

# الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Ibn Khaldoun –Tiaret-  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine: "Sciences de la Nature et de la Vie"

Filière: "Sciences Biologiques"

Spécialité: "Sciences des procédés biotechnologiques et agroalimentaires"

Présenté et soutenu publiquement par :

- M<sup>elle</sup> BACHA Hanane
- M<sup>elle</sup> BELGUEBLI Hanane
- M<sup>elle</sup> BENHAMOU Elamria

## Mesure de l'activité antioxydante de l'acide gallique et de la catéchine

**JURY:**

Grade

-Président: Mr ABBES. A

MAA

-Promoteur: M<sup>me</sup> khadem.H

MAA

-Examineur : M<sup>elle</sup> Boubakeur. B

MAA

Année universitaire: 2016–2017

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

## Remerciements

**On** remercie **ALLAH** le tout puissant de nous avoir donné la force, la patience et la volonté pour réaliser ce mémoire << **Hamdoulillah** >>.

**On** voudrait témoigner notre profonde reconnaissance à **Mme khadem H.** d'avoir encadré ce travail. On la remercie pour sa disponibilité, sa rigueur scientifique et ses conseils ainsi que pour ses qualités relationnelles.

On exprime nos respectueux dévouements aux membres du jury qui nous ont fait l'honneur d'examiner ce travail : **M<sup>elle</sup> BOUBAKEUR .B** et **Mr ABBES .M.A.**

Merci à **M<sup>elle</sup> ABDALLAH .F**, ingénieur du laboratoire pour sa collaboration, gentillesse.

Enfin, on remercie tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.



*Dédicaces*

*À ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour*

*À ceux qui m'ont encouragé dans mes moments les plus  
difficiles*

*À ceux qui m'ont fait confiance, qui m'ont soutenu et qui  
ont toujours accepté mes choix*

*À mes parents*

*Mon cousin : Ahmed*

*À ma sœur, mariem*

*À mes frères chéris : amine, boubeker, othomane , Ismail.*

*À toute ma famille*

*À tous mes amis et collègues wissam, Hanane, el amria  
Fadhila, zohra, Hayat et Sara*

*\*Bacha Hanane\**





*Dédicace*

*Je dédie ce travail*

*À ma mère et mon père pour leur amour et leur  
support continu*

*À mes frères Djilali, Mohamed, Bachir*

*À mes sœurs surtout Karima*

*À toute ma famille*

*À mes amies wissam, Hanane, el amria*

*Fadhila et Karima, bien noble témoignage*

*d'affection*

*\*Belquebli Hanane\**





## Dédicace

*Quoi que de plus que de pouvoir partager  
les meilleurs moments de sa vie avec les êtres qu'on aime.*

*Arrivé au terme de mes études, j'ai le grand plaisir de  
Dédier ce modeste travail :*

*À ma très chère mère, qui me donne toujours l'espoir  
de vivre et qui n'a jamais cessé de prier pour moi, et surtout  
pour son amour et ses sacrifices afin que rien n'entrave le  
déroulement de mes études*

*À ma très chère sœur wiam, pour ses encouragements  
À toute ma grande famille, et surtout ma cousine Fatima.*

*À mes meilleurs amis chacun à son nom*

*À la fin je dédie très chaleureusement ce mémoire à mon  
binôme d'étude belquebli Hanane bacha Hanane*

*\*Benhamou Elamria*



# Sommaire

Liste des figures .....	i
Liste des tableaux.....	ii
Introduction .....	1

## *Partie Bibliographique*

### **Chapitre I : Stress oxydatif**

I.1. Définition du stress oxydatif .....	03
I.2. Systèmes de défense.....	05

## *Partie Expérimentale*

### **Chapitre I: Matériel et Méthodes**

I.1. Objectifs de travail .....	06
I.2. Lieu de travail .....	06
I.3. Matériel utilisé.....	06
I.3.1. Matériel biologique .....	06
I.3.1.1. Catéchine.....	06
I.3.1.2. Acide gallique .....	07
I.3.2. Matériel du laboratoire et réactifs .....	07
I.4. Méthodes.....	08
I.4.1. Etude de l'activité antioxydante.....	09
I.4.1.1. Préparation de l'extrait aqueux de <i>Thymus fontanesii</i> .....	09
I.4.1.2. Préparation des dilutions .....	09
I.4.1.3. Mesure du pouvoir réducteur (FRAP).....	09
I.4.1.4. Mesure de l'activité antioxydante (DPPH).....	10

### **Chapitre II : Résultats et Discussion**

II.1. Test de réduction du fer .....	12
II.1.1. Test de réduction du fer : Acide gallique , catéchine .....	12
II.1.2. Test de réduction du fer : Acide ascorbique.....	13
II.1.3. Test de réduction du fer de l'extrait <i>Thymus fontanesii</i> .....	14
II.1.4. Comparaison du pouvoir réducteur des différentes substances étudiées .....	15
II.2. Test de piégeage des radicaux libres DPPH .....	16
II.2.1. Test de piégeage des radicaux libres DPPH : Acide gallique, Vitamine C.....	16
II.2.2. Test de piégeage des radicaux libres DPPH : Extrait de <i>Thymus fontanesii</i> .....	18

<b>II.2.3. Test du piégeage des radicaux libre DPPH : Catéchine.....</b>	<b>18</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>20</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>21</b>



# *Liste des figures*

<b>Figure N°01</b> : Déséquilibre de la balance entre antioxydant et prooxydant.....	<b>03</b>
<b>Figure N°02</b> : Implication du stress oxydant dans diverses maladies.....	<b>04</b>
<b>Figure N°03</b> : Structure de la catéchine.....	<b>06</b>
<b>Figure N°04</b> : Structure de l'acide gallique .....	<b>07</b>
<b>Figure N°05</b> : Protocole expérimentale .....	<b>08</b>
<b>Figure N°06</b> : Réduction du radical DPPH.....	<b>10</b>
<b>Figure N°07</b> : Pouvoir réducteur de l'acide gallique et de la catéchine.....	<b>12</b>
<b>Figure N°08</b> : Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique.....	<b>13</b>
<b>Figure N°09</b> : Différentes structures chimiques de la vitamine C et réaction avec les radicaux .....	<b>14</b>
<b>Figure N°10</b> : Pouvoir réducteur de <i>Thymus fontanesii</i> .....	<b>15</b>

# *Liste des tableaux*

<b>Tableau N°01</b> : Systèmes de défense .....	<b>05</b>
<b>Tableau N°02</b> : Appareillage et produits chimiques.....	<b>07</b>
<b>Tableau N°03</b> : Gamme de dilutions.....	<b>09</b>
<b>Tableau N°04</b> : Valeur de la CE <sub>50</sub> de l'acide gallique, Catéchine, <i>Thymus fontanesii</i> et la vitamine C .....	<b>16</b>
<b>Tableau N°05</b> : Piégeage du radical libre DPPH• de l'acide gallique et de la vitamine C....	<b>17</b>
<b>Tableau N°06</b> : Piégeage du radical libre DPPH•par l'extrait de <i>thymus fontanesii</i> .....	<b>18</b>
<b>Tableau N°07</b> : Piégeage du radical libre DPPH de la catéchine .....	<b>18</b>

# *Introduction*

# *Introduction*

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un électron célibataire (ou électron non apparié) sur leur couche externe **Toussant, (2008)** ; ils peuvent se former lorsque l'oxygène interagit avec certaines molécules très instables et se complexent rapidement avec les autres composants, essayant de capturer l'électron qui leur est nécessaire. Pour acquérir de la stabilité une réaction en chaîne débute lorsqu'ils attaquent la molécule stable la plus proche en lui « volant » son électron, la transformant elle-même en radical libre **Tanguy, (2009)**.

