectivement.



**Figure 42:** Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode FRAP des extraits de feuilles et graines de *Pistacia Lentiscus* en mg Eq d'acide ascorbique par g d'extrait., 1 : extrait éthanolique, 2 : extrait éthyle acétate, 3 : extrait aqueux acétate d'éthyle, 4 : extrait du chloroforme, 5 : extrait aqueux du chloroforme. PLF : *Pistacia lentiscus* feuille ; PLG : *Pistacia lentiscus* graine.

Les taux les plus élevés concernant les feuilles de *P.lentiscus* sont localisés au niveau des deux phases aqueuse et organique d'éthyle acétate avec  $378,88 \pm 163,11$  mg Eq ASC/g d'extrait et  $600,93 \pm 47,94$  mg Eq Asc/g extrait, respectivement. L'extrait qui marque le taux le plus faible est celui du chloroforme avec  $43,98 \pm 9,88$  mg Eq ASC/g (tableau X).

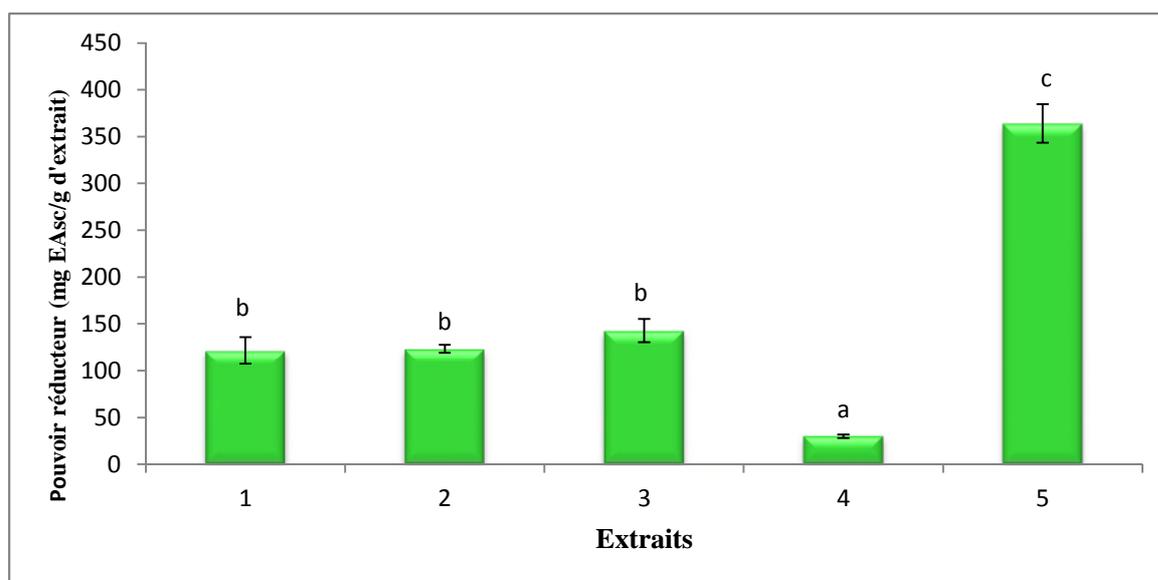
Par ailleurs, de faibles activités réductrices du  $Fe^{3+}$ , sont remarquées au niveau des extraits de fruits, où les extraits éthanolique, éthyle acétate et aqueux d'éthyle acétate marquent des activités similaires ( $P < 0,05$ ) ( $248,06 \pm 42,65$  mg Eq ASC/g d'extrait;  $267,54 \pm 43,11$ ;  $211,77 \pm 33,13$  mg Eq ASC/g d'extrait), respectivement. Tandis que le taux le plus faible est marqué par les deux phases du chloroforme, sans aucune différence significatives ( $P < 0,05$ ).

**Tableau X:** Pouvoir réducteur des extraits des feuilles et graines de *P.lentiscus*

Extrait	Feuille mg Eq ASC/g d'extrait	Graine mg Eq ASC/g d'extrait
Ethanol	475,76±60,35	248,06±42,65
éthyle acétate	539,08±26,44	267,54±43,11
aqueux d'éthyle acétate	600,93±47,94	211,77±33,13
chloroforme	43,98±9,88	14,39±6,21
aqueux du chloroforme	378,88±163,11	104,03±11,68

Plusieurs études ont rapporté la richesse de *Pistacia lentiscus* en composés phénoliques (Benhamou et al., 2008 ; Atmani et al., 2009). Ces derniers sont connus pour leur pouvoir réducteur qui est lié au degré d'hydroxylation de ces composés, au type ou à la position des substituants phénoliques qui ont une influence considérable (Rice-Evans, 1996 ; Heim et al., 2002 ; Kuçuk et al., 2007). L'étude menée par Gardeli et al. (2008) sur *Pistacia lentiscus* a montré entre autre que la capacité réductrice augmente quand deux groupements hydroxyles sont orientés en positions *ortho* ou *Para*.

Concernant les résultats du pouvoir réducteur des extraits de feuilles de *Clematis flammula*, aucune différence significative entre les trois premiers extraits notamment ; extrait éthanolique, éthyle acétate et aqueux d'éthyle acétate ( $p < 0,05$ ).



**Figure 43** : Pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP des extraits de feuille de *Clematis flammula* en mg Eq d'acide ascorbique par g d'extract, 1 : extrait éthanolique, 2 : extrait éthyle acétate, 3 : extrait aqueux d'éthyle acétate, 4 : extrait organique du chloroforme, 5 : extrait aqueux du chloroforme.

D'après la figure (43), le meilleur pouvoir réducteur des extraits de *Clematis flammula* a été obtenu par l'extrait aqueux du chloroforme avec  $363,98 \pm 20,57$  mg Eq ASC/gd'extract ; tandis que la valeur la plus faible est observée au niveau de l'extrait organique du chloroforme ( $30,05 \pm 1,48$  mg Eq ASC/g).

Les résultats obtenus dans cette étude restent assez bons comparativement à ceux rapportés par Lesjak et ses collaborateurs (2011), ils ont noté un pouvoir réducteur de  $114,81 \pm 9,9$  et  $35,26 \pm 1,12$  mg AAE/g des extraits de *Juniperus sibirica*.

**Benzie et Strain (1996)**, qualifient l'acide ascorbique comme un bon standard de référence, mais cette étude indique que le pouvoir réducteur n'est pas en relation avec la polarité des extraits puisque l'éthyle acétate de *C.flammula* qui est moins polaire que l'aqueux du chloroforme a donné une meilleure activité antioxydant. Cela peut être dû à la composition et la structure des composés contenues dans ces extraits, capables de céder des électrons (**Pietta, 2000 ; Li et al., 2008**).

### III.4. Corrélations entre les teneurs en composés bioactifs et l'activité antioxydant des extraits étudiés

#### III.4.1. Corrélation entre la teneur en composés phénoliques, vit C et le pouvoir réducteur (FRAP) des feuilles et graines de *Pistacia lentiscus*

Afin de déterminer la relation entre la teneur en composés phénoliques (proanthocyanidines, anthocyane et flavonols glycosylés), vit C des extraits de feuilles et graines de *P.lentiscus* et leur pouvoir réducteur obtenus, nous avons déterminé les coefficients de corrélation ( $r$ ), à partir des courbes de corrélation entre les teneurs en composés phénoliques et le pouvoir réducteur (FRAP) (figure 4, Annexes 2).

A partir des résultats obtenus, de très faibles corrélations ont été obtenues entre le taux en proanthocyanidines et le pouvoir réducteur au niveau des extraits des feuilles ( $r=0,017$ ) et graines ( $r= 0,088$ ) de *P.lentiscus*. Plusieurs travaux dont parmi eux : **Pantelidis et al.(2007)** ont rapporté un très bon coefficient ( $r= 0,974$ ), entre les teneurs en phénols et le pouvoir réducteur .

**Atmani et al.(2009)** ont rapporté un très bon coefficient ( $r=0,96$ ), entre les concentrations en phénols totaux et le pouvoir réducteur des extraits des feuilles de la même plante. Inversement, les teneurs en anthocyanes et flavonols glycosylés des extraits des feuilles de *P.lentiscus* sont négativement corrélées avec le pouvoir réducteur, de même l'extrait des graines de cette plante présente une corrélation négative ( $r=-0,264$ ) entre la teneur en flavonol glycosylé et le pouvoir réducteur, mais il présente une faible corrélation ( $r=0,497$ ) entre la teneur en anthocyanes et le pouvoir réducteur.

De même, pour les extraits des feuilles de *P.lentiscus*, les teneurs en vit C sont en corrélation positive avec cette activité qui présente un coefficient de corrélation de 0,698. Néanmoins un coefficient de corrélation négatif est établi pour les extraits de graines ( $r=-0,704$ ). Une étude menée par **Pantelidis et al.(2007)** a rapporté des résultats similaires, en appliquant la méthode FRAP ( $r=-0,363$ ).

**Li et al.(2014)** ont montré une corrélation entre les capacités antioxydants et le contenu phénolique total de 51 fleurs, ce sont des corrélations linéaires positives ( $R^2 = 0.911$  pour des valeurs FRAP). En outre, les résultats des fractions hydrosolubles ont montré des corrélations positives linéaires entre la capacité antioxydant et le contenu phénolique ( $R^2= 0.930$ ). Il y a une évidence qui indique que les composés phénoliques, tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques, tannins condensés et coumarins, sont habituellement les contributeurs importants des capacités antioxydants des plantes (**Li et al., 2014**).

Nos résultats concernant les teneurs en vit C des extraits des feuilles de *Pistacia* et le pouvoir réducteur dont  $r=0,698$ , sont similaires avec l'étude de **Contreras-Caldéron et al.(2011)**, qui ont rapporté des corrélations positives avec la valeur  $r=0,605$ .

**Du et al.(2009)** ont rapporté des coefficients de corrélation entre la composition en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux, flavonols totaux et vit C des fruits d'*Actinidia* et la capacité antioxydant par la méthode FRAP avec  $r=0,96$  ;  $r=0,68$ ,  $r=0,67$  ;  $r=0,96$ , respectivement.

Ces résultats expliquent la relation et l'importance de la nature de polyphénols avec le pouvoir réducteur du  $Fe^{2+}$  et confirme, que la concentration en polyphénols, n'est pas le seul critère d'une bonne corrélation.

### III.4.2 Corrélation entre la teneur en composés phénoliques, vit C et l'activité scavenging du cation $ABTS^{\cdot+}$ des feuilles et graines de *Pistacia lentiscus*

Dans cette étude, la détermination des coefficients de corrélation entre les teneurs en vit C et l'activité scavenging des extraits des feuilles et graines de *P.lentiscus* a révélé des valeurs positives et négatives moyennes avec ( $r = 0,538$ ) et ( $r = - 0,209$ ), respectivement (Annexe 2).

Nos résultats sont similaires avec ceux de **Contreras-Caldéron et al.(2011)**, qui ont rapporté des corrélations positives entre la teneur en AA et l'activité antioxydant mesuré par la méthode ABTS, avec ( $r = 0,512$ ).

**Garzon et Wrolstad, 2009** ont rapporté des corrélations significatives entre l'acide ascorbique et l'activité antioxydant des fruits déterminée par l'ABTS.

Des coefficients de corrélations négatives faibles ont été obtenus entre la teneur en proanthocyanidines, anthocyane et flavonols glycosylés des extraits des feuilles de *P.lentiscus*. Néanmoins des corrélations positives faibles ont été obtenues entre la teneur en proanthocyanidines et anthocyanes des extraits des graines de *P. lentiscus* avec  $r=0,105$  et  $r=0,092$ , respectivement.

Tandis que la teneur en flavonol glycosylé des extraits des graines de *Pistacia* avec l'effet scavenger du radical  $ABTS^{\cdot+}$  présente un coefficient de corrélation très faible et négatif ( $r = - 0,089$ ).

