



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ ECHAHID HAMMA LAKHDAR
EL OUED

FACULTÉ DE TECHNOLOGIE

Mémoire de fin d'étude

MASTER ACADEMIQUE

Domaine: Technologie

Filière: Génie des Procédés

Spécialité: Génie chimique

Thème

*Etude de l'effet des méthodes d'extraction sur la
composition phytochimique et l'activité antioxydante
d'extrait d'*Abelmoschus esculentus**

Présenté par:

Founas louiza

Karoui radja

Devant le jury composé de :

Présidente : M^{me} Zouari Ahmed Rachida

Université d'El-oued

Examinatrice : Dr. Boubekri Cherifa

Université d'El-oued

Rapporteur : Dr. LAOUINI Salaheddine

Université d'El-oued

الملخص

جزء كبير من البحوث المهمة حاليا تعمل على دراسة الجزئيات الطبيعية المضادة للأكسدة. يكمن هدف هذه الدراسة في تأثير طريقة الاستخلاص على النشاط المضاد للأكسدة ومجموع المركبات الفينولية للقناوية. وقد استخدمنا في هذا البحث طرق و تقنيات مختلفة كمية ونوعية: طرق الاستخلاص: Soxhlet، macération، ultrason أما التقنيات فهي: HPLC، UV،

وقد كشف التحليل الكيميائي على أن طريقة الاستخلاص Soxhlet أعطت أفضل النتائج، أما الفعالية المضادة للأكسدة فقد أظهرت النتائج أن الاستخلاص بالنقع هو الأفضل ومن جهة أخرى فيما يخص فعالية الجذور «DPPH» أعطت Soxhlet نتائج جيدة بالمقارنة مع باقي الطرق.

الكلمات المفتاحية: القناوية، البوليفينول، الاستخلاص، الفعالية المضادة للأكسدة.

Résumé

L'objectif de notre travail est la contribution de l'effet de la méthode d'extraction sur la composition phytochimique et leur activité antioxydante de l'espèce *Abelmoschus esculentus*. A cet effet, nous avons utilisé des différentes méthodes et des techniques quantitative et qualitative : les méthodes d'extraction : macération, Soxhlet, ultrason et les techniques utilisées (spectrophotométrie UV-visible, chromatographie liquide à haute performance HPLC).

Les résultats obtenus pour l'analyse photochimique et le teste DPPH donnée un bon résultat à la méthode du Soxhlet, mais la méthode de macération présentent une propriété antioxydante élevée par apport les autres méthodes.

Mots clés : *abelmoschus esculentus*, polyphénols, extraction. Activité antioxydante.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

Mes remerciements vont également à mes parents Pour leurs encouragements et leur assistance aussi bien matérielle que morale pour la gentillesse et la patience qu'il a manifestées à mon égard durant ma vie.

Je ne sais comment exprimer ma gratitude à mon marie Dr.Laouini salah eddine autrement qu'en leur promettant d'agir comme eux avec des étudiants dans ma situation, si un jour l'occasion m'en est donnée.

Je remercie Pr. Touhami lanez, directeur du laboratoire de VTRS, d'université Echahide Hamma Lakhdar d'El Oued ; ainsi que Mr Tliba ali responsable du laboratoire,et demoiselle Hammami hadya pour m'avoir accueilli au sein de ces institutions, et pour les conseils stimulants que j'ai eu l'honneur de recevoir de leur part.

Dr. Boubekri cherifa et Mme.Zouari ahmed rachida ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, et je les en remercie, de même que pour leur participation au Jury de soutenance. Ils ont également contribué par leurs nombreuses remarques et suggestions à améliorer la qualité de ce mémoire, et je leur en suis très reconnaissant.

En ce qui concerne le travail, je remercie énormément ma collègue Louiza, qui m'a accompagné durant l'élaboration et surtout la rédaction de cette thèse.

Je passe ensuite une dédicace spéciale à tous mes collègues que j'ai eu le plaisir de côtoyer durant ces quelques années au laboratoire de faculté de technologie,à savoir djamila ,djihad ,karima, ouhida, hafidha, noussayba, meriem,hakima,amel.

Aussi une dédicace à mon beau père sadok et mes beau-frère hammoud et sa femme meriem , tarek et sa femme nawel, idrisset sa femme zineb ,brahim ,nidhal et mes beau sœur noura, yasmina, soumaia, maroua ,rania ,aya,amira.

Enfin, ces remerciements ne seraient pas complets sans mentionner mes sœur Asma ;Sahar ;Rania et ces enfants;Manar.et la petite Souha et mon petit frère yasine .

Radja

Liste des Tableaux

Chapitre I : Généralité sur l'Abelmoschus esculentus	
Tableau (1) : Classification phylogénétique.....	5
Tableau (2) : Valeur nutritive pour 100 g de gombo consommés.....	7
Chapitre II : Les polyphénols et l'activité antioxydante	
Tableau (3) : Principaux acides hydroxybenzoïques.....	12
Tableau (4) : Principaux acides hydroxycinnamiques.....	13
Tableau (5) : Principaux types de coumarines.....	13
Tableau(6) : Quelques exemples d'utilisation réglementée des antioxydants de synthèse.....	22
Chapitre III : Matériels et méthodes	
Chapitre VI : Résultats et discussion	
Tableau (7): Les rendements des extraits bruts.....	38
Tableau (8) : Teneurs des polyphénols totaux des extraits.....	40
Tableau (9) : Le temps de rétention, et l'équation des courbes d'étalonnage des étalons... 	41
Tableau (10) Concentration de polyphénols des extraits de fruit d'Abelmoschus esculentus	46.
Tableau (11) : La capacité antioxydant totale des extraits d'Abelmoschus esculentus.....	48
Tableau (12) : Valeurs des IC50 du DPPH pour les extraits.....	49

Liste des Figures

Chapitre I : Généralité sur l'Abelmoschus esculentus	
Figure (1) : Répartition géographique des espèces du genre Abelmoschus.....	4
Figure (2) : Le gombo : a- graines; b- plante en fleur; c- fruit.....	5
Chapitre II : Les polyphénols et l'activité antioxydante	

<i>Figure (3): Structure chimique des flavanones.....</i>	<i>14</i>
<i>Figure (4): Structures des différentes classes des flavonoïdes.....</i>	<i>17</i>
<i>Figure (5): Exemple de Structure de Tanins hydrolysables.....</i>	<i>18</i>
<i>Figure (6): Exemple de Structure de Tanins condensés.....</i>	<i>19</i>

Chapitre III : Matériels et méthodes

<i>Figure (7) : Extraction par Soxhlet.....</i>	<i>26</i>
<i>Figure(8) : Extraction par macération.....</i>	<i>27</i>
<i>Figure (9) : Extraction par ultrason.....</i>	<i>27</i>
<i>Figure (10) : Protocole d'éliminer le lipide.....</i>	<i>29</i>
<i>Figure (11) : Protocole de préparation des extraits.....</i>	<i>30</i>
<i>Figure (12) : La spectrophotométrie UV-visible.....</i>	<i>31</i>
<i>Figure (13) : Chromatographie en phase liquide à haute performance.....</i>	<i>34</i>
<i>Figure (14) : Réduction du radical libre DPPH.....</i>	<i>35</i>

Chapitre VI : Résultats et discussion

Figure (15) : Courbes d'étalonnages de l'acide gallique pour dosage des polyphénols totaux...	39
Figure (16) : Comparaison des composés phénoliques des différents extraits	40
Figure (17) : Chromatogramme du mélange des étalons	41
Figure (18) : profil chromatographique HPLC d'extrait de macération sèche1	42
Figure (19) : profil chromatographique HPLC d'extrait de macération sèche2	43
Figure (20) : profil chromatographique HPLC d'extrait d'ultrason sèche2	43
Figure (21) : profil chromatographique HPLC d'extrait d'ultrason sèche1	44
Figure (22) : profil chromatographique HPLC d'extrait Soxhlet sèche2	45
Figure (23) : profil chromatographique HPLC d'extrait Soxhlet sèche1	45
Figure (24) : Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique	47
Figure (25) : Comparaison La capacité antioxydant totale des différents extraits	48
Figure (26) : Comparaison entre ARP de différentes extraits	50
Figure (27) : Effet d'extraits Soxhlet sèche2 sur le radical DPPH	50
Figure (28) : Effet d'extraits Soxhlet Sèche1 sur le radical DPPH	51
Figure (29) : Effet d'extraits macération sèche2 sur le radical DPPH	51
Figure (30) : Effet d'extraits macération Sèche1 sur le radical DPPH	52
Figure (31) : Effet d'extraits ultrason sèche2 sur le radical DPPH	52
Figure (32) : Effet d'extraits ultrason Sèche1 sur le radical DPPH	53

Liste des abréviations

Abréviation	Désignation
BHA	Tertiobutyl hydroxyanisole
BHT	Butylhydroxytoluène
PG	gallate propylée
TBHQ	Tétrabutylhydroquinone
CAT	Capacité anioxydante totale
DPPH	1,1- diphenyl-2-pierylhydrazyl
HPLC	Chromatographie liquide de haute performance
MS	Masse sèche
pH	Degré d'acidité
UV- visible	Spectrophotométrie ultra violet

Table des matières

<i>I. Généralité sur l'Abelmoschus esculentus</i>	
Introduction.....	1
I.1 Le genre Abelmoschus esculentus.....	3
I.1.1 Historique.....	3
I.1.2 Données taxonomiques.....	3
I.2 L'espèce Abelmoschus esculentus.....	3
I.2.1 Distribution géographique et écologique.....	4
I.2.2 Classification l'espèce.....	4
I.2.3 La description botanique.....	4
I.2.4 Utilisation.....	5
I.2.4.1 Usage alimentaire.....	5
I.2.3.2 Usage médical/médicinal.....	7
I.2.3.3 Usage industriel et artisanal.....	7
I.2.4 Les exigences écologiques.....	7

I.2.4.1 Exigences climatiques.....	8
I.2.4.2 Exigences édaphiques.....	8
I.2.5 Ressources génétiques.....	8
I.2.6 Culture du gombo.....	8
I.2.6.1 Préparation sol.....	8
I.2.6.2 Semis.....	9
I.2.6.3 Fertilisation.....	9
	9
	9
	10
	10
<i>II. Les polyphénols et l'activité antioxydante</i>	
II.1 Les composés phénoliques.....	11
II.1.1 Généralités	11
II.1.2 Classification des composés phénoliques	11
II.1.2.1 Polyphénols simples.....	11
II.1.2.1.1 Acides phénoliques (C ₆ -C ₁ ou C ₆ -C ₃).....	11
II.1.2.1.2 Les flavonoïdes	14
II.1.2.1.3 Alcools phénoliques.....	17
II.1.2.2 Polyphénols complexes (tannins).....	17
II.1.2.2.1 Les tanins hydrolysables.....	18
II.1.2.2.2 Les tanins condensés.....	18
II.1.3 Rôle et intérêt des composés phénoliques	19
II.2 Activité antioxydante.....	20
II.2.1 Définition d'un radical libre	20
II.2.2 Les antioxydants	21
II.2.2.1 Définition.....	21
II.2.2.2 Utilisation des antioxydants.....	21
II.2.2.3 Classification des antioxydants	21
II.2.2.3.1 Les antioxydants synthétiques.....	21
II.2.2.3.2 Les antioxydants naturels.....	22
<i>III. Matériels et méthodes</i>	
III. Matériels et méthodes.....	24

III.1 Matériels.....	24
III.1.1 Matériels de laboratoire	24
III.1.2 Matériel végétal	24
III.1.2.1 Préparation des échantillons.....	24
III.2 Méthodes.....	25
III.2.1 Extraction	26
✓ Extraction	27
Soxhlet.....	28
✓ Extraction par macération	31
✓ Extraction par ultrason	32
III.2.4 Préparation des extraits	32
III.2.2 Techniques d'identification.....	32
III.2.2.1 La spectrophotométrie UV-visible	32
III.2.3 Dosage des composées phénoliques.....	34
III.2.3.1 Analyse qualitative	35
a) Dosage des polyphénols totaux (PPT)	
III.2.3.2 Analyse quantitative.....	
III.2.3.2.1 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	
III.2.4 Evaluation de l'activité antioxydante.....	
III.2.4.1 Activité antioxydante totale (CAT)	
III.2.4.2 Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil)	

IV. Résultats et discussion

IV. Résultats et discussion.....	38
IV.1 Rendement d'extraction des composés phénoliques.....	38
IV.2 Etude phytochimique	39
IV.2.1 Dosage des composés phénoliques par la méthode colorimétrique	39
IV.2.1.1 Dosage de polyphénols totaux	41
IV.3 Technique d'analyse chromatographique HPLC	42
IV.3.1 Chromatogrammes des étalons	46
IV.3.2 Chromatogrammes HPLC des extraits.....	47
IV.4 Evaluation de l'activité antioxydante.....	49
IV.4.1 Méthode de la Capacité anioxydante totale (CAT)	
IV.4.2 Test anti-radicalaire (Test DPPH).....	

Introduction

Au cours de la dernière décennie, une réelle prise de conscience de l'importance d'une alimentation riche en fruits et légumes est apparue, en particulier dans le cadre de la prévention des maladies métaboliques telles que les pathologies cardiovasculaires, l'obésité, le diabète, les maladies neurodégénératives, le cancer, ... Une consommation élevée de fruits et légumes a pu être associée à la diminution du risque de ces maladies dans de nombreuses études épidémiologiques. De multiples constituants et micronutriments de ces aliments tels que les fibres, les vitamines, les minéraux et les polyphénols jouent potentiellement un rôle dans cet effet protecteur. [1]

Les substances naturelles et les plantes en particulier représentent une immense source des composés phénoliques (acide phénolique, flavonoïdes, flavonols, tannin condensé...), l'extraction bruts, naturels de ces composés et l'isolation à partir d'espèces de plantes utilisées en médecine traditionnelle peuvent être des ressources prolifiques de nouveaux médicaments. [2]

Aujourd'hui, les agents antioxydants de source naturelle ont suscités un intérêt particulier car ils peuvent protéger le corps humain contre les maladies causées par les radicaux libres avec sans effets secondaires; ceci est contraire aux agents antioxydants synthétiques.

Les polyphénols sont l'un des plus important groupe de composés présents dans les plantes, ils sont signalés présentent une activité antioxydant remarquable et jouent un rôle d'inhibiteur des radicaux libres.[2]

Dans ce contexte, que notre travail va s'inscrire vu l'implication de notre Laboratoire, dans cet axe de recherche consacré principalement l'étude phytochimique et à L'évaluation de l'activité biologique des plantes.

L'objectif du notre travail est basé sur l'obtention des meilleurs méthodes d'extraction des composées phénoliques du (*Abelmoschus esculentus* L) à partir des différentes méthodes d'extraction et l'évaluation de leurs activités anti-oxydantes.

Notre travail se répartit donc comme suit :

- Etude botanique de la plante « *Abelmoschus esculentus*» (classification, description, et utilisation,
- Etude chimique impliquant la définition, la structure, la classification, et l'activité biologique des extraits phénoliques.
- Extraction des polyphénols contenus dans la matière végétale.

- Analyse des extraits par les méthodes colorimétriques et chromatographie liquide de haute performance (HPLC).
- Evaluation de l'activité antioxydante de nos extraits par deux méthodes, la capacité antioxydante totale et le piégeage du radical libre DPPH.

I. Généralités sur l'Abelmoschus esculentus

I.1 Le genre *Abelmoschus esculentus*

I.1.1 Historique

Originnaire du Sud-Est asiatique, le genre *Abelmoschus* est un complexe multi spécifique dont la structure est encore mal comprise.

Il fut défini au sein de la famille des Malvacées par le botaniste allemand Friedrich Medikus à la fin du XVIIème siècle. Pendant longtemps le gombo fut rattaché au genre *HibUcus*. C'est en 1924 que Hochreutiner proposa d'en faire un genre à part entière. Mais il se heurta à ses pairs qui estimaient qu'il n'y avait pas d'éléments pertinents pour l'accepter. Il a fallu attendre jusqu'en 1973-1974, avec Biswas, Terrel et Winters, pour que les derniers éléments de polémique soient dissipés. La distinction reconnue est basée sur les caractéristiques du calice : spatiforme, le calice à cinq dents courtes est soudé à la corolle et est caduc après la floraison.

