



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ECHAHID HAMMA LAKHDAR EL OUED

FACULTE DE LA TECHNOLOGIE

Mémoire de Fin d'Etude

En vue de l'obtention du diplôme de :

**MASTER ACADEMIQUE**

Domaine: Sciences et Technologies

Filière: Génie des Procédés

Spécialité: Génie Chimique

Présenté par:

Ben atallah Mebrouka & Ben otmane Samah

Thème

**Etude de l'effet de la température et l'oxygène sur  
la stabilité des quelques composés phénoliques**

**( ascorbique ,vanilline, gallique )**

Soutenu le /05/2017

Devant le Jury:

Mr BELFAR Med Lakhdar	Président	Université ECHAHID HAMMA LAKHDAR d'El Oued.
Mr MENACEUR Souhila	Examineur	Université ECHAHID HAMMA LAKHDAR d'El Oued.
Mr LAOUINI Salaheddine	Rapporteur	Université ECHAHID HAMMA LAKHDAR d'El Oued

2016/2017

## REMERCIEMENTS

*Avant toute chose, nous remercions Dieu, le tout puissant, pour nous avoir  
donnée la force*

*et la patience. Aux joyaux de nos vie "nos parents" qui sont la source de nos  
réussites, nous souhaitons qu'ils trouvent à travers ce mémoire le faible  
témoignage de leurs efforts et sacrifices.*

*Nous exprime nos profondons gratitude à Dr LAOUINI Salah Eddine,  
qui nos fait l'honneur d'avoir veillé et dirigé ce travail. Ses conseils  
pertinents nous ont permis de mener à terme ce travail.*

*nous tenons à remercier : professeurs membres de jury .*

*nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont à toute  
personne qui a participé de près ou de loin dans la réalisation de notre  
travail.*

## *Dédicace*

*Nous dédions ce modeste travail à nos chers Parents qui*

*nous ont toujours encouragé tout au Long de notre vie*

*À nos frères et nos sœurs et à tous nos amis.*

## Résume :

Tous les composés phénoliques peuvent être considérés comme des paramètres importants des qualités organoleptiques (Couleur et Saveur) et nutritionnelles des produits alimentaires d'origine végétale. De multiples la couleurs d'ordre génétique, moléculaire, physiologique et environnemental, déterminent les teneurs et la spécificité d'accumulation des composés phénoliques chez les végétaux. De plus, toutes les techniques de conservation et de transformation qui perturbent l'intégrité cellulaire peuvent conduire à d'importants changements dans l'équipement phénolique avec apparition de brunissements. Actuellement, l'utilisation des composés phénoliques en tant qu'antioxydants nature dans l'alimentation est en cours de développement, en relation avec la prévention de certains cancers et maladies cardio-vasculaires. Dans ce travail, on étudie l'effet des quelques paramètres sur la stabilité de composés phénoliques (température, l'oxygène) : l'acide gallique, l'acide ascorbique et le vanilline.

## ملخص:

ان جميع المركبات الفينولية تعتبر مهمة لجودة المنتجات المعالجة (لون ونكهة) والمنتجات الغذائية الغذائية من أصل نباتي. متعددة التسلسل الجيني، الجزيئي والفسبولوجي والبيئي لتحديد محتويات وتراكم معين من المركبات الفينولية في النباتات. وبالإضافة إلى ذلك، يمكن لجميع تقنيات الحفظ والمعالجة التي تعطل سلامة الخلية يؤدي إلى تغييرات كبيرة في ظهور المعيدات مع إنضاج الفينولية. ويجري حاليا تطوير استخدام المركبات الفينولية المواد المضادة للاكسدة في الطبيعة في النظام الغذائي فيما يتعلق بمنع بعض أنواع السرطان وأمراض القلب والأوعية الدموية. في هذه الورقة، ونحن دراسة تأثير بعض العوامل على استقرار المركبات الفينولية (درجة الحرارة والأكسجين): حمض الغاليك وحمض الاسكوريك وفانيلين.

## Table des matière

Titre	page
Remerciement	
Dédicaces	
Sommaire	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	
<b><i>PARTIE bibliographique</i></b>	
<b>CHAPITRE 1: LES COMPOSE PHENOLIQUE</b>	
1-1- générale sur les poly phénols	1
1-2- Classification des poly phénols	1
1-2-1- Poly phénols simples	1
1-2-1-1- Acides phénoliques	1
1-2-1-2- Flavonoïdes	3
1-2-1-3- Alcools phénoliques	6
1-2-1-4- Poly phénols complexes(tanins)	7
1-3- Propriétés chimiques des poly phénols	8
1-3-1- Nucléophilie	9
1-3-2- Propriétés réductrices	9
1-3-3- Polarisabilité	10
1-3-4- Liaison hydrogène	11
1-3-5- Acidité	11
1-4- Propriétés thérapeutiques des poly phénols	12
1-4-1- Etudes épidémiologiques et propriétés biologiques <i>in vitro</i>	12
1-4-2- Effet antiallergique	12
1-4-3- Effet anti-inflammatoire	13
1-4-5- Effet anti-ulcère	13
1-4-6- Autres activités biologiques	14
1-5- Propriétés pro-oxydantes des poly phénols	14
1-6- Rôle et intérêt des composés phénoliques	15
1-6-1- Chez les végétaux	15
1-6-2- Chez les humains	16
1-6-3- Dans la régénération des sols pollués	16
1-7- Les antioxydants phénoliques	16
<b>CHAPITRE 2: Stabilité des composés polyphénols</b>	
2-1-Stabilité des polyphénols	18
2-1-1- Autoxydation	18
2-1-2- Mécanismes d'oxydation	19
<b>CHAPITRE 3 : L'acide ascorbique , Acide Gallique et Vanilline</b>	
3-1- L'acide ascorbique	26
3-1-1- Historique de l'acide ascorbique	26
3-1-2- Le métabolisme de l'acide ascorbique	27
3-1-3- Les sources d'acide ascorbique	27
3-1-4- Les rôles physiologiques de l'acide ascorbique	28
3-1-4-1- Rôle d'hydroxylation	28

3-1-4-2- Le rôle antioxydant	29
3-2- Acide Gallique	29
3-2-1- Historique de l'acide gallique	30
3-2-2- Propriétés de l'acide gallique	30
3-2-3- Activités biologiques	31
3-3- L'acide vanilline	32
3-3-1-Origine de l'acide vanilline	32
3-3-2-Propriétés physiques et chimiques	32
3-3-3- Production et synthèse	33
3-3-4- Différences avec la vanille	35
3-3-5- Utilisation	35
<b><i>PARTIE PRATIQUE</i></b>	
<b>CHAPITRE4 : materiele et méthodes</b>	
4-Matériels et méthodes	37
4-1-Matériels	37
4-2-Méthodes	38
4-3-Techniques d'identification	38
4-3-1-Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible)	38
4-3-2-Analyse par la spectrophotométrie FT-IR	39
4-3-3-Evaluation l'activité antioxydante	43
4-3-3-Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil)	44
<b>CHAPITRE 5: resultats et descussion</b>	
5-1-Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible)	45
5-1-1-Les courbes d'étallonage d'acide ascorbique, gallique et vanilline	45
5-1-2- l'effet de température sur l'absorbance de les acides : ascorbique ,vanillinique, gallique	45
5-1-3-l'effet de l'oxygène sur l'absorbance de les acides : ascorbique ,vanillinique, gallique	47
5-2-Détermination de l'activité antioxydant des extraits	48
5-2-1-Pouvoir antioxydant total	50
5-3-Le test DPPH	51

5-4-Analyse par la spectrophotométrie FT-IR	60
descussion	63
cocclusion	68
Références bibliographiques	69

## Liste des figures

Figure	Titre	Page
<b>CHAPITRE 1 LES COMPOSES PHENOLIQUES</b>		
<b>01</b>	Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques	2
<b>02</b>	Structures chimiques des acides hydroxycinnamiques	2
<b>03</b>	Squelette de base des flavonoïdes	3
<b>04</b>	Structure chimique des flavanones	4
<b>06</b>	Structures chimiques de flavonols	4
<b>06</b>	Structures chimiques de certains flavan-3-ols	5
<b>07</b>	Structure chimique de certains anthocyanidines courantes	5
<b>08</b>	Exemples de structures de composés phénoliques	6
<b>09</b>	Structures de l'hydroxytyrosol (a) et du tyrosol (b)	6
<b>10</b>	Structures de l'oleuropéine	7
<b>11</b>	Structure chimique (a) d'un tanin condensé (proanthocyanidol) et (b) d'un taningallique (1,2,3-tri-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose)	8
<b>12</b>	Forme smésomèresduphénol	8
<b>13</b>	Oxydation mono-électronique d'un phénol et formes mésomères	10
<b>15</b>	Mécanisme de formation d'espèces réactives par l'acide gallique, métabolite du propylgallate	15
<b>CHAPITRE 2 STABILITE DES COMPOSES PHENOIQUES</b>		
<b>16</b>	Oxydation des polyphénols présentant un noyau catéchol et principales formes oxydées (o-quinones et semi-quinones)	21
<b>17</b>	Réaction de transfert d'atome H depuis l'acide caféique, (En Kcal mol <sup>-1</sup> , BDE = bond dissociation énergie : capacité du phénol à céder un hydrogène)	22
<b>18</b>	Produits d'oxydation de l'acide caféique par voie de dimérisation	23
<b>19</b>	Produits d'oxydation de la catéchine par voie de dimérisation	24
<b>20</b>	Produits d'oxydation de la quercétine	25
<b>CAPITRE 3 : ASCORBIQUE , GALLIQUE ET VANILLIQUE</b>		
<b>21</b>	Structure du composés d'acide gallique	30
<b>CAPITRE 4: MATERIELS ET METHODES</b>		
<b>22</b>	Chromatogramme de vitamine E MAX	40

23	L'image le FTIR situé la détoure VTRS.	41
24	Schéma de principe de spectroscopie d'absorption infrarouge.	41
<b>CAPITRE 5: RESULTATS ET DESCUSSION</b>		
25	Courbe d'étalonnage de l'acide Ascorbique	45
26	Courbe d'étalonnage des l'Acide Galique	46
27	Courbe d'étalonnage de l'acide Vanilline	47
28	courbe de l'effet de température sur l'absorbance d'acide Ascorbique	48
29	courbe de l'effet de température sur l'absorbance d'acide vanillique.	48
30	courbe de l'effet de température sur l'absorbance d'acide gallique .	49
31	activité antioxydant (DPPH) d'acide gallique à 50 °C pendant 30 min	52
32	activité antioxydant (DPPH) d'acide gallique à 60 °C pendant 30 min	53
33	activité antioxydant (DPPH) d'acide gallique à 70 °C pendant 30 min	53
34	activité antioxydant (DPPH) d'acide gallique à 50 °C pendant 30 min	54
35	activité antioxydant (DPPH) d'acide gallique à 90 °C pendant 30 min	54
36	activité antioxydant (DPPH) d'acide vanilline à 50 °C pendant 30 min	55
37	activité antioxydant (DPPH) d'acide vanilline à 60 °C pendant 30 min	55
38	activité antioxydant (DPPH) d'acide vanilline à 70 °C pendant 30 min	56
39	activité antioxydant (DPPH) d'acide vanilline à 80 °C c° pendant 30 min	56
40	activité antioxydant (DPPH) d'acide vanilline à 90 °C c° pendant 30 min	57
41	Activité antioxydant (DPPH) d'acide ascorbique à 60 °C pendant 30 mn	57
42	Activité antioxydant (DPPH) d'acide ascorbique à 70 °C pendant 30 mn	58
43	Activité antioxydant (DPPH) d'acide ascorbique à 80°C pendant 30 mn	58
44	Activité antioxydant (DPPH) d'acide ascorbique à 90°C pendant 30 mn	59
45	Activité antioxydant (DPPH) d'acide ascorbique à 100 °C pendant 30 mn	59
46	Spectre infrarouge de l'acide ascorbique traité à 50 °C pendant 2 h	60
47	Spectre infrarouge de l'acide ascorbique traité à 100 °C pendant 2 h	60

<b>48</b>	Spectre infrarouge de l'acide gallique traité à 50 °C pendant 2 h	61
<b>49</b>	Spectre infrarouge de l'acide gallique traité à 100 °C pendant 2 h	61
<b>50</b>	Spectre infrarouge de l'acide vanillique traité à 50 °C pendant 2 h	62
<b>51</b>	Spectre infrarouge de l'acide vanillique traité à 100 °C pendant 2 h	62
<b>52</b>	Hypothèse de mécanisme de dégradation des proanthocyanidines en milieu acide à chaud.	63

## LISTE DES TABLEAUX

<b>tableaux</b>	<b>Titre</b>	<b>page</b>
<b>CAPITRE 5: RESULTATS ET DESCUSSION</b>		
1	l'effet de température sur l'absorbance d'acide Ascorbique	47
2	l'effet de température sur l'absorbance d'acide vanillique.	47
3	l'effet de température sur l'absorbance d'acide gallique .	47
4	l'effet de l'oxygène sur l'absorbance d'acide Ascorbique	49
5	l'effet de l'oxygène sur l'absorbance d'acide vanillique.	49
6	l'effet de l'oxygène sur l'absorbance d'acide gallique	49
7	Résultat de l'activité ontioxydant	51

## *Liste des abréviations*

<b>Abréviation</b>	<b>Désignation</b>
<b>AA</b>	Acide ascorbique
<b>AV</b>	Acide vanillique
<b>CAT</b>	Capacité anioxydante totale
<b>DPPH</b>	1,1- diphenyl-2-pierylhydrazyl
<b>FT-IR</b>	Spectrophotométrie de l'infrarouge
<b>AG</b>	Acide gallique équivalente
<b>h</b>	heure
<b>mg</b>	milligramme
<b>ml</b>	mimilitere
<b>min</b>	minute
<b>UV- visible</b>	Spectrophotométrie ultra violet
<b>T</b>	température en (°C)
<b>C<sub>0</sub></b>	concentration initiale du soluté en (mg/ml)
<b><math>\lambda</math></b>	la longueur d'onde du faisceau incident
<b>I</b>	intensité de la lumière transmise I toujours inférieure à I <sub>0</sub>
<b>IC</b>	pourcentage d'inhibition
<b>I<sub>0</sub></b>	intensité de la lumière incidente

# INTRODUCTION GENERALE

---

## Introduction-Présentation du sujet

Le régime méditerranéen, caractérisé par une consommation élevée et variée de produits végétaux (légumes, fruits, huile d'olive, thé . etc), est associé à un allongement de l'espérance de vie. Plusieurs études épidémiologiques suggèrent que la protection qu'une alimentation riche en produits végétaux semble apporter contre le développement de diverses pathologies dégénératives associées au stress oxydant telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives et divers cancers, seraient due aux microconstituants de cette diète dont les polyphénols sont les principaux représentants [1, 2]. Les polyphénols possèdent un large éventail d'activités biologiques *in vitro* (antibactériennes, anti-cancérogène, anti-inflammatoire, antioxydante etc...) liées à leur caractère réducteur et à leur affinité. Les polyphénols présentant ainsi des propriétés antioxydantes bien établies et en lien avec l'inhibition de l'oxydation aussi bien dans le domaine alimentaire (oxydation des lipides) que physiologique (stress oxydant). Ces substances suscitent beaucoup d'intérêts dans plusieurs domaines, celui de la nutrition par leur caractère préventif à l'égard de diverses maladies citées précédemment, en cosmétologie et surtout dans les industries agroalimentaires par leurs implications, en particulier, sur la flaveur des aliments et leur incidence sur la conservation des produits alimentaires. Ainsi, ils pourraient constituer une alternative à l'utilisation des additifs alimentaires synthétiques, buthylhydroxyanisole (BHA) et buthylhydroxytoluène (BHT), qui ont montré des effets nuisibles (effet carcinogène) [3].

Une meilleure connaissance du devenir des polyphénols d'importance alimentaire après ingestion et des effets nutritionnels qui en découlent est essentielle d'un point de vue de nutrition préventive. Un des objectifs de la recherche en nutrition préventive est de parvenir à démontrer *in vivo* les effets de la consommation de polyphénols sur la santé et à identifier, parmi les centaines de polyphénols, ceux qui pourraient jouer un rôle protecteur plus important dans une optique de nutrition préventive.

Aujourd'hui encore, ces molécules n'ont pas livré tous leurs secrets. Notre travail s'inscrit dans un programme de recherche visant à mieux comprendre l'effet des conditions de stockage tel que la température et l'oxygène sur la stabilité de quelques composés phénoliques (acide ascorbique, acide gallique, vanilline). Aussi, on étudie l'effets de ces paramètres sur le pouvoir antioxydant.

Afin de mieux situer dans le contexte dans lequel s'inscrit cette présente étude, une synthèse bibliographique est présentée sur les polyphénols : structures et propriétés, capacité antioxydante, biodisponibilité et effet santé.

## INTRODUCTION GENERALE

---

Le deuxième chapitre est consacré à la stabilité des composés phénoliques et l'effet de température sur la stabilité (dégradation) de l'acide gallique, ascorbique et la vanilline.

Le troisième chapitre présente les caractéristiques liées avec les composés phénoliques (l'acide gallique, ascorbique et la vanilline).

La mise au point d'un protocole de réduction du radical DPPH• de l'effet des différentes température et d'étudier l'influence sur l'activité antiradicalaire des composés phénoliques;

- Des tests colorimétriques ont permis d'évaluer la sensibilité de nos composés phénoliques et l'influence de température sur la stabilité de ces composés.

Ces travaux, conduits à des températures supérieures à 60 C°, les composés phénoliques commencent à se dégrader et se déstabiliser, les mêmes résultats sont assimilés pour l'activité antioxydante totale.



*PARTIE*

*bibliographique*



*Chapitre 1:*

*LES COMPOSE*

*PHENOLIQUE*

**1-1- Généralités:**

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement. 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 (tanins condensés). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées, 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 (Allélopathie), entre les plantes et les symbioses, 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. D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales, alliées à leur difficulté de production. Chez l'homme, ces molécules jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...) [4].

**1-2 -Classification des polyphénols :**

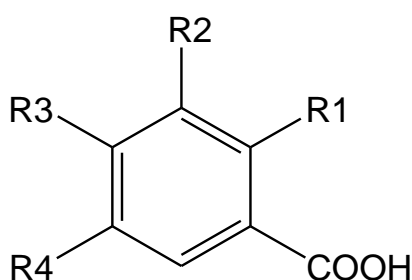
La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. On peut distinguer deux catégories : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes [5 ,6].

**1-2-1 Polyphénols simples :****1-2-1-1-Acides phénoliques :**

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils sont représentés par deux sous-classes : les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique[7].

▪ **Dérivés de l'acide hydroxybenzoïque(C6-C1) :**

Ces acides sont très communs aussi bien sous forme libre que sous forme combinée à l'état d'esters ou hétérosides [7, 8]. Cette catégorie est abondante dans les végétaux et les aliments, notamment les épices, les fraises, certains fruits rouges et l'oignon dans lesquels les concentrations peuvent atteindre plusieurs dizaines de milligrammes par kilogramme de fruits frais [8]. Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque les plus répandus sont illustrés dans la figure suivante :

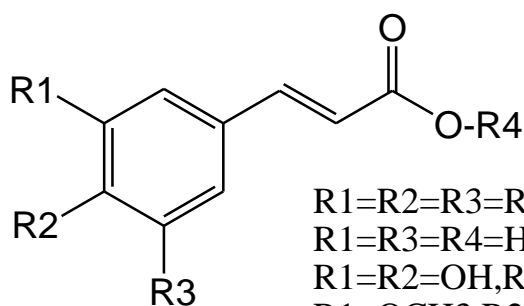


R1=R2=R3=R4=H :acide benzoïque(non phénolique)  
 R1=R2=R4=H,R3=OH :acide p-hydroxybenzoïque  
 R1=R4=H,R2=R3=OH :acide protocatéchique  
 R1=R4=H,R2=OCH3,R3=OH :acide vanillique  
 R1=H,R2=R3=R4=OH :acide gallique

**Figure 1 :** Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques[7].

▪ **Dérivés de l'acide hydroxycinnamique(C6-C3) :**

Ces composés ont une distribution très large. Rarement libres, ils sont souvent estérifiés[5] et peuvent également être amidifiés ou combinés avec des sucres (O-acylglucosides, O-arylglucosides) ou des polyols tels que l'acide quinique(**Figure 2**) [7].



R1=R2=R3=R4=H :acide cinnamique(non phénolique)  
 R1=R3=R4=H,R2=OH :acide p-coumarique  
 R1=R2=OH,R3=R4=H :acide caféique  
 R1=OCH3,R2=OH,R3=R4=H :acide férulique  
 R1=R2=OH,R3=H,R4= :acide chlorogénique

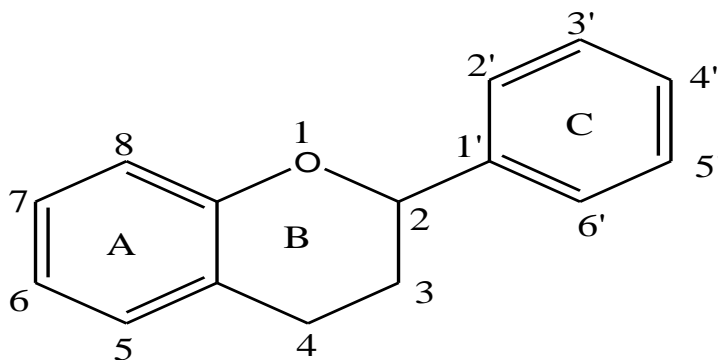
**Figure 2:** Structures chimiques des acides hydroxycinnamiques[9, 10].

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) [11]. L'acide chlorogénique est présent en très forte concentration dans la pomme (430 mg/kg) [12] et dans le café, une seule tasse peut en contenir de 70 à 350 mg [11].

### 1-2-1-2- Flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des composés possédant un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane, formant une structure C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (**Figure 3**) [13]. Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs et dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes [14]. Les flavonoïdes sont présents dans une grande variété d'aliments (fruits et légumes, céréales, jus de fruits, thé et vin...).

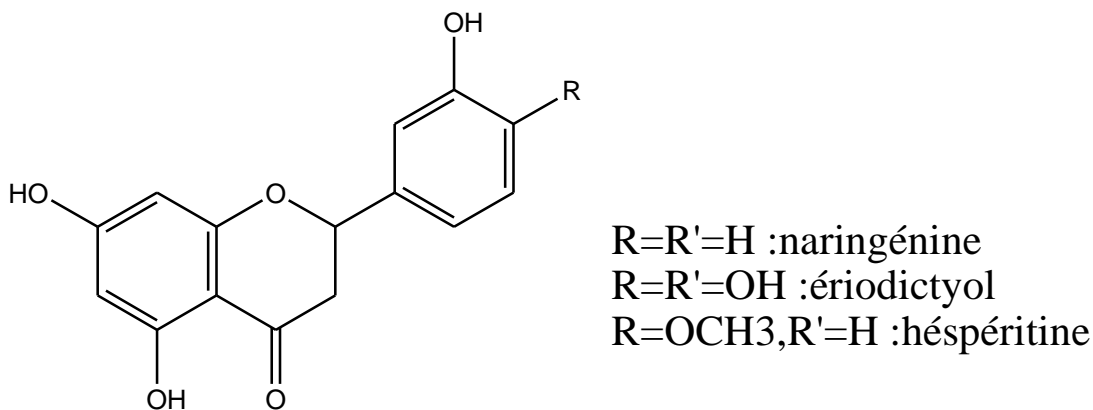


**Figure 3:** Squelette de base des flavonoïdes [14].

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 4, 5 et 7. Ces substances existent généralement sous forme de glycosides [10].

#### • Flavanones:

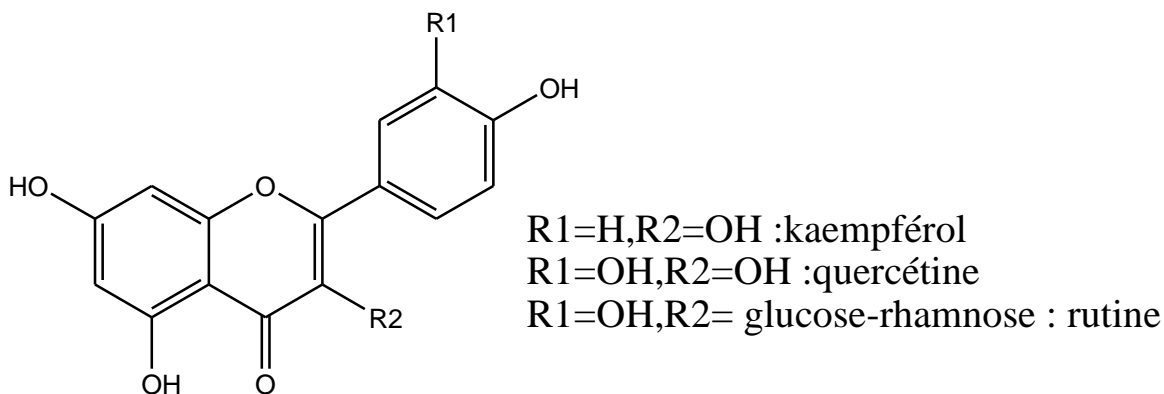
Les flavanones sont caractérisées par l'absence de la double liaison entre C2 et C3 et par la présence d'un centre de chiralité en C2 [7, 10]. Les agrumes constituent la principale source alimentaire de flavanones. Les principaux aglycones sont l'ériodictyol dans le citron, la naringénine dans le pamplemousse et l'hespéritine dans l'orange (**Figure 4**) : un jus d'orange contient entre 200 et 600 mg d'hespéritine/L[11].