Des Coefficients de corrélation ont été rapportés par **Du et al.(2009)**, entre la composition en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux, flavonols totaux et vit C des fruits d'*Actinidia* et la capacité antioxydant par la méthode  $ABTS^{\cdot+}$  avec  $r=0,84$  ;  $r=0,50$  ;  $r=0,49$  ;  $r=0,91$ , respectivement.

### III.4.3. Corrélation entre la teneur en composés phénoliques, vit C et l'activité scavenging du radical DPPH des feuilles et graines de *Pistacia lentiscus*

La corrélation entre la teneur en composés phénoliques, notamment proanthocyanidines, anthocyane et flavonol glycosylé des extraits des feuilles de *P.lentiscus* et l'effet scavenging du DPPH a révélé des coefficients de corrélation faibles négatifs. Concernant la vit C, une corrélation positive a été déterminé avec un coefficient de corrélation de  $r= 0,626$  ( Annexes 2).

Les extraits des graines de *Pistacia* montrent deux corrélations faibles négatives entre la teneur en vit C ( $r= - 0,252$ ), en proanthocyanidines ( $r = - 0,401$ ) et l'activité radicalaire. Cependant deux corrélations positives entre la teneur en anthocyane, flavonols glycosylés et cette activité, avec  $r= 0,158$  et  $r=0,404$ , respectivement (figure 6).

**Atmani et al.(2009)** ont rapporté une forte corrélation entre l'activité anti DPPH de l'extrait de *Fraxinus angustifolia* ( $r=0,97$ ) et *Clematis flammula* ( $r=0,85$ ).

Des valeurs de coefficient de corrélation en polyphenols totaux, flavonoïdes totaux, flavonols totaux et vit C des Fruits d'Actinidia et la capacité antioxydant par la méthode DPPH, ont été déterminé par **Du et al.(2009)**, dont les valeurs sont  $r=0,81$  ;  $r=0,53$  ;  $r=0,51$  ;  $r=0,83$ , respectivement.

**Motamed et Naghibi. (2010)** ont révélé des coefficients de corrélation entre DPPH et les flavonoïdes totaux ( $r=0,64$ ) et les composés phénoliques ( $r=0,59$ ) lors de l'étude des propriétés d'une plante comestible de la région Turkmène de Sahara.

### III.4.4 Corrélation entre la teneur en composés phénoliques, vit C et le test de blanchissement du $\beta$ -carotène des feuilles et graines de *Pistacia lentiscus*

L'étude entre la teneur en vit C, en flavonols glycosylés des extraits des feuilles et graines de *P.lentiscus* et le test de blanchissement, rapporte des coefficients de corrélation faibles négatifs, avec  $r = - 0,384$  ;  $r = - 0,0085$  ;  $r = - 0,291$  et  $r = - 0,110$ , respectivement (Annexex2).

Néanmoins, de bonnes corrélations positives entre la teneur en proanthocyanidines, anthocyanes des extraits des feuilles de *Pistacia* et le test de blanchissement avec les coefficients  $r=0,500$  et  $r=0,766$ , respectivement.

Tandis que ceux des graines présentent des coefficients de corrélation très faibles, négatifs ( $r = - 0,203$  ;  $r = - 0,001$ ), respectivement (figure 7).

Une étude établie par **Ao et al.(2008)** sur l'activité antioxydant et le contenu en phénols totaux des extraits de *F.microcarpa* et le test de blanchissement de  $\beta$ -carotène, rapporte des corrélations positives, la valeur de coefficient de corrélation est de 0,534. Les résultats suggèrent que les composés phénoliques contribuent de manière significative à la capacité antioxydant.

**Conde-Hernández et Guerrero-Beltrán, 2014** ont signalé que l'activité antioxydant des plantes est bien corrélée avec les composés phénoliques dans quelques plantes.

**Moure et al. (2000)** ont précisé que l'activité antioxydant des composés phénoliques peut dépendre des facteurs tels que les conditions de croissance, qualité et origine (endroit géographique) des plantes aussi bien que les méthodes d'extraction et de purification (type et polarité de solvants et états d'extraction) employées pour déterminer l'activité antioxydant.

**Amessis- Ouchemoukh et al.(2014)** ont constaté que des extraits de plantes ayant le potentiel d'empêcher ou de réduire au minimum la décoloration rapide du  $\beta$ -carotène, qui contiennent des teneurs phénoliques élevées, le coefficient de corrélation entre ces composés et l'activité était très élevé ( $r = 0.75$ ).

### III.4.5 Corrélation entre la teneur en composés phénoliques, vit C et le pouvoir réducteur (FRAP) des feuilles de *Clematis flammula*

Plusieurs études ont montré une activité antioxydant élevée des composés phénoliques de différentes espèces de plantes médicinales (**Tapia et al ., 2004**). Cette activité antioxydant dépend de plusieurs facteurs tels que la structure, le nombre et la position des groupement hydroxyles présents dans la molécule (**Balasundram et al ., 2005**).

A partir des résultats obtenus, on constate des coefficients de corrélation négatifs moyens entre les teneurs en vit C, proanthocyanidine et anthocyanes des extraits de feuilles de *C.flammula* ( $r = - 0,56$  ;  $r = - 0,68$  ;  $r = - 0,55$ ), respectivement. Néanmoins, une corrélation positive faible est établie entre la teneur en flavonols glycosylés des extraits de feuilles de *C.flammula* et le pouvoir réducteur avec  $r=0,18$  (figure 8).

Une étude a été établie par **Benmeddour et al. (2013)** montre une corrélation positive entre la teneur en flavonols glycosylés et proanthocyanidines, des extraits de *Phoenix dactylifera L* et le pouvoir réducteur avec  $r=0,62$  et  $0,85$ , respectivement.

#### III.4.6 Corrélation entre la teneur en composés phénoliques, vit C et l'effet scavenger de l'ABTS<sup>+</sup> des feuilles de *Clematis flammula*

Dans cette étude, la détermination des coefficients de corrélation fort négatifs entre la teneur en vit C et anthocyanes (annexe 2) et l'effet scavenger du radical cationique ABTS<sup>+</sup>, de même, pour les proanthocyanidines et flavonols glycosylés ; ont révélés des corrélations négativement faibles (figure 9).

Une valeur de corrélation entre la teneur en flavonoïdes et l'activité anti ABTS<sup>+</sup> de  $r=0,66$  à été déterminée par **Hmid et al ., 2013**.

#### III.4.7 Corrélation entre la teneur en composés phénoliques, vit C et effet scavenger du DPPH des feuilles de *Clematis flammula*

D'après la figure (10) (annexe 2), il est à noter, que des coefficients de corrélation négatifs moyens ont été obtenus entre la teneur en vit C, proanthocyanidines et anthocyanes des extrait des feuilles de *C. flammula* et l'effet scavenger du radical DPPH avec  $r = - 0,38$  ;  $r = - 0,58$  ;  $r = - 0,52$  , respectivement . Cependant une corrélation positive faible a été révélée par la teneur en flavonols glycosylés ( $r=0,15$ ).

**Benmeddour et al. (2013)** montrent une corrélation positive entre la teneur en flavonols glycosylés, proanthocyanidines, phénols totaux des extraits de *Phoenix dactylifera L* et l'effet scavenger du DPPH avec  $r=0,62$  ;  $r= 0,62$  ;  $r= 0,80$ , respectivement.

**Atmani et al.(2009)** ont montré une forte corrélation entre l'activité scavenger du DPPH et les extraits des feuilles de *C. flammula* avec  $r=0,85$ .

#### III.4.8 Corrélation entre la teneur en composés phénoliques, vit C et le test de blanchissement du $\beta$ - carotène des feuilles de *Clematis flammula*

Dans cette étude, la détermination des coefficients de corrélation entre la vit C et les flavonols glycosylés a révélé des valeurs moyennes autant pour les extraits des feuilles de *C. flammula* ( $r=0,42$  ;  $r=0,55$ ), respectivement. Cependant, des coefficients de corrélation négatifs très faibles sont établis entre la teneur proanthocyanidines et le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène des extraits de *C. flammula*. Alors qu'une très bonne corrélation est enregistrée entre le test de blanchissement du  $\beta$ - carotène et les anthocyanes avec  $r=0,92$ .

### Conclusion

Les plantes médicinales ont été utilisées pendant longtemps par les populations pour le traitement des maladies. Jusqu'à ce jour, moins de 10% des espèces végétales qui occupent la planète ont été explorées pour leurs propriétés chimiques et biologiques. La validation scientifique pour cette utilisation a concerné deux plantes *Clematis flammula* et *Pistacia lentiscus*.

Les résultats obtenus des dosages quantitatifs des composés phénoliques (flavonols glycosylés et proanthocyanidines) des extraits de plantes étudiées indiquent la richesse des extraits aqueux de chloroforme de feuilles et graines de *Pistacia lentiscus* et celui de *Clematis flammula* avec  $20271,06 \pm 423,72$  ;  $20650,32 \pm 839,24$  mg Eq C-3-G /100g d'extrait en flavonols glycosylés.

Le taux le plus élevé en proanthocyanidines est noté au niveau des phases organiques ( $38,16 \pm 3,06$  mg EC/g d'extrait) pour les feuilles de *Clematis f.* et au niveau de l'extrait éthanolique des deux parties de *Pistacia lentiscus*  $62,50 \pm 3,39$  mg EC/g d'extrait Pour les feuilles, et  $31,47 \pm 0,61$  mg EC/g d'extrait pou les graines.

De même, Pour les feuilles de la *Clematis flammula* et *Pistacia lentiscus*, c'est les phases organiques qui notent les meilleurs teneurs en anthocyanes, alors que c'est au niveau des l'extrait éthanolique et l'aqueux éthyle acétate ( $4460,17 \pm 60,42$  ;  $4974,88 \pm 50,60$  mg C3G/ 100g d'extrait) que ces composés se concentrent pour les graines de *Pistacia l.*

L'étude de la teneur en vit C avec la première méthode de dosage, des trois parties étudiées (feuilles et graines de *Pistacia* et feuilles de *Clematis*) dans les différents états, c'est-à-dire, la poudre et le matériel végétal frais, nous a permis de conclure que :Ce sont les feuilles en poudre de *C.flammula* qui présentent la teneur la plus élevée avec  $17801,87 \pm 1373,77$  mg EAA/100g d'extrait puis les graines de *pistacia lentiscus* ( $14966,91 \pm 2293,69$  mg EAA/100g MV). Donc ils peuvent être classés comme suit : CFF poudre > PLG poudre > PLF frais > PLF poudre > CCF frais.

Pour le dosage de la vit C des extraits des feuilles et graines de *P. lentiscus*, les résultats indiquent la richesse des feuilles au niveau des phases éthanoliques et aqueuses d'éthyle acétate ( $90134,80 \pm 13796,97$  ;  $106883,17 \pm 10204,24$  mg EAA/ 100g d'extrait, respectivement).Alors que c'est la phase organique de chloroforme avec  $73182,18 \pm 4347,18$  mg EAA/100g d'extrait qui note la valeur la plus grande en vit C pour les feuilles de *Clematis flammula*.

## Conclusion et perspective

---

Les résultats des activités antioxydant nous a permis de conclure que :

- Les activités anti-radicalaires des deux plantes étudiées, montre que la *P.lentiscus* présente les pourcentages les plus élevés (feuilles et graines).
- L'extrait aqueux et organique d'éthyle acétate des feuilles et graines de *P.lentiscus* présentent les meilleurs effet scavenger contre DPPH ( $93,63 \pm 0,25$ ) et ( $94,53 \pm 2,15$  %), respectivement. Alors que c'est l'extrait aqueux de chloroforme de la *C.flammula* qui présente la meilleure activité ( $71,80 \pm 4,3$  %).

Le meilleur pourcentage d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique par la  $\beta$ -carotène est exhibé par les phases organiques, l'extrait organique du chloroforme des feuilles des deux plantes ( $109,25 \pm 11,34$  ;  $73,70 \pm 14,06$ %) et l'extrait éthyle acétate des graines avec  $59,25 \pm 6,31$  %.