Le **stress oxydant** a été décrit réellement comme un facteur étiologique crucial impliqué dans diverses maladies chroniques humaines telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, inflammation, diabète et vieillissement **Uttara, (2009)**. Ces dommages oxydants sont réalisés par l'attaque des radicaux sur de diverses biomolécules, en particulier les protéines, les lipides et l'ADN, ayant finalement comme conséquence la dégradation et la mort cellulaire **Moon, (2009)**.

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation en faible concentration, Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances comprenant des **enzymes** aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro-ou liposolubles. Cette grande variété physico-chimiques autorise la présence d'antioxydants dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires **Cano et al, (2006)**.

En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ( $\text{OH}\cdot$ ) et superoxydes ( $\text{O}_2\cdot$ ) **Rice et al, (1995)**.

Parmi les antioxydants naturels, les polyphénols, des métabolites secondaires largement répandues dans le règne végétal étant trouvés dans tous les fruits et les légumes. Ces composés sont présents dans toutes les parties des plantes mais avec une répartition quantitative qui varie entre les différents tissus, plus de 8000 structures ont été identifiées

**Waks et al, (2011)**.

Allant de simples molécules comme les acides phénoliques à des substances hautement polymérisées comme les tanins **Dai et al , (2011)**.

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo* l'activité antioxydante , par piégeage de radicaux différents comme les peroxydes ROO • par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP( Total Radical- Trapping Antioxidant Parameter ) ; les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter ) **Benzie et al, (1996)** ou les radicaux ABTS • (sel d'ammonium de l'acide 2,2' – azinobis – 3 –ethylbenzothiazoline -6- sulfonique ) , ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH • ( diphényl-picrylhydrazyle) **Sharma et al ,(2009)**.

L'objectif de cette étude était d'évaluer le pouvoir antioxydant de l'acide gallique et la catéchine et le comparé à celui de l'extraits naturel de *Thymus fontanesii*.

Ce manuscrit est structuré en une brève bibliographie, donnant un rappel sur le stress oxydatif et une partie expérimentale, présentant les protocoles expérimentaux adoptés, puis les résultats obtenus et leur interprétation et vers la fin une conclusion générale.

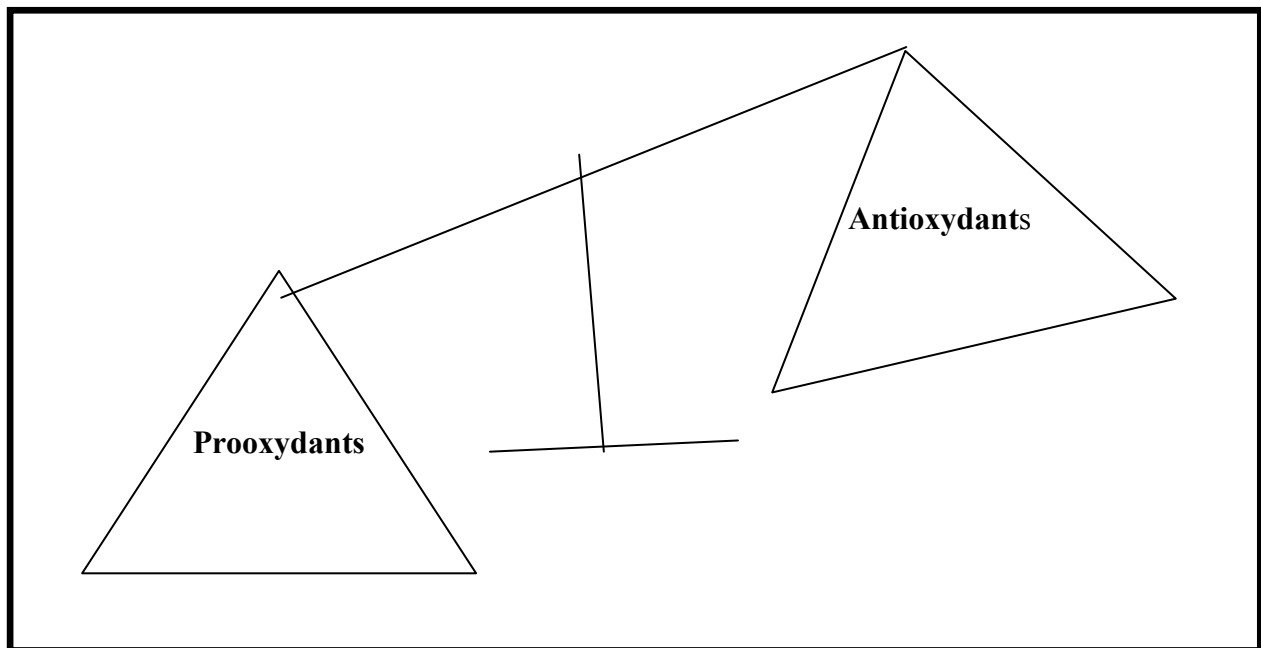
*Partie*  
*Bibliographique*

*Chapitre I :*  
*Stress oxydatif*

## I. Définition

### I.1. Stress oxydatif

Des molécules prooxydantes appelées **radicaux libre ou espèces réactives de l'oxygène** (ERO) sont produites quotidiennement dans l'organisme. Ces dernières sont cependant contrôlées par les antioxydants. Lorsque l'équilibre est rompu en faveur des radicaux libres un stress oxydatif survient (figure 1). Toute fois, une production excessive de ces molécules réactives ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut déséquilibrer la balance prooxydant /antioxydant **Christophe *et al*, (2011)**.



**FigureN°1** : Déséquilibre de la balance entre antioxydants et prooxydants.

Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telle que l'exposition aux radiations ionisantes (exposition importante au soleil, radioactivité artificielle ou naturelle), la pollution et le contact avec certains pesticides et solvants, la consommation du tabac et d'alcool, la prise de certains médicaments, la pratique du sport intensif et tout processus susceptible de surcharger les réactions de détoxification hépatique, notamment une perte de poids importante **Médart *et al*, (2009)**.