**Figure 4:** Structure chimique des flavanones[15].

• **Flavonols:**

Les flavonols se distinguent par la présence d'un groupement OH en position C3 et d'une double-liaison en C2-C3 (**Figure 5**). Ils peuvent exister soit sous forme d'aglycones, soit sous forme d'hétérosides. Les sucres les plus souvent impliqués sont des aldoses: D-glucose et L- rhamnose[14]. Leurs principaux représentants sont la quercétine, le kaempférol et la rutine. Les sources les plus riches sont les oignons (350-1200mg/kg de matière fraîche) [16, 17], le poireau, le chou et les baies telles que le cassis (115 mg/kg de matière fraîche) [18]. Le thé contient aussi des flavonols à hauteur de 45mg/L[19].



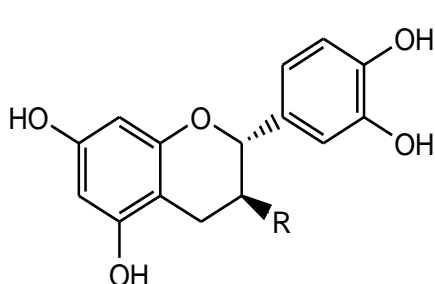
**Figure 5:** Structures chimiques de flavonols[14].

• **Flavan-3ols:**

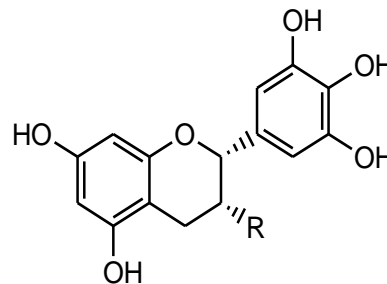
Les flavan-3-ols ou dérivés de catéchine sont la catégorie de flavonoïdes la plus complexe. Ces composés vont des simples monomères, (+) catéchine et son isomère (-)épicatechine, jusqu'aux oligomères et polymères, les proanthocyanidines. De plus, les flavan-3-ols peuvent être estérifiés par l'acide gallique ou hydroxylés pour former les

gallocatéchines (épicatechine gallate, épigallocatéchine, épigallocatéchine gallate)

(**Figure 6**) [10]. 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 [20, 15].



R= OH catéchine  
R= O-galloylcatéchine gallate

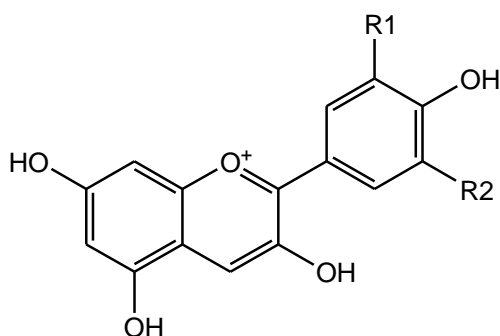


R = OH épigallocatéchine  
R = O-galloyl épigallocatéchine gallate

**Figure 6:** Structures chimiques de certains flavan-3-ols [10].

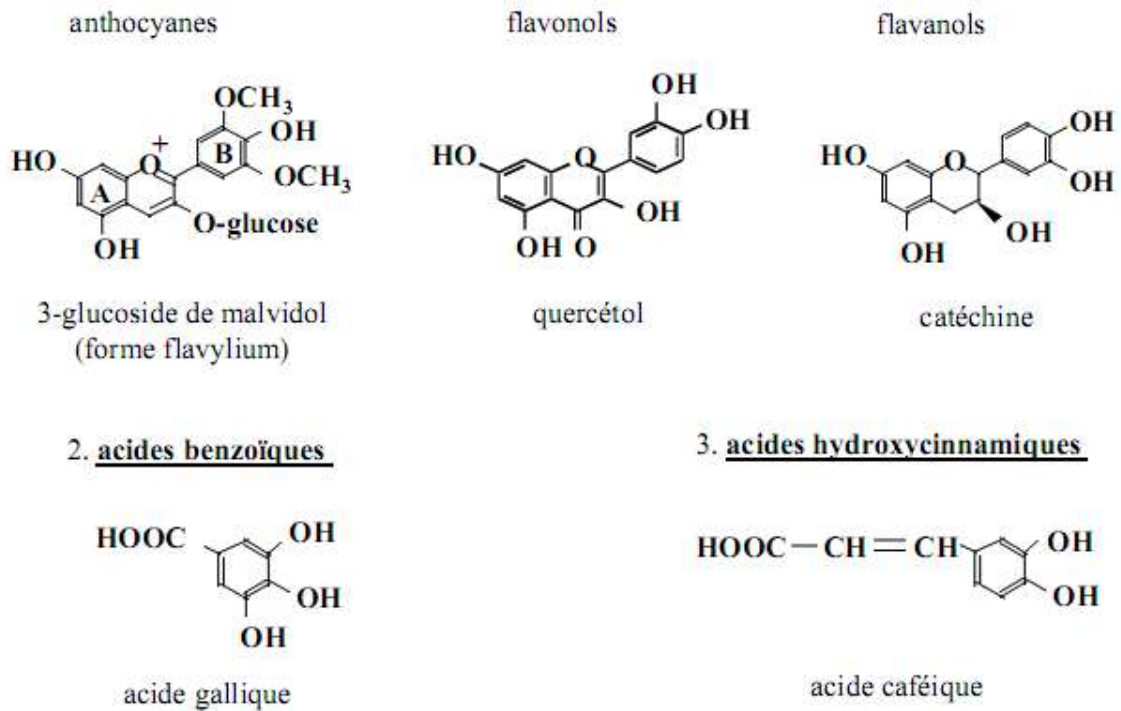
- **Anthocyanidines:**

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 [21]. Les composés les plus courants sont la pélagonidine, la cyanidine et la malvidine (**Figure 7**) [22, 23]. Ils sont présents dans le vin rouge (340-420 mg de malvidine 3-O-glucoside/L) [18]. De nombreux glucosides de cyanidine et deux dérivés de pélagonidine ont aussi été caractérisés dans l'oignon rouge [24].



R1=R2=H : pélagonidine  
R1=OH, R2=H : cyanidine  
R1=R2=OCH<sub>3</sub> : malvidine

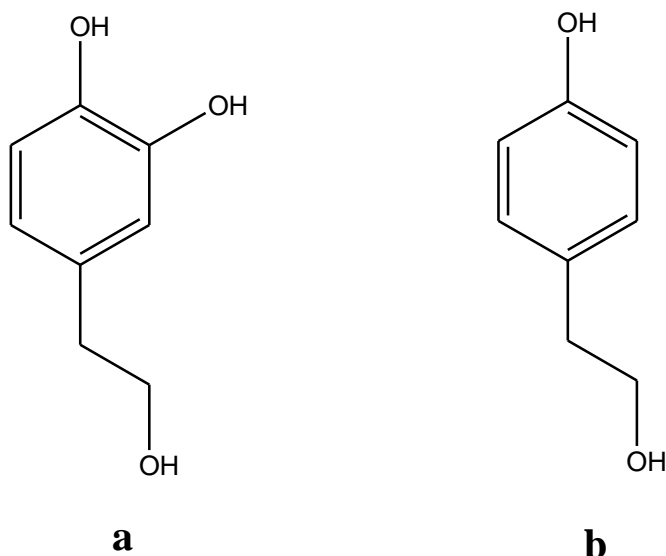
**Figure 7:** Structure chimique de quelques anthocyanidines courantes [9, 10].



**Figure 8:** Exemples de structures de composés phénoliques

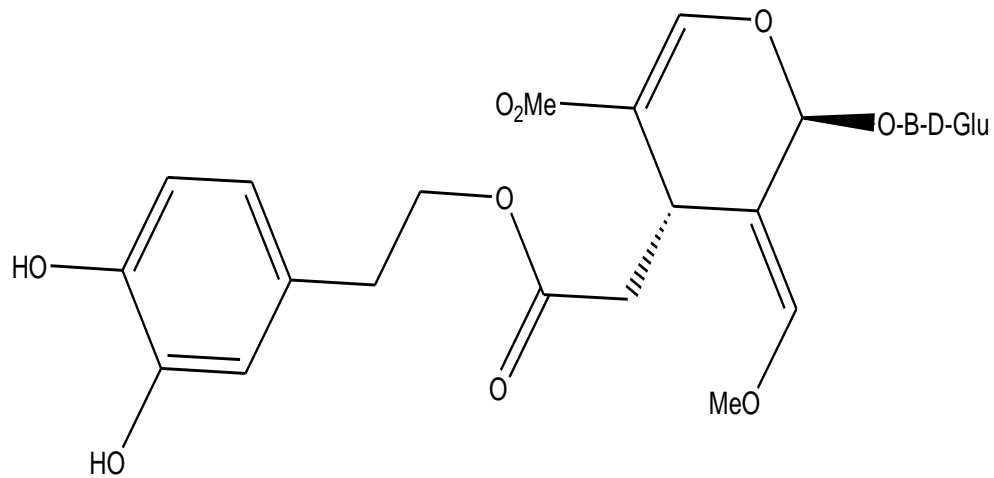
**1-2-1-3-Alcoolspénoliques :**

Un alcool phénolique est un composé organique possédant au moins un alcool aliphatique et un hydroxyle phénolique. Le tyrosol (4-hydroxyphenylethanol) et hydroxytyrosol (3,4 dihydroxyphenylethanol) (**Figure 9**) 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[25, 26].



**Figure 9 :** Structures de l'hydroxytyrosol(**a**) et du tyrosol(**b**) [15].

Le principal alcool phénolique de l'olive (responsable de l'amertume du fruit) est l'oleuropéine (**Figure 10**) (60 à 90 mg/g matière sèche) [27].



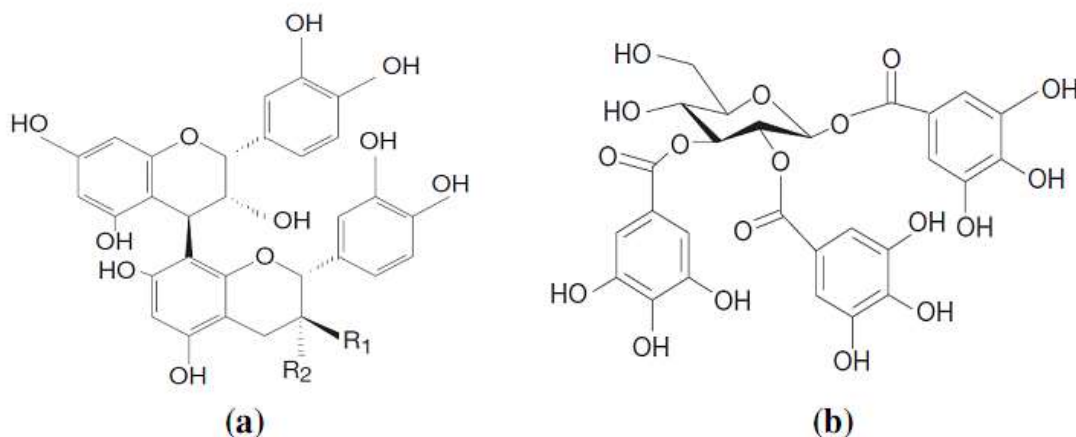
**Figure 10:** Structures de l'oleuropéine[27].

#### 1-2-1-4- Polyphénols complexes(tanins) :

Les tanins représentent une classe très importante de polyphénols localisés dans les vacuoles [28]. Historiquement, le terme « tanin » regroupe des composés polyphénoliques caractérisés par leurs propriétés de combinaison aux protéines [24], d'où leur capacité à tanner le cuir. Sur le plan structural, les tanins sont divisés en deux groupes, tanins hydrolysables et tanins condensés [29]:

- **Tanins hydrolysables** : ce sont des esters du D-glucose et de l'acide gallique ou de ses dérivés, en particulier l'acide ellagique(**Figure 11**) [30, 31]. Ces substances sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique (tannase)[32].
- **Tannins condensés** : les tannins condensés ou les proanthocyanidines sont des polymères constitués d'unités flavane reliées par des liaisons entre les carbones C4 et C8 ou C4 et C6 (**Figure 11**) [33, 31].

En raison de leur complexation avec les protéines salivaires, les tanins condensés sont responsables de l'astringence caractéristique des fruits avant maturité (raisin, pêche, pomme, poire, etc...) et de certaines boissons (vin, cidre, thé, etc...) et de l'amertume du chocolat.

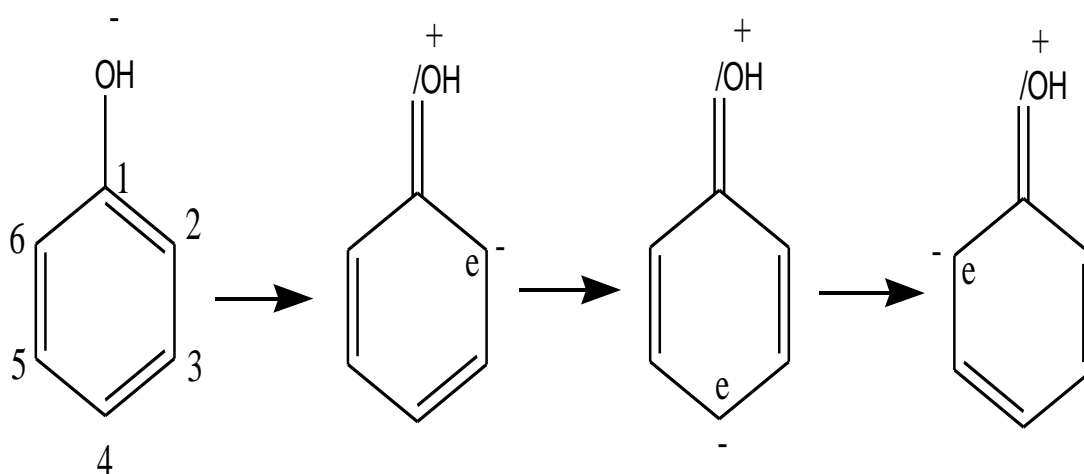


**Figure 11:** Structure chimique (a) d'un tanin condensé (proanthocyanidine) et (b) d'un gallotanin (1,2,3-tri-O-galloyl-β-D-glucose) [34].

### 1-3- Propriétés chimiques des polyphénols: I.3. Propriétés chimiques des polyphénols :

Les propriétés chimiques des polyphénols sont essentiellement liées à celles des noyaux phénoliques,[35] particulièrement des substituants à effet mésomère attracteur d'électrons (-M) et substituants à effet mésomère donneur (+M). La conjugaison d'une des deux paires libres de l'atome avec le cycle traduit l'effet (+M) du groupe OH.

Ce phénomène augmente la délocalisation électronique et produit une charge négative partielle sur les atomes C2, C4, C6. L'effet (+M) peut être représenté par quatre formes mésomères.



**Figure 12 :** Formes mésomères du phénol .

De ces caractères de base découlent les différentes propriétés physico-chimiques suivantes :

### 1-3-1- Nucléophilie :

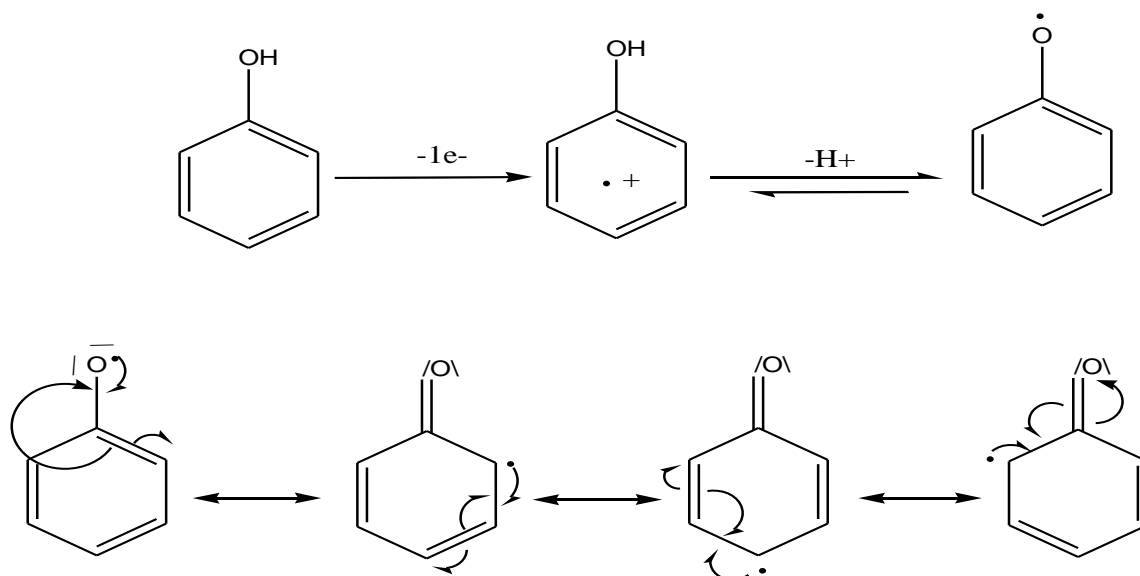
La nucléophilie des composés phénoliques est portée par l'atome d'oxygène et les atomes de carbone en ortho et para du groupement OH (suite à l'effet (+M)). Cette propriété est à l'origine des réactions de substituants électrophiles aromatique (alkylation, acylation, etc.) régiosélectives des positions ortho et para. Les substituants de type 1,3-dihydroxy (résorcinol) et 1,3,5-trihydroxy (phloroglucinol) permettent une accumulation de densité électronique sur les sommets C2, C4 et C6 (tous *ortho* ou *para* des groupements OH), accentuant ainsi le caractère nucléophile.

Le cycle A des flavanols possède deux centres C6 et C8 fortement nucléophiles car en *ortho* et en *para* de trois groupements OH ou OR à effet (+M). Le noyau A est également activé par le groupement carboné saturé en C4. Cette nucléophilie permet des réactions de substitutions électrophiles aromatiques qui peuvent par exemple intervenir lors de la production du thé noir.

### 1-3-2- Propriétés réductrices :

Le potentiel d'ionisation (PI) d'une molécule est l'énergie minimale qu'il faut lui fournir pour lui arracher un électron. Plus un composé aromatique est substitué par des groupements donneurs d'électrons, plus son PI est faible et plus son caractère réducteur est grand.

Il peut alors subir une oxydation mono-électronique qui conduit au radical correspondant. Dans le cas d'un phénol  $\text{ArOH}$ , le radical-cation formé est un acide fort qui se déprotonne aussitôt pour conduire à un radical phénoxy ou aryloxy  $\text{ArO}$  [35].



**Figure 13:** Oxydation mono-électronique d'un phénol et formes mésomères du radical aryloxy formé.

Le radical aryloxy ( $\text{ArO}^\bullet$ ) peut être formé directement par transfert d'hydrogène phénolique vers un radical de haute énergie tels que les radicaux oxyl ( $\text{RO}^\bullet$ ) et peroxy ( $\text{ROO}^\bullet$ ) formés par exemple au cours de l'autoxydation des lipides.

Ces réactions de transfert d'atome H et/ou d'électrons avec conversion d'un radical très réactif en radical aryloxy stabilisé par résonance sont l'un des principaux mécanismes d'action antioxydantes des phénols. La capacité du phénol à céder un atome H peut être quantifiée par l'énergie de dissociation homolytique de la liaison OH (*bond dissociation energy, BDE*). Plus la BDE d'un phénol est faible, plus fort est son caractère donneur d'hydrogène.

### 1-3-3- Polarisabilité :

La polarisabilité des phénols leur permet de développer de fortes interactions moléculaires de dispersion (composante attractive des interactions de Vander Waals) avec autres composés polarisables. Ce phénomène résulte du couplage entre les fluctuations électroniques de deux molécules voisines. Ainsi, en solution aqueuse, l'interaction du noyau benzénique apolaire du phénol avec une autre entité polarisable telle qu'un second cycle aromatique est favorisée par l'effet hydrophobe.

Les molécules d'eau de solvation s'organisent de manière à maintenir entre elles autant de liaison hydrogène que possible, et de ce fait, l'empilement de deux noyaux benzéniques dans l'eau a deux conséquences avantageuses:

- Le développement de forte interaction de dispersion entre les deux noyaux;
- Le relargage d'une partie des molécules d'eau de solvation dans le corps du solvant.

Ce dernier phénomène, appelé « Effet hydrophobe » puisqu'il minimise la surface de contact entre les deux solutés et l'eau, se traduit par une augmentation du nombre de liaison hydrogène entre noyau et molécule d'eau ( $\Delta_0 < 0$ ) et une relative désorganisation ( $\Delta_s \Delta_0$ ) qui tendent à stabiliser le complexe moléculaire formé entre deux molécules empilées.

La combinaison des interactions de dispersion et de l'effet hydrophobe constitue la principale force motrice pour la complexation moléculaire des phénols dans l'eau.

#### 1-3-4- Liaison hydrogène :

Les phénols sont des donneurs de liaison hydrogène (liaison H) en raison du caractère acide du proton du groupe OH. Ce sont aussi des accepteurs de liaison H. En fait, seule la paire libre de l'atome O qui n'est pas conjuguée avec le cycle est capable d'accepter une liaison H en provenance d'un donneur. Ainsi, un phénol est capable de donner une liaison H et d'en recevoir une seulement. Notons que ces liaisons H se renforcent mutuellement (coopérativité). Par exemple, en donnant une liaison H, le phénol allonge sa liaison OH. Cet état de prédissoassociation accentue la densité électronique sur le centre O et donc son caractère accepteur de liaison H.

#### 1-3-5- Acidité :

La coupure hétérolytique de la liaison OH (déprotonation) entraîne la formation d'un ion phénate dans lequel la délocalisation électronique de l'atome O vers le cycle (effet +M) est fortement augmentée (**Figure 12**). Ce phénomène et la forte solvation de l'anion phénate par formation de liaison H avec l'eau permettent d'expliquer les propriétés acides faibles des phénols dans l'eau. Les propriétés caractéristiques des phénols (nucléophilie, caractère réducteur, polarisabilité) sont amplifiées lors de la formation des anions phénates correspondants.

Les groupements OH en position para et ortho des noyaux phénoliques de polyphénols présentent un caractère acide renforcé, ce qui permet une dissociation au moins partielle à pH neutre. Cette exaltation de l'acidité est due à la stabilisation de l'ion phénate correspondant par délocalisation de la densité électronique vers le groupement à effet (-M). Elle peut être traduite en termes de formes mésomères.

#### 1-4- Propriétés thérapeutiques des polyphénols :

##### 1-4-1- Etudes épidémiologiques et propriétés biologiques *in vitro* :

Les propriétés biologiques des polyphénols sont essentiellement établies *in vitro* et découlent de leur activité réductrice (effets anti- voire pro-oxydants) et de leur affinité pour une grande variété de protéines (enzymes, récepteurs, facteurs de transcription).

L'une des premières propriétés reconnue aux flavonoïdes est d'être «veino-actifs» c'est-à-dire ayant la capacité de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance.

De nos jours, les propriétés des polyphénols sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités anti-virales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, anti-allergiques et anti-cancer. Ils ont également des actions positives sur l'obésité, le diabète, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Les catéchines du thé sont des inhibiteurs de l'angiogénèse *in vitro*.

Les activités biologiques des polyphénols ont souvent été évaluées *in vitro*, avec des protéines purifiées, des extraits cellulaires et des cellules entières en culture. Les propriétés biologiques des métabolites conjugués majoritairement présents dans le sang et les tissus ont en revanche été très peu étudiées, faute de disposer des standards commerciaux.

La signification de ces effets biologiques dans le domaine de la nutrition humaine est encore loin d'être établie d'autant qu'ils mettent presque toujours en jeu les formes natives ou aglycones de polyphénols et non pas les formes conjuguées circulantes. Pour progresser dans la démonstration *in vivo* des effets santé des polyphénols, une meilleure connaissance de la biodisponibilité des polyphénols (leur devenir après absorption éventuelle au travers de la paroi intestinale) et une combinaison d'études cliniques pertinentes est indispensable. Le développement récent de nouveaux outils et méthodes pourrait permettre des avancées importantes dans les années à venir. C'est notamment le cas de la nutriginomique qui vise à mettre en évidence les gènes dont l'expression est régulée (à la hausse ou à la baisse) par les composants de l'alimentation. La difficulté réside ensuite dans l'analyse et l'interprétation de ces données biologiques complexes.

##### 1-4-2- Effet anti-allergique :

Ces effets sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante, responsables de la libération de

l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATPase  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules. En inactivant cette enzyme, la quercétine a montré un potentiel d'action supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme[36].

#### 1-4-3- Effet anti-inflammatoire :

Sous l'action de la cyclooxygénase et la lipoxygénase, l'acide arachidonique est métabolisé respectivement en prostaglandines et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. Une étude de Landolfi et son groupe a montré que certains polyphénols sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes[37]. Les effets de la quercétine et de la myricétine sont dose-dépendants. A de fortes concentrations, ils inhibent la cyclooxygénase et la lipoxygénase. Cependant, à de faibles concentrations, seule la lipoxygénase est affectée. En revanche, d'autres flavonoïdes tels que l'apigénine et la chrysin agissent principalement sur l'activité de la cyclooxygénase.

