



Catalogue

Page de garde mémoires polyphénols.....	1
remercement.....	2
sommaire.....	4
Chapitre I.....	10
Chapitre II.....	20
Chapitre III.....	29
Chapitre IV.....	33
Chapitre V.....	38
CONCLUSION.....	60
Référence.....	62
Résumé.....	71



N° d'ordre :FS / UMBB / 2018

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
 République Algérienne Démocratique et Populaire
 وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
 Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
 جامعة أمحمد بوقرة بومرداس
 Université M'hamed Bougara de Boumerdès



Faculté des Sciences - Département de Chimie

Domaine : Sciences de la matière

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie Analytique

Mémoire de projet de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Présentée et soutenue par

BAKELLI Baelhadj

29 Septembre 2021

Thème

“ *Extraction des composés phénoliques de Cupressus et leurs applications* ”

Mme H. BOUSSAK	Maitre de conférences A - FS-UMBB	Président
Mme S. DEMIM	Maitre de conférences B - FS-UMBB	Promoteur
Mme L. Loucif-Seiad	Maitre de conférences A - FS-UMBB	Examineur

Année Universitaire 2020/2021

Dédicace

À ma mère et à mon père,

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorde santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

À mes frères,

En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

À ma fiancée,

Ma source de joie et de bonheur, pour l'encouragement qu'elle m'a toujours accordé.

À toute ma famille,

Que ce travail soit le témoignage de mon respect avec mes souhaits de bonheur pour vous tous. Que dieu vous procure santé, bonheur et succès.

A Mes adorables amis qui sont égayé mes journées.

À TOUTES LES PERSONNES QUI ONT PARTICIPÉ A L'ÉLABORATION DE CE TRAVAIL ET À TOUS CEUX QUE J'AI OMIS DE CITER.

Remercîment

A mon examinatrice du mémoire

Madame L. Loucif-Seiad (Maitre de conférences A- FS - université de Boumerdès)

C'est pour moi un grand honneur de vous voir siéger dans mon jury. Je suis très reconnaissant de la spontanéité et de l'amabilité avec lesquelles vous avez accepté d'examiner mon travail. Veuillez trouver, chère Madame, le témoignage de ma grande reconnaissance et de mon profond respect.

A ma présidente du jury

Madame H. BOUSSAK (Maitre de conférences A - FS - université de Boumerdès)

Je tiens à vous exprimer ici mon sincères remerciements pour l'honneur que vous me faite en acceptant de présider le juger de mon modeste travail ; La richesse de votre savoir, votre esprit de synthèse et votre ardeur ont toujours suscité l'admiration de vos étudiants ; Veuillez trouver, dans ce travail, le témoignage de mon haute considération et de mon profond respect.

A mon rapporteur du mémoire

Madame S. DEMIM (Maitre de conférences B - FS -université de Boumerdès)

Vous m'avez toujours accueilli et encouragé avec bienveillance et compréhension, c'est à vous que revient tout le mérite de cette thèse ; j'avais été profondément touché par votre rigueur scientifique et votre précieuse attention ; je garderai pour toujours de vous la meilleure des impressions.

Veuillez trouver ici, ma cher promotrice, l'expression de ma grande reconnaissance, de mon vif remerciement, de ma profonde estime et de ma gratitude.

Abréviations

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

EAM : extraction assisté par microonde

SOD : superoxyde dismutase

GPX : glutathion peroxydase

[POLY] : concentration de polyphénol totaux

[FLAV] : concentration des flavonoïdes

(INIB DPPH) : Inhibition du radical DPPH (%)

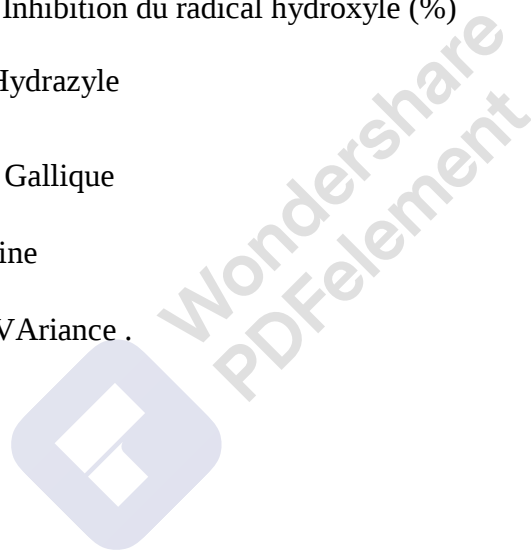
(INIB HYDROXYLE) : Inhibition du radical hydroxyle (%)

DPPH : DiPhénylPicrylHydrazyle

EAG : Équivalent Acide Gallique

EQ : Équivalent Quercétine

ANOVA : ANalysis Of VAriance .



Liste des figure

Figure I .1- vitamine E.....	09
Figure I .2- vitamine C ou acide ascorbique.....	10
Figure I .3- trolox.....	11
Figure I .4- probucol.....	11
Figure I .5- BO653.....	11
Figure II .1-Classification des polyphénols	12
Figure II .2- Quelques exemples de structures chimiques des acides hydroxybenzoïques..	13
Figure II .3- Quelques exemples de structures chimiques des acides hydroxycinnamiques	14
Figure II .4- Structure de base des flavonoïdes.....	14
Figure II .5-Structure de stilbene.....	16
Figure II .6- Structure chimique de la coumarine.	16
Figure II .7- Exemple des tanins hydrolysables.....	17
Figure II .8- Exemple des tanins condensés.....	18
Figure III .1- feuille et cône de cyprès.....	22
Figure III .2- Aire de répartition du Cupressus sempervirens L.	23
Figure V.1- extraction assisté par microonde.....	31
Figure V.2- Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	31
Figure V.3- des solutions d'acide gallique a diffèrent concentration a fin de tracé la courbe d'étalonnage.	32
Figure V.4- Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	32
Figure V.5- des solutions de la quercétine a diffèrent concentration fin de tracé la courbe d'étalonnage.....	33
Figure V.6les extrais obtenu de l'extraction à partir des feuilles.....	34
Figure V.7- dosage des polyphénol extrait à partir des feuilles.....	35
Figure V.8- Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues (polyphénol -flavonoides) feuilles.....	37
Figure V.9- test d'activité antioxydant (méthode de DPPH) des extrais obtenu à partir des feuilles.....	38
Figure V.10- Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues(activité antioxydant DPPH . H ₂ O ₂) feuilles.....	40
Figure V.11- l'un des essai obtenu par l'extraction à partir des cônes entier.....	41

Figure V.12-Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues(polyphénol -flavonoïdes) cônes entier.....	43
Figure V.13- Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues(activité antioxydant DPPH . H ₂ O ₂) cône entier.....	45
Figure V.14- les solution des extraits obtenu des cônes en poudre avant l'analyse par spectrophotomètre.....	46
Figure V.15-Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues(polyphénol -flavonoïdes) cônes poudre.....	49
Figure V.16-Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues (activité antioxydant DPPH . H ₂ O ₂) cône poudre.....	51

Liste des tables

Tableau I .1-Originé des espèces réactives de l'oxygène : réduction de l'oxygène et formation des intermédiaires partiellement réduits.....	04
Tableau II.1- Principales classes des flavonoïdes.....	15
Tableau II.2- Propriétés biologiques des quelques polyphénols dans l'organisme.....	19
Tableau III.1- Classification du Cyprès vert	21
Tableau IV .1- Niveaux expérimentaux choisis pour les trois facteurs étudiés.....	26
Tableau IV .2 -Plan d'expérience de trois facteurs (matrice de Box-Behnken).....	27
Tableau V.1- l'évaluation des concentrations des polyphénols et des flavonoïdes et des estimations des activités antioxydante (feuilles).....	34
Tableau V.2- analyse de la variance (ANOVA) feuilles.....	37
Tableau V.3- analyse de la variance (ANOVA) cones entier.....	39
Tableau V.4 - l'évaluation des concentrations des polyphénols et des flavonoïdes et des estimations des activités antioxydante (cones entier).....	41
Tableau V.5- analyse de la variance (ANOVA) cones entier.....	43
Tableau V.6- analyse de la variance (ANOVA) cones entier.....	45
Tableau V.7-l'évaluation des concentrations des polyphénols et des flavonoïdes et des estimations des activités antioxydants .(cône en poudre).....	47
Tableau V.8- analyse de la variance (ANOVA) cône en poudre.....	48
Tableau V.9- analyse de la variance (ANOVA) cones entier.....	50

Sommaire

Introduction général.....	01
I. Stress oxydatif	02
I.1. Stress oxydatif	02
I.2. Radical libre.....	02
I.2.1. Origine des espèces réactives de l'oxygène.....	03
I.2.2. Principaux espèces réactives d'oxygène	04
I.2.3. Cibles des ERO et pathologie associée au stress oxydant	06
I.3. Antioxydants et systèmes de défense	07
I. 3. 1. Antioxydant enzymatique	07
I. 3. 2. Antioxydant non enzymatique	08
I. 3. 3. Les antioxydants phénoliques de synthèse	10
II. Polyphénols	12
II.1. Classification des polyphénols	12
II.2. Rôle et intérêt des composés phénoliques	18
II. 3. Modes d'action des polyphénols	19
III. Cupressus (cyprés)	21
III.1. Cupressus	21
III.2. Taxonomie.....	21
III.3. Caractéristiques botaniques.....	21
III.4. Caractéristiques écologiques.....	22
III.5. Aire de répartition.....	23
III.6. Importance thérapeutique.....	24
IV. Matériel et méthodes	25
IV. 1. Matériel végétal	25
IV. 2. Extraction assistée aux microondes des polyphénols et des flavonoïdes.....	25
IV. 3. Plan d'expérience	26

IV. 4. Méthode analytique.....	28
IV. 4. 1. Dosage des polyphénols totaux.....	28
IV. 4. 2. Estimation des concentrations des flavonoïdes.....	28
IV. 4. 3. Estimation des activités antioxydantes.....	29
IV. 4. 3. 1. Test anti-radicalaire pour le dosage du DPPH	29
IV. 4. 3. 2. Test anti radicalaire (radical hydroxyle OH)	29
V. Résultats et discussion	30
V. 1. Extraction assisté aux microondes.....	30
V. 2. Analyses quantitatives des composés extraits.....	31
V. 2. 1. Polyphénols	31
V. 2. 2. Flavonoïdes.	32
V. 2. 3. Analyse des activités.....	33
V. 2. 4. Analyse des résultats du plan box behnken.....	33
V. 2. 4. 1. Extraction à partir des feuilles	33
V. 2. 4. 2. Extraction à partir des cônes entiers	41
V. 2. 4. 3. Extraction à partir des cônes poudre	46
Conclusion	52
Référence bibliographique	54

I. Stress oxydatif

L'oxygène (O_2 ou dioxygène) est indispensable à la vie, comme étant nécessaire à la respiration cellulaire chez les organismes aérobies (plantes, champignons, animaux et bactéries aérobies) par l'intermédiaire de la chaîne de transport d'électrons, comme celle des mitochondries des cellules eucaryotes (Baudin, 2020). Cependant, il est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) que par lui-même (Goudable, 1997). La majeure partie de la toxicité de l' O_2 provient de la formation de radicaux libres, qui sont des espèces contenant un ou plusieurs électrons non appariés, dits électrons célibataires (Baudin, 2020).

I.1. Stress oxydatif

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont présentes dans la cellule à des doses raisonnables : leur concentration est régulée par l'équilibre entre leur taux de production et leur taux d'élimination par les systèmes antioxydants (Halliwell et al., 1989). A l'état quiescent la balance antioxydants/pro-oxydants est en équilibre. Cependant cet équilibre redox peut être rompu, soit par une production excessive d'ERO, soit par une diminution des capacités antioxydants. On parle alors de stress oxydant. Un tel déséquilibre peut être provoqué de façon régulée par l'activation de systèmes de production d'ERO. La réponse antioxydant est alors efficace pour compenser cette production et le déséquilibre est transitoire. En revanche, dans certaines situations pathologiques (cancer), la production d'ERO est plus importante et prolongée, et la réponse antioxydant insuffisante. Le déséquilibre est durable (Haleng et al., 2007).

Cette rupture de l'homéostasie redox peut avoir plusieurs origines : stress d'origine exogène (agents environnementaux pro-oxydants), intoxication aux métaux lourds, irradiations, carence en antioxydants apportés par l'alimentation ou anomalies génétiques (Migdal et Serres, 2011).

I.2. Radical libre

Les radicaux libres sont des molécules ou des atomes qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche extrême. Ce sont des espèces chimiques, qui peuvent être formées par la perte ou le gain d'électrons à partir d'un composé non radical. Ils peuvent aussi apparaître au moment de la rupture symétrique d'une liaison covalente après laquelle chaque atome conserve un électron et devient un radical libre (Halliwell et Gutteridge, 1989). Ce sont des

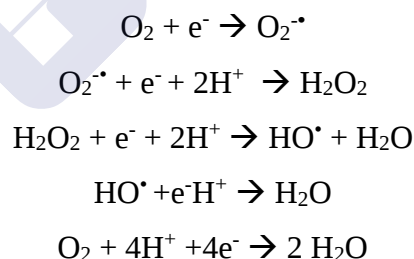
espèces chimiques instables, très réactives, et possèdent un temps de demi-vie extrêmement court ($10^{-9} - 10^{-6}$ S) (Tessier et Marconnet, 1995). Un radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé (Système redox) (Goudable, 1997).

Leurs natures instables les rendent très réactifs vis-à-vis de substrats biologiques et capables d'induire des modifications oxydatives délétères potentiellement impliquées dans l'apparition de pathologies (Haleng et al., 2007).

Les principaux radicaux libres entrant dans les processus physiopathologique humaines sont l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), ou le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$), soit des molécules comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'oxygène singulet (1O_2) (Delattre et al., 2005).

I.2.1. Origine des espèces réactives de l'oxygène

Les radicaux libres peuvent être d'origine exogène : produits des radiations (rayon X et lumière UV), polluants de l'air (N , NO_2), solvants organiques, anesthésiques, pesticides, drogues, xénobiotiques et hyperoxie. Lorsqu'ils sont d'origine endogène, ils sont produits en majorité, au niveau des chaînes respiratoires mitochondriales des cellules des organismes aérobies. La quasi-totalité de l'oxygène moléculaire à l'intérieur de la mitochondrie est réduit au cours du transport des électrons dans le bilan énergétique permet la phosphorylation de l'ADP en ATP. L'oxygène moléculaire subit globalement une quadruple réduction et protonation, conduisant à la formation d'eau :



Environ 98 % de l'oxygène parcourt cette voie, mais la fraction restante s'en échappe, au cours de réduction monovalentes successives, et apparaît sous forme d'espèce réactives (Tessier et Marconnet, 1995). Dans cette chimie particulière, les métaux de transition, comme le Fe^{2+} et le Cu^{2+} , agissent comme catalyseurs dans la formation du radical hydroxyle (Delattre et al., 2005). D'autres sources, cytosoliques ou présentes au sein de différents organites ont été rapporté aussi (Delattre et al., 2005). Les étapes de la réduction de l'oxygène et la formation des intermédiaires partiellement réduits sont détaillées dans le tableau I.1.

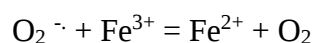
Tableau I .1-Origine des espèces réactives de l'oxygène : réduction de l'oxygène et formation des intermédiaires partiellement réduits.

Réduction tétravalente de l'oxygène		$O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$
$O_2^{\bullet -}$	Anion superoxyde	$O_2 + 1e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$
H_2O_2	Peroxydes d'hydrogène	$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
$\cdot OH$	Radical hydroxyle	$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + Fe^{3+} + OH^-$ $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$
$RO_2^{\bullet}$	Radical peroxyde	$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow RO_2^{\bullet}$
RO_2H	Hydroperoxyde	$RO_2^{\bullet} + RH \rightarrow RO_2H + R^{\bullet}$
$RO^{\bullet}$	Radical alkoxyde	$RO_2H + Fe^{2+} \rightarrow RO^{\bullet} + Fe^{3+} + OH^-$

I.2.2. Principaux espèces réactives d'oxygène

- Anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$

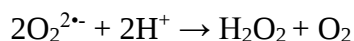
Le radical superoxyde $O_2^{\bullet -}$ est la première espèce réactive de l'oxygène formée. Il provient du fait que l'oxygène dans son état fondamental possède 2 électrons non appariés et doit recevoir un électron à la fois, ce qui est le cas lors de la fuite d'électrons de la chaîne respiratoire. Le radical superoxyde peut agir comme un oxydant ou un réducteur. Cependant son taux de réaction avec les lipides, l'ADN ou les protéines est assez lent. En revanche il est capable de diffuser à travers les membranes et donc son action n'est pas restreinte à la mitochondrie. Le radical superoxyde est capable de réagir avec l'ion ferrique Fe^{3+} pour donner l'ion ferreux Fe^{2+} et de l'oxygène.



D'autre part, il peut se dismuter soit spontanément soit de manière enzymatique et mener à la formation du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , une espèce non radicalaire. Il possède un caractère nucléophile, sa durée de vie est courte en milieu aqueux en raison de la compétition entre les réactions de réduction et de dismutation (Fridovich, 1975).

- Peroxyde d'hydrogène H_2O_2

La principale production de H_2O_2 résulte de la dismutation de l' $O_2^{\bullet -}$ par la superoxyde dismutase selon la réaction suivante :

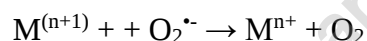


Le peroxyde d'hydrogène diffuse rapidement à travers les membranes cellulaires. Il est possible qu'il soit éliminé en O_2 et H_2O par l'action de la catalase soit par action directe après interaction avec certaines biomolécules, soit par action indirecte en étant le précurseur des radicaux hydroxyles $OH^\bullet$. Il possède des propriétés oxydantes et réductrices au même temps, peu réactif en l'absence de métaux de transition (Bensakhria, 2014).