- Le meilleur effet scavenger des extraits de *Pistacia l.* contre l'ABTS<sup>+</sup> est marqué au niveau des extraits aqueux et organique d'éthyle acétate des feuilles ( $89,89 \pm 0,14$  % ;  $88,50 \pm 1,04$  %) et graines ( $85,00 \pm 1,21$  % ;  $86,25 \pm 1,04$ %), respectivement. La *Clematis f.* présente des meilleurs pourcentages aux niveaux des phases aqueuses du chloroforme ( $89,43 \pm 1,02$ %) et ethanoliques ( $88,71 \pm 0,67$ %).
- L'activité antioxydant par le test FRAP indique que les feuilles de *Pistacia l.* qui présentent les meilleures activités réductrices par rapport aux graines, ceci au niveau des phases organiques et aqueuses d'éthyle acétate ( $539,08 \pm 26,44$  ;  $600,93 \pm 47,94$  mg Eq ASC/g, respectivement). Le meilleur pouvoir réducteur de la *Clematis f.* est obtenu par l'extrait aqueux de chloroforme ( $363,98 \pm 20,57$  mg Eq ASC/g).

L'ensemble des résultats obtenus au fil de cette étude n'est qu'une étape préliminaire, Alors, il est souhaitable d'accomplir et d'enrichir ce travail par :

- ❖ L'évaluation de l'activité biologique *in vivo* des extraits de ces deux plantes sur des animaux représentant des pathologies.
- ❖ L'étude de d'autres parties de plantes étudiées afin de déterminer l'organe le plus riche en antioxydants.
- ❖ Dosage d'autres composés bioactives comme les caroténoïdes, et de caractérisation des composés responsables de l'activité antioxydant par HPLC, RMN, SM...etc.

## Références bibliographie

---

### -A-

**Adedapo, A. A.; Jimoh, F. O.; Afolayan, A. J. & Masika, P. J. (2009).** Antioxidant Properties of the Methanol Extracts of the Leaves and Stems of *Celtis africana*. *Records of Natural Products*. 3(1).

**Aké, C.B.; Koné, M. W.; Kamanzi, A. K. & Aké, M. (2006).** Evaluation de quelques propriétés biologiques de produits de cueillette non ligneux vendus sur les marchés d'Abidjan et ses environs. *Pharm. Méd. Trad. Afr.* 14 : 1-17

**Amessis-Ouchemoukha, N.; Madania, K.; Faléb, P.L.V.; Serralheiro, M.L.; Araújo, M.E.M. (2014).** Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. *Industrial Crops and Products* .53: 6–15.

**Amic, D.; Davidovic-Amic, D.; Beslo, D. & Trinajstić N. (2003).** Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemical Acta*. 76: 55-61.

**Ansari, S.H.N. & Siddiqui, A.N. (2012).** *Pistacia lentiscus*: a review on phytochemistry and pharmacological properties. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4: 16-20.

**Antolovich, M.; Prenzler, P.D.; Patsalides, E.; Mc Donald, S. & Robard, K.(2001).** Methode for testing antioxidant activity. *Analyst*. 127:183-198.

**Ao, C.; Li, A.; Elzaawely, A. A.; Xuan, T. D. & Tawata, S. (2008).** Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Ficus microcarpa L.* fil. extract. *Food control*. 19(10): 940-948.

**Atmani, D.; Chaher, N.; Berboucha, M.; Ayouni, K.; Lounis, H.; Boudaoud, H.; Debbache, N.; Atmani, D. ( 2009).** Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*. 112: 303–309.

**Atmani, D.; Begoña Ruiz-Larrea, M.; Ruiz-Sanz, J.; Lizcano, L.; Bakkali, F.; Atmani, D. (2011).** Antioxidant potential, cytotoxic activity and phenolic content of *Clematis flammula* leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* .5(4): 589-598.

### -B-

**Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S.(2005).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99: 191–203

## Références bibliographie

---

- Bellakhdar , J. (1978).** Médecine traditionnelle et toxicologie ouest - saharienne, contribution à l'étude de la pharmacopée marocaine. *Edition technique Nord-africaine*. p : 357.
- Bellakhdar, J. (1997).** La pharmacopée marocaine traditionnelle Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Saint. Etienne. *Edition. Ibis Press*. p :764.
- Benhammou, N.; Bekkara, F.A. & Panovska, T.K. (2008).** Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts atlantica extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2(2):22-28.
- Benhammou, N.; Ghambaza, N.; Benabdelkader, S.; Atik-Bekkara, F. & Kadifkova Panovska, T. (2013).** Phytochemicals and antioxidant properties of extracts from the root and stems of *Anabasis articulata*. *International Food Research Journal*. 20(5): 2057-2063.
- Benmeddour, Z.; Mehinagic, E.; Meurlay, D. L. & Louaileche, H. (2013).** Phenolic composition and antioxidant capacities of ten Algerian date ( *Phoenix dactylifera L.*) cultivars: A comparative study. *Journal of Functional Foods*. 5(1): 346-354.
- Benzie, I. & Strain, J. (1996).** The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*. 239: 70–76.
- Berboucha, M.; Ayouni, K.; Atmani, D.; Atmani,D.& Benboubetra, M. (2010).** Kinetic Study on the Inhibition of Xanthine Oxidase by Extracts from Two Selected Algerian Plants Traditionally Used for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Journal of Medicinal Food*, 13 (4): 1–9.
- Berger, M.M.(1995).** Role des oligo-éléments et des vitamines en nutrition périopératoire. *Nutr. Clin. Metabol.* 9 (1) : 91-103.
- Bernard, B. P. (1997).** Musculoskeletal disorders and workplace factors: a critical review of epidemiologic evidence for work-related musculoskeletal disorders of the neck, upper extremity, and low back. In *Musculoskeletal disorders and workplace factors: a critical review of epidemiologic evidence for work-related musculoskeletal disorders of the neck, upper extremity, and low back*. NIOSH.
- Boizot, N & Charpenter, J.P. (2006).** Méthodes rapides d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Chemical Reviews*, 81:79-81.
- Bonnefont-Rousselot, D.; Peynet, J.; Beaudeau, J. L., Thérond, P.; Legrand, A. & Delattre, J. (2002).** Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose. *Nutrition clinique et métabolisme*. 16(4) : 260-267.
- Bougandoura, N. & Bendimerad, N. (2012).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha sp.Nepeta (L.)* Briq. *Revue « Nature & Technologie »*. B- Sciences Agronomiques et Biologiques. n° 09 : 14-19.

## Références bibliographiques

---

**Brémaud, C. (2006).** Alimentation, santé, qualité de l'environnement et du cadre de vie en milieu rural: *Module MP3 Bac professionnel Services en milieu rural*. Educagri Editions. p:106-108.

**Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. *Technique et documentation*, p : 1120.

**Bruneton, J. (2009).** Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. 4<sup>ème</sup> édition, Ed Lavoisier, p : 259-420.

-C-

**Cai, Y.Z.; Sun, M.; Xing, J.; Luo, Q & Corke, H. (2006).** Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plant. *Life Science*. 78:2872-2888.

**Cao, G.; Sofic, E. & Prior, R. L. (1997).** Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids. Structure–activity relationships. *Free Radic Biol Med*. 22(5):749–760.

**Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Herndàez, M.L.; Pàez- Herndàez, M.E.; Rodrigues, J.A. & Gàlan-Vidal, C.A. (2009).** Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 113: 859-871.

**Chaing, H.S.; Juilo, Y. & Lu, F.J. (1994).** Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Alsophila Spinulosa* (hook) Tryon. *Journal of Enzyme Inhibition*. 8(1):61-71.

**Chanforan, C. (2010).** Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation: études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate (Doctoral dissertation, Université d'Avignon).

**Chepda, T.; Perier, C.; Chamson, A. & Frey, J. (1999).** Effets pro-et antioxydants de l'ascorbate. *Nutrition clinique et métabolisme*. 13(2) : 115-120.

**Cherbal, A.; Kebeich, M.; Madani, K.; El-Adawi, H. (2012).** Extraction and valorization of phenolic compounds of leaves of Algerian *pistacia lentiscus*. *Asian Journal of Plant sciences* .11(3):131-136.

**Conde-Hernández, L. A. & Guerrero-Beltrán, J. Á. (2014).** Total phenolics and antioxidant activity of *Piper auritum* and *Porophyllum ruderale*. *Food chemistry*. 142:455-460.

**Contessa, C.; Mellano, M. G.; Beccaro, G. L.; Giusiano, A. & Botta, R. (2013).** Total antioxidant capacity and total phenolic and anthocyanin contents in fruit species grown in Northwest Italy. *Scientia Horticulturae*. 160 : 351-357.

## Références bibliographie

---

**Contreras-Calderón, J.; Calderón-Jaimes, L.; Guerra-Hernández, E. & García-Villanova, B. (2011).** Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*. 44(7): 2047-2053.

**Cook, C.N.& Sammam, S. (1996).** Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutrional Biochemistry*. 7:66-76.

### -D-

**Derbel, S.; Ghedira, K.(2005).**les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie et Nutrition*. 1 : 28-34.

**Djeridane, A.; Yousfi, M.; Nadjemi, B .; Vidal , N.; Lesgards, JF.; Stocker, P . (2007)** Screening of some A Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *European Food a Research and Technology*. 224: 801-809.

**Du, G.; Li, M.; Liang, D. (2009).** Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and Vitamin C in Actinidia fruits. *Food Chemistry* .113: 557–562.

**Duenas M.; Perez-Alonso, J.J.; Santos-Buelga, C. & Escribano, T.(2008).** Anthocyanin composition in fig(*Ficus carica L*).*Journal of Food Composition and Analysis*.

**Durand, G. & Beaudeau, J. L. (2011).** Biochimie médicale: marqueurs actuels et perspectives. *Lavoisier*.

### -E-

**El Ouafi, F. (1997).** Contribution à l'étude des plantes médicinales du Maroc. *Thèse Doctorat vétérinaire d'I.A.V Hassan II, Rabat*.

**Escribano-Bailon, M. T. & Santos-Buelga, C. E. L. E. S. T. I. N. O. (2003).** Polyphenol extraction from foods. *Methods in Polyphenol Analysis*. 1-16.

**Es-Safi, N-E.; Kollmana, A.; Khlifc, S.; Ducrot, P-H. (2007).** Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum L.* structure-activity relationship.*LMT*. 40:1648-1653.

### -F-

**Fabani, M.; Lunaa, L.; Baroni, M.; Monferran , M.; Ighani, M.; Tapiaa, A.; Wunderlinb, D.(2013).** Pistachio (*Pistacia veravar* Kerman) from Argentinean cultivars. A natural product with potential to improve human health. *Journal of Functional Foods* .5 : 1347 – 1356.

## Références bibliographiques

---

**Favier, A. (2003).** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique* . 14: 108-115.

**Feidemann, J. (2005).** World Spices Plants: Economic Usage, Botany, Taxonomy Springer Verlag. Berlin Heidelberg. European Union. p: 196.

**Foucher, F.; Morin, J.; Courtiade, J.; Cadioux, S.; Ellis, N.; Banfield, M. J. & Rameau, C.(2003).** Determinate and late flowering are two terminal flower1/centroradialis homologs that control two distinct phases of flowering initiation and development in pea. *The Plant Cell Online*.15(11): 2742-2754.

**Ferreria, A.; Proenca, C.; Serralheiro, M.L.M.; Araujo, M.E.M. (2006)** .The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plant from Portugal. *Journal of Eethnopharmacology*. 108: 31-37.

**Fimognari, C.; Berti, F.; Cantelli-Forti, G.; Hrelia, P.( 2004).** Effect of cyanidine 3-O-glucopyranoside on micronucleus induction in cultured human lymphocytes by four différents mutagens. *Environ. Mol Mutagen*. 43: 45-52.

**Francis, F. (1992).** A new group of food colorants Trends in Food. *Science &Technology* .3: 34-39.

**Frankel, E. N.; Huang, S.-W.; Kanner, J.; German, J.B. (1994).** Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs. emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42:1054-1059.