Tandis que Hochreutiner organisait le genre en quatorze espèces, Borssum Waalkes en 1966 proposa une classification ne s'articulant qu'autour de six espèces, trois étant plus ou moins cultivées (*A. esculentus*, *A. manihot* et *A. moschatus*). Les trois autres sont strictement spontanées (*A. crinitus*, *A. angulos* et *A. fieulneus*). En 1968, Bates proposa quelques modifications dont le passage de la sous-espèce *A. moschatus* spp. *tuberosus* au rang d'espèce sous le nom de *A. rugosus*. A cet ensemble, il faut ajouter une espèce cultivée africaine mise en évidence par Chevalier en 1940, redécouverte par Siemonsma en 1982 et décrite sous le nom de *A. caillei* par Stevels en 1988 et 1990[3].

I.1.2 Données taxonomiques

Le genre *Abelmoschus* appartient à la famille des Malvacées, laquelle comprend environ 1500 espèces surtout intertropicales. C'est une famille très facile à reconnaître par sa fleur qui a un aspect typique dû :

- ✓ à cinq pétales à préfloraison tordue (chaque pétale est à la fois recouvert et recouvrant).
- ✓ aux nombreuses étamines soudées en un tube.

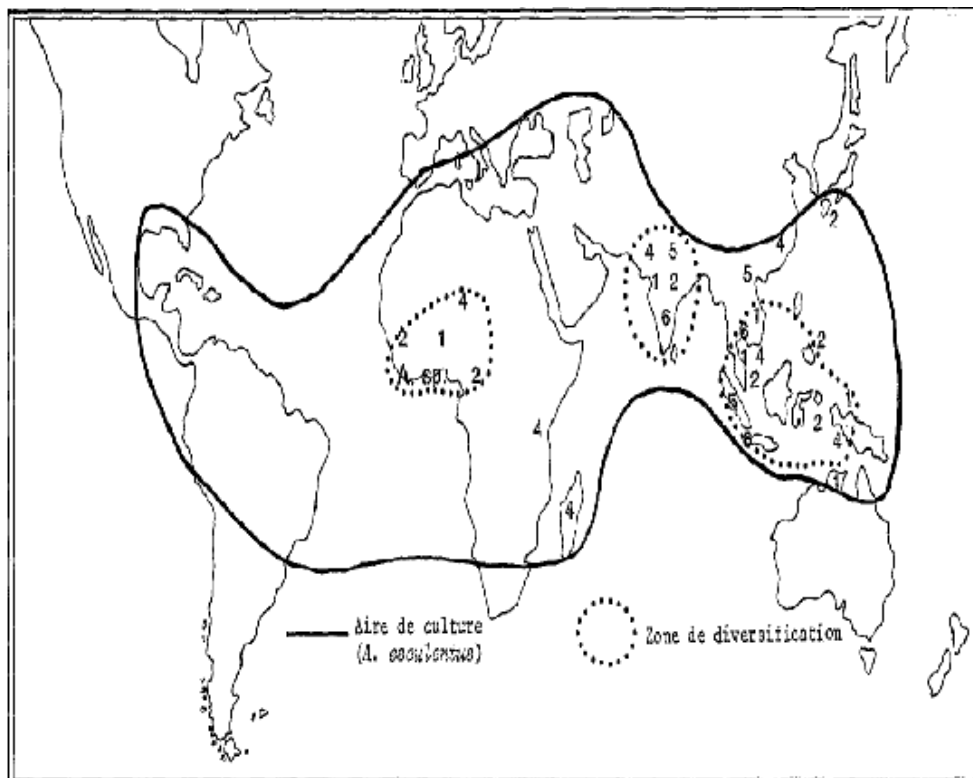
Se distinguant par les caractéristiques du calice, le genre *Abelmoschus* est constitué d'une série polyploïde dont l'organisation n'est pas aisée à saisir. On peut cependant distinguer

trois niveaux de ploïdie. Un premier ensemble d'espèces possèdent des nombres chromosomiques de base. Le deuxième niveau comprend les polyploïdes issus directement des génomes de base. Le dernier niveau comprend les Gombos de type " Guinéen" d'Afrique Occidentale [3] [4].

I.2 L'espèce *Abelmoschus esculentus*

I.2.1 Distribution géographique et écologique

L'espèce *Abelmoschus esculentus* est cultivée comme légume dans la plupart des régions méditerranéennes, tropicales, et subtropicales d'Afrique, d'Inde et d'Amérique. En Afrique de l'Ouest, montré sa préférence pour la zone soudano-sahélienne. Néanmoins, on trouve aussi *Abelmoschus esculentus* dans les régions forestières en moindre quantité. Il s'agit d'une adaptation écologique liée à la réponse photopériodique et au parasitisme. Dans ces régions, il occupe une place importante dans l'alimentation. Il est cultivé surtout pour ses fruits immatures qui sont consommés après cuisson. Dans certaines régions, les feuilles de gombo sont utilisées comme l'équivalent d'épinards [3].



Légende : 1 *A. moschatus* 2 *A. manihot* 4 *A. ficulneus*
5 *A. crinitus* 6 *A. angulosus* *A. sp.* Type Guinéen

Figure (1) : Répartition géographique des espèces du genre *Abelmoschus*.

I.2.2 Classification d'espèce

L'espèce cultivée *Abelmoschus esculentus* L. porte des noms différents selon les pays : Okra ou Lady's finger en anglais, Gombo en français, Quingombo en espagnol, Bhindi en hindi, Quiabero au Brésil et Bamiah en arabe. Les jeunes fruits produits par cette espèce sont utilisés comme légume. On récolte les fruits immatures de 3 à 6 cm de long, dont les fibres ne sont pas encore différenciées et dont les graines sont en cours de formation [5].

Tableau (1) : Classification phylogénétique.

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Dilleniidae
Ordre	Malvales
Famille	Malvaceae
Genre	<i>Abelmoschus</i>
Espèce	<i>Abelmoschus esculentus</i> L

I.2.3. La description botanique

L'*Abelmoschus esculentus* (L.) est une herbacée annuelle dressée ou ligneuse à la base pouvant atteindre 3 m à 4 m de hauteur, non ramifiée avec un système racinaire bien développé. Les axes portant une pilosité hispide éparses, de 0,2-1,4 mm.

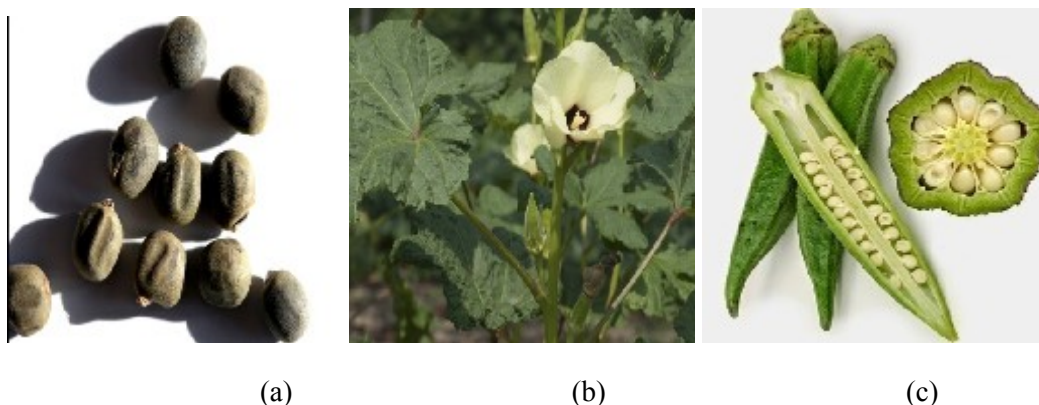


Figure (2) : Le gombo : a- graines; b- plante en fleur; c- fruit.

A-La tige :

La tige principale de *Abelmoschus esculentus* est cylindrique, de couleur pourpre ou verte, glabre ou légèrement pubescente et peut atteindre une hauteur de 1,5 à plus de 3

m. Elle se lignifie après un certain temps et présente des ramifications latérales plus ou moins importantes suivant les variétés.

b- Les feuilles :

Disposées en spirale, simples stipulées, présentant un limbe le plus souvent palmatilobé à palmatipartite en trois ou sept segments, les feuilles de gombo sont de couleur verte à rouge.

c- Les racines :

A. esculentus a un système racinaire relativement important qui permet de fixer la plante profondément dans le sol. Il est constitué d'une racine pivotante d'où se développent de nombreuses racines secondaires.

d- Les fleurs :

Les fleurs de gombo, comme celles de la plupart des Malvacées, sont éphémères, hermaphrodites, axillaires, solitaires et de grandes dimensions. Elles sont de couleur crème, jaune ou jaune d'or avec une coloration rouge à la base des cinq pétales libres. L'anthèse se produit très tôt dans la matinée. A l'aube, les fleurs sont épanouies. Elles demeurent ouvertes toute la matinée et se referment dans le milieu de l'après-midi. Elles sont fanées le soir et les pétales tombent dès le lendemain.

e- Le fruit :

Le fruit est une capsule érigée, cylindrique, fusiforme, de section ronde (fruit lisse) ou anguleuse. De coloration variable (vert à rouge), les fruits peuvent être duveteux, légèrement rugueux ou épineux. Ils sont récoltés frais quelques jours après la floraison. En effet, la croissance du fruit est maximale la première semaine. Au-delà, il se lignifie et devient impropre à la consommation. A maturité, les fruits deviennent fibreux et s'ils ne restent pas complètement fermés, s'ouvrent par des fentes longitudinales.

f- Les graines :

De forme globuleuse à ovoïde, glabres ou duveteuses, les graines de gombo sont assez grosses et de couleur grise. Conservées dans les conditions favorables, elles peuvent conserver leur pouvoir germinatif durant deux ans et même plus [4].

Tableau (2) : Valeur nutritive pour 100 g de gombo consommés. [4]

Elément nutritifs	Organes	
	Fruit	Feuilles
Matière sèche (g)	10.4	10
Energie (Kcal)	31.00	33.00
Protéines (g)	1.80	2.00
Calcium (mg)	90.00	70.00
Fer (mg)	1.00	1.00
Carotène (mg)	0.10	0.99
Thiamine (mg)	0.07	0.10
Riboflavine (mg)	0.08	0.10
Niacine (mg)	0.80	1.00
Vitamine C (mg)	18.00	25.00

I.2.4 Utilisation

I.2.4.1 Usage alimentaire

Le fruit contient une substance mucilagineuse (de texture gélatineuse) utile pour épaissir soupes et ragoûts. On conseille généralement de choisir des gombos bien colorés de moins de 10 cm de long afin qu'ils ne soient pas durs ^[réf. nécessaire]. Le gombo se mange cru ou cuit et il fait partie de nombreux plats créoles, africains ou japonais. Il entre notamment dans la fabrication du calalou antillais.

Il se marie bien avec la tomate, l'oignon, l'igname, le poivron ainsi qu'avec le curry, la coriandre, l'origan, le citron, le vinaigre et d'autres épices comme le ras el hanout. Il est fréquemment utilisé dans la cuisine méditerranéenne, et notamment les cuisines grecque et chypriote.

Il est également la base du gombo : soupe cadienne typique de Louisiane , dans laquelle le fond est constitué de mélange de céleri, poivron vert et oignon que l'on fait revenir avec les gombos coupés en rondelles. D'autres préparations typiques du Sud des États-Unis sont les gombos braisés à la tomate et les rondelles de gombo frites.

Il est également utilisé dans des sauces avec de la viande blanche ou du poulet. Fragile, le gombo se conserve deux à trois jours au réfrigérateur dans un sac de papier.

Séché, il peut se conserver pendant plusieurs mois. Les graines mûres, grillées, peuvent être utilisées en guise de café . Le gombo est une spécialité de la Côte d'Ivoire où il est souvent utilisé en sauce sur du riz blanc. Au Sénégal, le gombo est l'ingrédient de base de la soupe kandia. Les jeunes feuilles peuvent être consommées comme des épinards ; elles sont parfois données au bétail comme fourrage.

I.2.4.2 Usage médical/médicinal

Le mucilage du gombo a été utilisé pour accroître le volume sanguin. Les feuilles servent parfois de cataplasmes et sont utilisées pour leurs propriétés émollientes et sudorifiques, et dans le traitement de la dysurie.

I.2.4.3 Usage industriel et artisanal

Le même mucilage est utilisé dans la fabrication de papier glacé, comme agent de collage, ainsi que pour la fabrication de confiseries. Les fibres de l'écorce peuvent être utilisées localement pour la confection de cordelette, de papier et de carton [6].

I.2.5 Les exigences écologiques

I.2.5.1 Exigences climatiques

Le gombo est une espèce bien adaptée aux climats chauds et humides. Il est sensible à la sécheresse mais cette sensibilité varie suivant les phases du cycle. Sawadogo et al. (2006) ont montré que l'effet du stress hydrique en phase de bétonisation est très néfaste pour le gombo et se manifeste par une baisse des composantes du rendement.

Cependant, un arrosage artificiel peut permettre au gombo de satisfaire ses besoins en eau et en sels minéraux. En climat sahélien, les besoins en eau du gombo au cours d'un cycle cultural complet sont de l'ordre de 780 à 1000 mm .

A. esculentus ne supporte pas des températures nocturnes trop basses. Il nécessite des températures supérieures à 20°C pour avoir une croissance normale. L'initiation florale et la floraison sont retardées à mesure que la température s'élève. Par contre, Nana (2005) a rapporté que les meilleurs rendements sont obtenus en période chaude.

Le gombo est une plante photopériodique. C'est une plante à jours courts. Cependant, sa large répartition géographique (jusqu'à des latitudes de 35-40°) indique qu'il y a des différences marquées entre cultivars à cet égard [3].

I.2.5.2 Exigences édaphiques

Le gombo tolère une grande diversité de sols. Cependant, il préfère les sols profonds, limono-sableux, bien drainés et riches en matières organiques. Le pH optimal pour la culture du gombo varie de 6,2 à 6,5. [5].

I.2.6 Ressources génétiques

Les variétés locales d'Afrique ne courent pas pour le moment un grand risque d'érosion génétique. Seuls les producteurs commerciaux ont tendance à passer à des cultivars commerciaux de gombo commun, tandis que les variétés locales des deux espèces sont généralisées en agriculture de subsistance.

Des études récentes sur la cytogénétique des gombos sont rares. Le nombre élevé de chromosomes des espèces cultivées les rendent particulièrement délicates [5].

I.2.7 Culture du gombo

La culture sur buttes est largement pratiquée. Ce système a l'avantage, sur les sols pauvres, de concentrer dans les buttes, la matière organique de la couche superficielle. On rencontre généralement le gombo en "culture de case", en association avec une culture annuelle (mil, sorgho, ignames, riz, etc.) et plus rarement en culture de maraîchage autour des grandes agglomérations (Koechlin, 1989). La culture du gombo respecte une suite logique d'opérations.

I.2.7.1 Préparation sol

Elle est effectuée en vue de préparer le lit de semence à travers soit le labour simple, soit le labour suivi du buttage. Cela va contribuer à l'ameublissement du sol, ce qui va faciliter ainsi le mouvement de l'eau et de l'air dans le sol.

I.2.7.2 Semis

Le semis est fait sur billon ou sur planche. Il s'effectue à raison de 7 à 10 kilos de semences à l'hectare, à raison de 3 à 4 graines par poquet. Les écartements pratiqués sont de 20 cm à 40 sur la ligne et de 50 cm à 60 entre les lignes. Dans les régions à saison des pluies très prononcée, on conseille de semer en début de la saison des pluies. De même, Fondio et al. (2003) soutiennent que, dans le Centre de la Côte d'Ivoire, la période du 15 mai au 14 juin est la mieux indiquée pour le semis du gombo.

I.2.7.3 Fertilisation

Bien que la fertilisation soit rarement pratiquée, il est recommandé d'appliquer un engrais organique (10 tonnes par hectare) avant le semis, puis de réaliser un apport d'urée (150 kilos par hectare) et de chlorure de potassium (150 kilos par hectare) en deux ou trois applications. L'apport de fumure minérale devra être fractionné et leurs applications intervenir 30, 50 et 70 jours après semis en fonction de la longueur du cycle végétatif de la plante [7].