- Radical hydroxyle $OH^\bullet$

Le radiacal hydroxyl est l'espèce la plus réactive. Il peut être généré de plusieurs manières (Afonso et al., 2007):

- La réaction de Fenton : Décomposition de H_2O_2 en présence de métaux M^{n+} comme le Fe II ou le Cu I, le Co II, le Ti III ou le Cr V selon la réaction suivante :



- La réaction d'Haber-Weiss : Interaction de H_2O_2 avec $O_2^{\bullet -}$ selon la réaction suivante:



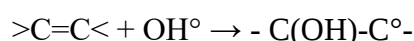
- Coupure homolytique de H_2O_2 sous l'influence de rayonnements UV
- Réaction de l'acide hypochloreux avec l' $O_2^{\bullet -}$.
- Décomposition des ions peroxynitrites ($ONOO^-$). La durée de vie des radicaux hydroxyles est $<10^{-6}$ sec, ils réagissent avec les molécules environnantes et non pas à distance (Bensakhria, 2014). Ces derniers initient des réactions d'oxydation selon trois voies (Afonso et al., 2007) :

- Transfert de charge : $Fe^{2+} + OH^\bullet \rightarrow OH^- + Fe^{3+}$

- Arrachement d'un atome d'hydrogène :



- Addition sur les doubles liaisons :



I.2.3. Cibles des ERO et pathologie associée au stress oxydant

Dans les systèmes vivants, la production des radicaux libres oxygénés se fait de manière continue. Toutes les molécules biologiques possédant des doubles liaisons sont particulièrement affectées par les radicaux libres, entraînant une grande réactivité de ces espèces chimiques vis à vis des lipides, des protéines et de l'ADN. C'est pourquoi les effets des radicaux libres sont retrouvés dans tout l'organisme et dans des pathologies très variées (Goudable, 1997). Plusieurs pathologies, impliquant le stress oxydant dans leur développement, ont été recensées : maladies cardio-vasculaires (oxydation des lipides) et le cancer (oxydation de l'ADN), diabète (obésité, syndrome métabolique) (Defraigne, 2005 ; Vincent et Taylor , 2006). Les Principales cibles biologiques des ERO sont l'acide désoxyribonucléique, les protéines et les lipides membranaires.

- L'acide désoxyribonucléique ou ADN

Le radical hydroxyle est connu pour réagir avec tous les composants de la molécule d'ADN, d'endommager les bases puriques et pyrimidiques et aussi le désoxyribose. La lésion de l'ADN la plus étudiée est la formation de 8-OH-G. Les modifications permanentes du matériel génétique résultant de ces dommages oxydatifs représente la première étape impliquée dans la mutagenèse, la carcinogenèse et le vieillissement (Haleng et al., 2007).

- Les protéines

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des ERO. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus avec, pour conséquences, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (non reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique). Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire (Haleng et al., 2007).

Les modifications oxydatives des protéines par les ERO provoquent l'introduction d'un groupement carbonyle dans la protéine. Ces réactions d'oxydation sont fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Fe^{2+} ou le Cu^{2+} . Les réactions d'oxydation de protéines peuvent être classées en deux catégories : d'une part, celles qui coupent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne peptidique, et d'autre part, les

modifications des peptides par addition de produits issus de la peroxydation lipidique. De telles modifications conduisent généralement à une perte de fonction catalytique ou structurale des protéines affectées et deviennent généralement plus sensibles à l'action des protéases et sont donc éliminées (Armstrong, 2002).

- Les lipides membranaires

Les acides gras polyinsaturés sont les cibles privilégiées des ERO. Plus l'acide gras est insaturé et plus il est susceptible d'être peroxydé. Il s'agit d'un enchaînement de réactions radicalaires organisées en trois phases successives. La phase d'initiation consiste en la création d'un radical d'acide gras ($L^{\bullet}$) à partir d'un acide gras (LH) par soustraction d'un atome d'hydrogène. Cette déshydrogénation peut être provoquée par un initiateur radicalaire tel que le $OH^{\bullet}$ et le $HOO^{\bullet}$. Le radical lipidique $L^{\bullet}$ subit ensuite un réarrangement moléculaire pour donner un radical avec une structure diène conjugué, plus stable, qui peut réagir avec une molécule d' O_2 et former un radical peroxy ($LOO^{\bullet}$). Ce radical est suffisamment réactif pour arracher à nouveau, un hydrogène à un acide gras polyinsaturé voisin, propageant ainsi la réaction. Chaque radical $L^{\bullet}$ peut être à l'origine d'une centaine de molécules d'hydroperoxyde avant que survienne la phase de terminaison dans laquelle le radical peroxy ($LOO^{\bullet}$) rencontre deux radicaux libres et la formation d'un composé stable ou le plus souvent par la réaction du radical avec une molécule antioxydante (Spiteller, 1998).

I.3. Antioxydants et systèmes de défense :

Un antioxydant est une espèce chimique plus ou moins complexe qui réduit le stress oxydant au sein de l'organisme ; c'est un groupe hétérogène composé de systèmes antioxydants endogènes, enzymatiques ou non, de vitamines, d'oligo-éléments ou encore de polyphénols. Un antioxydant peut : prévenir la synthèse de radicaux libres en inhibant l'initiation des chaînes réactionnelles ou désactiver directement les ERO (Desmier, 2016). Les antioxydants peuvent être classés selon leurs modes d'actions : systèmes enzymatiques, inhibiteurs d'enzymes oxydantes, chélateurs de métaux et piègeurs de radicaux libres

I. 3. 1. Antioxydant enzymatique

Pour contrôler la production permanente des ERO, les organismes vivants possèdent des systèmes de défense qui les protègent contre les dommages des ERO. Ces défenses permettent de maintenir la concentration en espèces radicalaires à un taux basal (homéostasie

physiologique). En effet, elles possèdent une grande affinité pour les ERO, avec lesquelles elles réagissent très rapidement pour les neutraliser (Soulère et al., 2002). Les principaux antioxydants enzymatiques sont : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPX).

- La superoxyde dismutase (SOD)

Les SOD éliminent les radicaux superoxydes par dismutation du radical en eau oxygénée H_2O_2 (Soulère et al., 2002).



Cependant, le peroxyde d'hydrogène est diffusible et dangereux à distance. La synthèse des SOD subit un rétrocontrôle négatif par les fortes concentrations de peroxyde d'hydrogène. L'activité des SOD est dépendante des apports nutritionnels en cuivre et à un moindre degré en zinc (Goudable, 1997).

a. La catalase

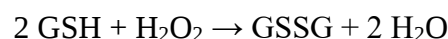
La catalase est une enzyme intracellulaire, localisée principalement dans les peroxysomes. Elle catalyse la réaction de détoxification du H_2O_2 (généralement produit par la SOD).



Elles n'éliminent pas la totalité du peroxyde d'hydrogène, mais leur rôle est très important surtout en présence d'ions ferreux, en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier. Elles sont quantitativement moins efficaces que le système des glutathion peroxydases (Goudable, 1997).

b. La glutathion peroxydase (GPX)

Les enzymes de cette famille sont Sélénium (Se)-dépendante. La glutathion peroxydase (GPX) est présente dans le cytoplasme où elle joue un rôle majeur dans la régulation de l'état redox physiologique intracellulaire des cellules vasculaires. Elle catalyse la réduction des hydroperoxydes (H_2O_2), et des peroxydes lipidiques en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène (Reddy et al., 1982).

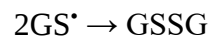
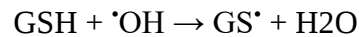


I. 3. 2. Antioxydant non enzymatique

Les principaux antioxydants non-enzymatiques sont le glutathion, la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes et l'acide urique. Ces molécules vont interrompre la chaîne de réaction radicalaire (Cadenas, 1989).

a. Le glutathion

- Le glutathion est un tri-peptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine : γ -L-Glutamyl-L-cystéinyglycine. Il est particulièrement important car c'est le substrat de plusieurs enzymes antioxydantes (Halliwell and Gutteridge, 1999). Il peut également régénérer la vitamine E (Reddy et al., 1982) et réagir avec les radicaux $\text{HO}^\bullet$ et $\text{O}_2^\bullet$ directement et ainsi casser la chaîne d'oxydation (Hermes-Lima, 2005) selon :



La maintenance d'un niveau élevé de glutathion est donc essentielle pour prévenir d'éventuels dégâts oxydatifs (Halliwell and Gutteridge, 1999).

b. La vitamine E

- La vitamine E ou α -tocophérol (Figure I .1), est un antioxydant liposoluble capable d'empêcher ou d'arrêter la propagation de la peroxydation lipidique.

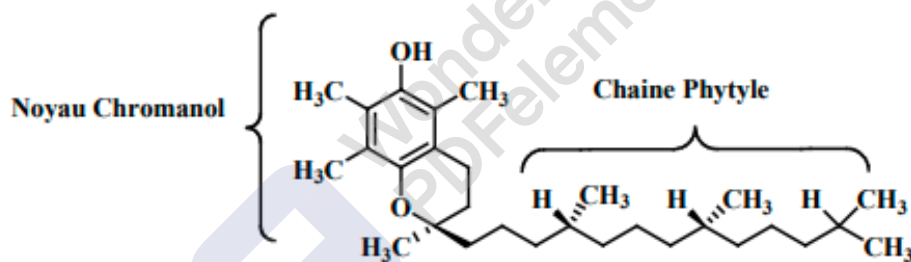


Figure I .1- vitamine E

Elle agit in vivo et in vitro en neutralisant les radicaux libres, devenant elle-même un toxique. La réduction de la vitamine E oxydée est assurée par la vitamine C. Les concentrations de ces deux vitamines sont donc nécessairement liées pour la protection contre la peroxydation lipidique (Goudable, 1997).

c. Les caroténoïdes

- Les caroténoïdes sont des molécules liposolubles produites par les organismes photo-autotrophes et qui doivent être acquis par l'alimentation chez les animaux. Leur potentiel antioxydant pour lutter contre la peroxydation lipidique a été démontré très tôt (Monaghan et Schmitt, 1932). De façon formelle, tous les caroténoïdes dérivent d'une structure linéaire ($C_{40}H_{56}$) avec de nombreuses doubles liaisons. Le chef de file des caroténoïdes est cependant le β -carotène, également appelé provitamine A car, après hydrolyse hépatique, il donne naissance à deux molécules de vitamine A (Haleng et al., 2007).

d. La vitamine C

La vitamine C ou acide L-ascorbique (Figure I.2) est une molécule soluble dans l'eau. Elle est synthétisée par les plantes et la plupart des animaux, excepté chez certains mammifères tels que l'homme. C'est une molécule antioxydante capable de réagir directement avec tous les ROS réduisant ainsi la peroxydation lipidique et les dommages aux protéines et à l'ADN. La vitamine C a également un pouvoir antioxydant indirect en recyclant les caroténoïdes et la vitamine E. D'un autre côté, la vitamine C permet le recyclage de Fe^{3+} en Fe^{2+} favorisant ainsi la réaction de Fenton et a donc de manière indirecte une action pro-oxydante (Goudable, 1997).

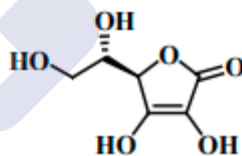


Figure I.2- vitamine C ou acide ascorbique

I. 3. 3. Les antioxydants phénoliques de synthèse

Il existe plusieurs antioxydants synthétiques dont les squelettes sont souvent dérivés des antioxydants naturels (hémisynthèse ou mimes de structures naturelles). Le but de ces synthèses est l'amélioration de l'activité antioxydante, la biodisponibilité et le coût des molécules (Vacaresse, 2001). Les principaux composés sont :

- Trolox®

Trolox ou l'acide 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tétraméthylchroman-2-carboxylique (Figure I .3) est l'exemple classique d'antioxydant synthétique dérivé de la vitamine E, cette molécule est souvent utilisée comme antioxydant de référence (Vacaresse, 2001).

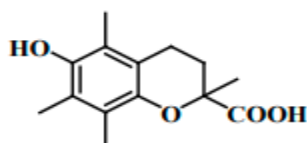


Figure I .3- trolox

- Probucol

Probucol un hypolipédémiant (Figure I .4). Ses propriétés antioxydantes et antiathérogènes ont été étudiées in vivo, il inhibe la formation de la plaque d'athérome chez le lapin (Witting ,2000).

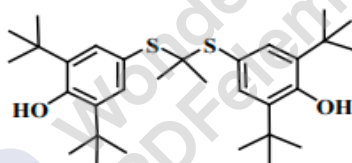


Figure I .4- probucol

- BO-653

BO-653 ou le 2,3-dihydro-5-hydroxy-2,2-dipentyl-4,6-ditertiobutyl-benzofurane (Figure I .5), un composé avec une activité antioxydante meilleure que celle de l'α-tocophérol et du probucol (Noguchi et Nikie, 2000).

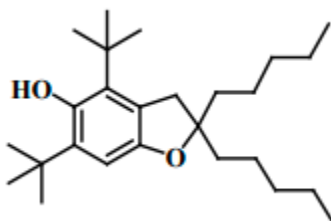


Figure I .5- BO653

II. Polyphénols

Les polyphénols constituent une famille de molécules largement présente dans le règne végétal. Ces composés sont le produit du métabolisme secondaire des plantes. Ils sont caractérisés par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire (Richter, 1993). Ces composés phénoliques englobent un vaste ensemble de plus de 8000 molécules divisées en une dizaine de classes chimiques (Martin et Andriantsitohaina 2002). Les polyphénols ont un rôle très important, ils participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques ou abiotiques (pathogènes, rayonnements UV...) (Druzyńska B et al., 2007).

II.1. Classification des polyphénols

Les polyphénols présentent tous un point commun : la présence d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones (phénol) lui-même porteur d'une ou plusieurs fonctions hydroxyles (OH). On distingue plusieurs familles de molécules dont la structure est relativement proche (Zerargui, 2015). Les polyphénols sont communément subdivisés en plusieurs groupes (Macheix et al., 2006).

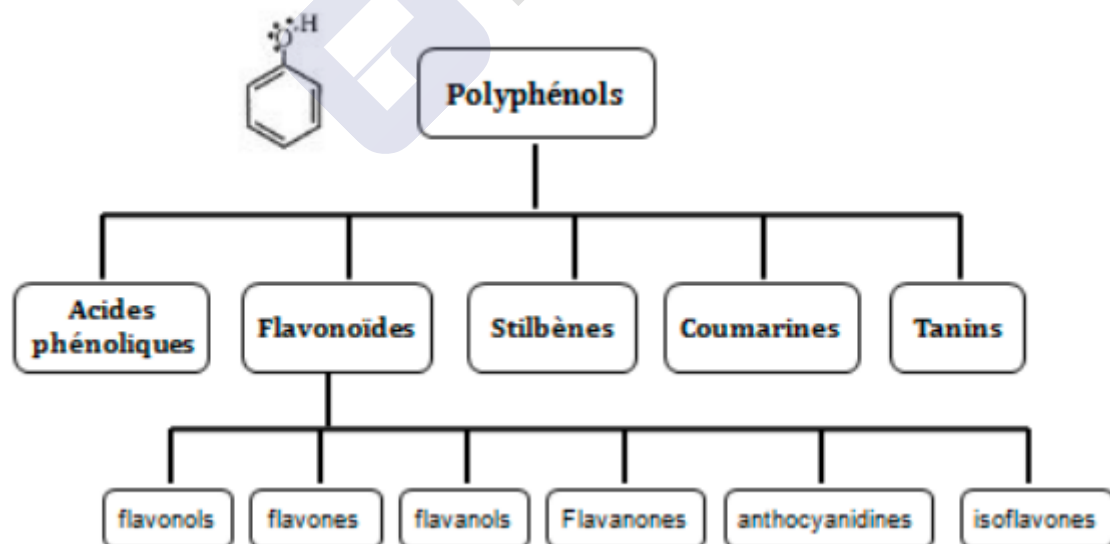


Figure II .1-Classification des polyphénols (Macheix et al., 2006).

Les composés phénoliques (acides phénoliques, tannins et flavonoïdes) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes (Beta et al., 2005).

- Acide phénolique

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples, deux grands groupes sont retrouvés : les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques.

- Acides hydroxybenzoïques

Les acides hydroxybenzoïques sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C₆-C₁ (Figure II .2). Les acides hydroxybenzoïques existent fréquemment sous formes d'esters ou de glycosides. Les principaux acides hydroxybenzoïques retrouvés dans les végétaux sont les acides phydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique et syringique (Boubekri, 2014).

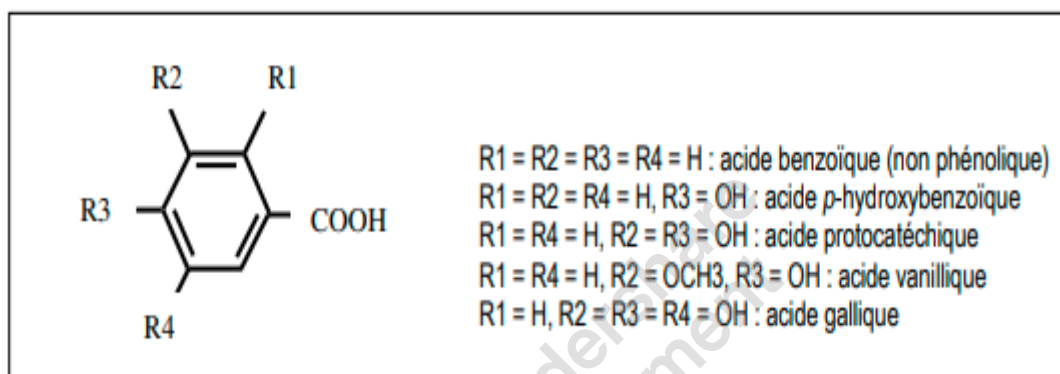


Figure II .2- Quelques exemples de structures chimiques des acides hydroxybenzoïques

- Acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base C₆-C₃ dérive de celle de l'acide cinnamique (Figure II .3). Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires sont un des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules. De plus, l'existence d'une double liaison dans la chaîne latérale conduit à deux séries isomères (*cis* ou *Z* et *trans* ou *E*) dont les propriétés biologiques peuvent être différentes. Les formes *trans* sont cependant naturellement prépondérantes (Boubekri, 2014).