La phagocytose qui accompagne une infection virale ou bactérienne est suivie d'une production d'espèces oxygénées réactives par les neutrophiles, ce qui va promouvoir l'inflammation. D'une manière générale, les espèces radicalaires, quelles que soient leurs origines, peuvent induire des dommages tissulaires, favoriser le processus de vieillissement, voire être à l'origine de certaines pathologies telles que le cancer et l'athérosclérose[38]. Il est intéressant de noter que de nombreux flavonoïdes sont capables de contrer cette production d'espèces oxygénées par les neutrophiles[39].

#### 1-4-4- Effet anti-ulcère :

Dans des expériences réalisées sur des rats, il a été démontré que la quercétine et la naringénine jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques. Il a été suggéré que la quercétine exerce son activité via un mécanisme complexe impliquant la production du mucus, le piégeage des radicaux libres et également l'inhibition de la production de leucotriènes [40].

D'autres études ont permis d'établir une relation étroite entre les propriétés anti-ulcère de la quercétine, la naringénine, la rutine et le kaempférol, et la production de PAF (*Platelet Activating Factor*) qui est un agent ulcérogène potentiel [41]. En effet, il s'est

avéré que la réduction des dommages gastro-intestinaux est due probablement à l'inhibition du PAF par ces flavonoïdes.

#### **1-4-5- Effet anti-cancer :**

Présente dans tous les types de thé et en particulier dans le thé vert, la catéchine a montré une activité anti-tumorale[42]. Une telle activité est attribuée à la capacité de ce flavonoïde à inactiver l'action de la P-glycoprotéine qui est impliquée dans la résistance phénotypique des cellules cancéreuses[43]. La croissance cellulaire peut être inhibée également par d'autres mécanismes, à savoir : la stabilisation du collagène, l'altération de l'expression des gènes et la réduction des radicaux libres[37]. En effet, la catéchine augmente la résistance du collagène et inhibe l'activité de la collagénase [45].

Les flavonoïdes ont montré des effets protecteurs contre les cancers de la prostate, du côlon et du poumon [46].

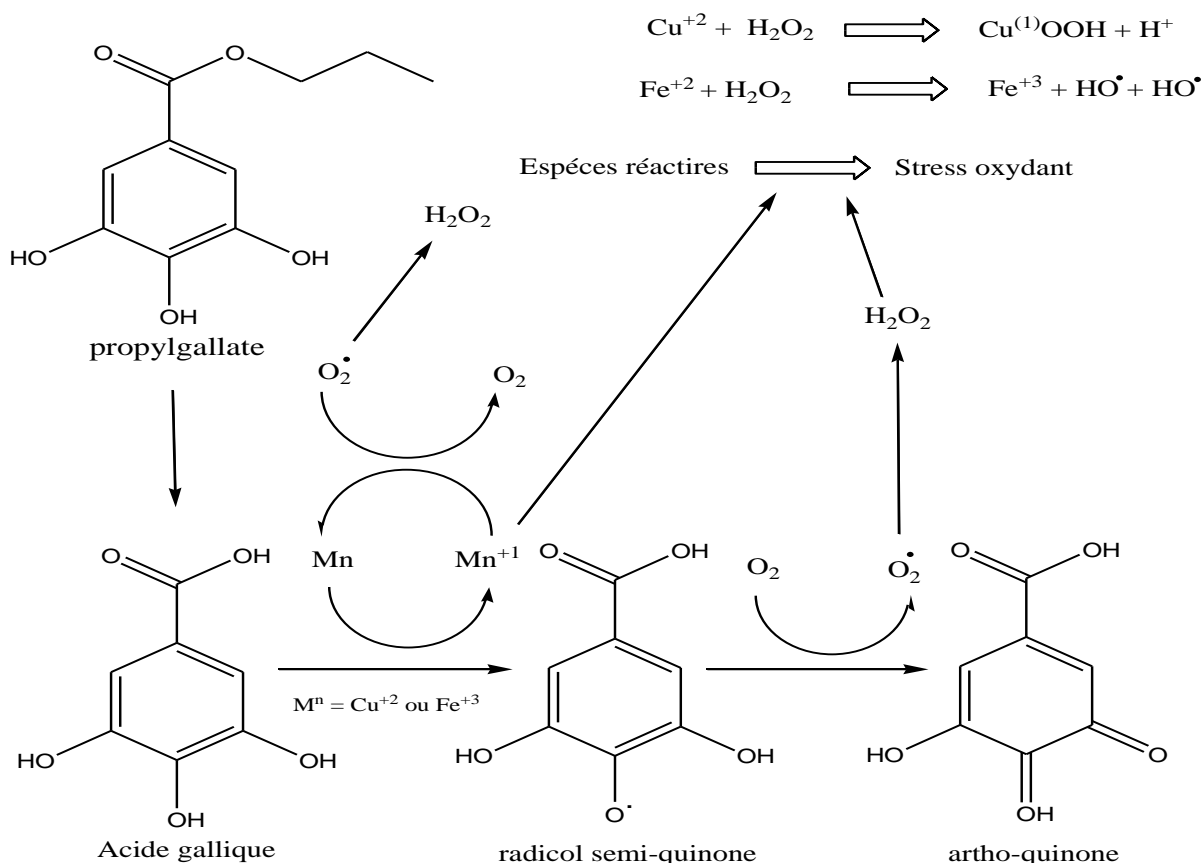
#### **1-4-6- Autres activités biologiques :**

Les flavonoïdes peuvent aussi prévenir le développement du diabète en inhibant l'enzyme aldose réductase. Ong et Khoo ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques [47,48,49]. Certains flavonoïdes peuvent inhiber l'athérosclérose et par conséquent réduire le risque des maladies cardiovasculaires [50,45]. Les effets anti-viraux des flavonoïdes ont été également démontrés[51].

#### **1-5- Propriétés pro-oxydantes des polyphénols :**

Certains polyphénols particulièrement réducteurs peuvent manifester une activité pro-oxydante en entrant dans des cycles redox qui génèrent des EOR. Par exemple, l'acide gallique est capable de réduire  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$ , ou  $Cu^{2+}$  en  $Cu^{+}$ , et ainsi d'enclencher la réaction de Fenton avec formation du radical hydroxyle (**Figure 15**) [53,54,55]. Le peroxyde d'hydrogène nécessaire à la réaction est produit par autoxydation des ions de basse valence. Par leurs effets pro-oxydants, certains flavonoïdes peuvent promouvoir la dégradation oxydante de l'ADN.

La signification biologique de ces effets pro-oxydants est dépendante de la présence d'ions du fer libres, c'est-à-dire non liés aux protéines [55,56,57].



**Figure 15 :** Mécanisme de formation d'espèces réactives par l'acide gallique, métabolite du propylgallate[56].

De plus, des effets indésirables ont été rapportés suite à l'administration de doses pharmacologiques chroniques de polyphénols excédant la dose moyenne absorbée via l'alimentation. Ainsi, des cas de défaillance rénale, anémie, fièvre et réaction cutanée ont été relevés pour des doses allant de 1 à 1,5 g de flavonoïdes par jour[58].

### 1-6-Rôle et intérêt des composés phénoliques:

#### 1-6-1-Chez les végétaux :

Les composés phénoliques peuvent 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 la transformation; dans les variations de certaines caractéristiques des

végétaux lors des traitements technologiques (préparation des jus de fruits, des boissons fermentées...) pendant lesquels apparaissent fréquemment des brunissements enzymatiques qui modifient la qualité du produit fini .

#### **1-6-2-Chez les humains :**

Le rôle des composés phénoliques est largement montré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes . Spécifiquement, on attribue aux flavonoïdes des propriétés variées: veinotonique, antitumorale, anti-radicalaire, anti-inflammatoire, analgésique, antiallergique, antispasmodique, antibactérienne, hépatoprotectrice, estrogénique et/ ou anti-estrogénique. Ils sont également connus pour moduler l'activité de plusieurs enzymes ou de récepteurs cellulaires. Les flavonoïdes favorisent la relaxation vasculaire et empêchent l'agglutinement des plaquettes sanguines. Par conséquent, ils réduisent la coagulation du sang et le rendent plus fluide. Ils limitent l'oxydation des lipides sanguins et contribuent à la lutte contre les plaques d'athérome. Ils sont aussi anxiolytiques et protègent nos artères contre l'athérosclérose et réduit la thrombose (caillots dans les artères). .

#### **1-6-3-Dans la régénération des sols pollués :**

Ce processus était ignoré jusqu'à tout récemment et il consiste en la biotransformation des matières organiques dans le sol où la lignine du type syringyl (un des millions de composés phénoliques) joue un rôle essentiel, tout comme un grand nombre d'autres composés phénoliques. Cette biotransformation n'est que le début d'un long processus lié à la transformation des sols, ce qui est la régulation de la vie des sols, par un contrôle de la mise en disponibilité des nutriments. Elle influence directement la résistance à l'érosion, stimule, protège à la fois différentes phases de la vie animale, bactérienne, fongique qui sont les principales responsables de la pédogenèse . C'est ainsi que le sol demeure stable et fertile. La biotransformation des tissus organiques est responsable du maintien de la biodiversité et de la structure physique du sol. Ces caractéristiques biologiques régissent la disponibilité de l'azote et du phosphore[59].

#### **1-7- Les antioxydants phénoliques:**

Parmi les antioxydants naturels, les composés phénoliques, et plus particulièrement les acides phénoliques et les flavonoïdes, suscitent un intérêt grandissant.

Ce sont des composées, naturels, qui permet de ralentir le phénomène d'oxydation qui favorisent le vieillissement cellulaire on interrompant le passage du stress oxydatif et interceptant le « message » de l'apoptose (mort cellulaire programmé) .

D'un point de vue chimique, un antioxydant n'est qu'un composé réducteur : il va donc pouvoir réagir avec un oxydant pour le neutraliser. Les antioxydants vont ainsi réduire les radicaux libres si dangereux pour l'organisme en raison de leur pouvoir oxydant très élevé. Cependant, ce n'est qu'avec l'identification des vitamines A, C et E qu'est apparue l'importance des antioxydants dans la biochimie des organismes vivants.

L'oxydation constitue probablement l'un des paramètres majeurs à l'origine de l'altération des produits alimentaires et cosmétiques. Les dégradations oxydatives qui en résultent affectent les qualités nutritionnelles et sensorielles des produits et peuvent avoir des répercussions sur la santé humaine. Dans ce contexte, différents moyens de prévention sont disponibles pour limiter ces phénomènes. Parmi eux, la valorisation d'antioxydants d'origine végétale à des fins alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques représente un enjeu majeur pour la recherche et l'industrie.

L'homme n'est pas capable d'assurer la biosynthèse de la plus part des antioxydants, en particulier ceux de nature phénolique. Il doit les trouver dans la ration journalière est alors un facteur nutritionnel considéré comme positif par les nutritionnistes et bénéfique à notre santé .

Les différents constituants végétaux de notre ration alimentaire quotidienne sont généralement riches en polyphénols à forte activité antioxydante et, selon les habitudes alimentaires, nous pouvons en ingérer de 100mg par jour. Cela est particulier vrai dans les régimes dits « méditerranéens » ou la consommation de fruits, de légumes, céréales et d'huile d'olive est importante[60] .

## *Chapitre 2:*

*STABILITÉ DES COMPOSES*

*PHÉNOLIQUES*

**2-1- Stabilité des polyphénols :**

L'oxydation des polyphénols est susceptible d'intervenir :

- Par voie enzymatique (catalysée par la polyphénoloxydase dans des conditions d'aérobies ou par les peroxydases en présence de peroxyde d'hydrogène) au cours des procédés technologiques d'élaboration des aliments ou après ingestion (catabolisme oxydant).

- Par voie non enzymatique : autoxydation lors des traitements thermiques, oxydation conjointe à l'action antioxydante. Dans ce dernier cas, il s'agit typiquement de processus d'oxydation couplés à la peroxydation des lipides polyinsaturés et qui peuvent intervenir dans l'aliment ou chez l'homme après ingestion [61].

**2-1-1 -Autoxydation :**

Si la capture des espèces oxygénées réactives (EOR) est effectivement un mécanisme d'action antioxydante, la réaction éventuelle des phénols avec le dioxygène de l'air (autoxydation) est une cause potentielle d'instabilité et de toxicité par production des EOR. Heureusement, ce phénomène est défavorable :

- d'un point de vue thermodynamique, car la réduction mono-électronique du dioxygène requiert des réducteurs forts :  $O_2 + 1 e^- \rightarrow O_2^{\circ-}$ ,  $E^0 = - 0,16 \text{ V}$  pour  $c(O_2) = 1 \text{ M}$

Seuls les polyphénols les plus réducteurs et en milieu fortement basique où ils sont sous forme de polyanions seraient susceptibles de transférer directement un électron vers  $O_2$ .

- D'un point de vue cinétique, car le dioxygène présente deux électrons célibataires ( $OM \pi^*$ ) dans l'état fondamental qui lui confèrent un spin total de 1 (biradical). La loi de conservation du spin total au cours d'une réaction chimique autorise la combinaison des radicaux organiques avec  $O_2$  mais interdit l'oxygénation directe des molécules organiques dont les électrons sont appariés. Cependant les ions de métaux de transition, particulièrement Fe(III), contaminant par exemple les sels utilisés dans la préparation de solutions tampons, et dont la concentration peut aisément atteindre  $1 \mu\text{M}$ , peuvent catalyser efficacement l'autoxydation avec production de peroxyde d'hydrogène voire de superoxyde.

Pour un polyphénol à noyau catéchol ( $QH_2$ ), le bilan chimique de la réaction peut s'écrire :



La décomposition de  $\text{H}_2\text{O}_2$  par les traces métalliques (réaction de Fenton) conduit ensuite au radical  $\text{HO}^\circ$  très réactifs :



Ainsi, l'autoxydation de la quercétine en milieu faiblement basique s'accompagne de la consommation de  $\text{O}_2$  et de la formation du radical  $\text{HO}^\circ$  mis en évidence par résonance paramagnétique électronique (RPE) par détection du composé d'addition stable formé en présence d'un piègeur de spin (DPMO). Dans les mêmes conditions, la rutine, un b3- glycoside de la quercétine, et le kaempférol (analogue 3'-désoxy de la quercétine) ne sont pas oxydés. Même si le mécanisme de l'autoxydation des polyphénols demeure mal connu, il semble que l'étape-clé consiste en la réduction de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  en  $\text{Fe}^{\text{II}}$  par le polyphénol. La production d'EOR procéderait alors par réduction du dioxygène et du peroxyde d'hydrogène par  $\text{Fe}^{\text{II}}$  avec régénération de  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . Notons que le phénomène semble très dépendant de la nature des ligands du fer. Ainsi, à pH neutre, les flavonoïdes fortement réducteurs tels que la quercétine seraient capables de réduire le complexe  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -EDTA, favorisant ainsi la réaction de Fenton mais pas le complexe  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrate.

L'autoxydation des polyphénols peut être responsable des effets pro-oxydants parfois observés, notamment lors de tests antioxydants impliquant des générateurs métalliques de stress oxydant [61].

### 2.1.2. Mécanismes d'oxydation :

Il semble que, pour un polyphénol donné, la distribution de produit d'oxydation soit peu dépendante de la nature du système oxydant. Selon ce dernier, l'oxydation peut procéder par succession de transfert mono-électronique avec formation d'intermédiaires radicalaires (radicaux aryloxy) ou par oxydation bi-électronique. Malgré la forte délocalisation de leur électron  $\pi$ , les radicaux aryloxy dérivés des polyphénols sont des intermédiaires très instables qui ne sont détectables que par méthodes cinétiques rapides. Ils évoluent rapidement par dimérisation, dismutation voire réaction avec le dioxygène. Il semble que la plupart des radicaux dérivés de polyphénols suivent une cinétique de second ordre, ce qui suggère que la dimérisation, dismutation sont les voies privilégiées. Cette dernière voie requiert en générale un noyau catéchol (**Figure 16**) (voire pyrogallol ou 1,2,3-trihydroxybenzène) tels que la catéchine, la quercétine, l'acide gallique ou l'acide

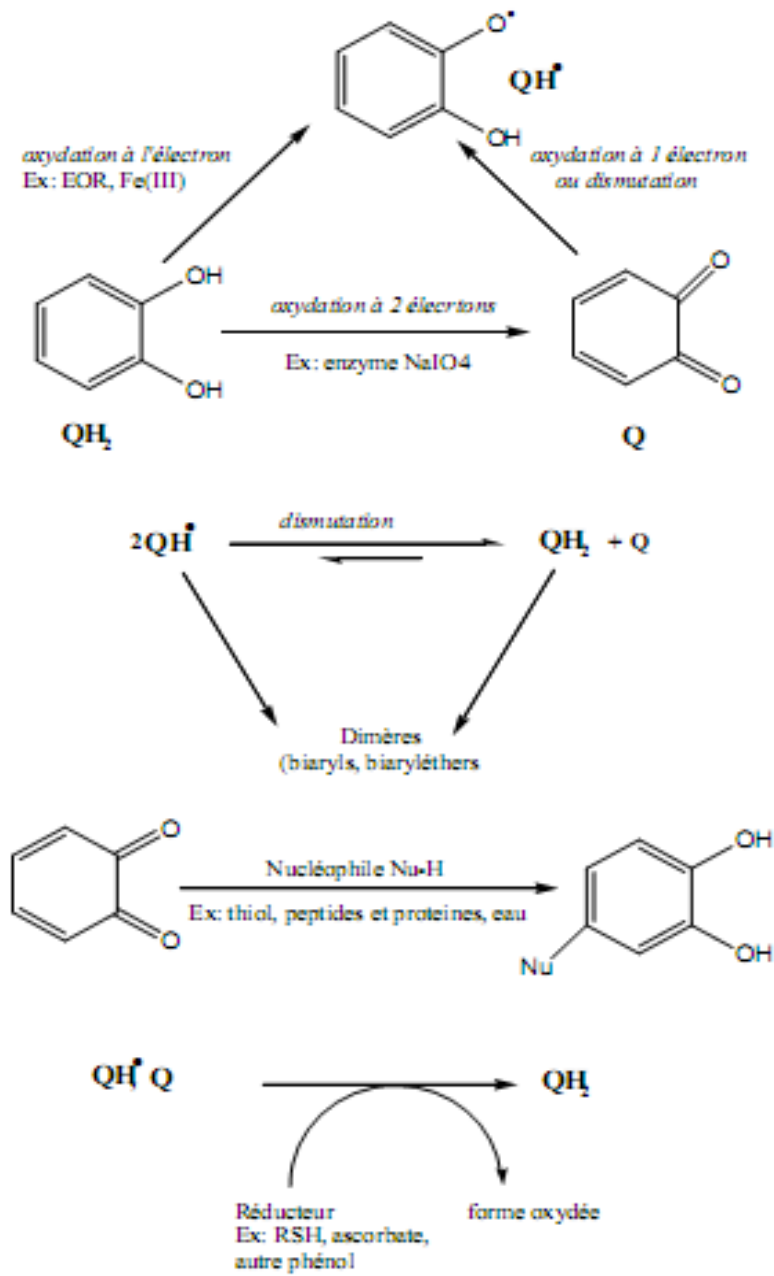
caféique. Elle s'accompagne alors de la formation d'une *ortho*-quinone avec régénération du polyphénol parant. La formation de radicaux semi-quinone à partir d'un polyphénol à noyau catéchol est représentée sur la (**Figure 17**) dans le cas de l'acide caféique. Le renforcement de la liaison H intramoléculaire au cours de la dissociation favorise le transfert d'atome H.

Dans le cas particulier des 3,4'-dihydroxyflavones (4'-hydroxyflavonols), la dismutation conduit à des *p*-méthylènequinones. Les *o*-quinones et *p*-méthylènequinones sont elles-mêmes des intermédiaires peu stables. Du fait de leur fort caractère électrophile, elles évoluent rapidement par diverses voies (**Figure 16**):

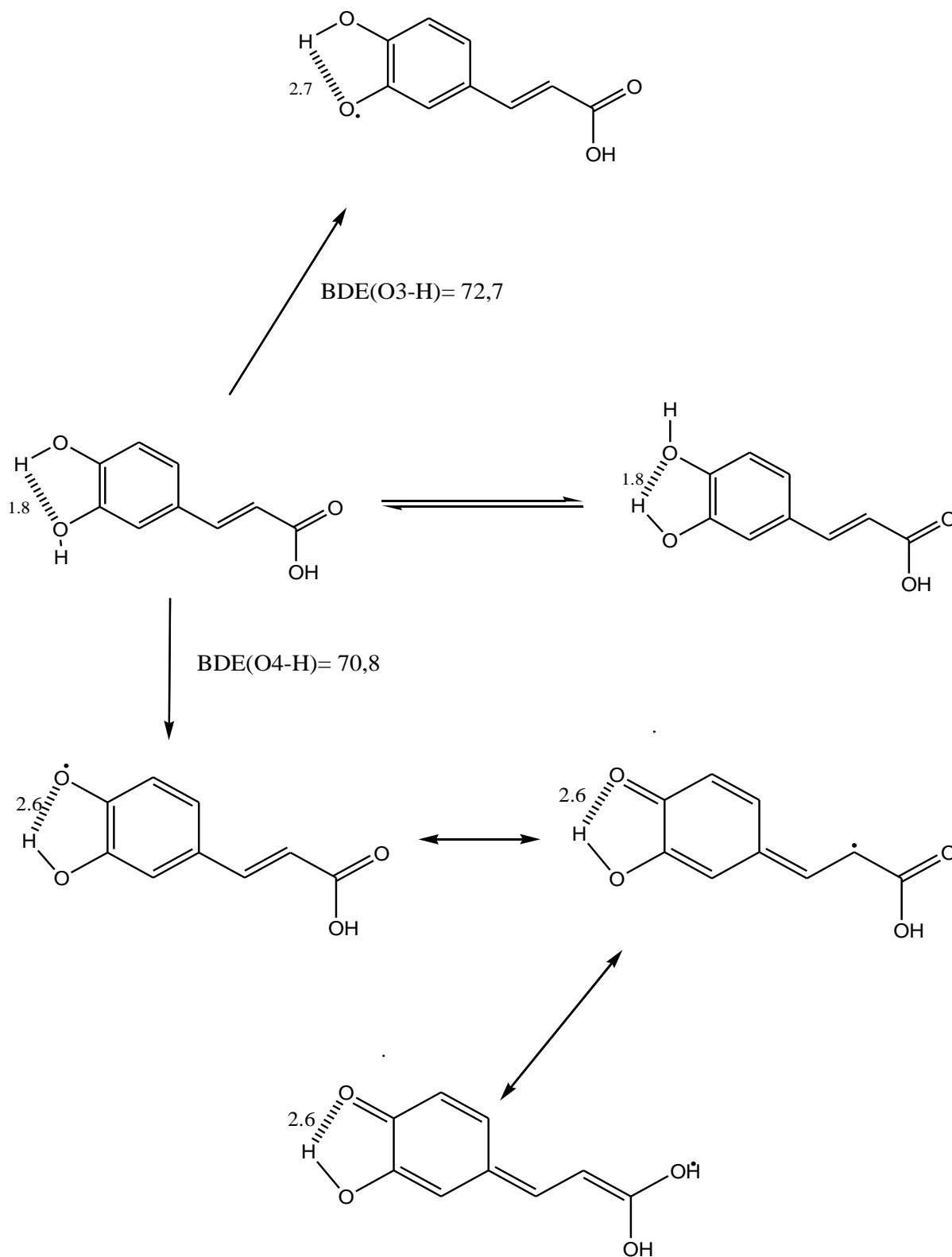
- Dimérisation, voire oligomérisation, cette voie semble prépondérante avec les quinones dérivées de l'acide caféique (**Figure 18**) et de la catéchine (**Figure 19**). La réaction peut procéder par addition nucléophile d'une molécule de polyphénol sur l'*o*-quinone correspondante ou par recombinaison de radicaux aryloxy. L'oxydation de la catéchine par la polyphénoloxydase conduit à une variété de dimères de types biaryle et biaryléther et dont la liaison entre deux unités catéchine implique le cycle A de l'une et le cycle B de l'autre. D'après ces structures, il semble que les deux mécanismes soient en compétition.

- Addition de solvant (eau, alcool). Dans le cas de la quercétine, l'addition de solvant a lieu sur le centre C2 de la *p*-méthylènequinone, ce qui entraîne une déconjugaison du cycle central (**Figure 20**). Dans le cas des anthocyanes, l'addition d'eau peut être suivie par l'élimination du cycle B avec formation de coumarines.

- Addition d'un bon nucléophile présent dans le milieu tel que le résidu Cys du tripeptide glutathion voire un autre polyphénol. Notons que le couplage des quinones à des résidus nucléophiles de protéines et d'acide nucléiques est un phénomène à répercussion biologique potentielle [61].



**Figure 16.** Oxydation des polyphénols présentant un noyau catéchol et principales formes oxydées (o-quinones et semi-quinones) [61] .



**Figure 17.** Réaction de transfert d'atome H depuis l'acide caféique, (En  $Kcal\ mol^{-1}$ , BDE = bond dissociation energy : capacité du phénol à céder un hydrogène)[61].

