

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF-M'SILA

FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE & BIOCHIMIE

N° :.....



DOMAINE :SCINCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
FILIERE:SCIENCE ALIMENTAIRE  
OPTION: NUTRITION ET SCIENCES DES ALIMENTS

**Mémoire présenté pour l'obtention  
Du diplôme de Master Académique**

**Par: NECHE AMIRA  
et HAMRIT HAFSA**

**Intitulé**

***Les méthodes de détermination de la capacité  
antioxydants dans les aliments***

**Soutenu devant le jury composé de:**

Dr. GUATOUACHE Mourad	Université de M'sila	Président
Dr. BEN MIRI Yamina	Université de M'sila	Rapporteuse
Dr. ARIECH Mounira	Université de M'sila	Examinatrice

**Année universitaire:2021/2022**

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, nous disons merci à Dieu de nous avoir donné la volonté, la santé, la force et le courage d'accomplir ce travail.

Notre grande appréciation et nos remerciements à notre superviseur, **Dr. Ben Meri Yamina**, Maître de conférences au Département de microbiologie et de biochimie, pour avoir accepté nous diriger et nous superviser pour la réalisation de notre mémoire en vue de l'obtention d'un master académique en nutrition et sciences alimentaires, en plus à ses judicieux conseils et à ses précieuses observations.

Nos sincères remerciements au **Dr. GUATOUACHE Mourad**, Maître de Conférences à Université de M'sila, pour l'avoir accepté comme président de notre jury de notre soutenance .

Et le **Dr. ARIECH Mounira** pour avoir accepté de faire partie de notre jury de notre soutenance et pour ses efforts dans la révision de cette mémoire.

Enfin, nous tenons à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet.

## **DEDICACE**

*Je dédie cet humble travail à mon soutien de la vie et à la personne sans qui je n'aurais pu rien accomplir, mon cher père **Hamrit Amar**.*

*Et à la femme, qui a toujours fait des sacrifices pour moi et m'a beaucoup soutenu à chaque étape de ma vie ,ma chère mère .*

*A mes sœurs et frères, que Dieu les protège*

*Au **Dr. Ben Meri** pour sa grande aide et ses précieux conseils.*

*Et à ma collègue Amira, qui a partagé avec moi tous les moments et situations de ce travail.*

**HAFSA**

## DEDICACE

*En expression ma gratitude, je dédie cet humble acte à ma chère maman : **Zahia**, qui m'a soutenu et mis en confiance tout au long de ma vie et de mon parcours d'études, qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a pas dit non à mes demandes et n'a ménagé aucun effort pour me rendre heureux et pour ses prières pour moi.*

*Et à mon père bien-aimé : **Abdallah**, qui n'a cessé de me conseiller et de m'écouter.*

*A la personne la plus chère et la plus compatissante qui est passée dans ma vie, le mari de ma tante maternelle **Ben Adel Issa**, que Dieu lui fasse miséricorde, il m'a aidé avec qui je ne pouvais pas atteindre et être ce que je suis maintenant sans lui.*

*A mes chers frères et sœurs : **Fateh, Nessrine et AboBakr**, que Dieu les protège et prenne soin d'eux.*

*À la personne qui m'a aidé et qui a toujours été à mes côtés et qui m'a fait atteindre ce stade :  
**Saif Al-Islam.***

*Au **Dr Ben Meri.Y** pour ses conseils et ses encouragements à mon égard.*

*A mon amie **Hafsa**, qui a partagé avec moi les moments difficiles, sa patience et sa compréhension tout au long de la période de réalisation de ce travail.*

*A tous ceux qui ont contribué à mon arrivée ici de manière positive ou négative.*

**AMIRA**

## Résumé

Ce travail est une étude des tests les plus importants utilisés pour déterminer l'activité des antioxydants naturels et artificiels et le protocole de leur application dans divers domaines, notamment le domaine de l'alimentation, et mentionne les avantages et les inconvénients de ces tests où certains dépendent de la mesure directe telle que le DPPH, FRAP et CURPAC et l'autre utilisent le calcul indirect pour mesurer l'activité antioxydante dans les aliments comme les méthodes ORAC, HORAC et TRAP. Les antioxydants cèdent un électron aux radicaux libres pour contribuer à leur stabilité et les empêcher de causer des dommages aux cellules. Ces radicaux libres, ERO et RNS, sont formés soit par des causes internes au métabolisme normal de l'organisme, telles que la respiration cellulaire dans les mitochondries, qui produit l'ERO, soit par des causes externes telles que les rayons ultraviolets, la pollution, etc. Le déséquilibre entre la production de radicaux libres dans l'organisme et la production d'antioxydants provoque ce qu'on appelle le phénomène de stress oxydatif, qui provoque de nombreuses maladies telles que le cancer et le vieillissement.

**Mots clés:** Activité antioxydant, radicaux libres , stress oxydatif, aliments.

## **Abstract**

This work is a study of the most important tests used to determine the activity of natural and artificial antioxidants and the protocol of their application in various fields, especially the field of food, and mentions the advantages and disadvantages of these tests where some rely on direct measurement such as DPPH, FRAP and CURPAC and the other use indirect calculation to measure antioxidant activity in foods such as ORAC, HORAC and TRAP methods. Antioxidants donate an electron to free radicals to help keep them stable and prevent them from causing cell damage. These free radicals, ERS and ERN, are formed either by causes internal to the body's normal metabolism, such as cellular respiration in the mitochondria, which produces ERS, or by external causes such as ultraviolet rays, pollution, etc. The imbalance between the production of free radicals in the body and the production of antioxidants causes what is called the phenomenon of oxidative stress, which causes many diseases such as cancer and aging.

**Key Words:** Antioxidant activity, free radicals, oxidative stress, foods.

## ملخص

هذا العمل عبارة عن دراسة لأهم الاختبارات المستخدمة لتحديد نشاط مضادات الأكسدة الطبيعية والاصطناعية وبروتوكول تطبيقها في مختلف المجالات وخاصة مجال الغذاء ، ويذكر مزايا وعيوب هذه الاختبارات حيث تعتمد البعض على القياس المباشر مثل DPPH و FRAP و CURPAC والطرق الأخرى تستخدم الحساب غير المباشر لقياس نشاط مضادات الأكسدة في الأطعمة مثل طرق ORAC و HORAC و TRAP. تعطي مضادات الأكسدة بالكترون للجذور الحرة للمساعدة في الحفاظ على ثباتها ومنعها من التسبب في تلف الخلايا. تتشكل هذه الجذور الحرة ، ERS و ERN ، إما عن طريق أسباب داخلية لعملية التمثيل الغذائي الطبيعي للجسم ، مثل التنفس الخلوي في الميتوكوندري ، التي تنتج ERS ، أو لأسباب خارجية مثل الأشعة فوق البنفسجية ، والتلوث .. الخ. يؤدي عدم التوازن بين إنتاج الجذور الحرة في الجسم وإنتاج مضادات الأكسدة إلى ما يسمى بظاهرة الإجهاد التأكسدي ، والتي ، كما أكدت العديد من الدراسات ، تسبب العديد من الأمراض مثل السرطان والشيخوخة.

**الكلمات المفتاحية :** النشاط المضاد للأكسدة، الجذور الحرة، الأكسدة، الأطعمة.

## Liste des abréviations

- $^1\text{O}_2$** :Oxygène singulet.
- ABTS**: Acide 2,2'-azinobis 3-ethylbenzo-triazoline-6-sulphonate.
- ADN** : Acide désoxyribonucléique.
- AsC•**:Radical ascorbate de tricarbonyle.
- BHA**: Butylhydroxyanisole.
- BHT**: Butylhydroxytoluène.
- CAA**: Activité antioxydant cellulaire.
- CAT**: Catalase.
- CUPRAC** :Pouvoir antioxydant réducteur cuivrique
- DG** :Gallate de dodécyle.
- DPPH** : 2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl.
- ERO**: Espèces réactives de l'oxygène.
- FRAP**: Pouvoir antioxydant réducteur du fer.
- FTC**: Thiocyanate ferrique.
- GPx**: Glutathionereductase.
- $\text{H}_2\text{O}_2$** :Peroxyde d'hydrogène.
- HOCl**: Acide hypochloreux.
- HORAC**: Capacité de prévention des radicaux hydroxyles.
- MDA**: malondialdehyde.
- $\text{N}_2\text{O}_3$**  : Trioxyde de nitrogène.
- NDPH**: Nicotinamide-Adenine-dinucleotide-Phosphate.
- NO**: Monoxyde d'azote.
- $\text{NO}^\bullet$** : Oxyde nitrique.
- $\text{NO}_2$**  : Dioxyde d'azote.
- $\text{O}_2^{\bullet-}$** : Anion superoxyde.
- $\text{O}_3$** :Ozone.
- $\text{OH}^\bullet$** :Radical hydroxyl.
- $\text{ONOO}^-$**  :Peroxynitrite.
- ORAC**: Capacité d'absorption des radicaux oxygène.
- PFRAP** :Pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium.
- PG** : Gallate de propyle.