Ces composés ont une distribution très large. Rarement libres, ils sont souvent estérifiés (Afanas'ev I.B. et al . 1989) et peuvent également être amidifiés ou combinés avec des sucres (O-acylglucosides, Oarylglucosides) ou des polyols tels que l'acide quinique (Beta et al. 2005).

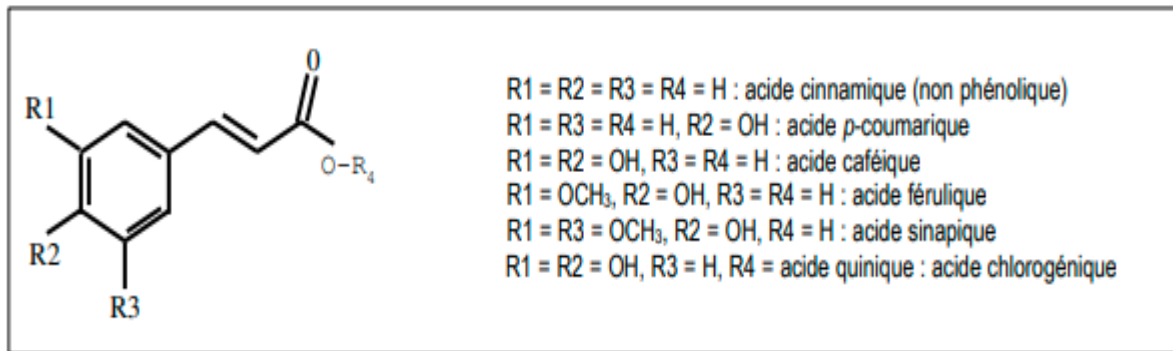


Figure II .3- Quelques exemples de structures chimiques des acides hydroxycinnamiques

- Flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent la majorité des composés phénoliques qui sont caractérisés par leur faible poids moléculaire. Plus de 4000 flavonoïdes sont responsables de la pigmentation des plantes, comme les anthocyanosides donnant la coloration rouge ou bleu ainsi que les chalcones, les aurones et les flavonols qui ont la couleur jaune (Heim et al., 2002).

Tous les flavonoïdes possèdent la même structure de base (C6-C3-C6), ils contiennent quinze atomes de carbone dans leur structure de base: deux cycles aromatiques A et B à six atomes de carbones (Figure II .4) liés avec une unité de trois atomes de carbone qui peut ou non être une partie d'un troisième cycle C (Boubekri, 2014).

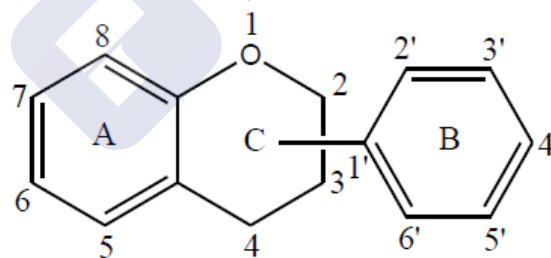
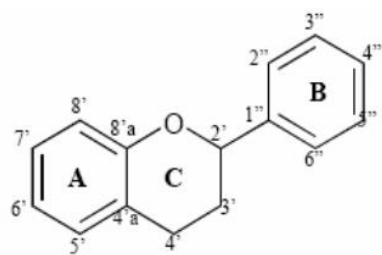
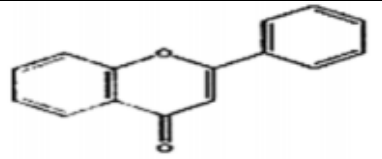
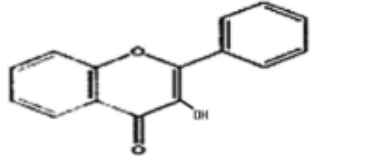
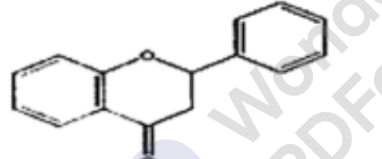
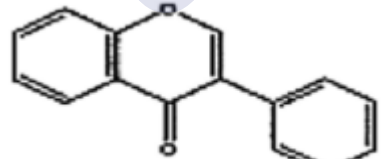
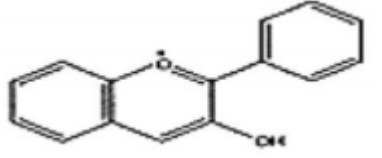


Figure II .4- Structure de base des flavonoïdes

Les principales classes des flavonoïdes sont : les flavonols les flavones, les flavanones, les flavan-3-ols, les isoflavones et les anthocyanes, ils varient dans leurs caractéristiques structurales par la diversité fonctionnelle autour de l'oxygénation de l'hétérocycle (Tableau II .1).

Tableau II .1- Principales classes des flavonoïdes (Heim et al., 2002)

Classe	Structure générale	Flavonoïde	Substituants
flavanol		Catéchine epicatéchine	3, 5, 7, 3', 4'-OH 3, 5, 7, 3',4'-OH
Flavone		Chrysine Apigénine Rutine Luteoline	5,7-OH 5, 7, 4'-OH 5, 7, 3', 4'-OH, 3-rutinoside 5, 7, 3', 4'-OH
Flavonole		Kaempferole Quercétine Myricétine Tamarixétine	3, 5, 7, 4'-OH 3, 5, 7, 3', 4'-OH 3, 5, 7, 3', 4', 5'-OH 3, 5, 7, 3'-OH, 4-OMe
Flavanone		Naringène Naringénine Taxifoline	5,4'-OH, 7-rhamnoglucose e 5, 7, 4'-OH 3, 5, 7, 3', 4'-OH
Isoflavone		Genistéine Genistéine Daidzine Daidzéine	5, 4'-OH, 7-glucose 5, 7, 4'-OH 4'-OH, 7-glucose 7, 4'-OH
Anthocyanidine		Apigénidine Cyanidine	5, 7, 4'-OH 3, 5, 7, 4'-OH, 3, 5-OMe

- Stilbène

Les membres de cette famille possèdent la structure C₆-C₂-C₆, avec un cycle A portant deux fonctions hydroxyles en position méta et un cycle B portant des fonctions hydroxyles ou méthoxyles en méta, ortho et para (Figure II .5). Les deux noyaux aromatiques sont reliés par une double liaison, formant un système conjugué. Ils sont généralement isolés des plantes sous formes hydroxylés, méthylés, esterifiés, glycosylés ou même prenylés. Leur solubilité est négligeable dans l'eau et accrue dans la plupart des solvants organiques (Boubekri, 2014). Les stilbènes sont des phytoalexines, composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux (Crozier et al., 2006).

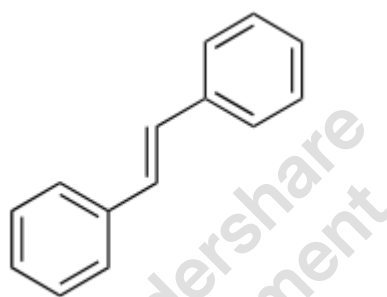


Figure II .5-Structure de stilbene

- Coumarine

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. Ce sont des composés phénoliques cyclisés (Figure II .6) qui dérivent des acides *t*-cinnamique et *p*-coumarique pour la majorité d'entre eux (Boubekri, 2014). Outre la structure de la coumarine, ces composés ont la particularité d'être hydroxylés en 7. Les substitutions les plus fréquentes se font en 7 et 8 avec essentiellement des hydroxylations ou des méthoxylations.

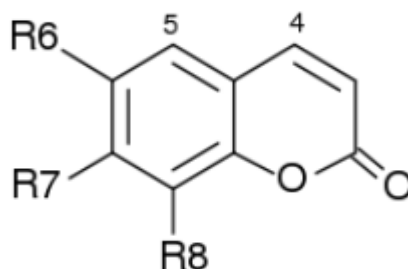


Figure II .6- Structure chimique de la coumarine

Les coumarines ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration mais aussi suivant l'espèce. Dans la cellule, les coumarines sont principalement présentes sous forme glycosylée. Cette glycosylation serait une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques des coumarines sur la cellule et la croissance. Elles sont considérées comme des phytoalexines (Boubekri, 2014).

- Tanins :

Les tanins sont des polyphénols de structure complexe, avec une activité antioxydante très puissante due au piégeage de $O_2^{\bullet-}$ grâce aux différents groupes phénoliques (Madi, 2018). Selon la structure, on distingue : les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

- **Tanins hydrolysables :** Les tanins hydrolysables ou acides tanniques (Figure II .7) sont des polymères de l'acide gallique ou de son produit de condensation ; l'acide ellagique. Ils ont un poids moléculaire plus faible (Boubekri, 2014 ; Madi, 2018).

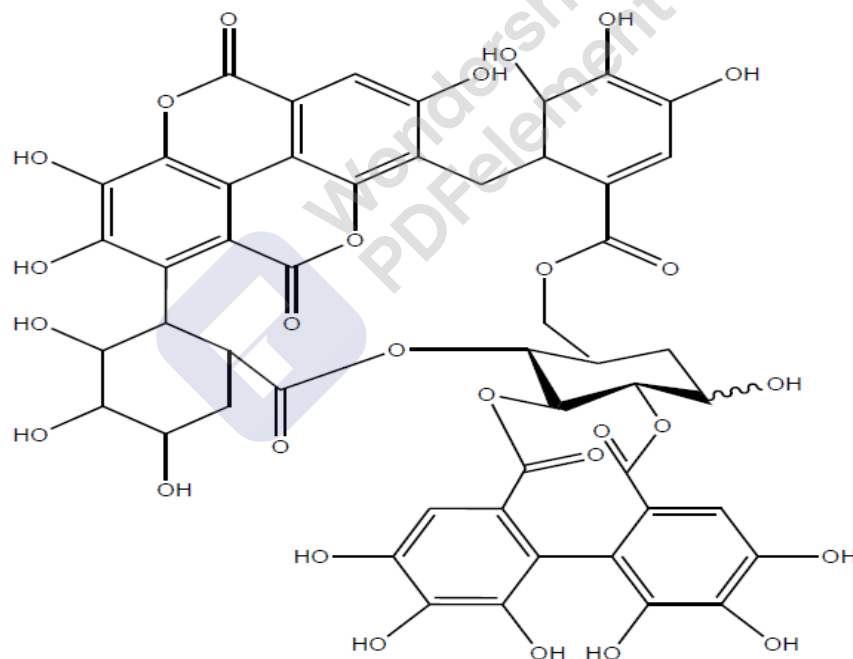


Figure II .7- Exemple des tanins hydrolysables

- **Tanins condensés :** Les tanins condensés (proanthocyanidines ou procyanidines) sont des polyphénols de masse molaire élevée (Figure II .8). Ils résultent de la polymérisation auto oxydative ou enzymatique des unités de flavan-3,4-diol liées majoritairement par les liaisons C4-C8 ou C4-

C6 des unités adjacentes, ou bien des liaisons C4-C8 avec une liaison d'éther additionnelle entre C2 et C7 (Boubekri, 2014 ; Madi, 2018).

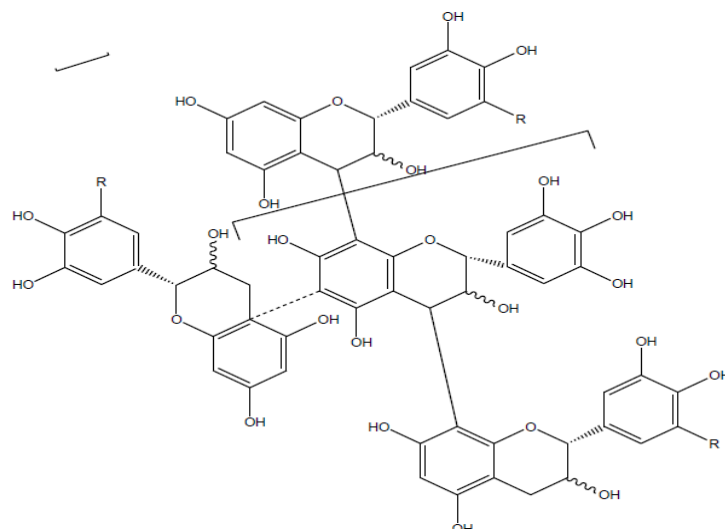


Figure II .8- Exemple des tanins condensés

II.2. Rôle et intérêt des composés phénoliques

Les bienfaits des polyphénols sur la santé, notamment grâce à leur pouvoir antioxydant mais aussi dans la prévention ou le traitement de nombreuses pathologies comme les cancers, les maladies cardiovasculaires ou dégénératives, ont été rapportés dans la littérature (Nsemi, 2018). Le tableau 3 résume les principaux rôles des polyphénols dans la protection contre certaines maladies (François M, 2010).

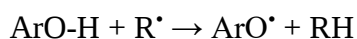
Tableau II .2- Propriétés biologiques des quelques polyphénols dans l'organisme
(François, 2010)

Polyphénols	Activités biologiques
Acides phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes, anti-ulcéreuses, antiparasitaires antifongiques, Antioxydantes.
Coumarines	Protectrices vasculaires, antiinflammatoires, anti parasites analgésiques et anti œdémateuses.
Flavonoïdes	Antitumorales, antiparasitaires, vaso, dilatoires, antibactériennes, anti carcinogènes, anti-inflammatoires, analgésiques, hypotenseurs, antivirales, diurétiques, ostéogène, antioxydantes, anti-atherogéniques, antithrombotique, anti- allergique.
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux, Anti oxydant.
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène, antioxydantes, antitumorales, antifongiques et anti-inflammatoires.
Tannins galliques et catéchiques	Antioxydantes.
Lignanés	Anti-inflammatoires, analgésiques.
Saponines	Antitumorale, anticancérigène,...
Phytostérols	Agent de protection contre l'hormone dépendant du cancer de colons.

Les polyphénols sont également utilisés en agroalimentaire, en cosmétique ou dans l'industrie pharmaceutique comme additifs.

II. 3. Modes d'action des polyphénols

Le mécanisme de piégeage des radicaux libres par les polyphénols se fait par le transfert de l'atome d'hydrogène. Le radical libre est réduit par transfert de l'atome d'hydrogène de l'antioxydant (ArO-H) vers le radical (R[•]) (Desmier, 2016).



Le radical $\text{ArO}^\bullet$ ainsi formé sera stabilisé selon (Desmier, 2016) par :

- délocalisation des électrons π ,
- un nouveau transfert d'atome d'hydrogène conduisant à la formation de quinone,
- réaction avec un autre radical libre.

Les polyphénols sont capables d'interagir avec les métaux de transition, notamment avec le fer et le cuivre. En effet les ROS sont produits abondamment par réduction d' O_2 par Fe^{2+} ou Cu^+ aboutissant à la formation de superoxyde, de peroxyde d'hydrogène et de radicaux oxyde (réaction de Fenton). Ainsi la formation de complexes chélateurs stables et inertes est un mécanisme antioxydant (Desmier, 2016).

Les polyphénols exercent une activité antioxydante via plusieurs mécanismes (Halliwell, 1994):

- Le piégeage direct des ERO : Les polyphénols (Ar-OH), sont capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, les peroxydes ($\text{ROO}^\bullet$), les alkoxydes ($\text{RO}^\bullet$) et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène (Jovanovic et al., 1994).



Où $\text{X}^\bullet$: Représente l'une des ERO.

- L'inhibition des enzymes génératrices d'ERO : les flavonoïdes sont les molécules les plus susceptibles d'être impliquées dans cet effet (**Lin et al., 2002**)
- La chélation des ions de métaux de transitions, responsables de la production des ERO ;
- L'induction de la biosynthèse d'enzymes antioxydants.

III. Cupressus (cypres)

III.1. Cupressus

Le Cupressus est un bel arbre au feuillage toujours vert, pouvant attendre jusqu'à 25 mètres de hauteur et une longévité exceptionnelle de 2000 ans. Il est connu sous les noms de Cyprés pyramidal, Cyprés toujours vert, Cyprés d'Italie ou Cyprés femelle (Chéraif et al, 2006). Originaire de l'Est de la Méditerranée (Proche et Moyen Orient). Il aurait été introduit à Chypre et en Crète par les Phéniciens puis dans l'Ouest de la Méditerranée (France, Espagne, Italie). Cette espèce est typique des paysages du pourtour méditerranéen (Froux, 2002). Cupressus est une plante aromatique et médicinale (Amara et Boughérara, 2017).

III.2. Taxonomie

Le cyprés vert, arbre du genre *Cupressus*, est un conifère qui appartient à la famille des *Cupressaceae*, sous famille des *Cupressoideae* (Pontoppidan, 2000). Le cyprés fait partie de l'embranchement des Gymnospermes et de l'ordre des coniférales qui regroupe des plantes ligneuses (Gazengel et Orecchioni, 2000). Le tableau 4 reprend la taxonomie du cyprés vert.

Tableau III .1- Classification du Cyprés vert (Bock, 1992).

Embranchement	Spermaphytes
Sous Embranchement	Gymnospermes
Classe	Pinopsida
Ordre	Pinales
Famille	<i>Cupressaceae</i>
Genre	<i>Cupressus</i>
Espèce	<i>sempervirens</i>

III.3. Caractéristiques botaniques

Arbre (conifère) à grande longévité, monoïque et thermophile, au tronc rectiligne à l'écorce d'un gris brunâtre fibreuse et striée verticalement, les rameaux écailleux sont bruns (Becker et al., 1982). De taille moyenne de 20 à 30 m. On distingue différentes formes de Cyprés qui par sélection, ont donné des variétés aujourd'hui bien distinctes reproduites par bouturage (Delaveau, 1986).