**Frankel, E.N. & Meyer, A.S. (2000).** The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80: 1925-1940.

-G-

**Ganjewala, D.; Boba, S. & Raghavendra, A.S. (2008).** Sodium nitroprusside affects the level of anthocyanin and flavonols glycosides in pea (*Pisum Sativum L.* cv. Arkel) leaves. *Acta Biologica Szeged.hu/ABS* .52(2): 301-305.

**Gardé- albert, A.M.; Bonnefont, D.R.; Abedinzadeh, Z.; & Jore. D. ( 2003 ).** Espèce réactives de l'oxygène : comment l'oxygène peut-il devenir toxique. *L'actualité Chimique*.91-95.

**Garzón, G.A.; Wrolstad , R.E.( 2009)** .Major anthocyanins and antioxidant activity of Nasturtium flowers (*Tropaeolum majus*).*Food Chemistry* .114 :44-49.

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

## Références bibliographie

---

**Goudable, J. & Favier, A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition clinique et métabolisme*. 11(2) :115-120.

-H-

**Hagerman, A.E & Bulter ,I.G.(1978).** Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Agriculture and Food Chemistry*. 26: 809-812.

**Hagerman, A.E. (2002).** Tannins chemistry in tannins handbook. Hagerman laboratory, Miami University, Oxford,USA.

**Halliwel, B.& Guettridge, J.M.C. (1999).** *Free radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. Oxford University Press.

**Havesteen, B .H.(2002).**The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*.96:67-202.

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

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

**Hernandez, Y.; Gloria Lobo, M.; Gonzalez , M.(2006).** Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods . *Food Chemistry*. 96 : 654–664.

**Hmid, I.; Elothmani, D.; Hanine, H.; Oukabli, A. & Mehinagic, E. (2013).** Comparative study of phenolic compounds and their antioxidant attributes of eighteen pomegranate (*Punica granatum L.*) cultivars grown in Morocco. *Arabian Journal of Chemistry*. 38: 13-17.

**Hossu, A. ; Radulescu, C.; Ionita, I.; Moater, M. (2006).** Methodes spectrophotometriques et chromatographiques pour la determination de la vitamine c. *Scientific Study & Research* .1: 32-38.

-J-

**Jakobek, L.; Šeruga, M.; Voća, S.; Šindrak, Z. & Dobričević, N. (2009).** Flavonol and phenolic acid composition of sweet cherries (cv. Lapins) produced on six different vegetative rootstocks. *Scientia horticulturae*. 123(1): 23-28.

-K-

## Références bibliographiques

---

**Kahn, N. (2006).** Mise en évidence de la stabilisation de la couleur par différents tannins de pépins de raisin. *Revue des Oenologie* .N°118.

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

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

**Kong, J-M.; Chiaa, L-S.; Goha, N-K.; Chia, T-F.; Brouillard, R. (2003).** Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* .64: 923–933.

**Kostova, I.; Raleva, S.; Genova, P. & Argirova, R. (2006).** Structure-activity relationships of synthetic coumarins as HIV-1 inhibitors . *Bioinorganic Chemistry and Applications*.

**Kroyer, R. (2003).** FSI analysis in supersonic fluid flow. *Computers & structures*. 81(8): 755-764.

**Küçük, M.; Kolaylı, S.; Karaoğlu, Ş.; Ulusoy, E.; Baltacı, C.; Candan, F.(2007).** Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*. 100 : 526–534.

-ℒ-

**Laguerre, M.; López-giraldo, L.; Lecomte, J.; Pina, M.; Villeneuve, P. (2007).** Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante. *OCL* .14 : 278-293 .

**Landrier, J.F. (2011 ).** Vitamine E et physiologie du tissu adipeux. *OCL*. 18(2) : 83-87.

**Lee, K. W.; Kim, Y. J.; Lee, H. J. & Lee, C. Y. (2003)** Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem*. 51 :7292-7295.

**Lesjak, M.; Beara, I.; Orčić, D.; Anačkov, G. ; Balog, K.; Francišković, M.; Mimica-Dukić. N. ( 2011) .** *Juniperus sibirica* Burgsdorf. as a novel source of antioxidant and anti-inflammatory agents. *Food Chemistry*. 124 : 850–856.

**Li, K.; Geng .; Simonsen, J. & Karchesy. (2004).** Novel wood adhesives from condensed tannins and polyethylenimine. *Internationa Journal of Adhesion and Adhesives*. 24: 327-333.

**Lila, M.A.(2004).**Anthocyanins and human health: an *in vitro* investigative approach. *BioMed Research International*. (5):306-313.

**Lingani-Sawadogo, H.; Thiombiano, G.; Traore. S.A.(2005).** Effets du stockage sur la vitamine C, les caroténoïdes et le brunissement de la mangue (*Mangifera indica L*) Amélie séchée.rev.CAMES- séier A. 03.

## Références bibliographie

---

**Liyana-Pathirana, C.M., Shahidi, F. (2006).** Antioxydant proprieties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivium* L.) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86: 477-485.

**Luigia, L.; Scardino, A. & Vasapollo ,G. (2007).** Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrina* L. *Innovative Food Science And Emerging Technologies*. 8 (3): 360- 364.

**Luigia ,L.; Platini, F.; Scardino, A.; Alabiso , O.; Giuseppe, V. & Tessitore .L. (2008).** Autophagy inhibition enhances anthocyanin-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther.*7: 2476-2485.

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

-M-

**Macheix, J.J. ;Fleuriet, A. & Jay-Allemand, C.(2005).** Les composés phénoliques des végétaux. *Presses polytechniques et Universitaires Romandes*. P :192.

**Macheix, J.; Fleuriet, A. & Sarni-Manchado, P. (2006).** Composés phénoliques dans la plante, structure, biosynthèse, répartition et rôle. In :Les polyphénols en agroalimentaire .Edition *Technologie et document*. Paris . P : 380-398.

**Mahmoudi, S. ; Khali, M. & Mahmoudi, N. (2013).** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L). *Revue « Nature & Technologie »*. B- Sciences Agronomiques et Biologiques. 09 :35 -40.

**Maisuthisakul, P.; Suttajit, M.; Pongsawatmanit, R.(2007).** Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some thai indigenous plants. *Food chemistry* .100:1409-1418

**Maksimovic, Z.; Malencie, N. & Kovacevie, N. (2005).** Polyphénol contents as antioxidant activity of *Maydis Stigma* extracts. *Bioresource Technology*. 96(8): 873-877.

**Malien-Aubert, C. & Amiot-Carlin, M. J.(2006).** Pigments phénoliques: structures, stabilité, marche des colorants naturels et effets sur la santé. *Les Polyphénols en Agroalimentaire, Lavoisier Tec & Doc*. Paris. 295-339.

**Mansouri, A.; Makris, D.P. & Kefalas, P. (2005).** Determination of hydrogen peroxide scavenging activity of cinnamic and benzoic acids employing a highly sensitive peroxyoxalate chemiluminescence-based assay: Structure-activity relationships. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 39: 22-26.

**Marfak, A. (2003).** Radiolyse gamma des flavonoides, etude de leur réactivité avec les radicaux libres issus des alcools : Formation de depsides. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de Limoges.

## Références bibliographie

---

**Martorana, M.; Arcoraci, T.; Rizza, L.; Cristani, M.; Bonina, P.; Saija, A.; Trombetta, D.; Tomaino, A.(2013).** *In vitro* antioxidant and *in vivo* photoprotective effect of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seed and skin extracts. *Fitoterapia*. 85 : 41–48.

**Mau, J-L.; Tsai, S-Y.; Tseng, Y-H.; Huang, S-J. (2005).** Antioxidant properties of methanolic extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry* .93: 641-649.

**Mbaïogaou, A.; Hema, A.; Ouedraogo, M.; Pale, E.; Naitormbaide, M.; Mahamout, Y. & Nacro, M. (2013).** Etude comparative des teneurs en polyphénols et en antioxydants totaux d'extraits de graines de 44 variétés de voandzou (*Vigna subterranea* (L.) Verdcourt). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 7(2): 861-871.

**Mélo, E.A.; Lima, V.L.A .G .; Maciel,M.I.S.(2006).** Polyphenol, Ascorbic Acid and Total Carotenoid Contents in Common Fruits and Vegetables. *Braz, Journal of Food Tecnology*. 9(2): 89-94.

**Middleton, E .JR.; Kandaswami, C . & Heoradies, T.C. (2000).** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev*.52: 673-751.

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

**More, D. & White, J. (2005).** Encyclopédie des Arbres plus de 1800 Espèces et Variétés du Monde .*Flammarion*. p : 18- 797.

**Moure, A.; Franco, D.; Sineiro, J.; Domínguez, H .; Núñez, M. J. & Lema, J. M. (2000).** Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* .48(9): 3890-3897.

**Moyo, M.; Ndhkala, A.R.; Finnie, J.F. & Staden, J.V.(2010).** Phenolic composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Sclerocary birrea* and *Harpephyllum caffrum* (Anacardiaceae) extracts. *Food Chemistry* . 123:69-76.

**Müller, L.; Gnoyke, S.; Popken, A.M.; Böhm, V. (2010).** Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT- Food Science and Technology*. 43: 992–999.

-N-

**N'Guessan A.H.O ; Déliko, C.E.D. ; Mamyrbékova-Békro, J.A. (2011).** Teneurs en composés phénoliques de 10 plantes médicinales employées dans la tradithérapie de l'hypertension artérielle, une pathologie émergente en Côte d'Ivoire. *Revue de génie industriel*. 6: 55-61.

**Naczka, M.; Shahidi, F.(2004).** Extraction and analysis of phenolic in food. *Journal of Chromatography A*. 1054 : 95–111.

## Références bibliographie

---

**Naghibi, F.; Mosaddegh, M.; Mohammadi Motamed, M. & Ghorbani, A. (2010).** Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 63-79.

**Nakagawa, K.; Fujii, S.; Ohgi, A. & Uesato, S. (2005).** Antioxidative activity of 3-O-octanyl-(+)- catechin, a newly synthesized catechin, *in vitro*. *Journal Health Science* .51(4): 492-496.

**Narayana, K. R.; Reddy, M. S.; Chaluvadi, M. R. & Krishna, D. R. (2001).** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of pharmacology*. 33(1): 2-16.

**Nève, J. (2002).** Flavanoids as antioxydants. *J.Nat. Prood* .63 :1035- 1042 .

**Nicoué, E. É. (2010).** Identification des anthocyanes de deux espèces de bleuets sauvages du Québec " *Vaccinium angustifolium*" et " *Vaccinium myrtilloïdes*" et évaluation de leur potentiel antioxydant (Doctoral dissertation, Université Laval).

**Nojavan, S.; Khalilian, F.; Kiaie, F. M.; Rahimi, A.; Arabanian, A. & Chalavi, S. (2008).** Extraction and quantitative determination of ascorbic acid during different maturity stages of *Rosa canina* L. fruit. *Journal of Food Composition and Analysis*. 21(4): 300-305.

-O-

**Okamura, H.; Mimura, A. & Yakou, Y. (1993).** Antioxydant activity of Tannins and flavonoid in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochem*. 33: 557-561.

**Osman, A.M.; Wong, K.K.Y. & Fernyhough, A. (2006).** ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 346:321-329.

**Ouelmouhoub, S. (2005).** Gestion multi-usage et conservation du patrimoine forestier: cas des subéraies du Parc National d'El Kala (Algérie).

-P-

**Palevitch, D. & Yaniv, Z. (2000).** Medicinal plants of the Holy Land. Modan Publishing House, Tel Aviv, Israel.

**Pantelidis, G. E.; Vasilakakis, M.; Manganaris, G. A. & Diamantidis, G. (2007).** Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry*. 102(3): 777-783.

## Références bibliographie

---

**Pas'ko, P. ;Barton', H. ; Zagrodzki, P. ; Gorinstein, S. ; Folta, M. Zachwieja, ; Z. (2009).** Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. *Food Chemistry*. 115: 994–998.