**RNS:** Azote réactif espèce.

**RO•** :Radical alcoxyle.

**ROO•** :Radical peroxy.

**SOD:** Superoxyde dismutase.

**TBA:** Acide thiobarbiturique.

**TBHQ** : Butylhydroquinone tertiaire.

**TRAP** : Procédure d'amplification de répétition de télomères.

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Différents types d'ERO et de RNS .....	6
<b>Tableau 2.</b> Structures de quelques antioxydants synthétiques .....	12
<b>Tableau 3.</b> Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées.....	18
<b>Tableau 4.</b> Les "top 20" des végétaux riches en antioxydants (activité antioxydant par portion, exprimée en micromoles de Trolox équivalents) .....	19
<b>Tableau 5.</b> Les avantages et les inconvénients de DPPH. ....	22
<b>Tableau 6.</b> Les avantages et inconvénients de test ABTS .....	25
<b>Tableau 7.</b> Les avantages et les inconvénients de test FRAP .....	26
<b>Tableau 8.</b> Les avantages et les inconvénients de test CURPAC.....	28
<b>Tableau 9.</b> Les avantages et les inconvénients de test PFRAP .....	29
<b>Tableau 10.</b> Les avantages et les inconvénients du test ORAC .....	34
<b>Tableau 11.</b> Les avantages et les inconvénients de test HORAC.....	35
<b>Tableau 12.</b> Les avantages et les inconvénients de test TRAP .....	36
<b>Tableau 13.</b> Les avantages et les inconvénients du test blanchiment du $\beta$ -carotène.....	38
<b>Tableau 14.</b> Les avantages et les inconvénients du test TBA.....	40

## Listes des figures

<b>Figure 1.</b> Chaîne respiratoire de la mitochondrie .....	2
<b>Figure 2.</b> La première étape de l'oxydation (formation de radicaux libres) .....	3
<b>Figure 3.</b> La deuxième étape de l'oxydation (formation de radical hydroperoxyde) .....	3
<b>Figure 4.</b> Génération des principales ERO et RNS .....	6
<b>Figure 5.</b> Le phénomène de stress oxydatif.....	7
<b>Figure 6.</b> Le stress oxydatif et son rôle central dans les maladies.....	8
<b>Figure 7.</b> Mécanismes d'oxydation et de réparation des protéines .....	9
<b>Figure 8.</b> Peroxydation lipidique .....	9
<b>Figure 9.</b> Addition de HO• sur la guanine.....	10
<b>Figure 10.</b> Défenses antioxydants enzymatiques.....	15
<b>Figure 11.</b> Différentes structures chimiques de la vitamine C et réaction avec les radicaux.....	16
<b>Figure 12.</b> Structure chimique des principaux caroténoïdes antioxydants.....	17
<b>Figure 13.</b> Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques.....	17
<b>Figure 14.</b> Mécanismes (principe) de piégeage du DPPH par un antioxydant (AH) .....	20
<b>Figure 15.</b> (a) Variation de couleur dans le test ABTS; )b) Schéma réactionnel impliqué dans 2,20 -Azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique dosage de l'activité de piégeage des cations radicaux acides (ABTS).....	23
<b>Figure 16.</b> Formation du complexe (Fe <sup>2+</sup> -TPTZ) à partir du complexe (Fe <sup>3+</sup> -TPTZ) par les antioxydants .....	25
<b>Figure 17.</b> Réaction inclus dans le dosage antioxydant au pouvoir antioxydant du cuivre (CUPRAC) ,(a): Formation du (Cu <sup>+</sup> ) à partir de (Cu <sup>2+</sup> ) ,(b) :le changement de couleur dans le test.....	27
<b>Figure 18.</b> Mécanisme de réaction du ferricyanure de potassium .....	29
<b>Figure 19.</b> Formation d'un complexe Fe <sup>3+</sup> -xylénol orange à partir de Fe <sup>2+</sup> avec un oxydant suivi d'un traitement au xylénol orange .....	30
<b>Figure 20.</b> Schémas réactionnels impliqués dans le test ORAC (Capacité d'absorption des radicaux oxygénés ) pour la détection de l'hydroxyle et les radicaux peroxydes .....	32
<b>Figure 21.</b> Mécanisme possible du test de blanchiment du β-carotène .....	37



## Table des matières

Remerciement

Dédicace

Résumé

Abstract

ملخص

List des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction générale .....1

### Chapitre I: Généralités sur l'activité antioxydant

I.1. Activité antioxydante.....2

I.1.1. Définition ..... 2

I.1.2. Réaction d'oxdoréduction..... 2

I.1.3. Les radicaux libres ..... 4

I.1.4. Stress oxydatif ..... 7

I.2. Les antioxydants.....10

I.2.1. Définition.....10

I.2.2. Le Rôle et les effets des antioxydants..... 10

I.2.3. Types des antioxydants ..... 11

I.2.4. Antioxydants et système de défense ..... 13

I.2.5. Quelques aliments riches en antioxydants et leurs bienfaits ..... 18

### Chapitre II: Les méthodes de détermination de la capacité antioxydants dans les aliments

II.1. Test DPPH(2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) ..... 20

II.2. Test ABTS/TEAC (Acide 2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique)/Capacité antioxydante équivalente au Trolox) ..... 23

Π.3. Test FRAP .....	25
Π.4. Test CUPRAC (Pouvoir antioxydant réducteur cuivrique ).....	27
Π.5. Test PFRAP (Méthode du pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium ).....	28
Π.6. Test FOX .....	30
Π.7. Test FTC (Thiocyanateferrique ) .....	31
Π.8. Test ORAC (Capacité d'absorption des radicaux oxygène ) .....	31
Π.9. Test HORAC (Capacité de prévention des radicaux hydroxyles ) .....	34
Π.10. Test TRAP (Procédure d'amplification de répétition de télomères) .....	35
Π.11. Test de blanchissement du $\beta$ -Carotène .....	36
Π.12. Test TBA (Acide thiobarbiturique).....	39
<b>Conclusion générale</b> .....	41
<b>Références bibliographiques</b> .....	42

# **Introduction générale**

Les antioxydants ont été largement inclus dans l'industrie alimentaire au XXe siècle pour réduire les résultats de l'oxydation. Ils sont des molécules stables et légères qui donnent un électron aux radicaux libres pour les éliminer et réduire leur capacité à causer ou à retarder les dommages. Ces radicaux, y compris ERO et RNS, sont produits à la suite de processus d'oxydation naturels dans le corps pour produire de l'énergie, par exemple, ou pour plusieurs raisons externes. Ils sont contrecarrés par des antioxydants internes (enzymatiques) produits par le corps dans le cas normal, y compris SOD, GPX et Catalase, et externes (non enzymatiques) tels que la vitamine C et les polyphénols et le bêta-carotène qui peuvent être prélevés dans l'alimentation d'une personne en plus des antioxydants synthétique tels que BHT, BHA, PG (Gautama *et al.*, 2010; Kumar, 2014; Nithyanand *et al.*, 2014; Flieger *et al.*, 2021).

L'augmentation de la production d'ERO et d'RNS dans le corps, qui à son tour contribue à l'apparition du stress oxydatif, qui résulte de l'échec du système de défense de l'organisme à maintenir un équilibre entre les quantités d'antioxydants et les quantités de radicaux libres produits. Le stress oxydatif cause de nombreux dommages aux cellules et aux molécules, y compris les protéines et les lipides, ainsi que des dommages à l'ADN, ce qui entraîne de nombreuses maladies et est dangereux pour l'homme (Singh *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2021). Ces dernières années, de nombreuses tentatives il a été conçu pour fournir des approches, rapides et économiques pour déterminer l'activité antioxydante des aliments que nous consommons. Il existe de nombreuses méthodes publiées telles que (ABTS), (DPPH), (FRAP) et autres (Zhang *et al.*, 2014; Georgiana et Apetrei, 2022).

L'objectif de ce travail est de résumer la théorie et la pratique des méthodes de détermination de l'activité antioxydante dans les aliments. Il est divisé en deux chapitres :

- Le premier chapitre aborde une étude bibliographique préalable réalisée sur l'activité antioxydant.
- Le second est consacré aux différentes méthodes utilisées pour déterminer l'activité des antioxydants dans les aliments.

# Chapitre I

## Généralités sur l'activité antioxydant

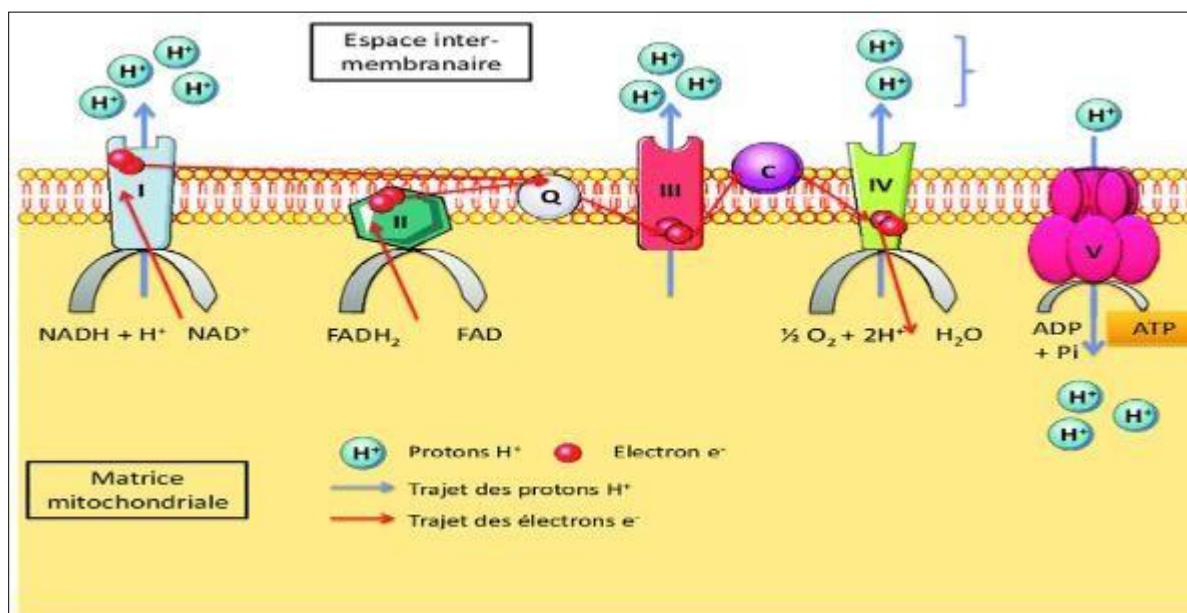
## I.1. Activité antioxydante

### I.1.1. Définition

Le terme activité antioxydant fait référence à la vitesse constante de réaction entre un antioxydant spécifique et un certain oxydant (Flieger *et al.*, 2021).