Le port est élanqué, conique, en étroite colonne compact et dense. Son feuillage est persistant, aromatique, vert foncé. Sur de courtes ramules, petites feuilles glanduleuses (glandes résinifères), squamiformes, imbriquées sur au moins 4 rang à la pointe émoussée (Delaveau, 1986). Fleurs monoïques, en chatons terminaux, les mâles petits ovoïdes, les femelles subglobuleux à 6-12 écailles ; les fruits ou galbules sont des cônes gris brun luisant, subglobuleux, de 2-3 cm de large, déhiscent, à écailles opposées en croix, épaisses, ligneuses, persistantes, terminées en écusson tétragonalmucroné vers le centre ; graines nombreuses, ovoïdes-comprimées, étroitement ailées (Raynaud, 2005).



Figure III .1- feuille et cône de cyprès

III.4. Caractéristiques écologiques

Le Cyprès est une plante de climat doux. Il a besoin de chaleur ; il doit être protégé des vents froids. Il peut résister à des températures négatives allant jusqu'à -20°C. Comme beaucoup de plantes méditerranéennes, c'est le froid humide en hiver qui peut être préjudiciable à sa longévité (Alifriq, 1995).

Le Cyprès est une essence xérophile, robuste, susceptible de s'adapter à des conditions physiques très sévères. Mais il peut être plastique et se développer dans des climats humides. En effet, le Cyprès est un arbre qui n'a pas d'exigence pluviométrique et peut se contenter de 250 à 350 mm / an (Delaveau, 1986).

Le cyprès vert n'a pas d'exigence spécifique pour se développer ; il est indifférent à la nature chimique du substrat. Il peut croître sur des sols profonds, drainés, comme il peut se développer sur un sol ras, sec et calcaire. Il peut tolérer des sols superficiels (moins de 50 cm, voire 30cm) et caillouteux. Il supporte mal les terres argileuses ou trop gorgées d'eau (Benjamaa, 2004).

III.5. Aire de répartition

La distribution naturelle de cette espèce n'est pas claire et a une distribution irrégulière. Le genre *Cupressus* est présent en Europe (la Méditerranée), de l'Afrique du Nord à l'Iran et de l'Asie de l'Est jusqu'à l'Himalaya. Le genre *Cupressus* en Europe, en Asie du Sud-Ouest et en Afrique du Nord est représenté par des taxons pouvant être adaptés à une sécheresse extrême ou au moins à des étés secs et chauds. Mais aussi, il est retrouvé à l'ouest de l'Amérique du Nord, y compris le Mexique (Rahmani, 2020).

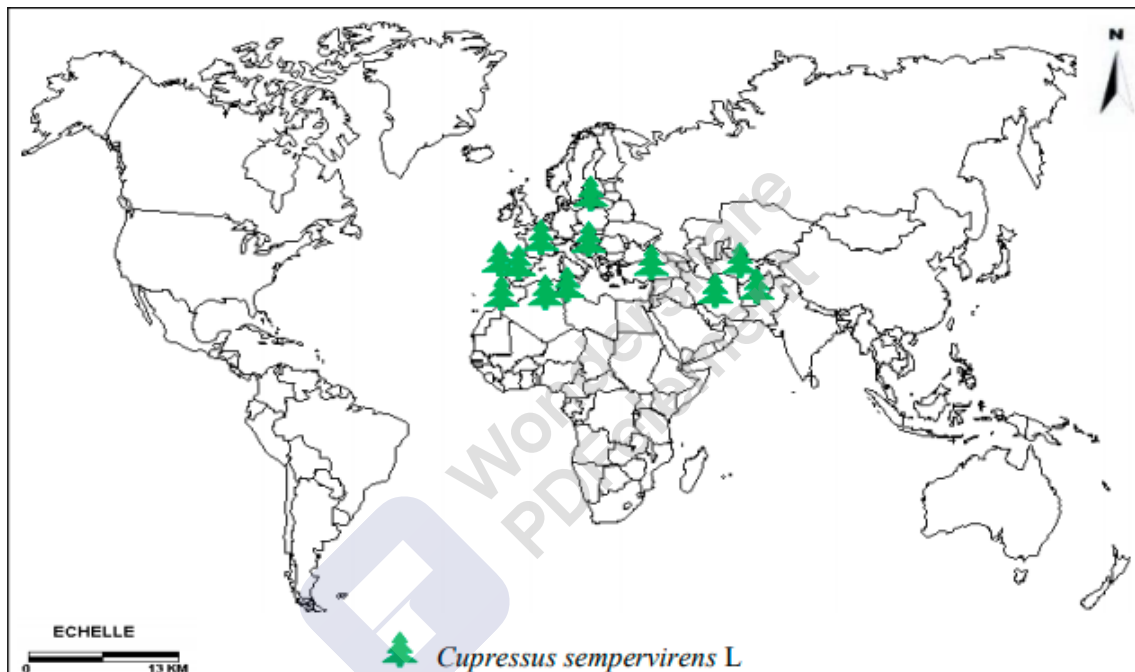


Figure III .2- Aire de répartition du *Cupressus sempervirens* L(Delaveau P ,1986)

III.6. Importance thérapeutique

- Utilisation ancestrale

Les feuilles bouillies dans du saindoux afin d'obtenir une solution utilisée par les Amérindiens pour soulager les douleurs articulaires et musculaires, le paludisme, la toux, la goutte et les rhumatismes. Les feuilles sont utilisés pour les perturbations suivantes tant l'irritabilité psychologique et physique, l'impatience forte, le pessimisme et l'anxiété, l'insomnie, des maux de tête, des taches de la peau et les taupes, les ongles cassants, prédisposition à varicose veines, transpiration accompagnée d'une odeur très forte, la sensibilité aux polypes, les infections et l'inflammation des voies urinaires (cystite), des douleurs abdominales et la constipation menstruel, les soins des cheveux (associée au Henné) (Lakhdar, 2015).

- Activité anti-microbienne et antiparasitaire

L'extrait méthanolique et à un degré moindre, l'extrait éthanolique de *Cupressus sempervirens*, ont révélés une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Echerchia coli*, *Klebsiella pneumonia* et *Salmonella typhimurium*. *Salmonella typhimurium*. (Boukhris et al., 2012).

Deux diterpènes : taxodione et 6-désoxytaxodione, isolés de l'extrait éthanolique de *Cupressus sempervirens*, ont montré une forte activité anti-leishmanienne contre *Leishmania donovani promastigotes* (Zhang et al., 2012).

IV. Matériel et méthodes

IV. 1. Matières végétal

La Matière végétal étudié est constitué de rameaux feuillés et de cônes de *Cupressus sempervirens* L. (cypres) adulte. Les échantillons ont été récoltés au mois d'avril de l'année 2021 dans la région de Douira, wilaya d'Alger. Les rameaux feuillés et les cônes ont été lavés et séchés à température ambiante à l'abri de la lumière.

IV. 2. Extraction assistée aux microondes des polyphénols et des flavonoïdes

a. Principe de l'extraction assisté aux microondes

Le principe de chauffage par micro-ondes consiste à chauffer le solvant en contact avec l'échantillon au moyen de l'énergie des micro-ondes (Jain et al., 2009)

La chauffe par micro-ondes s'effectue de l'intérieur vers l'extérieur. Cette particularité entraîne une extraction des principes actifs végétaux par surpression interne (Galema et saskia, 1997).

Les micro-ondes qui peuvent facilement pénétrer dans les pores de l'échantillon, ce qui permet au solvant piégé dans les pores de chauffer de manière uniforme et rapide. Contrairement au chauffage conventionnel où le récipient met longtemps à chauffer puis à transférer son énergie au solvant (Lopez-avila, 2000). L'extraction par micro-ondes présente des avantages évidents avec un temps d'extraction plus court et la réduction de consommation du solvant (Wang et Weller, 2006)

b. Procédure d'extraction

Une masse du matériel végétal est mise en suspension dans de l'eau distillée dans un Erlen-Meyer. Le mélange est soumis à des radiations microonde dans un four-micronde domestique (Samsung ME37A). Le mélange est traité à une puissance donnée et pendant un temps déterminé (cf matrice d'expérience). A la fin de temps d'extraction, le mélange est plongé dans un bain glacé pour arrêt de l'extraction des biomolécules et filtré. Le filtrat est conservé dans des tubes fermés hermétiquement jusqu'à analyse.

L'effet de trois facteurs, masse de la matière végétale, temps d'irradiation et puissance ont été étudiées. L'extraction des polyphénols et des flavonoïdes a été exécutée pour :

- Rameaux feuillés coupé en morceau,
- Cônes fragmentés,
- Cônes en poudre (les cônes ont été réduit en poudre fine dans un broyeur ménager : Moulinex D56).

IV. 3. Plan d'expérience :

Le plan d'expérience utilisé pour la réalisation de ce travail s'inspire du modèle des plans de surface, spécifiquement le plan de Box-Behnken. Ce type de plan permet une bonne gestion du processus expérimental. L'effet moyen, les effets principaux des facteurs et leurs interactions ont été estimés pour une bonne modélisation des réponses étudiées (Goupy et Creighton, 2006). L'avantage majeur de cette technique réside dans le fait que le nombre d'expérience est réduit d'où un gain de temps et d'argent. La réduction du nombre des essais n'influe en aucun cas sur la qualité des résultats, les essais sont structurés et organisés dans une matrice. La matrice est composée de mailles de points distribués uniformément dans l'espace. La matrice est sous forme codée, où chaque variable est convertie en une valeur codée selon l'équation suivante :

$$X_i = \frac{x_i - x_0}{\delta x} \dots \dots \dots (1)$$

X_i est la valeur codée de la variable, x_i est la valeur réelle de la variable, x_0 est la valeur du point central et δx est la variation entre les niveaux haut et bas.

Pour notre étude, nous avons étudié l'influence de trois paramètres : la masse de la matière végétale (X_1), le temps d'irradiation (X_2) et la puissance (X_3) sur les réponses suivantes : concentration en polyphénols, concentration en flavonoïdes et activité antioxydante.

Après des essais préliminaires (non exposés dans notre mémoire), les niveaux expérimentaux choisis pour les différents facteurs sont présentés dans le Tableau IV .1.

Tableau IV .1- Niveaux expérimentaux choisis pour les trois facteurs étudiés

Variables	Niveau		
	-1	0	+1
Masse en g (X_1)	3	4.5	6
Temps en mn (X_2)	2	4	6
Puissance en W (X_3)	300	450	600

L'ensemble des expériences est généré par un logiciel, JMP 9.0.2 (SAS Institute) (Tableau IV .2).

Tableau IV .2 -Plan d'expérience de trois facteurs (matrice de Box-Behnken).

Essai	X1	X2	X3
1	0	0	0
2	1	0	-1
3	1	-1	0
4	-1	1	0
5	-1	0	-1
6	0	1	-1
7	1	1	0
8	-1	0	1
9	0	1	1
10	0	-1	-1
11	0	0	0
12	-1	-1	0
13	0	-1	1
14	0	0	0
15	1	0	1

Les réponses aux essais réalisés permettent d'estimer les coefficients d'un modèle mathématique polynômial du second degré selon le modèle suivant (Hasan et al., 2010) :

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \dots\dots\dots(2)$$

Avec:

y: réponse expérimentale;

X_i : variables codées (-1 ou +1) ;

β₀: estimation de l'effet moyen général

β_i : estimation de l'effet principal du facteur i pour la réponse y;

β_{ij}: estimation de l'effet d'interaction entre le facteur i et le facteur j pour la réponse y ;

β_{ii} : estimation de l'effet quadratique du facteur i pour la réponse y.

L'intérêt essentiel de ce modèle mathématique est de pouvoir prédire, en tout point du domaine expérimental, les valeurs de la réponse Y. Les prévisions ainsi calculées doivent être aussi proches que possible des valeurs qui seraient obtenues par expérimentation.

IV. 4. Méthode analytique

IV. 4. 1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé selon la méthode de Folin Ciocalteu. L'ensemble des composés phénolique est oxydé par le réactif de folin-ciocalteau. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite possède une absorption maximum aux environs de 750 nm. Elle est proportionnelle au taux de composés phénoliques (Kim et al., 2003).

- **Protocole**

Pour réaliser le dosage, 200 μ L de chaque extrait filtré, est ajouté 1.5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois). Après 4 min, 1,5 mL de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 5% est ajouté au mélange. L'ensemble est agité et laissé à l'obscurité pendant 2 heures. L'absorbance est ensuite lue à 750 nm grâce à un spectrophotomètre UV/visible (JENWAY 6305). La concentration en polyphénols est calculée à partir d'une courbe d'étalonnage utilisant l'acide gallique comme standard. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par mL (mg EAG/mL).

IV. 4. 2. Estimation des concentrations des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes est basé sur un test colorimétrique utilisant le chlorure d'aluminium $AlCl_3$ avec lequel les flavonoïdes forment des complexes acides stables soit avec le carbonyle ($C=O$) en position C-4, soit avec le groupe hydroxyle en C-3 ou C-5 des flavones et des flavonols. Par ailleurs, $AlCl_3$ peut également former des complexes acides labiles avec les groupements orthodihydroxyyles éventuellement présents sur le noyau A et/ou B des flavonoïdes (Chang et al., 2002).

- **Protocole :**

A 1 ml de l'extrait est ajouté 1 mL d'une solution de chlorure d'aluminium $AlCl_3$ (2% dans le méthanol). Après 10 mn, l'absorbance est lu au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 430 nm (Behorimet al., 1996).). La concentration en flavonoïde est calculée à partir d'une courbe d'étalonnage utilisant la quercétine comme standard (Figure V .4). Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent de quercitrine par mL (mg EQ/mL).

IV. 4. 3. Estimation des activités antioxydantes

Le pouvoir antioxydant de l'extrait est estimé selon deux méthodes: le test anti-radicalaire pour le dosage du DPPH et le test antiradicalaire pour le radical hydroxyle (OH).

IV. 4. 3. 1. Test anti-radicalaire pour le dosage du DPPH

Le DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable, dont la solution possède une coloration violette et une absorption caractéristique à 517 nm. Quand une solution de DPPH est mélangée avec une substance donneuse d'atomes d'hydrogène (antioxydante) il y'a formation de la forme réduite. Ceci provoque la perte de la coloration violette en coloration jaune caractérisée par une bande d'absorption dans le visible à 517 nm (Brand-Williams, 1995).

Protocoles :

1 ml de solution de DPPH (0,1 mM dans l'éthanol) et 1 mL de l'extrait sont mélangés et incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes. L'absorbance est mesurée à 517 nm (deleltre et al., 2015). Le pourcentage de réduction du DPPH est donné par la formule suivante :

$$(\text{Inib DPPH}) = (1 - A_{\text{échantillon}} / A_{\text{témoign}}) \times 100 \dots\dots (3)$$

(Inib DPPH) : Inhibition du radical DPPH (%)

$A_{\text{échantillon}}$: Absorbance de l'échantillon.

$A_{\text{témoign}}$: Absorbance du contrôle négatif

IV. 4. 3. 2. Test anti radicalaire (radical hydroxyle OH)**• Protocoles :**

Un volume de 2mL de chaque extrait est mélangé avec 2 mL d'une solution de FeSO_4 (5 mM). Après homogénéisation, 2 mL de H_2O_2 (1 %) sont ajoutés, puis agiter de nouveau. Les mélanges sont incubés à température ambiante. Après 60 minutes d'incubation, 1 mL d'eau distillée est ajouté avant lecture de l'absorbance à 510 nm (deleltre et al., 2015). Le pourcentage d'inhibition du radical hydroxyl est donné par la formule suivante :

$$(\text{Inib hydroxyle}) = (1 - A_{\text{échantillon}} / A_{\text{témoign}}) \times 100 \dots\dots (4)$$

(Inib hydroxyle) : Inhibition du radical hydroxyle (%)

$A_{\text{échantillon}}$: Absorbance de l'échantillon.

$A_{\text{témoign}}$: Absorbance du contrôle négatif

V. Résultats et discussion

Dans le présent travail la méthode d'extraction assistée par microonde a été utilisée pour extraire les polyphénols et les flavonoïdes afin d'estimer leurs activités antioxydantes. Les feuilles et les cônes de cyprès ont été utilisés, deux état physique différents de cônes ont été évalués : cône entier et cône en poudre.

V. 1. Extraction assisté aux microondes

La chauffe par micro-ondes s'effectue de l'intérieur vers l'extérieur. Cette particularité entraine une extraction des principes actifs végétaux par surpression interne (Galema et saskia ,1997).

Les paramètres principaux qui influent sur la performance de l'EAM comprennent : le type de solvant, la composition du solvant du rapport solide –solvant, de puissance micro-ondes, le temps d'expositions et la température (katarzyna, 2009). L'extraction par micro-ondes présente des avantages évidents avec un temps d'extraction plus court et la réduction de consommation du solvant (Wang et Weller ,2006)

Les inconvénients de cette technique sont la nécessité de maitriser parfaitement le temps de chauffage par micro-ondes, l'inhomogénéité du chauffage par les micro-ondes et le fait qu'elle ne peut pas être utilisée pour l'extraction de composes thermosensibles (vitamines, protéines, anthocyanines etc.). Elle nécessite également une bonne connaissance des propriétés diélectriques des molécules dans le système.

Après des essais préliminaires, on a utilisé une puissance de chauffage comprise entre 300 w et 600w pour assurer une bonne extraction. Les essais ont été réalisés selon les conditions opératoires citées dans la partie matériel et méthodes (Tableau IV .1).



Figure V .1- extraction assisté par microonde

V. 2. Analyses quantitatives des composés extraits

V. 2. 1. Polyphénols

La teneur en polyphénols dans les extraits d'extraction est estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu (Li et al.,2007). Les analyses quantitatives des polyphénols, ont été déterminées à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage, tracée en utilisant l'acide gallique comme standard (Figure V .2). Les quantités de polyphénols correspondantes ont été rapportées en équivalent d'acide gallique.