**Pellegrini, N.; Serafini, M.; Colombi, B.; Del Rio, D.; Salvatore, S.; Bianchi, M. & Brighenti, F. (2003).** Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *The Journal of nutrition*. 133(9) : 2812-2819.

**Pelli, K. & Lyly, M. (2003).** Les antioxydants dans l'alimentation. Institut National de la recherche Agronomique. *VTT Biotechnology Frinlande . Edition : Paris*. 3: 1-28.

**Pietta, P.G.(2000).** Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* . 63 :10135-1042.

**Pincemail, J.; Defraigne, J. O.; Meurisse, M. & Limet, R. (1998).** Antioxydants et prévention des maladies cardiovasculaires. 2ème partie: la vitamine E. *Medi Sphere*. 89, 27-30.

**Pincemail, J.; Meurisse, M.; Limet, R.; & Defraigne, J. O. (1999).** Méthodes d'évaluation du stress oxydatif chez l'homme: Importance en matière de prévention. *Cancérologie*. 95 :1-4.

**Pincemail, J.; Bonjean, K.; Cayeux, K.; & Defraigne, J. O. (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition Clinique et Métabolisme*.16(4) : 233-239.

**Pincemail J. & Derfaigne, J.O. (2004).** Les antioxydants : un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygéné. Symposium « Antioxydants et alimentation » Institute Danone.

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

**Proir, R.I.; Wu. & Schaich, K.(2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. *American Chemical Society*.14:1-13.

-R-

**Rahman , I.; Biswas, S.; Kode, A. (2006).** Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases .*European Journal of Pharmacology*. 533 :222–239.

**Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-evans, C. (1999).** antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* .26 (9/10): 1231–1237.

## Références bibliographie

---

**Ribereau-Gayon , P.(1986).**Les composés phénoliques des végétaux. Ed *Dunod*, Paris, P : 38-40.

**Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G.(1996)** .Structure-antioxydant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 20: 933-956.

**Rietjens, I.; Boersma, M.; De Haan, L.; Spenkeliink , B.; Awad , W.; Cnubben , H.; van Zanden , J.; van der Woude , H.; Alink, G.; Koeman, J. (2002).** The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids Environmental. *Toxicology and Pharmacology* .11: 321–333.

**Rivas-Gonzalo, J. C. (2003).** Analysis of anthocyanins. *Methods in Polyphenol Analysis.*338-358.

**Rive-Evans, Miller , C.A. & Paganga, G. (1996).** Structure antioxydant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radicals In Biology And Medicine.* 20: 933–956.

**Rock, E.(2003).** Stress oxydant, micronutriments et sante. Université d'été de Nutrition Clermont-Ferrand. P 37-42.

**Romani, A .; Pinelli, P .; Galardi, N .; Mulinacci, N. & Tattini, M. (2002).** Identification and quantification of galloyl derivatives , flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochemical Analysis.* 13: 79 86.

-S-

**Sarkar, S.; Floto, R. A.; Berger, Z.; Imarisio, S.; Cordenier, A.; Pasco, M.& Rubinsztein, D. C. (2005).** Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *The Journal of Cell Biology.* 170(7):1101-1111.

**Sarni-Manchado , P. & Cheyrier , V. (2006).**Les polyphénols en agroalimentaire. Edition *Lavoisier*.

**Seyoum, A.; Asres, K. & EL-Fiky, F.K. (2006).** Structure-radical scavenging activity relationship of Flavonoids. *Phytochemistry*, 67: 2058-2070.

**Singh, P.; Singh, U.; Shukla, M. & Singh, R.L. (2010).** Variation of some phytochemicals in methi and saunf plants at different steges of development. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology* .4(2): 93-99.

**Spínola, V.; Mendes, B.; Câmara, J.S.; Castilho, P.S. (2013).** Effect of time and temperature on vitamin C stability in horticultural extracts. UHPLC-PDA vs iodometric titration as analytical methods. *LWT- Food Science and Technology.* 50: 489-495.

-T-

## Références bibliographie

---

**Tanguy, M. & Begué-Simon, A-M. (2009).** Antioxydants Première partie : les antioxydants dans l'alimentation *Medecine* . 256-260.

**Tapas, A.R.; Sakarkar, D.M. & Kakde, R.B. (2008).** Flavonoids as Nutraceuticals: a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Reserearch*. 7(3): 1089-1099.

**Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L. & Hawkins Byrne, D. (2006).** Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19(6): 669-675.

**Thurre, N. & Andlauer, W. (2007).** Influence de la variété de fraise et de la période de récolte sur les contenus en antioxydants et en anthocyanes ainsi que sur la répartition de l'acide ellagique dans le fruit, les akènes, les feuilles et le rhizome.

**Topçu, G.; Ay, M.; Bilici, A.; Sarikurkcu, C.; Ozoturk, M. & Ulubelen, A. (2007).** A new flavones from antioxidant extracts of *Pistcia terebinthus*. *Food Chemistry*. 103:1115-1122.

**Torkelson, A. R. (1996).** The Cross Name Index to Medicinal Plants, *CRC Press*, p: 1160.

**Tripoli, E.; Guardia, M. L.; Giammanco, S.; Majo, D. D. & Giammanco, M. (2007).** Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*. 104(2): 466-479.

**Tsuda, T.; Horio, F. & Osawa, T. (1998).** Dietary cyanidin 3-O-β-D-glucoside increases *ex vivo* oxidation resistance of serum in rats. *Lipids*. 33(6): 583-588

**Tsuda, T.; Horio, F.; Kitoh, J. & Osawa, T. (1999).** Protective Effects of Dietary Cyanidin 3-β-D-Glucoside on Liver Ischemia-Reperfusion Injury in Rats . *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 368(2): 361-366.

**Tsuda, T.; Horio, F. & Osawa, T. (2002).** Cyanidin 3-O-beta-glucoside suppresses nitric oxide production during a zymosan treatment in rat. *Journal of Nutrition Science Vitaminol*. 48:305-310.

**Turkoglu, A.; Duru, M.E.; Marcan, N.; Kivrak, I.; Gezer, K. (2006).** Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.)Murrill . *Food Chemistry*.

-V-

**Vamecq, J.; Vallée, L.; Storme, L.; Gelé, P.; Bordet, R. (2004).** Les acteurs immédiats du stress oxydatif Key players in oxidative stress. *La Lettre du Pharmacologue*. 18 : 278-293 .

**Verdu, M. & Garcia-Fayos, P. (1998).** Ecological causes, function, and evolution of abortion and parthenocarpy in *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae). *Can. Journal. Bot.* 76: 134-141.

## Références bibliographie

---

-W-

**Wang, H.; Zhao ,M. ; Yang ; B.; Jiang , Y. & Rao, G.(2008).**Identification of polyphénols in tobacco leaf and their antioxidant and antimicrobial activities. *Food Chemistry*. 107:1399-1406.

**Washko, P.W.; Welch, R.W.; Dhariwal, K. R.; Wang, Y. & Levine, M. (1992).** Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid Analyses in Biological Samples. *Analytical Biochemistry* 204:1-14.

**West, M. E. & Mauer, L. J. (2011).** Development of an integrated approach for the stability testing of flavonoids and ascorbic acid in powders. *Food Chemistry*. 129(1):51-58.

**Williamson G.; Poquet L. & Clifford, M.N.(2010).** Bioavailability of Flavonols and Phenolic Acids. In: Fraga C.G.; «Plant Phenolics and Human Health: *Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*».978-0-470-28721-7p: 51-53.

-Y-

**Yang, N., Zhai, J., Wang, D., Chen, Y., & Jiang, L. (2010).** Two-dimensional graphene bridges enhanced photoinduced charge transport in dye-sensitized solar cells. *Acs Nano*. 4(2).

**Yousfi, H.; Tahri, H.; El Amrani, A. & Cai , H.S. (2006).** Etude de l'effet antioxydant des anthocyanes de l'olive, du raisin rouge, du chou rouge et de la fraise. *Biochimie , substance Naturelles et environnemental* . PP.452-455.

-Z-

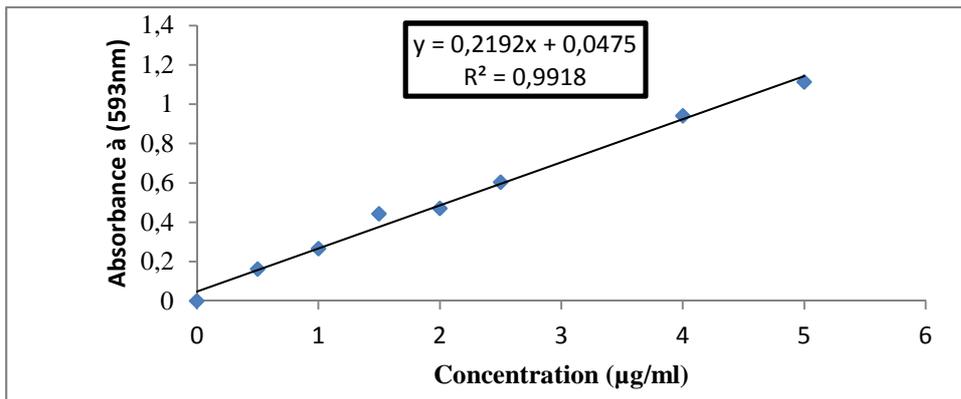
**Zhishen, J.; Mengcheng, T.; Jianming ,W. (1999).** The determination of flavonoid contents in mulberry and their scanenging effects on superoxide radicals.*Food chemistry*.64 (4): 555-559.

**Zohary, M.(1952).** Amonographical study of the genus Pistucia. *Palest. Journal. Bot.* 4: 187-228.

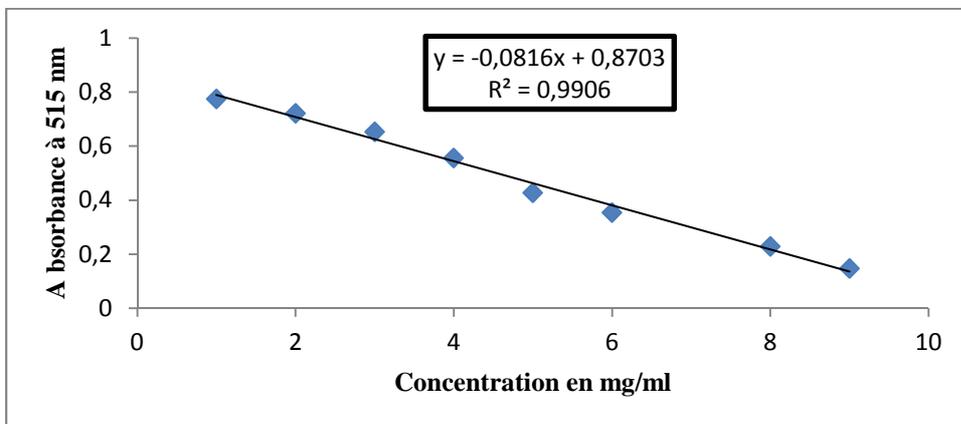
## Références bibliographie

---

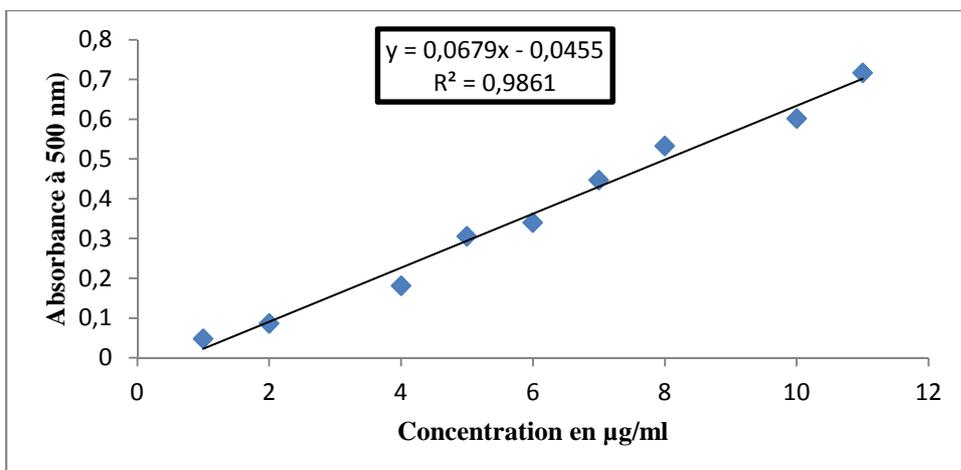
# Annexes 1



**Figure 1 :** Courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide ascorbique pour le test de pouvoir réducteur.