### I.1.2. Réaction d'oxdoréduction

Les réactions d'oxdoréduction sont des réactions physiologiques nécessaires au fonctionnement de l'organisme et constituent un système d'échange d'électrons. Cette réduction se produit dans le corps, où elle est utilisée par les cellules eucaryotes pour produire de l'énergie de manière aérobie, ce processus se produit dans les mitochondries et comprend des accepteurs d'électrons, des réducteur d'électrons et des donneurs (Ghayati, 2019). Ces réactions d'oxdoréduction forment des sous-produits, des radicaux libres ou des espèces réactives de l'oxygène (ERO), et elles se forment lorsque l'oxygène n'est pas réduit (2 à 3 % ne sont pas réduits) (Delattre, 2005) (Figure 1).



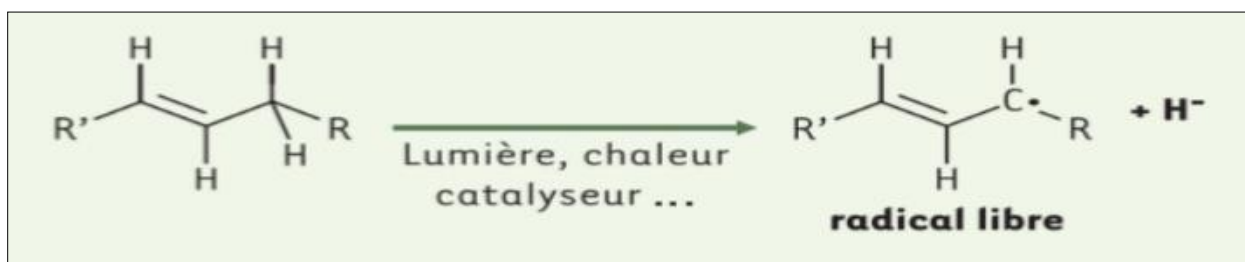
**Figure 1.** Chaîne respiratoire de la mitochondrie (Villedieu, 2018).

L'oxydation est une réaction organique qui se produit lorsqu'une liaison est formée entre le carbone et l'atome le plus électronégatif, tel que l'azote, l'halogène et l'oxygène, ou elle peut également se produire lorsqu'une liaison est détruite entre le carbone et l'atome le moins électronégatif, comme l'hydrogène, et cette réaction organique conduit à une diminution de densité électronique au niveau du carbone (Topwe, 2013). Elle cause de grands dommages aux aliments,

car il provoque une modification majeure des aliments en termes de qualité nutritionnelle et organoleptique, par exemple, un changement de couleur et provoquant le rancissement ...etc (Marc *et al.*, 2004).

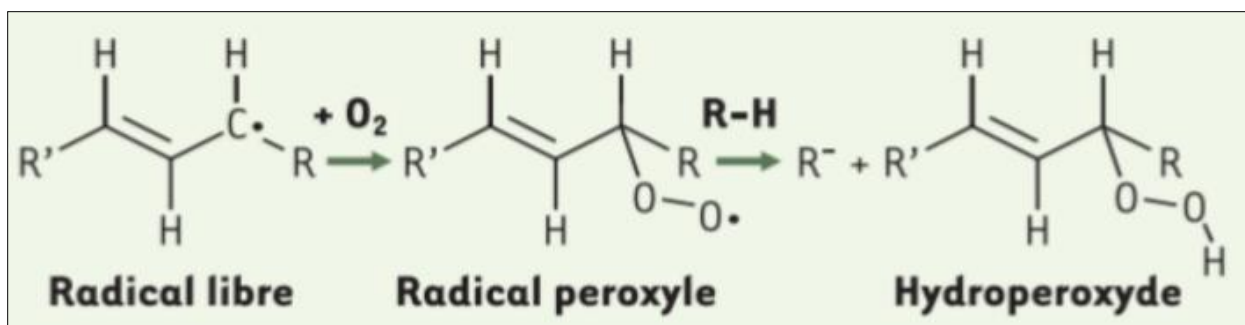
Selon Marc *et al.*, (2004) et Dridi (2016), le processus d'oxydation comprend trois étapes principales :

**A) Étape d'Initiation** : La formation de radicaux libres se produit sous l'influence de la chaleur, la radiation ou de certains stimuli tels que le fer et le cuivre, où ils contribuent à faciliter le processus de séparation du proton (Figure 2).



**Figure 2.** La première étape de l'oxydation (formation de radicaux libres) (Marc *et al.*, 2004).

**B) Étape de propagation** : Un radical hydroperoxyde est formé (l'oxygène fixé donne un radical peroxyde qui réagit avec une autre molécule) (Figure 3).



**Figure 3.** La deuxième étape de l'oxydation (formation de radical hydroperoxyde) (Marc *et al.*, 2004).

**C) Étape de terminaison** : différents radicaux se forment.

### I.1.3. Les radicaux libres

#### I.1.3.1. Définition

Les radicaux libres sont le résultat du métabolisme cellulaire, qui est des molécules ou des atomes qui portent un ou plusieurs électrons uniques (célibataire) dans son orbite externe. Ils ont une durée de vie très courte (**Delattre *et al.*, 2005**). Ce sont des composés instables et rapidement réactifs, sur le chemin de la stabilité, les radicaux libres interagissent avec d'autres composés tels que les protéines, les lipides et l'ADN en les dépouillant ou donnant un électron, ce qui en fait également un radical libre (**Halliwell et Guttenridge, 2007**).

Il y a deux sources de production de radicaux libres (**Ebadi, 2001**) :

- **Internes** : Mitochondries, xanthine oxydase, inflammation, phagocytose, peroxysomes, exercice excessif, Ischémie.
- **Externes** : Fumée de cigarette, polluants environnementaux, radiation, certains médicaments, pesticides, solvants industriels, ozone.

#### I.1.3.2. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives de l'azote (RNS)

Ce sont des molécules hautement réactives produites par l'organisme via les métabolismes cellulaires. Elles ont deux effets sur le corps, négatif et positif, et cela dépend de la quantité de sa production, car il agit comme médiateurs pour envoyer des signaux, par exemple, pour la prolifération des cellules dans le cas d'un taux modéré, mais si la concentration est élevée, elles provoquent de nombreuses maladies (**Finkel et Holbrook, 2000; Trachootham *et al.*, 2008; Finkel, 2011**).

##### I.1.3.2.1. Les espèces réactives de l'azote (RNS)

Les ERN appartiennent à la famille des dérivés de l'azote qui sont étroitement liées à l'oxygène (**Shi, 2015**). Les RNS sont NO<sup>•</sup> (oxyde nitrique), NO<sub>2</sub> (dioxyde d'azote), N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (trioxyde de nitrogène) et ONOO<sup>-</sup> (peroxynitrite), NO (monoxyde d'azote) (**Haida et Hakiman, 2019**). Le NO<sup>•</sup> est un radical libre qui est produit par l'oxygène, l'arginine et le NADPH et qui est responsable de la production de ONOO<sup>-</sup> par sa réaction avec O<sub>2</sub><sup>-•</sup> (anionsuperoxyde), Les ONOO<sup>-</sup> résultants, à leur tour, peuvent être divisés pour produire

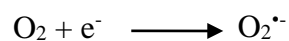
des HO<sup>•</sup> et des NO<sub>2</sub> (**Figure 4**) (Winterbourn, 2014; Moniczewski *et al.*, 2015; Pisoschi et Pop, 2015).

### I.1.3.2.2. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

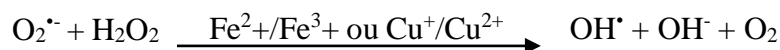
Les ERO sont des atomes d'oxygène qui contiennent un électron non apparié dans leur orbite externe et sont des sous-produits résultat d'un processus incomplet de réduction de l'oxygène lors de la respiration cellulaires, qui est le processus physiologique le plus produit des ERO, et le NADPH oxydase est considéré aussi comme l'une des principales sources pour la production de ERO (Valko *et al.*, 2006; Murphy, 2009; Schieber et Chandel, 2014).

Il existe sous forme d'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), de radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>), de radical peroxyde (ROO<sup>•</sup>), de radical alcoxyde (RO<sup>•</sup>), d'acide hypochloreux (HOCl), d'ozone (O<sub>3</sub>), et d'oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (**Figure 4**) (Favier, 2003 ; Murphy, 2009; Li *et al.*, 2016). Les ERO sont présentées dans le **tableau 1**.

**A) Anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)** : Ce type de radicaux se forme à la suite de nombreux processus métaboliques tels que la phagocytose, ou l'auto-oxydation, ainsi que dans la chaîne mitochondriale de transport d'électrons lors du processus de production d'énergie (ATP). Il consiste à donner un électron à un atome d'oxygène (Young et Woodside, 2001; Sanches-Moreno, 2002; MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).



**B) Radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>)** : Ce type de radical est le produit de la réaction de Fenton. Il est très agressif et est également un agent oxydant très fort. Il peut réagir avec les glucides, les lipides et d'autres molécules, formées à la suite de la réaction du fer avec le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Sanches-Moreno, 2002 ; Pisoschi et Pop, 2015).



**C) Peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)** : C'est un oxydant très fort produit par les peroxysomes et les enzymes oxydantes, aussi par la décomposition des radicaux superoxydes, il contient deux électrons supplémentaires (Sanches-Moreno, 2002; Winterbourn, 2013). Le peroxyde d'hydrogène réagit le plus avec les métaux de transition, soit par complexes de faible poids moléculaire ou des métalloprotéines, Il n'oxyde pas directement les molécules sensibles aux oxydants dans la plupart des cas (Winterbourn, 2014).

