

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université SAAD DAHLEB de BLIDA-1

Faculté des sciences
Département de chimie



En vue de l'obtention d'un diplôme de Master en Chimie
Spécialité : Chimie appliqué

Thème :

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'ACTIVITE
ANTIOXIDANTE DES COMPOSES PHENOLIQUE
ET NON PHENOLIQUE ET LEURS SYNERGIE.
EXPERIMENTALEMENT ET PAR DFT

Présenté par :

ZEBOUDJ ABDELMALEK & MASSOUNE Mohamed Anisse

Devant le jury composé de :

Mme. A. BESSI USDB1 PRESIDENTE

Mr. A. BELAFRIEKH MCB USDB1 EXAMINATEUR

Mr. AHMED AIT YAHIA MAA USDB1 DIRECTEUR DE MEMOIR

Mme. FELLA ATI MCB USDB 1 INVITE

Remerciement

La réalisation de ce travail a été possible grâce au bon dieu le tout puissant et le miséricordieux pour le courage, la volonté, la patience et la santé qu'il nous a donné durant toutes les années d'étude.

Nous tenons à remercier vivement Mr **AIT YAHIA** pour la confiance, l'encadrement, la disponibilité et la rigueur scientifique et son sens d'écoute et d'échange. J'espère que ce travail sera à la hauteur de ses espérances.

Mme **HAMZA** pour la disponibilité, les encouragements, la confiance, les conseils précieux que vous nous avez accordée.

Nos sincères remerciements vont aussi pour Mme **ATI** d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos sincères remerciements vont aussi pour les membres de jury Pour nous avoir répondu présent à notre soutenance et faire l'honneur de juger ce modeste travail.

Nos remerciements vont aussi à tous les enseignants du département de chimie de la faculté des sciences de Saad Dahlab Blida 01.

Les étudiants de notre promotion chimie appliqué 2020/2021.

Un grand merci à tous.

Dédicace

À l'aide de Dieu tout puissant, qui m'a tracé ce chemin, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie

Avec un énorme plaisir à :

Ma très chère maman, qui a consacré sa vie pour bâtir la mienne. Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour le sacrifice que tu as consenti pour mon instruction et mon bien être. Je te remercie pour tout le soutien et l'amour que tu ma portée depuis mon enfance. Que ce modeste travail soit l'exaucement de tes vœux tant formulés et le fruit de tes innombrables sacrifices.

Mes chères sœurs Asma et Ilham, celles qui m'ont accompagné dans les moments les plus difficiles et m'ont toujours tendu une main secourable, celle qui ont coloré ma vie par leurs sourires et par leurs bontés. Sans eux, je ne serais pas ce que je suis devenue aujourd'hui.

Mes très chers grands parents et tous mes oncles

Mon beau-frère Massinissa pour son aide et ses encouragements.

Je tiens à remercier toutes l'équipe de l'association EL-BADR

En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble pendant toutes ces années. Merci pour votre amour, votre soutien et surtout votre joie de vivre ! Sachez que sans vous, rien de tout cela n'aurait été facile. Je prie Dieu de vous accorder le meilleur dans ce bas monde et dans l'au-delà.

À ceux qui me sont très chers : Samy, Rahim, Youness, Boulil, Younsi, Amdjed, Sofiane, Mounaim, Khalil, Ramzi, Abdelraouf.

A mes frères Fawzi, Dr.Rahni, Hamza , Mounir.

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mon amour. Vous m'avez toujours offert soutien et réconfort, j'exprime envers vous une profonde admiration, reconnaissance et attachement inconditionnels. Je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

Une spéciale dédicace à ma fiancée Selma. Ton encouragement et ton soutien furent la bouffée d'oxygène qui me ressourçait dans les moments les plus difficiles. Merci d'être toujours restée à mes côtés.

PAPA, de savoir que là-haut tu as trouvé la paix, la sérénité et le bonheur que tu mérites, nous aide à accepter le vide laissé par ton absence. Puisses-tu toujours veiller sur nous

À toute ma famille et à tous ceux qui ont contribué de loin ou de près, à la réalisation de ce mémoire.

Z. ABDELMALEK

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur A.AIT YAHYA,
Professeur à l'Université SAAD DAHLEB BLIDA, pour m'avoir guidé durant mon travail, et
m'avoir fait bénéficier de ses connaissances en chimie quantique et Modélisation
Moléculaire et en particulier à mon Co promotrice de travail Melle K .HAMZA professeur a
UNIVERSITE DE BLIDA*

*pour son aide précieuse durant tout le travaille
à le professeur de la chimie quantique et Modélisation Moléculaire Melle F .ATI pour son
aide au laboratoire de la chimie quantique*

*J'exprime ma profonde et respectueuse gratitude à Melle A BESSI,
Professeur à l'Université SAAD DAHLEB DE BLIDA, qui m'a fait l'honneur d'accepter de
présider le jury de ce mémoire.*

*Je tiens à adresser mes vifs remerciements et l'expression de mon profond respect à
Melle A BESSI , Professeur à l'Université SAAD DAHLEB BLIDA et à Monsieur. BELFRIEKH,
pour l'honneur*

qu'il nous a fait en acceptant d'examiner notre travail.

*J'adresse mes sincères remerciements à tous les collègues des laboratoires de
recherche «*

*et Modélisation Moléculaire ». Enfin, je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de
loin à la réalisation de ce travail.*

A mes chers parents Gasmi Aicha et Sliman Massoune

A ma chère grand-mère

A mes chers frères et sœurs :Chahrazed ,Alaa ,Abdelbaset et Iyad

A mes oncles et à mes tantes

A mes collègues du laboratoire

A mes amis(es)

A tous ceux qui me sont chers

M.Med ANIS

INTRODUCTION GENERALE**PARTIE THEORIQUE**

I.	Radicaux libres	2
I.1	Définition	2
I.2.	Type de radicaux libres	2
I.2.1.	Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (EROA)	2
I.2.2-a	Espèces réactives de l'oxygène Les ERO	3
I.2.2-b	Espèces réactives de l'azote (ERA)	3
I.3.	Sources de production des radicaux libres	4
I.4.	Dommages causés par les radicaux libres	5
I.4.1.	ADN	5
I.4.2.	Lipides	5
I.4.3.	Protéine	5
I.5	Stress oxydatif	5
I.6	Les antioxydants	6
I.6.1.	La classification des antioxydants	6
I.6.1-a.	Antioxydants synthétiques	6
I.6.1-b	Antioxydant hydrophile naturel	7
I.7	Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydants	7
I.7.1.	Méthode de blanchiment de la β -carotène	7
I.7.2.	Méthode du piégeage du radical libre DPPH	8
I.7.3	Méthode de dosage du pouvoir réducteur ferrique	8
II.	Théorie fonctionnelle de la densité	9
II.1	Théorie fonctionnelle de la densité DFT	10
II.2	Évaluation théorique de l'activité antioxydante	10
II.2.1.	Géométries et descripteurs moléculaires optimisés	10
IX.3.2	Orbitales moléculaires frontière	10
II.2.2	Le mécanisme de transfert d'atome d'hydrogène (HAT)	11
II.2.3	Le mécanisme de transfert séquentiel de protons par transfert d'électrons (SETPT)	11
II.2.4	Mécanisme de transfert séquentiel d'électrons et perte de protons (SPLET)	12
III.	La synergie	12

MATERIELS ET METHODES

I. Lieux d'expérimentation.	13
II. Appareillage et produits.	13
II.1 Appareils.	13
II.2 produits chimiques.	13
III. Méthodes.	14
III.1 Activité antioxydant des composés volatils purs.	14
III.2 Activité antioxydant des mélanges équi-volumiques.	18
III.3 Etude théorique des composés testés par la méthode de DFT.	22

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I.1 Introduction:	24
I.2 Effet synergiques des composés étudiés	28
I.3 Approche théoriques du pouvoir anti-oxydante.	33
I.3-1 Etude du mécanisme HAT	33
I.3-2 Etude du mécanisme SET-PT.	34
I-3.3 Etude du mécanisme SPLET :	34
I.4 Relation structures chimique / pouvoir antioxydant	35
I.4.1 les hydrocarbures oxygénés phénoliques	35
I.4.2 les Hydrocarbures	36

CONCLUSION

Résumé :

L'objectif de cette étude est cherché de quantifier l'activité antioxydant de quelque composé des huiles essentiel en utilisant la méthode de calcul théorique DFT, pour trouver une relation entre la structure chimique de ces composé et leur activité de piégeage des radicaux libre DPPH ces composés sont : thymol ; carvacrol et un mélange équimolaire de ce dernier a fin de visé le phénomène de synergie entre les deux composés

Pour la corrélation théorique, le BHA, BHT et le vitamine C ont été pris comme référence. Les résultats obtenus montrent que les valeurs de l'enthalpie de dissociation de la liaison O-H (BDE-OH), calculées au niveau de la théorie DFT (fonctionnelle hybride B3LYP) et la base standard 6-311G++(d,p) en phase gazeuse, sont en bon accord avec l'ordre du pouvoir antioxydant

Mots clés : DFT ; antioxydant ; DPPH ; synergie ; phénols

Abstract:

The aim of this study is to quantify the antioxidant activity of some compounds of essential oils using the method of theoretical calculation DFT, in order to find a relationship between the chemical structure of these compounds and their activity of scavenging free radicals DPPH. These compounds are: thymol; carvacrol and an equimolar mixture of this last one in order to target the phenomenon of synergy between the two compounds.

For the theoretical correlation, BHA, BHT and vitamin C were taken as reference. The results obtained show that the values of the enthalpy of dissociation of the O-H bond (BDE-OH), calculated at the level of the DFT theory (hybrid functional B3LYP) and the standard base 6-311++G(d,p) in gas phase, are in good agreement with the order of the antioxidant power

Key words: DFT; antioxidant; DPPH; synergy; phenols

ملخص:

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للأكسدة لبعض مركبات الزيوت الأساسية باستخدام طريقة الحساب النظري DFT، من أجل إيجاد علاقة بين التركيب الكيميائي لهذه المركبات ونشاطها في كسح الجذور الحرة DPPH. هذه المركبات هي: الثيمول. كارفاكروول ومزيج متساوي الأقطاب من هذا الأخير من أجل استهداف ظاهرة التعاضد بين المكونين.

فيما يخص الارتباط النظري، تم أخذ BHA و BHT وفيتامين C كمرجع. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن قيم المحتوى الحراري لتفكك رابطة (BDE-OH) OH، المحسوبة على مستوى نظرية DFT (وظيفية هجينة B3LYP) والقاعدة القياسية 6-311++G(d,p) في طور الغازي، في اتفاق جيد مع ترتيب قوة تأثير النشاط المضاد للأكسدة

الكلمات المفتاحية : DFT؛ مضادات الأكسدة. DPPH. التعاضد؛ الفينولات

Liste des abréviations :

Abs : Absorbance.

BDE : Bande dissociation enthalpie.

BHA : Butyle hydroxyle anisol.

BHT : Hydroxytoluènebutyle.

B3LYP : Becke 3 lee-yang-parr.

C : Concentration.

DPPH : (2,2'-diphenyle-1-picryl hydrazyl).

DFT : Théorie de la fonctionnelle de la densité.

eV : Electronvolt.

FRAP : Pouvoir réducteur du fer.

EA : L'affinité électronique.

PA : Affinité protonique.

ERO : Espèces réactives de l'Oxygène.

ERN : Espèces réactives de l'azote.

ETE : Enthalpie de transfère d'électron.

HAT : Transfert d'atome d'hydrogène.

EC50 : Effective concentration

IP : Potentiel d'ionisation

mg : Milligramme.

ml : Millilitre.

MOPAC : Paquet orbital moléculaire

nm : Nanomètre.

NOS : Les nitroso synthases.

OM : Orbitale moléculaire.

PDE : L'enthalpie de dissociation du proton.

PM3 : Parametric Method 3.

PM6 : Parametric Method 6.

RNS : Espèces réactives de l'azote.

ROS : Les espèces réactives de l'oxygène.

SCF : Champ auto-cohérent.

SET-PT: Transfert d'électrons unique suivi d'un transfert de protons.

SOD: La Superoxyde Dismutase.

SPLET: Transfert d'électrons séquentiel de perte de protons.

TCNE : Tétracycloéthylène.

u.a : Unité atomique.

UHF : Unrestricted Hartree Fock Method.

V : Volume.

ul : Microlitre.

HOMO : Highest occupied molecular orbital.

LUMO : Lowest unoccupied molecular orbital.

HE : Huile essentielle

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Différence entre une molécule stable et un radical libre	2
2	Origine des radicaux libres	4
3	Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant	6
4	Réaction du DPPH avec un antioxydant	8
5	Le schéma simplifié pour ces deux réactions FRAP	9
6	Mode opératoire suivi lors du test du piégeage du radical libre DPPH	15
7	Méthode suivie lors du calcul par DFT	23
8	Structure des composé oxygénés phénoliques	35
9	Les formes limites du radical 1-naphtoxy	36
10	Les valeurs de BDE et les structure chimique des hydrocarbures	36
11	Forme limite sur locimène	37

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Réactions des espèces radicalaires réactive d'oxygène ERO	3
2	Réactions chimiques des espèces réactives d'azote (RNS)	3
Matériels et méthodes		
1	Classes chimiques, structures, formules brutes et masses molaires des composés étudiés	13
2	Concentration de la solution mère, différents volumes et concentrations des solutions testées pour chaque échantillon.	16
3	Concentration des solutions antioxydants des références, différents volumes et concentrations des solutions testées de chaque échantillon.	17
4	Concentration des solutions mères et des solutions filles dans le cas de l'étude de la synergie entre carvacrol et thymol	18
5	Concentration des solutions mères et des solutions filles dans le cas de l'étude de la synergie entre carvacrol et ocimène et entre thymol et ocimène.	18
6	Concentration des solutions mères et des solutions filles dans le cas de l'étude de la synergie entre carvacrol et 1-naphtol et entre thymol et 1-naphtol	19
7	Concentration des solutions mères et des solutions filles dans le cas de l'étude de la synergie entre carvacrol et camphène et entre thymol et camphène	19
8	Concentration des solutions mères et des solutions filles dans le cas de l'étude de la synergie entre carvacrol et α -pinène et entre thymol et α -pinène.	20
9	Concentration des solutions mères et des solutions filles dans le cas de l'étude de la synergie entre carvacrol et eugényl acétate et entre thymol et eugényl acétate.	20
10	Concentration des solutions mères et des solutions filles dans le cas de l'étude de la synergie entre carvacrol et menthol	21

11	Concentration des solutions mères et des solutions filles dans le cas de l'étude de la synergie entre thymol et menthol	21
12	Activité antioxydante, EC50 et courbe de variation de l'activité en fonction de la concentration de l'espèce active des composés purs	25
13	Activité antioxydante, EC50 et courbe de variation de l'activité en fonction de la concentration des produits de références	27
14	Activité antioxydante, EC50 et courbe de variation de l'activité en fonction de la concentration en espèce active dans les mélanges binaires étudiés	28
15	Valeurs des EC50 des composés purs et des mélanges binaires testés.	32
16	Valeurs des énergies BDE correspondantes au premier mécanisme	33
17	Valeurs des énergies IP et PDE correspondantes au deuxième mécanisme	34
18	Les valeurs des énergies du mécanismes 3	34

INTRODUCTION

Introduction générale

Le domaine de l'informatique chimique (La chimio-informatique) s'impose, de plus en plus, comme un outil de travail incontournable dans le monde très vaste de la chimie et surtout dans le domaine de la réactivité chimique.