***II.Polyphénols et
l'activité
antioxydantes***

II.1 Les composés phénoliques

II.1.1 Généralités

Les composés phénoliques également dénommés les polyphénols, sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance ou la reproduction [8]. Ils constituent un des groupes les plus nombreux et largement distribué des substances dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connues [9].

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La structure des composés Phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tannins condensés). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées [10].

Les composés phénoliques participent activement aux interactions de la plante avec son environnement en jouant soit le rôle des signaux de reconnaissance entre les plantes, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel [9].

II.1.2 Classification des composés phénoliques :

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. On peut distinguer deux catégories : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes [11].

II.1.2.1 Polyphénols simples

II.1.2.1.1 Acides phénoliques (C₆-C₁ ou C₆-C₃)

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes distincts qui sont les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques [1].

➤ *Acides hydroxybenzoïques (C₆-C₁)*

Sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure générale de base de type (C₆-C₁). Ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides [12]. Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans le tableau suivant :

Tableau (3): Principaux acides hydroxybenzoïques[9]

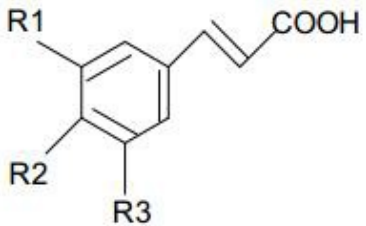
Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p-hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechine
	H	OCH ₃	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	H	Acide gallique
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

➤ *Acide hydroxycinnamique (C₆-C₃)*

Ces composés ont une distribution très large. Rarement libres, ils sont souvent estérifiés et peuvent également être amidifiés ou combinés avec des sucres (O-acylglucosides, O-arylglucosides) ou des polyols tels que l'acide quinique. [1]

L'acide caféique est le principal représentant de cette catégorie. Il est présent dans de nombreux végétaux (graine de café, tomate, olive, pomme), en particulier dans les fruits. Il représente 75 à 100% de la teneur totale en acides hydroxycinnamiques de la majorité des fruits, principalement sous forme d'ester de l'acide quinique (acide chlorogénique). L'acide chlorogénique est présent en très forte concentration dans la pomme (430 mg/kg) et dans le café, une seule tasse peut en contenir de 70 à 350 mg [11].

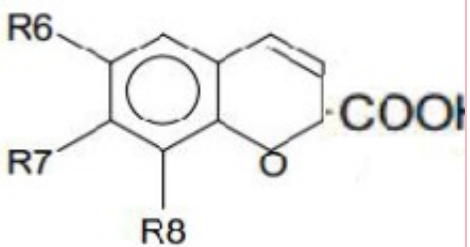
Tableau (4) : Principaux acides hydroxycinnamiques. [9]

Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	H	OH	Acid p-coumarine
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH ₃		H	Acide férulique
	OH			
OCH ₃				Acide sinapique
OH		OCH ₃		

➤ **Coumarines**

Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale. Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique. [13]

Tableau (5) : Principaux types de coumarines. [9]

Structure	R	R7	R8	Acides phénoliques
	6			
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OC	OH	H	Scopolétole
	H ₃			
OC	OH	OH	Fraxétole	
H ₃				
H	OH	OH	Daphnétole	

II.1.2.1.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. On les trouve dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastides particuliers, le chromoplastes. Le terme flavonoïde regroupe une très large gamme de composés naturels polyphénoliques. On dénombre près de 6500 flavonoïdes répartis en 12 classes et leur nombre ne cesse d'accroître. Par définition, les flavonoïdes sont des composés qui ont en commun la structure du diphenylpropane ($C_6-C_3-C_6$) ; les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C.

Leur fonction principale semble être la coloration des plantes (au-delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bêtaïnes), même si leur présence est parfois masquée par leur présence sous forme "leuco", ce qui explique leur intérêt commercial dans l'industrie alimentaire [14].

Il existe plusieurs classes de flavonoïdes, dont les principales sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines. La structure de base de ces différents flavonoïdes peut subir de nombreuses substitutions, les groupements hydroxyles étant généralement en positions. Sous forme de glycosides [9].

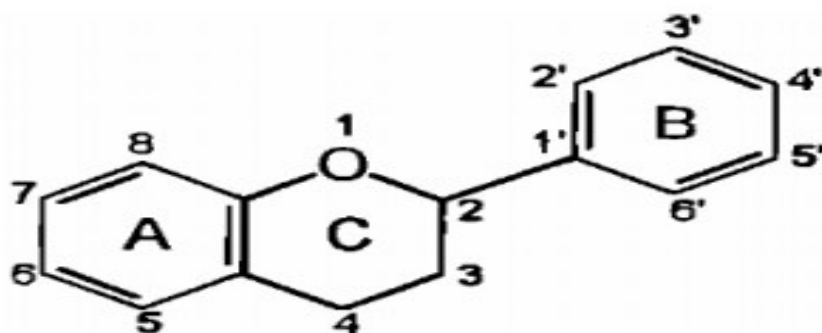


Figure (3): Structure chimique des flavanones [9].

➤ Les flavanones

Les flavanones sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2,3 et la présence d'un centre chiral en position 2. Elles sont synthétisées à partir des chalcones, par une chalcone isomérase sous forme de 2*S*-flavanones, cette réaction s'effectue spontanément en milieu alcalin. Il semblerait que seuls les stéréo-isomères 2*S* sont biologiquement actifs.

Environ 350 flavanones aglycones et une centaine de flavanones glycosylées sont décrites dans de nombreuses familles, en particulier les Asteraceae, les Leguminoseae et les Rutaceae. Beaucoup de flavanones aglycones sont retrouvées à l'état libre dans les écorces, les racines, les écorces de racine, en particulier chez les Leguminoseae. La majorité des flavanones glycosylés sont des Oglycosides[2].

➤ **Flavonols**

Les flavonols sont caractérisés par la présence d'une double liaison en position 2-3 et d'un groupement hydroxyle en C3. Elles sont les flavonoïdes les plus répandus dans le règne végétal, leur couleur varie du blanc au jaune, elles sont essentiellement représentés par la quercétine, le kaempférol et la myricétine. Les flavonols qui s'accumulent dans les tissus végétaux sont presque toujours sous la forme conjugués glycosylés [1].

➤ **Flavan-3ols**

Les flavan-3-ols ou dérivés de catéchine sont la catégorie de flavonoïdes la plus complexe. De plus, les flavan3-ols peuvent être estérifiés par l'acide gallique ou hydroxylés pour former les gallocatéchines (épicatéchine gallate, épigallocatéchine, épigallocatéchine gallate). Les catéchines sont présentes dans le chocolat (jusqu'à 132,4 mg/kg de matière fraîche de chocolat noir), le thé (jusqu'à 120 mg du thé noir de Chine) et dans les fruits comme l'abricot [9].

➤ **Flavones**

Dérivent des flavanones par une oxydation qui introduit une seconde double liaison dans l'hétérocycle. Dans plus de 90%, le cycle A est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C5 et C7. Par exemple : Glucoside d'épigénies chez le blé et la tricine chez le blé [9].

➤ **Isoflavones**

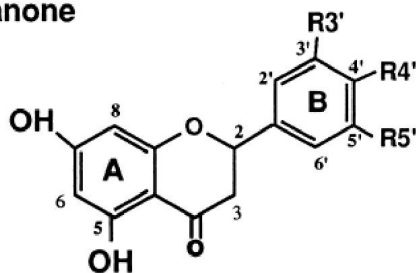
Les isoflavones sont considérées comme des dérivés des flavones, elles représentent une sous-classe importante et très distinctive des flavonoïdes. Contrairement à la plupart des autres flavonoïdes, les isoflavones sont caractérisées par la présence d'un cycle B fixé à C₃ plutôt que la position C₂. Ils ont une distribution très limitée dans le règne végétal [1].

➤ *Anthocyanidines*

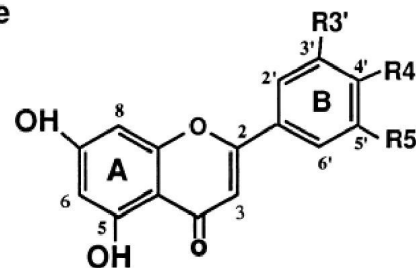
Ce sont des pigments, principalement sous formes de glycosides stables et hydrosolubles, rouges en milieu acide, virant au bleu-violet en milieu neutre ou faiblement alcalin. Les composés les plus courants sont la pélagonidine, la cyanidine et la malvidine.

Ils sont présents dans le vin rouge (340-420 mg de malvidine 3-O-glucoside/L). De nombreux glucosides de cyanidine et deux dérivés de pélagonidine ont aussi été caractérisés dans l'oignon rouge [11].

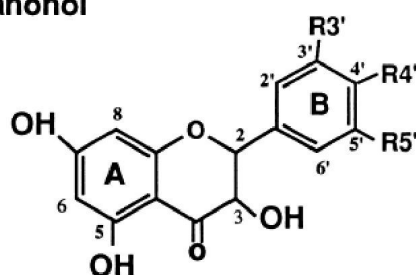
flavanone



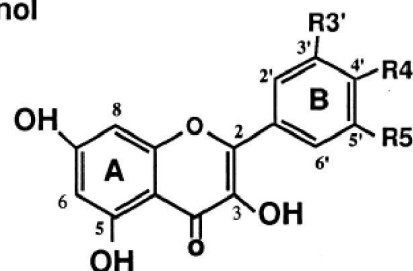
flavone



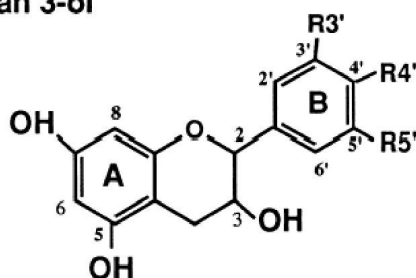
flavanonol



flavonol



flavan 3-ol



isoflavone

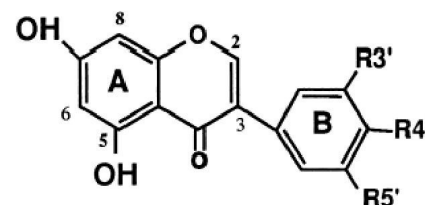


Figure (4) : Structures des différentes classes des flavonoïdes.

II.1.2.1.3 Alcools phénoliques

Un alcool phénolique est un composé organique possédant au moins un alcool aliphatique et un hydroxyle phénolique. Le tyrosol (4-hydroxyphenylethanol) et hydroxytyrosol (3,4dihydroxyphenylethanol) sont les principales molécules de cette classe. Ces composés sont très abondants dans l'olive (fruit et feuille), libres ou associés à l'acide élénolique [11].

II.1.2.2 Polyphénols complexes (tannins)

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structures variées, ayant en

Commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de rendre imputrescible. Ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant. Très répandu dans le règne végétal ils peuvent exister dans divers organes, mais on note une accumulation plus particulièrement dans les tissus âgés ou d'origine pathologique. Ils sont localisés dans les vacuoles, quelques fois combinés aux protéines et aux alcaloïdes. On distingue : les tannins hydrolysables et les tannins condensés [1].

Les tannins sont largement répandus dans les organismes végétaux et plus particulièrement dans les fruits, les graines de céréales et diverses boissons. Dans l'alimentation humaine, les sources les plus importantes de tannins sont le vin et le thé [1].

II.1.2.2.1 Les tannins hydrolysables

Ces tannins sont des dimères d'acide gallique condensés sur un dérivé glycosyle, Ils comprennent l'acide gallique et les produits de condensation de son dimère, l'acide hexahydroxydiphénique. Comme leur nom l'indique, ces tannins subissent facilement une hydrolyse acide et basique, ils s'hydrolysent sous l'action enzymatique et de l'eau chaude[2].

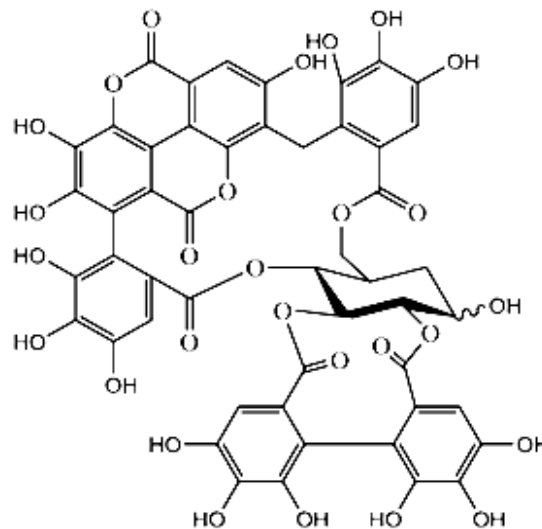


Figure (5). Exemple de Structure de Tannins hydrolysables. [15]

II.1.2.2.2 Les tannins condensés

Appelés aussi proanthocyanidines ou procyanidines, les tannins condensés, sont des polyphénols de masse molaire élevées. Ils résultent de la polymérisation auto oxydative ou enzymatique des unités de flavan-3,4-diol liées majoritairement par les liaisons C₄-C₈ (parfois C₄-C₆) des unités adjacentes, et se nomment ainsi pro anthocyanidines de type B. Lorsque la condensation se produit entre les unités adjacentes par la liaison C₄-C₈ et par une liaison d'éther additionnelle entre C₂ et C₇, les proanthocyanidines sont dits de types A W. Ci-dessus est représenté le modèle de structure d'un tannin de type B. [14]

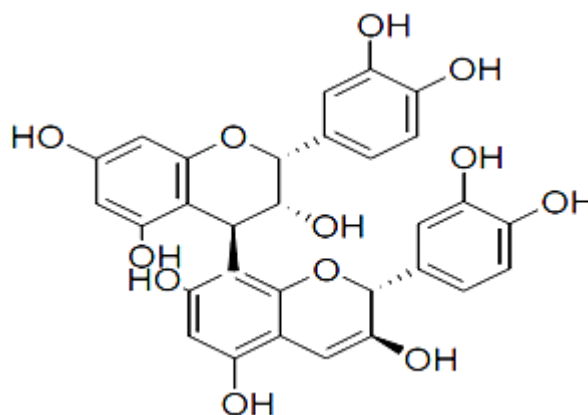


Figure (6). Exemple de Structure de Tanins condensés. [15]

II.1.3 Rôle et intérêt des composés phénoliques

Le rôle des composés phénoliques est maintenant reconnu dans différents aspects de la vie de la plante et dans l'utilisation que fait l'homme des végétaux. Ils peuvent en effet intervenir :

- Dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites...).
- Dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV), soit directement dans la nature soit lors de la conservation après récolte de certains végétaux.
- Dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles...) qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux (fruits, légumes, tubercules...) et des produits qui en dérivent par transformation.

- Dans les variations de certaines caractéristiques des végétaux lors des traitements technologiques (préparation des jus de fruits, des boissons fermentent...) pendant lesquels apparaissent fréquemment des brunissements enzymatiques qui modifient la qualité du produit fini.
- Dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes[13].

II.2 Activité antioxydante

La protection contre les effets délétères induits par les radicaux oxygénés s'effectue à l'aide de trois types d'agents différents : les protéines non enzymatiques, Les enzymes tels que les superoxyde-dismutases et les glutathion-peroxydases et enfin les antioxydants d'origine nutritionnelle tels que les caroténoïdes, les tocophérols (vitamine E), l'acide ascorbique (vitamine C) et les polyphénols qui sont des antioxydants essentiels pour l'homme [15].

II.2.1 Définition d'un radical libre

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique [9].

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux libres primaires, qui dérivent directement de l'oxygène. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires (radical peroxyde ROO•, radical alkoxy RO•), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule.

L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène" (**ROS**). Cette appellation n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical superoxyde O₂•, radical hydroxyl OH•, monoxyde d'azote NO•, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité

est importante : l'oxygène singulet $1O_2$, peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , peroxyde d'azote $ONOO^-$ [12].

II.2.2 Les antioxydants

La production de radicaux libres est contrebalancée par des systèmes antioxydants assurant le maintien de l'état biologique. De nombreuses situations peuvent cependant entraîner l'apparition en excès de ces espèces chimiques. Les agents anti-radicalaires sont des capteurs de radicaux qui agissent avec eux plus vite que ne ferait le substrat à protéger ou interrompent les chaînes de réaction radicalaires [15].