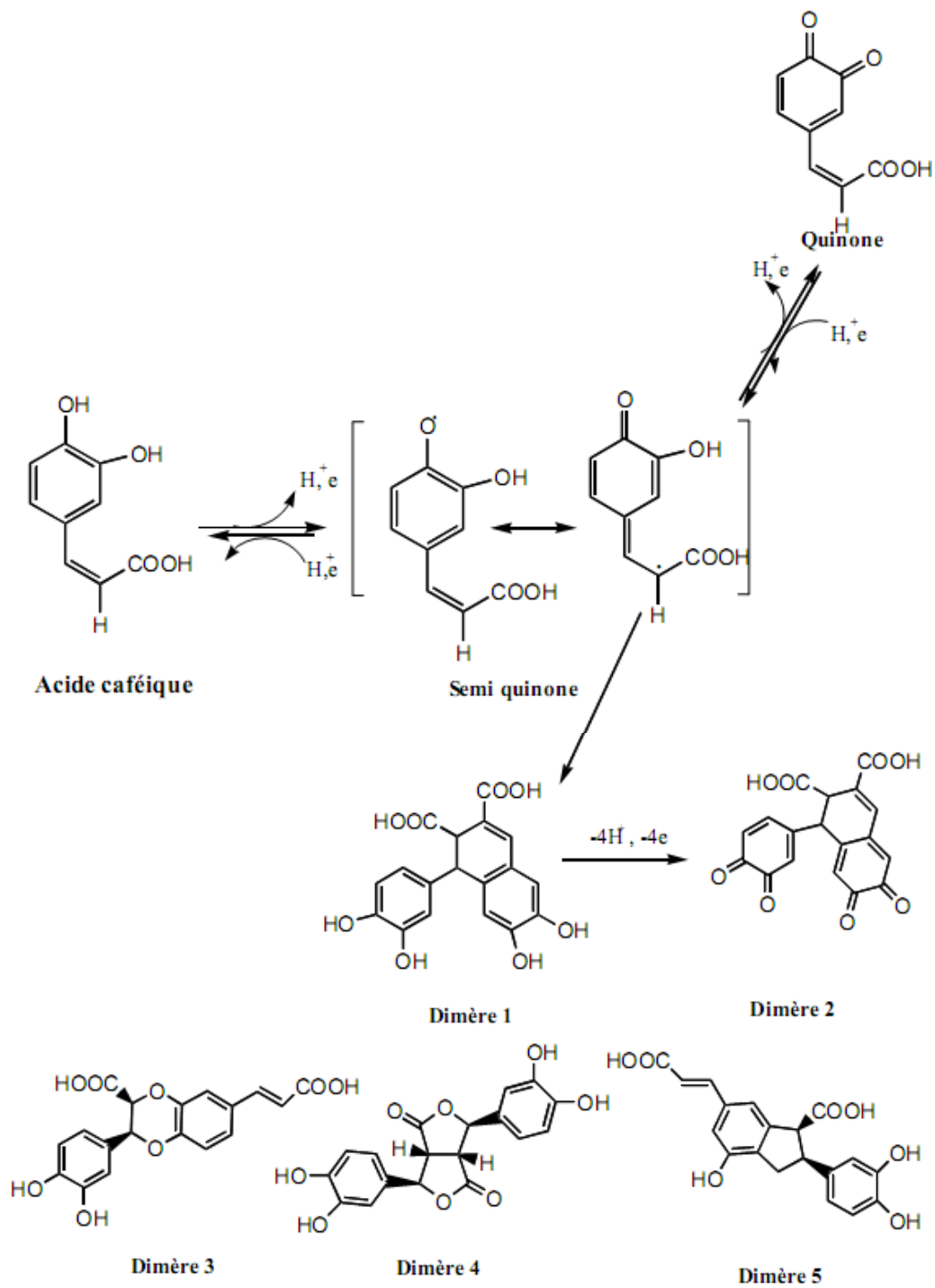
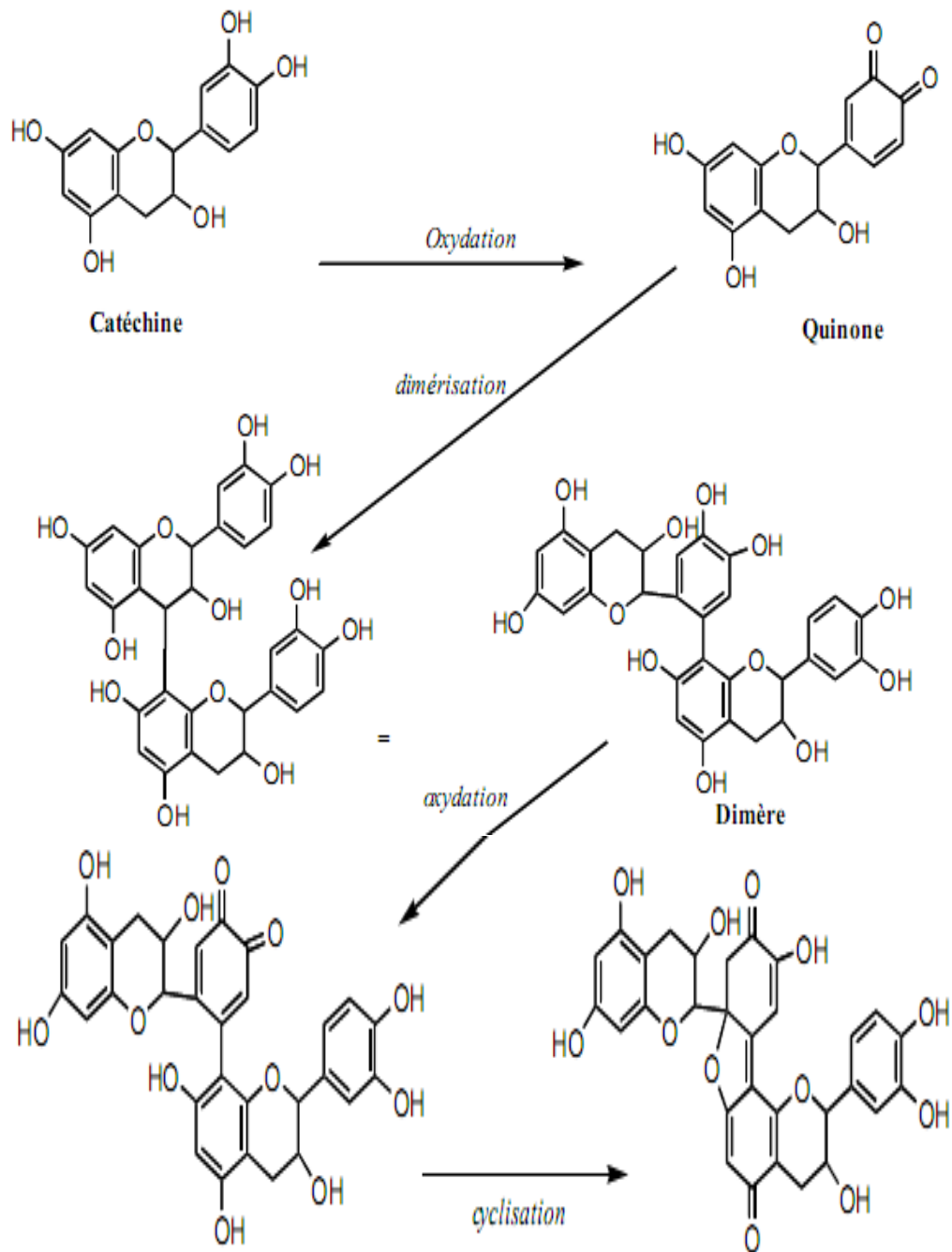
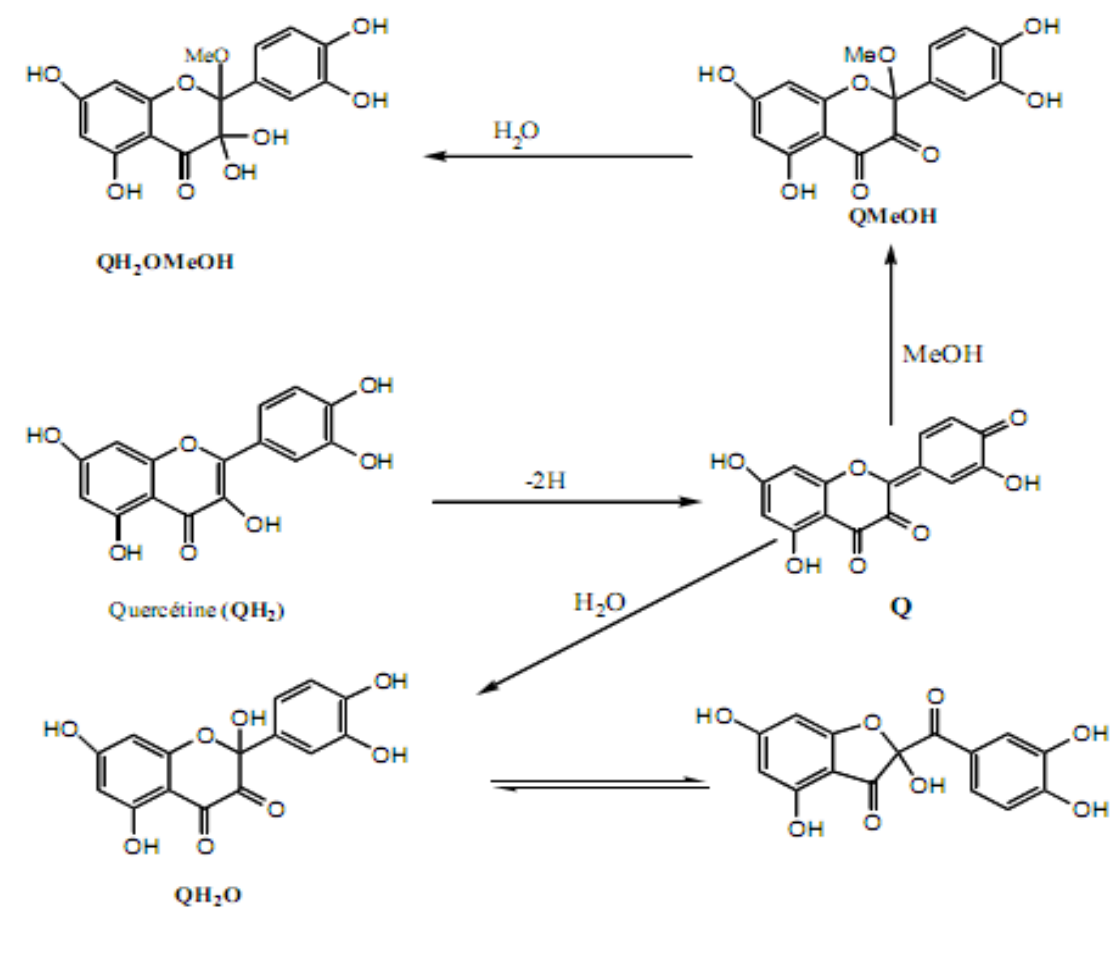


Figure 18. Produits d'oxydation de l'acide caféique par voie de dimérisation [61].



**Figure 19.** Produits d'oxydation de la catéchine par voie de dimérisation[61].



**Figure 20.** Produits d'oxydation de la quercétine[61].

En outre, le caractère oxydant des *o*-quinones et des radicaux aryloxy permet la co- oxydation de substrats réducteurs tels que l'ion ascorbate, le glutathion et d'autres phénols.

Enfin, signalons que les dimères et produits d'addition présentent également des noyaux phénoliques et sont donc à leurs tours oxydables de sorte que les mélanges réactionnels obtenus dans les réactions d'oxydation des polyphénols sont souvent complexes à analyser. Au cours de l'action antioxydante, ces cascades réactionnelles permettent la capture de plusieurs équivalents d'EOR par mole d'antioxydant, particulièrement lorsque cedernierprésente un noyau catéchol. En plus de la rapidité des réactions de capture des EOR, c'est un avantage important pour l'activité antioxydante des polyphénols[61].

## *Chapitre 3:*

*LES ACIDES :*

*ASCORBIQUE , GALLIQUE*

*ET VANILLINE*

### 3-1-L'acide ascorbique :

#### 3-1-1--Historique de l'acide ascorbique :

La structure chimique de l'acide ascorbique (noté AA) fut établie par Haworth en 1932. Sa formule chimique est  $C_6H_8O_6$ . Il possède une fonction ène-diol, deux fonctions alcool et une fonction lactone qui unit les carbones C1 et C4. Sa forme oxydée est l'acide déhydroascorbique (noté DHA), de formule chimique  $C_6H_6O_6$ . Les autres noms de l'acide ascorbique sont la vitamine C, l'acide L-thréo-hex-2-enoïque gamma-lactone et l'acide Lxyloascorbique ; ce dernier fait référence à ses propriétés antiscorbutiques.

Le scorbut est l'une des plus anciennes maladies connues. La première description de la maladie est retrouvée dans le papyrus égyptien d'Ebers, 1500 ans avant notre ère .

Dans l'antiquité, Hippocrate (460-370 av. J.C) déclare dans son traité "des affections internes" que « *ceux qui sont atteints ont une haleine puante, les gencives mallasses et sont sujets à l'hémorragie du nez ; ils ont parfois des ulcères aux jambes, lesquels se cicatrisent tandis que d'autres apparaissent de nouveau. La maladie guérit difficilement et conduit souvent au tombeau.* ». Durant le Moyen Age, le scorbut est endémique dans le nord de l'Europe. Il sévit le plus souvent pendant l'hiver, lorsque les fruits et légumes frais viennent à manquer. Il est présent également pendant les guerres. Ainsi, durant la septième croisade menée par Louis IX, le sire de Joinville, en 1249, parle de la maladie comme d'une calamité : « *... la chair de nos jambes séchait toute seule et la peau de nos jambes devenait tachetée de noir et terreuse comme une vieille chaussure. Nul n'échappait à la maladie et il fallait mourir.* » Durant les XVIème et XVIIème siècles, le scorbut continue à sévir chez les marins et sur la terre ferme. Il apparaît ainsi en 1870 à Londres chez les nourrissons des classes moyennes. En 1912, Funk, chimiste polonais, conclut que le rachitisme, la pellagre, le béribéri et le scorbut sont consécutifs à un déficit en composés azotés qui possèdent une structure amine. Il désigne ses composés par le terme de « vital amine » dont dérive le terme « vitamine ». A la même période, Zylva isole du citron un principe actif contre le scorbut. Si les propriétés curatives de l'orange et du citron sont connues, il faut attendre le début du XXème siècle pour identifier et préparer la substance antiscorbutique. C'est en 1927 qu'un chimiste hongrois, Szent-Györgyi, isole de manière fortuite la vitamine C. Il retrouve une substance inconnue en quantité importante dans les glandes surrénales mais aussi dans les choux et les oranges . Szent- Györgyi la nomme « ignose » en référence à la terminologie des sucres « ose » et au fait que ce composé était encore inconnu. Lorsqu'il découvrit qu'il était un acide constitué de 6 atomes de carbone, il lui préféra le nom d'acide hexuronique. En 1932, Szent-Györgyi et King découvrent que

l'acide hexuronique prévient le scorbut chez le cobaye. Grâce à cette découverte, la molécule est renommée en 1933 "acide ascorbique". C'est un biochimiste anglais, Norman Haworth, qui synthétise l'acide D et L ascorbique pour la première fois. En 1936 débute la production industrielle de la vitamine C. Le déficit d'apport en acide ascorbique est encore aujourd'hui un problème sanitaire pour tous les pays, car il existe des carences saisonnières ou d'origines socio-économiques liées à des régimes plus au moins volontaires. A ces déficits exogènes peuvent se rajouter un contexte clinique d'augmentation des besoins qui conduit à une carence fonctionnelle en vitamine C et aux signes du scorbut.

### **3-1-2-Les sources d'acide ascorbique :**

L'acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble. Il possède deux isomères : l'acide L ascorbique et l'acide D ascorbique. Seule la forme L est métabolisée de façon efficace chez l'homme, tandis que la forme D est synthétisée et utilisée chez les eucaryotes inférieurs (champignons). A l'instar des primates ou du cobaye, l'homme est incapable de la synthétiser du fait d'une mutation du gène de la L-gluconolactone oxydase. En outre l'organisme ne dispose pas de capacité de stockage. Un apport minimal quotidien d'origine alimentaire est donc nécessaire. En France, la majeure partie des apports (70 %) provient des fruits (agrumes essentiellement) et des légumes [4]. Les pommes de terre, le pain et les céréales en apportent de 12 à 22 %.

### **3-1-3-Le métabolisme de l'acide ascorbique :**

La quantité totale d'acide ascorbique contenue dans l'organisme est estimée entre 1500 et 3000 mg. L'acide ascorbique est absorbé principalement au niveau de l'iléon grâce à un mécanisme de transport actif Na-dépendant. Ensuite, l'acide ascorbique passe rapidement dans le sang et pénètre dans tous les tissus. Dans le sang, la majeure partie de l'acide ascorbique est sous sa forme réduite (environ 85%). Au pH physiologique, la forme majoritaire est l'anion ascorbate AH<sup>-</sup> (85%). La forme oxydée (DHA) ne représente que 15 %. La concentration plasmatique en acide ascorbique est faible (5 à 15 mg.L<sup>-1</sup>) alors qu'elle est 10 à 30 fois plus élevée dans les leucocytes et les plaquettes. La concentration leucocytaire reflète la concentration tissulaire. Les glandes surrénales et l'hypophyse possèdent les plus grandes concentrations tissulaires (30 à 50 µg par g). Toutefois, les reins, le cerveau et la rate contiennent à eux trois la majorité de la quantité en acide ascorbique. Les voies d'élimination de la vitamine C sont principalement les urines, les matières fécales et la sueur. L'élimination urinaire est majoritaire, la voie fécale est peu importante, sauf lors de diarrhées. Pour des apports en vitamine C de 100 mg/jour, 25 % sont excrétés. Pour les doses supérieures à 500 mg, seule une partie est ingérée et presque

toute la dose absorbée est excrétée. L'élimination a lieu sous forme native ou de métabolites. Lorsque la concentration plasmatique dépasse  $79 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , l'acide ascorbique est éliminé dans les urines sous forme inchangée. Le principal métabolite de l'acide ascorbique est l'acide oxalique. A hautes doses, et en cas de déficit associé en vitamine B6, l'acide ascorbique peut être responsable de la survenue de lithiases rénales oxalocalciques .

### **3-1-4-Les rôles physiologiques de l'acide ascorbique**

L'acide ascorbique joue plusieurs rôles dans l'organisme, notamment grâce à ses propriétés antioxydantes et hydroxylantes. Il intervient dans la synthèse du collagène, de la tyrosine, de la carnitine, du cholestérol et des acides biliaires. Il participe également au métabolisme du fer et a un rôle dans l'élimination des carcinogènes et des nitrosamines cancérigènes .

#### **3-1-4-1-Rôle d'hydroxylation :**

- **Le métabolisme du collagène :**

Le collagène est un peptide essentiel à la construction du tissu conjonctif, tissu de soutien des vaisseaux et des organes. On le retrouve dans la constitution de la peau et des phanères, dans la substance organique des os et des dents, au niveau des disques intervertébraux et du cristallin. L'acide ascorbique est le cofacteur d'enzymes d'hydroxylation. Sa carence est responsable d'une atteinte fonctionnelle du collagène qui peut se manifester par l'altération de la paroi vasculaire entraînant des syndromes hémorragiques, l'atteinte des muqueuses avec gingivite, l'altération de la peau et une mauvaise cicatrisation qui sont les principaux signes du scorbut .

- **Le métabolisme de la carnitine :**

La carnitine est une substance retrouvée dans le muscle cardiaque, et squelettique ou encore dans le foie. Elle est impliquée dans le transport des acides gras jusqu'aux mitochondries où ils sont oxydés. Elle est synthétisée à partir de la lysine et de la méthionine grâce à deux hydroxylases à fer ferreux et dont un des cofacteurs essentiels est l'acide ascorbique .

- **Le métabolisme des catécholamines :**

L'acide ascorbique est le cofacteur de la dopamine hydroxylase. Ainsi, il permet la transformation de la dopamine en noradrénaline. Ceci pourrait expliquer les troubles de l'humeur et mêmes les troubles psychiatriques décrits dans le scorbut.

**3-1-4-2-Le rôle antioxydant :**

Le rôle antioxydant de l'acide ascorbique découle de ses propriétés réductrices. C'est le plus puissant des antioxydants hydrosolubles. Il est capable de réagir directement avec les espèces réactives oxygénées et azotées. Il réduit l'anion superoxyde sous forme acide ou basique :



Il limite la peroxydation lipidique en réagissant avec les radicaux peroxy et les complexes oxoferryle :



Il intervient dans de nombreuses réactions enzymatiques fer dépendantes en tant que transmetteur d'électrons . Il permet aussi de régénérer la vitamine E. Son pouvoir antioxydant l'implique dans les mécanismes de défense contre plusieurs pathologies[62].

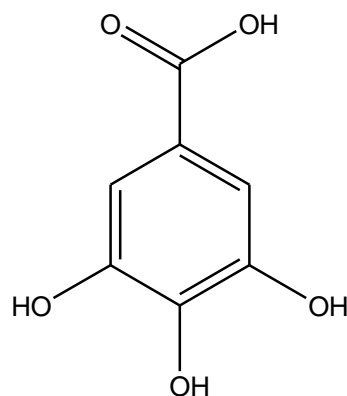
**3-2- Acide Gallique :**

L'acide gallique (acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque) est un composé organique aromatique, l'un des six isomères de l'acide trihydroxybenzoïque, largement répandu dans les plantes soit sous forme libre soit comme composant des gallotannins.

Il est classé dans les acides-phénols (ou acides phénoliques) puisqu'il comporte à la fois une fonction carboxylique et des hydroxyles phénoliques. Et comme il est dérivé de l'acide benzoïque, on le classe aussi dans les acides hydroxybenzoïques.

On le trouve à l'état naturel dans des galles de chênes (ou noix de galle), de sumac, d'hamamélis, les feuilles de thé, l'écorce de chêne, entre autres plantes. Sa formule chimique est  $\text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})_3\text{COOH}$ . Les sels et esters tirés de cet acide sont appelés gallates.

Fréquemment utilisé dans l'industrie pharmaceutique, il est un précurseur pour la synthèse de la mescaline.



**Figure 21:** Structure du composé acide gallique.

### 3-2-1- Historique de l'acide gallique :

Le chimiste suédois, Scheele, a été le premier à extraire « des sels essentiels de la noix de galle ». Il laissait les moisissures se développer sur une infusion de noix de galle dans un vase<sup>6</sup>. Au bout de quelques mois, il en extrayait les cristaux qui s'y étaient déposés.

Le chimiste et directeur du Jardin Botanique de Nancy Henri Braconnot (1780-1855) améliora la technique d'extraction de Scheele en 1818, et montra que l'acide extrait n'était pas pur mais composé d'acide gallique et d'acide pyrogallique. C'est Braconnot qui dénomma cet acide.

Les propriétés chimiques de l'acide gallique furent étudiées par le chimiste Théophile-Jules Pelouze dans son Mémoire sur le tannin et les acides galliques, pyrogallique, ellagique et méta-gallique .

### 3-2-2- Propriétés de l'acide gallique :

L'acide gallique se présente sous la forme d'une poudre cristalline blanche ou jaune pâle, inodore, de saveur astringente et acide.

L'acide gallique est soluble dans le méthanol, l'éthanol, l'eau et l'acétate d'éthyle. La solubilité relative est dans l'ordre suivant:

méthanol > éthanol > eau > acétate d'éthyle , Il est très peu soluble dans l'eau froide mais sa solubilité croît avec la température.

Avec le chlorure de fer(III), il produit du gallate de fer de couleur bleu-noir. Chauffé à 220 °C, il perd son groupement COOH pour donner du pyrogallol.

L'acide gallique existe en faible quantité dans les noix de galle mais peut être tiré facilement des tanins. Il s'obtient par hydrolyse des gallotanins avec de l'acide sulfurique. Ces gallotanins (ou tanins galliques) sont formés autour d'un sucre (glucose ou polyol) comportant plusieurs liaisons esters avec des acides galliques ou leurs dérivés.

### 3-2-3-Activités biologiques :

#### • Activités antioxydantes et pro-oxydantes :

On sait que des agents antioxydants comme la vitamine E ou le bêta-carotène, peuvent dans certaines conditions rompre l'équilibre fragile de synergie des antioxydants et devenir des agents pro-oxydants. Il existe aussi des substances qui protègent les lipides de l'oxydation mais qui par ailleurs, peuvent augmenter les dommages occasionnés par les radicaux libres sur des non-lipides comme l'ADN ou les glucides. C'est le cas du gallate de propyle ou du gossypol qui réduisent  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  et stimulent la dégradation des glucides et de l'ADN par les radicaux libres.

Il en est de même avec l'acide gallique qui, à une concentration de 1,65 mM, accélère l'oxydation du désoxyribose induite par des radicaux hydroxyles  $\bullet OH$  (produits par  $Fe^{3+}$ - $H_2O_2$ ). Au-delà de cette concentration, l'acide gallique se comporte en antioxydant capable de réduire les dommages du désoxyribose occasionnés par  $Fe^{3+}$ - $H_2O_2$ .