Au cours des dernières décennies la microbiologie n'est pas restée insensible à cet outil surtout, du point de vue de l'activité biologique : actions antioxydantes, anti-inflammatoires, anticancéreuses et antimicrobienne.

Notre travail est une contribution à élucider la relation entre la structure chimique des composés naturels et leur activité biologique à savoir le pouvoir antioxydant. Il consiste, en premier, à déterminer le pouvoir antioxydant de huit composés naturels purs et de deux composés de références. Deuxièmement, nous déterminerons l'activité des mélanges binaires entre ces composés. Ceci dans le but de mettre en évidence l'effet de la synergie sur l'activité antioxydante.

Troisièmement, une étude théorique quantique se fera en parallèle en utilisant la méthode DFT.

Ainsi, ce travail sera scindé en trois parties :

La première partie sera consacrée à une étude théorique.

La seconde partie exposera le matériel, les produits utilisés et la méthodologie suivie.

Dans la dernière partie, nous apporterons les résultats obtenus, que ce soit expérimentalement ou théoriquement, suivie de leurs discussions.

Nous terminons par une conclusion générale.

PARTIE
THEORIQUE

I. Radicaux libres :

INTRODUCTION :

Les êtres humains sont constamment exposés aux radicaux libres. Ces derniers peuvent semer le désordre dans la structure des protéines cellulaires, des lipides membranaires et des acides nucléiques s'ils ne se trouvent pas en équilibre avec les antioxydants [1].

I.1 DEFINITION :

Un radical libre se définit comme toute molécule ou fragment d'une molécule possédant au moins un électron non apparié (célibataire) sur son orbitale externe [1]. La présence d'un électron non apparié confère à ces molécules une grande instabilité, c'est-à-dire qu'elles sont extrêmement réactives et que leur durée de vie est courte. [2] Ils réagissent avec des différentes molécules plus stables pour capter ou céder les électrons et ils peuvent initier des réactions en chaîne en engendrant de nouvelles espèces radicalaires [3].

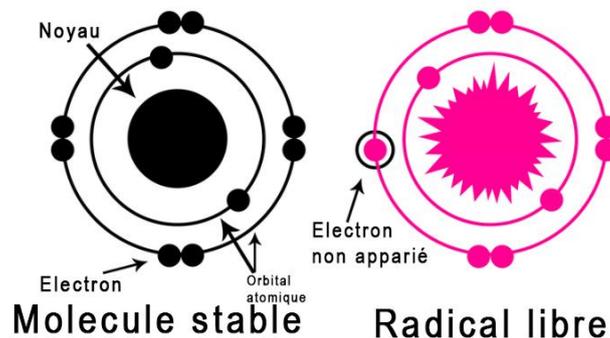


Figure 1 : Différence entre une molécule stable et un radical libre [4].

I.2. Type de radicaux libres :

I.2.1. Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (EROA) :

Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (RONS) sont un groupe de radicaux hautement réactifs et de produits chimiques non radicalaires contenant de l'oxygène et de l'azote. Ils sont générés sous forme de sous-produits métaboliques ou de produits primaires [5].

I.2.2-a Espèces réactives de l'oxygène Les ERO :

Les ROS sont une variété de molécules chimiques dérivées principalement de l'oxygène moléculaire (O_2), qui est généré et consommé par plusieurs processus biochimiques. Dans sa coquille de valence, l' O_2 contient deux électrons non appariés, ce qui en fait une molécule bi radical. Lorsqu'un des électrons non appariés gagne plus d'énergie, l'électron est excité et change de spin ; ce processus aboutit à la formation d'un puissant [6].

Tableau 1 : Réactions des espèces radicalaires réactive d'oxygène ERO

Espèces radicalaires	Réactions chimique	Références
L'anion Superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)	$NADPH+2O_2 \rightarrow NADP^++H^++2O_2^{\bullet-}$ NADPHoxydase	[7]
Le radical hydroxyle ($\bullet OH$)	$H_2O \rightarrow OH^{\bullet} + e$	[8]
L'oxygène Singulet (O_2^1)	$^3O_2 \rightarrow ^1O_2$ (deux électron célibataire)	[9]
Le Peroxyde D'hydrogène (H_2O_2)	$2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ Sous l'action d'une enzyme SOD	[10]
L'acide Hypochloreux (HOCl)	$H_2O_2 + H^+ + Cl^- \rightarrow H_2O + HOCl$	[11]

I.2.2-b Espèces réactives de l'azote (ERA) :

Le radical ERA centré primaire est NO^{\bullet} , qui est généré par la conversion de la l-arginine en l-citrulline en présence d'oxygène moléculaire, une réaction catalysée par une famille d'enzymes contenant un hémisphère appelée oxyde nitrique synthases (NOS). Des interactions entre ROS et ERA existent lorsque NO^{\bullet} réagit avec $O_2^{\bullet-}$ à faible tension d'oxygène pour générer du peroxynitrite ($ONOO^-$) [11].

Tableau 2 : Réactions chimiques des espèces réactives d'azote (RNS)

Espèces radicalaires	Réactions chimique	Références
L'anion peroxy nitrite ($ONOO^-$)	$NO^{\bullet} + O_2^{\bullet-} \rightarrow ONOO^-$	[12]
L'oxyde Nitrique (NO)	$L\text{-Arginine} + O_2 \rightarrow L\text{-Citrulline} + NO^{\bullet}$ NOS	[13] [14]

I.3. Sources de production des radicaux libres :

Il existe plusieurs facteurs qui contribuent à la production de radicaux libres. Le mode de vie, le stress et l'environnement favorisent la formation excessive de radicaux libres, qui a pour conséquence la production de stress oxydatif [15].

Voici quelques exemples de ces facteurs : la pollution de l'air, la fumée de cigarette, la consommation d'alcool, un taux de sucre élevé dans le sang, une consommation élevée en acides gras polyinsaturés, les rayonnements, trop ou trop peu d'oxygène dans le corps, l'exercice intense et prolongé, une consommation excessive d'antioxydants ou un déficit en antioxydants [15].

Une fois formés, ces radicaux libres réagissent avec les produits chimiques qui ont permis leur apparition et les convertissent à leur tour en radicaux libres. Une réaction en chaîne est ainsi initiée, qui souvent accroît les effets potentiels nuisibles des radicaux libres dans le corps [15].

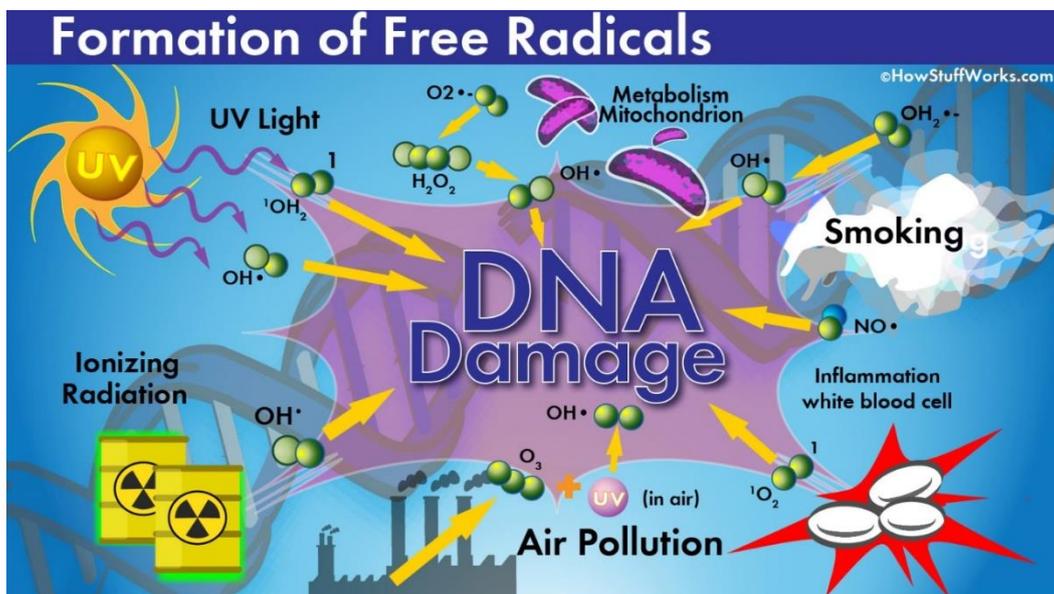


Figure 2 : Origine des radicaux libres [16]

I.4. Dommages causés par les radicaux libres :

Le paradoxe des radicaux libres réside dans le fait que ce sont des molécules très réactives et dommageables tout en étant indispensables pour différents mécanismes cellulaires [17]. Ces radicaux libres flottant dans l'organisme sont responsables du vieillissement des cellules, de l'apparition de certains cancers et de beaucoup d'autres maladies [18]. Ils ont été longtemps considérés comme nuisibles, responsables de potentiels dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides [19].

I.4.1. ADN :

La production excessive de radicaux libres peut endommager un certain nombre de molécules biologiques, en particulier l'ADN, qui est très sensible à l'attaque des espèces réactives de l'oxygène [20].

I.4.2. Lipides :

Parmi les cibles les plus susceptibles à l'action sont les acides gras polyinsaturés. L'abstraction d'un atome d'hydrogène à partir d'une molécule d'acide gras polyinsaturé initie le processus de la peroxydation lipidique [21].

I.4.3. Protéine :

Hormis les lipides et l'ADN, les protéines sont également sensibles aux attaques des radicaux libres, principalement celles dont la structure comporte un groupement sulfhydryle (SH) [22].

I.5 Stress oxydatif :

Il se définit comme l'incapacité de l'organisme de se défendre contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) en raison de la perturbation d'équilibre endogène entre ces derniers et les agents oxydants (AO). Ce déséquilibre conduit potentiellement à des dégâts structuraux et fonctionnels [23]. On cite comme exemple les maladies chroniques comme le diabète, le cancer, les maladies inflammatoires, la maladie d'Alzheimer ou encore le Parkinson. Mais rappelons toutefois que si l'équilibre antioxydants et radicaux libres est présent, ces derniers sont utilisés par certains globules blancs et contribuent à la destruction des bactéries et à la régulation des cellules mortes. Les radicaux libres sont donc des molécules très instables et chimiquement réactives qui sont à l'origine du stress oxydatif et peuvent être neutralisés par les antioxydants [24].

I.6 Les antioxydants :

Un antioxydant est défini comme toute substance ayant la capacité de retarder, prévenir ou réparer un dommage oxydatif d'une molécule cible [25]. Ce sont des molécules naturellement produites par le corps ou bien apportées par l'alimentation pour combattre les effets toxiques des radicaux lors du stress oxydant [26]

Face à la production permanente des espèces réactives, les organismes vivants ont développé des systèmes de défense qui les protègent des dommages oxydatifs. On peut distinguer un système de défense antioxydant enzymatiques et non enzymatiques [27]

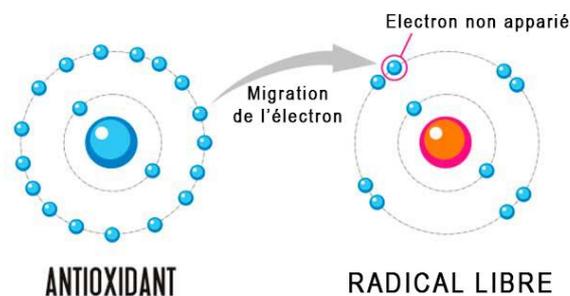


Figure 3 : Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant [28].

I.6.1. La classification des antioxydants :

Les antioxydants sont des substances synthétiques ou naturelles capables de prévenir ou de retarder l'oxydation en neutralisant les radicaux libres

I.6.1-a. Antioxydants synthétiques

Parmi les antioxydants exogènes, nous avons trouvé l'hydroxytolunebutylé (BHT), l'hydroxyanisolebutylé (BHA).

Le BHA et le BHT sont des antioxydants synthétiques couramment utilisés par l'industrie alimentaire comme additifs [29] [30], Le BHA a deux isomères : le 3-tert-butyl-4-méthoxy phénol (3-BHA) et le 2-tert-butyl-4-méthoxy phénol (2-BHA). Ce composé est un antioxydant hautement liposoluble largement utilisé dans les huiles en vrac et les émulsions huile dans eau [30].

I.6.1-b Antioxydant hydrophile naturel

La vitamine C ou L'ASC est un antioxydant hydrophile naturel présent dans divers aliments. Ce composé est utilisé comme complément alimentaire pour prévenir et traiter le scorbut. Trolox est un dérivé hydrosoluble de la vitamine E qui a plusieurs applications médicales et industrielles [32], en raison de leurs propriétés antioxydantes et de leurs structures simples, l'ASC et le Trolox sont largement utilisés comme contrôles positifs dans l'évaluation de l'activité antioxydante [33].