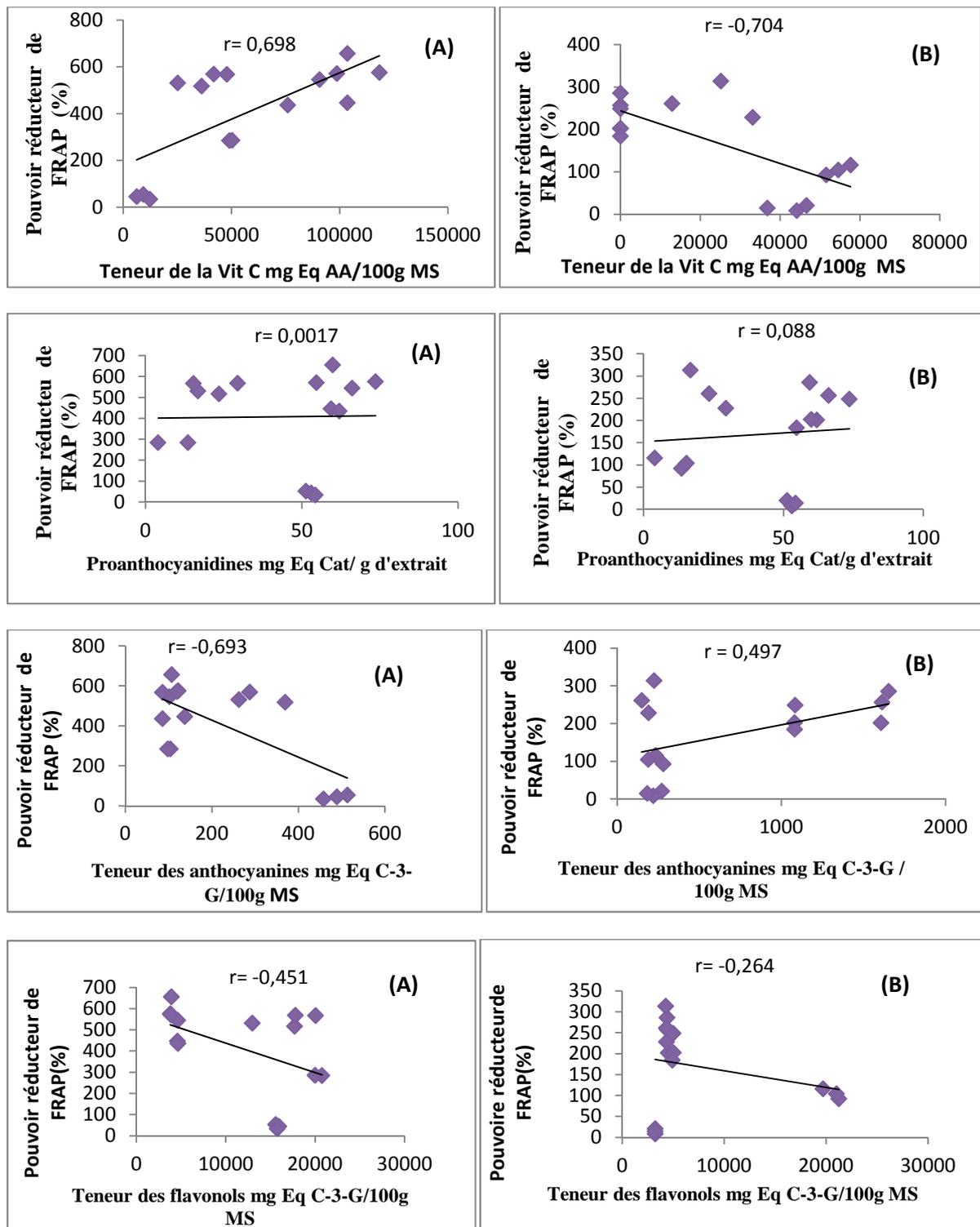
**Figure 2 :** Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique .



**Figure 3:** courbe d'étalonnage des proanthocyanidines.

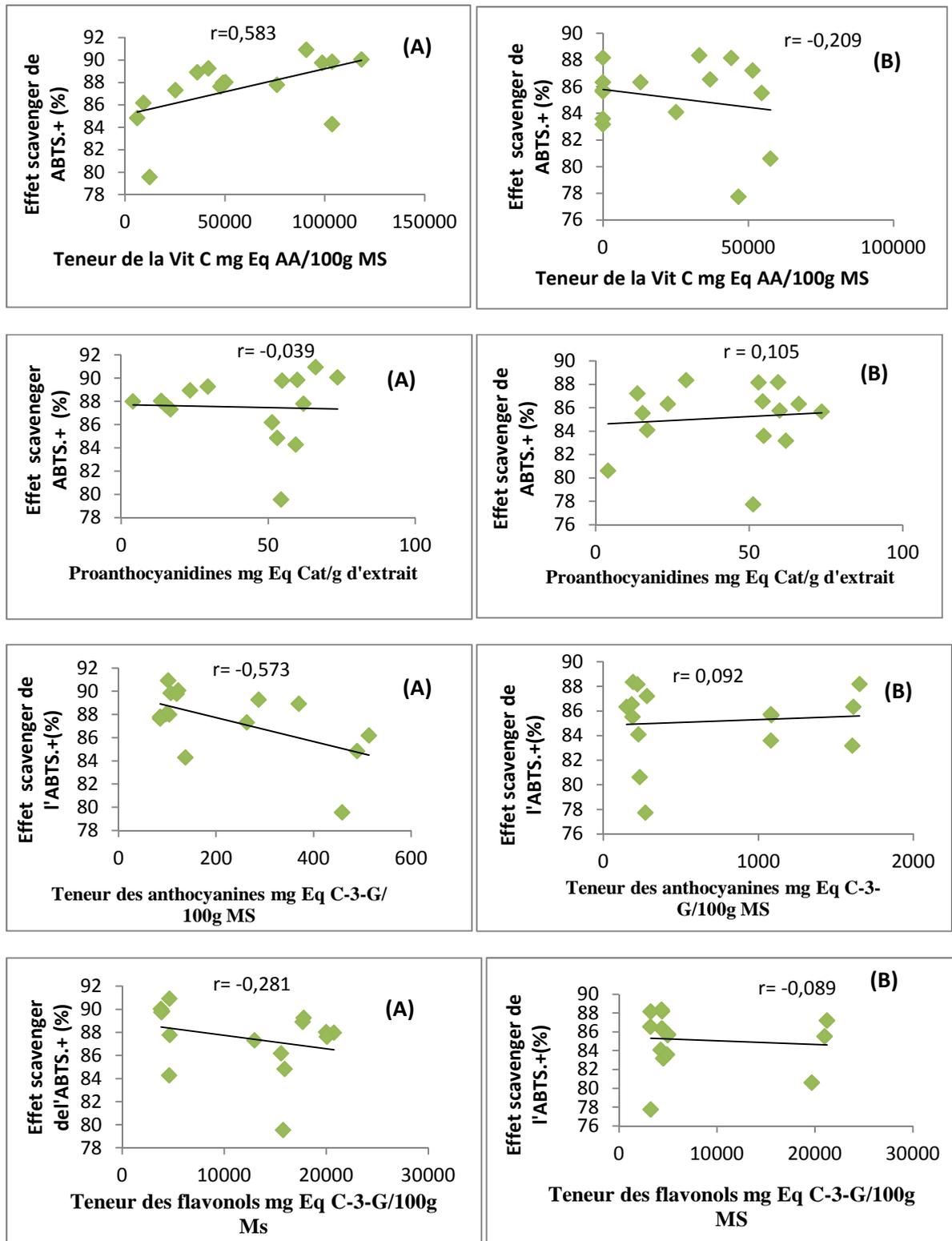
## Annexes 2

### Courbes de corrélations



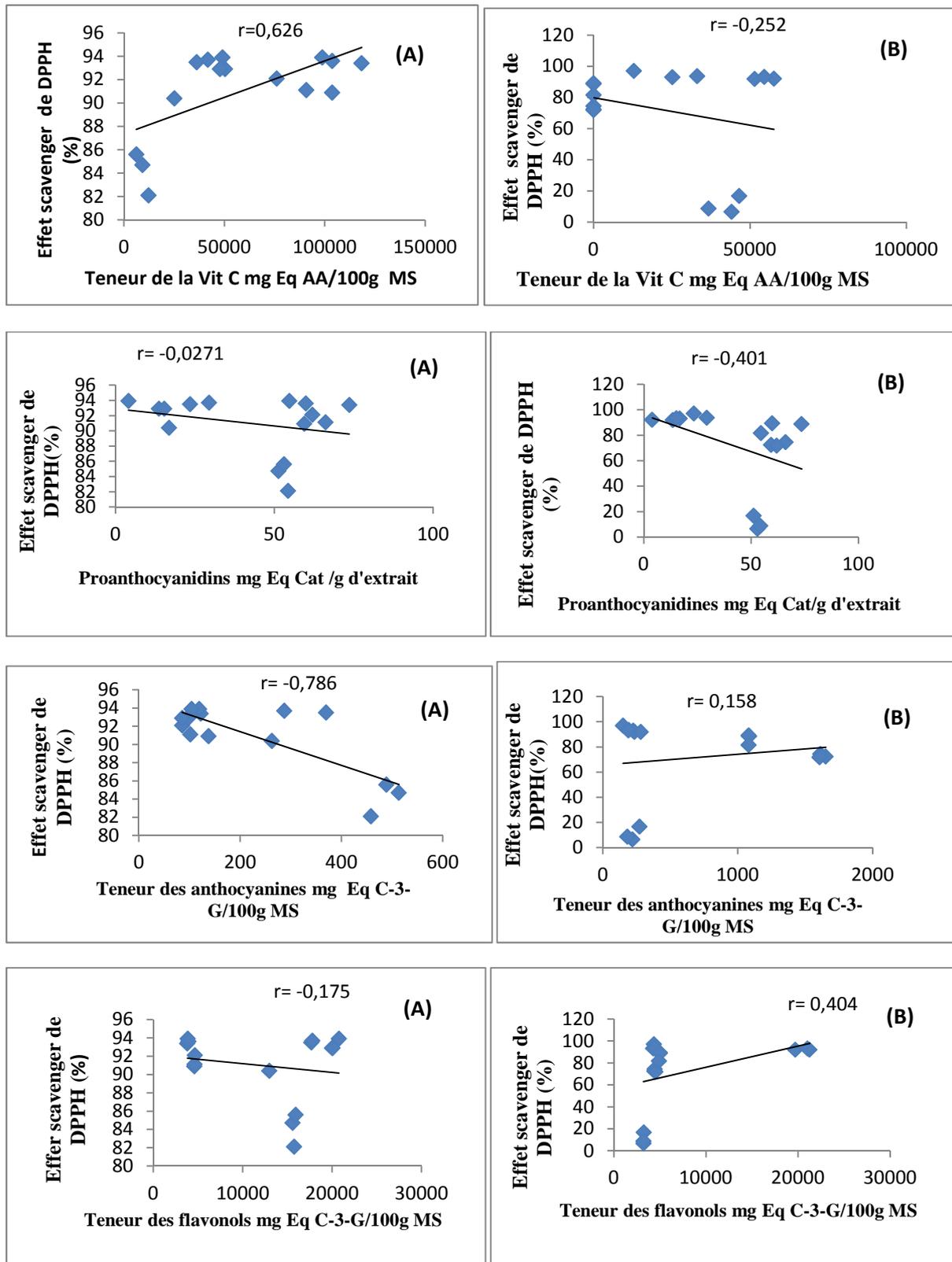
**Figure 4 :** Corrélation entre le pouvoir réducteur (FRAP) et les teneurs en vit C et en proanthocyanidines, anthocyanidines et les flavonols des extraits des feuilles (A) et graines (B) de *Pistacia lentiscus*.