On observe aussi l'aptitude de l'acide gallique à générer des radicaux hydroxyles en présence de cuivre Cu(II) mais en quantité bien moindre que ne le fait l'acide tannique. Inversement, l'activité antioxydante se manifeste par son aptitude à réduire la dégradation de l'ADN. La riboflavine photosensibilisée est apte à dégrader l'ADN mais si on lui rajoute de l'acide gallique la dégradation est alors limitée<sup>13</sup>. L'acide tannique dans ce cas inhibe complètement la dégradation.

L'acide gallique est aussi un piègeur de radicaux libres. À la concentration de 4,17 mM, il est capable de piéger 44 % des radicaux DPPH $\bullet$  et 60 % du peroxyde d'hydrogène.

#### •Activité antitumorale :

L'acide gallique possède une activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses (leucémie, cancer de la prostate, du poumon etc). Une culture de cellules de l'adénocarcinome pulmonaire exposée à l'acide gallique voit sa croissance diminuer en fonction du temps et de la dose. L'observation suggère que la mort cellulaire induite par

l'acide gallique soit liée au stress oxydant résultant de la production d'espèces oxygénées activées EOA. You et al.<sup>14</sup> ont observé que l'acide gallique provoquait une forte croissance des radicaux superoxyde  $O_2$  mitochondriaux. L'acide gallique semble donc se comporter comme un pro-oxydant sur les cellules cancéreuses du poumon[63].

### **3-3- vanilline :**

#### **3-3-1-Origine de vanilline :**

La vanilline est, parmi les multiples composants de l'arôme naturel de la vanille, le plus important et le plus caractéristique. Elle représente 0,75 % à 2 % de la masse de la gousse<sup>5</sup>. Une gousse pesant autour des trois grammes n'en contient donc que 22 à 60 mg.

Elle a été extraite pour la première fois à l'état pur par le chimiste Théodore Nicolas Gobley par macération de la vanille dans l'alcool à 85 °, suivie d'une extraction à l'éther. La substance brune très odorante qu'il obtient après évaporation est portée à ébullition dans l'eau, puis filtrée à chaud. La vanilline est finalement isolée après plusieurs recristallisations successives sous forme de longues aiguilles incolores.

La vanilline a pour la première fois pu être synthétisée en 1874 par Wilhelm Haarmann et Ferdinand Tiemann, à partir de coniférine, un dérivé d'isoeugénol qu'on trouve dans l'écorce de pin<sup>7</sup>. Karl Reimer propose deux ans plus tard, en 1876, une nouvelle voie de synthèse à partir du guaiacol.

#### **3-3-2-Propriétés physiques et chimiques:**

La molécule est un aldéhyde aromatique, d'où ses autres appellations de vanillaldéhyde ou aldéhyde vanillique. En solution en présence de fer et d'autre composé alcalin, l'aldéhyde développe une couleur rouge et perd son pouvoir odorant.

La vanilline a une odeur similaire à la vanille avec un goût sucré. Son intensité aromatique est cependant de 2 à 4 fois moins puissant que celui de l'éthylvanilline.

#### **3-3-3- Production et synthèse:**

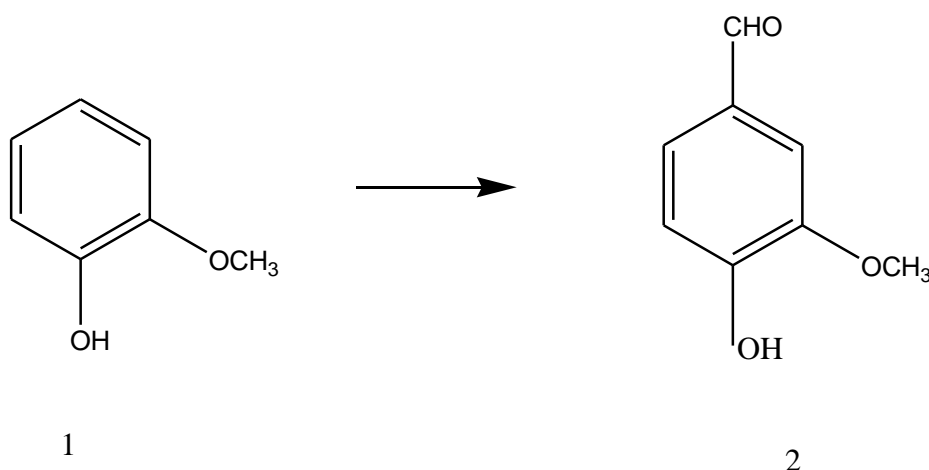
La vanilline peut être fabriquée à faible coût par divers procédés, alors que la vanille est très chère à produire et à préparer. C'est ainsi que la production industrielle de la

vanilline et son utilisation dans l'alimentation et les parfums sont devenues bien plus importantes que la production et l'usage de la vanille naturelle.

À titre indicatif, 1 kg de gousses de vanille entière vaut environ 80 euros quand 1 kg de gousses de vanille en poudre vaut dans les 40 euros et qu'un kilogramme d'arôme artificiel de vanille liquide coûte environ 10 euros.

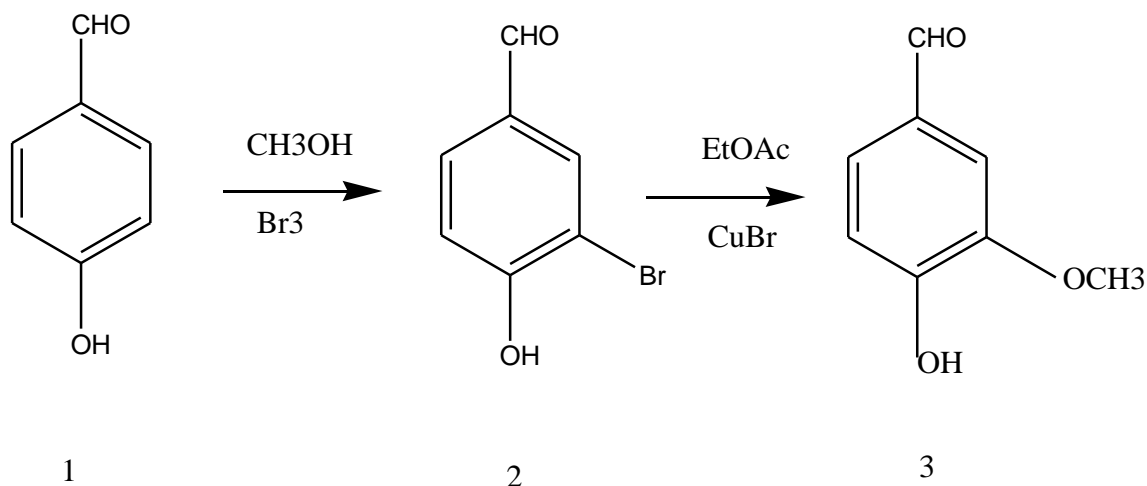
### Synthèse à partir du gäiacol:

En 1876, Karl Reimer a préparé la vanilline à partir du gäiacol<sup>8</sup>. Après dissolution du gäiacol dans une solution d'hydroxyde de potassium on fait réagir le tout avec du chloroforme. Cette réaction donne lieu à la formation de vanilline ainsi que d'un isomère la méthoxyaldéhyde salicylique. Les deux composés ainsi formés sont séparés par distillation à la vapeur d'eau sous pression de 2 atmosphères.



### Synthèse à partir du 4-hydroxybenzaldéhyde :

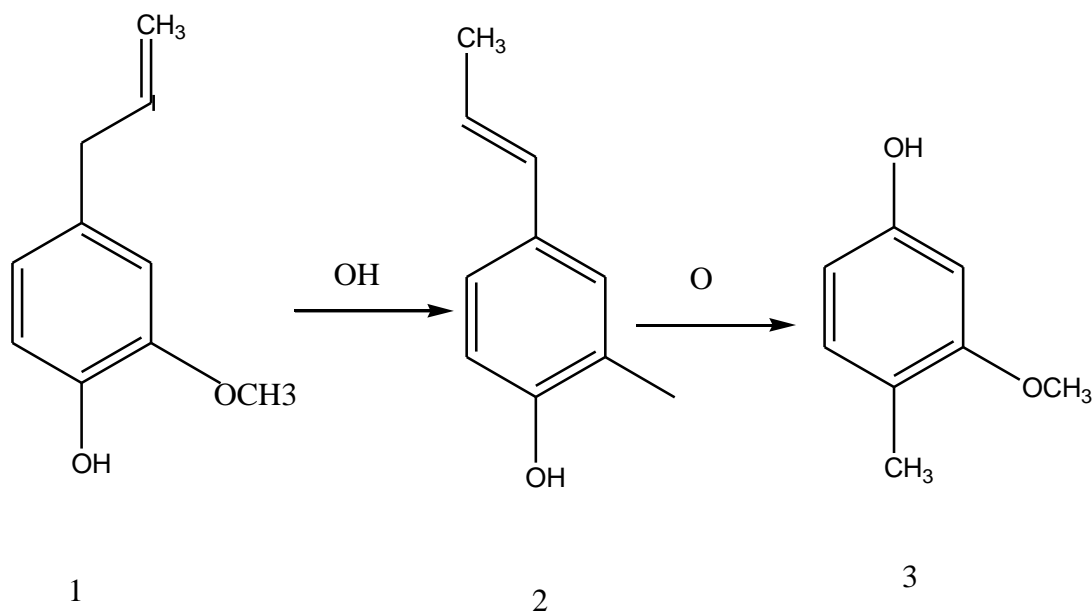
La vanilline peut être synthétisée à partir de la 4-hydroxybenzaldéhyde. Cette préparation s'effectue en deux étapes impliquant une substitution électrophile aromatique pour incorporer un atome brome sur le cycle aromatique suivi d'une méthylation organométallique à l'aide d'un catalyseur de cuivre.



### Synthèse à partir de l'eugénoïl:

L'eugénoïl est extrait du clou de girofle.

L'eugénoïl (1) est transformé en isoeugénoïl (2), puis en acétate d'isoeugénoïl, puis en acétate de vanilline, puis en vanilline.



### Synthèse à partir de la lignine:

On utilise la lignine récupérée des eaux résiduelles de l'industrie de la pâte à papier. Cette voie de synthèse oxyde les acides lignosulfoniques à l'aide de l'oxydation par voie humide.

**Synthèse à partir de la curcumine:**

Le procédé étant biochimique, l'arôme pourrai être considéré comme arôme naturel et étiqueté comme tel dans la composition de préparations alimentaires.

**3-3-4- Différences avec la vanille:**

La vanilline extraite de la gousse de vanille est exactement la même que celle fabriquée industriellement.

La différence de qualité provient de la complexité et de la richesse de l'arôme naturel de vanille qui contient de nombreux autres composants, alors que la vanilline obtenue par synthèse est chimiquement pure. Les procédés de biogénèse aboutissent en revanche à la formation d'un arôme complexe, et non à un produit chimiquement pur.

**3-3-5- Utilisation:**

- La vanilline est utilisée pour ses propriétés aromatisantes, soit seule soit en tant que constituant d'un arôme. Il ne faut pas en abuser dans l'arôme car elle possède un goût amer à haute dose. La vanilline (numéro Fema GRAS 3107<sup>9</sup>) est utilisée dans la création d'arôme vanille, chocolat et banane.
- C'est un produit intermédiaire pour la production de plusieurs dérivés à usage pharmaceutique.
- Ses propriétés chimiques la font parfois utiliser dans certaines réactions en chimie analytique.
- On lui attribue également des vertus aphrodisiaques.
- La vanilline sulfurique (mélange dans l'acide sulfurique concentré) est utilisée pour doser les terpènes par colorimétrie [63].



*PARTIE*

*PRATIQUE*



*Chapitre 4:*

*MATERIELS ET*

*METHODES*

#### 4-Matériels et méthodes :

Notre travail a été réalisée au niveau de laboratoire de valorisation et technologie des ressources sahariennes (VTRS) d'université Echahide Hamma Lakhdar d'El Oued . Cette travail comprend l'étude de l'effet des milieux acide sur l'extraction des composés phénoliques .

Pour effectuer cette étude , plusieurs étapes ont été réalisé :

- ✓ Dosage des composés phénoliques .
- ✓ L'utilisation de FT-IR pour confirmer la présence des composés phénoliques.
- ✓ Evaluation de l'activité antioxydant .
- ✓ Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil).

#### 4-1-Matériels:

##### Matériels de laboratoire :

- ✓ **Appareillage et Produit chimiques:**

<b>Appareillage</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• UV spectrophotomètre (UV-1800 SHIMADZU).</li> <li>• Spectrophotometer IR Affinity – 1( FTIR- 8400S SHIMADZU ).</li> <li>• Un chromatographe liquide haute performance HPLC (SHIMADZU type HPLC-RP-C18).</li> </ul>
<b>Les logiciels utilisés</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Logiciel Origine Pro 8 , pour trace les courbes d'étalonnages .</li> <li>• Logiciel Chem Draw Ultra 8, pour trace les composés chimiques.</li> </ul>

<b>Produits chimiques</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acide gallique 99% ( C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub> )Production par (PROLABO).</li> <li>• Acide ascorbique (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub> ) Production par (PROLABO).</li> <li>• vavilline (C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub> ) Production par (PROLABO).</li> </ul>

**4-2-Techniques d'identification :****4-2-1-Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible) :****4-2-1-1-La spectrophotométrie :**

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

La densité optique des solutions est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de l'espèce chimique à étudier. Lorsqu'une lumière d'intensité  $I_0$  passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le(s) soluté(s). L'intensité  $I$  de la lumière transmise est donc inférieure à  $I_0$ . L'absorbance de la solution est définie comme suit :

$$A = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

$$A = -\log T$$

Avec T (transmittance)  $T = \frac{I}{I_0}$

L'absorbance est une valeur positive, sans unité. Elle est d'autant plus grande que l'intensité transmise est faible.

**4-2-1-2-Domaine UV-visible de la spectrophotométrie :**

Un soluté coloré ou chromophore absorbe la lumière visible (longueurs d'onde comprises entre 400 et 800 nm). On parle de spectrophotocolorimétrie ou plus simplement de colorimétrie. Certaines solutions absorbent dans l'ultraviolet (longueurs d'onde inférieures à 380 nm), on parle alors de spectrophotométrie UV.

Un spectrophotomètre mesure l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée. Un dispositif monochromateur permet de générer, à partir d'une source de lumière visible ou ultraviolette, une lumière monochromatique, dont la longueur d'onde est choisie par l'utilisateur. La lumière monochromatique incidente d'intensité  $I_0$  traverse alors une cuve contenant la solution étudiée, et l'appareil mesure l'intensité  $I$  de la lumière transmise. La valeur affichée par le spectrophotomètre est l'absorbance à la longueur d'onde étudiée.

Le spectrophotomètre peut être utilisé pour mesurer de manière instantanée une absorbance à une longueur d'onde donnée ou pour produire un spectre d'absorbance

(spectrophotomètre à balayage). Dans ce dernier cas, le dispositif monochromateur décrit en un temps court l'ensemble des longueurs d'onde comprises entre deux valeurs choisies.

#### 4-2-1-3 -Analyses quantitatives :

Les méthodes colorimétriques basées sur l'utilisation du spectrophotomètre UV-visible, ont été utilisées pour évaluer la quantité des composés phénoliques dans la matière végétale[65].

#### 4-2-2-Analyse par la spectrophotométrie FT-IR:

Les méthodes spectroscopiques infrarouges, une technique d'analyse qui Permet de connaître la composition chimique beaucoup plus rapidement que les dosages Elles permettent des analyses simultanées de divers composants avec une grande rapidité, sur une faible quantité de produit, récupérable si nécessaire dans l'approche descriptive, on ne dispose que des données spectrales, sans aucune autre information complémentaire sur la nature des données.

C'est le cas de l'analyse en composantes principales.

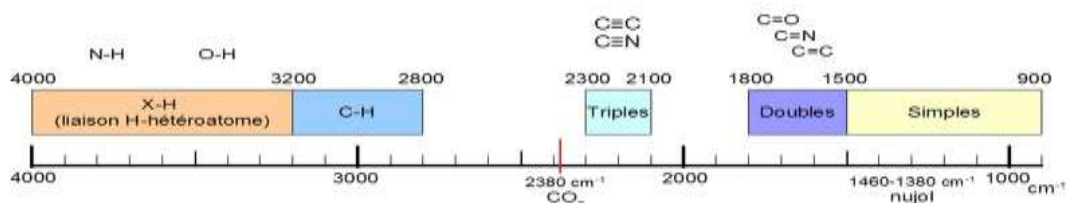
Dans les méthodes prédictives, les données spectrales PIR sont exploitées, dans Le but de prédire une variable qualitative ou quantitative.

Dispositif FTIR diffère en ce que la source de la source d'énergie est un monochrome "*laser monochromatique source* " laser car il ne contient pas une onde uniformes, et par conséquent du faisceau incident contient toutes les longueurs d'onde moyennes infrarouge  $5000-400 \text{ cm}^{-1}$  comme l'appareil est équipé d'un adaptateur - numérique convertisseur analogique afin de faciliter son intégration à l'analyse des dispositifs de chromatographie dispose également d'appareil FTIR qui analysera des échantillons de petite taille et plus rapide et plus précis que le dispositif normal car il donne un très haut degré de discrimination.



**Figure23** :L'image le FTIR situé la détoure VTRS.

- Quelques domaines d'absorption correspondant à divers types de liaisons chimiques. Les nombres d'onde sont exprimés en  $\text{cm}^{-1}$ .



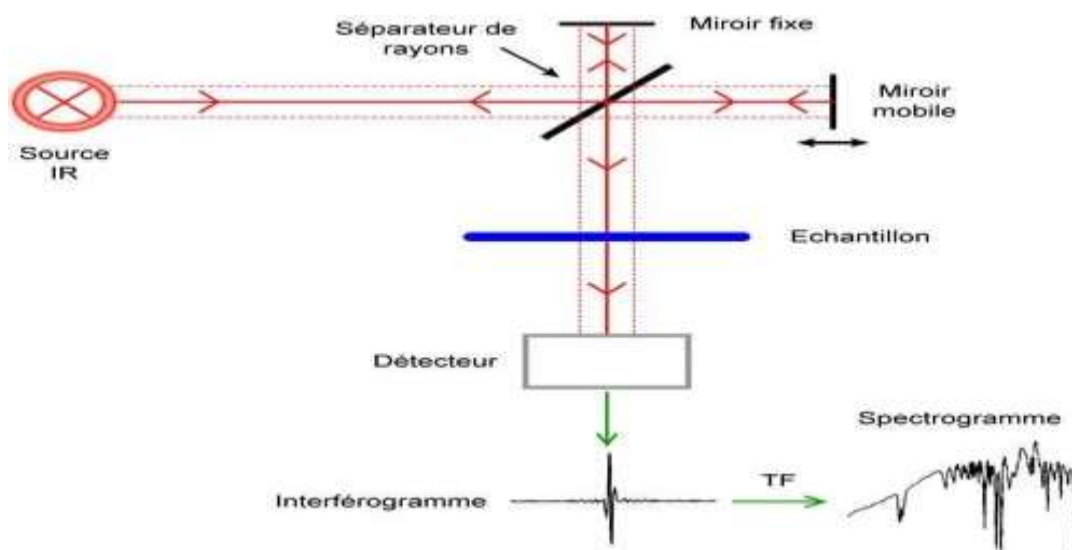
Le principe de fonctionnement d'une spectroscopie infrarouge est de déterminer la nature des liaisons chimiques présentes dans une molécule.

En effet, l'expérience montre que certaines fréquences de vibration, dites

« fréquences de groupe », sont caractéristiques de la présence d'un groupement chimique dans la molécule étudiée.

La théorie mécanique des vibrations permet de prévoir l'existence des fréquences de groupe à partir des ordres de grandeur des différents types de constante de force .

Ainsi, la spectroscopie infrarouge est puissante pour identifier des groupements moléculaires et obtenir de nombreuses informations microscopiques sur leur conformation et leurs éventuelles interactions .



**Figure 24:** Schéma de principe de spectroscopie d'absorption infrarouge.

La figure 25: représente le schéma de principe du fonctionnement de l'appareil. La source ETC (Electronically Temperature Controlled) EverGlo™ émet dans le centre infrarouge et la totalité du rayonnement est envoyée vers un interféromètre de Michelson, le cœur de l'instrument.

L'intensité du rayonnement de la source est divisée en deux : 50% retournent à la source et 50% (deux fois 25%) sont recombinaés de manière cohérente et envoyés vers l'échantillon.

L'intensité des interférences créées par le séparateur de rayons (beamsplitter, semi- réfléchissant composé d'un substrat en KBr recouvert de multiples couches diélectriques, Vectra-Piezo™) est enregistrée par le détecteur (DTGS TEC, DéterrâtesTri Glycine Sulfate Temperature ElectronicallyControlled) en fonction de la différence de marche induite par le déplacement du miroir mobile (c.-à-d. en fonction du temps) pour constituer un interférogramme.

La transformée de Fourier de cet interférogramme permet d'obtenir un graphe dans l'espace des fréquences qui est directement exploitable .

Il existe des nombreuse conffiguration differntes pour placer l'échantillon le faisceau incident et le détecteur ,chacune ayant une specficité propre aux informations recherchées et au type d'échantillon (nature et forme) à analyser.

#### **Préparation de l'échantillon :**

Les échantillons solides peuvent être préparés de quatre manières majeures. La première d'entre elles est de broyer l'échantillon avec un agent liant (souvent du nujol) dans un mortier avec un pilon. Un film mince de ce broyat est appliqué sur les plaques et mesuré.

La deuxième méthode consiste à une quantité de l'échantillon avec un sel purifié spécialement (comme le bromure de potassium) afin de supprimer les effets de diffusion des gros cristaux.

Ce mélange poudreux est ensuite comprimé dans une presse afin de fournir une pastille translucide au travers de laquelle un faisceau de spectromètre peut passer.

La troisième technique est dite de déposition de film, et est principalement

utilisée pour les matériaux polymères.

L'échantillon est tout d'abord dissous dans un solvant non hygroscopique et adéquat.

Une goutte de cette solution est déposée à la surface d'une cellule de KBr ou de NaCl.

La solution est ensuite évaporée jusqu'à séchage complet et le film ainsi formé sur la cellule est analysé directement.

Il faut faire attention à ce que le film ne soit pas trop épais, empêchant la lumière de le traverser.

Cette technique permet des analyses qualitatives.

La quatrième méthode est l'utilisation de la microtomie afin de découper un film mince (de 20 à 100  $\mu\text{m}$ ) dans un échantillon solide.

C'est l'un des plus importants moyens d'analyse des produits plastiques rejetés, par exemple, car cette technique préserve l'intégrité physique globale de l'échantillon.

Il est important de savoir que les spectres obtenus à partir de différentes méthodes peuvent présenter de légères différences entre eux en raison des états physiques des échantillons [66].

#### 4-2-3-Evaluation l'activité antioxydante :

L'activité antioxydante des extraits du *Matricaria pubescens* 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.

##### ✓ **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  $\text{MoO}_4^{2-}$  à molybdène Mo (V)  $\text{MoO}_2^+$  en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) à pH acide [67].

##### ✓ **Mode opératoire**

Un volume de 0.3 ml de chaque échantillon est mélangé avec 3 ml de solution du réactif (0.6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM 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).

#### **4-3-3-Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) :**

Le DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon [68].

##### **✓ 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 0,3 mM de DPPH est mélangée avec différentes concentrations des échantillon , mettre 3 ml de chaque dilution de ces échantillon dans un tube à essai, ajouter 2ml de solution méthanolique de DPPH, puis laisser incuber 30 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.



*Chapitre 5:*

*RESULTATS ET  
DESCUSSION*

**5-Résultats et discussion :****Les méthodes de vérification des concentrations dans les médicaments**

Les méthodes sont des techniques spectroscopiques qui vérifient la concentration des composés actifs par une longueur d'onde à l'aide des appareils spécifiques.

**5-1-Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible) :**

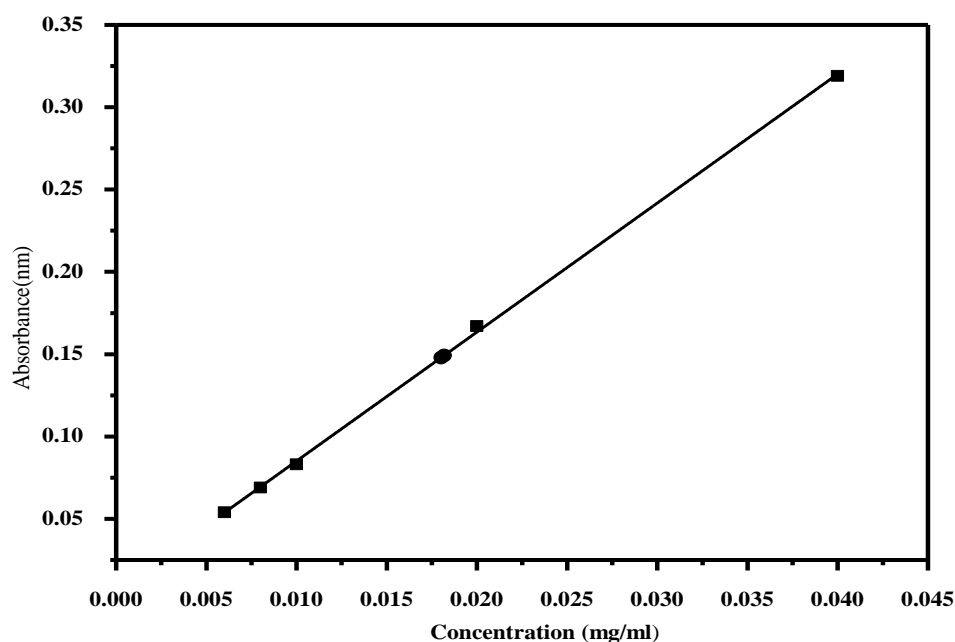
Les méthodes colorimétriques basées sur l'utilisation du spectrophotomètre UV-visible, ont été utilisées pour déterminer la concentration des composés actifs, et ont comparé la concentration déclarée par la concentration trouvée.