I.7 Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydants :

Plusieurs méthodes sont utilisées pour mesurer l'activité antioxydant, on cite trois de ces méthodes :

I.7.1. Méthode de blanchiment de la β -carotène

Le test de blanchiment du β -carotène pour évaluer l'activité antioxydant est l'une des méthodes couramment utilisées dans le domaine de la chimie alimentaire [34]. Le principe de la méthode est basé sur la décoloration de couleur jaunâtre d'une solution de β -carotène due à la rupture de la π -conjugaison par réaction d'addition d'un radical lipide ou lipide peroxy ($L \cdot$ ou $LOO \cdot$) à une double liaison $C = C$ de β -carotène. L'espèce radicalaire est générée par l'autoxydation de l'acide linoléique par chauffage sous atmosphère d'air. Lorsque l'antioxydant approprié est ajouté à la solution, la décoloration peut être retardée par une réaction concurrente entre le β -carotène et l'antioxydant avec les radicaux soumis. La similitude structurelle entre les fullerènes et le β -carotène, comme les molécules fortement -conjuguées, permet une évaluation précise de l'activité antioxydant par ce test de blanchiment du β -carotène contrairement à d'autres méthodes comme le dosage des radicaux DPPH [35].

L'activité antioxydant exprimée en % AOA. Le % AOA est pratique pour exprimer l'activité antioxydant en utilisant la valeur comprise entre 0 (faible) et 100 (élevé).

$$\%AOA = ((\text{abs control}) - (\text{abs échantillon})) / (\text{abs control}) \times 100$$

I.7.2. Méthode du piégeage du radical libre DPPH :

Le radical 2,2-Diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicalaire libre et la simplicité de l'analyse [36].

En présence des piègeurs, le DPPH de couleur violette se réduit en 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazine de couleur jaune [38]. L'intensité de la couleur jaune reflète la capacité antiradicalaire de la molécule, et dépend de la nature, la concentration et la puissance de cette molécule [39].

Cette réduction peut être suivie par spectrométrie UV-Vis, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants [39].

En outre, le DPPH n'est soluble que dans des solvants organiques (éthanol, méthanol), ce qui rend la mesure de la capacité antioxydantes d'antioxydants hydrophiles difficiles [41]. Le dernier inconvénient que pose ce radical est son instabilité à la lumière, c'est pourquoi les tests réalisés avec le DPPH doivent impérativement se faire dans l'obscurité [42]

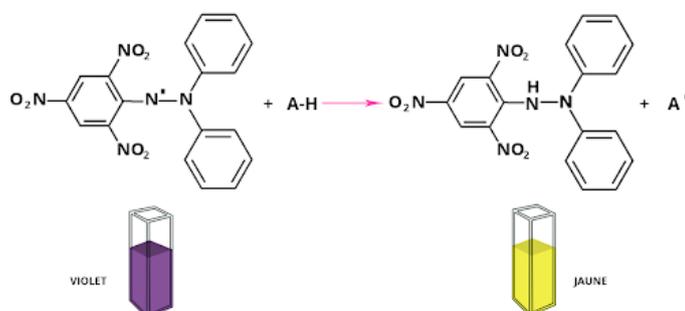


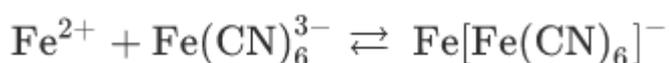
Figure 4 : Réaction du DPPH avec un antioxydant [40]

I.7.3 Méthode de dosage du pouvoir réducteur ferrique :

Le dosage du pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP) est une méthode basée sur la mesure de la réduction du complexe ion ferrique (Fe^{3+}) - ligand en complexe ferreux (Fe^{2+}) intensément de couleur bleue par des antioxydants dans un milieu acide. L'activité antioxydante est déterminée par l'augmentation de l'absorbance à 593 nm et les résultats sont exprimés en équivalents micromolaires Fe^{2+} ou par rapport à un standard antioxydant [43].

Le dosage FRAP est effectué dans des conditions de pH acide (pH 3,6) afin de maintenir la solubilité du fer et, plus important encore, de stimuler le transfert d'électrons. Cela augmentera le potentiel redox, provoquant un changement dans le mécanisme de réaction dominant [44].

Plus récemment, le ferricyanure de potassium a été le réactif ferrique le plus populaire utilisé dans les dosages FRAP. Dans ce dernier cas, le bleu de Prusse est produit comme produit final, qui est quantifié par spectrophotométrie et indique le pouvoir réducteur des antioxydants testés. La production de bleu de Prusse peut se faire par deux voies différentes avec le même résultat. Les antioxydants peuvent soit réduire le Fe^{3+} dans la solution en Fe^{2+} , qui lie le ferricyanure pour donner du bleu de Prusse, soit réduire le ferricyanure en ferrocyanure, qui lie le Fe^{3+} libre dans la solution et forme du bleu de Prusse [45]



or

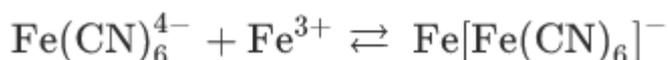


Figure 5 : Le schéma simplifié pour ces deux réactions FRAP [45].

II. Théorie fonctionnelle de la densité :

Introduction

Les outils informatiques de modélisation moléculaire tels que la (DFT), les simulations de dynamique moléculaire (MD) et l'ancrage moléculaire se sont avérés être des approches efficaces et peu coûteuses pour comprendre diverses propriétés fondamentales de différentes structures moléculaires [50]. Pour une évaluation pratique et détaillée de la réactivité et de l'applicabilité potentielle de la molécule, l'identification des sites moléculaires réactifs locaux est d'une grande importance pour différents domaines scientifiques [51] Outre que la réactivité, une combinaison de calculs DFT et de simulations MD peut également être utilisée pour comprendre le effets du solvant.

II.1 Théorie fonctionnelle de la densité DFT :

Les calculs DFT des valeurs de H-BDE peuvent être utilisés pour la prédiction de la sensibilité des molécules organiques naturel et synthétique au mécanisme d'autoxydation. À savoir, la corrélation entre l'H-BDE et l'autoxydation a été établie [52] Ce type de sensibilité moléculaire est d'une importance particulière, compte tenu du fait que les réactions oxydatives sont parmi les voies les plus importantes pour l'élimination des molécules organiques par dégradation [52]. Dans les cas où les valeurs de l'H-BDE sont comprises entre 70 et 85 kcal / mol [53], une sensibilité élevée au mécanisme d'autoxydation est attendue. Cependant, les valeurs de H-BDE entre 85 et 90 kcal / mol indiquent également une sensibilité au mécanisme d'autoxydation dans une certaine mesure, mais elles doivent être prises avec prudence[54]. De manière inattendue, des valeurs de H-BDE inférieures à 70 kcal / mol n'indiquent pas une sensibilité à l'autoxydation [55].

II.2 Évaluation théorique de l'activité antioxydante :

II.2.1. Géométries et descripteurs moléculaires optimisés :

Le potentiel antiradicalaire des composés étudiés pourrait être estimé en comparant la force de leurs liaisons O-H. Plus la liaison O-H est faible, plus le potentiel antiradicalaire est élevé.[56]

Les descripteurs moléculaires tels que l'électronégativité, la douceur, la dureté et l'indice électrophile sont d'autres paramètres importants qui peuvent caractériser les propriétés antiradicales des composés étudiés [57].

- L'électronégativité est une mesure de la tendance à attirer les électrons dans une liaison chimique.
- La douceur et la dureté chimiques sont des mesures de résistance au transfert de charge.
- L'indice d'électrophilicité est lié à l'abaissement d'énergie associé à une quantité maximale de flux d'électrons entre un donneur et un accepteur.[58]

IX.3.2 Orbitales moléculaires frontière

L'énergie et la distribution de la plus haute orbitale moléculaire occupée (HOMO) et la plus basse orbitale moléculaire inoccupée (LUMO) sont des paramètres importants qui sont en corrélation avec l'activité antiradicalaire des composés étudiés [59].

La forme de l'HOMO détermine les sites d'attaque des radicaux libres, tandis que son énergie est liée à la capacité de donner des électrons. Les molécules avec une énergie HOMO inférieure sont moins susceptibles de donner des électrons[60].

II.2.2 Le mécanisme de transfert d'atome d'hydrogène (HAT)

Dans le mécanisme de transfert d'atome d'hydrogène (HAT), l'atome H est directement transféré de l'antioxydant par clivage homolytique au radical libre [61]. Ce mécanisme n'implique qu'une seule étape et il est caractérisé par la valeur BDE (énergie de dissociation des liaisons) qui correspond à la capacité d'un antioxydant à donner son atome d'hydrogène et par conséquent à former un radical [62] Plus la valeur BDE est faible, meilleures sont les propriétés antiradicales.

Outre que les valeurs de la BDE, la stabilité des radicaux est un autre paramètre important qui caractérise les activités antiradicales des composés étudiés. Le radical le plus stable indique une activité antiradicalaire plus forte du composé[63]. La stabilité d'un radical peut être caractérisée par la distribution de densité de spin, plus la densité de spin est délocalisée, plus le radical est stable.[64]

II.2.3 Le mécanisme de transfert séquentiel de protons par transfert d'électrons (SETPT)

Dans le mécanisme de transfert séquentiel de protons par transfert d'électrons (SETPT), l'antioxydant piège les radicaux libres en deux étapes: la formation initiale d'un cation radicalaire par le transfert d'un électron de l'antioxydant au radical libre et un transfert de proton du cation radical vers l'anion [64]. Le mécanisme SETPT est caractérisé par la valeur IP (potentiel d'ionisation), qui représente l'énergie nécessaire pour éliminer un électron de la molécule neutre, et la valeur PDE (enthalpie de dissociation du proton) qui correspond à l'enthalpie de déprotonation du radical cationique antioxydant. Plus les valeurs IP et PDE sont basses, plus l'activité antioxydante est élevée.

En raison des enthalpies de solvation élevées du proton en solution, les valeurs de PDE sont considérablement diminuées dans les solvants étudiés dans l'ordre : eau <phase gazeuse <éthanol. Cela confirme que le solvant polaire peut faciliter la déprotonation [55] En supposant le mécanisme SETPT, le potentiel antiradicalaire est défini par la combinaison de PDE et IP (IP + PDE) [65]

II.2.4 Mécanisme de transfert séquentiel d'électrons et perte de protons (SPLET)

Le mécanisme de transfert séquentiel d'électrons et perte de protons (SPLET) comporte deux étapes: la dissociation d'un proton de l'antioxydant (formation d'un anion) suivie d'un transfert d'électrons vers le radical libre [66]. Ce mécanisme est caractérisé par la valeur PA (affinité du proton), qui correspond à l'enthalpie de la dissociation d'un proton de la molécule neutre, et la valeur ETE (enthalpie de transfert d'électrons) qui correspond à l'enthalpie du transfert d'un électron de l'anion antioxydant au radical libre. Les valeurs faibles de PA et ETE montrent une activité anti radicalaire plus élevée.

III. La synergie :

La synergie semble être plus pertinente dans les industries alimentaires et pharmaceutiques en tant que conservateurs et /ou agents thérapeutiques. Par conséquent, les mélanges d'HE peuvent être avantageux par rapport aux HE individuels car ils peuvent avoir plusieurs modes d'action, et peuvent améliorer leur efficacité biologique et réduire la probabilité de toxicité à une concentration réduite. [63]

Selon les recherche documentaire, l'activité antioxydante des HE est vaguement liée à leur composition chimique, en particulier à leur contenu phénolique. Par conséquent, l'activité antioxydante modérée peut être attribuée, au moins en partie, à la faible occurrence de tels composés. [64]

Le pouvoir antioxydant des HE étudiés dépend très probablement d'un certain nombre de leurs composants plutôt que d'un seul composé exerçant leurs activités par différents mécanismes, y compris le synergisme. Dans ce sens il est noté que le mélange d'hydrocarbures mono et sesquiterpéniques présentait une activité de piégeage notable [64]

Deux agents ou plus de la combinaison interagissent de différentes manières conduisant à l'un des quatre effets possibles : synergique, synergique partielle, sans effet et antagonisme, Les interactions synergiques sont les plus importantes car elles améliorent l'activité antioxydante en utilisant les efficacités des agents combinés de la meilleure manière possible et entraînent ainsi une réduction de plusieurs fois des doses requises des agents combinés [65] [66]

MATERIELS

ET

METHODES

I. Lieux d'expérimentation :

Notre travail expérimental a été réalisé au niveau du laboratoire de physico-chimie moléculaire et macromoléculaire (LCPMM) de l'université de Saad Dahlab Blida.

II. Appareillage et produits :

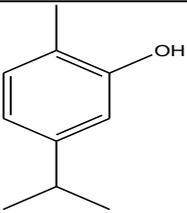
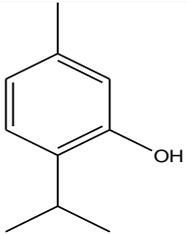
II.1 Appareils :

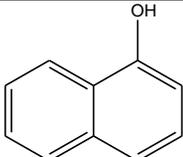
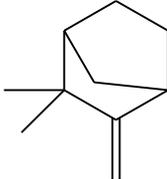
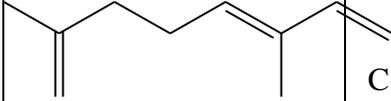
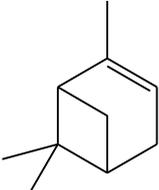
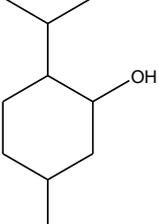
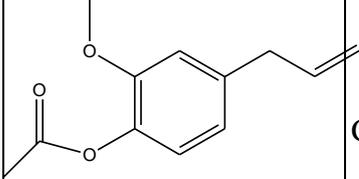
- Les analyses réalisées dans le domaine spectral UV-visible, sur les espèces chimiques étudiées sont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre JASCO, type v-630 à double faisceau
- Les différentes pesées de précision ont été accomplies en utilisant une balance analytique de marque PERKIN 550
- Les conformations les plus stables des molécules étudiées et leurs énergies totales sont donnés par les logiciels Gaussian 98 W et 09 W.
- Le traçage des molécules a été fait grâce au logiciel GaussView 5.0
- L'origine 2017 a été utilisé pour le traçage des graphes

II.2 produits chimiques :

L'ensemble des produits chimiques utilisés au cours de notre expérimentation sont présentés dans le tableau si dessous :

Tableau 1 : Classes chimiques, structures, formules brutes et masses molaires des composés étudiés.