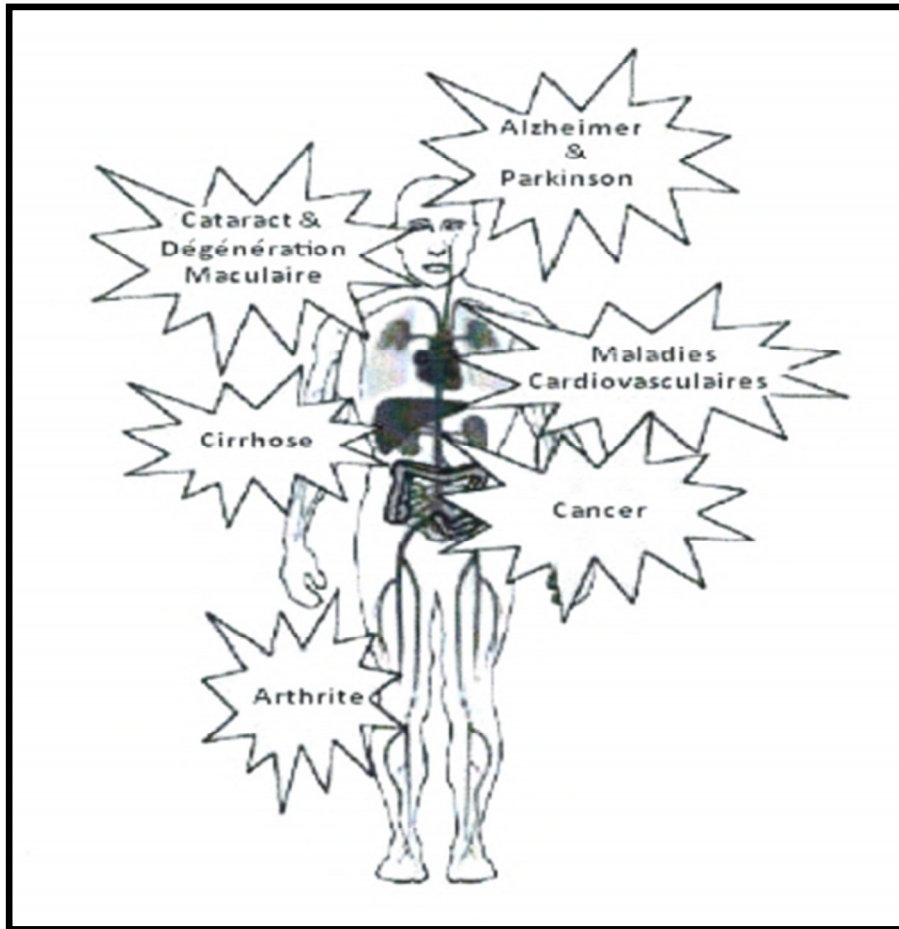


Figure N°2 : Implication du stress oxydants dans diverses maladies.

## I.2. système de défense

Sur le tableau si dessous sont résumés les moyens de défenses primaires et secondaires

Tableau N°1 : Systèmes de défense

Primaires (enzymatiques)	Secondaires (non enzymatiques)
<p><b>1--Superoxyde dismutase (SOD) :</b></p> $2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \xrightarrow{\text{SOD}} \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ <p><b>Landis <i>et al</i> , ( 2005)</b></p> <p><b>2- Catalase :</b></p> $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ <p><b>Viko <i>et al</i> ,(2006)</b></p> <p><b>3- Glutathion peroxydase :</b></p> $2\text{GSH}_{(\text{réduit})} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{GPX}} \text{GSSG}_{(\text{oxyde})} + 2\text{H}_2\text{O}$	<p><b>1- Acide ascorbique (vitamine C) :</b></p> <p>La vitamine C ou acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble, sensible à la chaleur, au ultraviolets et a l'oxygène <b>Fian, (2004).</b></p> <p>Elle est un antioxydant puissant hydrosoluble, capable de piéger / neutraliser l'ERO à des concentrations très faibles.</p> <p><b>2- tocophérols (dont la vitamine E) :</b></p> <p>Les tocophérols sont des composés liposoluble, ils regroupent quatre substances dont l'alpha-tocophérol aussi appelé vitamine E . <b>Wang <i>et al</i> , (2006).</b></p> <p><b>3- caroténoïdes :</b></p> <p>Les caroténoïdes, sont des pigments fabriqués par les végétaux. les plus importants sont le bêta – carotène, l'alpha-carotène, la lutéine, la zéaxanthine et le lycopène. Ce sont eux qui donnent aux fruits et légumes des couleurs orange et jaune leur fonction essentielle est de protéger les plantes, la plupart des caroténoïdes ont une propriété antioxydant <b>Causse, ( 2005)</b></p>

*Partie*  
*expérimentale*

*Chapitre I :*  
*Matériels et*  
*Méthodes*

### I.1. Objectifs de travail

L'objectifs de la présente étude était de :

- Mesurer l'activité antioxydante de deux substances actives de la famille des polyphénols ; l'**acide gallique** et la **catéchine** ; en appliquant deux méthode différentes : le piégeage des radicaux libres 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle (**DPPH •**) et **FRAP** (ferric reducing antioxydant power).
- Comparer le pouvoir antioxydant de la catéchine et l'acide gallique avec celui d'un extrait naturel (extrait aqueux de *Thymus fontanesii*).

### I.2. Lieu de travail

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires :

- Amélioration et Valorisation des Productions Animales Locales.
- Biochimie (Faculté des Sciences de le Nature et de la Vie)

### I.3. Matériel utilisé

#### I.3.1. Matériel biologique

##### I.3.1.1. Catéchines

Sont des polyphénols, caractérisés par la présence dans leur structure de noyaux phénoliques. Elles appartiennent au groupe des flavonoïdes et au sous-groupe des flavanols, qui peuvent être à leur tour des monomères ou de polymères, elles sont particulièrement abondantes dans les feuilles de thé, dans des fruits comme le raisin et la pomme, dans le cacao et dans les produits transformés tels que le vin et le chocolat Scalbert *et al* ,(2000).

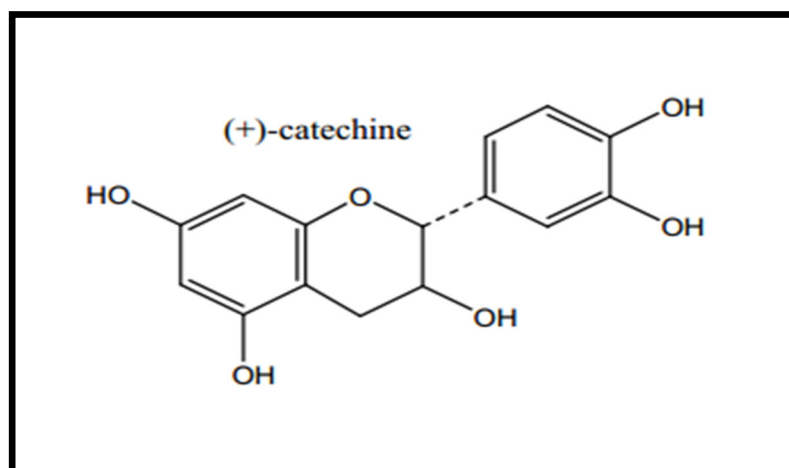


Figure N°3 : Structure de la catéchine

### I.3.1.2. L'acide gallique

Est largement distribué dans diverses plantes, fruits et aliments, ou il est présent sous forme libre ou comme ingrédient de tanins, à savoir les gallotannins, les noix de galle, le sumac, l'écorce de chêne, le thé vert, raisins, fraises, ananas, banane, citron, hamamélis, vins rouges et blancs et l'épluchure de pomme sont connus pour être riche en acide gallique **Niemetz et al, (2005)**.

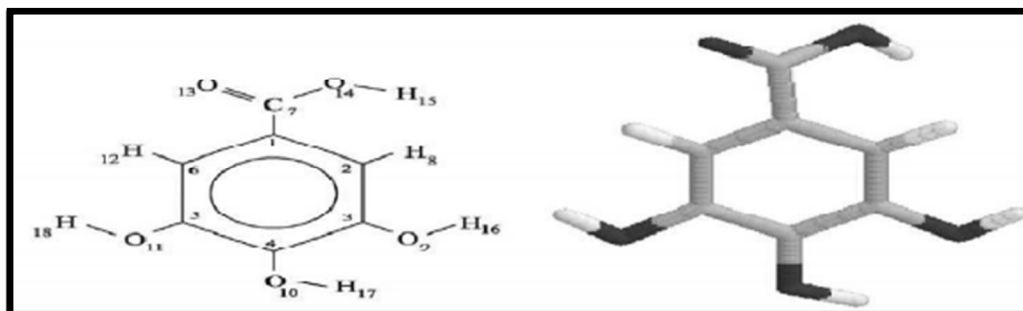


Figure N°04: Structure de l'acide gallique

### I.3.2. Matériel du laboratoire

L'appareillage et les produits chimiques utilisés dans ce travail sont mentionnés dans le tableau suivant.