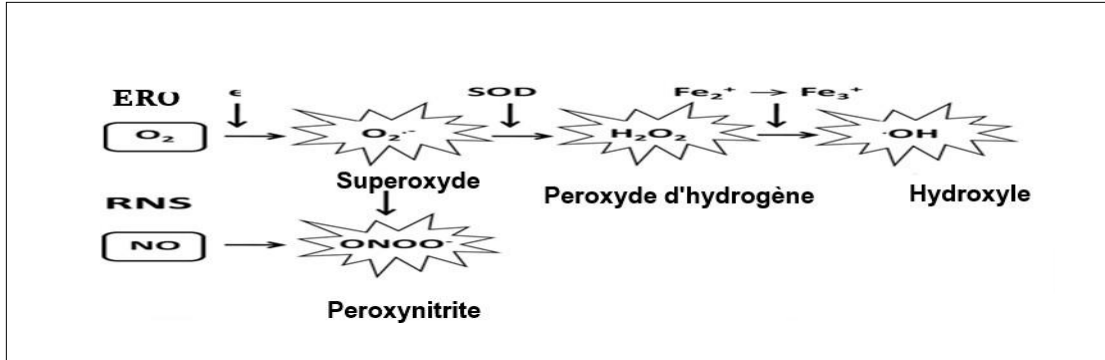


Figure 4. Génération des principales ERO et RNS (Codorner-Franch *et al.*, 2011).

Tableau 1. Différents types d'ERO et de RNS (Oddhima, 2019).

<b>Radical</b>	Anion superoxyde	$O_2^{\bullet-}$
	Oxyde nitrique	$NO$
	Dioxyde d'azote	$NO_2$
	Hydroxyle	$OH^{\bullet}$
	Dioxyde de carbone	$CO_2^{\bullet-}$
	Alkoxyde	$RO^{\bullet}$
<b>Non radical</b>	Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$
	Acide hypochloreux	$HOCl$
	Peroxynitrite	$ONOO^-$
	Peroxyde organique	$ROOH$
	Ozone	$O_3$
	Oxygène singulet	$^1O_2$

### I.1.3.3. Rôle physiologique des radicaux libre

Les radicaux libres jouent un rôle important dans l'organisme, car ils contribuent à la prévention des maladies en améliorant les fonctions immunitaires en amplifiant le signal à l'intérieur des cellules où les phagocytes produisent des ERO pour les aider à détruire les corps étrangers. Les radicaux libres détendent également les muscles lisses et régulent la transduction du signal et la prolifération cellulaire en activant les kinases (Adjadj, 2016).

### I.1.4. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre la production de radicaux libres et la quantité d'antioxydants produits dans le corps (Incapacité du système de défense à démanteler ces radicaux) (Daenen *et al.*, 2019). L'un de ses résultats est qu'il provoque l'accumulation d'ERO en abondance dans le corps, ce qui entraîne plusieurs maladies, dont le cancer (Delattre, 2005). Plusieurs facteurs affectent le stress oxydatif, notamment des facteurs physiques tels que la température ou les rayons ultraviolets, des facteurs biologiques et chimiques (médicaments, certains aliments transformés...etc.) (Figure 5) (Semenza, 2001; Zhang, 2021).

Le régime alimentaire peut également provoquer un stress oxydatif s'il est pauvre en aliments contenant des antioxydants tel que vitamines C et E, caroténoïdes, polyphénols (Defraige et Pincemail, 2008).

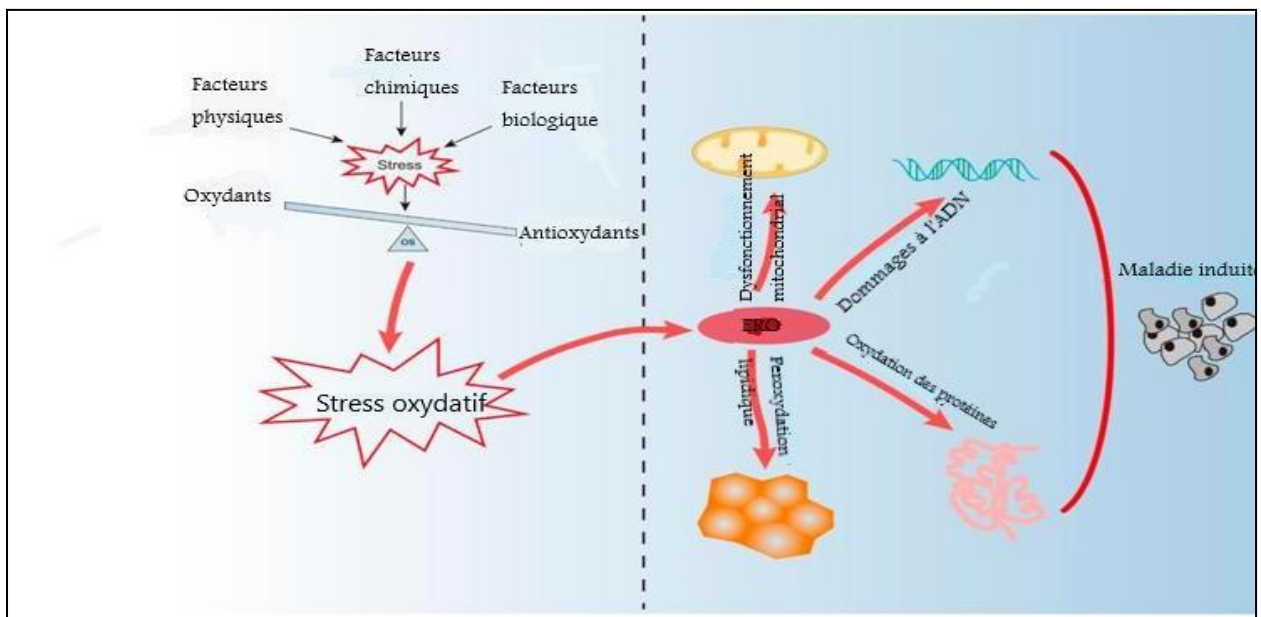
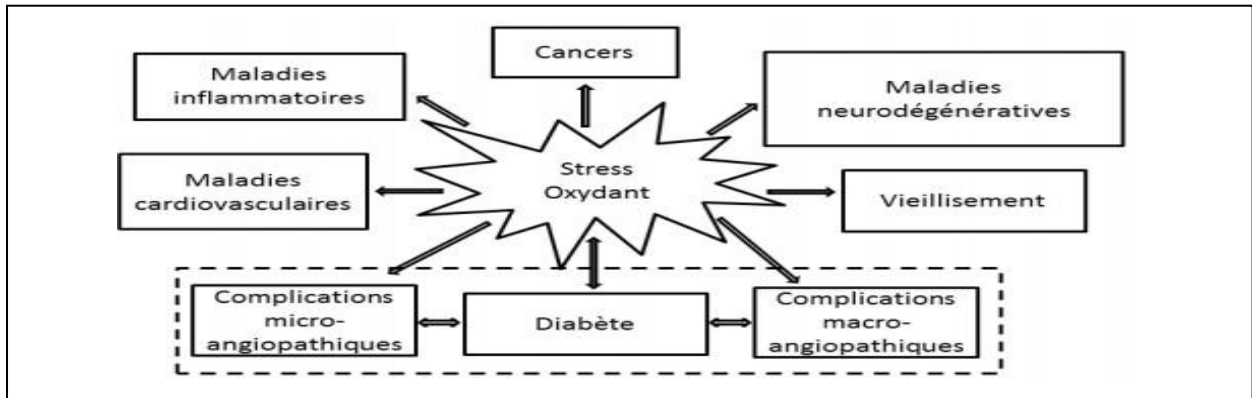


Figure 5. Le phénomène de stress oxydatif (Zhang *et al.*, 2021).

#### I.1.4.1. Maladies liées au stress oxydatif

Les dommages oxydatifs dus au stress oxydatif peuvent entraîner une surexpression de gènes oncogènes, la génération de composés mutagènes, une prolifération cellulaire incontrôlée et l'émergence de tumeurs de type cancéreux (Adjadj, 2016). Il provoque également une diminution de la viabilité et de la motilité des spermatozoïdes, augmentant ainsi l'incidence de l'infertilité masculine (Lavranos *et al.*, 2012). Selon plusieurs nouvelles études qui ont prouvé

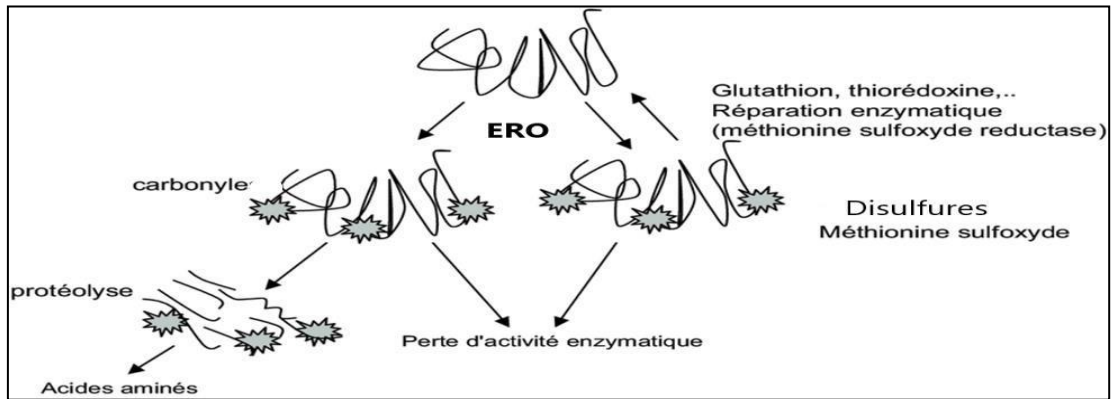
leur participation à l'émergence d'autres maladies telles que le diabète, les maladies neurodégénératives, les maladies pulmonaires, les maladies auto-immunes et les maladies inflammatoires, le stress oxydatif provoque une augmentation de l'activité de l'athérosclérose qui entraîne des maladies cardiovasculaires (**Figure 6**) (**Adjadj, 2016; Ghayati, 2019**).