Famille	Composé	Structure	Formule brute	Masse molaire $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Hydrocarbures oxygénés phénoliques	Carvacrol		$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$	150,2176
	Thymol		$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$	124,1372

	1-naphtol		$C_{10}H_8O$	144.17
Hydrocarbures	Camphène		$C_{10}H_{16}$	136,234
	Ocimen		$C_{10}H_{16}$	136,243
	α pinène		$C_{10}H_{16}$	136,243
Hydrocarbures oxygénés non phénoliques	Menthol		$C_{10}H_{20}O$	156,2752
	Eugenyl-acetat		$C_{12}H_{14}O_3$	206,24

III. Méthodes :

III.1 Activité antioxydante des composés volatils purs :

Pour évaluer l'activité anti radicalaire des composés purs, nous avons opté pour la méthode du piégeage du radical libre DPPH (1,1 Diphényl 2 PycrilHydrazil). Cette méthode est choisie pour sa simplicité. Cette activité doit être comparée à celle des antioxydants de références, dans notre travail nous avons choisis la BHT, BHA et la vitamine C.

Les solutions de nos échantillons sont préparées à des concentrations qui nous permettront d'évaluer la valeur d'EC 50, ces intervalles de concentrations ont été déterminés grâce à des tests préliminaires effectués sur chaque échantillon. Le mode opératoire suivi est simplifié dans le schéma suivant :

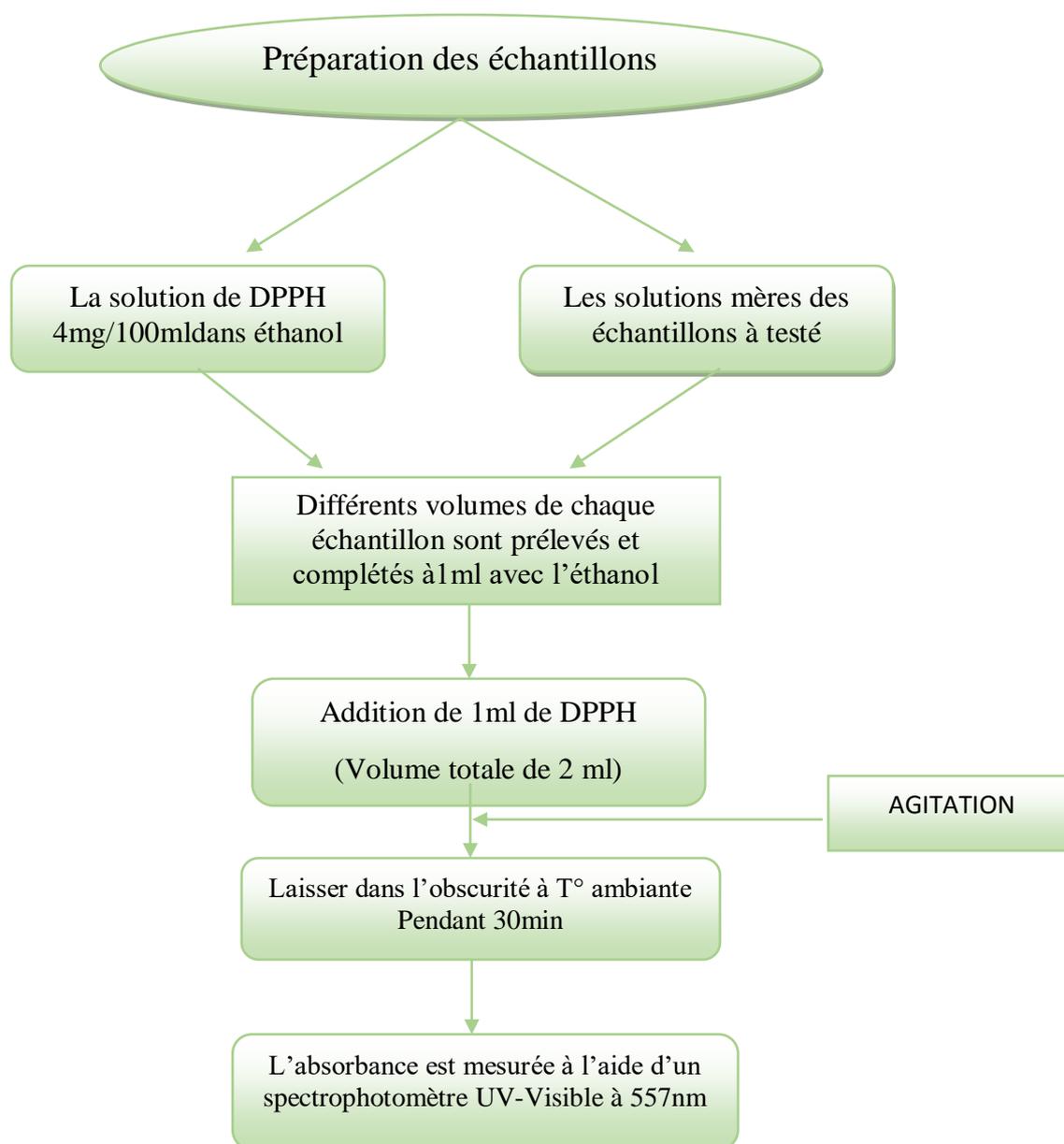


Figure 6 : Mode opératoire suivi lors du test du piégeage du radical libre DPPH.

- ✓ L'estimation de l'activité anti-radicalaire (AA) est donnée par la relation suivante :

$$AA \% = [(ABS_{\text{control}} - ABS_{\text{échantillon}}) / ABS_{\text{control}}] * 100$$

Soit :

- ABS control : absorbance à la longueur d'onde de 517nm de la solution de DPPH dans l'éthanol.
- ABS échantillon : absorbance à 517 nm de chaque échantillon

Les concentrations ainsi que les volumes de chaque échantillon sont donnés dans le tableau 2. Les solutions d'antioxydants synthétiques de référence ont été préparées avec des concentrations et des volumes donnés dans le tableau 3.

Tableau 2 : concentration de la solution mère, différents volumes et concentrations des solutions testées pour chaque échantillon.

Composé	solution mère] mg/ml	Volume prélevé (µl)	solution fille] (mg/ml)
Carvacrol ou thymol	10	0	0
		5	0,025
		10	0,05
		20	0,1
		40	0,2
		60	0,3
		80	0,4
		100	0,5
		120	0,6
		150	0,75
		200	1
		300	1,5
		400	2
500	2,5		
1-naphtol	10	0	0,000
		10	0,050
		15	0,075
		20	0,100
		40	0,200
		60	0,300
		80	0,400
		100	0,500
		120	0,600
		150	0,750
		200	1,000
400	2,000		
Comphène	500	0	0
		20	5
		60	15
		80	20
		200	50
		300	75
		400	100
		500	125
800	200		
Ocimène	500	0	0,00
		20	5,00
		30	7,50

		40	10,00
		50	12,50
		75	18,75
		150	37,50
α-pinène	500	0	0,0
		20	5,0
		50	12,5
		100	25,0
		150	37,5
		200	50,0
		300	75,0
		500	125,0
Menthol	100	0	0,000
		20	1,000
		40	2,000
		80	4,000
		100	5,000
		120	6,000
		150	7,500
		200	10,000
		400	20,000
		500	25,000
		800	40,000
		1000	50,000
Eugényl acétate	100	40	2
		60	3
		100	5
		200	10
		300	15
		500	25

Tableau 3 : Concentration des solutions antioxydants des références, différents volumes et concentrations des solutions testées de chaque échantillon.

Composé	[solution mère] mg/ml	Volume prélevé (μ l)	[solution fille] (mg/ml)
BHA	0,2 (mg/ml)	0	0
		10	0,001
		20	0,002
		40	0,004
		60	0,006
		80	0,008
		100	0,01
		150	0,015
		200	0,02
		250	0,025
Vitamine C	0,2 (mg/ml)	0	0
		10	31,4501
		20	55,8187
		30	78,2889
		40	88,2281
		50	86,32852
		60	89,80573
		70	90,98938

		80	89,26034
		100	90,73304

III.2 Activité antioxydante des mélanges équi-volumiques :

Afin d'étudier l'effet synergique des composés étudiés avec le thymol et le carvacrole, nous avons préparé des mélanges équi-volumiques des différentes solutions mères déjà utilisées. A partir de ces nouvelles solutions mères, différents volumes ont été prélevés puis compléter a 1ml avec de l'éthanol puis additionner a 1ml de la solution de DPPH (4% d'éthanol). Après 30 min à l'obscurité, l'absorbance est mesurée a 715nm par spectrophotométrie UV-Visible.

Les concentrations des solutions mères et des solutions filles sont données dans les différents tableaux suivants :

Tableau 4 : Concentration des solutions mères et des solutions filles dans le cas de l'étude de la synergie entre carvacrol et thymol

Mélange équi-volumique	[carvacrol dans la solution mère] mg/ml	[thymol dans la solution mère] mg/ml	Volume prélevé (µl)	[carvacrol dans la solution fille] (mg/ml)	[thymol dans la solution fille] (mg/ml)	Concentration totale en espèces actives
Carvacrol - thymol	10	10	0	0	0	0
			5	0,0125	0,0125	0,025
			10	0,025	0,025	0,05
			20	0,05	0,05	0,1
			40	0,1	0,1	0,2
			60	0,15	0,15	0,3
			100	0,25	0,25	0,5
			200	0,5	0,5	1
			300	0,75	0,75	1,5
			500	1,25	1,25	2,5

Tableau 5 : Concentration des solutions mères et des solutions filles dans le cas de l'étude de la synergie entre carvacrol et ocimène et entre thymol et ocimène.

Mélange équivolumique	[carvacrol ou thymol dans la solution mère] mg/ml	[ocimène dans la solution mère] mg/ml	Volume prélevé (µl)	[carvacrol ou thymol dans la solution fille] (mg/ml)	ocimène dans la solution fille] (mg/ml)	Concentration totale en espèces actives
Carvacrol ou thymol-ocimène	10	500	0	0	0	0
			20	0,05	2,5	2,55
			30	0,075	3,75	3,825
			40	0,1	5	5,1
			50	0,125	6,25	6,375
			75	0,1875	9,375	9,5625
			150	0,375	18,75	19,125

Tableau 6 : Concentration des solutions mères et des solutions filles dans le cas de l'étude de la synergie entre carvacrol et 1-naphtol et entre thymol et 1-naphtol

Mélange équivolumique	[carvacrol ou thymol dans la solution mère] mg/ml	[1-naphtol dans la solution mère] mg/ml	Volume prélevé (µl)	[carvacrol ou thymol dans la solution fille] (mg/ml)	[1-naphtol dans la solution fille] (mg/ml)	Concentration totale en espèces actives
Carvacrol ou thymol - 1-naphtol	10	10	0	0	0	0
			10	0,025	0,025	0,05
			15	0,0375	0,0375	0,075
			20	0,05	0,05	0,1
			40	0,1	0,1	0,2
			60	0,15	0,15	0,3
			80	0,2	0,2	0,4
			100	0,25	0,25	0,5
			120	0,3	0,3	0,6
			150	0,375	0,375	0,75
			200	0,5	0,5	1
			400	1	1	2

Tableau 7 : Concentration des solutions mères et des solutions filles dans le cas de l'étude de la synergie entre carvacrol et camphène et entre thymol et camphène.

Mélange équivolumique	[carvacrol ou thymol dans la solution mère] mg/ml	[camphène dans la solution mère] mg/ml	Volume prélevé (µl)	[carvacrolou thymol dans la solution fille] (mg/ml)	[camphène dans la solution fille] (mg/ml)	Concentration totale en espèces actives
Carvacrolou thymol - camphène	10	500	0	0	0	0
			20	0,05	2,5	2,55
			40	0,1	5	5,1
			60	0,15	7,5	7,65
			80	0,2	10	10,2
			100	0,25	12,5	12,75
			200	0,5	25	25,5
			300	0,75	37,5	38,25
			400	1	50	51
			500	1,25	62,5	63,75
600	1,5	75	76,5			

Tableau 8 : Concentration des solutions mères et des solutions filles dans le cas de l'étude de la synergie entre carvacrol et α -pinène et entre thymol et α -pinène.

Mélange équivolumique	[carvacrol ou thymol dans la solution mère] mg/ml	[α -pinène dans la solution mère] mg/ml	Volume prélevé (µl)	[carvacrolou thymol dans la solution fille] (mg/ml)	[α -pinène dans la solution fille] (mg/ml)	Concentration totale en espèces actives
Carvacrol ou thymol - α -pinène	10	500	0	0	0	0
			20	0,05	2,5	2,55
			50	0,125	6,25	6,375
			100	0,25	12,5	12,75
			150	0,375	18,75	19,125
			200	0,5	25	25,5
			300	0,75	37,5	38,25
			500	1,25	62,5	63,75

Tableau 9 : Concentration des solutions mères et des solutions filles dans le cas de l'étude de la synergie entre carvacrol et eugényl acétate et entre thymol et eugényl acétate.