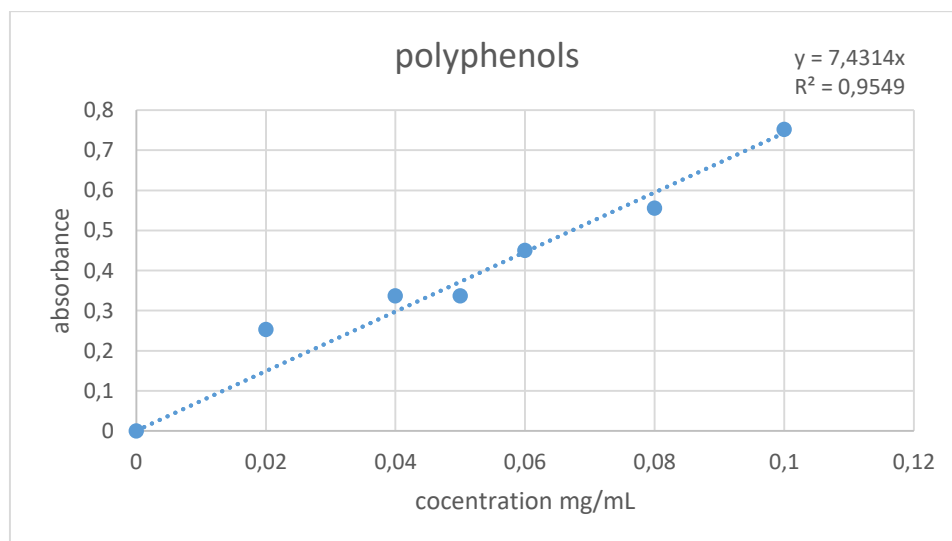


Figure V .2- Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Le dosage colorimétrique par le réactif Folin-Ciocalteu appliqué dans cette étude est une méthode simple et nécessite peu de réactifs, ce qui est appropriée pour l'estimation grossière de la teneur en polyphénols totaux, même si elle est limitée par la faible spécificité envers les polyphénols, et s'appuie sur l'utilisation d'un composé standard (BOUCHOUKA).

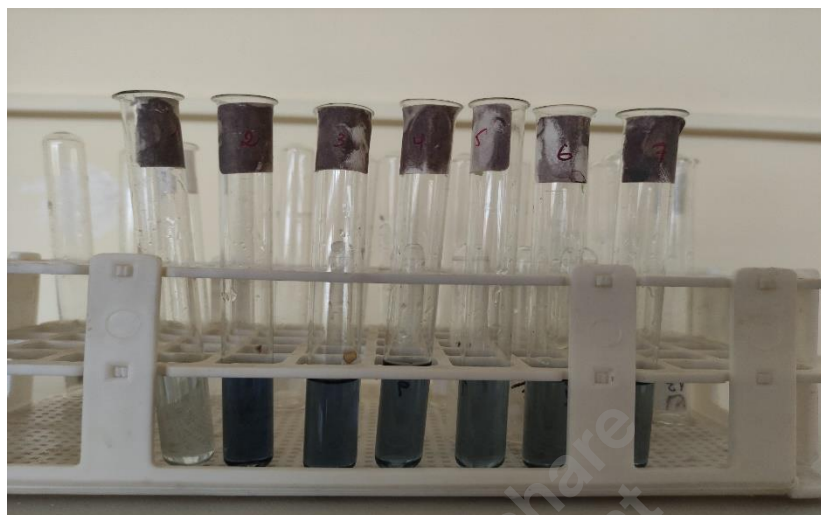


Figure V .3—des solutions d'acide gallique a diffèrent concentration a fin de tracé la courbe d'étalonnage

V. 2. 2. Flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes dans les extraits d'extraction est estimée par la méthode de chlorure d'aluminium (behorumet al., 1996). Les analyses quantitatives des flavonoïdes, ont été déterminées à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage, tracée en utilisant la rutine comme standard (Figure V .4). Les quantités de flavonoïdes correspondantes ont été rapportées en équivalent de la quercitrine.

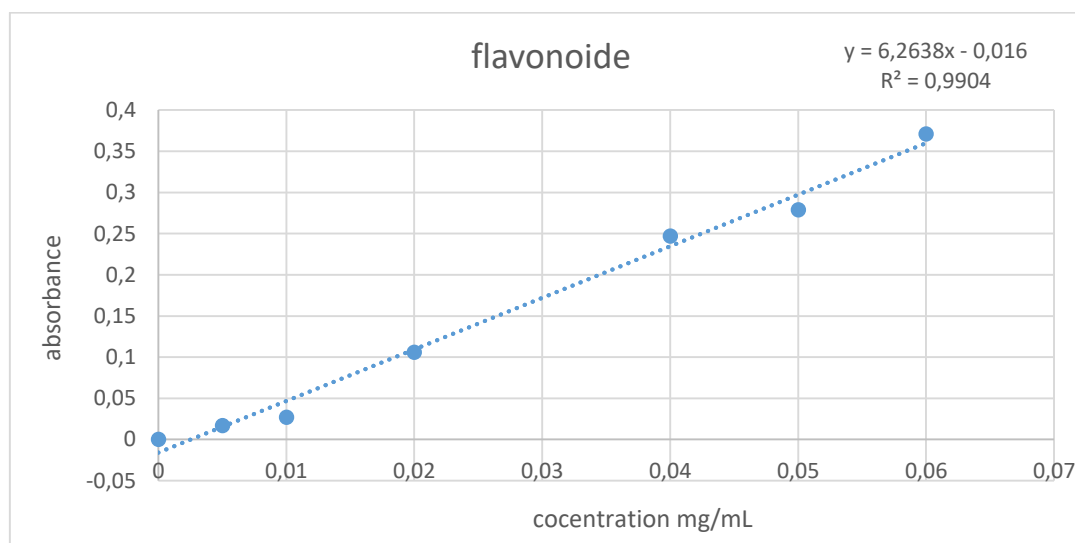


Figure V .4- Courbe d'étalonnage de la quercétine

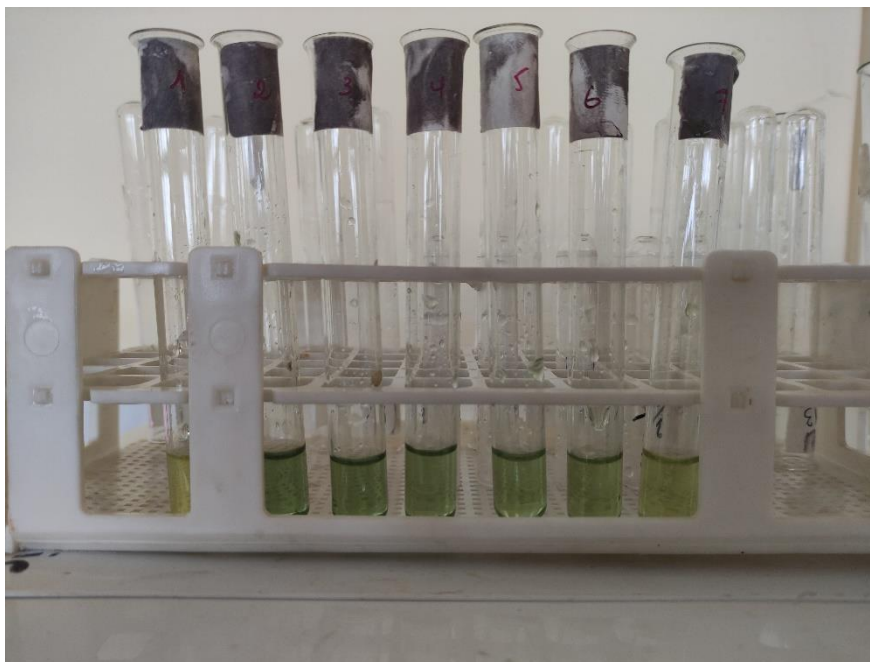


Figure V .5- des solutions de la quercétine a diffèrent concentration fin de tracé la courbe d'étalonnage

V. 2. 3. Analyse des activités

Il existe de nombreuses méthodes qui diffèrent sur le plan de leurs principes d'analyse et les conditions expérimentales et les antioxydants ont des contributions différentes au potentiel antioxydant totale. Pour cette raison l'utilisation de plusieurs tests antioxydants complémentaires est utile afin d'évaluer le potentiel antioxydant des extraits (BOUCHOUKA). Dans ce travail, nous avons utilisé deux méthodes pour évaluer l'activité antioxydant in vitro de la plante étudiée à savoir : DPPH, Test anti radicalaire : radical hydroxyle OH.

V. 2. 4. Analyse des résultats du plan box behnken

La méthode des plans de surfaces a été adoptée pour l'étude des effets individuels et des interactions entre variables sélectionnées sur les réponses : (concentration polyphénols et flavonoïdes et l'activité antioxydant). Les résultats sont analysés en utilisant le logiciel JMP version 9.0.2 (SAS Institute) et la relation entre la réponse Y et les variables X est déterminée.

V. 2. 4. 1. Extraction à partir des feuilles

L'extraction assistée aux microondes a été réalisé comme cité précédemment (cf IV. 2.). La Figure V .6 illustre les extraits obtenus après filtrations des différents échantillons.



Figure V .6-les extrais obtenu de l'extraction à partir des feuilles

Les résultats obtenus de l'évaluation des concentrations des polyphénols et des flavonoïdes et des estimations des activités antioxydant sont résumé dans le Tableau V .1

Tableau V.1- l'évaluation des concentrations des polyphénols et des flavonoïdes et des estimations des activités antioxydante (feuilles)

essais	X1 masse	X2 temps	X3 puissance	[POLY] mg EAG/ml	[FLAV] mg EQ/ml	(INIB DPPH) %	(INIB HYDROXYLE) %
1	4.5	4	450	0,023	0,016	64,81	11,36
2	6	4	300	0,007	0,008	33,50	18,18
3	6	2	450	0,003	0,003	25,73	9,94
4	3	6	450	0,028	0,020	52,67	24,15
5	3	4	300	0,005	0,006	24,76	0
6	4.5	6	300	0,025	0,015	60,68	24,72
7	6	6	450	0,050	0,031	45,15	27,27
8	3	4	600	0,020	0,013	50,49	1,70
9	4.5	6	600	0,045	0,027	44,17	37,50
10	4.5	2	300	0,001	0,002	0	20,45
11	4.5	4	450	0,016	0,007	42,72	38,07
12	3	2	450	0,002	0,003	0	16,19
13	4.5	2	600	0,008	0,006	20,63	26,70
14	4.5	4	450	0,023	0,015	54,61	20,17
15	6	4	600	0,034	0,023	44,90	45,74

a. Effet des paramètres sur la concentration des métabolites : polyphénols et flavonoïdes

Les résultats ont montré que la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes varie en fonctions des conditions opératoire : ratio masse/ solvant, puissance et temps d'extractions.

Nous constatons que les concentrations en polyphénols de tous les extraits varient considérablement. Les concentrations enregistrées sont compris entre 0,001 et 0,05 mg EAG/mL. La concentration la plus élevé correspond à l'essai numéro 07 pour une masse d'échantillon (feuilles de cyprès) de 6 g et une puissance de chauffage de 450W pendant 6 minutes.

Aussi, la concentration en flavonoïdes est variables et dépendante des conditions opératoires. Celle-ci est comprise entre 0,002 et 0,031 mg EAG/ml. La valeur la plus élevé correspond à l'essai numéro 07 (le même essai que la valeur maximale de dosage des polyphénols) est enregistrée pour les conditions suivantes : une masse de 6g, puissance de 450W, et une durés de : 6 minutes.



Figure V .7- dosage des polyphénol extrait à partir des feuilles

Grâce à la modélisation mathématique par l'étude des plans d'expérience, un modèle mathématique de second degré liant chaque réponse : concentration polyphénols et flavonoïde aux différents facteurs ont été obtenu (équation 5 et 6).

Les effets de chaque facteur (X_1 (masse), X_2 (temps) et X_3 (puissance)) et les effets d'interaction sont déterminés par la méthode des moindres carrés à partir des résultats expérimentaux. Les coefficients de régression pour chaque modèle ont été déduits. A partir des valeurs de ces coefficients, le modèle mathématique de second degré peut être déterminé.

$$[\text{POLY}] = 0.0206 + 0.0043 * X_1 + 0.0167 * X_2 + 0.0081 * X_3 + 0.0052 * X_1 * X_2 + 0.004 * X_1 * X_3 + 0.0032 * X_2 * X_3 - 0.0011 * X_1 * X_1 + 0.0012 * X_2 * X_2 - 0.0021 * X_3 * X_3 \dots\dots\dots (5)$$

$$[\text{FLAV}] = 0.0127 + 0.0024 * X_1 + 0.0099 * X_2 + 0.0043 * X_3 + 0.0027 * X_1 * X_2 + 0.0029 * X_1 * X_3 + 0.002 * X_2 * X_3 + 0.0012 * X_1 * X_1 + 0.0003 * X_2 * X_2 - 0.0005 * X_3 * X_3 \dots\dots\dots (6)$$

Dans le cas de [POLY] nous remarquons d'après l'analyse de l'équation, que les facteurs linéaire X_1 , X_2 , X_3 et l'interaction des facteurs X_1X_2 , X_1X_3 , X_2X_3 , et le facteur quadratique X_2 exerce un effet positif alors que le facteur quadratique X_1 , X_3 exerce un effet négatif. Alors que dans le cas du [FLAV] les facteurs linéaire X_1, X_2, X_3 et l'interaction des facteurs X_1X_2 , X_1X_3 , X_2X_3 et l'effet quadratique X_1 , X_2 exercent un effet positif. Le facteur quadratique X_3 à un effet négatif.

Après la détermination des effets des facteurs, nous avons réalisé une analyse de la variance (ANOVA), comportant les paramètres statistiques suivants : degrés de liberté, somme des carrés, carré moyen, statistique de Fisher et la p-value. Le Tableau V .2 illustre cette analyse.

Tableau V .2- analyse de la variance (ANOVA) feuilles

	source	ddl	ss	MC	F0	P
[POLY]	modèle	9	0,00304830	0,000339	16,7431	0,0078*
	Lack of fit	2	0,00004825	0,000024	1,4770	0,4037
	R ²	0,974142				
	R ² _{ajus}	0,91596				
[FLAV]	modèle	9	0,00104815	0,000116	7,1280	0,0371*
	Lack of fit	2	0,00001669	0,000008344	0,3429	0,7447
	R ²	0,941307				
	R ² _{ajus}	0,809249				

Nous remarquons dans le cas du [POLY] le modèle est significatif avec une valeur- P inférieur à 0,05. Et la valeur-P pour le lack of fit est supérieure à 0,05 ; validant ainsi le modèle. De même pour la concentration en flavonoides, nous notons une valeur- P inférieurs à 0,05 pour le modèle et une valeur-P pour le lack of fit supérieure à 0,05 validant ainsi le modèle.

Concernant la détermination du coefficient de corrélation (R²), celui-ci est de 97 % pour la concentration en polyphénols et de 94% pour le dosage des flavonoïdes ; indiquant une forte corrélation entre les valeurs observées et les valeurs prédites (Figure V .8).

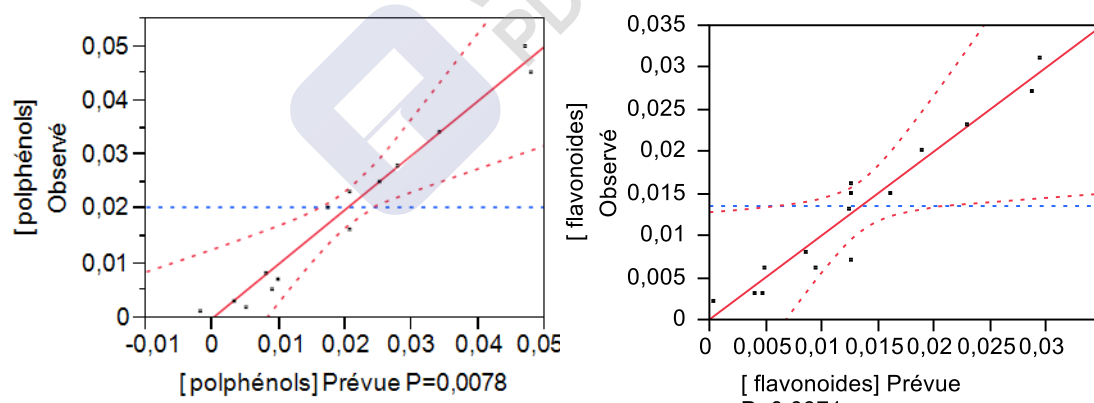


Figure V .8- Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues (polyphénol - flavonoides) feuilles

b. Effet des paramètres sur la l'activité antioxydante : DPPH, Test anti radicalaire : radical hydroxyle OH

Concernant l'évaluation de l'activité anti-oxydante, la présente étude montre que tous les extraits possèdent des activités antioxydantes, et varient considérablement selon le type de test réalisé.



Figure V .9- test d'activité antioxydant (méthode de DPPH) des extrais obtenu à partir des feuilles

Pour le test DPPH, les valeurs d'activité antioxydant varie entre 0% et 64,81% la meilleur activité concerne le 1^{er} essai avec les conditions expérimentales suivant : X1 : 4.5g, X2 :4 mn, X3 :450w.

Pour le test anti radicalaire (radical hydroxyle OH) les valeurs d'activité antioxydant varie entre 0% et 38,07% la meilleurs activité concerne le 11^{eme} essai avec les conditions expérimentales suivant : X1 : 4.5g, X2 :4 mn, X3 :450 w.

Donc on note que les conditions opératoires donnant le maximum d'activité antioxydante DPPH et antiradicalaire OH sont totalement différentes.