**Figure 6.** Le stress oxydatif et son rôle central dans les maladies (**Delattre, 2005**).

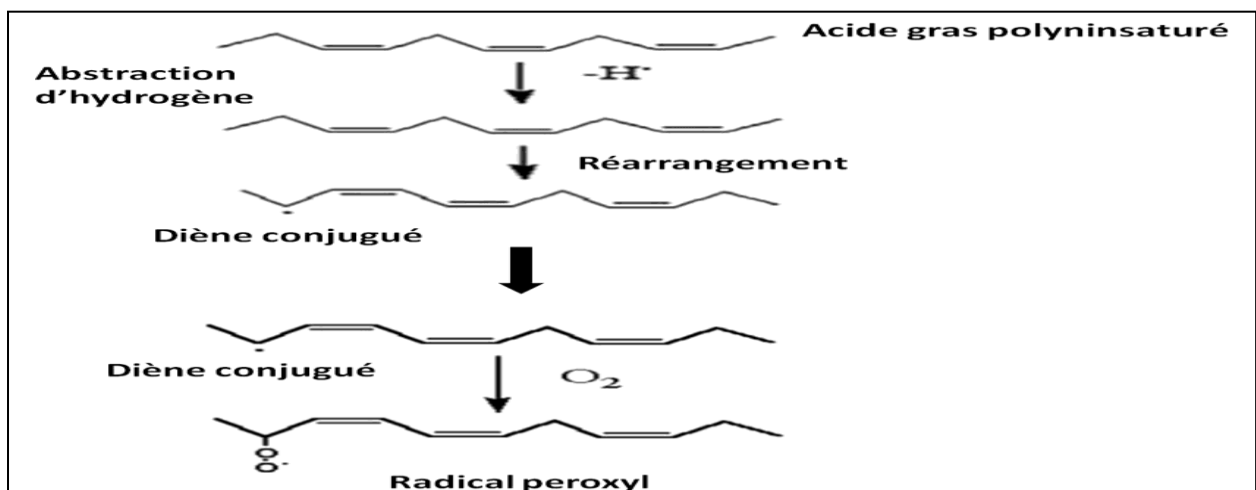
#### I.1.4.2. Conséquences du stress oxydatif

**A) Oxydation des protéines:** Plusieurs enzymes cellulaires et protéines de transport contiennent des groupes sulfhydrile (SH) dans leur structure chimique, ce qui les rend vulnérables aux attaques des radicaux libres, les obligeant à s'oxyder et à perdre leurs propriétés biologiques. Ces protéines deviennent également extrêmement hydrophobes (**Favier, 2003**). Les acides aminés sont indirectement attaqués par des aldéhydes réactifs tels que le MDA et le 4-hydroxynonéal qui sont des produits de la peroxydation lipidique induite par les ERO (**Figure 7**) (**Raedschelders et al., 2012**). De nombreuses études sur les maladies liées à l'alimentation ont démontré le rôle de l'oxydation des protéines dans la viande et d'autres aliments dans l'apparition de nombreuses maladies graves, et l'effet des ERO peut affecter les types d'aliments ainsi que leur effet sur les tissus vivants (**Estévez, 2019; Zang et al., 2020**).



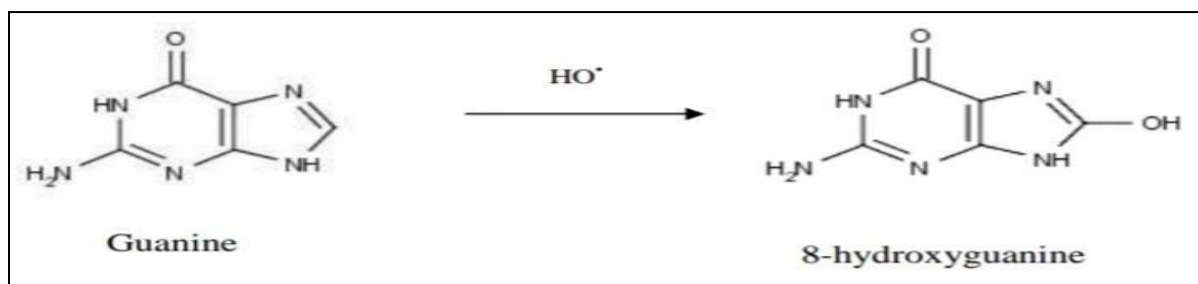
**Figure 7.** Mécanismes d'oxydation et de réparation des protéines (Bailly *et al.*, 2008).

**B) Oxydation des lipides:** elle est également appelé peroxydation lipidique, qui se forme par la dégradation des lipides par les ERO. Ce processus est appelé par ce nom à la suite de la formation de la radicaux peroxydes à la fin, les radicaux hydroxyles attaquent les acides gras insaturés, ces radicaux extraient l'hydrogène entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué puis s'oxydent pour devenir un radical peroxyde (Figure 8) (Esterbauer *et al.*, 1992; Kardeh *et al.*, 2014). L'oxydation des lipides joue également oxydation est également visible à travers l'odeur ou la saveur, et cette dernière se forme à un rôle important dans la détérioration des aliments, où le résultat de cette la suite de composés volatils. L'oxydation affecte également la couleur de l'aliment et cela est dû à l'oxydation des pigments qu'ils soient liposolubles ou hydrosolubles et on peut voir ce cas sur une miché de pain (Prior, 2003).



**Figure 8.** Peroxydation lipidique (Nosel, 2013).

C) **Oxydation de l'ADN:** L'ADN est une molécule sensible à l'oxydation par les ERO suite à une abstraction d'hydrogène initiale méditée par le  $\text{OH}\cdot$  et une modification des purines ou pyrimidines et une fragmentation (**Adjadj, 2016**). Les bases qui composent l'ADN sont très sensibles à l'oxydation, et particulièrement la guanine. Il existe cinq catégories principales de dommages causés par  $\text{OH}\cdot$  à l'ADN : les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténares, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines (**Cadet *et al.*, 2002; Myardin, 2018**). Au final, l'oxydation de l'ADN conduit à des mutations qui peuvent provoquer des maladies graves telles que le cancer (**Figure 9**) (**Favier, 2003**).



**Figure 9.** Addition de  $\text{HO}\cdot$  sur la guanine (**Myardin, 2018**).

## I.2. Les antioxydants

### I.2.1. Définition

Les antioxydants sont des composés chimiques qui, lorsqu'ils sont présents à de très faibles concentrations dans les aliments et dans le corps humain, réduisent ou empêchent le processus d'oxydation qui conduit à la détérioration des aliments et à la propagation de maladies dégénératives dans le corps (**Shahidi et Zhong, 2015**). Ce processus s'effectue en bloquant la synthèse des radicaux libres en les inhibant au début de la réaction ou en désactivant directement les ERO (**Desmier, 2016**).

### I.2.2. Rôle et effets des antioxydants

Les effets des antioxydants dépendent de plusieurs facteurs dont les plus importants sont les propriétés structurales, la température, les propriétés du substrat soumis à l'oxydation, la concentration et l'état physique du système (**Shahidi et Zhong, 2011**). En plus de la cinétique de la réaction, qui est le facteur le plus important qui interfère dans leur rôle protecteur (**Antolovitch *et al.*, 2002**). Parmi les principaux effets des antioxydants, leur impact positif sur la conservation

des aliments, les industries alimentaires et pharmaceutiques, et leur utilisation en cosmétique pour favoriser une meilleure promotion, en plus d'éviter l'oxydation (**Espin *et al.*, 2007**).

#### **A) Rôle des antioxydants dans les industries alimentaires**

Les antioxydants sont utilisés dans l'industrie alimentaire comme additifs alimentaires pour conserver l'apparence des denrées alimentaires et prolonger leur durée de conservation. De plus, ils préviennent les calories en les ajoutant à l'alimentation ou en complément (**Réblová, 2012; Anbudhasan *et al.*, 2014**).

#### **B) Rôle des antioxydants dans le domaine industriel**

Les antioxydants sont utilisés dans les produits industriels comme stabilisants (carburants et lubrifiants) et inhibiteurs de la dégradation oxydative des polymères (caoutchoucs et adhésifs). De plus, ils améliorent la stabilité des agents thérapeutiques et des produits chimiques susceptibles de se décomposer en raison de l'oxydation (**Arshiya, 2013; Shebis *et al.*, 2013**).

#### **C) Rôle des antioxydants dans le domaine médical**

Les antioxydants jouent un rôle important dans le traitement de diverses maladies dégénératives et des déséquilibres du stress oxydatif, et les composés phénoliques sont les antioxydants les plus importants impliqués. Ils sont également utilisés dans les industries des cosmétiques et des compléments alimentaires (**Rojas et Ca, 2013**).

### **I.2.3. Types des antioxydants**

Les antioxydants sont divisés selon leur nature chimique dans les aliments aux antioxydants naturels qui sont naturellement présents dans les plantes, les micro-organismes, les champignons et les tissus (**Pelliet Lyly, 2003**). Selon son mécanisme d'action et le temps de son intervention en antioxydants de prévention, de scavenger et de novo et de réparation.