Mélange équivolumique	[carvacrolou thymol dans la solution mère] mg/ml	[eugényl acétate dans la solution mère] mg/ml	Volume prélevé (µl)	[carvacrolou thymol dans la solution fille] (mg/ml)	[eugényl acétate dans la solution fille] (mg/ml)	Concentration totale en espèces actives
-----------------------	--	---	---------------------	---	--	---

Carvacrol ou thymol - eugényl acétate	10	100	0	0	0	0
			5	0,0125	0,125	0,1375
			10	0,025	0,25	0,275
			20	0,05	0,5	0,55
			40	0,1	1	1,1
			60	0,15	1,5	1,65
			100	0,25	2,5	2,75
			200	0,5	5	5,5
			300	0,75	7,5	8,25
			500	1,25	12,5	13,75

Tableau 10 : Concentration des solutions mères et des solutions filles dans le cas de l'étude de la synergie entre carvacrol et menthol

Mélange équivolumique	[carvacrol dans la solution mère] mg/ml	[menthol dans la solution mère] mg/ml	Volume prélevé (µl)	[carvacrol dans la solution fille] (mg/ml)	menthol dans la solution fille] (mg/ml)	Concentration totale en espèces actives
Carvacrol - menthol	10	100	0	0	0	0
			20	0,05	0,5	0,55
			40	0,1	1	1,1
			80	0,2	2	2,2
			100	0,25	2,5	2,75
			120	0,3	3	3,3
			150	0,375	3,75	4,125
			200	0,5	5	5,5
			300	0,75	7,5	8,25
			400	1	10	11
500	1,25	12,5	13,75			

Tableau 11 : Concentration des solutions mères et des solutions filles dans le cas de l'étude de la synergie entre thymol et menthol

Mélange équivolumique	thymol dans la solution mère] mg/ml	[menthol dans la solution mère] mg/ml	Volume prélevé (µl)	thymol dans la solution fille] (mg/ml)	[menthol dans la solution fille] (mg/ml)	Concentration totale en espèces actives
thymol - menthol	10	100	0	0	0	0
			20	0,05	0,5	0,55
			40	0,1	1	1,1
			100	0,25	2,5	2,75

			150	0,375	3,75	4,125
			200	0,5	5	5,5
			400	1	10	11

III.3 Etude théorique des composés testés par la méthode de DFT :

Les calculs quantiques dans le cadre de la théorie fonctionnelle de la densité (DFT) sont une fonction puissante pour obtenir les propriétés atomistiques et moléculaires des différentes espèces chimiques. Ces calculs sont essentiels pour comprendre la stabilité des groupements atomiques.

Les calculs de la théorie fonctionnelle de la densité (DFT) ont été réalisés à l'aide du logiciel Gaussian W09 et Gaussian W98 [68]. La fonctionnelle B3LYP [68-69] et l'ensemble de base 6-311++G (d,p) ont été utilisés pour tous les calculs. Les descripteurs numériques du mécanisme anti radical (BDE, IE, PDE, PA, ETE) sont calculé comme suit [70].



Ce travail se fait en deux étapes :

- Dessiner la molécule avec le logiciel Chemdarw
- Copie la molécule dans le logiciel Chem3d afin de faire une optimisation PM3
- Faire sortir la Z-matrix avec gaussian 98 et lancer le calcul PM6 avec le gaussian 09

Réalisation de l'optimisation géométrique de chaque molécule par la théorie fonctionnelle de la densité (DFT) avec l'ensemble de fonction de corrélation B3LYP (la plus utilisée est celle proposée par Lee, Yang et Parr (LYP) et de base 6-311G+. Ceci permet de calculer les énergies des orbitales frontières HOMO (l'orbitale moléculaire occupée la plus élevée) et LUMO (l'orbitale moléculaire inoccupée la plus basse) de la conformation la plus stable de chaque molécule, à partir de ces données théoriques, les propriétés chimiques seront calculées (moment dipolaire, potentiel d'ionisation, affinité électronique, potentiel chimique, électronégativité...etc.).

- Calcul de l'énergie des conformations les plus stables des molécules étudiées optimisés par la même méthode DFT : B3LYP/6-311G+.
- La fréquence est calculée avec la même méthode DFT : B3LYP/6-311G++(d,p) permet de déterminer les enthalpies des molécules étudiées à l'état fondamental, cationique, anionique et radicalaire.

La méthode de calcul est résumée dans l'organigramme suivant :

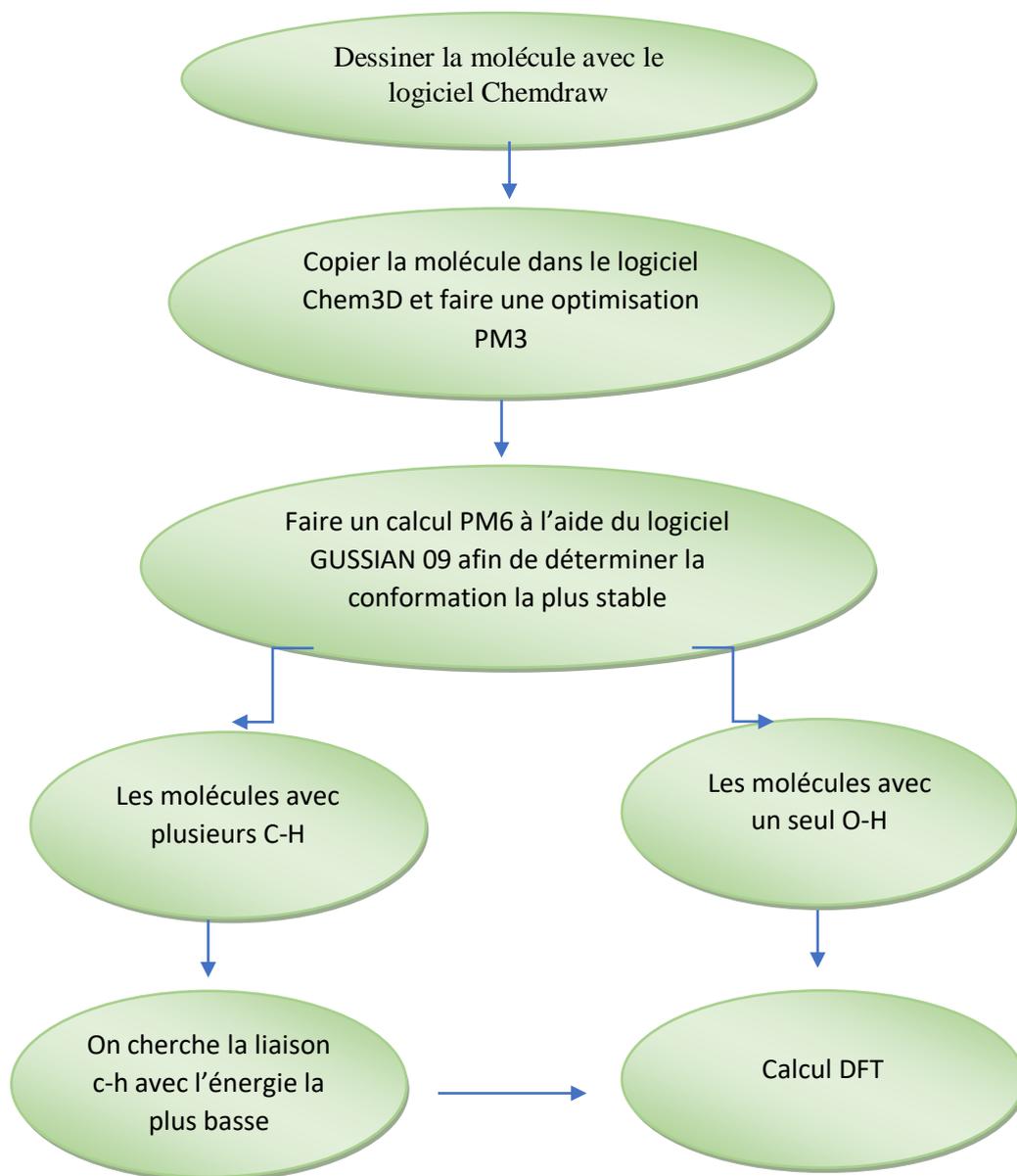


Figure 7 : Méthode suivie lors du calcul par DFT.

**RESULTATS ET
DISCUSSIONS**

I.1 Introduction:

Dans ce travail, on s'intéresse à l'étude expérimentale et théorique de l'activité antioxydante, par la méthode du piégeage du radical libre DPPH (Diphényl picryl hydrazyl), de quelques composés volatils purs (issue communément des huiles essentielles). Notre choix est porté sur: le carvacrol, le thymol, l'eugényle acétate, l'ocimène, le 1-naphtol, l' α -pinène, le camphène et le menthol. Le BHA et la vitamine C seront utilisés comme des antioxydants de références. Le choix de ces composés est basé sur :

- La diversité de leurs classes chimiques (hydrocarbures, hydrocarbures oxygénés phénoliques ou non phénoliques).
- La similitude dans leurs structures chimiques, tel est le cas de l' α -pinène, et le camphène), (thymol et carvacrole).
- Leur grande disponibilité dans les plantes médicinales.

La méthode utilisée pour l'évaluation de cette activité est la méthode du piégeage du radical libre DPPH. Le principe de cette méthode est donné dans la partie théorique.

L'absorbance et les résultats de l'activité de piégeage du radical libre DPPH des composés étudiés en fonction de la concentration [mg/ml] sont regroupés dans le tableau 12.

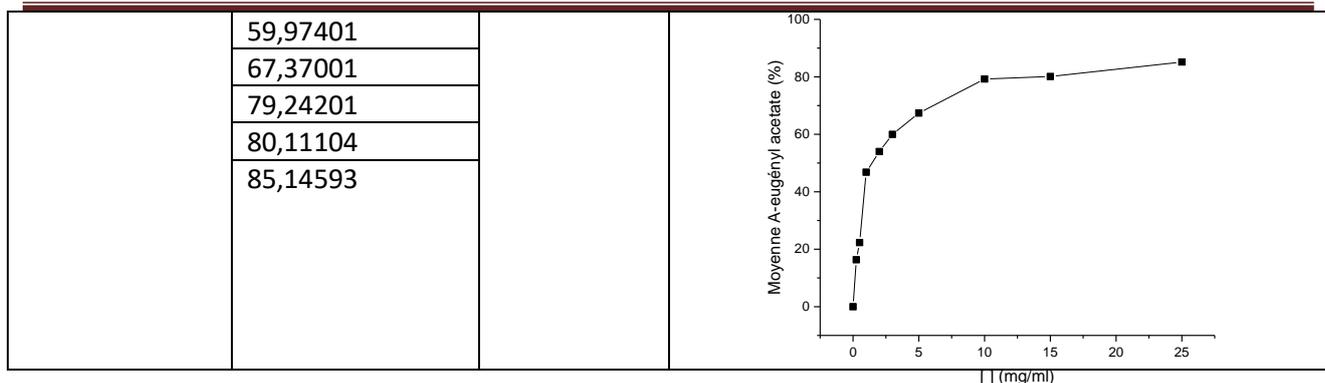
Tableau 12 : activité antioxydante, EC50 et courbe de variation de l'activité en fonction de la concentration de l'espèce active des composés purs

Composé	Activité %	EC50(mg/ml)	Activité (%) = f([concentration massique])
Carvacrol	0	0.382	
	5,69614		
	14,16046		
	25,06592		
	32,6565		
	43,51018		
	51,44587		
	56,32214		
	61,7655		
	65,68262		
	69,48303		
	78,16597		
	82,5099		
	83,88692		
thymol	0	0.308	
	7,20842		
	6,71584		
	31,25863		
	40,52148		
	49,71963		
	53,59386		
	58,87		
	65,55556		
	67,42624		
	68,18927		
	75,9278		
	77,73249		
	78,63268		
1-naphtol	0	0.913	
	26,06402		
	29,23793		
	31,39621		
	33,55276		
	41,10178		
	49,01203		
	50,68983		
	51,46888		
	55,66123		
	59,07667		
	80,10815		

Résultats et discussion

Comphène	0	> 200	
	9,69917		
	14,13969		
	16,01363		
	22,82794		
	25,04259		
	27,44697		
	25,55366		
	30,6644		
Ocimène	0	7.827	
	31,91913		
	48,79182		
	58,5583		
	78,23039		
	80,7033		
	80,95752		
α-pinène	0	64.01	
	4,7259		
	3,92927		
	11,59136		
	22,59332		
	44,27542		
	54,55249		
	67,57338		
menthol	0	>50	
	1,48942		
	3,42813		
	4,14015		
	4,2696		
	4,98162		
	6,08202		
	6,72741		
	7,56889		
	9,83755		
	15,01274		
	20,12507		
eugényl acétate	54,00918	1.451	