## Annexes 2



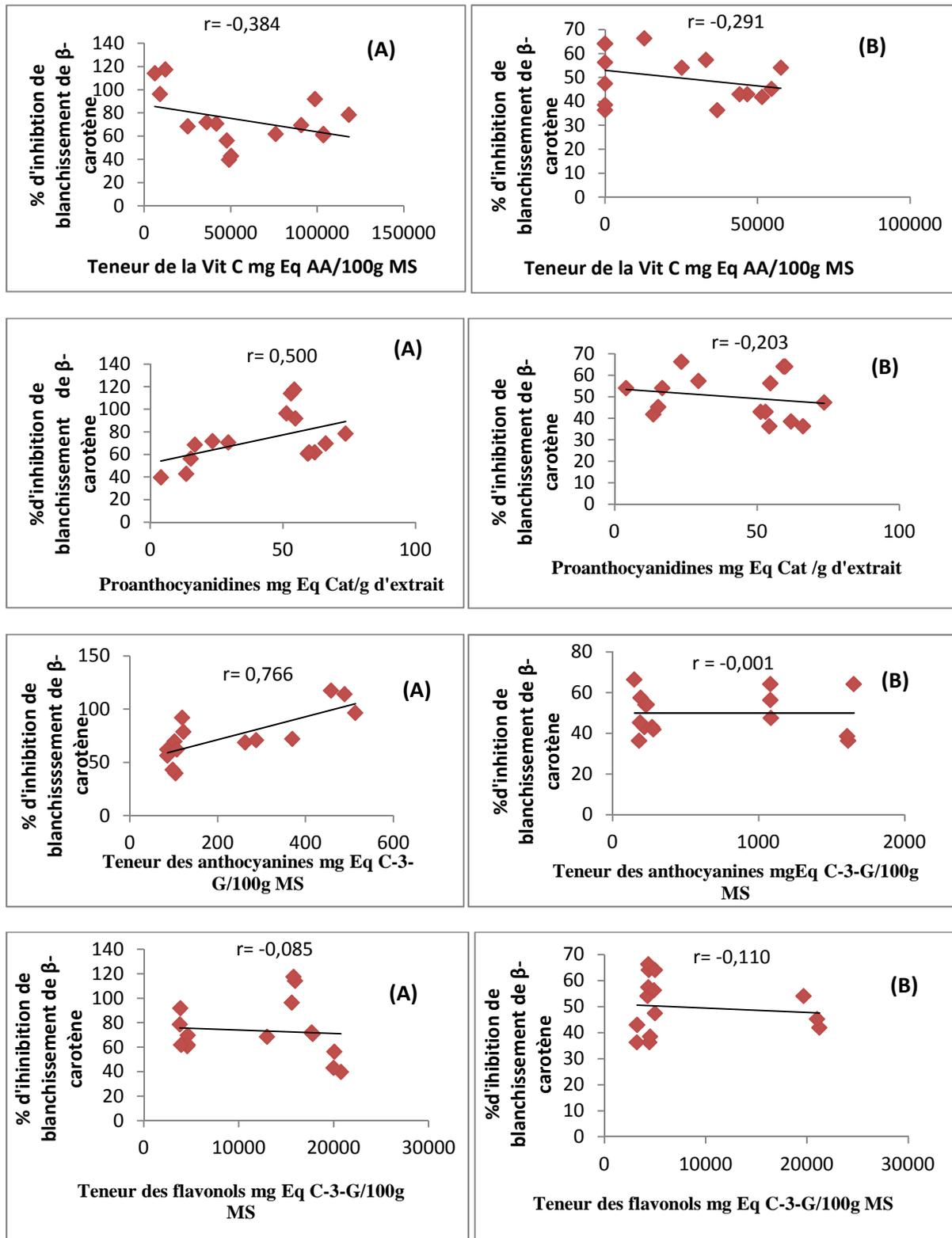
**Figure 5 :** Corrélation entre l'effet scavenger (ABTS<sup>+</sup>) et les teneurs en vit C et en proanthocyanidines, anthocyanidines et les flavonols des extraits des feuilles (A) et graines (B) de *Pistacia lentiscus*.

## Annexes 2



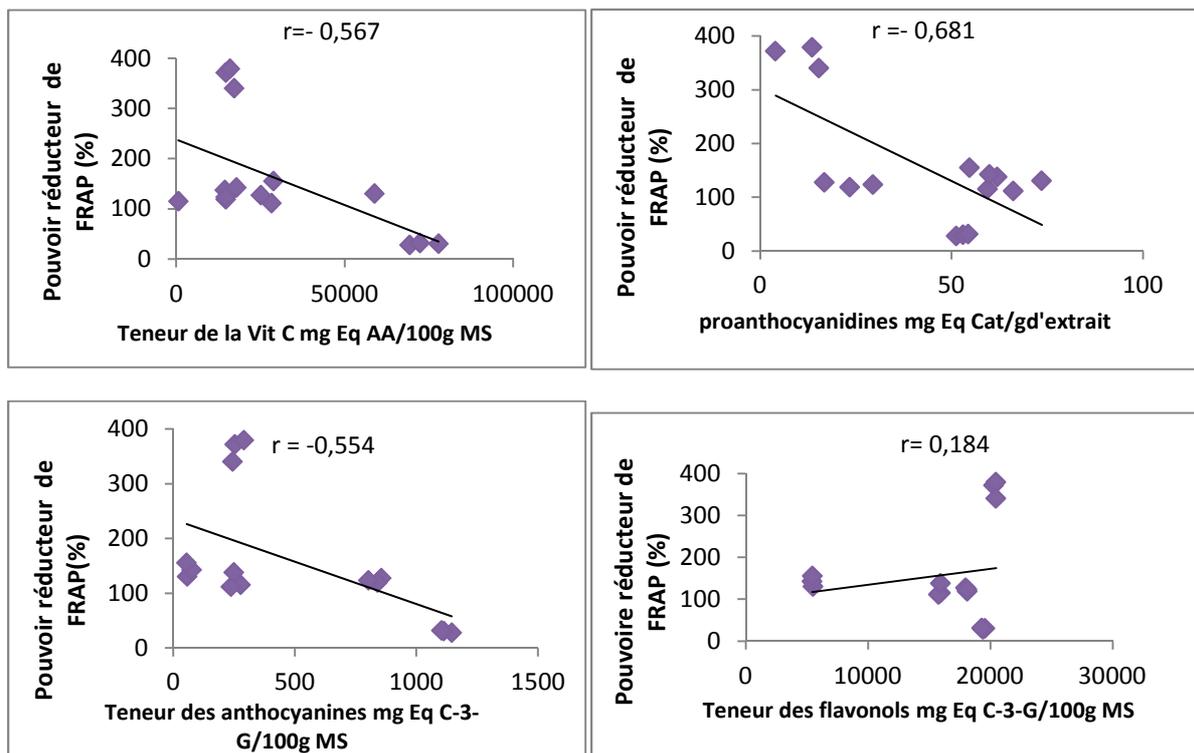
**Figure 6 :** Corrélation entre l'effet scavenger (DPPH) et les teneurs en vit C et en proanthocyanidines, anthocyanidines et les flavonols des extraits des feuilles (A) et graines (B) de *Pistacia lentiscus*.

## Annexes 2

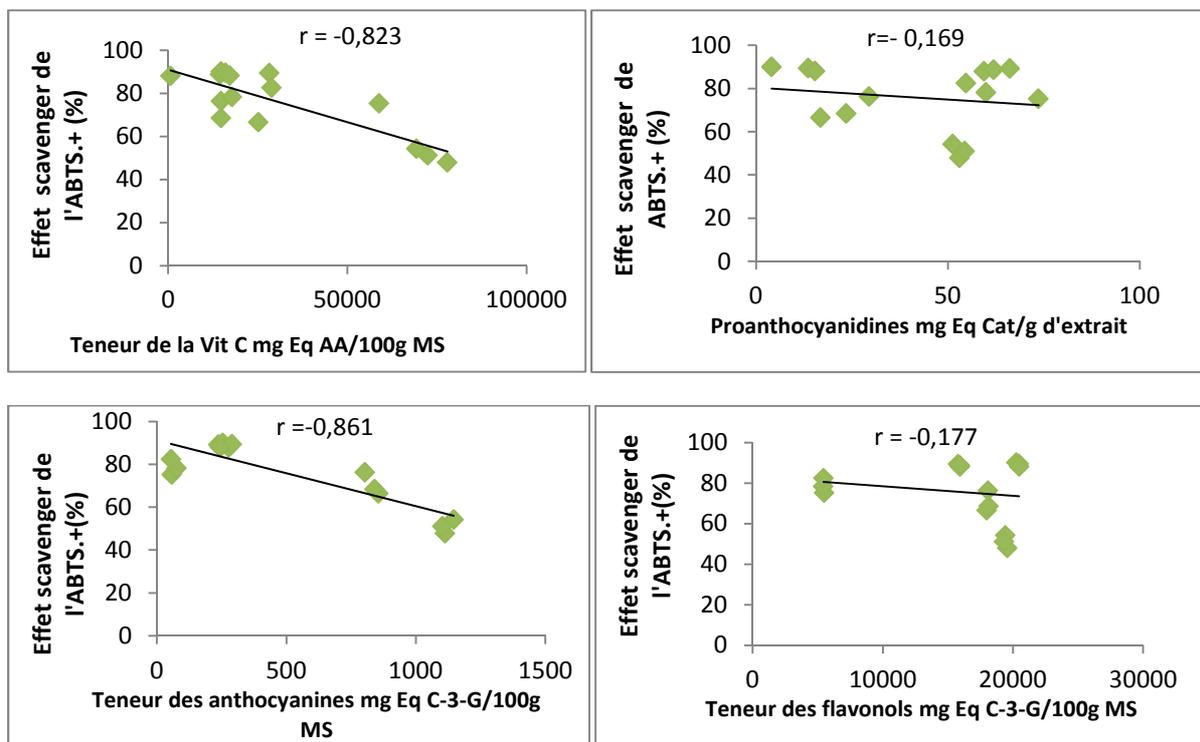


**Figure 7 :** Corrélation entre le test de blanchissement de  $\beta$ -carotène et les teneurs en vit C et en proanthocyanidines, anthocyanidines et les flavonols des extraits des feuilles (A) et graines (B) de *Pistacia lentiscus*.