II.2.2.1 Définition

Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. Il est défini par HALLIWELL comme « toute substance qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat ». C'est une molécule qui est capable de neutraliser les formes actives de l'oxygène et permet de maintenir au niveau de la cellule et de l'organisme des niveaux non cytotoxiques de radicaux libres [16].

II.2.2.2 Utilisation des antioxydants

- ✓ Dans l'industrie chimique : pour éviter le durcissement du caoutchouc ou en métallurgie pour protéger les métaux de l'oxydation.
- ✓ Dans l'industrie agro-alimentaire : pour éviter le rancissement des corps gras.
- ✓ Dans l'industrie teinturerie : pour éviter l'oxydation des colorants au soufre ou des

Colorants de cuve lors de la teinture [16].

II.2.2.3 Classification des antioxydants

II.2.2.3.1 Les antioxydants synthétiques

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT) gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matière de substitution d'après des sources

naturelles comme antioxydants de la nourriture. Cependant, il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques. En effet, le BHA convertirait certains produits ingérés en substances toxiques ou carcinogènes en augmentant la sécrétion des enzymes microsomales du foie et des organes extra-hépatiques. Le BHT présenterait des effets carcinogènes chez le rat [15].

Tableau (6) : Quelques exemples d'utilisation réglementée des antioxydants de synthèse
[9].

Nature de l'aliment	Antioxydant	Concentration maximale (ppm)
Saindoux, graisse de boeuf, de volaille et de mouton, huile de poisson	Gallates et BHA seuls ou en mélange	200
	BHT	100
Compléments alimentaires	Gallates, BHT et BHA	400
Soupes et viandes déshydratées, lait en poudre	Gallate et BHA seuls ou en mélange	200

II.2.2.3.2 Les antioxydants naturels

Les antioxydants naturels sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures. Elles incluent le bêta carotène, l'albumine, les vitamines (E, C, P.), les composés phénoliques [9].

➤ **Vitamine C** : Acide ascorbique

La Vit C contient une forme énediol qui produit la forme di cétonique par transferts successifs de ses deux atomes d'H. La forme énediol est régénérée par l'intervention d'enzyme superoxyde dismutase en présence d'une catalase.

On trouve la vitamine C dans les légumes, les choux, le poivron, le persil, les agrumes et le kiwi. Elle joue un rôle important dans la régénération du vit E [14].

➤ **La vitamine E** :

La vitamine E est un antioxydant majeur liposoluble. C'est un composé amphiphile, capable de s'insérer dans les membranes cellulaires : globules rouges, cellules

endothéliales, cellules musculaires, neurones (c'est le seul antioxydant du système nerveux central) [13].

➤ Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont, avec la chlorophylle et les anthocyanes, les pigments les plus répandus dans la nature. A ce jour, plus de 600 caroténoïdes ont été identifiés, mais seule une quarantaine est retrouvée régulièrement dans l'alimentation humaine. Une trentaine de caroténoïdes et de leurs métabolites a été identifiée dans le plasma et les tissus humains, mais 6 caroténoïdes sont majoritaires : le β -carotène, le lycopène, la lutéine, la β -cryptoxanthine, l' α -Carotène, et la zéaxanthine [16].

III. Matériels et méthodes

III. Matériels et méthodes

Notre travail a été réalisé au niveau de laboratoire de valorisation et technologie des ressources sahariennes (VTRS) d'université Echahide Hamma Lakhdar d'El Oued.

III.1 Matériels

III.1.1 Matériels de laboratoire

➤ **Appareillage et Produit chimiques**

Appareillage
<ul style="list-style-type: none"> • UV spectrophotomètre (UV-1800 SHIMADZU). • Un chromatographe liquide haute performance HPLC (SHIMADZU type HPLC-RP-C18). • Ultrason – H (J.P.SELECTA, s.a). • Evaporateur rotatif (Rotavapor BUCHI Heating bath R-210). • Etuve (Mommert, Beschickung-Loadig Modell 100-800). • Balance analytique (Shanghai Sunrise Instrument précision 0.001g).
Produit chimique
<ul style="list-style-type: none"> • Acide gallique 99% (C₇H₆O₅) Production par (PROLABO). • DPPH 95% (C₁₈H₁₂ N₅O₆) Production par (ALFA AESAR). • Carbonate de sodium(Na₂CO₃) Production par (BIOCHEM Chemopharma) . • Ethanol 96% (CH₃-CH₂-OH) Production par (SIGMA- ALDRICH). • méthanol 99% (CH₃-OH) Production par (BIOCHEM Chemopharma). • Acide acétique 99% (CH₃-COOH) Production par (BIOCHEM Chemopharma). • Réactif Folin Ciocalteu (3H₂O, P₂O₅, 13WO₃, 5MoO₃, 10H₂O) Production par (PROLABO).

III.1.2 Matériel végétal

III.1.2.1 Préparation des échantillons

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué deux échantillons des fruits de la plante *Abelmoschus esculentus*, les échantillons récoltées au mois de Novembre de 2015 dans un village de Guemar à région d'El Oued. Un échantillon des fruits sont

nettoyés puis mis à sécher à température ambiante et à l'abri de la lumière solaire pendant 1 mois nommé « sèche1 », la deuxième récoltés après sécher pour la lumière du solaire et à température ambiante nommé « sèche2 ». Afin de préserver au maximum l'intégrité de sa composition chimique.

III.2 Méthodes

III.2.1 Extraction

L'extraction est une étape très importante avant l'analyse quantitative et qualitative proprement dite. Elle est influencée par la méthode d'extraction choisie en fonction des composés phytochimiques à étudier. D'autres facteurs, comme le pH, la température, le rapport quantité de matière au volume du solvant, les intervalles de temps, le nombre et les étapes d'extractions individuelles, jouent également un rôle important dans cette procédure. Des étapes supplémentaires de purification des échantillons peuvent être nécessaires en vue d'éliminer des composés tels que les cires, les graisses, les terpènes et les chlorophylles, pour l'analyse des composés phénoliques et polyphénolique, l'extraction liquide - liquide et/ou solide-liquide sont les procédures les plus couramment utilisées.

En effet, ces techniques sont faciles d'utilisation, très efficaces et peuvent être largement appliquées. Les solvants d'extractions les plus communément utilisés sont les alcools (méthanol, éthanol), l'acétone, l'éther éthylique et l'acétate d'éthyle. Cependant, pour les composés très polaires tel que les acides phénoliques (benzoïque, cinnamique) ne pouvant être extraits complètement avec les solvants organiques purs les mélanges d'alcool - eau ou acétone-eau sont recommandés [2]. Les solvants moins polaires (dichlorométhane (DCM), chloroforme, hexane, benzène) sont utilisés pour éliminer les composés apolaires (cires, huiles, stérols, chlorophylle...). Les extractions sont répétées deux à trois fois et les extraits sont ensuite combinés. Dans notre travail en utilise trois méthode d'extraction : soxhlet, macération et ultrason [2].

✓ Extraction par Soxhlet

Il s'agit d'une extraction solide liquide. L'extracteur de Soxhlet permet le traitement des solides de toutes tailles, avec des solvants en phase liquide ou partiellement vaporisés. Le corps de l'extracteur (Soxhlet), contenant un support de cartouche et qui remplit de solide, est fixé sur un réservoir de solvant (ballon) et est surmonté d'un réfrigérant. Les solvant sont vaporisés puis condensé, et reste en contact avec le solide. La solution est soutirée périodiquement par l'amorçage d'un siphon. La solution du ballon

s'enrichit petit à petit en soluté et le solide est toujours mis en contact avec du solvant fraîchement distillé [2].

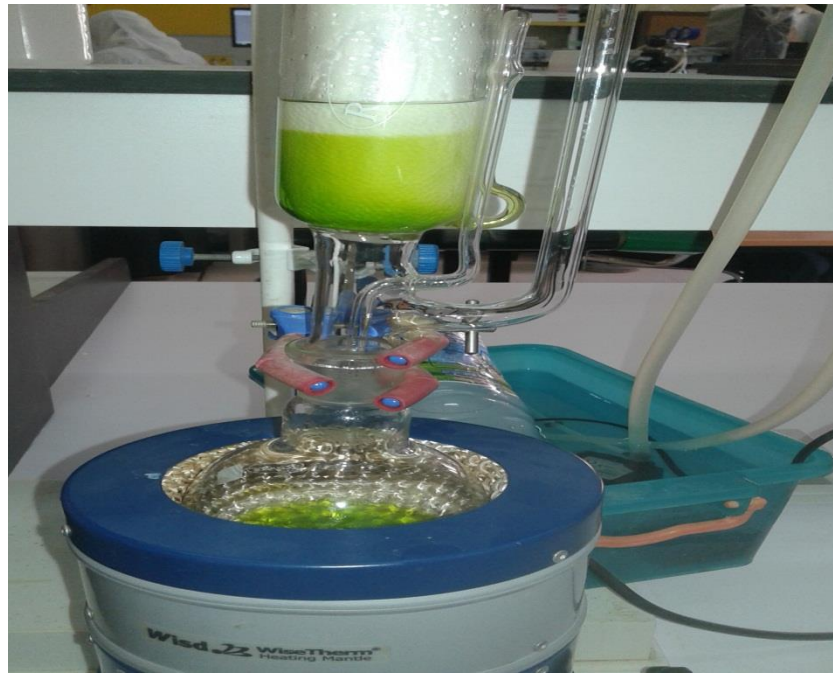


Figure (7) : Extraction par Soxhlet

✓ **Extraction par macération**

L'organe végétal est mis dans un Erlenmeyer ou Bécher de 1000 ml, une Quantité déterminée d'éthanol ou de méthanol est alors ajoutée. Le mélange est laissé macéré sous agitation mécanique et à température ambiante pendant 24 ou 48 heures. L'extrait obtenu est ensuite évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif jusqu'à obtention d'un résidu sec éthanolique ou méthanolique de la plante [17].



figure (8) : Extraction par macération

✓ **Extraction par ultrason :**

Cette technique est maintenant bien connue pour avoir des effets significatifs sur la cinétique de certaines réactions chimiques ou encore sur la réduction du temps des procédés d'extractions. En effet la cavitation induite par les ultrasons de faibles fréquences dans les milieux liquides se traduit entre autres par des accélérations de cinétique et/ou des améliorations du rendement, notamment dans le cas de l'extraction solide-liquide [9].



Figure (9) : Extraction par ultrason

III.2.4 Préparation des extraits

1^{ère} étape :

Le poudre de chaque matière végétale (30 g) a été extrait avec 150 ml de l'hexane pour éliminer les lipides par macération pendant 24h à température ambiante, après terminé .l'extrait est filtrés par papier de filtration, Les filtrats obtenus sont évaporés presque à sec au moyen d'un évaporateur rotatif muni d'une pompe à vide à une température 40°C pour éliminer le solvant et le poudre dans le papier filtre sécher à température ambiante.

2^{ème} étape :

Le poudre de chaque matière obtenus pour 1^{ère} étape à extraire sont pesées et ensuite mises dans la cartouche du Soxhlet. L'éthanol est introduit dans le ballon puis chauffé pour démarrer l'extraction. L'extraction est arrêtée après l'épuisement de cinq cycles, lorsque le liquide entourant la cartouche devient clair, cette couleur indiquant que le solvant n'extrait plus rien du solide. Le temps de traitement est heures. Le contenu du ballon (solvant plus matières solubilisées).

- ✓ Le poudre des fruits vert et sèche est placée dans un erlenmeyer avec l'éthanol, et est soumis à une extraction par ultrason à 40 °C. Les macéras sont réunis puis ils sont filtrés sur un papier filtre.
- ✓ Le poudre des plantes est mis dans un Erlenmeyer avec le solvant est alors ajoutée. Le mélange est laissé macéré sous agitation mécanique et à température ambiante. Les macéras sont réunis puis ils sont filtrés sur un papier filtre.

Après terminés les trois méthodes, Les filtrats obtenus sont évaporés presque à sec au moyen d'un évaporateur rotatif muni d'une pompe à vide à une température 70°C pour éliminer le solvant. Le résidu sec obtenu ont été récupérés dans des flacons en verre hermétiquement fermé et conservé à -2°C pour protéger ses caractéristiques physicochimique.

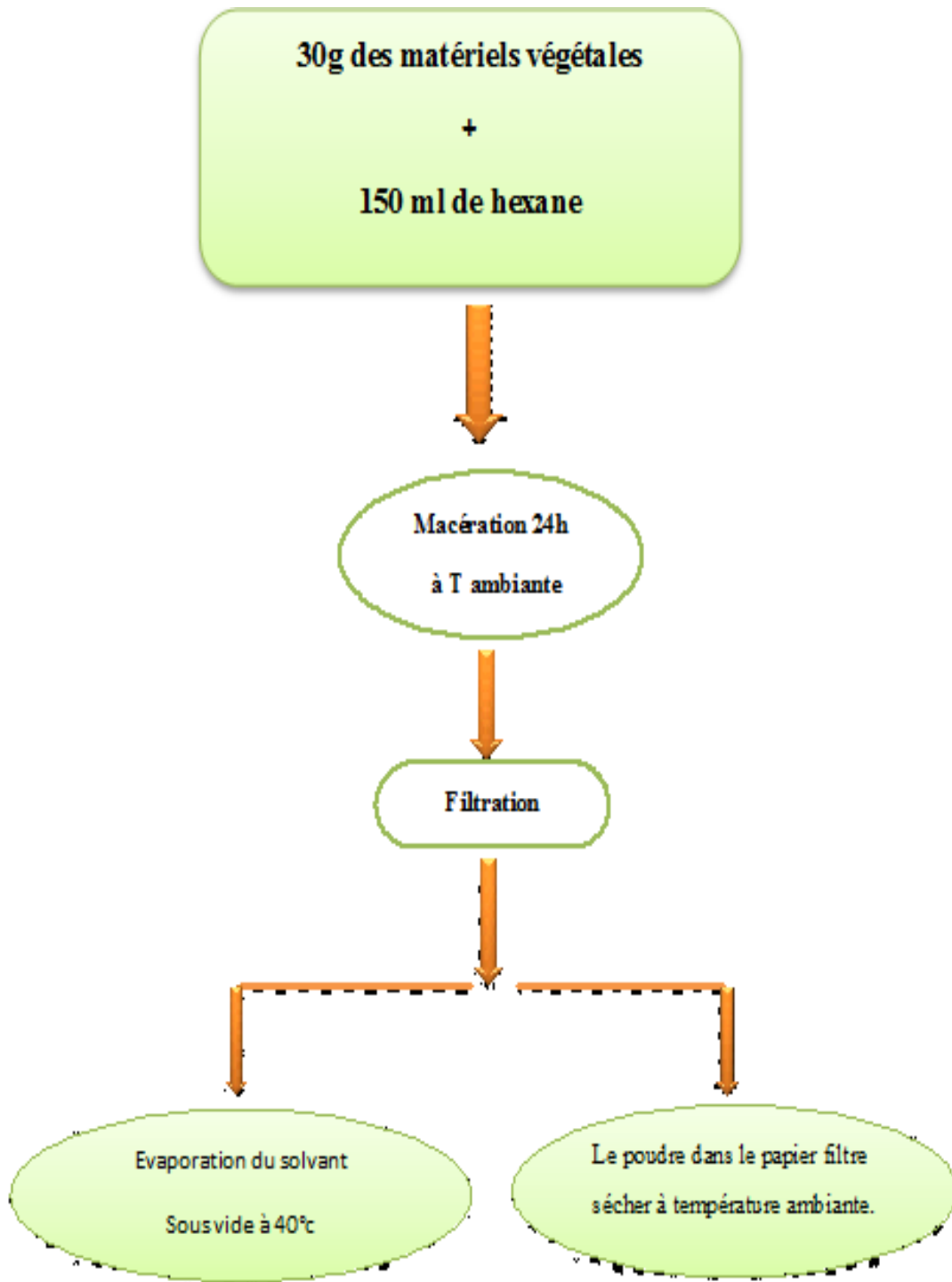


Figure (10) : Protocole d'éliminer les lipides.