**5-1-1-Les courbes d'étalonnage d'acide ascorbique, gallique et vanilline :**

➤ L'acide ascorbique

$\lambda=263.5\text{nm}$

C [mg/ml]	0.04	0.02	0.01	0.008	0.006
A(nm)	0.319	0.167	0.083	0.069	0.054



**Figure 25 :** Courbe d'étalonnage de l'acide Ascorbique

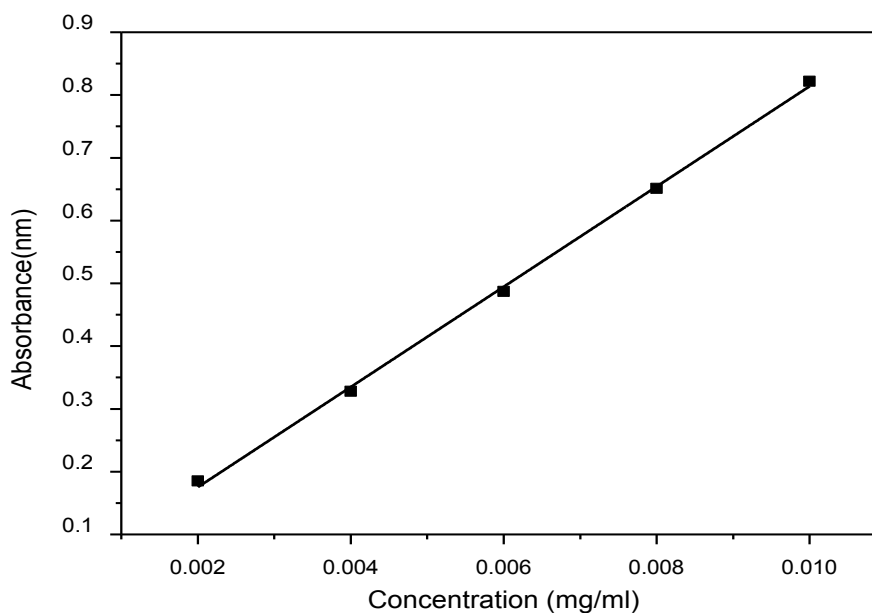
Cette courbe est établie en utilisant l'acide ascorbique comme référence et les résultats sont exprimés en concentration d'acide ascorbique des médicaments. Par(mg/ml). La courbe d'étalonnage est établie avec un coefficient de corrélation

$$R^2 = 0.993.$$

➤ Acide gallique

$\lambda=259\text{nm}$

C [mg/ml]	0.01	0.008	0.006	0.004	0.002
A(nm)	0.444	0.375	0.278	0.182	0.092



**Figure 26 :** Courbe d'étalonnage de l'acide galique

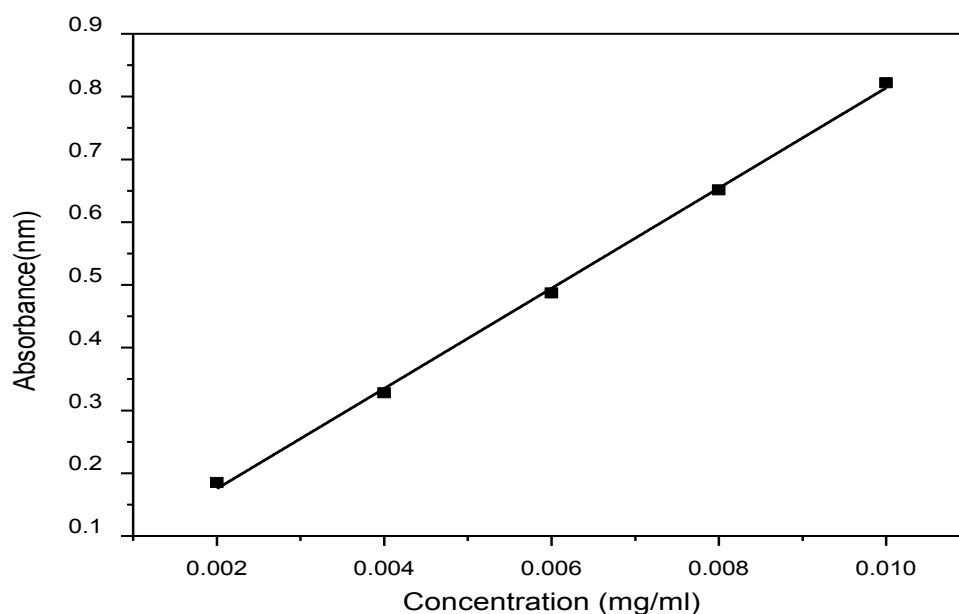
Cette courbe est établie en utilisant l'acide galique comme référence et les résultats sont exprimés en concentration d'acide galique des médicaments. Par(mg/ml).

La courbe d'étalonnage est établie avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 0.995$ .

➤ Vanilline

$\lambda=229.5\text{nm}$

C [mg/ml]	0.01	0.008	0.006	0.004	0.002
A(nm)	0.822	0.651	0.487	0.328	0.185



**Figure 27:** Courbe d'étalonnage de Vanilline

Cette courbe est établie en utilisant Vanilline comme référence et les résultats sont exprimés en concentration Vanilline des médicaments. Par(mg/ml). La courbe d'étalonnage est établie avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 0.998$ .

#### 5-1-2- l'effet de température sur l'absorbance de les acides : ascorbique , gallique et vanilline :

Température(C°)	A0	60	70	80	90	100
L'absorbance(nm)	0.035	0.064	0.119	0.133	0.195	0.388

**Tableau 1:** l'effet de température sur l'absorbance d'acide Ascorbique.

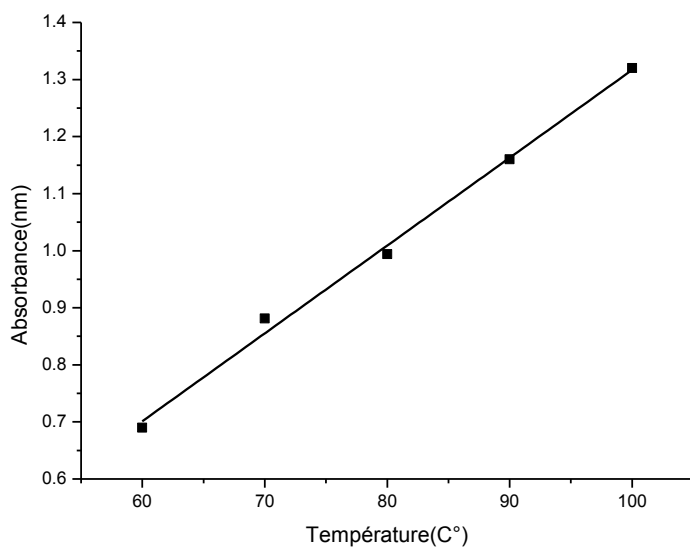
Température(C°)	A0	60	70	80	90	100
L'absorbance(nm)	0.082	0.400	0.445	0.815	1.075	2.69

**Tableau 2:** l'effet de température sur l'absorbance de vanilline.

Température(C°)	A0	60	70	80	90	100
L'absorbance(nm)	0.593	0.761	0.835	0.952	2.14	2.16

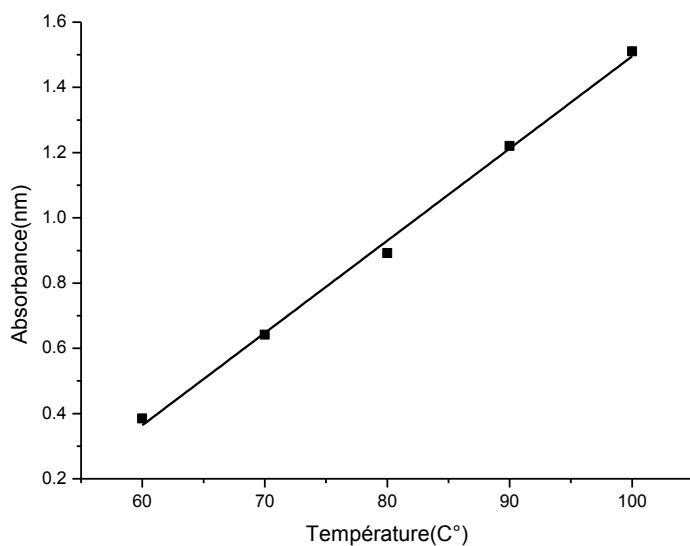
**Tableau 3:** l'effet de température sur l'absorbance d'acide gallique .

Les courbes de l'absorbance de les acides : ascorbique , gallique et vanilline :



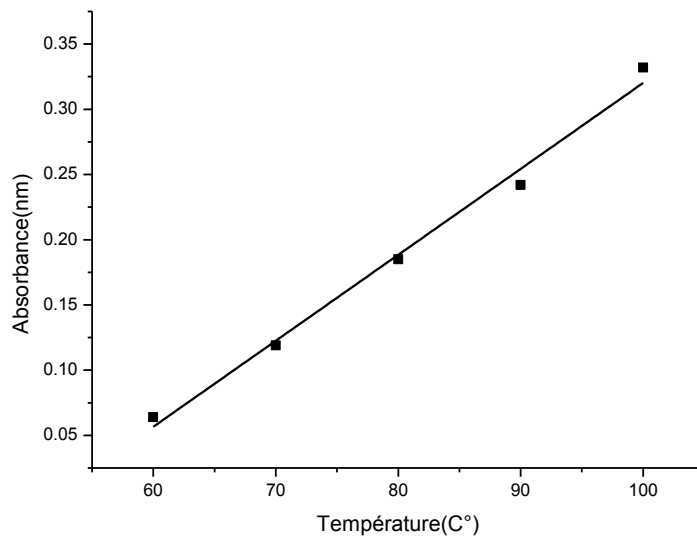
$$R^2 = 0.994$$

**Figure 28** : courbe de l'effet de température sur l'absorbance d'acide Ascorbique



$$R^2 = 0.996$$

**Figure 29**: courbe de l'effet de température sur l'absorbance de vanilline.



$$R^2 = 0.998$$

**Figure 30 :** courbe de l'effet de température sur l'absorbance d'acide gallique .

**5-1-3-l'effet de l'oxygène sur l'absorbance de les acides : ascorbique , gallique et vanilline :**

Le temps(min)	A0	5	10	15	20	25
L'absorbance(nm)	1.099	1.158	1.168	1.160	1.187	0.990

**Tableau 4:** l'effet de l'oxygène sur l'absorbance d'acide Ascorbique

Le temps(min)	A0	5	10	15	20	25
L'absorbance(nm)	0.702	0.726	0.736	0.733	0.735	0.729

**Tableau 5:** l'effet de l'oxygène sur l'absorbance de vanilline.

Le temps(min)	A0	5	10	15	20	25
L'absorbance(nm)	0.282	0.282	0.275	0.135	0.025	0.141

**Tableau 6:** l'effet de l'oxygène sur l'absorbance d'acide gallique .

D'après les résultats obtenus on observe :

L'influence des températures sur la stabilité et l'absorbance de l'acide ascorbique, vanilline et l'acide gallique à l'onde 263.5, 229 et 259 respectivement.

Pour l'oxygène, il n'y a aucune influence de l'oxygène sur la stabilité dans le composé phénolique standard (ascorbique, vanilline, gallique) reste constante après barbotage par l'oxygène à plusieurs temps.

### 5-2-Détermination de l'activité antioxydant des extraits

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.

Nous avons choisi parmi de nombreux modes d'expression de cette mesure d'utiliser le pourcentage d'inhibition (IP) et/ ou l'équivalence en polyphénols standards obtenu par spectroscopie UV-Visible.

Le pourcentage d'inhibition qui permet d'évaluer l'activité antioxydant d'un échantillon de calcul selon la formule suivante :

$$IC (\%) = [(A-B) / (A)] \times 100$$

Avec : a = absorbance de la solution oxydée en absence d'agents antioxydant,

b = absorbance de la solution oxydée en présence d'agents antioxydant.

L'évaluation de l'aptitude des composés à piéger des radicaux libres consiste donc à mesurer sa capacité à piéger les radicaux libres et donc à ralentir ou inhiber la création de radicaux libres.

Dans le cas de l'évaluation de l'activité antioxydante en fonction de l'équivalence en polyphénols standards, la méthode consiste à comparer l'absorbance de nos échantillons à celle d'une droite d'étalonnage qui relie l'absorbance à la concentration en des standards.

Les types de radicaux que nous avons utilisés pour évaluer l'activité antioxydante de nos composés phénoliques: Activité antioxydante total et DPPH.

**5-2-1-Pouvoir antioxydant total**

Au cours de ce test, l'hydrogène et l'électron sont transférés du composé réducteur (composé phénolique-antioxydant) vers le complexe oxydant (PPM). Ce transfert dépend du potentiel redox, du pH du milieu et de la structure du composé antioxydant.

Le test est basé sur la réduction du molybdène de l'étage d'oxydation (VI) à l'étage d'oxydation (V). Cette réduction se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate/ Mo (V)) à un pH acide. On mesure la diminution de la coloration du complexe molybdène (VI) en présence d'antioxydant. A la différence des autres tests, ce test permet non seulement de quantifier l'apport de l'activité antioxydante des polyphénols mais aussi d'autres composés antioxydants tel que les vitamines.

La méthode consiste à introduire dans un tube Eppendorff 300 µl de composé phénoliquephénolique mélangées à 2.7 ml d'un réactif composé de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.6 M), de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (28 mM) et du molybdate d'ammonium (4 mM). Le tube est ensuite bien fermé puis incubé à 95°C pendant 90 minutes. Après les avoir refroidis, l'absorbance est mesurée à 695 nm. Le témoin est constitué de 300 µl de méthanol mélangé avec 2.7 ml du réactif mentionné ci-dessus[190].

Les étalons, les échantillons et les témoins sont incubés dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalentd'acide gallique par gramme de matière sèche (mg E AG/g Ms).

	60C°	70C°	80C°	90C°	100C°
Acide gallique	59.84	70.12	80.28	89.65	100.20
vanilline	59.84	70.26	79.89	89.78	99.94
Acide ascorbique	60.23	70.00	80.15	89.91	99.81

**Tableau 7** : Résultat de l'activité ontioxydant

### 5-3-Le test DPPH :

Le test DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydante.

En effet, le DPPH se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. Cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule. La présence de ces radicaux DPPH• donne lieu à une coloration violette foncée de la solution, qui absorbe aux environs de 517 nm. La réduction des radicaux DPPH• par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution à examiner.

L'évaluation de la capacité antioxydante est réalisée comme suit : à 0.5 ml d'une solution méthanolique de DPPH (7.8 mg DPPH dans 100 ml méthanol) a été mélangé 0.3 ml de composé phénolique. Le mélange obtenu est ensuite gardé à l'abri de la lumière à la température ambiante pendant 30 minutes. Puis l'absorbance est mesurée à 517 nm contre un témoin composé de 0.5 ml de la solution de DPPH et de 0.3 ml de méthanol[189].

La préparation des échantillons et du témoin est réalisée dans les mêmes conditions opératoires. La décroissance de l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre et le % IC (pourcentage d'inhibition) est calculé suivant la formule ci-dessous

$$\% \text{ IP} = [ (A_{t_0} - A_{t_{30}}) / A_{t_0} \times 100 ].$$

Avec  $A_{t_0}$ : absorbance du témoin (ne contenant aucun antioxydant) après 30 minutes

$A_{t_{30}}$ : absorbance des composé mesurés après 30 minutes.

L'activité anti radicalaire exprimée en  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ ), la dose anti radicalaire nécessaire pour provoquer 50% d'inhibition. Toutes les résultats présentés sont des moyennes ( $\pm$  SEM) et analysées avec trois répétition.

DPPH :

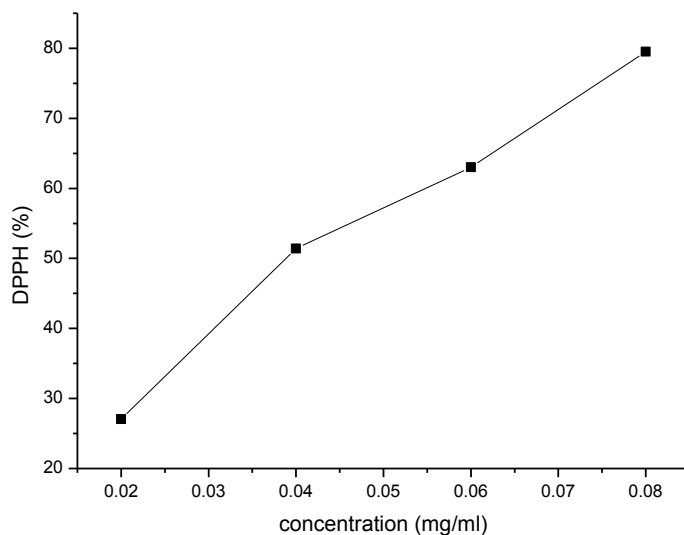


Figure 31 :activité antioxydant (DPPH) gallique à 50 °C pendant 30 min

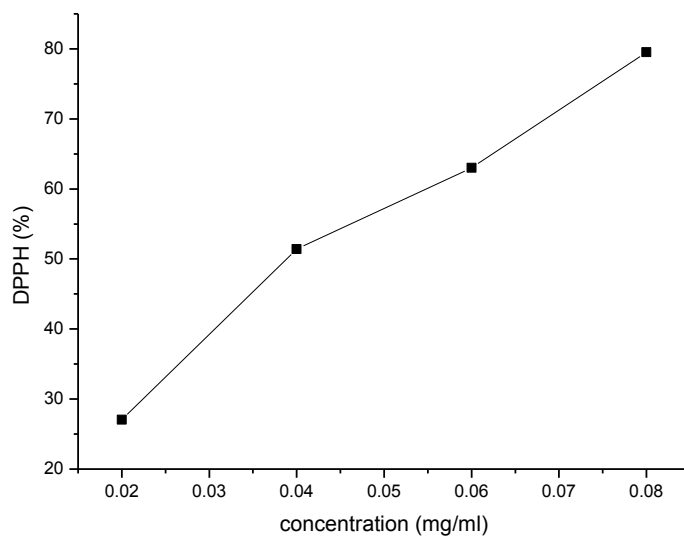
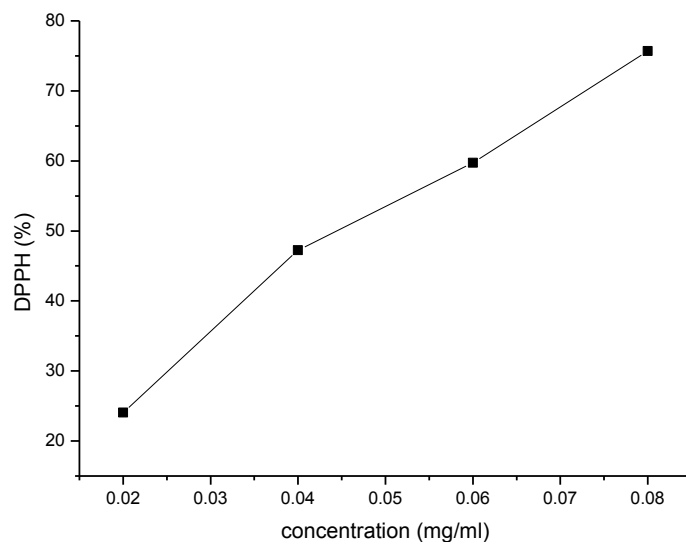
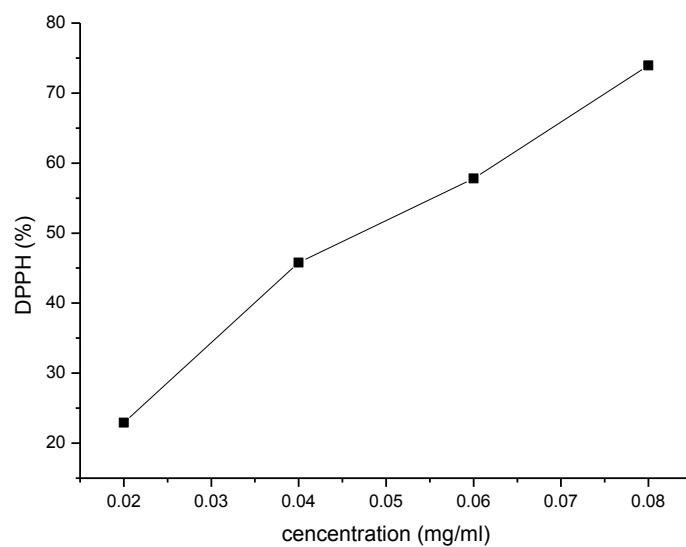


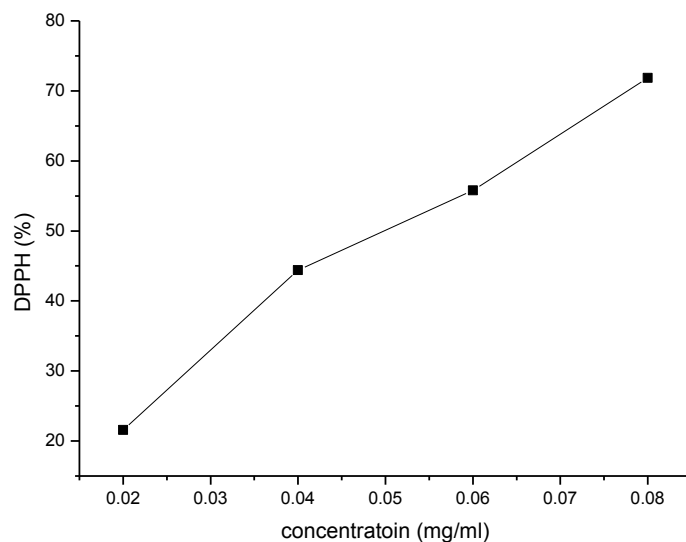
Figure 32 :activité antioxydant (DPPH) gallique à 60 °C pendant 30 min



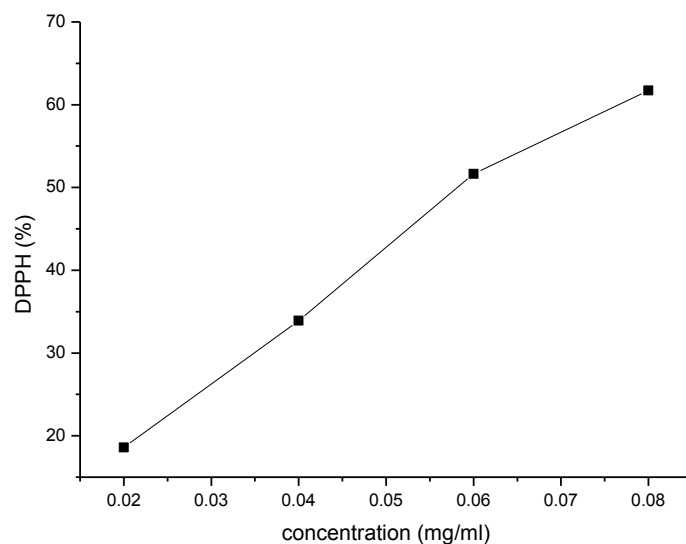
**Figure 33** :activité antioxydant (DPPH) gallique à 70 °C pendant 30 min