## Annexes 2

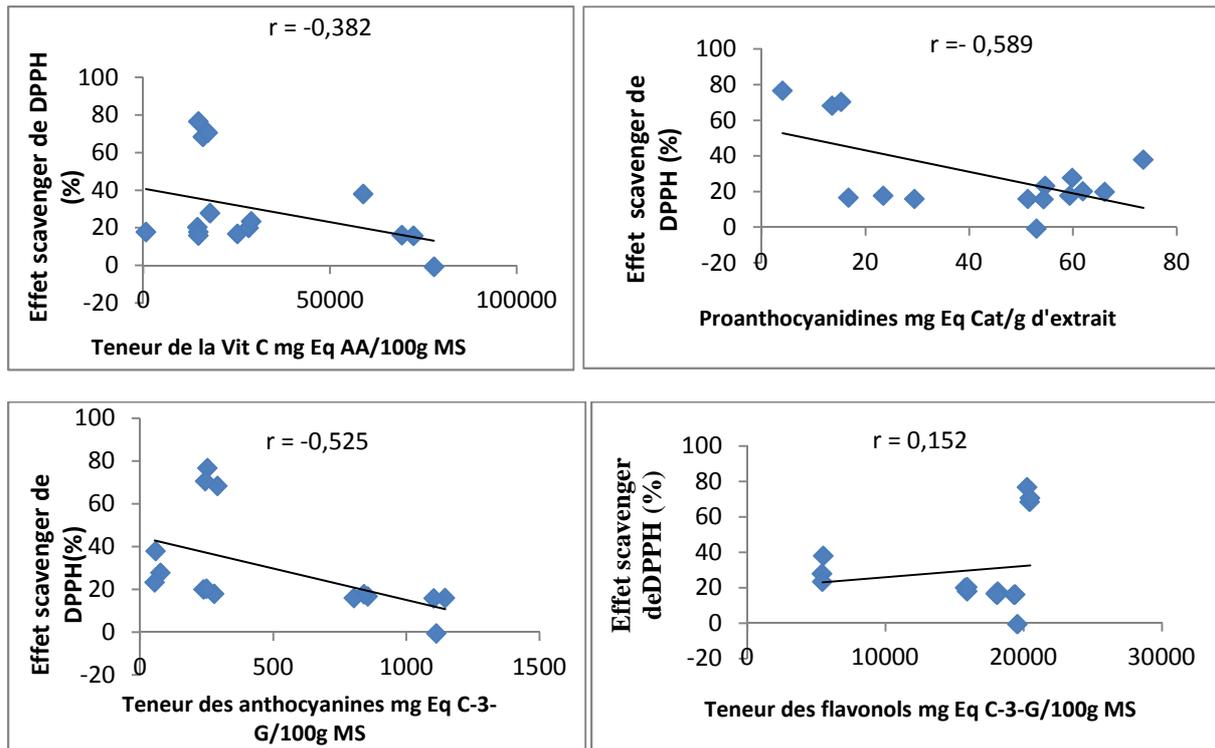


**Figure 8:** Corrélation entre le pouvoir réducteur (FRAP) et les teneurs en vit C et en proanthocyanidines, anthocyanidines et les flavonols des extraits des feuilles de *Clematis flammula*.

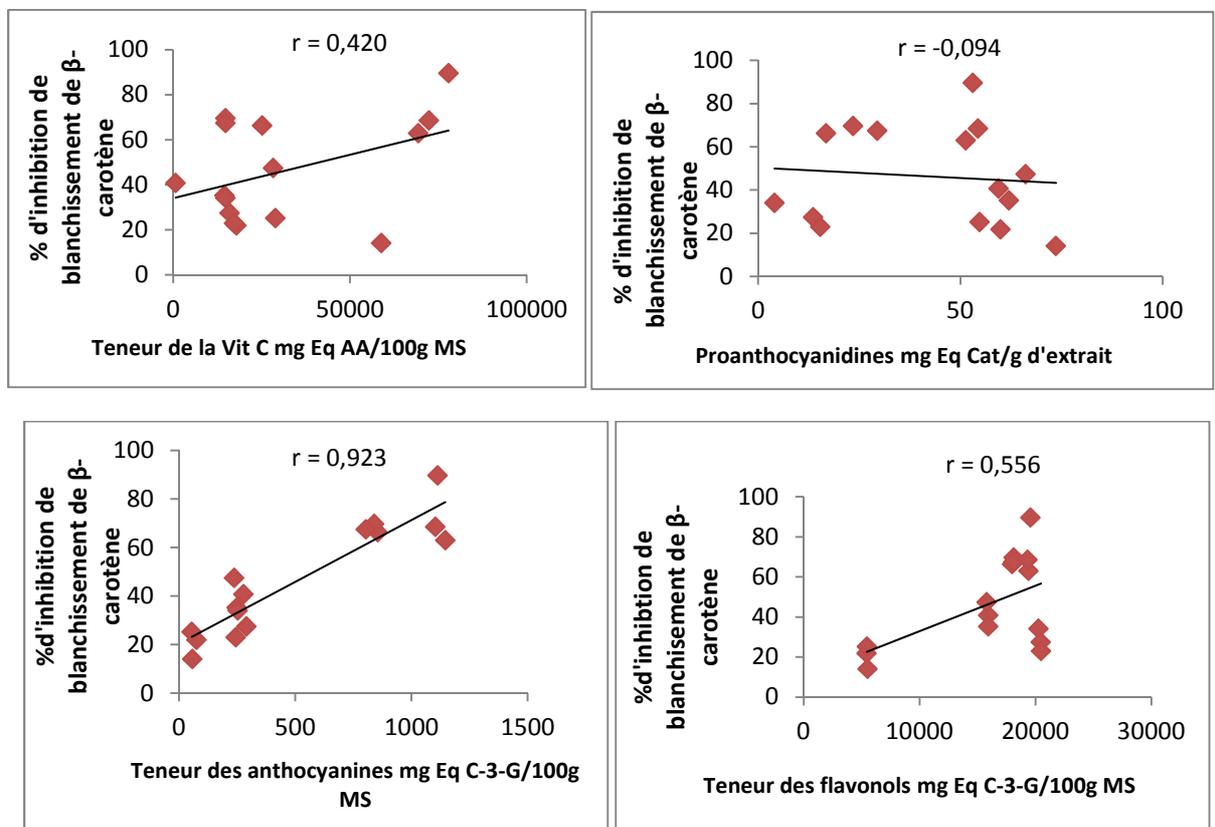


**Figure 9:** Corrélation entre l'effet scavenger (ABTS<sup>+</sup>) et les teneurs en vit C et en proanthocyanidines, anthocyanidines et les flavonols des extraits des feuilles de *Clematis flammula*.

## Annexes 2



**Figure 10:** Corrélation entre l'effet scavenger (DPPH) et les teneurs en vit C et en proanthocyanidines, anthocyanidines et les flavonols des extraits des feuilles de *Clematis flammula*.



**Figure 11:** Corrélation entre le test de blanchissement et les teneurs en vit C et en proanthocyanidines, anthocyanidines et les flavonols des extraits des feuilles de *Clematis flammula*.

## Résumé

Le but de ce travail est le dosage des antioxydants et la détermination des activités antioxydantes des extraits *Pistacia lentiscus* et *Clematis flammula*. Les résultats ont montré que les plantes étudiées présentent des teneurs élevées en polyphénols et en vitamine C.

Les résultats obtenus des dosages quantitatifs des composés phénoliques montrent la richesse des extraits aqueux de chloroforme de feuilles et graines de *Pistacia lentiscus* et celui de *Clematis flammula* avec  $20271,06 \pm 423,72$ ;  $20650,32 \pm 839,24$  mg Eq C-3-G/100g d'extrait en flavonols glycosylés. Les proanthocyanidines sont concentrés au niveau des phases organiques pour les feuilles de *Clematis f.* et au niveau de l'extrait éthanolique des deux parties de *Pistacia lentiscus*. Les phases organiques de feuilles de la *Clematis flammula* et *Pistacia lentiscus*, notent les meilleures teneurs en anthocyanes, alors que ces composés se concentrent au niveau de l'extrait éthanolique et l'aqueux éthyle acétate ( $4460,17 \pm 60,42$ ;  $4974,88 \pm 50,60$  mg C3G/ 100g d'extrait) pour les fruits.

Les résultats de dosage de la vit C des extraits des feuilles et graines de *P. lentiscus*, indiquent la richesse des feuilles au niveau des phases éthanoliques et aqueuses d'éthyle acétate ( $90134,80 \pm 13796,97$ ;  $106883,17 \pm 10204,24$  mg EAA/ 100g d'extrait), respectivement; et au niveau de la phase organique de chloroforme avec  $73182,18 \pm 4347,18$  mg EAA/100g d'extrait pour les feuilles de *Clematis flammula*.

Les extraits des parties étudiées ont noté de bonnes activités antioxydantes, les feuilles de *Pistacia lentiscus* exhibent un pouvoir réducteur, ainsi que des pouvoirs anti radicalaires. L'extrait aqueux et organique d'éthyle acétate des feuilles et graines de *P.lentiscus* présentent les meilleures activités scavenging contre le DPPH ( $93,63 \pm 0,25$ ;  $94,53 \pm 2,15$  %) et l'ABTS<sup>·+</sup> ( $89,89 \pm 0,14$ ;  $88,50 \pm 1,04$  %), respectivement. Alors que la *Clematis* présente des meilleurs pourcentages aux niveaux des phases aqueuses du chloroforme ( $89,43 \pm 1,02$ ) et éthanoliques ( $88,71 \pm 0,67$ ). L'activité antioxydante par le test FRAP indique que les extraits de feuilles de *Pistacia* qui notent les meilleures activités ( $539,08 \pm 26,44$  mg Eq ASC/g éthyle acétate;  $600,93 \pm 47,94$  mg Eq ASC/g aqueux d'éthyle acétate), par rapport à ceux des graines et *Clematis flammula* ( $363,98 \pm 20,57$  mg Eq ASC/g aqueux de chloroforme). Le meilleur pourcentage d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique par le  $\beta$ -carotène est exhibé par les phases organiques, l'extrait organique du chloroforme des feuilles des deux plantes ( $109,25 \pm 11,34$ ;  $73,70 \pm 14,06$ %) et l'extrait éthyle acétate des graines avec  $59,25 \pm 6,31$  %.

**Mots clés :** *Pistacia lentiscus*, *Clematis flammula*, FRAP, DPPH, ABTS<sup>·+</sup>, test de blanchissement du  $\beta$ -carotène.

## Abstract:

The aim of this work is the determination rate of antioxidants and antioxidant activity of *Pistacia lentiscus* and *Clematis flammula* extracts. The results showed that the plants tested contain high levels of polyphenols and vitamin C.

The results of quantitative assay of phenolic compounds show a high degree of aqueous chloroform extracts of leaves and seeds of *Pistacia lentiscus* and *Clematis flammula* with  $20271.06 \pm 423.72$ ;  $20650.32 \pm 839.24$  mg Eq C-3-G / 100g extract of flavonols contents. Proanthocyanidins are concentrated in the organic phases for leaves of *Clematis f.* and at the ethanol extract of the two parts of *Pistacia lentiscus*. The organic phases leaves of *Clematis flammula* and *Pistacia lentiscus*, note the best levels of anthocyanins, while the compound concentrated at the ethanol extract and aqueous ethyl acetate of seeds ( $4460.17 \pm 60.42$ ,  $4974.88 \pm 50.60$  mg C3 Gextract 100g). The contents of vit C of leaves and seeds of *P. lentiscus* extracts, indicate the wealth of leaves at the ethanolic and aqueous phases ethyl acetate ( $90134.80 \pm 13796.97$ ,  $106883.17 \pm 10204$  EAA 24 mg / 100 g of extract, respectively). and the level of the organic phase with chloroform  $73182.18 \pm 4347.18$  mg EAA/100g to extract *Clematis flammula*. All extracts noted good antioxidant activities, *Pistacia lentiscus* leaves exhibit a good reducing power and radical activities. The aqueous extract and ethyl acetate organic leaves and seeds *P.lentiscus* have the best scavenging activity against DPPH ( $93.63 \pm 0.25$ ,  $94.53 \pm 2.15$ %), and ABTS<sup>+</sup> ( $89.89 \pm 0.14$ ,  $88.50 \pm 1.04$ %), respectively. While *Clematis* presents best percentages at aqueous phases chloroform ( $89.43 \pm 1.02$ ) and ethanolic ( $88.71 \pm 0.67$ ). The antioxidant activity by FRAP test indicates that leaf extracts of *Pistacia l.* note the best activities ( $539.08 \pm 26.44$  mg Eq ASC / g ethyl acetate;  $600.93 \pm 47.94$  mg Eq ASC / g aqueous ethyl acetate), compared to those of seeds and *Clematis flammula* ( $363.98 \pm 20.57$  AUC mg Eq / g of aqueous chloroform). The best percentage of inhibition of the oxidation of the linoleic acid by  $\beta$ -carotene is exhibited by the organic phases, the organic extract of the chloroform of the sheets of the two plants ( $109,25 \pm 11,34$ ;  $73,70 \pm 14,06$ %) and the extract ethyl acetate of seeds with  $59,25 \pm 6,31$ %.

**Key words:** *Pistacia lentiscus*, *Clematis flammula*, FRAP, DPPH, ABTS<sup>·+</sup>,  $\beta$ -carotene bleaching assay.