Par la modélisation des plans d'expériences, les modèles mathématiques de second degré sont obtenus : équation 7 et 8.

$$\begin{aligned}
 (\text{INIB DPPH}) \% = & 54.046 + 1.5481 * X1 + 19.53875 * X2 + 4.0343 * X3 - 8.3125 * \\
 & X1 * X2 - 1.33875 * X1 * X3 - 9.285 * X2 * X3 - 6.9364 * X1 * X1 - 16.2227 * X2 * \\
 & X2 - 6.4539 * X3 * X3 \dots\dots\dots (7)
 \end{aligned}$$

$$(INIB\ HYDROXYLE)\ \% = 23.2 + 2.662 * X1 + 5.045 * X2 + 1.312 * X3 + 2.3425 * X1 * X2 + 15.912 * X1 * X3 + 1.6325 * X2 * X3 - 2.651 * X1 * X1 - 1.161 * X2 * X2 + 5.303 * X3 * X3 \dots\dots\dots (8)$$

Dans le cas de de l'activité antioxydante par le test DPPH, nous remarquons d'après l'analyse de l'équation, que tous les facteurs linéaire $X1$, $X2$, $X3$ exerce un effet positif, et les interactions des facteur $X1X2$, $X1X3$, $X2X3$, et les facteur quadratique $X2$, $X1$, $X3$ exerce un effet négatif. Alors que dans le cas de l'activité antioxydante pour le radical hydroxyle, les facteurs linéaire $X1$, $X2$, $X3$, l'interaction des facteurs $X1X2$, $X1X3$, $X2X3$ et l'effet quadratique $X3$ exercent tous des effets positifs. Les deux facteurs quadratiques $X2$ et $X1$ ont un effet négatif.

Après la détermination des effets des facteurs, nous avons réalisé une analyse de la variance (ANOVA), Le Tableau V .3 illustre cette analyse.

Tableau V .3- analyse de la variance (ANOVA) cônes entier

	source	ddl	ss	MC	F0	P
(INIB DPPH) %	modèle	9	4987,9465	554,216	5,4432	0,0489
	Lack of fit	2	162,81242	81,406	0,6660	0,6002
	R^2	0,924512				
	R^2_{ajus}	0,754665				
(INIB HYDROXYLE) %	modèle	9	1261,1002	140,122	0,9774	0,5544
	Lack of fit	2	202,94445	101,472	0,5478	0,6461
	R^2	0,687425				
	R^2_{ajus}	-0,01587				

Nous remarquons dans le cas l'activité antioxydante par le test DPPH, le modèle est significatif avec une valeur- P inférieur à 0,05 ; validant ainsi le modèle.

Concernant l'activité antioxydante par le test radical hydroxyle, nous notons que le modèle est non significatif, la valeur- P est supérieur à 0,05. Le modèle est non validé. Ce résultat peut être attribué à un mauvais dosage, qui peut être lié à une oxydation du réactif H_2O_2 .

Concernant la détermination du coefficient de corrélation (R^2), celui-ci est de 92 % pour les teste d'activité antioxydant en utilisant le DPPH indiquant une forte corrélation entre les valeurs observées et les valeurs prédites. Le R^2 pour les teste d'activité antioxydant en utilisant le H_2O_2 est de 60 %; indiquant une corrélation de mauvaise qualité entre les valeurs observées et les valeurs prédites (Figure V .10), confirmé par la valeur de R^2_{ajus} .

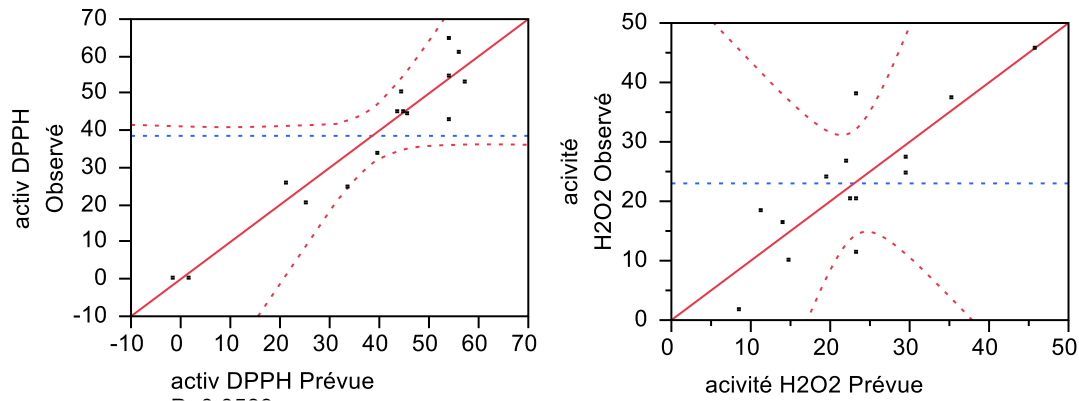


Figure V .10- Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues (activité antioxydant DPPH. H_2O_2) feuilles

V. 2. 4. 2. Extraction à partir des cônes entiers

Le Tableau V .4 résume les résultats obtenus des concentrations des polyphénols et des flavonoïdes mesurés et des estimations des activités antioxydant.

Tableau V .4 - l'évaluation des concentrations des polyphénols et des flavonoïdes et des estimations des activités antioxydante (cônes entier)

essais	X1 masse	X2 temps	X3 puissance	[POLY] mg EAG/ml	[FLAV] mg EQ/ml	(INIB DPPH) %	(INIB HYDROXYLE) %
1	4.5	4	450	0,353	0,018	46,84	44,32
2	6	4	300	0,601	0,016	57,04	49,43
3	6	2	450	0,395	0,012	49,03	51,14
4	3	6	450	0,372	0,011	72,33	56,53
5	3	4	300	0,253	0,004	65,78	53,41
6	4.5	6	300	0,446	0,021	58,98	36,93
7	6	6	450	0,738	0,030	60,68	69,32
8	3	4	600	0,362	0,017	66,02	43,18
9	4.5	6	600	0,531	0,041	60,44	54,26
10	4.5	2	300	0,168	0,005	58,01	44,89
11	4.5	4	450	0,442	0,018	45,63	61,93
12	3	2	450	0,117	0,006	64,56	52,56
13	4.5	2	600	0,228	0,009	71,12	56,82
14	4.5	4	450	0,377	0,015	73,30	54,55
15	6	4	600	0,357	0,019	63,59	58,81

a. Effet des paramètres sur la concentration des polyphénols et des flavonoïdes

Nous constatons que les concentrations en polyphénols de tous les extraits varient considérablement. Les concentrations enregistrées sont compris entre 0,117 et 0,738 mg EAG/ml. La concentration la plus élevé correspond à l'essai numéro 07 pour une masse d'échantillon (cônes) de 6 g et une puissance de chauffage de 450W pendant 6 minutes.

Aussi, la concentration en flavonoïdes, est variables, et dépendante des conditions opératoires. Celle-ci est comprise entre 0,004 et 0,041 mg EAG/ml. La valeur la plus élevé correspond à l'essai numéro 09 pour les conditions suivantes : une masse de :4,5 g, puissance : 600W, durés : 6 minutes.

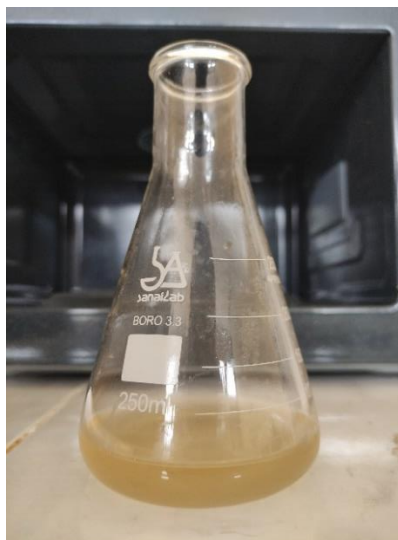


Figure V .11- l'un des essais obtenus par l'extraction à partir des cônes entiers

Les effets des facteurs individuels et des effets d'interaction ont été déterminés par la méthode des moindres carrés à partir des résultats expérimentaux. Les coefficients de régression pour chaque modèle ont été déduits. A partir des valeurs de ces coefficients les modèles mathématiques de second degré ont pu être déterminés équations 9 et 10.

$$[\text{POLY}] = 0.3907 + 0.1234 * X_1 + 0.1474 * X_2 + 0.0012 * X_3 + 0.022 * X_1 * X_2 - 0.0882 * X_1 * X_3 + 0.00625 * X_2 * X_3 + 0.0324 * X_1 * X_1 - 0.0176 * X_2 * X_2 - 0.0298 * X_3 * X_3 \dots \dots \dots (9)$$

$$[\text{FLAV}] = 0.017 + 0.0049 * X_1 + 0.0089 * X_2 + 0.005 * X_3 + 0.00325 * X_1 * X_2 - 0.0025 * X_1 * X_3 + 0.004 * X_2 * X_3 - 0.0036 * X_1 * X_1 + 0.0014 * X_2 * X_2 + 0.0006 * X_3 * X_3 \dots \dots \dots (10)$$

Concernant la concentration des polyphénols, nous remarquons d'après l'analyse de l'équation, que les facteurs linéaire X_1 , X_2 , X_3 , l'interaction des facteurs X_1X_2 , X_2X_3 , et le facteur quadratique X_1 exerce un effet positif alors que le facteur quadratique X_2 , X_3 et l'interaction des facteurs X_1X_3 exerce un effet négatif. Alors que dans le cas de la concentration des flavonoïdes, les facteurs linéaire X_1 , X_2 , X_3 et l'interaction des facteurs X_1X_2 , X_2X_3 et l'effet quadratique X_2 , X_3 exercent un effet positif. L'interaction des facteurs X_1X_3 et le facteur quadratique X_1 ont un effet négatif.

Après la détermination des effets des facteurs, nous avons réalisé une analyse ANOVA (Tableau V .5).

Tableau V .5- analyse de la variance (ANOVA) cones entier

	source	ddl	ss	MC	F0	P
[POLY]	modèle	9	0,33772342	0,037525	7,3862	0,0202*
	Lack of fit	3	0,02116125	0,007054	3,3267	0,2397
	R ²	0,930046				
	R ² _{ajus}	0,80413				
[FLAV]	modèle	9	0,00121248	0,000135	6,2807	0,0285*
	Lack of fit	3	0,00010125	0,000034	11,2500	0,0827
	R ²	0,918734				
	R ² _{ajus}	0,809249				

Nous remarquons dans le cas de la concentration des polyphénols, le modèle est significatif avec une valeur- P inférieur à 0,05 et une valeur-P pour le lack of fit supérieure à 0,05 ; ce qui valide le modèle.

Les mêmes observations sont rapportées pour la concentration de flavonoïdes, la valeur- P inférieurs à 0,05 et la valeur-P pour le lack of fit supérieure à 0,05. Validant ainsi le modèle.

Concernant la détermination du coefficient de corrélation (R²), celui-ci est de 93 % pour les polyphénols et 91% pour les flavonoïdes indiquant une forte corrélation entre les valeurs observées et les valeurs prédites (Figure V .12).

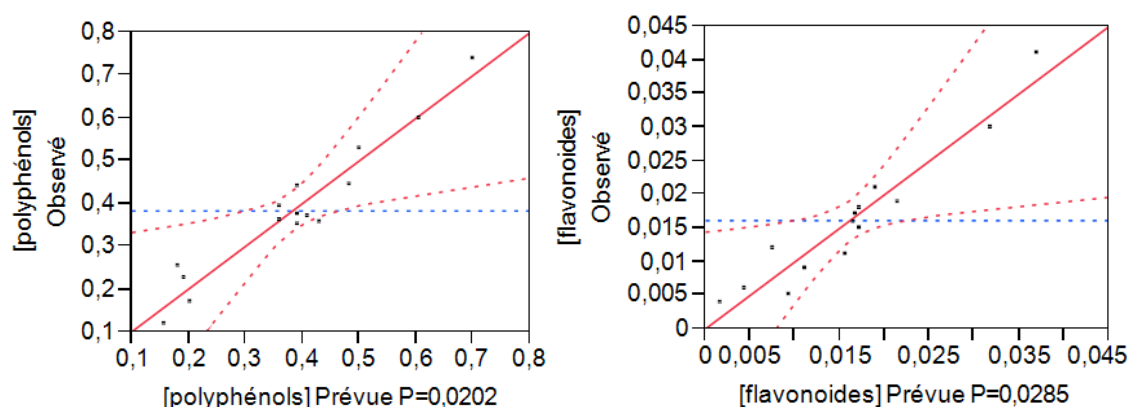


Figure V .12-Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues(polyphénol - flavonoides) cones entier

b. Effet des paramètres sur la l'activité antioxydant (DPPH , Test anti radicalaire (radical hydroxyle OH))

Concernant l'évaluation de l'activité anti-oxydante, la présente étude montre que tous les extraits possèdent des activités antioxydants, et varient considérablement du type de test réalisé. Pour le test DPPH les valeurs d'activité antioxydant varie entre 45,63% et 73,3% la meilleurs activité concerne le 14^{eme} essai avec les condition expérimental suivant : X1 : 4.5g , X2 :4 mn , X3 :450w .

Pour le test anti radicalaire (radical hydroxyle OH) les valeurs d'activité antioxydant varie entre 36,93% et 69,32%. La meilleurs activité concerne le 7^{eme} essai avec les condition expérimental suivant : X1 : 6g , X2 :6 mn , X3 :450w .

Les modèles mathématiques de second degré liant chaque réponse sont exprimés par les équations 11 et 12.

$$\begin{aligned} (\text{INIB DPPH}) \% = & 55.256 - 4.793 * X1 + 1.2137 * X2 + 2.67 * X3 + 0.97 * X1 * X2 + \\ & 1.5775 * X1 * X3 - 2.91 * X2 * X3 + 3.6816 * X1 * X1 + 2.7116 * X2 * X2 + 4.1691 * \\ & X3 * X3 \dots\dots\dots (11) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} (\text{INIB HYDROXYLE}) \% = & 53.6 + 2.8775 * X1 + 1.4537 * X2 + 3.5512 * X3 + 3.5525 * \\ & X1 * X2 + 4.9025 * X1 * X3 + 1.35 * X2 * X3 + 1.35 * X1 * X1 + 0.4025 * X2 * X2 - \\ & 5.7775 * X3 * X3 \dots\dots\dots (12) \end{aligned}$$

Concernant l'activité DPPH, nous remarquons d'après l'analyse de l'équation, que les facteurs linéaire X2, X3 et les interactions des facteur X1X2, X1X3 et tous les facteurs quadratiques exercent un effet positif, et le facteur linéaire X1, et l'interaction des facteur X2X3, exercent un effet négatif.

Alors que dans le cas de l'activité antiradicalaire (radical hydroxyle), les facteurs linéaire X1, X2, X3 et l'interaction des facteurs X1X2, X1X3, X2X3 et l'effet quadratique X2, X3 entraînent un effet positif. Et le facteur quadratique X3 a un effet négatif.

L'analyse de la variance (ANOVA) est illustrée dans le Tableau V .6

Tableau V .6- analyse de la variance (ANOVA) cones entier

	source	ddl	ss	MC	F0	P
(INIB DPPH) %	modèle	9	423,7133	47,079	0,3708	0,9070
	Lack of fit	3	145,67567	48,559	0,1986	0,8901
	R ²	0,40031				
	R ² _{ajus}	-0,67913				
(INIB HYDROXYLE) %	modèle	9	516,89015	57,4322	0,7123	0,6903
	Lack of fit	3	246,75243	82,2508	1,0517	0,5212
	R ²	0,561805				
	R ² _{ajus}	-0,22695				

Nous remarquons pour les deux activités, que les modèles mathématiques ne sont pas validés : la valeur- P est supérieure à supérieure à 0,05.

Aussi, les valeurs des coefficients de corrélation sont inférieur à 0,80. Celui-ci est de 40 % pour les teste d'activité antioxydant en utilisant le test DPPH et 56% pour les teste d'activité antioxydant en utilisant le H₂O₂; indiquant une faible corrélation entre les valeurs observées et les valeurs prédites (Figure V .13). Ces faibles résultats sont probablement dû à des problèmes techniques lors des dosages (réactivité des réactifs, ...).

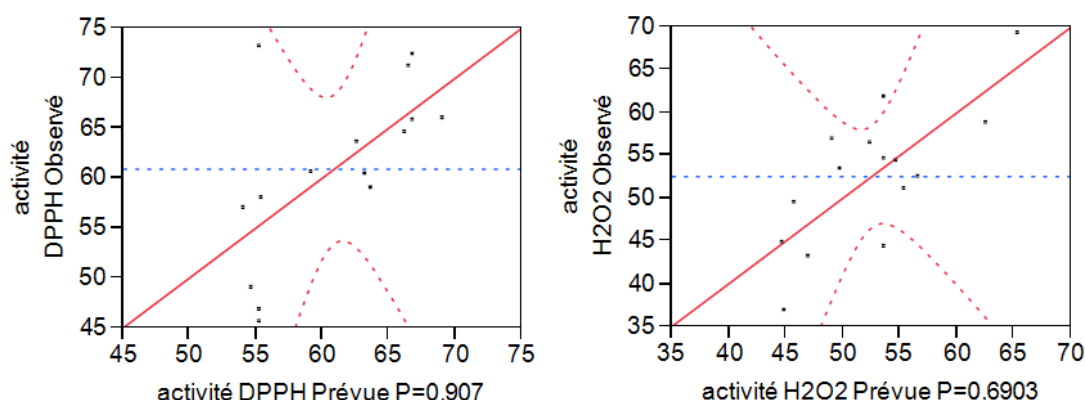


Figure V .13- Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues(activité antioxydant DPPH . H₂O₂) cône entier

V. 2. 4. 3. Extraction à partir des cônes poudre

Nous avons réalisé ces essais selon le même protocole que précédemment mais en utilisant les cônes sous forme de fine poudre, l'état physique peut avoir un effet sur les taux d'extraction des métabolites et es activités. La Figure V .14 Illustre les résultats expérimentaux.