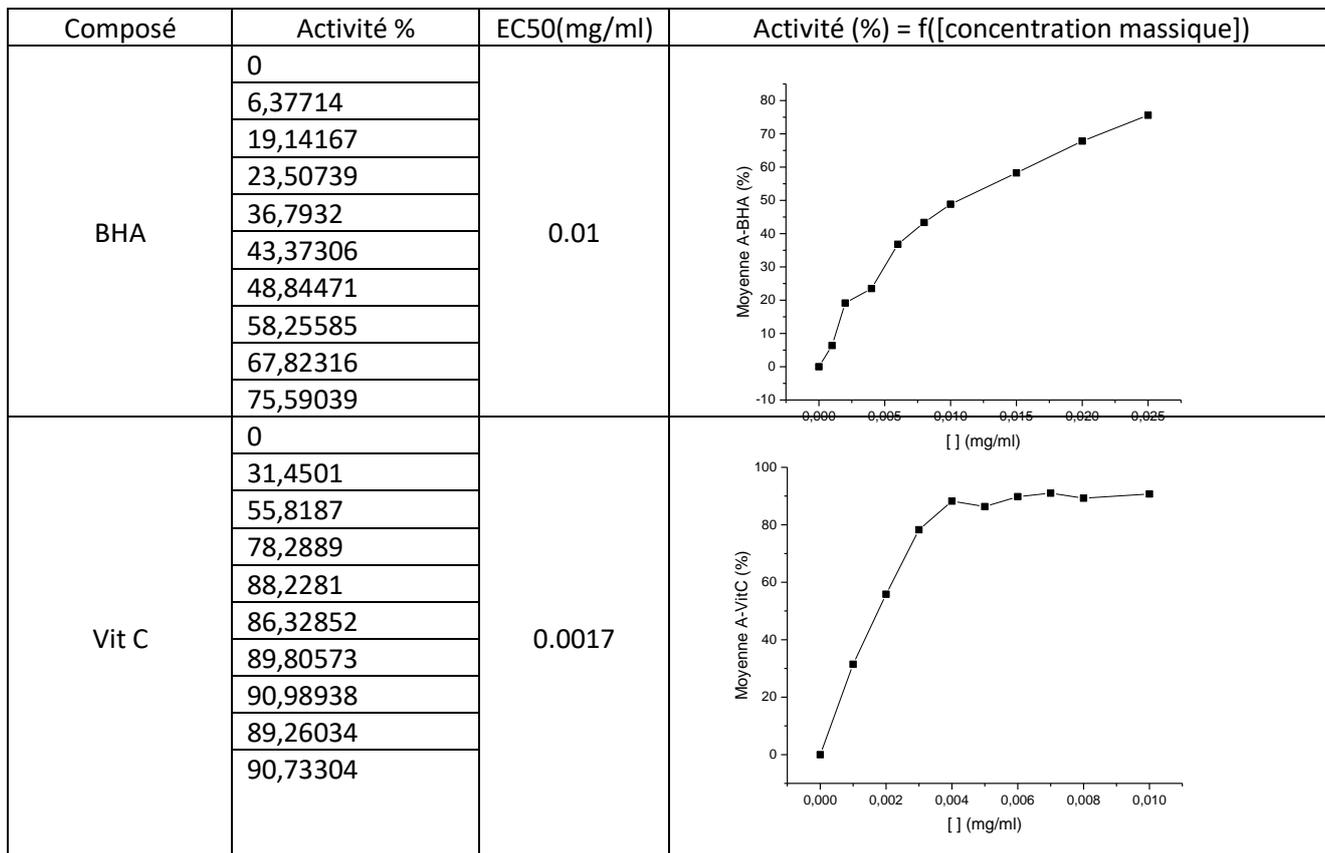
Résultats et discussion



EC₅₀ des espèces chimiques de références

De même que précédemment, les résultats de l'activité antioxydante des composés de références sont résumés dans le tableau 13 :

Tableau N°13 : activité antioxydante, EC₅₀ et courbe de variation de l'activité en fonction de la concentration des produits de références



La lecture des tableaux 12 et 13 montre clairement que les composés phénoliques à savoir le thymol, le carvacrol et le 1-naphtol présentent les activités les plus élevées. Toutefois, elles sont moins importantes que celle des composés de références.

En deuxième position d'importance c'est le composé oxygéné eugényle acétate qui l'emporte. En dernier on trouve les hydrocarbures non oxygénés qui présentent des valeurs d'EC₅₀ très élevées et donc des activités très faibles.

I.2 Effet synergiques des composés étudiés :

Les résultats de l'activité antioxydante des composés purs montrent une variance du pouvoir du piégeage des radicaux libres. Ce pouvoir dépend de la structure de ces composés. D'autre part, il a été reporté que le pouvoir antioxydant du mélange d'hydrocarbures mono et sesquiterpéniques présentait une activité de piégeage notable [64] cela nous permet de conclure que l'activité antioxydante des HE dépend très probablement d'un certain nombre de leurs composants plutôt que d'un seul composé. Ces derniers, exercent leurs activités par différents mécanismes, y compris le synergisme.

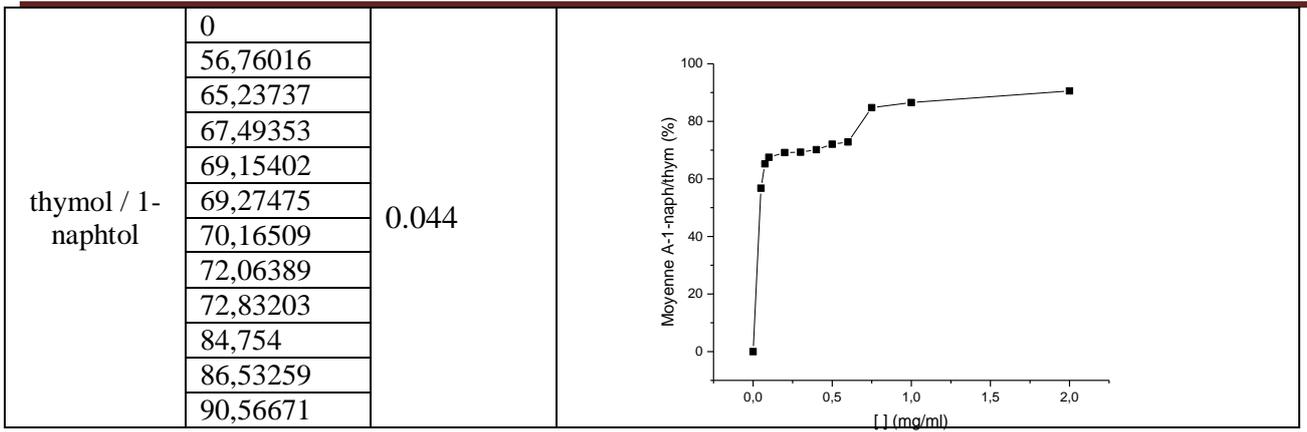
Deux agents ou plus de la combinaison interagissent de différentes manières conduisant à l'un des quatre effets possibles : synergique, synergique partielle, sans effet et antagonisme, Les interactions synergiques sont les plus importantes car elles améliorent l'activité antioxydante en utilisant les efficacités des agents combinés de la meilleure manière possible et entraînent ainsi une réduction de plusieurs fois des doses requises des agents combinés [65] [66].

Dans ce sens, nous avons pensé à étudier l'effet synergique des différents composés étudiés. Les résultats obtenus sont donnés dans les tableaux suivants.

Tableau N°14 : activité antioxydante, EC_{50}^T et courbe de variation de l'activité en fonction de la concentration des produits de références.

Mélange binaire	Activité %	EC_{50}^T (mg/ml)	Activité (%) = f([concentration massique])
Carvacrol / thymol	0	0.15	
	7,93226		
	30,64558		
	38,90966		
	60,08875		
	62,79245		
	68,51292		
	80,25649		
	82,60158		
	83,38455		
Carvacrol / 1-naphtol	0	0.056	
	45,23193		
	63,9821		
	77,44852		
	79,44751		
	83,50523		
	83,89233		
	84,08563		
	85,89008		
	86,79062		
	87,50072		
88,5973			

Résultats et discussion



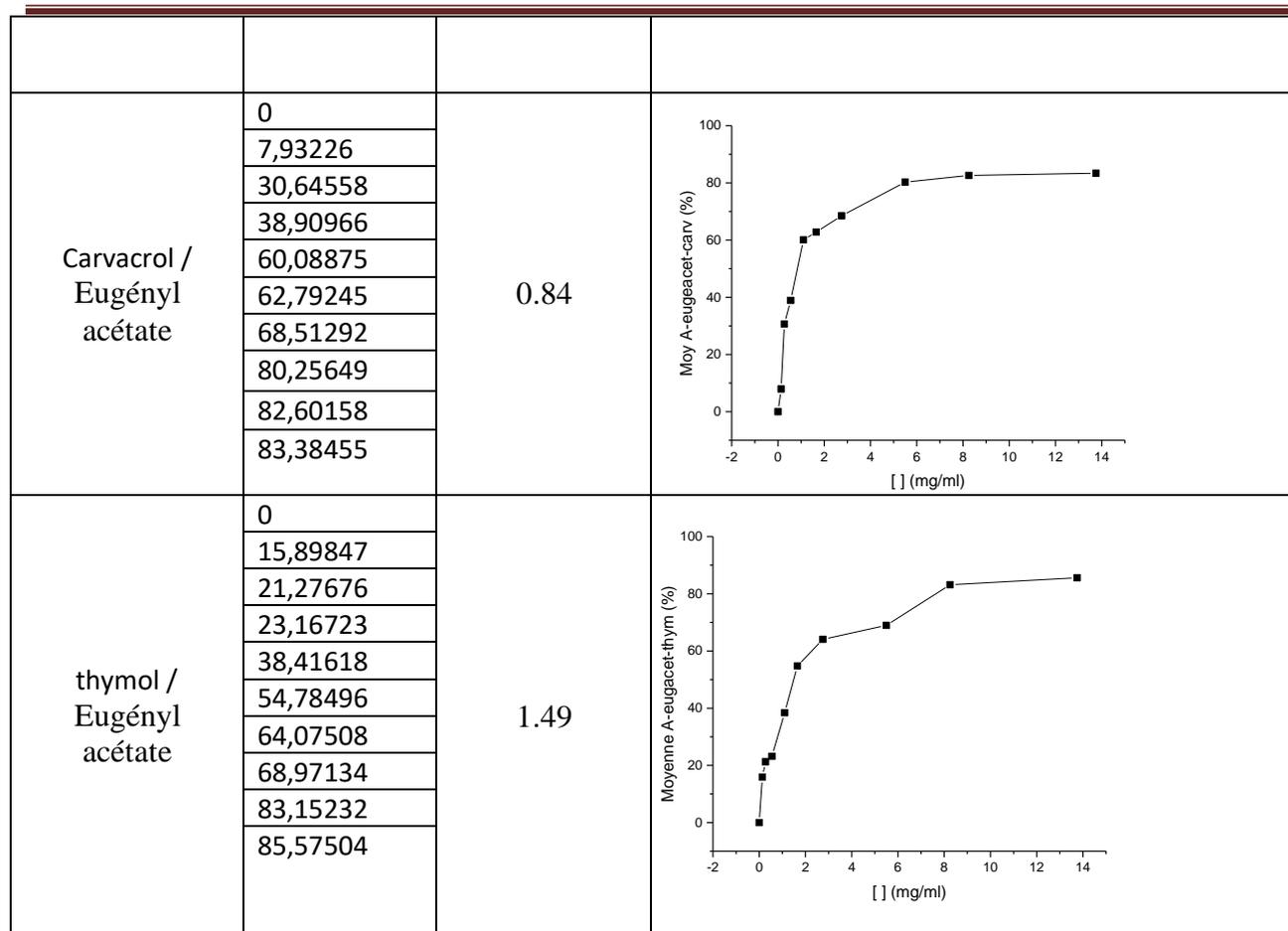
Résultats et discussion

Mélange binaire	Activité %	EC_{50}^T (mg/ml)	Activité (%) = f([concentration massique])
Carvacrolcamphène	0	71.16	
	8,85312		
	11,67002		
	15,01736		
	19,40846		
	24,9497		
	27,56539		
	27,36419		
	30,98592		
	38,43058		
58,14889			
thymol / camphène	0	22.44	
	17,66055		
	17,88991		
	21,78899		
	35,77982		
	39,1056		
	53,44037		
	58,93706		
	63,53211		
	66,97248		
76,14679			
Carvacrol/ ocimène	0	2.49	
	50,84379		
	54,34308		
	62,60696		
	68,82303		
	78,28975		
	86,55154		
thymol/ ocimène	0	4.89	
	10,17018		
	33,23232		
	53,20641		
	60,23057		
	74,5762		
88,07488			

Résultats et discussion

Mélange binaire	Activité %	EC_{50}^T (mg/ml)	Activité (%) = f([concentration massique])
Carvacrol / α -pinène	0	44.7	
	6,30324		
	23,40997		
	27,18949		
	28,10903		
	39,38294		
	45,50346		
	62,95969		
thymol / α -pinène	0	32.14	
	10,98467		
	16,14231		
	22,63055		
	31,47373		
	40,78435		
	58,34036		
	63,80095		
carvacrol / menthol	0	7.58	
	5,6627		
	11,76466		
	14,79043		
	23,33369		
	29,27349		
	39,86463		
	42,42927		
	52,37886		
	53,96145		
61,93493			

Mélange binaire	Activité %	EC_{50}^T (mg/ml)	Activité (%) = f([concentration massique])
thymol / menthol	0	0.96	
	32,38255		
	55,98332		
	67,16891		
	78,21801		
	80,09742		
	83,31285		



Aussi le tableau15 récapitule l'ensemble des valeurs des EC_{50} obtenus pour chaque système étudié.

Tableau 15 : valeurs des EC_{50} des composés purs et des mélanges binaires testés.

Composé	EC_{50}^{pur}	$EC_{50}^{composé/carvacrol}$	$EC_{50}^{composé/thymol}$
thymol	0.308	0.15	-
carvacrol	0.382	-	0.15
1-naphtol	0.913	0.056	0.044
Camphène	>200	71.16	22.44
Ocimène	7.827	2.49	4.89
α -pinène	64.01	44.7	32.14
Menthol	>50	7.58	0.96
Eugényl acétate	1.451	0.84	1.49

Le tableau 15 montre l'effet synergique positif des composés testés, sauf dans le cas du système eugényle acétate/thymol où l'activité reste presque constante. Cet effet est plus accentué dans le cas du thymol qu'avec le carvacrole. Il paraît clair qu'une étude théorique quantique soit nécessaire pour mieux cerner ces résultats et tenter de trouver la relation entre l'activité antioxydante et la structure moléculaire des composés doués de pouvoir antioxydant.

1.3 Approche théoriques du pouvoir anti-oxydante

Le pouvoir antioxydant est régi par trois mécanismes. Chaque mécanisme est lié à un descripteur spécifique comme suit :

1^{er} cas : (mécanisme N°1) :

La HAT qui représente la perte d'un atome d'hydrogène lié à un atome de forte électronégativité (liaison fragile). Cette réactivité dépend étroitement de l'enthalpie de dissociation de la liaison hydrogène BDE de (l'acronyme anglais Bond Dissociation Enthalpy: BDE.).

2^{ème} cas : (mécanisme N°2) :

La SET-PT qui est une perte successive d'un électron et d'un proton. Ce processus est lié au potentiel d'ionisation (Ionisation Potential: IP) et à l'enthalpie de dissociation du proton (Proton Dissociation Enthalpy: PDE).