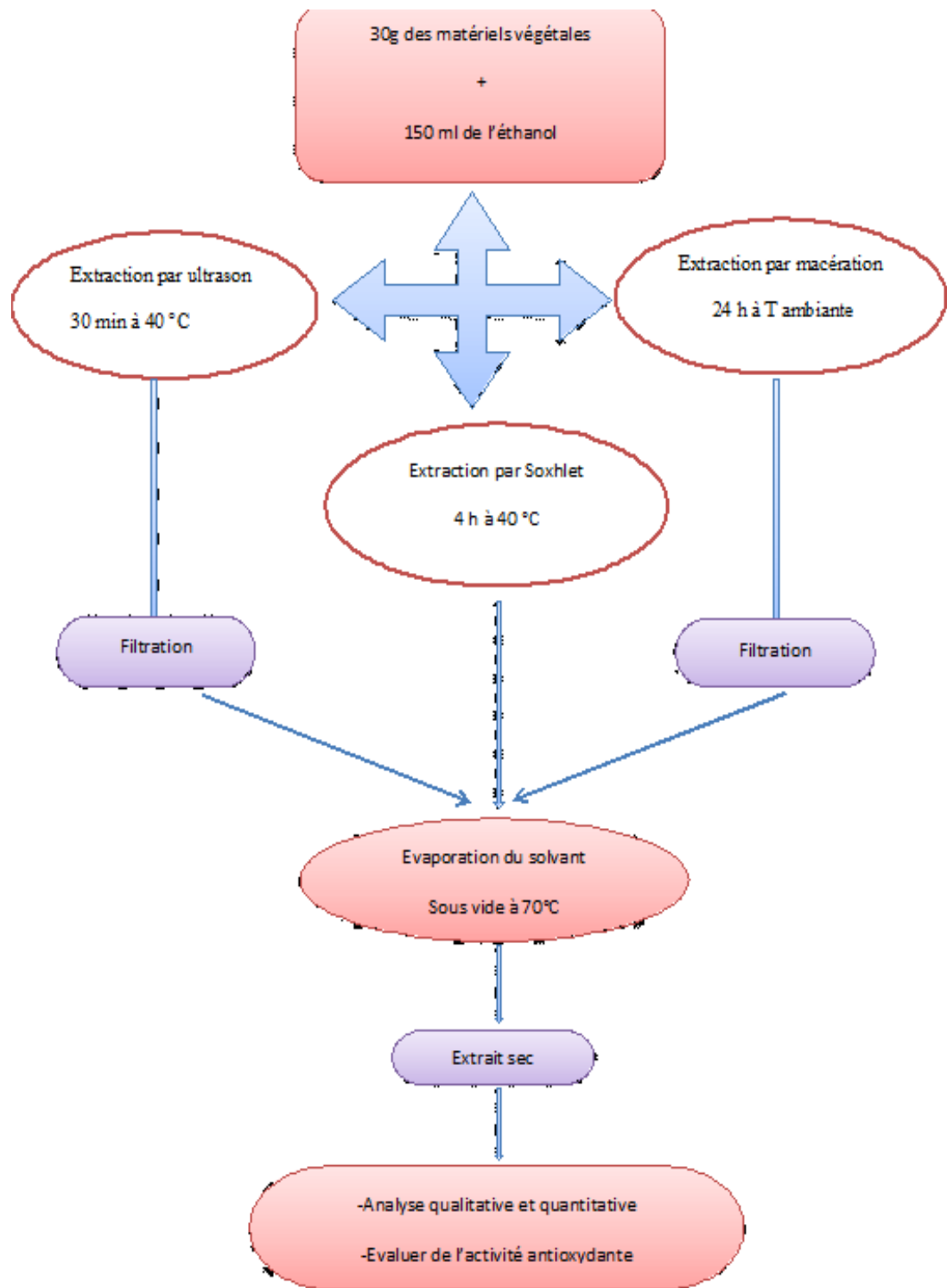


Figure (11) : Protocole de préparation des extraits.

III.2.2 Techniques d'identification

III.2.2.1 La spectrophotométrie UV-visible

➤ *Définition*

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une structure chimique donnée en solution, plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer-Lambert [2].

➤ *Principe*

Le principe repose sur l'absorption de la lumière par les espèces chimiques, l'appareil comporte une source de lumière blanche, un système dispersif permettant de sélectionner la longueur d'onde de la radiation et un système détecteur permettant la mesure de l'intensité lumineuse de la radiation monochromatique traversant la solution. Le spectrophotomètre effectue une comparaison entre les intensités lumineuses incidentes et transmises et permet par l'intermédiaire d'un circuit électronique d'afficher l'absorbance $A = \epsilon \cdot l \cdot c$.

Pour valider la loi de Beer-Lambert il faut travailler en lumière monochromatique, les solutions utilisées doivent être diluées, homogènes, et le soluté ne doit pas donner de réactions sous l'effet de la lumière incidente [18].



Figure (12) : La spectrophotométrie UV-visible.

III.2.3 Dosage des composées phénoliques

III.2.3.1 Analyse qualitative

a) Dosage des polyphénols totaux (PPT)

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits est réalisé par la méthode de Singleton et Ross en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.[19].

➤ *Principe*

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolibdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu donne un maximum d'absorption à 760 nm [20].

➤ *Mode opératoire*

Mettre 0,2 ml de chaque extrait de dans des tubes à essais ; ajouter 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois dans l'eau distillée ; puis laisser agir 5 min avant d'ajouter 0,8ml de carbonate de sodium à 7.5%.

Après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible à 765 nm.

On effectue la même opération pour l'acide gallique à différentes concentrations.

Le blanc est représenté par le solvant utilisé additionné du Folin-Ciocalteu et de carbonate de sodium.

Les concentrations des polyphénols totaux contenus dans les extraits sont calculées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent en acide gallique/g matières sèche.

III.2.3.2 Analyse quantitative

III.2.3.2.1 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

➤ *Principe*

La HPLC est un moyen très flexible et simple d'isoler et d'identifier les différents composés d'un mélange.

La HPLC peuvent être assez largement décrite par des théories communes. Un fluide appelé phase mobile traverse une colonne qui contient une phase solide (silices, silices fondues, silice greffées).

A l'instant initial, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il est entraîné par la phase mobile. Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange ayant des temps de rétentions différents sont séparés par élution. Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme [2].

➤ **Appareillage**

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe **HPLC-RP-C18**, Les différentes parties constituant l'appareil sont décrites ci-dessous :

A) Pompe : un système de deux pompes, Pompe : LC 20AL, LC20AL pour déplacer la phase mobile à haute pression (plusieurs dizaines de bars) ;

b) Injecteur : c'est une vanne d'injection qui porte une boucle d'échantillonnage portant Volume d'injection : 20 µl.

c) Colonne : (d'une longueur de 125 mm et d'un diamètre interne de 4,6 mm) contenant la phase stationnaire apolaire (phase inverse), cette dernière est constituée de silice modifié chimiquement par greffage de résidus (C-18), ces colonnes en phase inverse permettent la séparation des composés polaires, solubles dans l'eau ou dans les mélanges hydro-alcooliques ; elle contient la phase stationnaire qui définit le type de chromatographie, soit en phase normale soit en phase inverse. Et l'éluant utilisé est constitué de deux compositions constante (H₂O acide acétique, (0.2%), acétonitrile).

d) Détecteur : un détecteur monochrome : UV SPD-20A à longueur d'onde variable (190-400 nm) qui permet de détecter les différents composés contenus dans l'échantillon à analyser. Notons qu'il est important que les produits à détecter portent un chromophore qui absorbe dans cette plage de longueur d'onde.

e) Four : CTO 20A [11]. Dans notre étude on a utilisé une HPLC en mode phase inverse, à laquelle nous avons réalisé une analyse qualitative et quantitative des composés polyphénoliques contenant dans nos différents extraits.

➤ **Les conditions opératoires :**

Les conditions opératoires qui nous avons utilisées dans notre analyse sont comme suite :

- ✓ Débit : 1ml/min.
- ✓ Volume d'injection : 20 µl.
- ✓ Longueur d'onde : 300 nm.
- ✓ Concentration de l'échantillon : 0.1mg/ml.
- ✓ Temps d'analyse : 50 min.

Phase mobile est composée d'un mélange de deux compositions constantes (H₂O acide acétique (0.2%), acétonitrile).



Figure (13) : Chromatographie en phase liquide à haute performance.

III.2.4 Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits traduit leur aptitude à piéger les radicaux libres de l'organisme. Deux méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des extraits : ce sont la capacité antioxydante totale (CAT), le piégeage du radical libre DPPH.

III.2.4.1 Activité antioxydante totale (CAT)

La capacité antioxydante totale (CAT) des extraits est évaluée par la méthode de phosphomolybdène. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdène Mo (V) MoO_2^+ en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) à pH acide [22].

Mode opératoire

Un volume de 0.1 ml de chaque extrait est mélangé avec 1 ml de solution du réactif (0.6 ml acide sulfurique, 28 mg phosphate de sodium et 4 mg molybdate d'ammonium). Les tubes sont vissés et incubés à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 1 ml de la solution du réactif et 0.1 ml du solvant utilise et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon. La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalents d'acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg EAA/ g MS) [23].

III.4.2.2 Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil)

La réduction du radical libre DPPH \cdot par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquées par la présence des extraits phénoliques.

Le DPPH $^\circ$ est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie (**Figure.14**). Cette décoloration est représentative de la capacité des composés phénoliques à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Plus la chute de l'absorbance du DPPH est importante plus le pouvoir antioxydant des extraits est élevé. Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir anti radicalaire direct de différentes substances phénoliques de nos extraits [15].

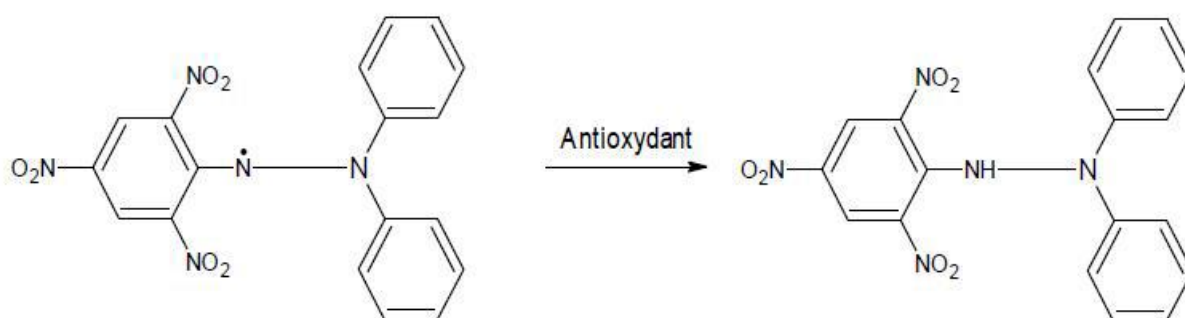


Figure (14) : Réduction du radical libre DPPH [4].

➤ **Mode opératoire**

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par Brand-Williams, Cuvelier et Berset.

Une solution méthanolique de 0,1 mg de DPPH est mélangée avec différentes concentrations des extraits, mettre 1ml de chaque dilution de ces extraits dans un tube à essai, ajouter 2ml de solution méthanolique de DPPH, puis laisser incuber 15 min à l'abri de la lumière à température ambiante. Lire l'absorbance à 515 nm contre un blanc qui contient de méthanol pur. Le contrôle est la solution DPPH avec le solvant.

L'évaluation de l'activité antioxydante en utilisant la méthode DPPH est exprimée en pourcentage selon la relation suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = (Abs_{\text{control}} - abs_{\text{extrait}} / Abs_{\text{control}}) \times 100$$

Avec :

Abs_{Control} : absorbance du control (ne contenant aucun antioxydant).

Abs_{Extrait} : absorbance des extraits.

Le pourcentage d'inhibition est exprimé ensuite par la valeur de la IC50, sachant que l'IC50 est la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH [9].

IV. Résultats et discussion

IV. Résultats et discussion :

IV.1 Rendement d'extraction des composés phénoliques :

Les extractions des différents composés phénoliques les plus abondant dans notre matière végétale permis de calculer le rendement de chaque extrait notamment les extraits brut alcoolique , selon la règle générale [9] :

$$R\% = \frac{\text{Masse de résidu extrait}}{\text{Masse initial de végétale}} \times 100$$

Le rendement qui a été déterminé par rapport à 20 g de matériel végétal pour les méthodes « Soxhlet, ultrason », « macération » l'extrait vert 31.14g, l'extrait sèche 27.86g et broyé est exprimé en pourcentage. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau (7).

Tableau (7) : Les rendements des extraits bruts.

Méthode	Extrait	Rendement
Ultra-sons	Sèche1	1.920
	Sèche2	1.694
Macération	Sèche1	2.764
	Sèche2	2.247
Soxhlet	Sèche1	7.817
	Sèche2	4.224

Les résultats obtenus pour les extraits bruts, montrent que l'extrait brut du méthode Soxhlet enregistre un fort rendement de l'ordre de 7.817 pour sèche1 et 4.224 à sèche2, suivi par l'extrait du méthode macération à raison de 2.764 pour sèche1 et 2.247 à sèche2 et l'extrait du méthode ultrason (1.920) pour sèche1 ;(1.694) à sèche2.

IV.2 Etude phytochimique

IV.2.1 Dosage des composés phénoliques par la méthode colorimétrique

L'étude quantitative des extraits bruts, préparés à partir des fruits de *Abelmoschus esculentus*, au moyen des dosages spectrophotométriques avaient pour objectif la Détermination de la teneur des composés phénoliques. La raison principale pour le choix de ces substances liées avec des effets pharmacologiques des plantes. Les droites d'étalonnages ont été tracées pour cet objectif qui est réalisées avec des solutions d'étalons à différentes concentrations [25].

Les quantités des composés phénoliques ont été rapportées en milligramme d'équivalents de l'étalon utilisé par gramme d'extrait et déterminés par l'équation de type :

$$Y = ax+b$$

Avec :

Y : la valeur d'absorbance.

x : la concentration d'étalon en mg/ml.

IV.2.1.1 Dosage de polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par la méthode spectrophotométriques adaptée de Singleton et Ross avec le réactif de Folin-Ciocalteu. La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations, la courbe montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations (Fig. 15).

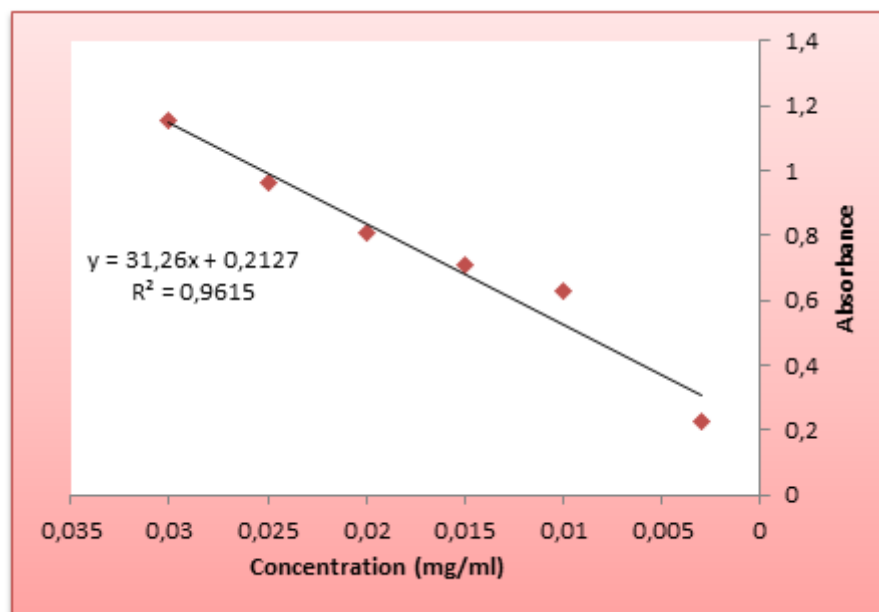


Figure (15) : Courbes d'étalonnages de l'acide gallique pour dosage des polyphénols totaux.

Le tableau (8) résume les résultats obtenus des teneurs en polyphénols totaux des extraits bruts des plantes.

Tableau (8) : Teneurs des polyphénols totaux des extraits.