Tableau N°02 : Appareillage et produits chimiques

Appareillages	Produits chimiques
-Balance analytique (Dahus)	-Acide Trichloro acétique (TCA) 10% ( $C_2HCl_3O_2$ )
-Centrifugeuse (Sigma)	-DPPH (1,1-Diphényl-2-Picrylhydrazyl)
-Etuve (Heraeus)	-Ethanol( $C_2H_5OH$ )
-Micropipette (Accumax)	Tampon phosphate (0,2M, PH : 6,6)
-Vortex (LinLab)	-Ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$
-Spectrophotomètre UV-Visible (Schimadzu)	-Chlorure de fer( $FeCl_3$ )
	-Acide ascorbique( $C_6H_8O_6$ )
	-Acide gallique ( $C_6H_2(OH)_3COOH$ )
	-Catéchine

## I.4.Méthodes

Les étapes de l'expérimentation sont résumées comme suite :

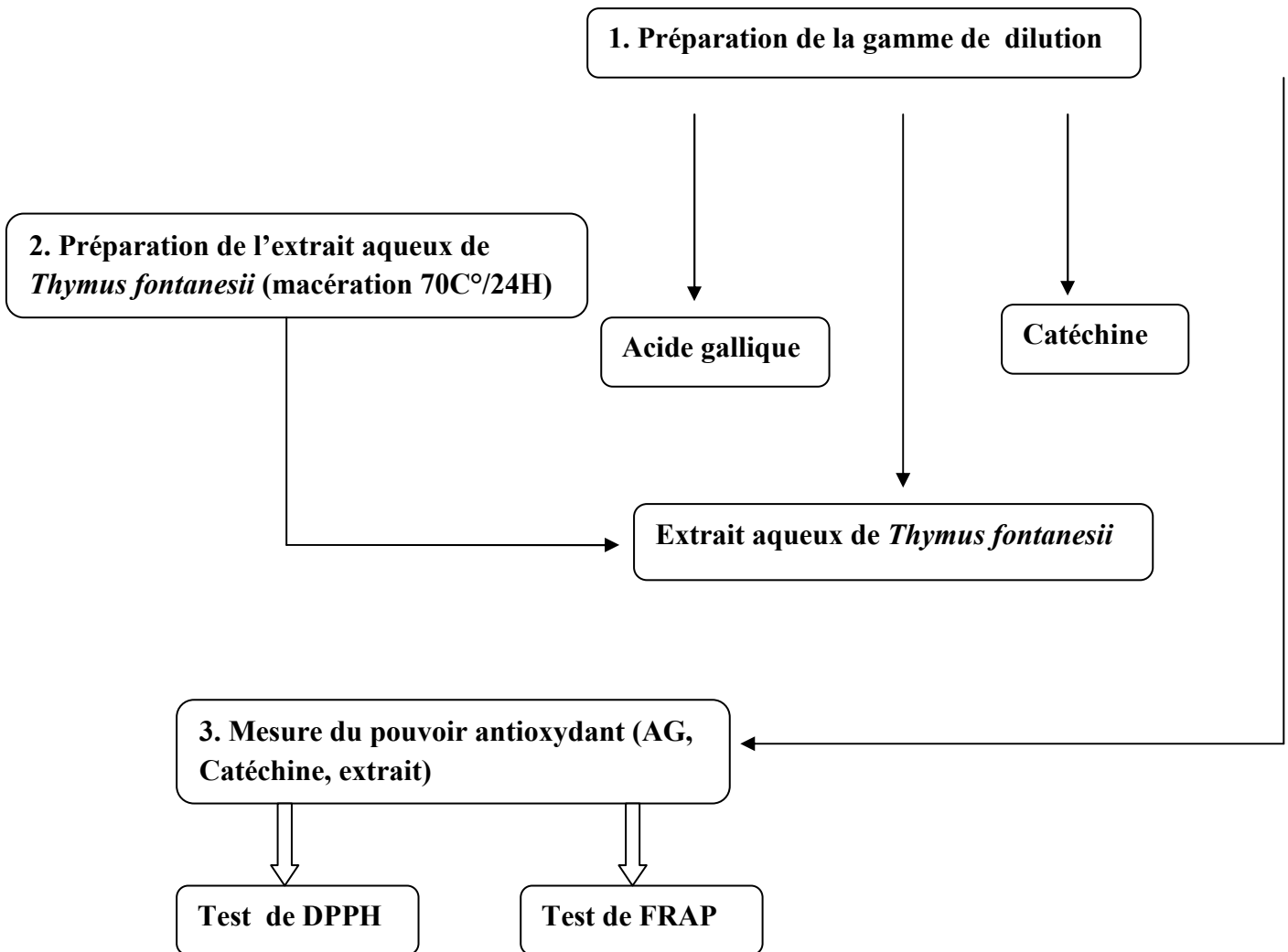


Figure N°05: Protocole expérimental

### I.4.1. Etude de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des différentes substances synthétiques (**Acide gallique, Catéchine**) et naturelles (**Extrait de *Thymus fontanesii***) a été évaluée par deux méthodes ; la réduction du fer et le piégeage du radical libre DPPH.

#### I.4.1.1. Préparation de l'extrait de *Thymus fontanesii*

**5g** de poudre de *Thymus fontanesii* sont mélangés à **100ml** d'eau distillée, après 24h de macération le mélange est filtré et récupéré dans un flacon, le reste de poudre est macéré une deuxième fois dans les mêmes conditions puis le filtrat est récupéré et est conservé à **4°C** jusqu'à utilisation.

#### I.4.1.2. Préparation de dilutions

Le tableau si dessous montre la gamme de préparation des différentes dilutions (V/V).

**Tableau N°03** : Gamme de dilutions

<i>Dilutions</i>	<b>1 /10</b>	<b>1/2</b>	<b>1/4</b>	<b>1/6</b>	<b>1/8</b>	<b>1/10</b>	<b>1/12</b>
<i>Concentration mg/ml</i>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,0625</b>	<b>0,0312</b>	<b>0,0156</b>

#### I.4.1.3. Mesure du pouvoir réducteur (Test de FRAP)

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode de **Oyaizu, (1986)**, En effet, 1 ml de différentes concentrations de la solution d'acide gallique, de catéchine et de l'extrait de plante (**0,0156 ; 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25mg/ml**) est mélangé avec 2,5 ml de la solution tampon phosphate (0,2 M ; pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium ( $K_3Fe(CN)_6$ ) à 1%. Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20 min. après, 2,5 ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. 2,5 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2,5 ml d'eau Distillée et 0,5 ml  $FeCl_3$  (0,1%). L'absorbance est mesurée contre un blanc à 700 nm par d'un spectrophotomètre.



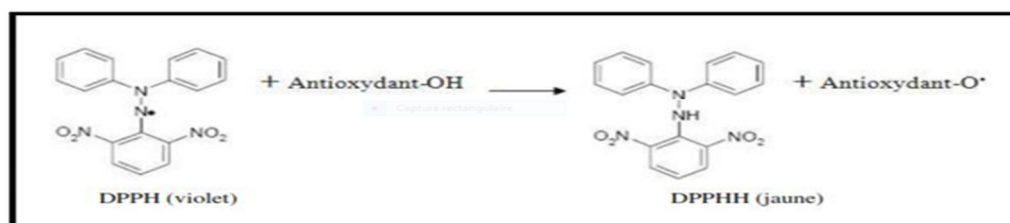
**NB:** L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions opératoires.

**NB:** Les graphes sont tracés, exprimant les absorbances obtenues en fonctions des différentes concentrations utilisées pour les trois solutions. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des substances testées.