3^{ème} cas : (mécanisme N°3) :

Le SPLET qui se résume à une perte d'un proton suivi d'un électron. Il dépend de l'affinité protonique (ProtonicAffinity: PA) et de l'enthalpie de transfert d'électron (Electron Transfer Enthalpy:ETE).

I.3-1 Etude du mécanisme HAT :

Dans le cas de ce mécanisme l'énergie de la BDE est la plus faible possible. Généralement, les composés phénoliques s'adonnent à ce type de mécanisme. Ainsi, dans le cas du thymol, carvacrol et du 1-naphtol on obtient les plus faibles énergies de la BDE. Voir le tableau 16.

Tableau 16 : Valeurs des énergies BDE correspondantes au premier mécanisme

famille	composé	neutre	radical	H(H·)	BDE(Ha)	BDE (Kcal/mol)
hydrocarbures oxygénés phénoliques	carvacrol	-464,633247	-464,006296	-0,5	0,126951	79,66213335
	thymol	-464,631916	-464,005952	-0,5	0,125964	79,04278789
	n-naphtol	-461,075246	-460,454792	-0,5	0,120454	75,58524636
Hydrocarbures	comphene	-390,531912	-389,880204	-0,5	0,151708	95,19722512
	α pinène	-390,514651	-389,886331	-0,5	0,12832	80,52118496
	ocimen	-390,512148	-389,889676	-0,5	0,122472	76,85154742
hydrocarbures oxygénés non phénoliques	menthol	-468,088132	-467,435296	-0,5	0,152836	95,90504851
	eugenylacetat	-691,286122	-690,669376	-0,5	0,116746	73,25846524

I.3-2 Etude du mécanisme SET-PT

Dans ce cas on prend en considérations l'énergie totale IP +PDE, si la réaction nécessite une énergie IP inférieure à la BDE on dit que la molécule suit le deuxième mécanisme. Le résultat du calcul des énergies est donné dans le tableau 17.

Tableau 17 : Valeurs des énergies IP et PDE correspondantes au deuxième mécanisme

famille	compose	rad-cat	molec	rad	H(é)	H(H+)	IP	PDE	SOMME (Kcal/Mol)
hydrocarbures oxygénés phénoliques	carvacrol	-464,346715	-464,633247	-464,006296	0,0012	0,0024	180,552693	215,119951	395,6726442
	thymol	-464,346024	-464,631916	-464,005952	0,0012	0,0024	180,151091	214,902207	395,0532987
	n-naphtol	-460,796956	-461,075246	-460,454792	0,0012	0,0024	175,380813	216,214944	391,5957572
Hydrocarbures	comphene	-390,227287	-390,531912	-389,880204	0,0012	0,0024	191,906105	219,301631	411,2077359
	α pinène	-390,227222	-390,514651	-389,886331	0,0012	0,0024	181,115563	215,416132	396,5316958
	ocimene	-390,227221	-390,512148	-389,889676	0,0012	0,0024	179,545551	213,316507	392,8620582
hydrocarbures oxygénés non phénoliques	menthol	-467,771432	-468,088132	-467,435296	0,0012	0,0024	199,483204	212,432356	411,9155593
	eugenyle acetate	-691,008892	-691,286122	-690,669376	0,0012	0,0024	174,71566	214,553316	389,268976

On remarque que l'IP est supérieure à la BDE. Ceci joue en faveur du mécanisme HAT.

I-3.3 Etude du mécanisme SPLET :

Ce mécanisme est impliqué si la valeur de l'énergie PA est inférieure à celle de la BDE, on voit que dans notre cas aucune structure ne suit ce mécanisme, les valeurs des énergies sont données dans le tableau 18.

Tableau 18: Les valeurs des énergies du mécanismes 3

famille	compose	rad-ani	molec	rad	H(é)	H(H+)	PA	ETE	SOMME (Kcal/Mol)
hydrocarbures oxygénés phénoliques	carvacrol	-464,084664	-464,633247	-464,006296	0,0012	0,0024	345,743485	49,9291587	396,5310683
	n-naphtol	-460,537808	-461,075246	-460,454792	0,0012	0,0024	338,749965	52,8457926	352,1709987
	thymol	-464,085688	-464,631916	-464,005952	0,0012	0,0024	344,265716	50,7875828	346,2178777
Hydrocarbures	comphene	-389,878363	-390,531912	-389,880204	0,0012	0,0024	411,609965	-0,40222942	428,0662315
	ocimene	-389,934087	-390,512148	-389,889676	0,0012	0,0024	364,241019	28,6210393	364,2410189
	α-pinène	-389,982606	-390,514651	-389,886331	0,0012	0,0024	335,365841	61,1658549	335,3658408
hydrocarbures oxygénés non phénoliques	menthol	-467,504679	-468,088132	-467,435296	0,0012	0,0024	367,624515	44,2910442	396,2455544
	eugenyl acetat	-690,709727	-691,286122	-690,669376	0,0012	0,0024	363,195599	26,0733772	362,7933695

I.4 Relation structures chimique / pouvoir antioxydant

Les résultats obtenus confirment cette relation, on remarque une bonne corrélation entre la structure chimique et le pouvoir antioxydant dans chaque famille de composés étudié.

2 1) les hydrocarbures oxygénés phénoliques :

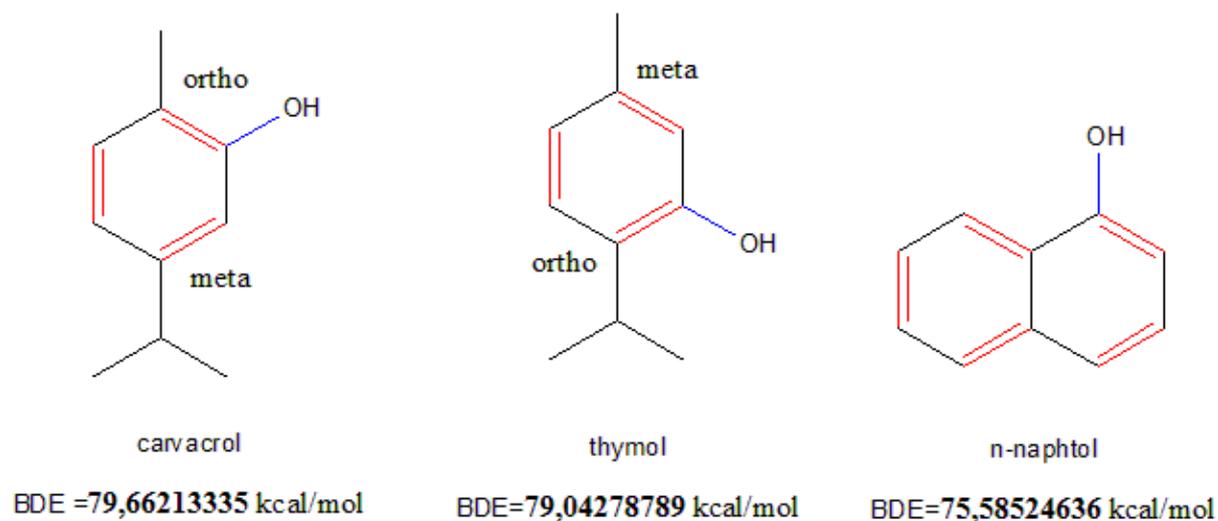


Figure 8: structures des composés oxygénés phénoliques

Cette classe regroupe le carvacrol, le thymol et le 1-naphtol.

- Les trois composés possèdent un groupement OH phénolique et une aromaticité.
- La valeur de la BDE est plus faible dans le cas du n-naphtol (75,59 kcal/mol) que dans le thymol (79,04 kcal/mol) et le carvacrol (79,66 kcal/mol). Ceci signifie que le naphthol devrait avoir une activité plus importante, cela est dû au nombre de formes limites lors de la délocalisation de l'électron célibataire, et donc une meilleure stabilité du radical que dans le cas du carvacrol et du thymol, ces effets facilitent aussi la rupture de la liaison O-H figure 9.

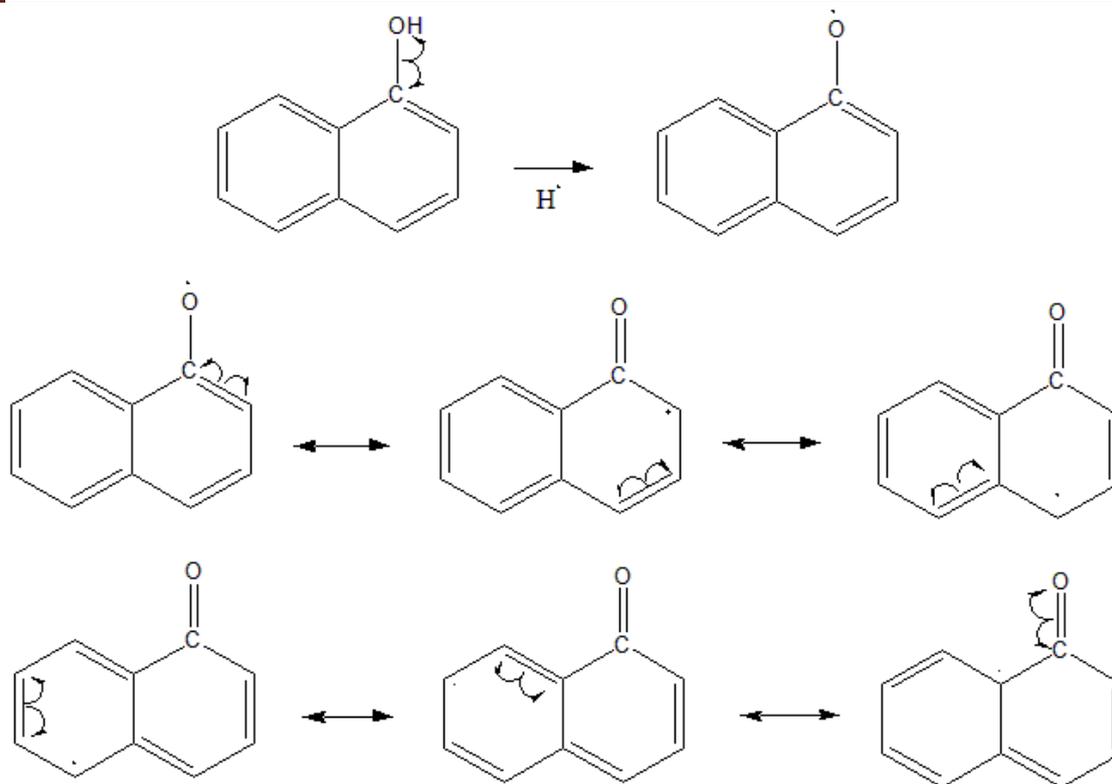


Figure 9: Les formes limites du radical 1-naphtoxy

Expérimentalement c'est l'inverse qui se passe. Ceci peut être dû à des effets stériques qui retardent la réaction.

2- 2) les Hydrocarbures

C'est le cas du camphène, α -pinène et, l'ocimène

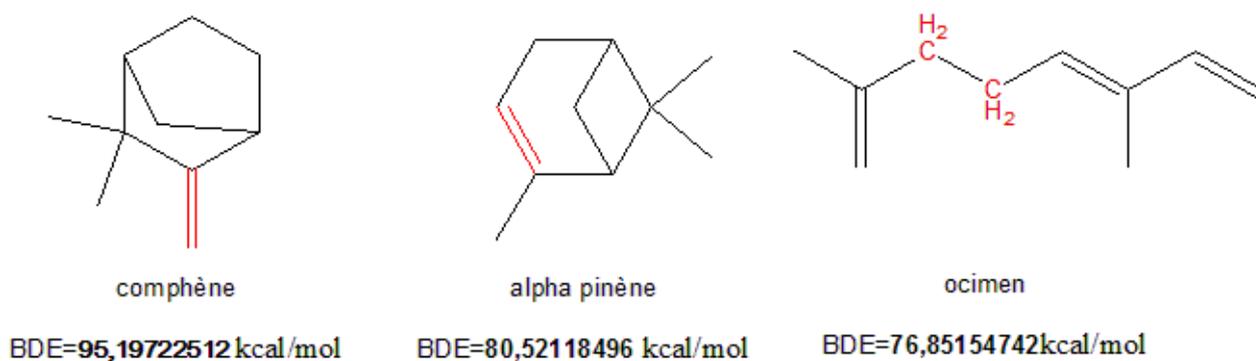


Figure 10 : Les valeurs de BDE et les structures chimiques des hydrocarbures

- On remarque que l'ocimène présente la plus faible énergie (76,85 kcal/mol) par rapport aux autres structures à cause de sa structure qui contient plusieurs sites d'attaque, ainsi que la présence d'une délocalisation sur les doubles liaisons conjuguées ceci affaiblit les liaisons C-H qui porte l'hydrogène active figure 11

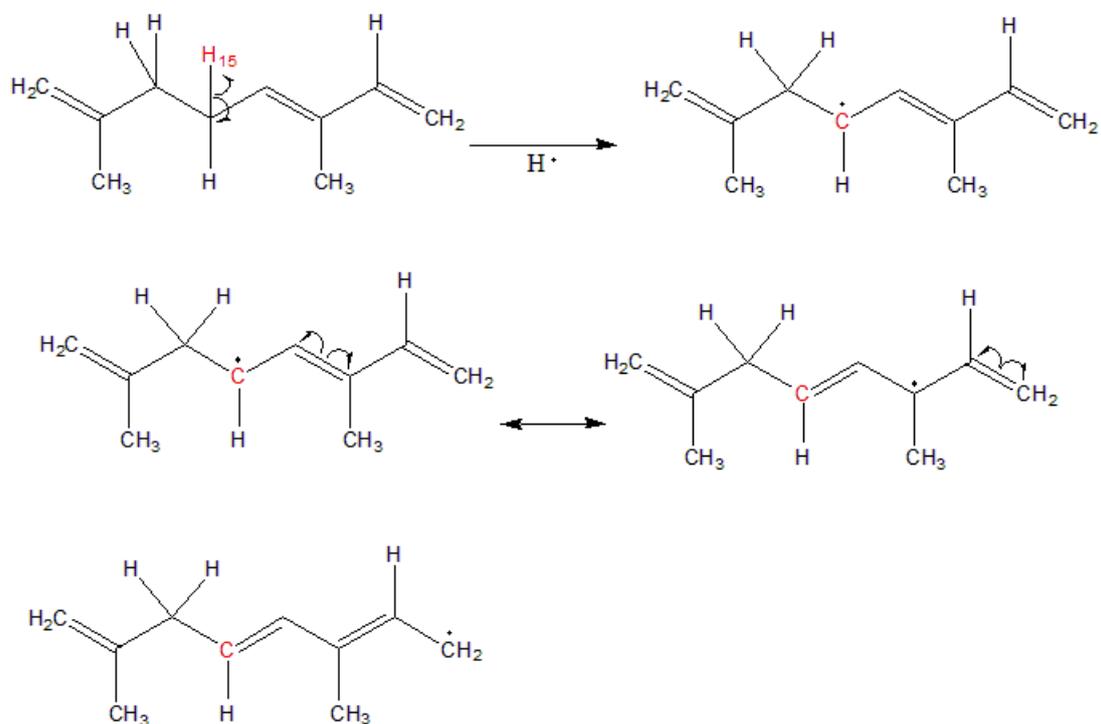


Figure 11 : Formes limites sur l'ocimène.