Méthode	Extrait	Equation	Teneur en polyphénols totaux (mgGAE/g MS)
Ultra-sons	Sèche1	$Y = 31.26x + 0.2127$	0.736
	Sèche2		0.682
Macération	Sèche1		0.781
	Sèche2		0.362
Soxhlet	Sèche1		1.846
	Sèche2		1.143

Les teneurs en polyphénol totaux obtenus par trois méthodes d'extraction, présentées dans le tableau ci-dessus, en remarque ; Soxhlet semble être la meilleure méthode de 1.846 à l'extrait sèche1 et 1.143 à sèche2, suivi par l'extrait de la méthode macération avec une teneur 0.781 à sèche1 et 0.362 pour sèche2, l'extrait de la méthode ultrason est représenté la teneur la plus faible environ 0.736 à sèche1 et 0.682 pour sèche2.

Ces résultats peuvent être expliqués par l'effet de temps et la température d'extraction pour l'oxydation et réduction des composés phénoliques.

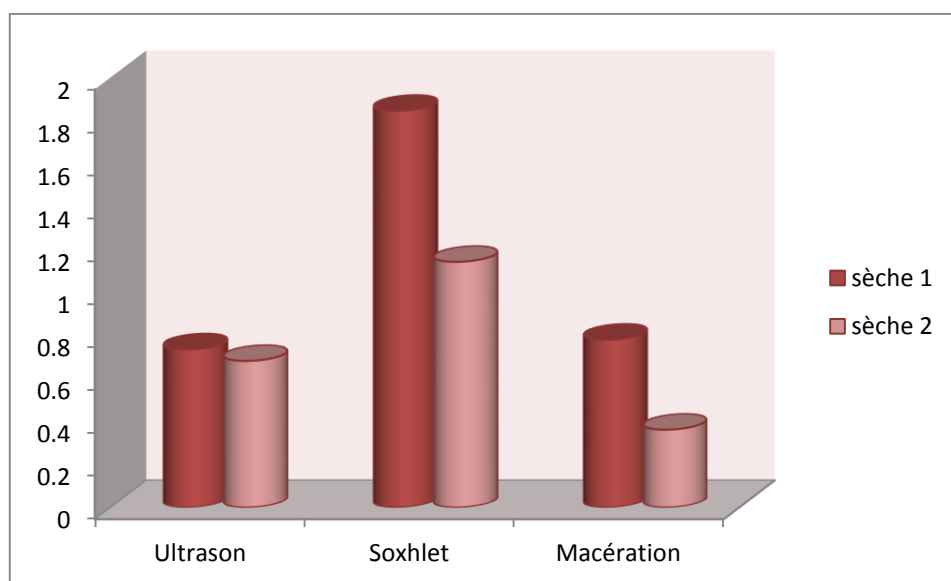


Figure (16) : la concentration des composés phénoliques des différents extraits.

IV.4 Technique d'analyse chromatographique HPLC

Les différents extraits ont été analysés afin de comparer leurs profils chromatographiques et d'obtenir une information sur la composition de ces extraits en polyphénols et comparés avec les différents standards.

IV.4.1 Chromatogrammes des étalons

Sept composés phénoliques standards (Acide ascorbique, acide gallique, acide Chlorogénique, acide caféique, rutine, cristine, vaniline, acide b-comarine ont été utilisés dans l'analyse HPLC comme étalons).

La quantité de ces composés a été rapportée en microgramme par un milligramme de la matière végétale équivalente en solution standard.

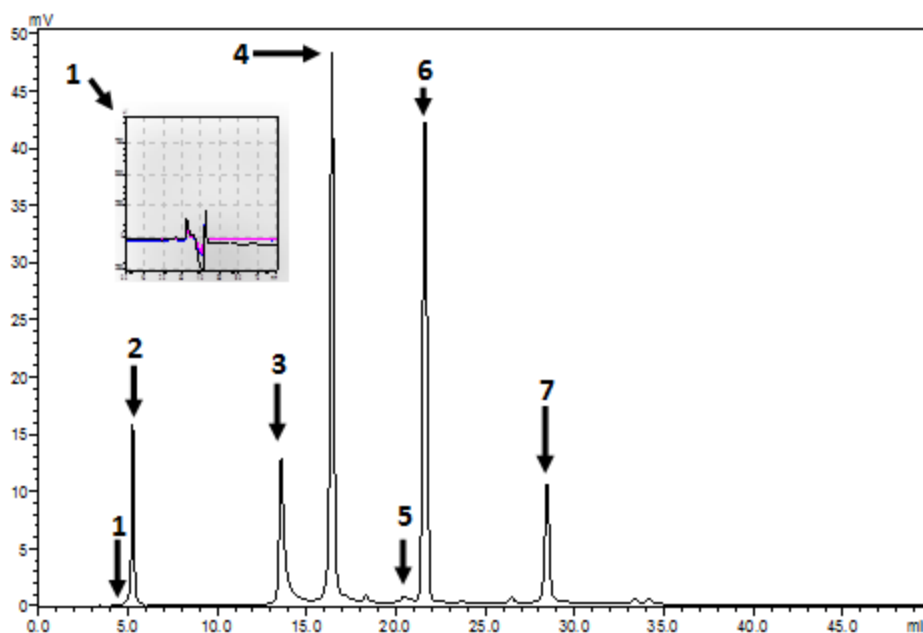


Figure (17): chromatogramme du mélange des étalons

1 : Acide Ascorbique ; 2 : Acide Gallique ; 3: Acide chlorogénique ; 4 : Acide caféique;
5 : Quercétine ; 6 : vanilline ; 7 : Rutine.

Tableau (9) : Le temps de rétention, et l'équation des courbes d'étalonnage des étalons.

composés	Temps de rétention (min)	Equation de courbe d'étalonnage
Quercétine	20.37	$Y= 548.0x-2832$
Acide gallique	5.23	$Y= 23616x-7232$
Acide caféique	16.3	$Y= 72328x$
Acide chlorogénique	13.62	$Y= 39775x-1881$
Vanilline	21.46	$Y= 82773x-1423$
Routine	28.22	$Y= 24112.98x-1060$
Acide ascorbique	4.21	$Y= 211.7x-1098$

IV.4.3. Chromatogrammes HPLC des extraits

Les résultats de la séparation des différents extraits de fruit d'*Abelmoschus esculentus* par la chromatographie liquide à haute performance HPLC sont illustrés dans les spectres suivants :

✓ *L'extrait sèche1 par macération*

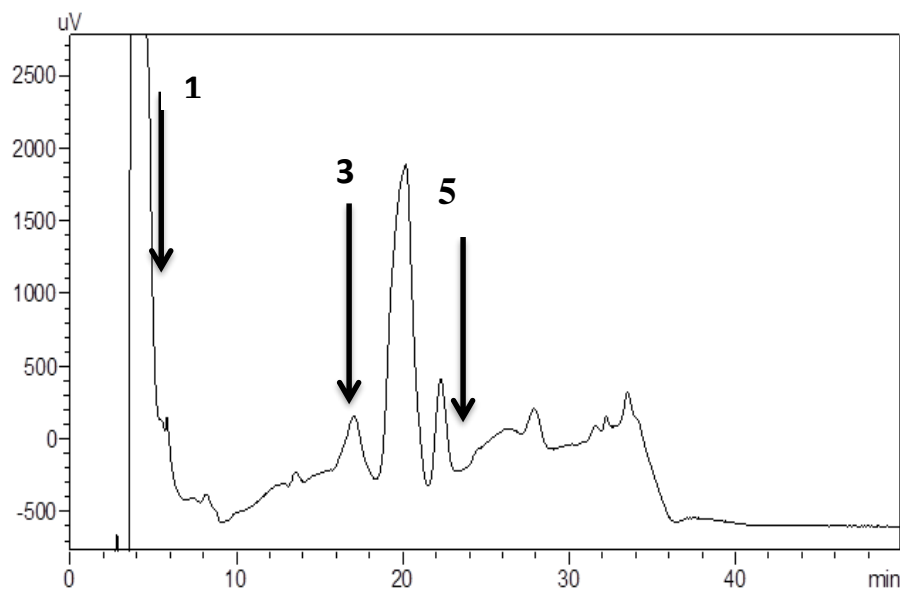


Figure (18) : profil chromatographique HPLC d'extrait de macération sèche1.

1 : Acide Ascorbique ; 3 : Acide chlorogénique ; 5 : Quercétine.

Le profil chromatographique d'extrait sèche1 représenté au niveau de figure (18).

Les résultats des analyses quantitatives des composés phénoliques identifiés sont représentés dans le tableau (10). L'analyse de ces résultats montre que dans l'extrait.

sèche1 l'acide ascorbique ($181.637\mu\text{g}/\text{mg Ms}$), quercétine ($35.209\mu\text{g}/\text{mg Ms}$), Acide chlorogénique ($0.01\mu\text{g}/\text{mg Ms}$), on remarque que l'acide ascorbique est le plus représentatif.

✓ *L'extrait sèche2 par macération*

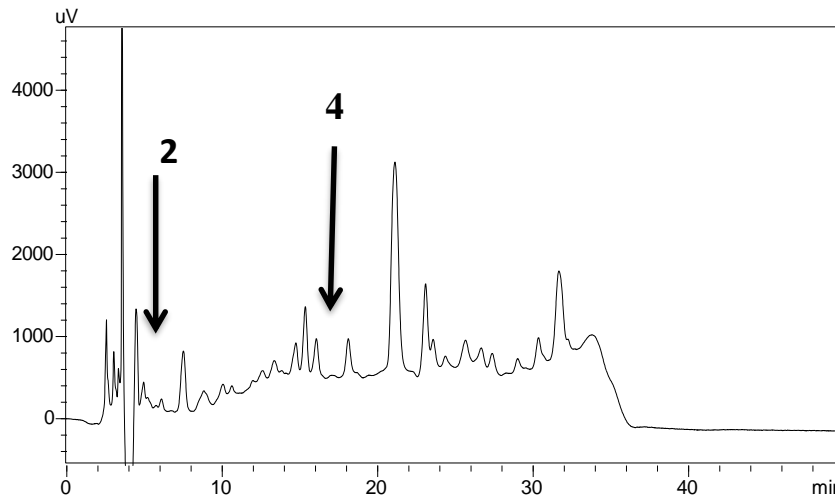


Figure (19) : profil chromatographique HPLC d'extrait de macération sèche2.

2 : Acide Gallique ; 4 : Acide caféique.

Le profil chromatographique d'extrait sèche2 représenté au niveau de figure (19).

Les résultats des analyses quantitatives des composés phénoliques identifiés sont représentés dans le tableau (10). L'analyse de ces résultats montre que dans l'extrait.

Sèche2 l'acide gallique ($0.1101\mu\text{g}/\text{mg Ms}$), acide caféique ($0.01378\mu\text{g}/\text{mg Ms}$), on remarque que l'acide gallique est le plus représentatif.

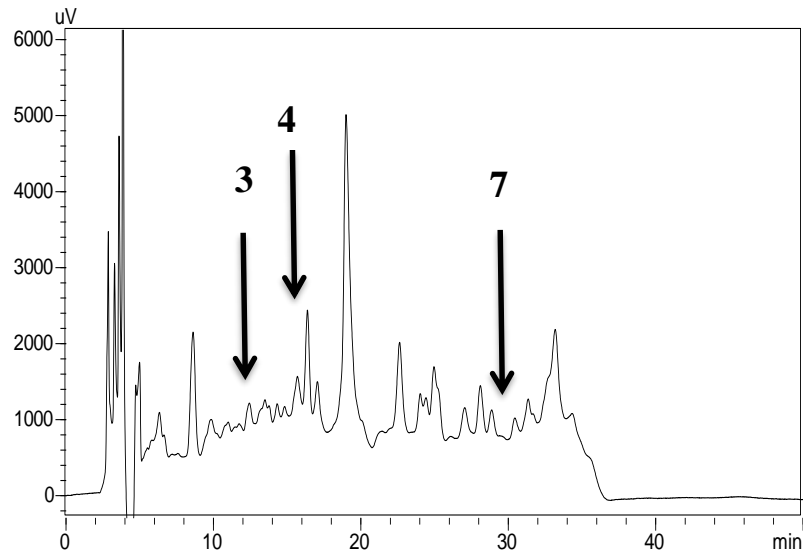
✓ *L'extrait d'ultrason sèche2*

Figure (20) : profil chromatographique HPLC d'extrait d'ultrason sèche2.

3: Acide chlorogénique ; 4 : Acide caféique ; 7 : Rutine.

Le profil chromatographique d'extrait sèche2 représenté au niveau de figure (20).

Les résultats des analyses quantitatives des composés phénoliques identifiés sont représentés dans le tableau (10). L'analyse de ces résultats montre que dans l'extrait.

Sèche2 l'acide chlorogénique (0.0138 $\mu\text{g}/\text{mg Ms}$), acide caféique (0.0462 $\mu\text{g}/\text{mg Ms}$), rutine (0.0646 $\mu\text{g}/\text{mg Ms}$) on remarque que rutine est le plus représentatif.

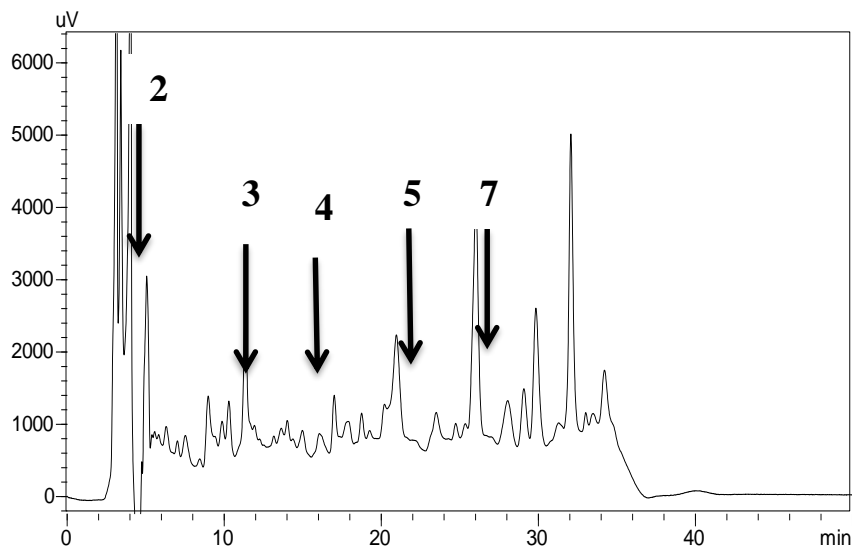
✓ *L'extrait d'ultrason sèche1*

Figure (21) : profil chromatographique HPLC d'extrait d'ultrason sèche1.

2 : Acide Gallique ; 3: Acide chlorogénique ; 4 : Acide caféique; 5 : Quercétine ; 7 : Rutine.

Le profil chromatographique d'extrait sèche1 représenté au niveau de figure (21). Les résultats des analyses quantitatives des composés phénoliques identifiés sont représentés dans le tableau (10). L'analyse de ces résultats montre que dans l'extrait sèche1 acide gallique ($0.1015 \mu\text{g}/\text{mg Ms}$), l'acide chlorogénique ($0.0174\mu\text{g}/\text{mg Ms}$), acide caféique ($0.0125 \mu\text{g}/\text{mg Ms}$), quercétine ($2.106\mu\text{g}/\text{mg Ms}$), rutine ($0.0937\mu\text{g}/\text{mg Ms}$), on remarque que quercétine est le plus représentatif.

✓ *L'extrait de Soxhlet sèche2*

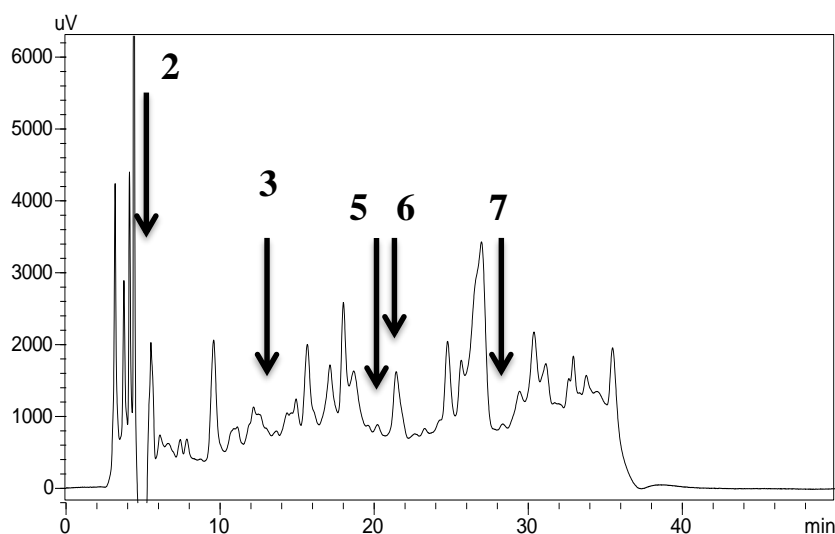


Figure (22) : profil chromatographique HPLC d'extrait soxhlet sèche2.