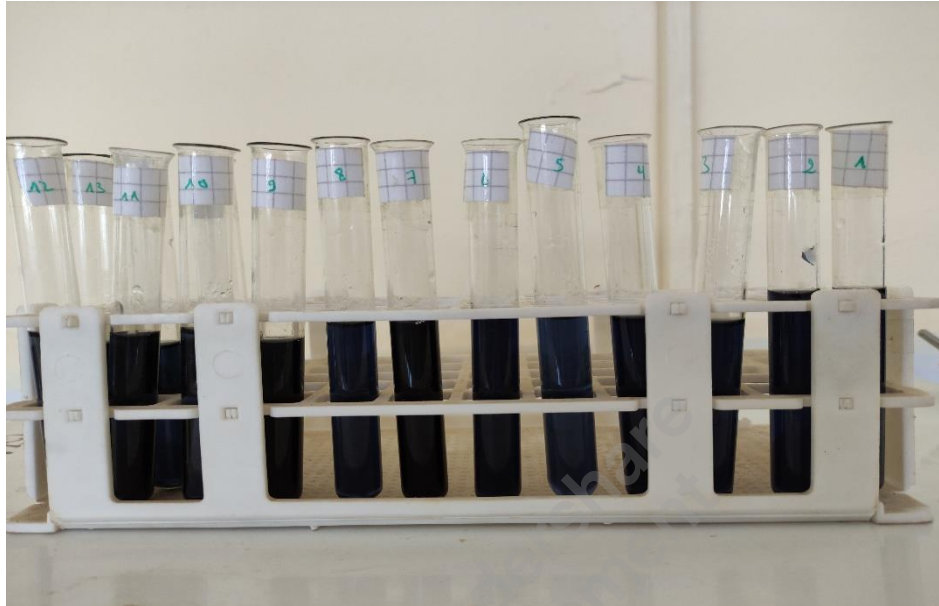


Figure V .14- les solution des extrais obtenu des cônes en poudre avant l'analyse par spectrophotomètre

Nous avons noté une couleur des extrais plus foncés que celle des extrais obtenus des feuilles et des cônes entiers, ce qui suppose que la concentration en métabolites est plus importantes dans ces extraits. Le Tableau V .7 résume les résultats obtenus de l'évaluation des concentrations des polyphénols et des flavonoïdes et des estimations des activités antioxydant.

Tableau V .7-l'évaluation des concentrations des polyphénols et des flavonoïdes et des estimations des activités antioxydantes.(cône en poudre)

essais	X1 masse	X2 temps	X3 puissance	[POLY] mg EAG/ml	[FLAV] mg EQ/ml	(INIB DPPH) %	(INIB HYDROXYLE) %
1	4.5	4	450	1,322	0,033	66,26	0
2	6	4	300	1,285	0,031	53,40	16,76
3	6	2	450	1,057	0,027	66,26	6,82
4	3	6	450	1,274	0,030	43,69	0
5	3	4	300	0,821	0,016	63,11	4,83
6	4.5	6	300	1,279	0,034	27,18	9,94
7	6	6	450	2,537	0,060	0	0
8	3	4	600	1,007	0,016	54,85	73,01
9	4.5	6	600	1,842	0,071	0	0
10	4.5	2	300	0,772	0,0156	68,20	82,95
11	4.5	4	450	1,177	0,023	63,11	72,73
12	3	2	450	0,540	0,014	65,78	90,63
13	4.5	2	600	0,940	0,013	57,04	81,25
14	4.5	4	450	1,044	0,024	60,39	84,38
15	6	4	600	1,783	0,052	46,60	61,36

a. Effet des paramètres sur la concentration des métabolites (polyphénols et flavonoïdes)

Les concentrations enregistrées sont compris entre 0,540 et 2,537 mg EAG/mL. Concentration plus élevés que ceux trouvés dans les précédant essais (feuilles et cônes entiers), confirmant notre hypothèse. La concentration la plus élevé correspond à l'essai numéro 07 pour une masse d'échantillon (cônes poudre) de 6 g et une puissance de chauffage de 450W pendant 6 minutes. Aussi, la concentration en flavonoïdes, est variables, et dépendante des conditions opératoires. Celle-ci est comprise entre 0,013 et 0,071 mg EAG/ml. Comparé aux essais des feuilles et cônes entiers les concentrations sont plus élevées. La valeur la plus élevé correspond à l'essai numéro 09 pour les conditions suivantes : une masse de :4,5 g , puissance : 600W , durés : 6 minutes . On remarque que pour les mêmes conditions expérimentales dans le cas des cônes entier et des cônes en poudre (X1 :6g , X2 : 6mn , X3 : 450W) On obtiens une valeur de concentration

maximales des polyphénol (7^{ème} essais). Et la même remarque pour la concentration maximale des flavonoïdes avec le (9^{ème} essai).

Les résultats ont montré que la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes varie en fonctions des conditions opératoires : ratio masse : solvant, puissance et temps d'extractions.

Grâce à la modélisation mathématique, les équations 13 et 14 ont été obtenu

$$[\text{POLY}] = 1.181 + 0.377 * X1 + 0.452 * X2 + 0.177 * X3 + 0.186 * X1 * X2 + 0.078 * X1 * X3 + 0.098 * X2 * X3 + 0.0934 * X1 * X1 + 0.776 * X2 * X2 - 0.0503 * X3 * X3 \dots \dots \dots (13)$$

$$[\text{FLAV}] = 0.0267 + 0.0117 * X1 + 0.0157 * X2 + 0.0069 * X3 + 0.0042 * X1 * X2 + 0.0052 * X1 * X3 + 0.0099 * X2 * X3 + 0.0007 * X1 * X1 + 0.0054 * X2 * X2 + 0.0014 * X3 * X3 \dots \dots \dots (14)$$

Dans le cas des dosages des polyphénols, nous remarquons d'après l'analyse de l'équation, que les facteurs linéaire X1, X2, X3 et l'interaction des facteurs X1X2, X2X3, X1X3 et le facteur quadratique X1² X2² exerce un effet positif alors que le facteur quadratique X3² exerce un effet négatif. Alors que dans le cas des concentrations des flavonoïdes, tous les facteurs linéaire, les interaction des facteurs et tous les effets quadratique X1, X2, X3 exercent un effet positif.

Le Tableau V .8 illustre l'analyse de l'ANOVA.

Tableau V .8- analyse de la variance (ANOVA) cône en poudre

	source	ddl	ss	MC	F0	P
[POLY]	modèle	9	3,2988141	0,366535	11,7182	0,0072*
	Lack of fit	3	0,11772925	0,039243	2,0298	0,3469
	R ²	0,954736				
	R ² _{ajus}	0,873262				
[FLAV]	modèle	9	0,00413826	0,000460	12,4301	0,0063*
	Lack of fit	3	0,00012429	0,000041	1,3658	0,4491
	R ²	0,957218				
	R ² _{ajus}	0,88021				

Dans le cas du dosage des polyphénols, le modèle est significatif avec une valeur- P inférieure à 0,05 et une valeur-P pour le lack of fit supérieure à 0,05 ; validant ainsi le modèle.

Concernant la concentration des flavonoïdes, nous notons que tous les coefficients du modèle sont significatifs avec une valeur- P inférieure à 0,05 et une valeur-P pour le lack of fit supérieure à 0,05. Validant ainsi le modèle.

Aussi, les coefficients de corrélation (R^2), sont de l'ordre de celui-ci est de 95 % pour les deux dosages ; indiquant une forte corrélation entre les valeurs observées et les valeurs prédites (Figure V .15).

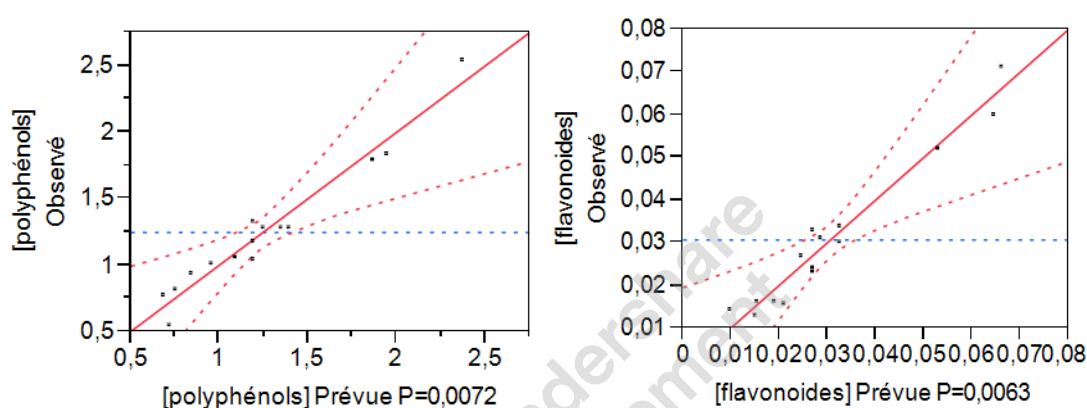


Figure V .15-Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues (polyphénol - flavonoïdes) cônes poudre

b. Effet des paramètres sur la l'activité antioxydant (DPPH , Test anti radicalaire (radical hydroxyle OH))

Concernant l'évaluation de l'activité anti-oxydante, la présente étude montre que tous les extraits possèdent des activités antioxydantes, et varient considérablement du type de test réalisé. Pour le test DPPH les valeurs d'activité antioxydant varie entre 0% et 68.2% la meilleurs activité concerne le 10^{emer} essai avec les condition expérimental suivant : X1 : 4.5g , X2 :2 mn , X3 :300w .

Pour le test anti radicalaire (radical hydroxyle OH) les valeurs d'activité antioxydant varie entre 0% et 90.63% la meilleurs activité concerne le 12^{eme} essai avec les condition expérimental suivant : X1 : 3g , X2 :2 mn , X3 :450w .

On remarque que la durée de chauffage a un effet négatif sur l'activité anti oxydante, plus la durée d'échauffement est lente plus l'activité anti oxydants est faible

Les modèles mathématiques de second degré liant chaque réponse au différents facteurs ont été obtenu (équation 15 et 16).

$$\begin{aligned} (\text{INIB DPPH}) \% = & 63.253 - 9.406 * X_1 - 26.579 * X_2 - 8.1925 * X_3 - 14.5625 * X_1 * \\ & X_2 + 0.365 * X_1 * X_3 - 7.04 * X_2 * X_3 - 1.7104 * X_1 * X_1 - 21.1304 * X_2 * X_2 - \\ & 7.0529 * X_3 * X_3 \dots\dots\dots (15) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} (\text{INIB HYDROXYLE}) \% = & 52.37 - 0.5017 * X_1 - 33.06 * X_2 + 5.4023 * X_3 + 21.5662 * \\ & X_1 * X_2 + 10.979 * X_1 * X_3 + 0.3341 * X_2 * X_3 - 24.979 * X_1 * X_1 - 3.6947 * X_2 * \\ & X_2 - 7.666 * X_3 * X_3 \dots\dots\dots (16) \end{aligned}$$

Dans le cas du test DPPH, nous remarquons d'après l'analyse de l'équation, que seul l'interaction des facteurs X_1X_3 exerce un effet positif, alors que tous les autres facteurs linéaires X_1, X_2, X_3 et les interactions des facteurs X_1X_2, X_2X_3 , et tous les facteurs quadratiques X_2, X_1, X_3 exercent un effet négatif.

Alors que dans le cas du test au radical hydroxyle, le facteur linéaire X_3 et tous les interactions des facteurs X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3 exercent un effet positif. Les facteurs linéaires X_1, X_2 et les effets quadratiques X_1, X_2, X_3 ont un effet négatif.

Après la détermination des effets des facteurs, nous avons réalisé une analyse de la variance (ANOVA). Le Tableau V .9 illustre cette analyse.

Tableau V .9- analyse de la variance (ANOVA) cones entier

	source	ddl	ss	MC	F0	P
(INIB DPPH) %	modèle	9	9701,593	1077,95	14,3733	0,0045*
	Lack of fit	3	357,72477	119,242	13,8177	0,0682
	R ²	0,962787				
	R ² _{ajus}	0,895802				
(INIB HYDROXYLE) %	modèle	9	13523,736	1502,64	0,8531	0,6072
	Lack of fit	3	3944,2817	1314,76	0,5408	0,7003
	R ²	0,605618				
	R ² _{ajus}	-0,10427				

Dans le cas du test au DPPH, le modèle est significatif avec une valeur- P inférieure à 0,05. Et la valeur-P pour le lack of fit est supérieure à 0,05. Validant ainsi le modèle. Et dans le cas de test pour le radical hydroxyle, nous notons que le modèle est non significatif pour une valeur- P supérieur à 0,05. Probablement dû à l'oxydation du réactif H_2O_2 au cours des dosages, le H_2O_2 est très sensible.

Concernant la détermination du coefficient de corrélation (R^2), celui-ci est de 95 % pour les teste d'activité antioxydant en utilisant le test DPPH indiquant une forte corrélation entre les valeurs observées et les valeurs prédites ; et de 60% pour les teste d'activité antioxydant en utilisant le H_2O_2 ; indiquant une faible corrélation entre les valeurs observées et les valeurs prédites (Figure V .16) .

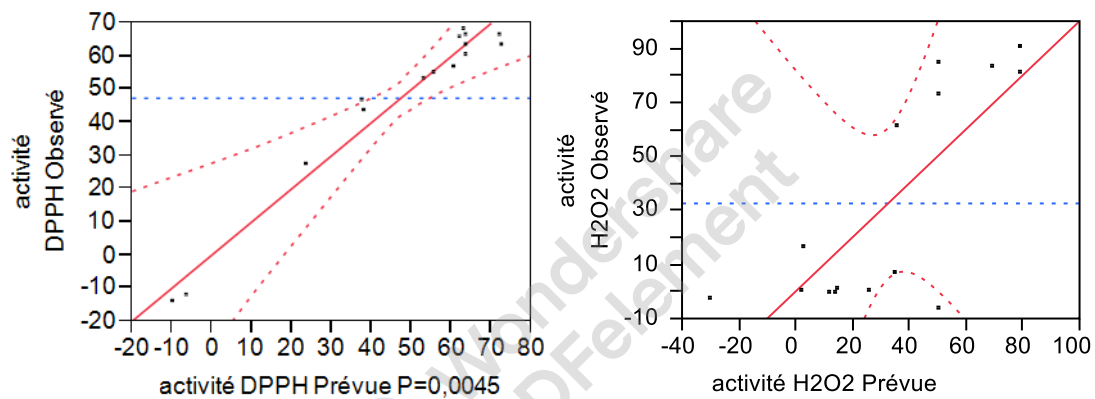


Figure V .16-Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues (activité antioxydant DPPH. H_2O_2) cône EN POUDRE

CONCLUSION

L'objectif du travail réalisé était l'extraction des produits phénolique (polyphénols et flavonoïdes) et l'évaluation de l'activité antioxydante de ces extraits.

L'extraction est réalisée sur de la matière végétale, tiges feuillée et cônes de cyprès, en présence d'un milieu aqueux dans un microonde. Deux états physiques de cônes ont été étudié : cône entiers et cône poudre.

Trois paramètres opératoires ont été étudiés, le rapport solide : liquide, le temps d'extraction et la puissance des ondes. Les réponses étudiées sont : la concentration des polyphénols, la concentration des flavonoïdes, test anti radicalaire par la méthode DPPH et test anti radicalaire par la méthodes H_2O_2 .

L'approche expérimentale adoptée dans ce mémoire s'inspire des plans d'expériences, particulièrement le plan de Box Behken. Ce type de plan permet à la fois :

- d'apprécier l'évolution des différentes réponses aux différents facteurs étudiés,
- mais aussi d'apprécier l'effet individuel de chaque facteur et les effets d'interactions entre facteurs.

Le plan de box Behken avec trois facteurs à trois niveaux est réalisé avec 15 essais. Ce nombre réduit d'essais ne touche en aucun cas à la qualité des résultats. Une modélisation mathématique des réponses en fonction des facteurs a pu être établie.

Les principaux résultats obtenus ont été sélectionnés pour dégager les conclusions suivantes :

- Les résultats mettent en évidence le pouvoir des ondes microondes à extraire les composés phénoliques,
- l'extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes est dépendantes des facteurs étudiés. De même l'activité antioxydante est dépendante des facteurs étudiés.
- Chaque réponse a pu être modélisée dans un polynôme de second degré. Ces modèles sont représentatifs de la relation : réponse- variable.
- Le signe positif des coefficients de régression des modèles mathématiques représente un effet synergique, tandis qu'un signe négatif indique un effet antagoniste.
- Les modèles postulés de second degré pour chaque réponse ont été évalué par l'analyse ANOVA et par la détermination des coefficients de corrélation.
- les résultats obtenus sont valables uniquement dans les intervalles définis des facteurs étudiés et dans les conditions expérimentales instaurées.

Conclusion

Enfin, les résultats acquis dans ce mémoire permettent d'envisager de nouvelles perspectives pour des études futures, notamment l'exploration d'autre voie d'extraction et l'évaluation de d'autres méthodes de mesure de l'activité antioxydant.



Référence bibliographique

A

- Afanas'ev I.B., Dcrozko A.I., Brodskii A.V., Kostyuk V.A., Potapovitch A.I. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemicalpharmacology*. (1989). 38(11):1763-1769.
- Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A. Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxyde dismutases μ rôle dans les maladies rhumatismales. (2007). *Revue du Rhumatisme*. 74 : 636–643.
- Al-Othman, A.M., Hussain, I., Khan, H., Rehman, Ur.M., Abdeltawab, A.A., Ullah, R., Rohullah, N.S., Talha, M. Phytochemical analysis and biological activities of selected medicinal plants. *J. Med. Plants. Res.* 2012. 6 (23), 4005–4010.
- Ames, B.N., Cathcart, R., Schwiers, E., Hochstein, P.,. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981 .78, 6858-6862.
- Atkin MA, Gasper A, Ullegaddi R, et al.—Oxidative susceptibility of unfractionated serum or plasma : response to antioxidants in vitro and to antioxidants supplementation. *ClinChem*, 2005, 51, 2138-2144.