CONCLUSION

Conclusion

Le but de notre travail a été de trouver une corrélation entre l'étude théorique et expérimentale de l'activité antioxydante des composés phénoliques : carvacrol, thymol et 1-naphtol ; des composés non phénoliques et non oxygénés : camphène, ocimène et α -pinène ; et des composés non phénoliques et oxygénés : menthol et eugényle acétate. Des antioxydants de synthèse BHA et VitC sont utilisés comme des références.

Les résultats obtenus indiquent clairement la supériorité des composés phénoliques. Avec le thymol qui présente un EC50 égale à 0.308 mg/ml.

Aussi, nous nous sommes donné comme deuxième but l'étude de la synergie entre les différents composés précédents. Pour cela nous avons préparé des mélanges binaires pour lesquels nous avons mesuré l'activité antioxydante (EC50).

Nous avons constaté, d'après cette étude, un effet de synergie positif très marqué sur le pouvoir antioxydant et pour toutes les molécules. Ainsi, pour le 1-naphtol on passe de 0.913 à 0.044 dans le cas du mélange 1-naphtol/thymol.

Dans la deuxième partie, Nous nous sommes intéressé à l'étude de l'activité antioxydante par DFT. Les résultats obtenus montrent que les valeurs de l'enthalpie de dissociation de la liaison O-H ou C-H sont les plus faibles. Ceci, favorise le mécanisme HAT pour les molécules choisies dans notre étude.

REFERENCES

Références

- [1] Tessier F., Marconnet P., 1995. Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice revue. *Science and Sports*, 10: 1-13.
- [2] Carange Julie (2010) rôle antioxydant et anti-apoptotique des brassiostéroïdes, une nouvelle stratégie de neuroprotection ? Université du Québec
- [3] Soares A.F., 2005. Effets du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes : Adiponectine et prostaglandines. Thèse de doctorat, Institut National des sciences Appliquées de Lyon, pp : 35-43.
- [4] <https://www.mercordianimalcare.com/2019/02/what-are-free-radicals.html>
- [5] S.Goldschmidt and K. Renn, "Zweiwertiger Stickstoff: Über das α , α -Diphenyl- β -trinitrophenyl-hydrazyl.(IV. Mitteilung über Amin-Oxydation)," *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft (A B Ser.)*, vol. 55, no. 3, pp. 628–643, 1922.
- [6] J. F. Turrens, "Mitochondrial formation of reactive oxygen species," *J. Physiol.*, vol. 552, no. 2, pp. 335–344, 2003.
- [7] D. Han, E. WILLIAMS, and E. CADENAS, "Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space," *Biochem. J.*, vol. 353, no. 2, pp. 411–416, 2001..
- [8] C. Migdal and M. Serres, "Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant," *médecine/sciences*, vol. 27, no. 4, pp. 405–412, 2011.
- [9] O. Sorg, "Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?," *C. R. Biol.*, vol. 327, no. 7, pp. 649–662, 2004.
- [10] B. P. Yu, "Cellular defenses against damage from reactive oxygen species," *Physiol. Rev.*, vol. 74, no. 1, pp. 139–162, 1994.
- [11] R. Radi, "Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 115, no. 23, pp. 5839–5848, 2018
- [12] B. P. Yu, "Cellular defenses against damage from reactive oxygen species," *Physiol. Rev.*, vol. 74, no. 1, pp. 139–162, 1994.
- [13] B. Halliwell, A. Zentella, E. O. Gomez, and D. Kershenobich, "Antioxidants and human disease: a general introduction," *Nutr. Rev.*, vol. 55, no. 1, p. S44, 1997.
- [14] S. Moncada, A. Higgs, and R. Furchgott, "XIV. International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research," *Pharmacol. Rev.*, vol. 49, no. 2, pp. 137–142, 1997.
- [15] https://www.anastore.com/fr/dossiers/1_articulation_les_radicaux_libres.php
- [16] <https://science.howstuffworks.com/life/cellular-microscopic/free-radicals.htm>

- [17] Favier,A. 2006. [Oxidative stress in human diseases]. *Ann.Pharm.Fr.* 64: 390-396.
- [18] <https://www.indexsante.ca/chroniques/216/les-radicaux-libres.php>
- [19] Z.Eddhima (2019). Les radicaux libres : effets, mécanisme et approches thérapeutiques. Université Mohammed V de Rabat Maroc
- [20] Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 2003 Jul;17:1195–214.
- [21] Evans W J (2000). Vitamin E, vitamin C and exercise. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 647-652.
- [22] Favier,A. 2006. [Oxidative stress in human diseases]. *Ann.Pharm.Fr.* 64: 390-396.
- [23] https://www.analyticaltoxicology.com/wp-content/uploads/2015/01/Chapitre-IX_Stress-oxydatif.pdf
- [24] <https://www.meltonic.fr/A-2251-sport-sante-le-stress-oxydatif.aspx>
- [25] Halliwell B and Gutteridge J M C (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford (fourth edition).
- [26] Halliwell B., J. M. C. Gutteridge. (2008). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Fourth Edition. Oxford University Press. Citer dans la Thèse de Doctorat (2015): Implication du stress oxydant dans plusieurs affections du cheval athlete : revue bibliographique, 44-61 p.
- [27] Belkheiri, N. (2010). Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes [Thèse de doctorat, Université de Toulouse].
- [28] <https://www.hsnstore.fr/blog/complements/antioxydants/>
- [29] O. I. Aruoma, “Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease,” *J. Am. oil Chem. Soc.*, vol. 75, no. 2, pp. 199–212, 1998.
- [30] B. N. Stuckey, “Antioxidants as food stabilizers,” *Handb. food Addit.*, pp. 185–223, 1972.
- [31] B. Poljšak *et al.*, “Role of the vitamin E model compound Trolox in the prevention of Cr (VI)-induced cellular damage,” *Toxicol. Environ. Chem.*, vol. 88, no. 1, pp. 141–157, 2006.
- [32] T. Cordes, J. Vogelsang, and P. Tinnefeld, “On the mechanism of Trolox as antiblinking and antibleaching reagent,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, no. 14, pp. 5018–5019, 2009.
- [33] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, and J. Telser, “Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 39, no. 1, pp. 44–84, 2007.

- [34] M. S. Al-Saikhan, L. R. Howard, and J. C. Miller Jr, "Antioxidant activity and total phenolics in different genotypes of potato (*Solanum tuberosum*, L.)," *J. Food Sci.*, vol. 60, no. 2, pp. 341–343, 1995.
- [35] A. Djordjevic, J. M. Canadanovic-Brunet, M. Vojinovic-Miloradov, and G. Bogdanovic, "Antioxidant properties and hypothetic radical mechanism of fulleranol C60 (OH) 24," *Oxid. Commun.*, vol. 27, no. 4, pp. 806–812, 2004.
- [36] Bozin B., Mimica-Duric N., Samojlik I., Goran A. and Igetic R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L. Alliaceae).
- [37] <https://en.wikipedia.org/wiki/DPPH>
- [38] Maataoui, B. S., Hmyene, A., & Hilali, S. (2006). Activités antiradicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). Lebanese science journal, 7(1), 3-8.
- [39] Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Song Klana Karin J. sci. technol, 26(2), 211-219.
- [40] <http://chimactiv.agroparistech.fr/fr/aliments/antioxydant-dpph/principe>
- [41] Amao MB. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practice case. Tr Food Sc Tehnol. 2000; 11(11): 419-421.
- [42] Ozcelik B, Lee JH, Min DB., 2003. Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl J Food Sci., 68(2): 487-490.
- [43] M. Antolovich, P. D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, and K. Robards, "Methods for testing antioxidant activity," *Analyst*, vol. 127, no. 1, pp. 183–198, 2002.
- [44] A.E. Hagerman *et al.*, "High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 46, no. 5, pp. 1887–1892, 1998.
- [45] K. I. Berker, K. Güçlü, İ. Tor, B. Demirata, and R. Apak, "Total antioxidant capacity assay using optimized ferricyanide/prussian blue method," *Food Anal. Methods*, vol. 3, no. 3, pp. 154–168, 2010.
- [46] Teruin., M. (2018). Qualité des huiles essentielles en fonction des réseaux de distribution : focus sur la menthe poivrée et la lavande fine [Thèse de doctorat, Université de Nantes].
- [47] Sumonrat C., Suphitchaya C. and Tipparat H. 2008. Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical Citrus spp. against food-related microorganisms. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 30(1):125-131.

- [48] Bruneton J. 1999. Pharmacognosie- phytochimie, plantes médicinales. 4eme Ed. Tec & Doc, Paris,1288.
- [49] Bakkali, F.,2007. Biological effects of essential oils – A review, Food Chem. Toxicol.
- [50] Jiang, Y., et al., Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. Environmental toxicology and pharmacology, 2011. 32(1): p. 63-68.
- [51] Padua de, L.S., Bunyapraphatsara, N., Lemmens, R.H.M.J., 1999. Plant Resources of South-East Asia, No. 12 (1). Medicinal and Poisonous Plants 1. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- [52] Herz, W.,1977. in: V.H.Heywood, J.B.Harbone, B.L.Turner (Eds.), « The biology and chemistry of the compositae », Academic Press, london, P.337, Chapter 11.
- [52] Baranska, M., Schulz, H., Kruger, H., Quilitzsch, R., 2005. Anal. Bianal.Chem.381 ,1241.
- [54] J. Bruneton. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 1993, 915
- [55] (B. Abegaz, N. Asfaw, W. Lwande, J. Essent. Oil Res. 5 (1993) 487.)
- [56] Hellali N., Mahammed M.H., Ramdane F., Talli A. 2016. Antimicrobial and antioxidant activities of *Cytopogon schoenanthus* (L.) spreng essential oil, growing in Illizi – Algeria. Journal of medicinal plant research.10:188-194.
- [57] Almeida M.M.B., Sousa P.H.M., Arriaga A.M.C., et al. 2011. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh fruits from Northeastern Brazil. Food Research International. 44:2155-2159.
- [58] Sánchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-Calixto F. 1998. A procedure to measure the antioradical efficiency of polyphenols. Journal of the Science of Food and Agriculture.76:270-276.
- [59] Dordevic S., Petrovic S., Dobric S., et al. 2007. Antimicrobial, anti-inflammatory, antiulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. Journal of Ethnopharmacology.109 :58-463.
- [60] Spinola M. 2016. Prise en charge de l'arthrose par les thérapeutiques alternatives et/ou complémentaires à l'allopathie (homéopathie – phytothérapie – aromathérapie – compléments alimentaires). Thèse Présentée à la Faculté de Pharmacie de Dijon pour l'obtention du Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie. Université de Bourgogne UFR des Sciences de Santé Circonscription Pharmacie.
- [61] C. Bicchi *et al.*, “Quantitative analysis of essential oils: a complex task,” *Flavour Fragr. J.*, vol. 23, no. 6, pp. 382–391, 2008.

- [62] A. Oreopoulou, D. Tsimogiannis, and V. Oreopoulou, "Extraction of polyphenols from aromatic and medicinal plants: an overview of the methods and the effect of extraction parameters," *Polyphenols in plants*, pp. 243–259, 2019.
- [63] Gulluce, M., et al., *Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from Mentha longifolia L. ssp. longifolia*. Food chemistry, 2007. 103(4): p. 1449-1456.
- [64] Bozin, B., et al., *Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (Rosmarinus officinalis L. and Salvia officinalis L., Lamiaceae) essential oils*. Journal of agricultural and food chemistry, 2007. 55(19): p. 7879-7885.
- [65] Bag, A. and R.R. Chattopadhyay, *Evaluation of synergistic antibacterial and antioxidant efficacy of essential oils of spices and herbs in combination*. PloS one, 2015. 10(7): p. e0131321.
- [66] Adrar, N., N. Oukil, and F. Bedjou, *Antioxidant and antibacterial activities of Thymus numidicus and Salvia officinalis essential oils alone or in combination*. Industrial Crops and Products, 2016. 88: p. 112-119.
- [67] Armaković, S., S.J. Armaković, and S. Koziel, *Optoelectronic properties of curved carbon systems*. Carbon, 2017. **111**: p. 371-379.
- [68] De Souza, G.L., et al., *A DFT investigation on the structural and antioxidant properties of new isolated interglycosidic O-(1→3) linkage flavonols*. Journal of molecular modeling, 2016. **22**(4): p. 100.
- [69] Djeradi, H., A. Rahmouni, and A. Cheriti, *Antioxidant activity of flavonoids: a QSAR modeling using Fukui indices descriptors*. Journal of molecular modeling, 2014. **20**(10): p. 1-9.
- [70] Lienard, P., et al., *Predicting drug substances autoxidation*. Pharmaceutical research, 2015. **32**(1): p. 300-310.