2 : Acide Ascorbique ; 3 : Acide chlorogénique ; 5 : Quercétine ; 6 : vanilline ; 7 : Rutine.

Le profil chromatographique d'extrait sèche1 représenté au niveau de figure (22). Les résultats des analyses quantitatives des composés phénoliques identifiés sont représentés dans le tableau (10). L'analyse de ces résultats montre que dans l'extrait Sèche1 acide ascorbique ($22.368 \mu\text{g}/\text{mg Ms}$), l'acide chlorogénique ($0.0072\mu\text{g}/\text{mg Ms}$) quercétine ($0.9538\mu\text{g}/\text{mg Ms}$), vanilline ($0.037 \mu\text{g}/\text{mg Ms}$), rutine ($0.0098\mu\text{g}/\text{mg Ms}$) on remarque que l'acide ascorbique est le plus représentatif.

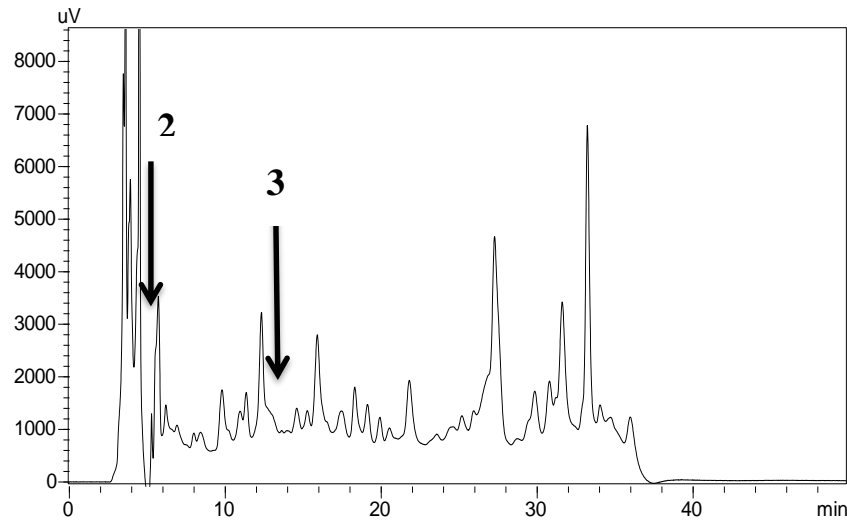
✓ *L'extrait de Soxhlet sèche1*

Figure (23) : profil chromatographique HPLC d'extrait soxhlet sèche1.

2 : Acide Gallique ; 3: Acide chlorogénique

Le profil chromatographique d'extrait sèche1 représenté au niveau de figure (23). Les résultats des analyses quantitatives des composés phénoliques identifiés sont représentés dans le tableau (10). L'analyse de ces résultats montre que dans l'extrait Sèche1 acide gallique (0.0848 $\mu\text{g}/\text{mg Ms}$), l'acide chlorogénique (0.0175 $\mu\text{g}/\text{mg Ms}$), on remarque que l'acide gallique est le plus représentatif.

Tableau (10) : Concentration de polyphénols des extraits de fruit d'*Abelmoschus esculentus*.

Composés	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mg}$)					
	Macération sèche2	Macération sèche1	Ultrason sèche2	Ultrason sèche1	Soxhlet sèche2	Soxhlet sèche1
Acide ascorbique	non détecté	181.637	non détecté	non détecté	22.368	non détecté
Acide gallique	0.1101	non détecté	non détecté	0.1015	non détecté	0.0848
Acide chlorogénique	non détecté	0.01	0.0138	0.0174	0.0072	0.0175
Acide caféique	0.01378	non détecté	0.0462	0.0125	non détecté	non détecté
Quercétine	non détecté	35.209	non détecté	2.106	0.9538	non détecté
Vanilline	non détecté	non détecté	non détecté	non détecté	0.037	non détecté
Rutine	non détecté	non détecté	0.0646	0.0937	0.0098	non

						déecté
--	--	--	--	--	--	--------

IV.5 Evaluation de l'activité antioxydante

La mesure du potentiel antioxydant est réalisée en déterminant les produits résultant de l'oxydation ou en évaluant l'aptitude à piéger des radicaux de modèles réactionnels.

Le premier mode, plus ancien, nécessite une connaissance préalable des composés issus de l'oxydation. En effet ces méthodes recherchent certains groupements fonctionnels (aldéhydes, cétones, dicarbonylés...) dans les dérivés des constituants d'origine. Le second relie la quantité de radicaux piégés à celle d'antioxydant utilisé.

On a choisis parmi de nombreux modes d'expression de cette mesure d'utiliser le pourcentage d'inhibition (IC) et/ ou l'équivalence en solution standard obtenu par spectroscopie UV-Visible.

IV.5.1 Méthode de la Capacité antioxydante totale (CAT)

L'acide ascorbique a été utilisée comme étalon à différentes concentrations, La teneur en capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme d'équivalent d'acide ascorbique par gramme d'extrait (mg ER/g d'extrait). Le taux de capacité antioxydante totale des extraits ont été obtenus à partir d'une courbe d'étalonnage d'acide ascorbique figure (23).

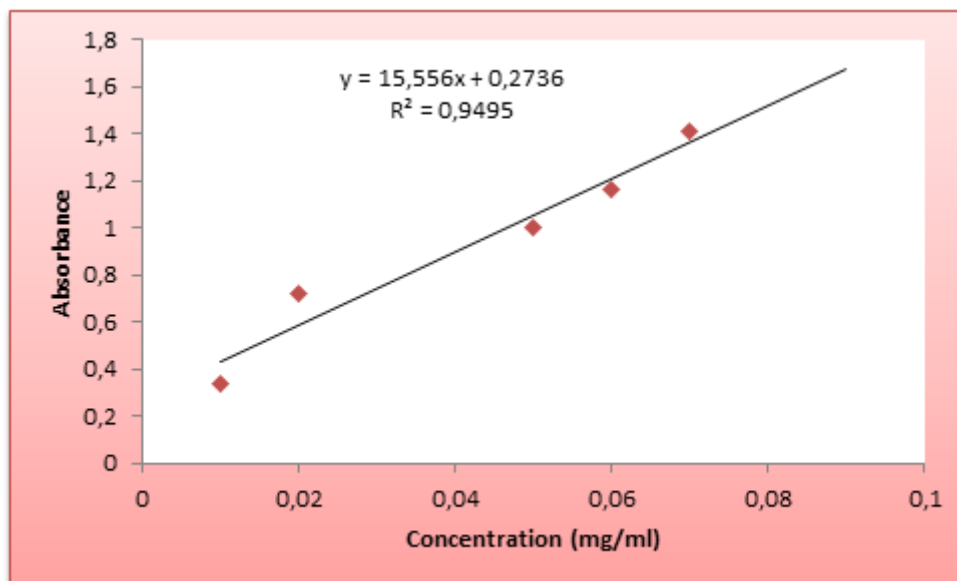


Figure (24) : Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique.

Le tableau (11) résume les résultats obtenus des teneurs en capacité anioxydante totale des extraits.

Tableau (11) : La capacité antioxydant totale des extraits d'Abelmoschus esculentus.

Méthode	Extrait	Equation	La capacité antioxydant totale (mg/g)
Ultra-sons	Sèche1	$Y = 15.556x + 0.2736$	3.150±0.004
	Sèche2		8.353±0.015
Macération	Sèche1		11.49±0.0405
	Sèche2		10.347±0.162
Soxhlet	Sèche1		10.831±0.378
	Sèche2		9.201±0.0108

Les résultats montrent que tous les extraits présentent des activités antioxydants différentes. L'extrait de la méthode macération possède la meilleure capacité antioxydante totale de l'ordre (11.49±0.0405), par l'extrait de la méthode Soxhlet (10.831±0.378) et faible capacité antioxydante pour la méthode ultrason de (8.353±0.015) .Remarque l'activité antioxydant pour l'extrait sèche1 élevé contre l'extrait sèche2 pour les trois méthodes.

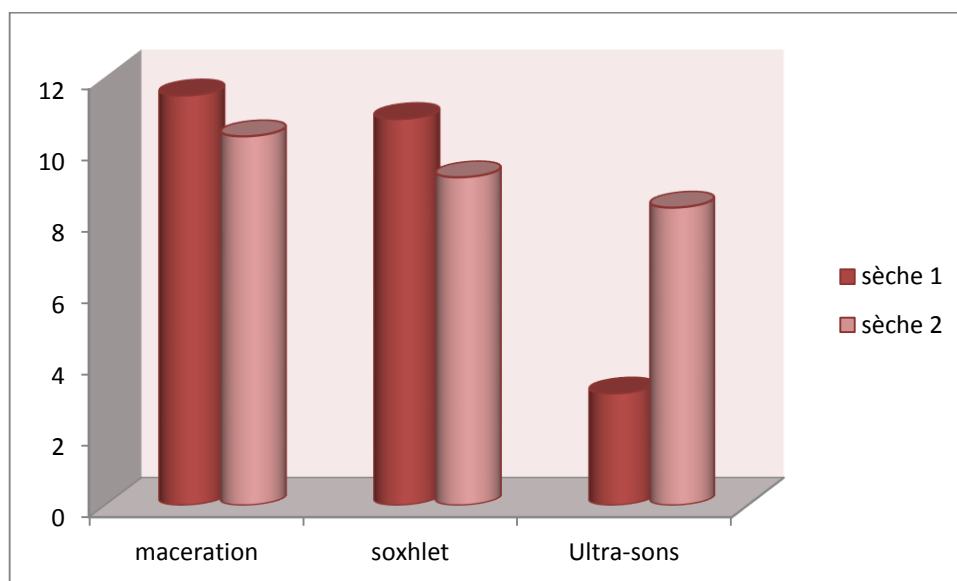


Figure (25) : Comparaison La capacité antioxydant totale des différents extraits.**IV.5.2 Test anti-radicalaire (Test DPPH)**

L'activité anti radicalaire est réalisée par la méthode du radical 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle (DPPH) qui est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron, la forme non radicalaire DPPH-H est formée. L'inhibition de la décoloration du radical DPPH est en fonction de la concentration des différents extraits utilisés [12].

L'activité antioxydante des extraits est exprimée en IC50, il définit la concentration Efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH. Un autre Paramètre exprime la puissance anti-radicalaire a été calculée à partir du premier paramètre Notée : "APR" (efficacité anti-radicalaire, égale à 1/IC50) [9].

Tableau (16) : Valeurs des IC50 du DPPH pour les extraits.

Méthode	Extrait	Equation	Valeurs des IC50 (mg/ml)	APR
Ultra-sons	Sèche1	$Y=10.944x+19.744$	2.764	0.362
	Sèche2	$Y=19.354x-4.1577$	2.798	0.357
Macération	Sèche1	$Y=4.7814x+33.958$	3.355	0.298
	Sèche2	$Y=18.214x-16.15$	3.631	0.275
Soxhlet	Sèche1	$Y=18.709x-5.4934$	2.966	0.337
	Sèche2	$Y=8.3903x+32.33$	2.106	0.475

Le tableau ci-dessus montre que l'extrait sèche2 de méthode Soxhlet possède inhibition élevé de 2.106 mg/ml, suivi par l'extrait sèche1, sèche2 de méthode ultrason de (2.764 mg/ml), (2.798 mg/ml) successivement .Remarque l'inhibition faible obtenue pour de méthode macération de (3.355 mg/ml), (3.631mg/ml) de l'extrait sèche1 et sèche2 successivement.

Les capacités de piégeage du radical sont classées dans l'ordre :

Méthode Soxhlet> méthode ultrason > méthode macération.

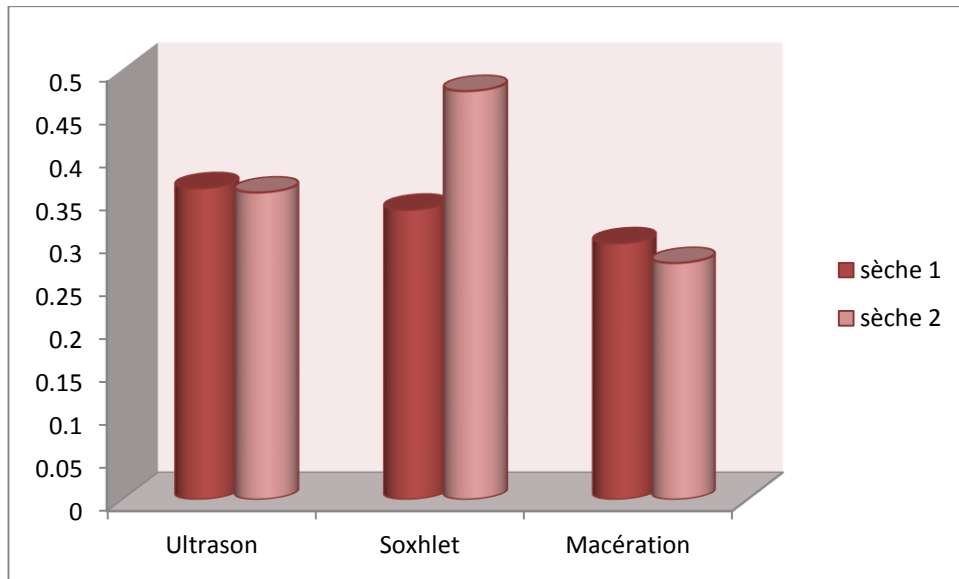


Figure (26) : Comparaison entre ARP de différents extraits.

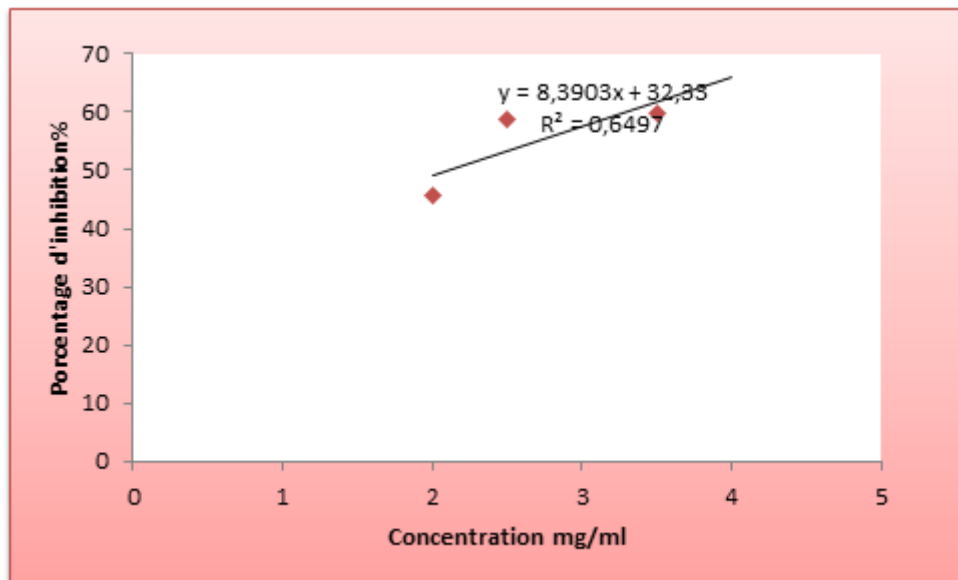


Figure (27) : Effet d'extraits Soxhlet sèche2 sur le radical DPPH.