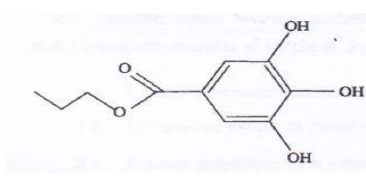
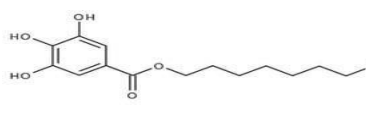
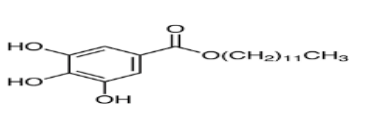
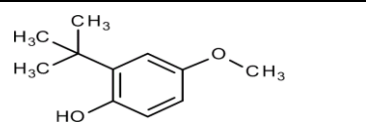
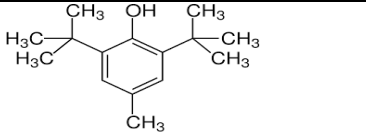
#### **I.2.3.1. Suivant la nature chimique dans les aliments**

**A) Les antioxydants naturels :** Les antioxydants naturels sont des substances qui préviennent les effets nocifs des ERO en les bloquant ou en les inhibant et font généralement partie de l'alimentation (**Olugbami *et al.*, 2014**).

**B) Les antioxydants synthétiques:** Ils sont fabriqués chimiquement, efficaces et pas cher par rapport aux antioxydants naturels, ils sont donc largement utilisés et interfèrent dans toutes les

formulations contenant des graisses insaturées. Actuellement, les antioxydants synthétiques les plus importants autorisés pour une utilisation dans les aliments sont le butylhydroxytoluène (BHT), le butylhydroxyanisole (BHA), le gallate de propyle (PG), le gallate de dodécyle (DG) et butylhydroquinone tertiaire (TBHQ) (Tableau 2) (Shahidi, 1992; Maamri, 2008; Bouhadjra, 2011).

**Tableau 2.** Structures de quelques antioxydants synthétiques (Maamri, 2008).

Nom	Structure chimique
Gallate de propyle (E310)	
Gallate d'octyle (E311)	
Gallate de dodécyle (E312)	
Butylhydroxyanisole ou BHA	
Butylhydroxytoluène ou BHT	

### I.2.3.2. Par rapport à leur mécanisme d'action

**A) Antioxydants de prévention :** C'est la première ligne de défense qui élimine la formation radicaux libres. Le produit de la décomposition des minéraux devrait être les hydroperoxydes et le peroxyde d'hydrogène, bien que le mécanisme et l'emplacement de la formation de radicaux dans le corps n'aient pas encore été déterminés (Lobo *et al.*, 2010).

**B) Antioxydants de Scavenger:** C'est la deuxième ligne de défense constituée d'antioxydants endogènes anti- radicalaires, dont certains sont hydrophiles (vitamine E, acide urique, albumine,

thiols et bilirubine) et l'autre est lipophile (ubiquinol, vitamine E qui est la plus antioxydant puissant pour lipophil anti-radicalaire). Cette ligne élimine les radicaux actifs (**Lobo et al, 2010**). Ils éliminent les radicaux libres en donnant un ou plusieurs électrons aux espèces réactives. Cette réaction se traduit par la transformation du piègeur en radical, même s'il n'interagit pas (**Kohen et Nyska, 2002**).

**C) Antioxydants de novo et réparation:** La troisième ligne de défense est une novo et réparation qui reconnaît les enzymes, les protéines et les peptides présents dans la mitochondrie et le cytosol, les dégrade et élimine les oxydants, ainsi que la modification des protéines et la prévention de leur accumulation (**Lobo et al., 2010**). La quatrième ligne de défense est représentée par la fonction adaptative par laquelle des antioxydants appropriés sont produits, à un moment approprié, à des concentrations appropriées et donc placés à l'endroit approprié (**Niki, 2010**).

#### I.2.4. Antioxydants et système de défense

À la suite des changements causés par la production excessive d'espèces réactives de l'oxygène, les organismes vivants ont développé des mécanismes pour sa prévention qui dépendent de composants endogènes et exogènes et forment ainsi un système enzymatique et non enzymatique complexe (**Puppel et Kuczy, 2016**).

##### I.2.4.1. Antioxydants enzymatiques

Il se compose d'enzymes produites par l'organisme à l'alimentation (endogènes) situées dans le cytoplasme, les mitochondries et le milieu extracellulaire, dont les plus importantes sont : Catalase (CAT), Superoxyde dismutase (SOD), Glutathione reductase (GPx) (**Baba et McGrath, 2008**).

##### A) Superoxyde dismutase (SOD)

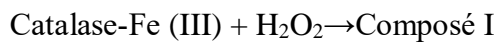
Ce sont des enzymes métalliques clés qui régulent les processus oxydatifs dans les cellules, qui accélèrent le processus de dismutation en convertissant le superoxyde anion en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et en oxygène moléculaire. Ces enzymes sont un substrat pour les deux autres enzymes endogènes (CAT et GPx) (**Figure 10**)



Quatre enzymes de la SOD ont été identifiées : SOD1 et SOD 3 qui se lient aux ions cuivre et zinc, mais SOD1 est traduite dans le cytosol et SOD3 sont extracellulaires. Le SOD2 se lie aux ions magnésium et fer et est traduite dans les mitochondries. Et enfin, la SOD4 est apparentée au nickel et est présente dans diverses bactéries aérobies dans le sol de Streptomyète (Aguilar *et al.*, 2016; Munteanu et Apeterei, 2021).

### B) Catalase (CAT)

C'est une enzyme antioxydant tétranucléaire, il y a une activité élevée dans le foie et les globules rouges, distribué dans tous les tissus animaux. Qui neutralise les radicaux libres de superoxyde en convertissant le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène avec du fer comme cofacteur en deux étapes (Rupeshkumar *et al.*, 2012; Aguilar *et al.*, 2016):



### C) Glutathion peroxydase (GPx)

C'est une enzyme antioxydant dans le plasma, le cytosol et les fluides extracellulaires, constituée de sélénium. Il catalyse la réduction de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et hydroperoxydes organiques à l'eau ou aux alcools. Le fonctionnement de GPx dépend de la disponibilité de le glutathion réduit (GSH) agit comme un donneur d'électrons efficace Lorsque les groupes thiol libres sont oxydés en liaisons disulfure, NDPH et GR. Ainsi, le système antioxydant endogène travaille de manière interconnecté (Figure 10) (Dröge, 2002; Sayre *et al.*, 2005).

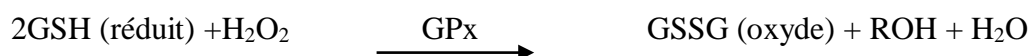
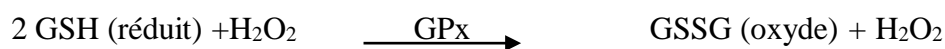




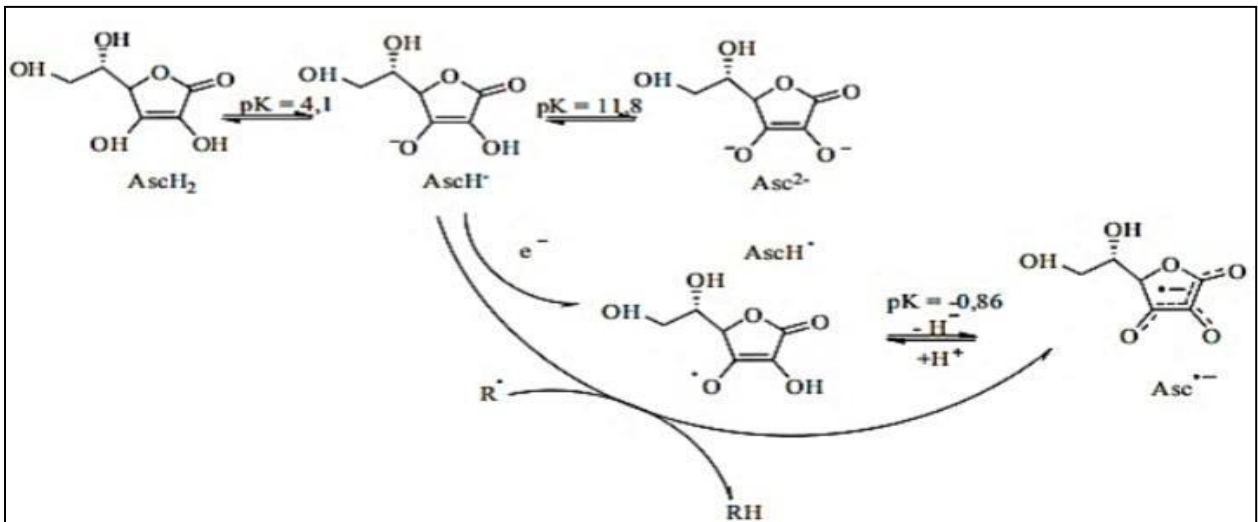
Figure 10. Défenses antioxydantes enzymatiques (Halliwell *et al.*, 2007).

#### I.2.4.2. Antioxydants non enzymatique

Il représente la deuxième ligne de défense et est présenté aux organismes vivants par l'alimentation (Bielecka *et al.*, 20221; Karasahim *et al.*, 2021; Puppel *et al.*, 2021).

##### A) Acide ascorbique (vitamine C)

La vitamine C appelée aussi l'acide ascorbique est l'un des antioxydants hydrosolubles, il n'est pas fabriqué par l'organisme, on le trouve principalement dans les légumes et les fruits. Il neutralise les ERO en phase pré-aqueuse lipidique au début de chaque oxydation. Ses propriétés antioxydantes proviennent de sa forme ionisée abondante ( $AscH^-$ ) qui produit le radical ascorbate de tricarbonyle ( $AscH^{\cdot}$ ) stable en résonance par sa réaction avec les radicaux. La forme radicalaire n'ayant pas réagi est faiblement protonée en raison du faible niveau de PK (Figure 11) (Rezaire, 2012; Ortega *et al.*, 2014).