**Figure 34** :activité antioxydant (DPPH) gallique à 50 °C pendant 30 min



**Figure 35** :activité antioxydant (DPPH) gallique à 90 °C pendant 30 min



**Figure 36** :activité antioxydant (DPPH) vanilique à 50 °C pendant 30 min

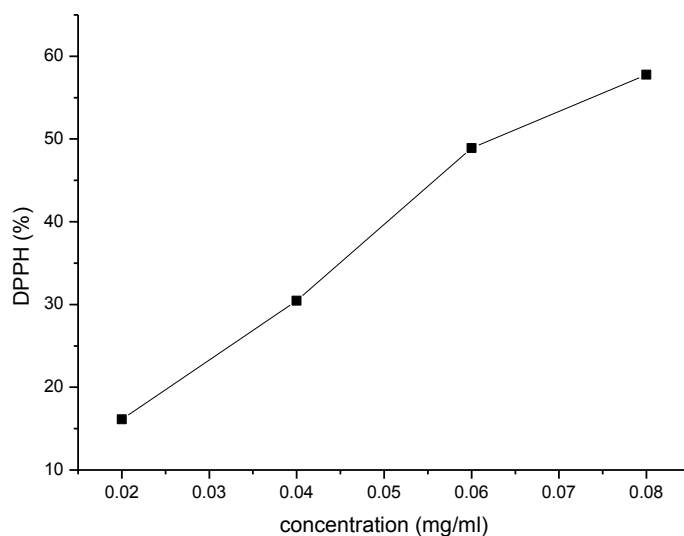


Figure 37 :activité antioxydant (DPPH) vanilique à 60 C° pendant 30 min

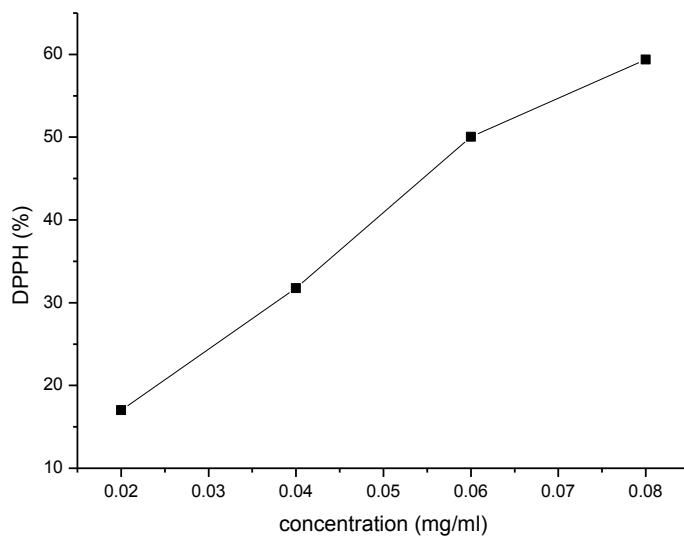
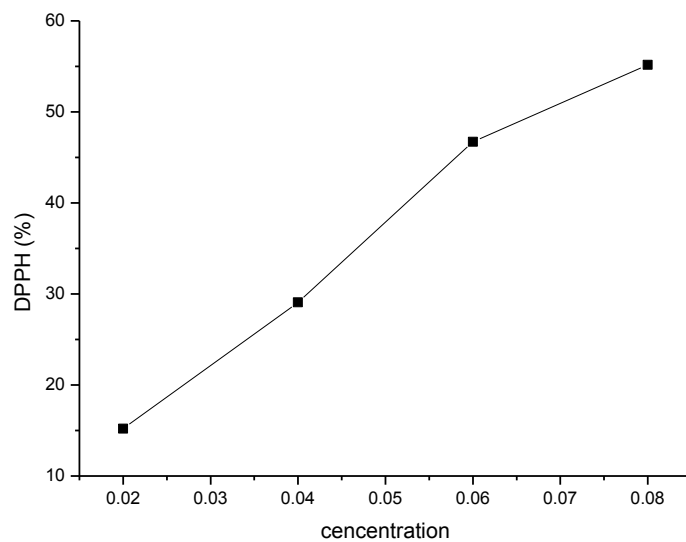
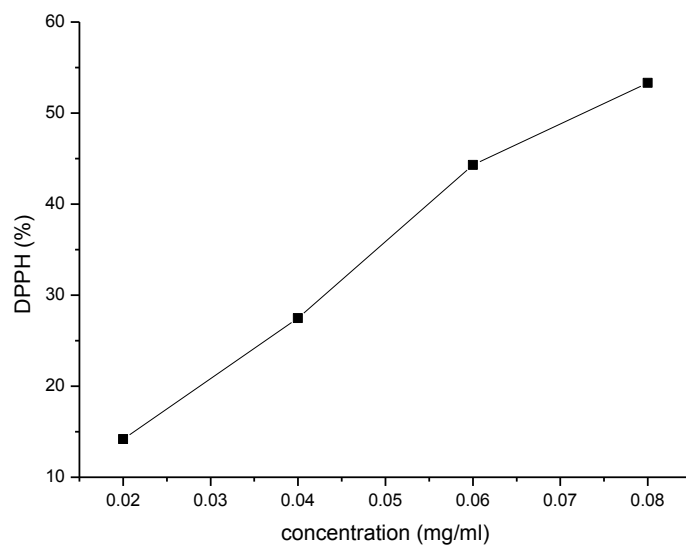


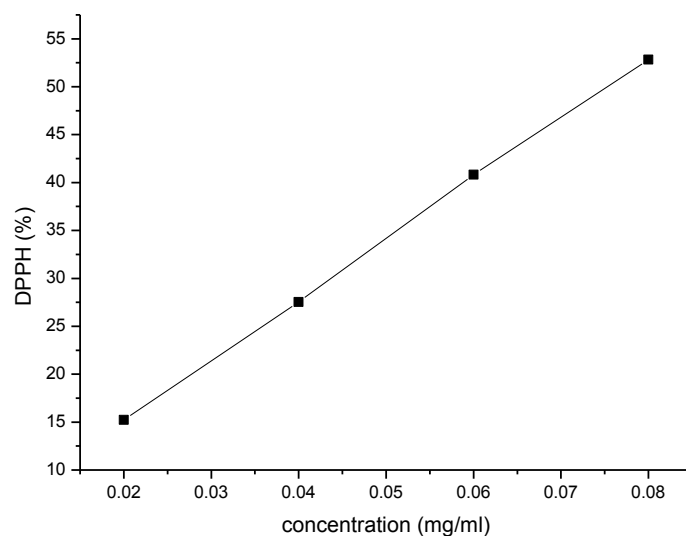
Figure 38 :activité antioxydant (DPPH) vanilique à 70 °C pendant 30 min



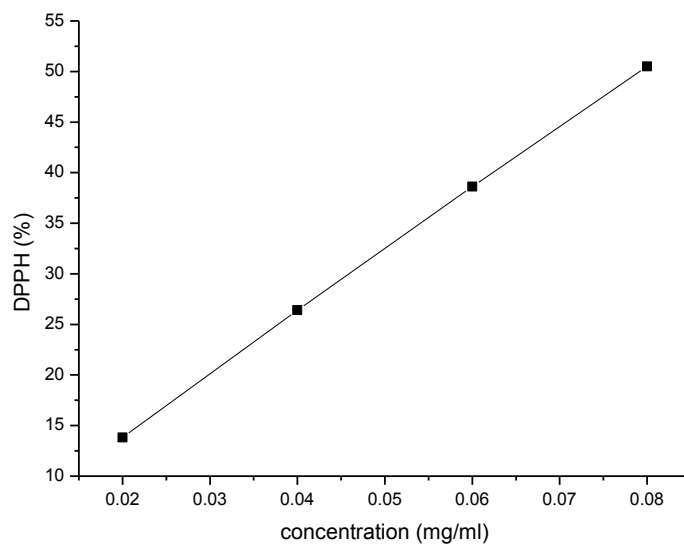
**Figure 39** :activité antioxydant (DPPH) vanilique à 80 °C pendant 30 min



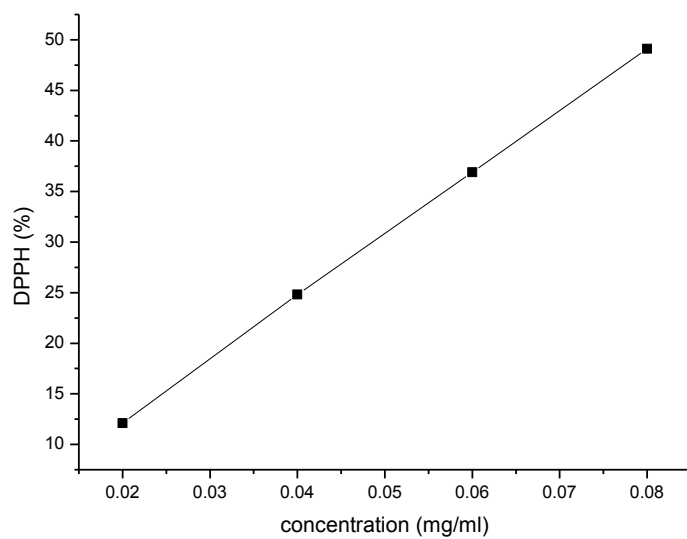
**Figure 40** :activité antioxydant (DPPH) vanilique à 90 °C pendant 30 min



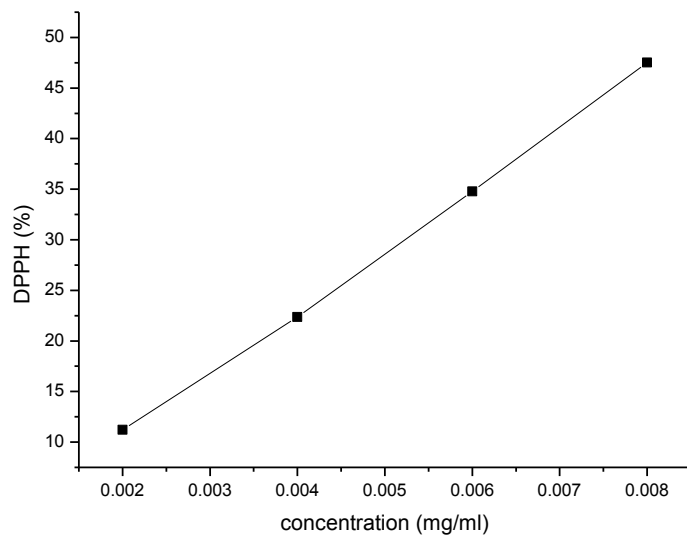
**Figure 41:** Activité antioxydant (DPPH) d'acide ascorbique à 60 °C pendant 30 mn



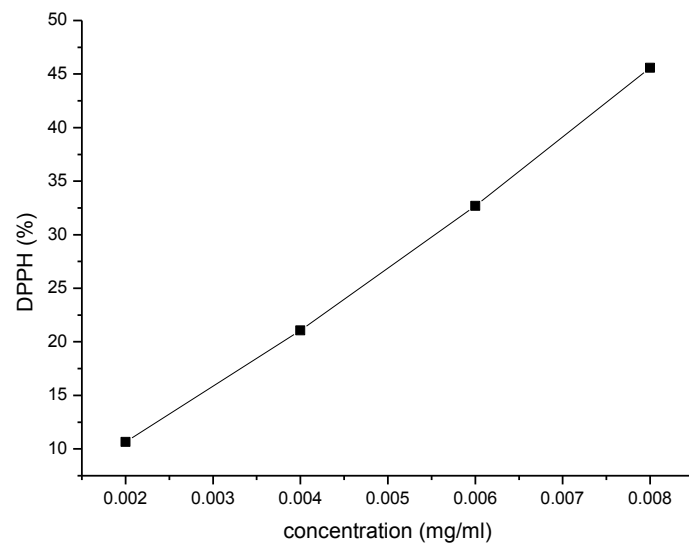
**Figure 42:** Activité antioxydant (DPPH) d'acide ascorbique à 70 °C pendant 30 mn



**Figure 43:** Activité antioxydant (DPPH) d'acide ascorbique à 80°C pendant 30 mn



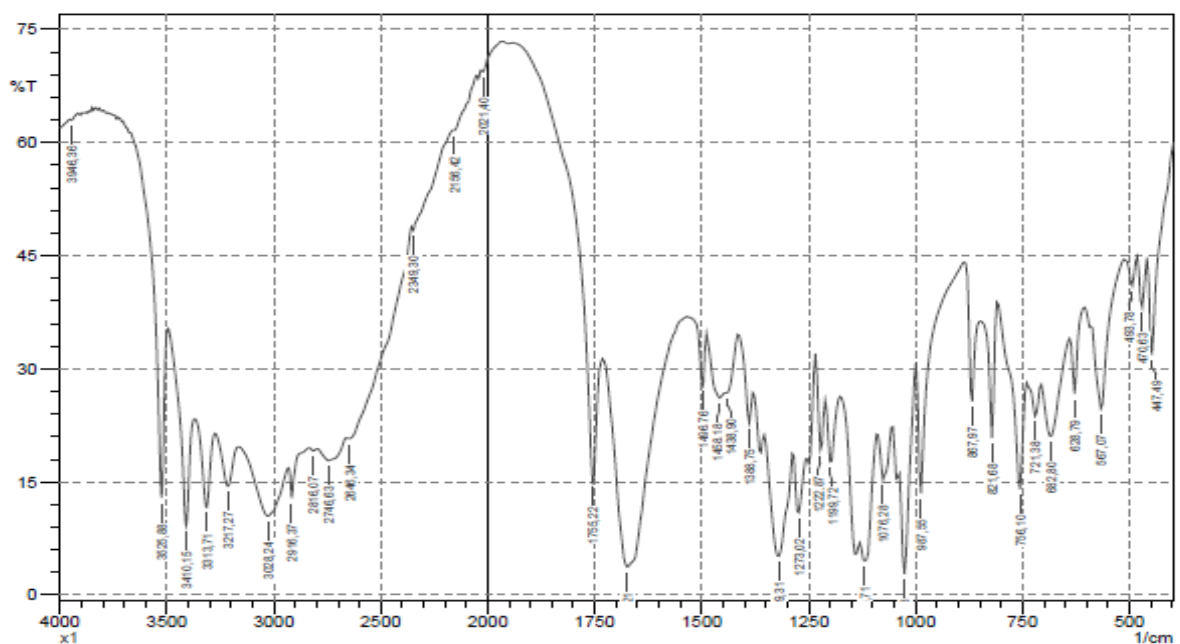
**Figure 44:** Activité antioxydant (DPPH) d'acide ascorbique à 90°C pendant 30 mn



**Figure 45:** Activité antioxydant (DPPH) d'acide ascorbique à 100 °C pendant 30 mn

#### 5-4-Analyse par la spectrophotométrie FT-IR

le spectre FTIR a été utilisé pour identifier les groupes fonctionnel des extraits et composés phénoliques sur la base de la valeur de crête dans la région du rayonnement infrarouge .Le spectre FTIR ( $4000-500\text{cm}^{-1}$ ) de différent d'extrait ont été enregistrés et l'onde spécifique et les intensités ont été examinés .



**Figure 46 :** Spectre infrarouge de l'acide ascorbique traité à 50 °C pendant 2 h

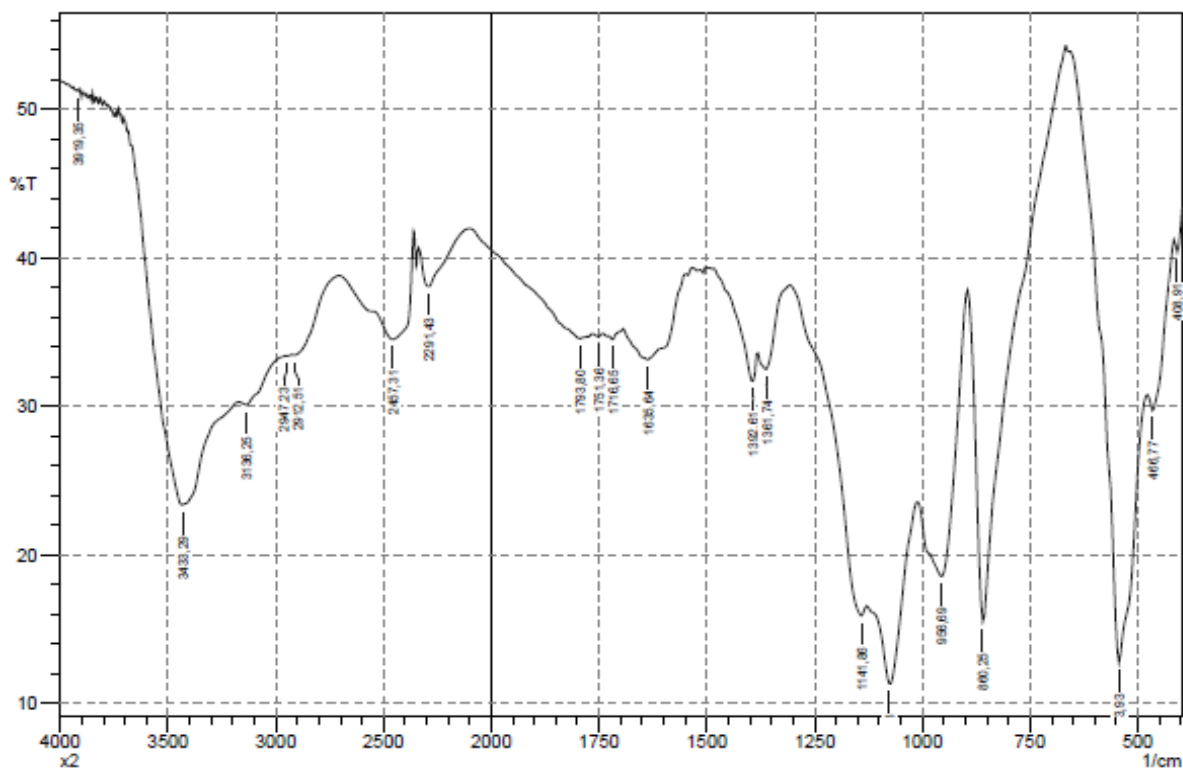


Figure 47 : Spectre infrarouge de l'acide ascorbique traité à 100 °C pendant 2 h

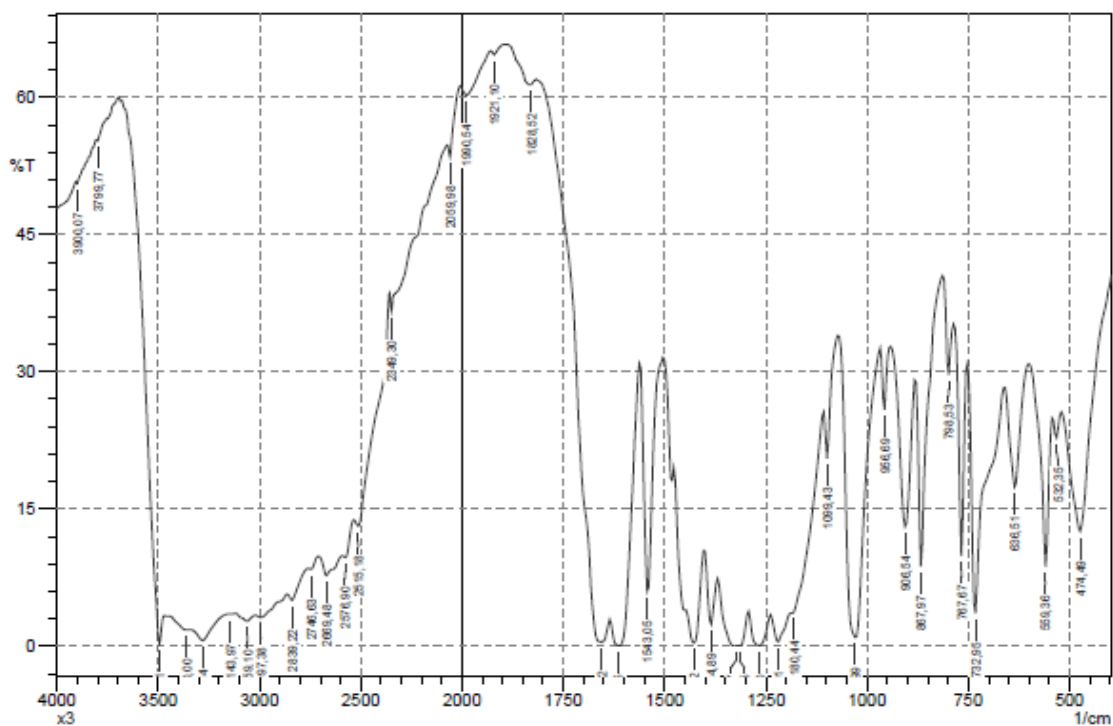


Figure 48: Spectre infrarouge de l'acide gallique traité à 50 °C pendant 2 h

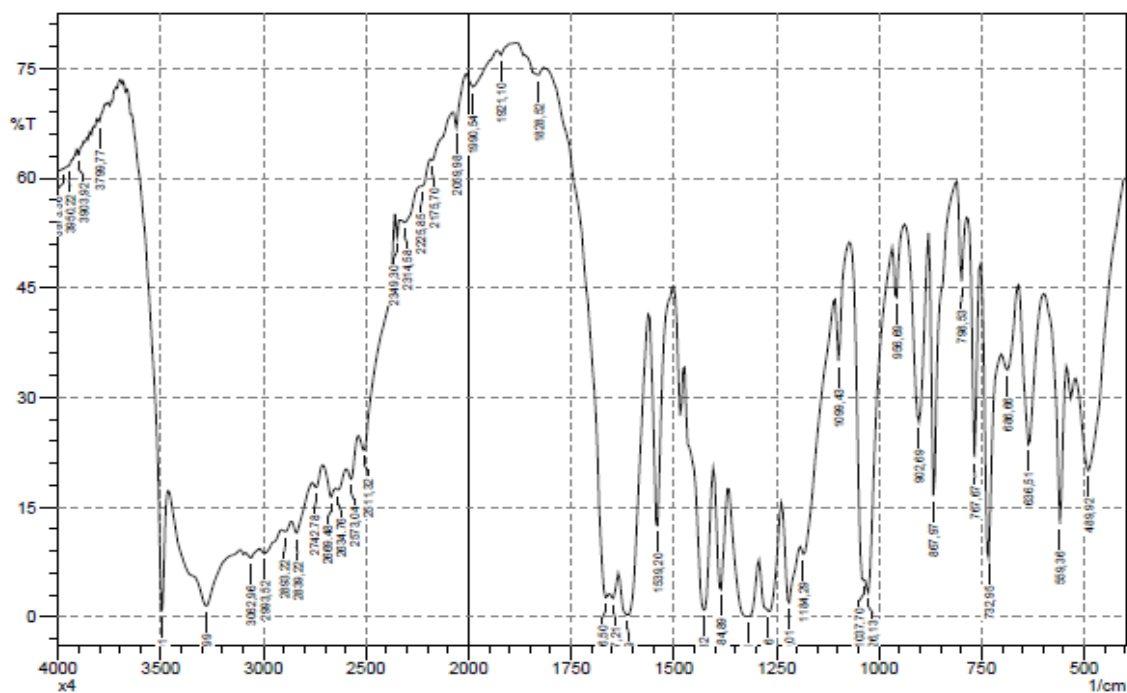


Figure 49 : Spectre infrarouge de l'acide gallique traité à 100 °C pendant 2 h

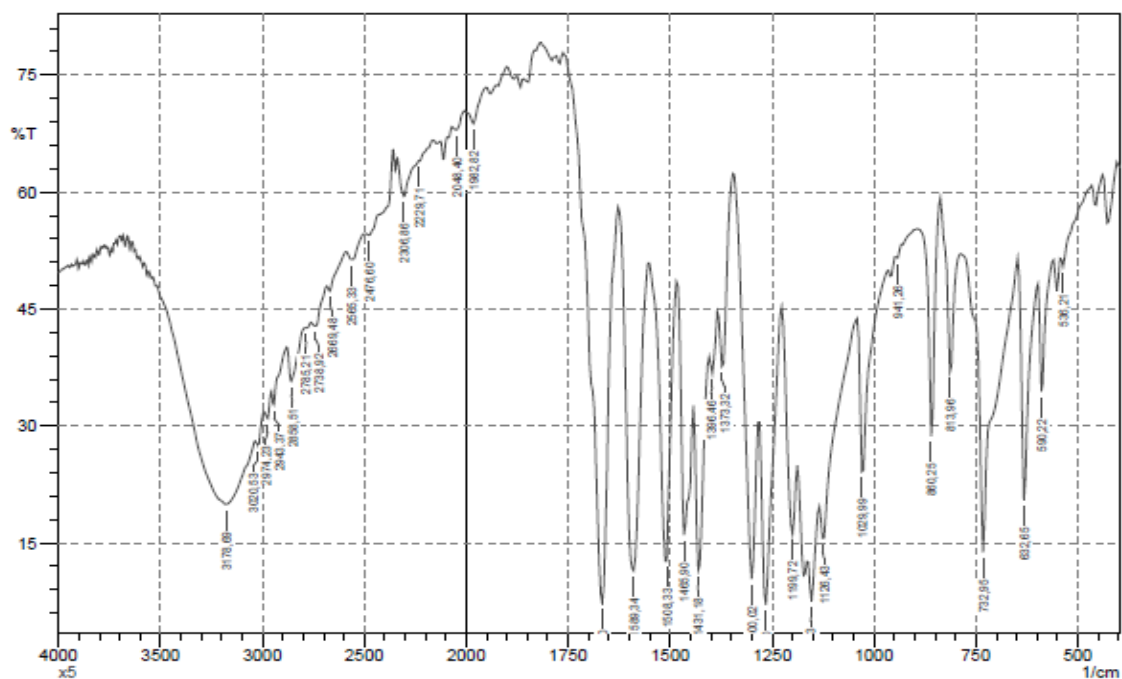
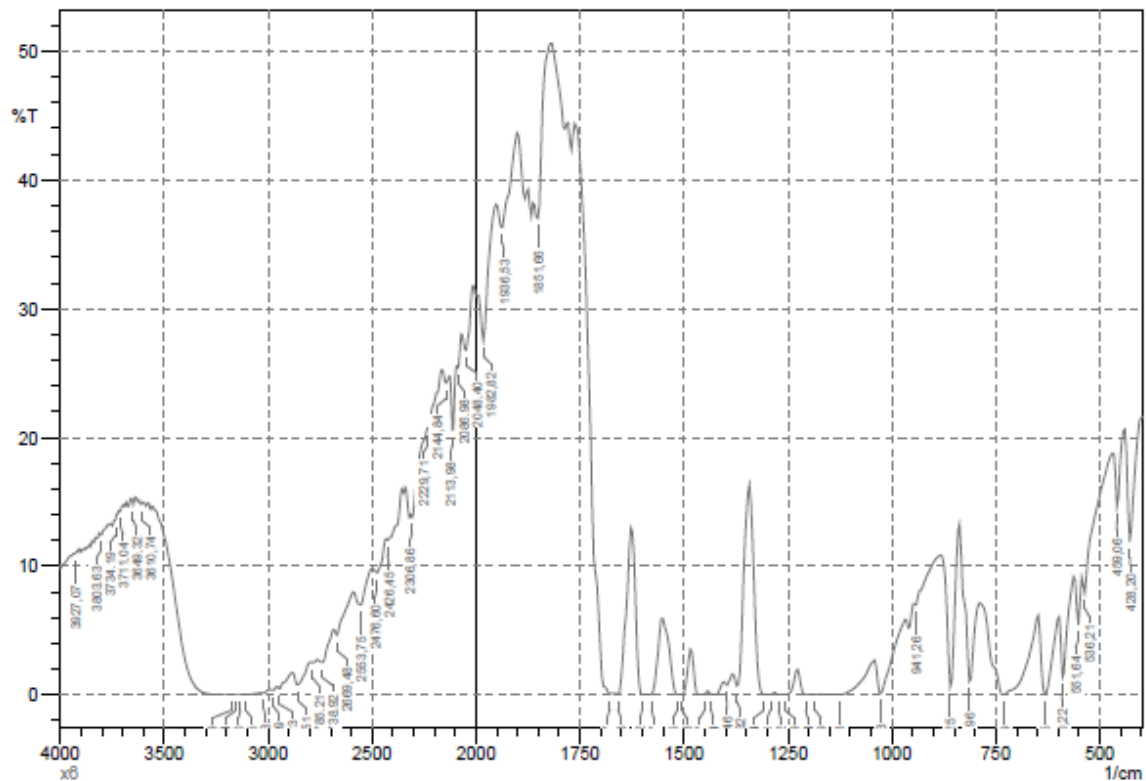


Figure 50 : Spectre infrarouge de vanilline traité à 50 °C pendant 2 h



**Figure 51:** Spectre infrarouge de vanilline traité à 100 °C pendant 2 h

les spectres infrarouge de les acides : ascorbique , gallique et vanilline traité à 50C° pendant 2 h et les acides: ascorbique, gallique et vanilline traité à 100 C° pendant 2 h : le spectre infrarouge de l' acide ascorbique pendant à 50 °C et l' acide ascorbique pendant à 100 °C Nous notons la disparition de certains des pics en raison de liens cassés ou tops constituent une nouvelle indication de la forme de nouveaux liens à tout autre aspect constituant.