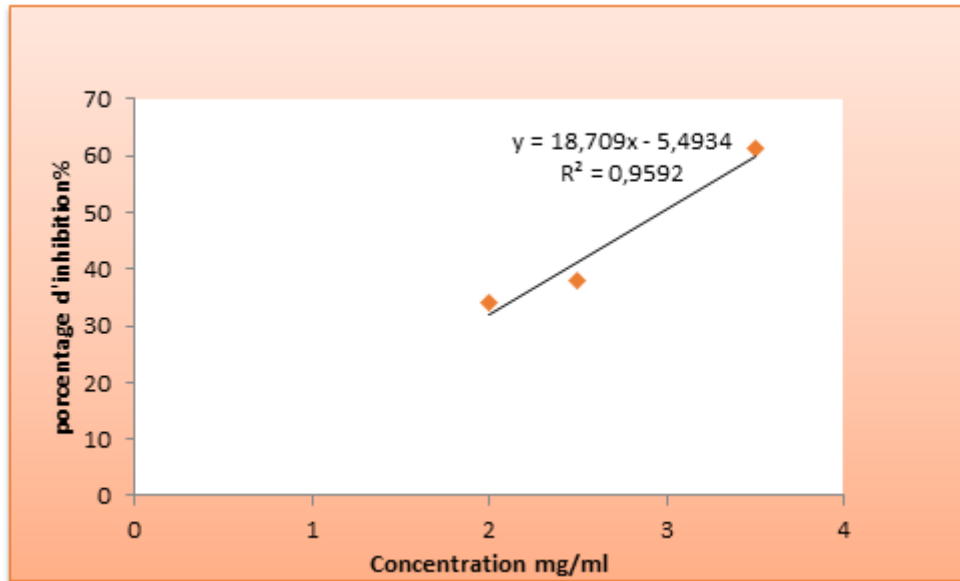


Figure (28) : Effet d'extraits Soxhlet Sèche1 sur le radical DPPH.

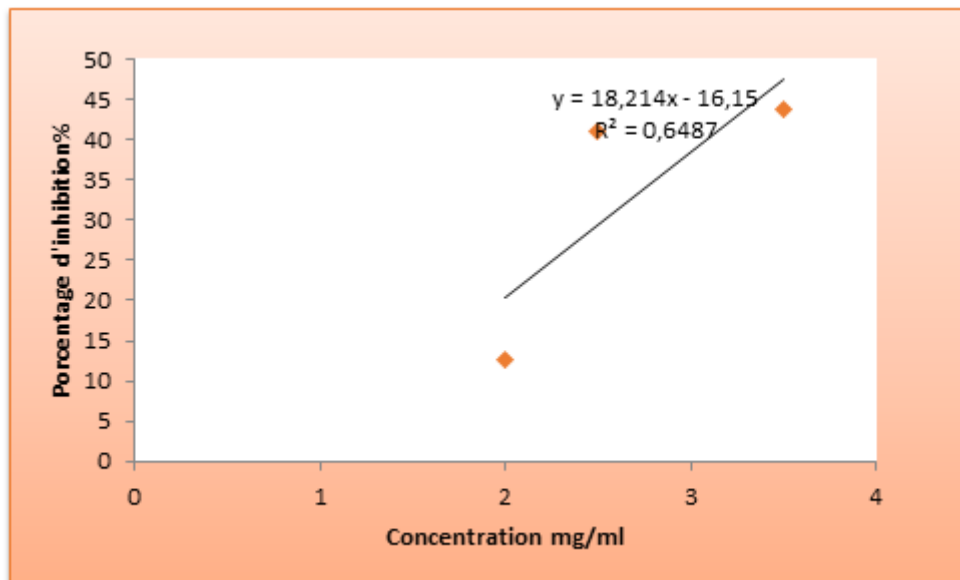


Figure (29) : Effet d'extraits macération sèche2 sur le radical DPPH.

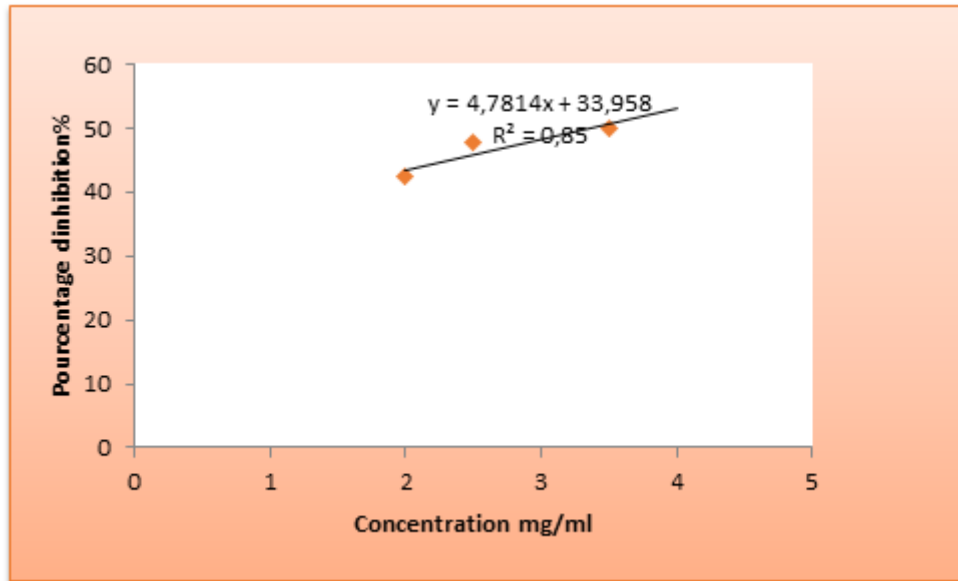


Figure (30) : Effet d'extraits macération Sèche1 sur le radical DPPH.

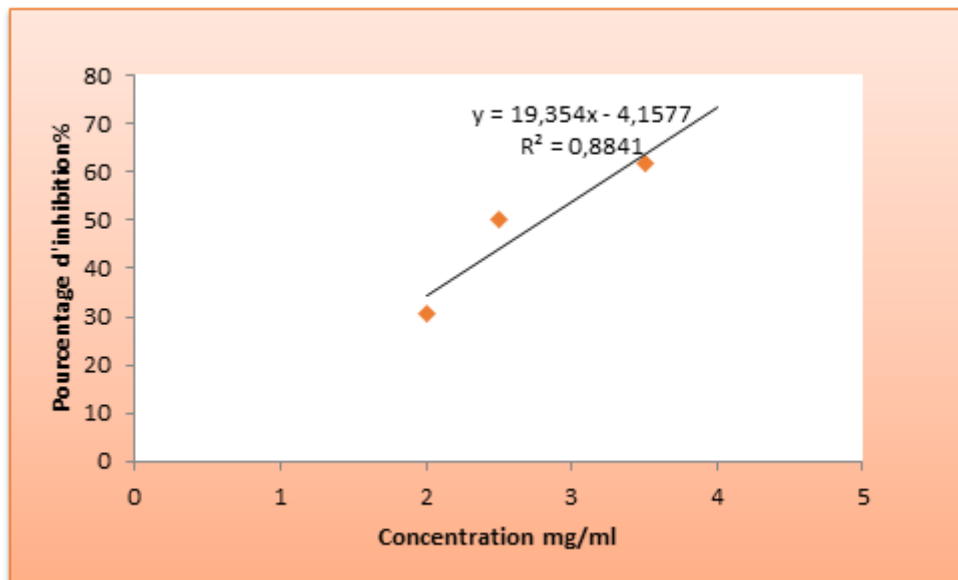


Figure (31) : Effet d'extraits ultrason sèche2 sur le radical DPPH.

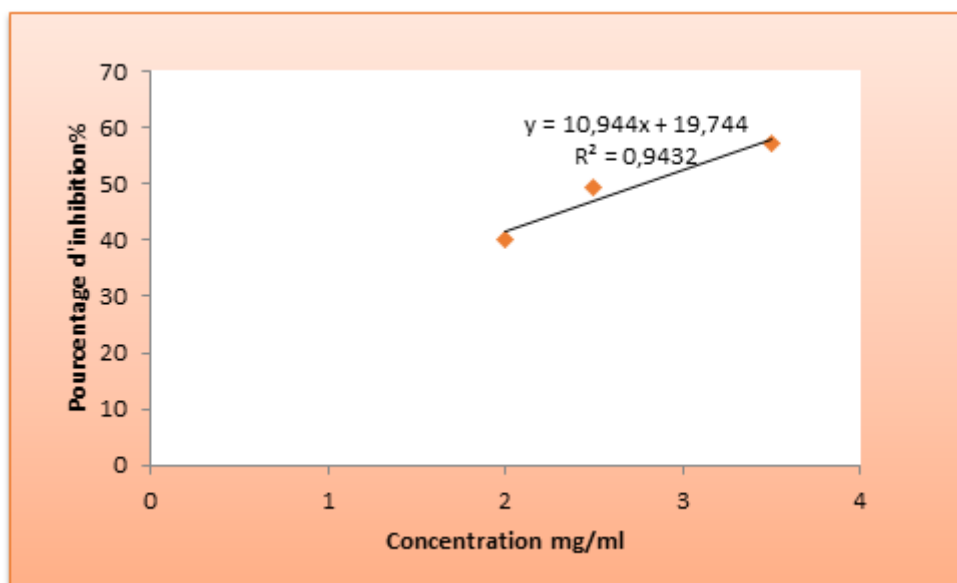


Figure (32) : Effet d'extraits ultrason Sèche1 sur le radical DPPH.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail avait pour but d'évaluer la composition phytochimique et de déterminer la concentration des quelques polyphénols par HPLC des extraits éthanolique des *Abelmoschus esculentus* de deux matériels végétales, séchage naturelle dans la plante et séchage au niveau de laboratoire. On utilise trois méthodes d'extraction, Ultra-son, macération et Soxhlet. Le deuxième objectif est d'estimer l'activité antioxydante de ces extraits par deux méthodes DPPH et l'activité antioxydante totale de ces extraits en question.

Etant donné la toxicité et/ou les effets secondaires indésirables des molécules de synthèse ainsi que la résistance de certains germes microbiens face aux médicaments existants

L'utilisation des plantes qui contiennent des composés bio-actifs est en progression constante. En effet, compte tenu de leur meilleure biocompatibilité on observe une demande croissante des produits d'origine naturelle

Vu que l'étude bibliographique réalisée sur ces espèces a montré que l'on ne disposait que de peu d'informations de nature chimique et/ou biologique. Pour pallier ce manque d'informations, notre étude c'est focalisée sur les analyses qualitative et quantitative de ces extraits, les évaluations de la capacité antioxydante

En ce qui concerne la caractérisation et la quantification des polyphénols, Nos résultats montrent que les composés phénoliques existent en concentration considérable et que l'extrait séché au laboratoire obtenu par Soxhlet plus riche par rapport aux autres extraits

L'activité antioxydante des extraits d'*Abelmoschus esculentus* a été évaluée et comparée en utilisant les méthodes suivantes : DPPH et l'activité antioxydante totale. On a pu calculer la concentration inhibitrice à 50%, ainsi on a pu conclure que l'activité antioxydante des extraits des *Abelmoschus esculentus* diminue dans l'ordre suivant : Extrait par macération > Extrait par Soxhlet > Extrait par ultra-son, et même remarque pour l'analyse phytochimique que l'échantillon séché au laboratoire présente une activité antioxydante élevée par rapport à l'échantillon séché dans la plante. Pour toutes les

méthodes citées ci dessus. On a remarqué que l'activité antioxydante des deux variétés dépendait de leur concentration.

L'évaluation des propriétés antioxydantes révèle que toutes ces variétés manifestent une forte capacité et plus particulièrement les extraits obtenus par Macération. De plus, une corrélation positive entre l'activité antioxydante et la teneur en composés polyphénoliques a été établie

Cette étude valide scientifiquement l'usage traditionnel de ces plantes et révèle leur intérêt dans le cadre d'une exploitation en biotechnologie. Pour la suite, il serait intéressant d'isoler et de caractériser les composés phénoliques des extraits des deux variétés sélectionnés (et d'autre). Aussi, serait très souhaitable, pour une meilleure compréhension du mode d'action des dérivés polyphénoliques, d'évaluer in vivo l'activité anti-inflammatoires, antidiabétique et antimutagène de chacun de ces composés pris séparément. Ce qui permettrait alors de mettre en évidence le principe actif des extraits et/ou une éventuelle synergie entre les différents composés phénoliques, ce qui fera l'objet d'une autre étude

Références bibliographiques

- [1] Chérifa Boubekri ,(2014), « Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques.Thèse de doctorat,Université Mohamed Khider,Biskra .
- [2] Salah Eddine Laouini, (2014), « Etude du plan phytochimique et l'activité biologique d'extrait de *Phoenix dactylifera* L dans la région du Sud d'Algérie (la région d'Oued Souf) ». Thèse de doctorat,Université Mohamed Khider,Biskra .
- [3] Ouedraogo Zoéwendpaoré Albert,(2009), « Caractérisation agromorphologique Comparée de cinq variétés de Gombo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) » memoire d'ingenieur,Université Burkina Faso.
- [4] Yakoubi Fatima, (2014), « Réponse hormonale des graines du gombo (*Abelmoschus esculentus*. L) sous stress salin » memoire de magister, universite d'Oran.
- [5] Menouar Mohammed, (2015), « Effet de l'action combinée bentonite et la salinité sur les bilans hydrique et minéral du gombo (*Abelmoschus esculentus*. L) memoire de magister, universite d'Oran.
- [6] Jacques Fournet,(2002), Flore illustrée des phanérogames de Guadeloupe et de Martinique, Gondwa eddition, Cirad.
- [7] Inès Nadège Wendkûni Pizongo,(2014), « Réponse de variétés de gombo (*Abelmoschus esculentus* L) aux engrais chimiques et à la fumure organique » mémoire de master, Université Burkina Faso.
- [8] Guignardj,(2001), « Botanique Systématique moléculaire »,2^{ème} édition Lavoisier, Paris.
- [9] Jamilla Berra ,(2015), « *Etude de l'effet du milieu d'extraction sur la composition des feuilles de Matricaria Pubescens* » mémoire de master, Université Echahid Hamma Lakhdar El Oued.
- [10] Urquiagea I.N.E.S.and Leighton F. E. D. E,(2000) « Plant polyphénol antioxidant and oxidative stress »Biol Ress.
- [11] Achat Sabiha,(2013), « Polyphénol de l'alimentation :Extraction,Pouvoir antioxydant et interaction avec des ions métalliques.

- [12] Harrar Abd El Nacer,(2012), « Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus*L » Thèse de Magister, Université Ferhat Abbas-Setif.
- [13] Bouras Fatima Zohra et Houchi Abdelbasset,(2013), «Etude de l'activité antioxydante de la plante *Rumex Vesicarius* L » mémoire de master, Université Kasdi Merbah, Ouargla.
- [14] François Nesmi Muanda,(2010), « Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques » Thèse de doctorat, Université Paul Verlaine-Metz.
- [15] Hemmami Hadia et Guezei Nadia,(2013), « Évaluation de l'activité antioxydante d'extraits de *Capsicum annuum* L de la région d'el-oued » mémoire de master, Université Echahid Hamma Lakhdar El Oued.
- [16] Kahina Bouhadjra épouse Fodhil,(2011), « Etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge » Thèse de Magister université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.
- [17] RACHED Wahiba « Évaluation du potentiel antioxydant de plantes médicinales et analyse phytochimique » Thèse de Magister Université d'Oran Es-Sénia.
- [18] Zeghad .N (2009), « Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne », Mémoire magister, Université Constantine.
- [19] Yogita Chavan, Rekha S. Singhal , (2013) « Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactives from arecanut (*Areca catechu* L.) and optimization study using response surface methodology. » Innovative Food Science and Emerging Technologies.

[21] Xiang, Y.; Liu Y. and Lee M.L (2006). « Ultrahigh pressure liquid chromatography using elevated temperature ». Journal of Chromatography.

[22] G.Yakhlef, (2009), « Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de *Thymus Vulgaris* L ». Et *Laurus Nobilis*, Mémoire de magister en biochimie appliquée

[23] Petko Ivanov PENCHEV, (2010) « Etude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions » thèse du doctorat de l'université de Toulouse.

[24] Sanchez Moreno, C, Review, methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods Sci.Tech. I ,8(3) :121-137.

[25] Selma Dziri, Imed Hassen, Saloua Fatnassi, Yassine Mrabet, Herve Casabianca, Belgacem Hanchi, Karim Hosni , (2012) "Phenolic constituents, antioxidant and antimicrobial activities of rosy garlic (*Allium roseum* var. *odoratissimum*)" . Journal of Functional Food.