#### I.4.1.4. Mesure de l'activité antioxydante (Test de DPPH)

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque substance( acide gallique ,catéchine,extrait de *Thymus fontanesii* ) sur le DPPH est mesuré par la technique décrite par *velazquez et al* , (2003).

La réduction du radical libre **DPPH•** (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrophotomètre UV – visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants en présence des pièges de radicaux libres, le **DPPH•** (2,2- diphényl-1-picryl-hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2 diphényl-1-picryl hydrazine de couleur jaune (figure N°6).



**Figure N°06:** Réduction du radical DPPH

Un volume de 750ul de chaque solution (AG, catéchine, extrait) est ajouté à 1,5 ml de la solution méthanolique de DPPH (2,4mg/100ml), après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30minutes,

La lecture a été effectuée par la mesure de l'absorbance à 517nm. Les résultats sont exprimés en activité anti- radicalaire ou l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (%) en utilisant la formule suivante :

$$I\% = [1 - (\text{abs échantillon} - \text{abs contrôle négatif})] \times 100$$

**I%: Pourcentage de l'activité anti-radicalaire (AAR%)**

**Abs échantillon : Absorbance de l'échantillon**

**Abs contrôle négatif : Absorbance du contrôle négatif**

**NB:** IC50 ou concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC50 pour Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH• Les IC50 sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes absorbances.

*Chapitre II :*  
*Résultats et*  
*discussion*

## II.1. Résultats de réduction du fer

### II. 1.1. Test de réduction du fer par l'Acide gallique- catéchine

#### - Acide gallique (figure N°07-A)

-Sur la figure sont montrés les résultats du test de **FRAP**, nous remarquons que la réduction du fer augmente avec la concentration en acide gallique, [DO 0,276 à la concentration 0,125 mg/ml, DO 0,56 à 0,25mg/ml] d'après l'équation, la concentration effectrice (**CE50**) était estimé **0,243 mg/ml (243 µg/ml)**.

#### - Catéchine (figure N°7-B)

-La figure concerne les résultats du test de FRAP, nous remarquons que la réduction du fer augmente avec la concentration en catéchine, [DO 0,25 à la concentration 1,6 mg/ml et DO 0,53 à 6,6 mg/ml ] ;d'après l'équation, la concentration effectrice **CE50** était estimé à **5,606 mg/ml (5606µg/ml)**.

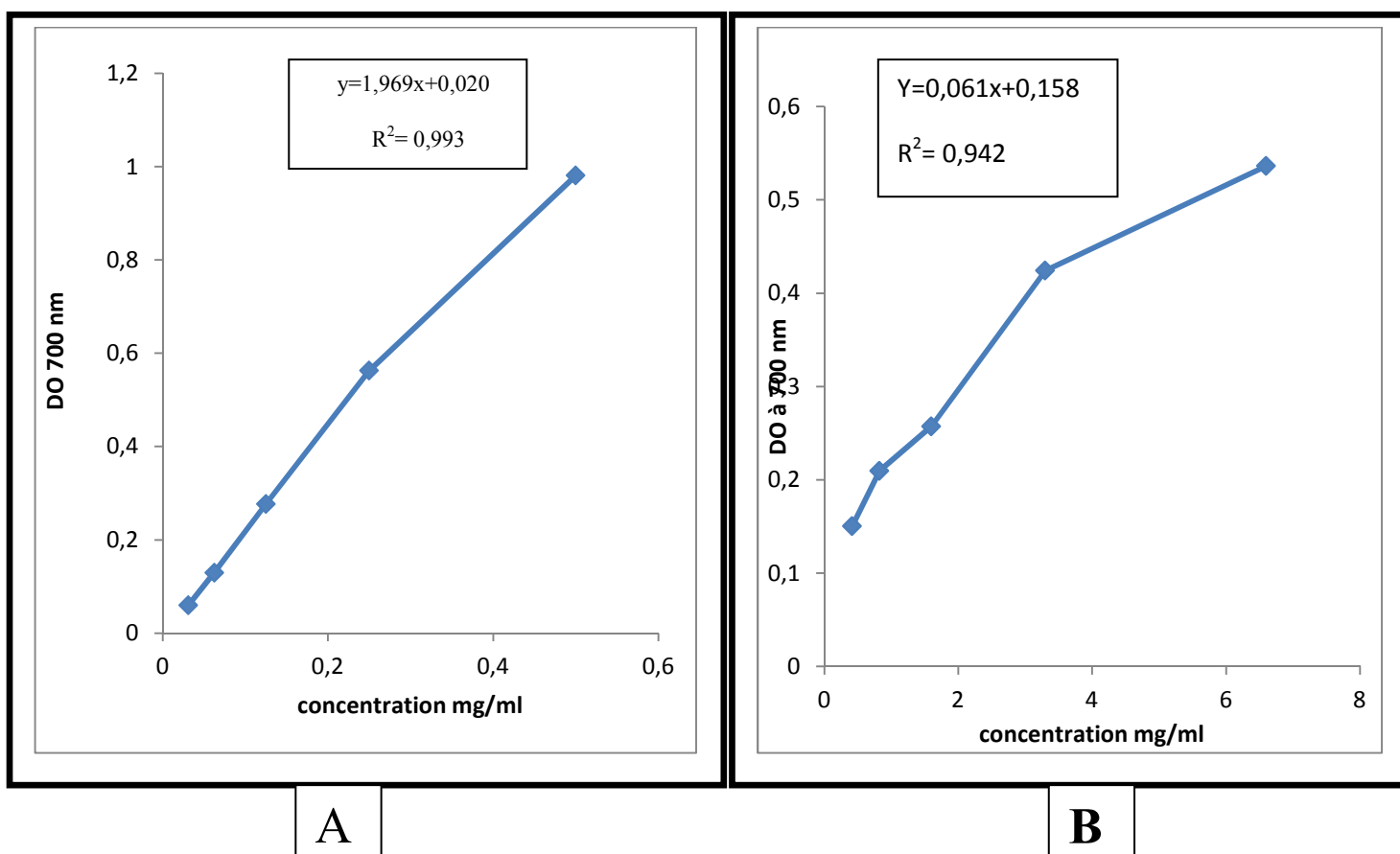


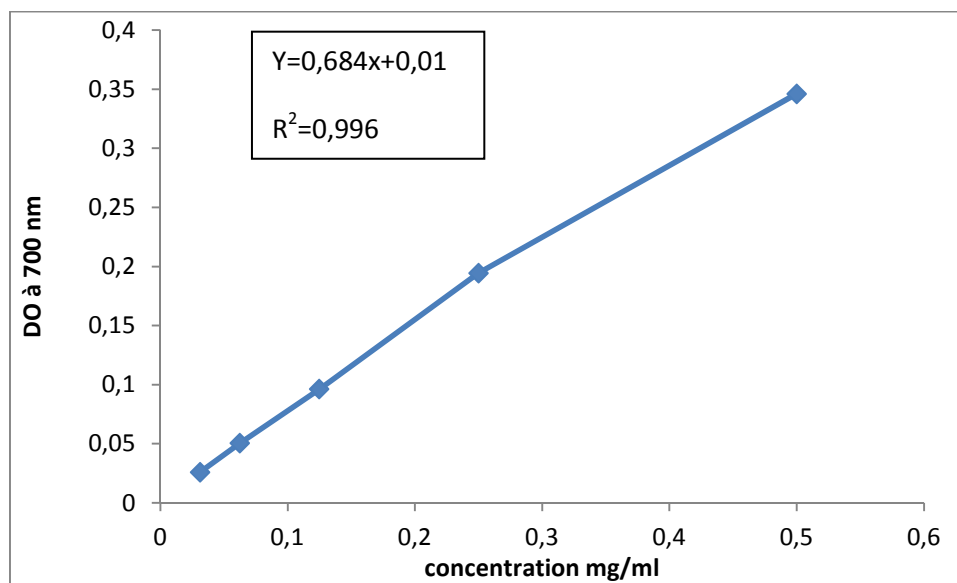
Figure N°07 : Pouvoir réducteur de l'acide gallique et de la catéchine

Ces résultats sont différents à ceux de **Makoto et ses collaborateurs**, (1994), lors d'une étude comparant la cytotoxicité et le pouvoir antioxydant de deux acides phénoliques, il s'est avéré que l'acide gallique avait une activité antioxydante moins forte par rapport aux autres acides, son CE50 était supérieur à **20 $\mu$ g/ml**.