**Figure 11.** Différentes structures chimiques de la vitamine C et réaction avec les radicaux (Rezaire, 2012).

## B) Vitamine E

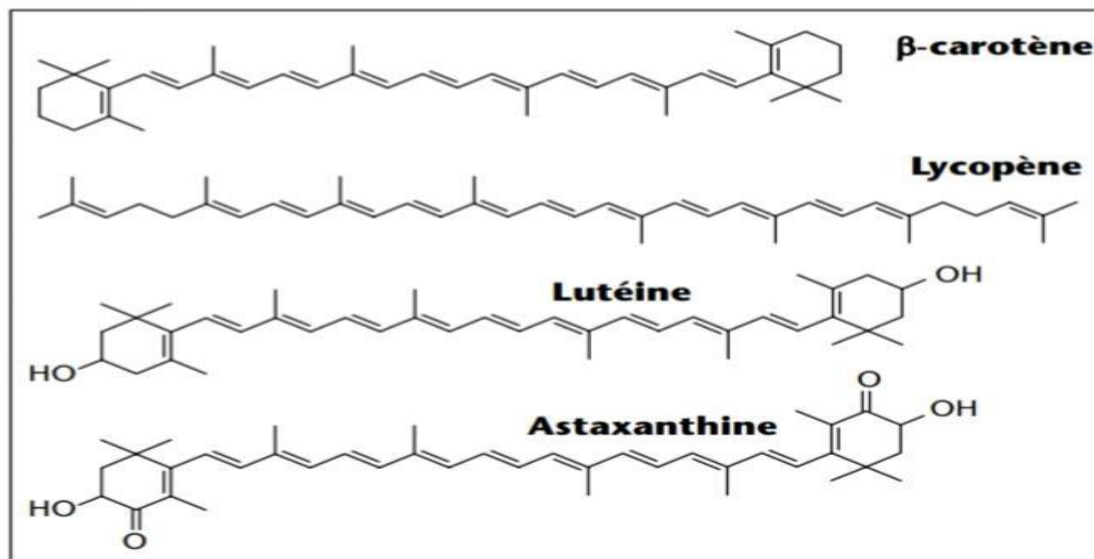
C'est un important antioxydant liposoluble représentant le groupe des huit liés aux les tocophérols et les tocotriénols. Il protège les acides gras membranaires du peroxyde lipidique car c'est l'antioxydant le plus efficace pour briser les chaînes membranaires cellulaires ou réduire son activité par d'autres antioxydants comme l'ubiquinol, le rétinol et l'ascorbate (Lobo *et al.*, 2010; Ortega *et al.*, 2014).

## C) Les oligoéléments

Ce sont des cofacteurs disponibles en très faible quantité qui n'agissent pas directement contre les ERO mais sont nécessaires à l'activité d'enzymes comme : la SOD qui nécessite du cuivre et du zinc pour son action. Principalement lié au magnésium, au zinc, au sélénium, au cuivre (Paster, 2005; Desmier, 2016).

## D) Caroténoïdes

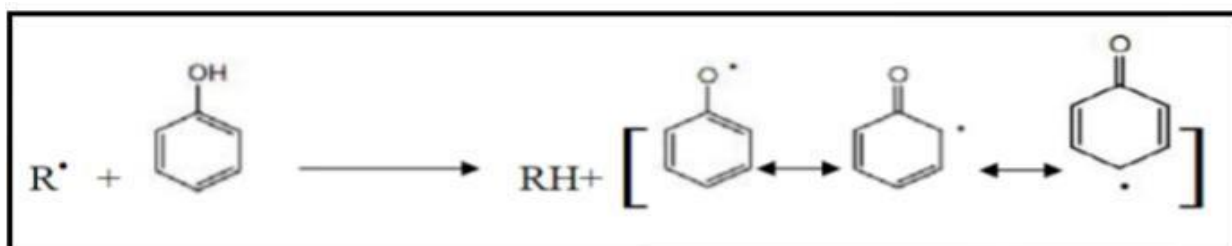
Aussi appelés xanthophylles, ce sont des pigments communs orange, rouge et jaune. Ils sont des groupes fonctionnels contenant de l'oxygène et un nombre différent d'atomes d'hydrogène (Figure 12). Ses structures peuvent être tournées. Les caroténoïdes les plus courants sont : le bêta-carotène, la lycopène et l'alpha-carotène, tandis que les xanthophylles comprennent : la zéaxanthine, la lutéine, la cryptoxanthine, la canthaxanthine, l'astaxanthine et la fucoxanthine (Chandrasekara et Shahidi, 2018).



**Figure 12.** Structure chimique des principaux caroténoïdes antioxydants (**Laguerre et al., 2007**).

### E) Les polyphénols

Les polyphénols sont des sous-produits qui possèdent des propriétés antioxydantes qui diffèrent selon les structures chimiques, où la localisation et le degré d'hydroxyle jouent un rôle important dans l'activité antioxydante des polyphénols, en plus du groupement catéchol (noyau aromatique portant deux fonctions hydroxyles) qui représente le polyphénol porteur (**Figure 13**) (**Seggani et Boukehil, 2017**). Dont les plus importants les flavonoïdes, distribués notamment dans le règne végétal. Les flavonoïdes régulent le processus de stress oxydatif en inhibant l'action de certaines enzymes responsables de la production de ERO ou en saisissant directement les espèces réactives de l'oxygène en éliminant un métal des métaux de transition, empêchant ainsi la réaction de Fenton (**Trabsa, 2011; Klibet, 2016**).



**Figure 13.** Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques (**Nkhili, 2009**).

Le **tableau 3** présente les principaux antioxydants non enzymatiques majeurs présents dans les aliments, ainsi que l'importance d'une alimentation riche en légumes et fruits pour maintenir l'équilibre cellulaire entre les ERO et les antioxydants (**Kochelin-Ramonatxo, 2006**).

**Tableau 3.** Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées (**Mohammed, 2013**).

Principaux nutriments Antioxydants	Sources alimentaires
Vitamine E	Huile : Tournesol, soja, maïs, beurre, œufs, noix.
$\beta$ -carotène	Légumes et fruits.
Vitamine C	Agrume, melon, brocoli, fraise, kiwi, chou, poivron.
Acides phénoliques	Céréales complètes, baies, cerises.
Flavonoïdes	Fruits, légumes, thé vert.
Tannins	Lentilles, thé, raisins.
Sélénium	Poisson, œufs, viandes, céréales, volaille.
Zinc	Viande, pain complet, légumes verts, huîtres, produits laitiers.
Métabolisme de la cystéine, glutathion	Caséine, Lactalbumine (petit-lait), produits laitiers Brocoli ,chou Œufs, poissons, viandes.

### I.2.5. Quelques aliments riches en antioxydants et leurs bienfaits

L'alimentation est un terreau fertile géant qui a été découvert pour les antioxydants, notamment les légumes et les fruits. Parmi ces aliments : citron, orange, kiwi, fraise, huile de tournesol, œufs, beurre, viande, pain complet, thé...etc. Grâce à des études, ils ont trouvé plus de 20 plantes riches en antioxydants (**Tableau 4**) (**Wu et al.,2004; Guggenbuhl, 2016**).

**Tableau 4.** Les "top 20" des végétaux riches en antioxydants (activité antioxydant par portion, exprimée en micromoles de Trolox équivalents) (Wu *et al.*, 2004).

Les végétaux riches en antioxydants	L'activité antioxydant par portion (micromoles de Trolox équivalents)
Petits haricots rouges (secs)	13727
Myrtilles sauvages	13427
Haricot rouge (sec)	13259
Haricot Pinto	11864
Myrtilles cultivées	9019
Cranberry	8983
Artichaut (cuit)	7904
Mure	7701
Pruneau	7291
Framboise	6058
Fraise	5938
Pomme	5900
Pomme	5381
Noix de pécan	5095
Cerise	4873
Prune noire	4844
Pomme de terre (cuite)	4649
Haricot noir (sec)	4181
Prune	4118
Pomme " Gala"	3903

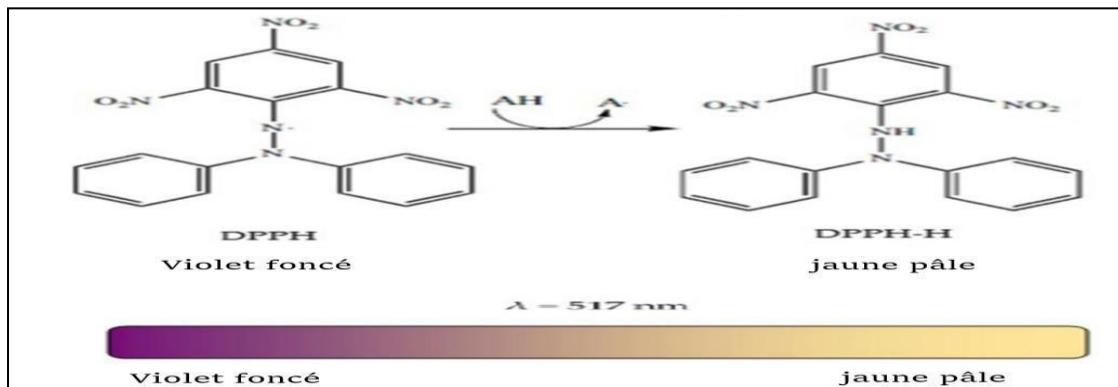
## Chapitre II

# Les méthodes de détermination de la capacité antioxydants dans les aliments

Ces derniers temps, les méthodes de mesure des antioxydants ont fait des progrès remarquables. Les antioxydants ont été utilisés pour neutraliser certains types de produits d'oxydation (activité de piégeage contre les ERO et divers types de radicaux libres). Parmi ces mesures qui utilisent la mesure directe pour transférer des électrons ou transférer un atome d'hydrogène d'antigènes vers des radicaux libres. Les méthodes de mesure des antioxydants sont divisées en méthodes spectroscopiques, électrochimiques et chromatographique (Prior *et al.*, 2005; Shahidi et Zhong, 2015).