B

- Bensakhria Ayoub *Toxicologie Générale - Le Stress Oxydatif* . 2014 .70-83.
- Bock c , connaitre et decouvrir les arbre , liber , paris 1992.
- Bertrand Delafosse .Radicaux fibres oxygènes et antioxydants: aspects cliniques. *Nutr Clin Métabol*1997; 11:121-4
- Beta T., Nam S., Dexter J.E. and Sapirstein H.D. Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions. *CerealChemistry* (2005). 82, 390-393.
- Boukhris, M., Regane, G., Yangu, T., Sayadi, S., Bouaziz, M. Chemical composition and biological potential of essential oil from Tunisian *Cupressus sempervirens* L. *J. Arid. Land. Stud.* 2012 . 22 (1), 329–332.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. et Berset, C.. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* (1995). 28: 25-30.
- Bruneton J, *Pharmacognosie et phytochimie plantes médicinales*. Paris, France: Lavoisier. 1993. 278 - 279p.

Référence bibliographique

- Bruno Baudin..Stress oxydant et protections antioxydantes. REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES MAI 2020• N °522 •

C

- Cadenas, E.,. Biochemistry of oxygen toxicity. AnnuRevBiochem 1989 .58, 79-110
- Camille Migdal, Mireille Serres ; Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant ; médecine/sciences 2011 ; 27 : 405-12
- Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. EdtBlackwellPublishing Ltd. (2006).

D

- De Barros M P., Lemos M. Maistro E L., Leite M F., Soosa J P B., Bastos J K de Andradede SF., Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. 2008.Journal of Ethnopharmacology 120: 372-377.
- Defraigne J-O. Un mécanisme physiopathologique central à l'origine des complications du diabète ? Rev Med Liege, 2005, 60, 472-478. 9.
- Delattre J, Beaudeau JL, Bonnefont-Rousselot D. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Cachan : Lavoisier, 2005.
- Delattre J, Beaudeau J-L, Bonnefont-Rousselot D. Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques. Première édition. Ed. Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 2005, 5
- Delaveau P . les plantes médicinales les actualités pharmaceutiques , 1986 , 230 , 65-66.
- Donald Armstrong . Oxidative Stress Biomarkers and Antioxidant Protocols. Springer Science & Business Media. ISBN .(2002). 978-1-59259-173-2.
- Druzynka B., Stepniewska A. et Wolosiak R. The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria. (2007). 6: 27-36.
- Dykes L., Rooney LW., Sorghum and millet phenols and antioxidants. 2006.Journal of cereal Sciences 44: 236 - 241.

F

- Fabienne FROUX. Caractéristiques hydrauliques, régulation stomatique et efficence d'utilisation de l'eau de quatre espèces de conifères méditerranéens (Cupressus

Référence bibliographique

sempervirens, Cedrus atlantica, Pinus halepensis et Pinus nigra). Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1, 2002.

- Fleuriet A., Jay-Allemand C., Macheix J.J., Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes 2005. pp 121-216.
- François Muanda Nsemi. Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Biologie végétale. Université Paul Verlaine - Metz, 2010.
- Fridovich, I., Superoxide dismutases. Annu Rev Biochem 1975.44, 147-159.

J

- JAIN, T., JAIN, V., PANDEY, R., VYAS, A., SHUKLA, S., Microwave assisted extraction for phytoconstituents-An overview.2009. Asian J Res Chem 2, 19-25.
- Joëlle Goudable, Alain Favier. Radicaux libres oxygènes et antioxydants. *Nutr Clin Métabol* 1997; 11:115-20.
- Jovanovic S.V., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B., Simic M.G. Flavonoids as antioxidants. (1994). Journal of the American Chemistry Society. 116: 4846-4851.

H

- Haleng J, Pincemail J, Defraigne J.O, Charlier C, Chapelle J.P. Rev Med Liege 2007; 62 : 10 : 628-638.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 2e ed. Oxford, UK : Clarendon, 1989.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed. Oxford University Press. 1999.
- Halliwell B. Free radicals and antioxidants: A personal view. (1994). Nutrition Reviews. 52: 253-265.
- Hattori I, Nakamura H, Masutai H et al. Thioedoxin-dependent redox regulation – implication in aging and neurological diseases. Critical review of oxidative stress and aging. RG Cutler and H Rodriguez Eds. World Scientific 2003. Vol II pp 87 – 101,
- Hermes-Lima, M., Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals, In K. B. Storey (Ed.), Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. Hoboken, NJ: Wiley-Liss. 2005. 319-368.

Référence bibliographique

- Heim K. E., Tagliaferro A. R. and Bobilya D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity Relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* (2002), 13, 572–584.
- Hitara T., Fujii M., Akita K., Yanaka N., Ogawa K., Kuroyanagi M., Hongo D., Identification and physiological evaluation of the components from Citrus fruits as potential drugs for anti-obesity and anticancer. 2009. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17: 25- 28.

G

- Gaengel J.M , orecchioni A.M .le réparateur en pharmacie , dossier 2 , botanique-pharmacognosie , phytothérapie-homéopathie , édition tec et doc . decembre 2000 , p10 , p17-18 , p108 , p110 , p117 , p118.
- Galema, saskia. Microwave chemistry. *Chemical Society Reviews*, (1997). vol. 26, p.233-238. Science, Turkey
- Guichard C, Pedruzzi E, Fay M, et al. Les Nox/Duox : une nouvelle famille de NADPH oxydases. *Med Sci (Paris)* 2006 ; 22 : 953-9.
- Gurbuz I., Yesilada E., Ito S., An anti-ulcerogenic flavonol diglucoside from *Equisetum palustre* L. 2009. *Journal of Ethnopharmacology* 121: 360 -365.

K

- Kalia, K., Sharma, K., Singh, HP. et Singh, B. Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. *J. Agric. (2008). Food Chem.* 56: 10129– 10134.
- Khabir, M., Khatoon, F., Ansari, W.H .Flavonoids of *Cupressus sempervirens* and *Cupressus cashmeriana*. *J. Nat. Prod.* 1987. 50 (3), 511–512.
- Kim J Y., Lim H J., Lee D Y., Kim D H., Jeon R., Ryu J H., In vitro anti inflammatory activity of lignans isolated from *Magnolia fargessii*. 2009. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19: 937 -940.
- Košinová P, Gažák R, Duroux J-L, Lazzaroni R, Křen V, Assfeld X, et al. Dimerisation process of silybin-type flavonolignans: insights from theory. *Chemphyschem Eur J Chem Phys Phys Chem.* 18 avr 2011;12(6):1135-42. 38.
- Kubata BK., Nagamune K., Murakami N, Merkel P., Kabututua Z., Martin SK., Kalulug TM., Mustakuk H., Hoshida M., Ohnishi-kameyama M., Kinoshita T., Duszenko M., Uradea Y., Kola acuminate proanthocyanidins: a class of antitrypanosomal compounds

Référence bibliographique

effective against trypanosome brucei. 2005. International Journal for Parasitology 35: 91-103.

L

- Lin C., Chen C., Liang Y., Lin J. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. (2002). Biochemical and Biophysical Research Communications. 294: 167-172.
- Lopez-avila, extraction | Microwave-Assisted Extraction, Editor(s): Ian D. Wilson, Encyclopedia of Separation Science, Academic Press, 2000, Pages 1389-1398, ISBN 9780122267703, sciencedirect.com .

M

- Macheix et al., Les polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier (2006) 1-28.
- Martin S. et Andriantsitohaina R. (2002). Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium. Annales de Cardiologie et d'Angiologie. 51: 304-315.
- Masquelier J, Dumon M et Dumas J, Stabilisation des collagènes par des oligomères procyanidoliques. 1979. Acta thérapeutique 1, 101-104 p.
- Monaghan, B.R., Schmitt, F.O., The effects of carotene and of vitamin A on the oxidation of linoleic acid. J Biol Chem 1932. 96, 387-395.
- Moran JF, Klucas RV, Grayer RJ, Abian J, Becana M. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. Free Radic Biol Med. 1997;22(5):861-70.
- Murota K., Mitsukuni Y., Ichikawa M., Tsushida T., Miyamoto S., et Terao J. Quercetin-4'-glucoside is more potent than quercetin-3-glucoside in protection of rat intestinal mucosa homogenates against iron ion-induced lipid peroxidation. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2004). 52(7): 1907-1912.

N

- Nacira Amara, Yousra Boughérara Activité Antimicrobienne de l'Huile Essentielle du Cypres Vert (Cupressus Sempervirens L.). Algerian Journal of Natural Products 5:2 (2017) 455-46.
- Namiki, M. Antioxidants/antimutagens in food. (1990). CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition 29: 273-300.
- Nakajima K, Nakano T, Tanaka A.— The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis : The comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. Clin Chim Acta, 2006, 367, 36-47.

Référence bibliographique

- Nawaz, H., Shi, J., Mittal, G.S. et Kakuda, Y. Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration, Separation and Purification Technology. (2006). 48: 176- 181
- Nebeling L., Phytochemicals, the color of a Healthy Diet. Health Promotion Research Branch National Cancer Institute, Maryland.2002.
- Negre-Salvayre A., Affany A., Hariton C., Salvayre R. (1991). Additional antilipoperoxidant activities of alpha-tocopherol and ascorbic acid on membrane-like systems are potentiated by rutin. Pharmacology. 42(5): 262-272.
- Noguchi N and Nikie E. Phenolic antioxidants: a rationale for design and evaluation of novel antioxidant drug for atherosclerosis. Free Radical Biology&Medicine. 28, No. 10:1538–1546, 2000.

O

- Orgogozo JM, Dartigues JF, Lafont S, Letenneur L, Commenges D, Salamon R, et al. Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area. Rev Neurol (Paris). avr 1997;153(3):185-92. 37.

P

- Pirker K.F., Baratto M.C., Basosi R., Goodman B.A. (2012). Influence of pH on the speciation of copper (II) in reactions with the green tea polyphenols, epigallocatechingallate and gallic acid. Journal of InorganicBiochemistry. 112: 10-16.
- Pontopiddan A . le cyprès , edition actes sud , avri 2000. p13-19 ,p58-67 , p72-86.

Q

- Queen, B. L. et Tollefsbol, T. O. Polyphenols and Aging. (2010). Curr Aging Sci. 3(1): 34-42.

R

- Raynaud J .Prescription et conseil en phytothérapie. Tec & Doc/Lavoisier, Paris, (2005). p. 72-4).
- Reddy, C.C., Scholz, R.W., Thomas, C.E., Massaro, E.J., Vitamin E dependent reduced glutathione inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation. Life Sci 1982. 31, 571-576.
- Richter G. (1993). Composés phénoliques in Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie. Ed Presse polytechnique et universitaire romande. pp: 317-339.

S

Référence bibliographique

- Saad A, Virella G, Chassereau Ch., OxLDL immune complexes activate complement and induce cytokine productionn by MonoMac 6 cells and human macrophages. J Lipid Res, 2006, 47, 1975-1983.
- Salvayre R, Auge N, and Nègre-Salvayre A. Rôle de l'oxydation dans la genèse et la progression de l'athérosclérose. In L'athérosclérose : Physiopathologie, Diagnostics, Thérapeutiques., J.-F. Toussaint, M.-P. Jacob, L. Lagrost and J. Chapman, Eds. Masson: Paris 2003, Vol. 14, pp 269-290.
- Sannomiya M., Fonseca V B., Da silva M A., Rocha LRM. Dos Santos L C, Hiruma-Lima C A., Britoc A R M S, Vilegas W., Flavonoids and antiulcerogenic activity from Byrsonima crassa leaves extracts. 2005. Journal of Ethnopharmacology 97: 1- 6.
- Skandrani, I., Limem, I., Neffati, A., Boubaker, J., Ben Sghaier, M. et Bhourri, W. Assessment of phenolic content, free-radical-scavenging capacity genotoxic and antigenotoxic effect of aqueous extract prepared from Moricandia arvensis leaves. (2010). Food and Chemical Toxicology 48: 710–715.
- Smyth T; Ramachandran V. N.; Smyth W. F., A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. 2009. International journal of antimicrobial agents 33: 421 - 426.
- Soulère L, Viodé C, Périé J. and Hoffmann P. Selective Inhibition of Fe-versus Cu/Zn-Superoxide Dismutases by 2,3-Dihydroxybenzoic Acid Derivatives. Chem. Pharm. Bull 2 Thomas DESMIER , LES ANTIOXYDANTS DE NOS JOURS : DEFINITION ET APPLICATIONS 2016 .
- Spiteller G . linoleic acid peroxidation – the domination lipid peroxidation process in low densitylipoprotein . chemistery and physics of lipids . 1998 .95 (2), 105 -208.
- Stohs, S. et Bagchi, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. (1995). Free Radic al Biology and Medicine 18 (2): 321–36.
- Sumimoto H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. FEBS J 2008 ; 275 : 3249-77.

T

- Tessier F, Marconnet P. Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. Science & Sports (1995) 10.1-13Science & Sports (1995) 10.1-13.

V

Référence bibliographique

- Vacaresse N, Vieira O, Robbesyn F, Jürgens G, Salvayre R, and Negre-Salvayre A. Phenolic antioxidants trolox and caffeic acid modulate the oxidized LDL-induced EGF-receptor activation. *Br J Pharmacol.* 132(8): 1777–1788, 2001.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J. et Telser, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. (2004). *Molecular and Cellular Biochemistry* 266(1- 2): 37-56.
- Velu SS, Buniyamin I, Ching LK, Feroz F, Noorbatha I, Gee LC, et al. Regio- and stereoselective biomimetic synthesis of oligostilbenoid dimers from resveratrol analogues: influence of the solvent, oxidant, and substitution. *ChemWeinhBergstr Ger.* 2008;14(36):11376-84.
- Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obesity*, 2006, 30, 400–418.

W

- WANG L. ET WELLER C.L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology.* (2006). 17, 300–312.
- Win N N., Awale S. Esumi H, Tezuka Y., Kadota S., Novel anticancer agents, kayeassamins C-I from the flower of *Kayaea assamica* of Myanmar. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2008.16: 8653 - 8660.
- Witting P K, Pettersson K, Letters J, and Stocker R. Site-Specific Antiatherogenic Effect of Probucol in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *ArteriosclerThrombVasc* , 2000 *Biol.*20 :26-33.
- Wollgast J., Anklam E., Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. 2000. *Food Research International* 33: 423 - 447.

Y

- Yasarawan N., Thipyapong K. et al. Fundamental Insights into Conformational Stability and Orbital Interactions of Antioxidant (+)-Catechin Species and Complexation of (+)-Catechin with Zinc (II) and Oxovanadium (IV). (2013). *Journal of Molecular Structure.* 1047: 344–357
- Yen G-C, Duh P-D, Tsai H-L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chem.* nov 2002;79(3):307-13.

Référence bibliographique

Z

- ZERARGUI Fatima ,Activité antioxydante des extraits de racines *Tamuscommunis* L. et caractérisation des substances bioactives .2015.
- Zhang, J., Rahman, A.A., Jain, S., Jacob, M.R., Khan, S.I., Tekwani, B.L., Ilias, M.,. Antimicrobial and antiparasiticabietanediterpeneoids from *Cupressus sempervirens*. Res. Rep. Med. Chem. 2012. 2, 1–6.
- Zineb RAHMANI, Contribution à l'étude phytochimique, Electrochimique et biologique des extraits de *Cupressus sempervirens* (L). Doctorat LMD 2020, Université KasdiMerbah-Ouargla.



ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو استخلاص البوليفينول والفلافونويد وتقييم أنشطتها المضادة للأكسدة. تمت عملية الاستخلاص من المواد النباتية، السيقان المورقة ومخاريط السرو ، في وجود وسط مائي في الميكروويف. تمت دراسة حالتين فيزيائيتين للمخاريط: المخروط الكامل و المخروط المسحوق. تمت دراسة ثلاث عوامل متغيرة، نسبة المادة الصلبة: السائل، زمن الاستخراج وقوة أمواج الميكروويف. النهج التجريبي المعتمد في هذه الرسالة مستوحى من التصميم التجريبي، وخاصة تصميم Box Behken. تم نمذجة النتائج التي تم الحصول عليها في معادلة كثير الحدود من الدرجة الثانية. أظهرت هذه الدراسة قوة موجات الميكروويف لاستخراج المركبات الفينولية ، مع تطوير نشاط كبير مضاد للأكسدة. كما يعتمد الاستخلاص على العوامل المدروسة. وكذلك نشاط مضادات الأكسدة.

الكلمات المفتاحية: السرو، الاستخلاص بمساعدة الميكروويف، المركبات الفينولية.

Résumé

L'objectif du travail réalisé était l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes et l'évaluation de leurs activités antioxydant. L'extraction est réalisée sur de la matière végétale, tiges feuillée et cônes de cyprès, en présence d'un milieu aqueux dans un microonde. Deux états physiques de cônes ont été étudié : cône entiers et cône poudre. Trois paramètres opératoires ont été étudiés, le rapport solide : liquide, le temps d'extraction et la puissance des ondes. L'approche expérimentale adoptée dans ce mémoire s'inspire des plans d'expériences, particulièrement le plan de Box Behken. Les résultats obtenus ont été modélisés dans un polynôme de second degré. Cette étude a mis en évidence le pouvoir des ondes microondes à extraire les composés phénoliques, tout en concevant une activité antioxydante appréciable. Aussi, l'extraction est dépendantes des facteurs étudiés. De même que l'activité antioxydante.

Mots clé : cyprès, extraction assisté aux micro-ondes, composés phénoliques.

Abstract

The objective of the work carried out was the extraction of polyphenols and flavonoids and the evaluation of their antioxidant activities. The extraction is carried out on plant material, leafy stems and cypress cones, in the presence of an aqueous environment in a microwave. Two physical states of cones have been studied: whole cone and powder cone. Three operating parameters were studied, the solid: liquid ratio, the extraction time and the power of the waves. The experimental approach adopted in this dissertation is inspired by design experiments, particularly the Box Behken design. The results obtained were modeled in a second degree polynomial. This study demonstrated the power of microwave waves to extract phenolic compounds, while developing significant antioxidant activity. Also, the extraction is dependent on the factors studied. As well as antioxidant activity.

Keywords: cypress, microwave assisted extraction, phenolic compounds.