Ainsi dans une étude faite par **kholkhal**, (2013), les CE50 de l'acide gallique et la catéchine étaient respectivement **22,122 $\mu$ g/ml** et **2,2890  $\mu$ g/ml**.

### II.1.2. Test de réduction du fer : l'Acide ascorbique

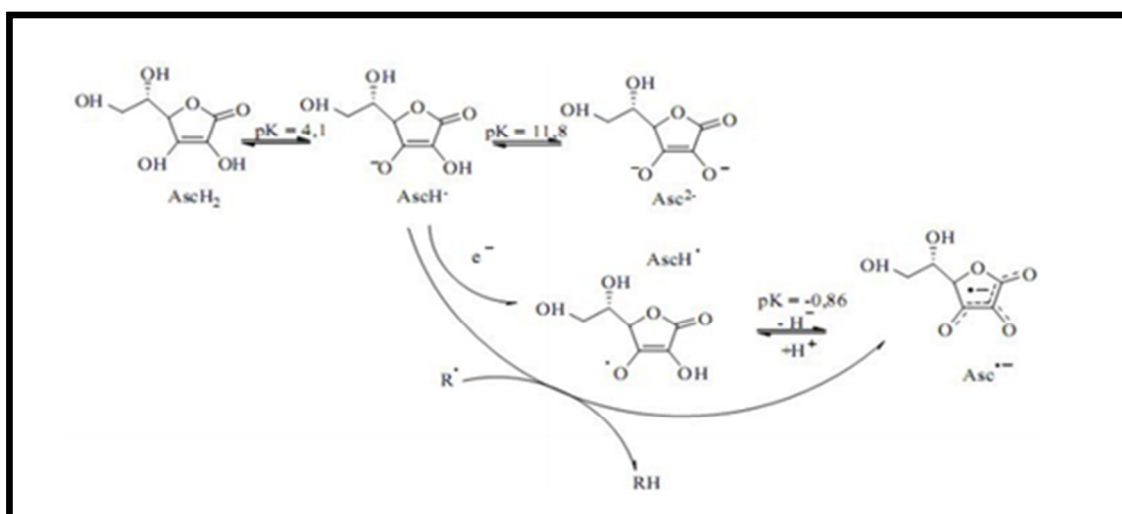
Sur la figure ci-dessous sont montrés les résultats du test de **FRAP**, nous remarquons que la réduction du fer est proportionnelle à la concentration en vitamine C [DO **0,096** à la concentration **0,125-DO 0,19** à **0,525mg/ml** d'après l'équation, **CE50 0,716 mg/ml**. (**716 $\mu$ g/ml**).



**Figure N°08** : Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique

Ce résultat est en accord à celui de **Bougandoura , (2012)**,  $CE_{50}$  était au voisinage de **0,134mg/ml**.

La Vitamine C est connue pour son action protectrice contre l'oxydation membranaire **Retsky et al, (1999)**. Son caractère antioxydant provient de sa forme ionisée abondante (AscH<sup>-</sup>) qui peut aisément réagir avec des radicaux et produire le radical acrobate tricarbonyle (AscH•), stabilisé par résonance.



**Figure N° 09:** Différentes structures chimiques de la vitamine C et la réaction avec les radicaux

L'ascorbate ou vitamine C : est l'antioxydant hydrosoluble majeur, qui réagit rapidement avec l'anion superoxyde et l'oxygène singulet , ou encore avec le peroxyde d'hydrogène elle est indispensable par sa capacité à réduire les antioxydants oxydés comme la vitamine E ou les caroténoïdes **pourrut, ( 2008)** . Acide ascorbique est abondant dans les agrumes, les fruits les pommes.

### II.1.3. Test de réduction du fer : *Thymus fontanesii*

Sur la figure si dessous sont montrés les résultats du test de **FRAP**, nous remarquons que la réduction du fer augmente avec la concentration en *Thymus fontanesii* [DO 0,23 à la concentration 2,1 mg/ml à 0,53 à 6,6 mg/ml d'après l'équation, la concentration effectrice était estimé 4,80 mg/ml (4800µg/ml).

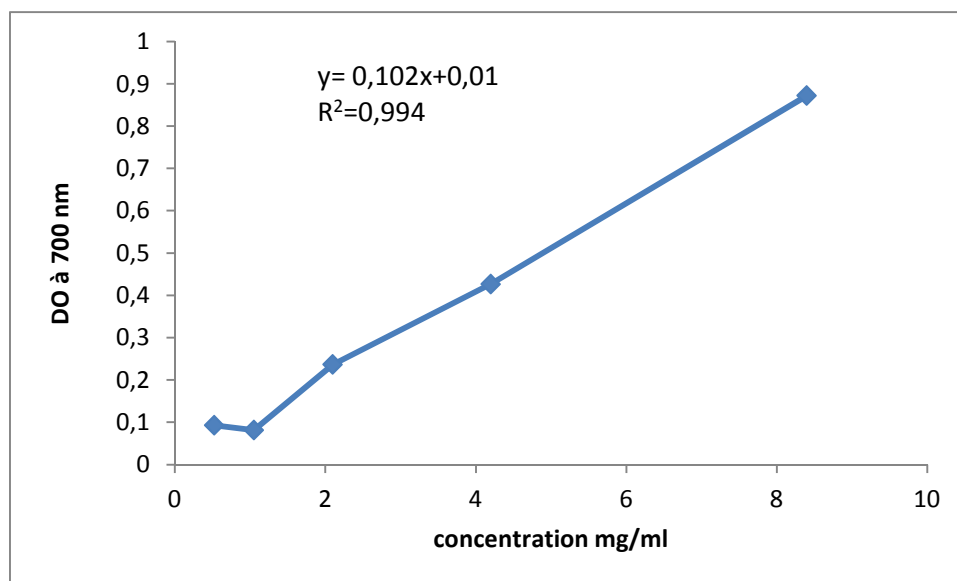


Figure N°10 : Pouvoir réducteur de *Thymus fontanesii*

Ce résultat est différent de celui de **Bougandoura & Bendimerad, (2012)** lors de son travail sur une plante de la famille des lamiacées ou les résultats étaient comme suit : la phase acétate d'éthyle (DO=  $0,78 \pm 0,006$ ) (respectivement DO=  $0,49 \pm 0,003$  et DO= $0,32 \pm 0,03$ ). Le pouvoir réducteur des extraits de la plante est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants.