### Discussion

Les polyphénols sont des phytomicronutriments très courants dans les fruits et légumes. La consommation de polyphénols a été estimée à environ 1 g/j. Les fruits (hors jus) et légumes apporteraient environ 300 mg/j de polyphénols monomères dans une alimentation classique. Malgré leurs structures très différentes, ils partagent un certain nombre de caractéristiques : une implication dans la couleur des fruits et légumes ; des propriétés antioxydantes ; des propriétés protectrices envers certaines maladies dégénératives tels des cancers et maladies cardiovasculaires. Les polyphénols sont impliqués dans la couleur soit sous forme native (anthocyanes, flavonols), soit après oxydation (par le phénomène de brunissement enzymatique); ils sont abondants dans les baies, et de nombreux autres fruits, et sont souvent plus concentrés dans les zones externes

du fruit ou légumes. Les propriétés anti-oxydantes de ces molécules ont été particulièrement étudiées. En effet par leurs propriétés de capture de radicaux ou d'électrons et leur sensibilité à l'oxydation, ces molécules sont impliquées lors des phénomènes d'oxydation. Ceux-ci représentent le deuxième mécanisme de perte organoleptique et nutritionnelle des aliments, juste après les dégradations microbiennes. Enfin, de très nombreux travaux mettent en exergue les propriétés favorables de ces molécules pour la santé. Outre le rôle de certains polyphénols comme précurseurs de la vitamine A, les effets les mieux prouvés concernent la prévention de la dégénérescence maculaire liée à l'âge par la lutéine, ou la prévention du cancer de la prostate par le lycopène .

Les polyphénols quant à eux sont impliqués dans la santé cardiovasculaire par leurs effets vasodilatateurs et anti-inflammatoires.

Des traitements thermiques sont appliqués aux fruits et légumes pour en améliorer la texture, pour les stabiliser, permettant ainsi un accès toute l'année à des produits attractifs et variés, alors que les fruits et légumes frais sont hautement périssables, et pour en garantir la sécurité microbiologique. La sévérité des traitements thermiques appliqués est très variable. Ainsi, garantir la sécurité microbiologique de conserves de légumes, généralement de  $\text{pH} > 5$ , au cours d'une conservation au long terme à température ambiante, exige des traitements sévères (stérilisation). Enfin, un blanchiment est souvent nécessaire en préalable à la congélation ou au séchage. Les fruits et légumes ont en commun d'être majoritairement composés de parenchyme, bien qu'ils correspondent à différents organes de la plante, fruit, partie végétative, racine, chacun de ces organes comprenant différents types de tissus. La vacuole est un compartiment majeur occupant 80 à 90% du volume des cellules. Elle contient de l'eau et des substances organiques et inorganiques, substances de réserve mais aussi métabolites secondaires, dont les polyphénols. Dans le tissu végétal intact, ces molécules sont donc strictement compartimentées et protégées de l'oxydation. L'effet des traitements thermiques sur les matrices végétales et leurs phytomicronutriments est complexe. En effet, il va intégrer successivement la déstructuration proprement dite, due à la destruction des membranes plasmiques (vers  $50^{\circ}\text{C}$ ) puis des structures pariétales (à haute température), et la dégradation des phytomicronutriments sous l'effet des enzymes libérées ou de réactions purement chimiques. La disparition des membranes (membrane cytoplasmique, membranes des plastes) permet en effet le libre accès de l'oxygène et des enzymes à leurs substrats. Les polyphénols vont donc pouvoir être exposés à des réactions, la principale

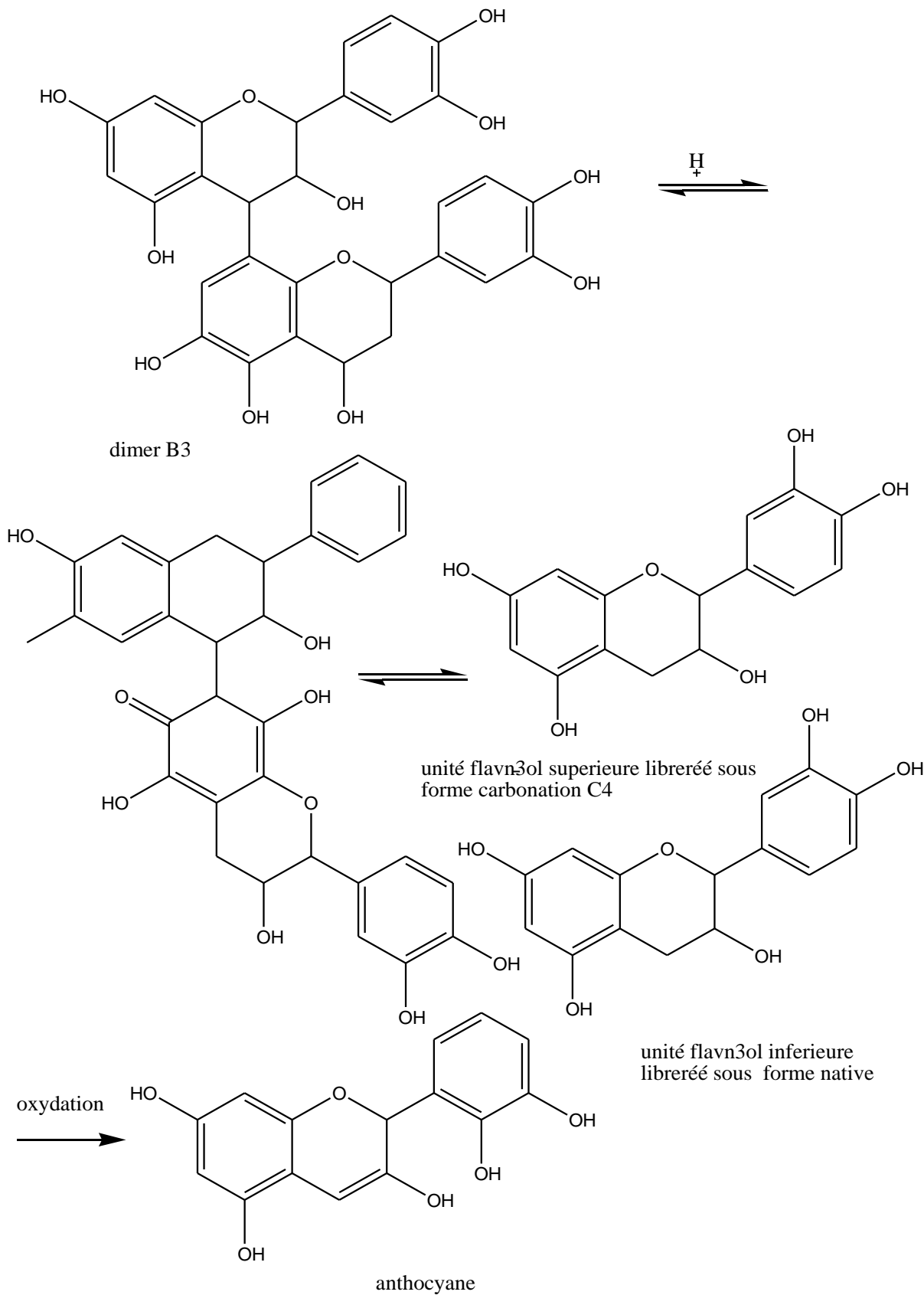
étant l'oxydation, pouvoir diffuser plus librement, et pouvoir interagir avec les macromolécules présentes, principalement les polyosides pariétaux.

L'impact des traitements thermiques sur les micronutriments des fruits et légumes en lien avec leur effet sur la santé est d'un intérêt récent, mais des travaux plus anciens s'y sont intéressés en tant que déterminants de qualités sensorielles principalement la couleur. Les travaux identifiables dans la littérature peuvent être regroupés en deux catégories : d'une part des études *in vitro* sur des molécules isolées, qui permettent d'identifier des mécanismes et molécules néoformées, et qui indiquent une certaine fragilité, et d'autre part des bilans appliqués sur des procédés, aux résultats très variables et aux indicateurs souvent contestables.

### **Les mécanismes de dégradation thermique des polyphénols**

Nous ne traiterons pas ici des mécanismes d'oxydation, et en particulier d'oxydation enzymatique, des polyphénols. Un mécanisme spécifique de dégradation par clivage de liaison C-C, susceptible de se produire dans les produits acides traités thermiquement, a été décrit pour les proanthocyanidines.

Les polymères de flavan-3-ols sont nommés proanthocyanidines car ils conduisent à la formation d'anthocyanes lors de leur dépolymérisation en milieu acide. En milieu acide à chaud, la liaison interflavanique des procyanidines, qui est relativement fragile, est rompue (Figure 52).



**Figure 52** : Hypothèse de mécanisme de dégradation des proanthocyanidines en milieu acide à chaud.

Sa rupture conduit à la formation d'un carbocation réactif localisé en C(4) de l'unité flavan-3-ol supérieure (position 4, stabilisée en résonance avec sa forme méthylène quinone) et, à la libération de l'unité (-)-épicatéchine ou (+)-catéchine (position 6 ou 8) correspondant à l'unité inférieure. Les carbocations formés sont des molécules très réactives qui peuvent s'oxyder dans le milieu afin de former des anthocyanes.

De plus, ces carbocations, formés en milieu acide, peuvent réagir avec des groupements nucléophiles des protéines, des polysaccharides et des polyphénols puis former des liaisons exogènes avec la chaîne polypeptidique, polysaccharidique ou des liaisons polyphénol/polyphénol. Lors de traitements à haute température (50-60°C), la structure des polyphénols peut être dégradée. De plus, les traitements thermiques peuvent conduire à la formation d'*o*-quinones et d'*o*-semi-quinones, molécules très réactives qui peuvent réagir avec des groupements nucléophiles des protéines et/ou des polysaccharides.

# CONCLUSION GENERALE

---

## Conclusion générale

La famille des polyphénols renferme de nombreux composés d'intérêt nutritionnel et valorisables dans l'industrie alimentaire et la cosmétologie en raison de leurs propriétés réductrices (antioxydants) et de leur capacité à interagir avec les radicaux libres.

Ce travail comporte deux parties :

Une étude de l'effet des température et l'oxygène sur la stabilité des composés phénoliques

Des différentes analyses pratiquées.

L'étude des propriétés antiradicalair des composés phénoliques, l'activité antioxydant total et DPPH des composés phénoliques traités par différents températures.

Globalement, les polyphénols sélectionnés dans ce travail, présentent une forte activité antioxydant et sont particulièrement très intéressants pour leurs applications dans le domaine alimentaire et pour leur capacité à protéger l'organisme contre le stress oxydant et ce dès le compartiment gastrique. L'ingestion régulière de poly phénols par la consommation de fruits et légumes pourrait permettre à notre organisme de renforcer ses moyens de défense contre les processus d'oxydation qui menacent quotidiennement nos cellules.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude ne constitue qu'une ébauche dans le domaine de recherche de l'influence et la stabilité des composés phénoliques vis-à-vis la température et l'oxygène.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

### Références bibliographiques

- [1]- **A. Torreggiani, M.Tamba, A.Trincherio, S.Bonora.** (2005). Copper(II)–Quercetin complexes in aqueous solutions : spectroscopic and kinetic properties. *Journal of Molecular Structure.* 744–747.(SPEC. ISS.) 759-766.
- [2]- **I. Esparza, I.Salinas, C.Santamaria , J.M.Garcia-Mina ,J.M. Fernandez.** (2005). Electrochemical and theoretical complexation studies for Zn and Cu with individual polyphenol. *Analytica Chimica Acta.* 543: 267–274.
- [3]- **J.M. Hynes, M.O’Coinceanainn.** (2001). The kinetics and mechanisms of the reaction of iron(III) with gallic acid, gallic acid methyl ester and catechin. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 85: 131–142.
- [4]- **M.N. Clifford.** (1999). Appendix 1. A nomenclature for phenols with special reference to tea  
*Washington, DC, CRC Press, Boca Raton Florida.* 41 (5): 393-397.
- [5]- **M.D’Archivio, C.Filesi, R.Di Benedetto, R.Gargiulo, C.Giovannini. etR. Masella.**(2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-dell’Istituto-Superiore-di-Sanità.* 43(4) : 348-361.
- [6]- **J.Bruneton.** (2008). Acides phénols. In: Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. *Ed: Tec & Doc. Lavoisier, Paris.* pp198-260.
- [7]- **M. Skerget, P. Kotnik, B. Hadolin, A.R. Hras, M. Simonic et Z. Knez.** (2005). Phenols, proanthocyanidines, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry.* 89:191-198
- [8]- **X.H. Han, S.S. Hong, J.S. Hwang, M.K. Lee, B.Y.Hwang, J.S. Ro .** (2007). Monoamine oxidase inhibitory components from *Cayratia japonica*. *Archives Pharmacal Research.* 30: 07- 13.
- [9]- **K.Chira , J.Such , C.Saucier , L.Teissèdre.** (2008). Les polyphénols du raisin. *Ed :Springer.*  
6 :75-82.
- [10]- **C.Manach, A.Scalbert, C.Morand, C.Remesy, L.Jimenez.** (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition.* 79:727-747.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [11]- **A.Podsedek, J.Wilska-Jeszka, B.Anders, J.Markowski.** (2000). Compositional characterisation of some apple varieties. *European Food Research and Technology*. 210: 268- 272.
- [12]- **K.Ghedira.** (2005). Les flavonoïdes: structures, propriétés biologiques, rôles prophylactiques et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. 04:162-169.
- [13]- **A.Crozier.** (2003). Classification and biosynthesis of secondary plant products: an overview.  
  
In *Plants' Diet and Health*. Ed. Goldberg. pp: 27- 48.
- [14]- **I.C.W.Arts, B.Van de Putte, P.C.H Hollman .** (2000). Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 2. Tea, Wine, Fruit juices and chocolate milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48:1752-1757.
- [15]- **M.J.L.Hertog, P.C.H.Hollman, M.B.Katan.** (1992). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40:2379-2383.
- [16]- **C.Manach.** (1998). Biodisponibilité des flavonoïdes. Thèse: Clermont-Ferrand: Université Blaise Pascal.
- [17]- **G.Mazza, L.Fukumoto, P.Delaquis, B.Girard, B.Ewert.** (1999). Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47:4009-40017.
- [18]- **M.G.L.Hertog, .H.P.C.Hollman, B.Van de Putte .** (1993). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41:1242-1246.
- [19]- **I.C.W.Arts , B.Van de Putte , P.C.H.Hollman .** (2000). Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods and processed foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48:1746-1751.
- [20]- **I-J.Košir , B.Lapornik , S.Andrenšek , A.Wondra , Vrhovšek U et J.Kidric .** (2004). Identification of anthocyanins in wines by liquid chromatography, liquid

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. *Analytica Chimica Acta* . 513:277-282.

[21]- **I.J.Košir , B.Lapornik , S.Andrenšek , A.Wondra ,Vrhovšek U et J.Kidric** . (2004). Identification of anthocyanins in wines by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. *Analytica Chimica Acta* . 513:277-282.

[22]- **X.Vitrac , A.Bornet , R.Vanderlinede** . (2005). Determination of stilbenes (Delta-viniferin, trans-resveratrol, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol, epsilon-niferin) in Brazilian wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (14):5664-5669.

[23]- **M.Paris , M.Hurabeillen** . (1981). Abrégé de Matière médicale, pharmacognosie. Ed: Masson. 210-215

[24]- **V.Micol , N.Caturia , L.Perez-Fons , V.Mas , L.Perez . et A.Estepa** . (2005). The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia Rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Research*. 66: 129-136.

[25]- **S.Silva , L.Gomes , F.Leitao , M.Bronse , A.V.Caelho . et V.Boas** . (2010). Secoiridoids in olive seed: characterization of nuzhenide and 11-methyl oleosides by liquid chromatography with diode array and mass spectrometry. *Grassasy Aceites*. 61 (02):157-164.

[26]- **R.Briante , M.Patumib , F.Febbrina . et R.Nuccia** . (2004). Production of highly purified hydroxytyrosol from *Olea europaea* leaf extract biotransformed by hyperthermophilic B- glucosidase. *Journal of Biotechnology*. 111(01): 67-77.

[27]-**A.Aguilera-Carbo, C.Augur, L.A.Prado-Barragan, E.Favela-Torres, C.N.Aguilar**. (2008). Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 78:189-199.

[28]- **D.Linden et Lorient** . (1994). Pigments et arômes .In : Biochimie agro-industrielle valorisation alimentaire de la production agricole. Ed : Masson.338-340.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [29]- **M.M.Cowan** . (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 564-582.
- [30]- **J.E.O'Connell , P.F.Fox** . (2001). Signification and applications of phénolic compounds in the production and quality of milk dairy products: a review. *International Dairy Journal*. 11(3): 103-120
- [31]- **P.Ribéreau-Gayon** . (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod. Paris. pp : 173-201.
- [32]- **T.Bruyne, L.Pieters , H.Deelstra . et A.Vlietink** . (1999). Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematic and Ecology*. 27: 445- 459.
- [33]- **S.Derbel, K.Ghedira** . (2005). Phytothérapie et nutrition : Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*. 1:28-34.
- [34]- **O.Dangles**. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier, 2006, 29-50.
- [35]- **G.Di Carlo, N.Mascolo , A.A.Izzo , F.Capasso** . (1999). *Rev. Life Sci.*, 65,337-53.
- [36]- **R.Landolfi , R.L.Mower , M.Steiner** . (1984). *Biochem Pharmacol*, 33,1525-1530.
- [37]- **J.Ward**. (1994). *Austr. J. Physic.*, 23, 1297-301.
- [38]- **B.Limasset, C.Doucen, J.ch.Dore, T.Ojasoo, M.Damon, A.C.dePaulet** .(1993). *Biochem. Pharmacol.*, 46, 1257-1271.
- [39]-**G. Di Carlo , Mascolo N., A.A.Izzo , F.Capasso** . (1999). *Rev. Life Sci.*, 65,337-53.
- [40]- **A.A.Izzo** . (1996). *Rev. J. Pharm. Pharmacol.*, 48, 1103-1111.
- [41]-**M.Bracke, B.Vyncke, G.Opdenakker, J.M.Foidart,G.DePestel, M.Mareel**.(1991).
- [42]- **J.Jodoin , M.Demeule , R.Béliveau** .(2002). *J. Biochem. Biophys. Acta*, 1542,149-159.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [43]- A.Scutt , S.Meghji , J.P.Canniff , W.Harvey. (1987). *Experientia.*, 43, 391-393.
- [44]- M.T.Goodarzi1, F.Zal1 , M.Malakooti , M.R.Safari1, S.Sadeghian1. (2006). *Acta. Medica Iranica* , 44,41-45.
- [45]- G.G.Duthie , S.J.Duthie, J.A.M.Kyle. (2000). *Nut. Res. Rev.*, 13, 79-106.
- [46]- K.C.Ong, H.E. Khoo. (1997). *Gen. Pharmacol.*, 29,121-126.
- [47]- K.C.Ong, H.E.Khoo. (2000). *Life Sci.*, 67, 1695-1705.
- [48]- M.G.Hertog , E.J.Feskens, P.C.Hollman, M.B.Katan, D.Kromhout . (1993). *Lancet*, 342,1007-1011.
- [49]- A.Yann C.& Ramarosan. (2005). *Pharmacol.Rep.*, 57,97-107.
- [50]- Chin Yen, Pin-Der Duh, Hui-Ling Tsai. (2002). *J. Food. Chem.*, 79,307-313.
- [51]- M.J.Laughton, B.Halliwel, P.J.Evans, J.Hoult, S.Robin. (1989). *Biochem.Pharmacol.* , 38, 2859-2865.
- [52]- M.Kessler, G.Ubeau , L.Jung. (2002). *J. Pharm. Pharmacol.*, 55,1-11.
- [53]- G.C.Yen, H.Y.Chen, H.H. Peng. (1997). *J. Agr. Food Chem.*, 45,30-34.
- [54]- O.I. Aruoma, A.Murcia, J.Butler, B.Halliwel. (1993). *J. Agric. Food. Chem.*, 41, 1880- 1885.
- [55]- H.Kobayashi, S.Oikawa, K. Hirakawa, S.Kawanishi. (2004). *Muta. Res.*, 558,111-120.
- [56]- Gow-Chin Yen, Pin-Der Duh, Hui-Ling Tsai. (2002). *J. Food. Chem.*, 79,307-313.
- [57]- N.C.Cook & S. Samman. (1996). *J. Nutr. Biochem.*, 7,66-76.
- [58]-Wang et Mazza, 2002; Macheix *et al* 2005, Sarni Machando et Cheynier, 2006; Visioliet *al.*, 1999 .

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [59]- **P.Besançon**. (2000). Effets bénéfiques pour la santé des fruits et des légumes. Alimentation méditerranéenne et santé : actualité et perspectives. Montpellier, John Libbey. Pp99 .
- [60]- **O.Dangles**. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier, 2006, 29-50.
- [ ]-K. J. Carpenter ; The history of scurvy and vitamin C. Cambridge University Press, New York(1986).
- [61]- **O. Traxer, B. Huet, J. Poindexter, C. Pak, M. Pearle** ; *Effect of ascorbic acid consumption on urinary stones risk factors*. J. Urol, 17 (2003) 397-401.
- [62]- **P. Karabinas, D. Janakoudakis** ; *Kinetic parameters and mechanism of the electrochemical oxidation of L-ascorbic acid on platinum electrodes in acid solutions* . J. Electroanal. Chem., 160 (1984) 159-167.
- [63]- **B. N. Ames, R. Cathcart, E. Schwiers, P. Hochstein** ; *Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer : A hypothesis*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 78 (1981) 6858-6862.
- [64]- **D.Gonzalez-Gomez, M.Lozano, M.F.Fernandez-Leon, M.J.Bernalte, M.C.Ayuso , A.B.Rodreguez** . Sweet cherry phytochemicals: identification and characterization by HPLC DAD/ESI-MS in six sweet-cherry cultivars grown in Valle del Jerte (Spain). of Food Composition and Analysis 2009; p:533–539.
- [65]- **L .DELATTRE** .Application de La technologie Analytique des Procédés dans L'étude Del' homogénéité de Poudres pour Compression Directe : Edition TECHNIP, 2006-2007, Page : 58- 23.
- [66]- **Belyagoubi Née Benhammou Nabila**. (2012)" Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien". Thèse Doctorat, Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen
- [67]- **Kanoun Khadidja**. (2011), "Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaïne)" . Mémoire de magister , Université Aboubekr Belkaid Tlemcen.