### II.1.4. Comparaison des CE50 des différentes substances étudiées

**Tableau N° 04:** Valeur de CE<sub>50</sub> de l'acide gallique, catéchine, *Thymus fontanesii* et la vitamine C

<i>Substances</i>	<i>Acide gallique</i>	<i>Vit C</i>	<i>Thymus fontanesii</i>	<i>Catéchine</i>
<b>CE50</b>	<b>0,243±0,5</b>	<b>0,716±0,5</b>	<b>4,8±0,5</b>	<b>5,606±0,5</b>

## II.2. Résultats du piégeage du radical DPPH

### II.2.1. Test de piégeage des radicaux libres : acide gallique et vitamine C

#### Acide gallique

-Sur le tableau si dessous sont montrés les résultats du test de **DPPH**, nous remarquons que le pourcentage d'inhibition augmente avec la concentration en AG, Ex : à la concentration 0,125mg/ml le % est 116,80 et à la concentration à 0,25 mg/ml le % 116,8 .

#### Acide ascorbique

-Concernant ce lui de l'acide ascorbique, nous remarquons les résultats du test de **DPPH**, nous remarquons que le pourcentage de l'inhibition diminue avec l'augmentation de la concentration, le % était à 105,18 à la concentration 0,125mg/ml et a baissé à % de 102, 37% à 0,25 mg/ml



**Tableau N°05:** Piégeage du radical libre DPPH de l'acide gallique et de la vitamine C

<i>Concentration (mg/ml)</i>	<i>% d'inhibition</i>	
	<i>Acide gallique</i>	<i>Vitamine C</i>
<b>0,0312</b>	<b>108,425</b>	<b>121,635</b>
<b>0,0625</b>	<b>111,93</b>	<b>112,93</b>
<b>0,125</b>	<b>116,805</b>	<b>105,18</b>
<b>0,25</b>	<b>118,02</b>	<b>102,376</b>
<b>0,5</b>	<b>130,705</b>	<b>102,06</b>

L'acide gallique à un pouvoir antioxydant plus élevé que celui de vitamine C, cela est ainsi affirmé par **TSAO et DENG, (2004)**.

Les composés phénoliques obtenus à partir de sources végétales ont le potentiel d'agir comme antioxydants ou éliminateurs de radicaux libres. Ils possèdent une chimie structurale idéale pour l'activité de balayage des radicaux libres. Les propriétés antioxydantes des polyphénols (Acide gallique) proviennent de leur haute réactivité en tant que donneurs d'hydrogène ou d'électrons qui peuvent stabiliser et délocaliser l'électron non apparié (fonction de rupture de chaîne) et de leur potentiel pour chélater des ions métalliques.

Ce résultat est différent à celui de **kholkhal et ses collaborateurs, (2013)** ou l'acide avait une CI50=1,12 mg/ml), ainsi à celui de **Bruno Moukette, (2015)**. La vitamine C utilisée comme témoin positif avait la meilleure activité de balayage avec un pourcentage d'inhibition de **95,77% ± 0,28**.

Alors que ce résultat est plus proches a celui **Sirichia A, Disakwattana et al, (2017)**, lorsque l'acide ascorbique a été combiné avec de l'acide gallique, des radicaux libres.

Dans une étude entérieure, la combinaison d'acide ascorbique et d'acide gallique avaient un effet synergique sur L'inhibition de l'oxydation des protéines.

### II.2.2. Test de piégeage des radicaux libre : *Thymus fontanesii*

-Sur le tableau si dessous sont montrés les résultats du test de DPPH, nous remarquons que le pourcentage d'inhibition diminue avec l'augmentation de la concentration de *thymus fontanesii*, le % était de **115,77** à la concentration **1,05mg/ml** et s'est diminué à **100,415 %** à **8,4 mg/ml**.

**Tableau N°06:** Piégeage du radical libre DPPH du *Thymus fontanesii*

<i>Concentration mg/ml</i>	<b>1,05</b>	<b>2,1</b>	<b>4,2</b>	<b>8,4</b>	<b>6,8</b>
<i>% d'inhibitions du DPPH</i>	<b>115,77</b>	<b>105,305</b>	<b>100,545</b>	<b>100,415</b>	<b>100,19</b>

Ce résultat est proche à celui de **kholkhaL et ses collaborateur, (2013)**, ou le pourcentage d'inhibition était de l'ordre de **94%** à une concentration de **1,5 mg/ml** contre **79%** pour les racines à une concentration de **6,75mg/ml**.

Les propriétés biologiques et pharmaceutiques du thym sont en grande partie dues à la présence de substances actives telles que les flavonoïdes qui représentent une des plus grandes classes des produits naturels synthétisés par la plante **JOHNSON, (1999)**.

### II.2.3. Test de piégeage des radicaux libre : Catéchine

-Sur le tableau si dessous sont montrés les résultats du test de DPPH, nous remarquons que le pourcentage d'inhibition diminue avec l'augmentation de la concentration de la catéchine, le % est de **126,98** à la concentration **0,82 mg/ml** et à diminué à **124,32%** à **1,6 mg/ml**.

**Tableau N°07 :** Piégeage du radical libre DPPH de la catéchine

<i>Concentration mg/ml</i>	<b>0,416</b>	<b>0,82</b>	<b>1,6</b>	<b>3,3</b>	<b>6,6</b>
<i>% d'inhibitions DPPH</i>	<b>130,32</b>	<b>126,98</b>	<b>124,32</b>	<b>119,50</b>	<b>116,91</b>

Ces résultats sont en désaccord avec ceux de **POPOVICI et ses collaborateurs, (2009)**, de % d'inhibition CI50 **8,11** à la concentration **0,5**. L'épicatéchine, caractérisée par la présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3, est considérée également comme un antioxydant fort **SEYOUM, (2006)**.

Ils à été démontré que la capacité de piégeage des catéchines ne dépend pas de leur stéréo-isomérisation, mais les dérivés galloylés de catéchines sont des piègeurs plus puissants que les non-galloylés dans d'ordre : gallocatéchine gallate >épigallocatéchine gallate>épicatéchine gallate >épicatéchine =catéchine. il y a une information contradictoire à propos du degré jusqu'au quel la polymérisation a un effet positif sur l'activité antiradicalaire **TABART et ses collaborateurs, (2009)**.

Les catéchines sont des réducteurs chimiques et donc oxydables . Cela est directement apparent lors de la transformation des feuilles. la catéchine sont des propriétés réductrices et la capacité à piéger les radicaux libres des polyphénols sont à l'origine de l'utilisation de certains d'entre eux comme antioxydants alimentaires pour prévenir en particulier l'oxydation de matières grasses.

# *Conclusion*

# Conclusion

Les polyphénols (acide gallique et la catéchine ) sont des composés naturels largement répondus dans le règne végétal qui ont une importance croissante notamment

Grace à leur effets bénéfique sur la santé . Leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer , des maladies inflammatoire, et cardiovasculaire ;ils sont également utilisées comme aditifs en industrie agroalimentaire ,pharmaceutique et cosmétique .

Il existe donc un équilibre critique entre l'oxygène moléculaire indispensable a la vie en aérobiose et la formation inévitable de radicaux oxygénés libre au cours de son utilisation par le métabolisme cellulaire , que l'organisme doit s'efforcer de maintenir pour conserver son intégrité dans ce contexte nous sommes intéressés à l'étude de pouvoir antioxydant de l'acide gallique ,catéchine, l'extrait de *Thymus fontansii* par les deux méthodes **DPPH** et **FRAP**.

Les résultats obtenus a l'issue de ce travail montrent que l'acide gallique, catéchine,l'extrait de *Thymus fontansii* ont un pouvoir réducteur intéressant et variable testé.

De ce fait, une stratégie de prévention nutritionnelle apparait donc comme un enjeu de santé publique.

En fait le moyen le plus simple consiste à avoir une alimentation varie et équilibrée combinant vitamine, minéraux, oligo-élément et antioxydants.

Perspective : le travail nécessite d'être complété au futur.

- ✚ optimiser la méthode de mesure de l'activité antioxydante .
- ✚ comprendre le principe d'oxydation des biomolécules.

*Références*  
*Bibliographique*

# *Références Bibliographique*

- **Benzie I.f., Strain j., (1996).** The ferric Reducingability of plasma (frap) as a mesure of antioxydant power :the FRAPP assay. Analytical biochemistry .239 .P70-76.
- **Bougandoura N.,(2012).**Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de satureja calamithassp.nepta(L).nature&technologie.p14-19.
- **Bruno M Y., Constant A., P, Jacques .R.N., Cabralpn,B ,Bravi.M and Jeanne Y.N.,(2015).** In vitro antioxydant propreities , free radicals scavenging activities of extracts and polyphenol composition of à non –timber forest product used as spice : mondora myristica .
- **CANO. N., BARNOUD.D., SCHNEIDER. S.M., VASSON. M.P., MASSELMANN.M & LEVERVE.X.,(2006).** Traité de nutrition artificiellement de l'adulte .Edition springer. P225.
- **Christophe. P., & Christophe .S., (2011).** Physiologie, pathologie et thérapie de la production chez l' humain. Edition springer. P84.
- **Dai.j. & Mumper.R .J.,(2011).** Plant phenolics : extraction, Analysis and their Antioxydant and Anti cancer propreities. Molécules 15(10) .p7313-52.
- **JOHNSON A. I.,(1999).** Antioxydant et anticancéreux, biofuture .(17)186 .P :14-15.
- **Kholkhal.F., Hanadi.A.L .,bendahou .M , Boublenza .I,Chabane . S.D et Chaouch . T .,(2013 ).** Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante de thymus clliatus SSP. Colorants. 09(1).P151-158.
- **MEDART . J.,(2009).**Manuel pratique de nutrition. L'alimentation préventive et curative. Editions De Baech supérieur.P49 .
- **Mokoto. I ., Rie .S .,Tatsuo. K., Vahako. S .,Yukio .O., Yoshisada. Y.,(1994).** Antioxydant ,Gallic Acid , induces Apoptosis in HL-60 RG –Cells . (204)2.p898-904.
- **Moon .J.K., Schibamoto.T.,(2009).** antioxydant assays for plant and Food components. J agr Food chem. 57.p1655-66.
- **Oyaizy .M., (1986).** Studies on products of Brouvining reaction prepared from glucose amine. JPN J Nutr .44 .P307 -15
- **Popovici .C.,Jonka .S., Bartek.T.,(2009).** Composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. Revu de génie industriel. P25-39.

- **Porrut.,(2008).**Contribution l'étude phytochimique implication du stress oxydatifs dans la toxicité du plomb sur une plante modele vicia faba.these pour l'obtention du diplôme de doctorat a l'institut national polytechnique de l'université de toulouse spécialité ecotoxicologie France.
- **Rice evans.C.A.,Miller.N .J.,Bolwell.P.G.,Bramley.P.M., Pridham .J.B.,(1995).** The relative antioxydant activities of plant-derived polyphenolic flavanoïds. Free radical research. 22.p375-383.
- **Retsky.d.,Chen.k.,Zeind.J .,et Frei.B.,(1999).** Inhibition of Copper-induced .LDL oxydation by vitamin C Is associated with decreased Copper-binding to LDL and 2-oxohistidine formation. Free radical biology and médecine. 26(1-2).p90-98.
- **Scalbert.A.,& Williamson.G.,(2000),**Dietryintake and biova-ailability of polyphenols .J.Nutr.130.p2073S-2085S.
- **Seyoum.A.,Asres.K.,El-fiky.F-K.,(2006).**Structure radical scavenging activity relation chips of flavonoids.journal of phytochimitry.67.p2058-2070.
- **Sharma.OMP.,Bhat.T.K.,(2009),** DPPH antioxidant assay Rovisited Food chemistry.113(4) P 1202.
- **Sirichia. A., Thavaree.T.H.,Weerachat.S.,Porntip.P.,(2017).**Interaction between ascorbic acid and gallic in model of fructose –mediated protein glucation and oscidation.Journal of biotechnology. P32-316 .
- **Tanguy.M.,(2009) .**Antioxydants première partie : les antioxydants dans l'alimentation .médecine.5(6).P256-260.
- **Tabart .J.,Kevers C.,Pincemail J .,Defraingine J , Domnnest.J., (2009).** Compositioin antioxydant capacities of phénolic compounds measured by various tests. Food chemistry .113.p1226-1233.
- **Tsao et Deng., (2004).** Séparation procedure for naturally occuring antioxidant phytochemicals.Journal of chromatography B.812.p85-99.
- **Toussant.B.,(2008).** Oxygène et stress oxydants, faculté de médecine de Greenble (UFJ), université joseph. Furier.p19.
- **Ultra.B.,Singht.A.V.,Zambom.P., (2009) .**Oxidative stress and neurodegenerative diseases : a review of up Stream and down Stream antioxidant therapeutic options : curr neuropharmacol. 7.p65-74.
- **Velazquez.E.,Tournier.H.A.,Debuschiazzo.P.M.,Saavedra.G.,et Schinella.G.R.,(2003).** Antioxidant activity of paraguayen plant extractions fitoterapia.74.p91-97.



- **Waksmundzka.H.M., & Scherma.J.,(2011).**Hight performance lipid chromatography in phytochemical ience .chromatographic Science series .p477-478.

## Résumé

Les radicaux libres sont impliqués pour de nombreuses maladies , y compris le diabète sucré, l'arthrite, le cancer , le vieillissement, etc. Dans le traitement de ces maladies, la thérapie Antioxydante a gagné une grande importance. Dans cette étude on a déterminé l'efficacité antioxydante *in vitro* (de l'acide gallique, catéchine, extrait de *Thymus fontansii* et l'acide ascorbique)

A l'aide de deux méthodes différents, à savoir , un balayage des radicaux  $\alpha,\alpha$ -diphényle- $\beta$ -picrylhydrazyle (DPPH), la puissance réductrice a été déterminée en utilisant un dosage de puissance de réduction de fer/antioxydant (FRAP) en appliquant la technique de la spectrophotométrie pour la mesure.

A l'instar des résultats il s'est avéré que l'acide gallique et la vitamine C avaient des CE50 plus faibles que l'extrait de *Thymus fontansii* et la catéchine, donc leurs pouvoir antioxydant est plus puissants que les autres substances. ainsi le piégeage du DPPH était plus meilleur avec l'acide gallique ce qui exige leur consommation importante pour lutter contre plusieurs maladies.

**Mots clé :** Antioxydant, FRAP,DPPH , Radicaux libres

## الملخص

تتسبب الجذور الحرة في ظهور الكثير من الأمراض مثل داء السكري التهاب المفاصل السرطان و الشيخوخة و قد اكتسب العلاج المضاد للأكسدة أهمية بالغة في علاج مثل هذه الأمراض في هذه الدراسة لقد قمنا بتبيين الفاعلية المضادة للأكسدة (لحمض الغال كاتشين) بالإضافة الى مستخلص الزعتر و حمض الاسكوريك) استخدام طريقتين DPPH و طريقة FRAP

اظهرت النتائج ان فاعلية الحمضين الغال و الاسكوريك ان فعاليتها المضادة للأكسدة النصفية اكبر من مستخلص الزعتر و الكاتشين. هذه النتائج تشير ووضوح ان هذه المواد هي فعالة ضد الامراض واسطة الجذور الحرة.

الكلمات المفتاحية : المضادة للأكسدة – DPPH- FRAP- الجذور الحرة.