### II.1. Test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle)

La méthode de DPPH° est une méthode spectrophotométrique qui a la capacité d'éliminer les radicaux libres. Il a été décrit pour la première fois par Blois en 1958 puis modifié par plusieurs chercheurs (Pereira *et al.*, 2012; Ritter et Budge, 2012). Le DPPH° (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle) est un radical libre, stable, de couleur violette (Figure 14), sensible au pH, à la lumière, à l'oxygène et à la nature du solvant utilisé, il réagit avec des composés pouvant donner un atome d'hydrogène (Schever et Godoy, 2009). Cette méthode est basée sur le principe que le DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle) réagit avec une substance qui produit un atome d'hydrogène (un antioxydant par exemple) pour donner une forme réduite de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) et la couleur violette vire au jaune, signifiant une diminution de l'absorbance mesurée à 517 nm (Figure 14) (Flieger *et al.*, 2021).



**Figure 14.** Mécanismes (principe) de piégeage du DPPH par un antioxydant (AH) (Munteanu et Apetrei, 2021).

### II.1.1. Mode opératoire

**A) Préparation de la solution DPPH:** Il s'agit de dissoudre 7,89 mg de DPPH dans du méthanol à 99,5 % jusqu'à obtenir 100 mL du volume d'une fiole jugée bien fermée (0,2mM de DPPH) après mélange. Ensuite, le mélange est incubé dans l'obscurité pendant deux heures et stocké à température ambiante dans l'obscurité (Çetinus *et al.*, 2007; Shimamura *et al.*, 2014).

**B) Procédure de test DPPH :** Dans un tube à essai, des volumes de 200 µL de la solution d'échantillon, 800 µL de solution tampon Tris -HCl 0,1M (pH=7,4) et 1mL de la solution de DPPH préalablement préparée sont versés. Un autre tube est ajouté comme témoin dans lequel sont versés 1,2 mL de méthanol (ou d'éthanol selon l'alcool utilisé) et 800 µL de Tris-HCl. Les tubes sont mélangés avec un agitateur pendant 10 Sec et laissés dans l'obscurité pendant 30 min à température ambiante. Après incubation, l'absorbance est mesurée à 517 nm

(Shimamura *et al.*, 2014).

### II.1.2. Expression des résultats

#### A) Calcul des pourcentages d'inhibitions

Le pourcentage d'inhibition (I%) du radical libre DPPH est calculé selon l'équation suivante (Toure, 2015; Flieger *et al.*, 2021):

$$I(\%) = (A_0 - A) / A_0 \times 100$$

Avec:

**I(%):** Pourcentage d'inhibition.

**A<sub>0</sub> :** Absorbance de la réaction de contrôle contenant tous les réactifs sauf l'huile (T= 0 min).

**A:** Absorbance de l'échantillon contenant une dose d'échantillon testée (T= 30 min).

#### B) Calcul des concentrations efficaces (IC<sub>50</sub>)

La valeur de la concentration inhibitrice IC<sub>50</sub> représente la dose de l'extrait qui cause la neutralisation de 50 % des radicaux de DPPH. L'IC<sub>50</sub>, utilisée comme une estimation de l'activité antioxydante par DPPH, les pourcentages d'inhibition (Y) en fonction de concentrations d'échantillons (X), une courbe légèrement courbée est obtenue dont l'équation est  $Y = ax + b$ .

L'IC<sub>50</sub> est calculée en choisissant deux points avec une inhibition de 50 % pour calculer X (concentration de l'échantillon) en remplaçant Y par 50 dans l'équation de régression (Torres *et al.*, 2006; Djenidi, 2020).

### C) Calcul de l'activité anti radicalaire (APR)

L'APR est inversement proportionnelle à EC<sub>50</sub>(EC<sub>50</sub> est l'IC<sub>50</sub> par équivalent gramme de DPPH) (Houda et Soraya, 2017):

$$APR = 1/ EC_{50}$$

### D) Calcul de la capacité antioxydant équivalent Trolox

L'activité de piégeage des radicaux DPPH de l'échantillon est exprimée par la capacité antioxydant équivalente Trolox (TEAC) et calculée comme suit :

$$TEAC = IC_{50} \text{ de Trolox } (\mu\text{g/L}) / IC_{50} \text{ d'échantillon } (\mu\text{g/L})$$

### II.1.3. Avantages et inconvénients du test DPPH

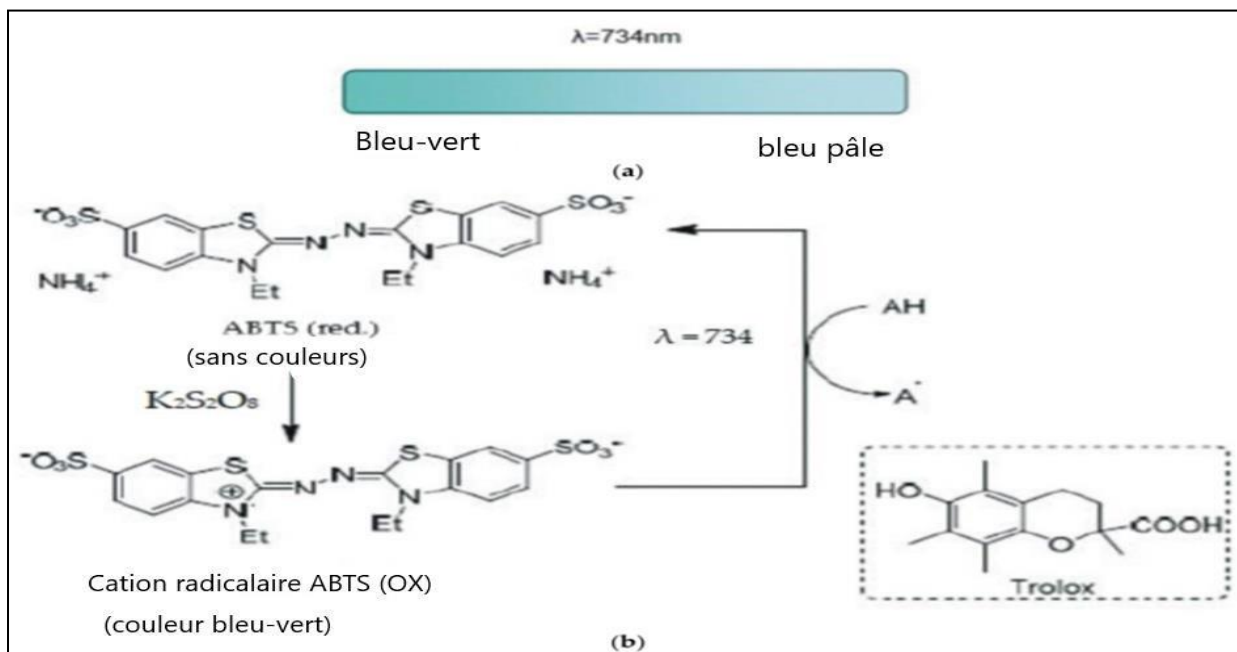
Le test DPPH présente de nombreux avantages et inconvénients qui l'affectent, résumés dans le **tableau 5**.

**Tableau 5.** Les avantages et les inconvénients de DPPH (Bibi Sadeer *et al.*, 2020).

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Simple, rapide, pas cher et très sensible.</li> <li>-Ses résultats reproductibles peuvent être comparés à d'autres méthodes de piégeage des radicaux.</li> <li>-Détermine la quantité d'antioxydants dans les systèmes biologiques complexes.</li> <li>-Efficace pour les composés thermiquement instables.</li> <li>-Le temps de réaction de piégeage des radicaux est de 30 minutes, ce qui permet au DPPH d'interagir avec les antioxydants les plus faibles.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Sensible aux règles de Lewis.</li> <li>-Nécessite l'obscurité (en cas d'exposition à la lumière, l'absorption du DPPH diminue).</li> <li>-Réagit avec les autres radicaux présents dans les échantillons analysés.</li> <li>-Les chromogènes radicalaires DPPH ne sont solubles que dans les composés organiques (lipophiles).</li> </ul>

## II.2. Test ABTS/TEAC (Acide 2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)/Capacité antioxydante équivalente au Trolox)

La méthode ABTS<sup>+</sup> (2,2-azino-bis(3-éthylbenz-thiazoline-6-sulfonic acide)), également connue sous le nom de capacité antioxydante équivalente TROLOX (TEAC), a été développée par Miller en 1993 (Echegaray *et al.*, 2021). Il s'agit d'une méthode spectrophotométrique utilisée pour mesurer la capacité antioxydant totale (TAC), il est basé sur l'oxydation de l'ABTS par dioxyde de manganèse ou persulfate de potassium. Les antioxydants neutralisent le radical stable d'ABTS (l'acide 2,20-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS<sup>+</sup>), il est de couleur bleu-verte en perdant un électron par l'atome d'azote ABTS, dont l'absorption maximale est estimée à 743nm (Figure 15). En présence de Trolox, l'atome d'azote éteint l'atome d'hydrogène, entraînant une décoloration de la solution et une diminution de l'absorbance dans 743 nm. Ce test dépend de l'activité des antioxydants, de leur concentration et de la durée de la réaction (Marc *et al.*, 2004; Jabri, 2018; Munteneau et Apetrei, 2021).



**Figure 15.** (a) Variation de couleur dans le test ABTS; (b) Schéma réactionnel impliqué dans le dosage de l'activité de piégeage des cations radicaux acides (ABTS) (Munteneau et Apetrei, 2021).

### II.2.1. Mode opératoire

**A) Préparation de la solution mère 1:** Une quantité d'ABTS (96,02 mg) est dissoute dans une solution d'acide acétique (pH 4,5). Ensuite, 25 mL sont dilués pour que la quantité de solution d'ABTS devienne égale à 7 mmol/l. Le mélange est maintenu à une température comprise entre 0 et 4°C dans l'obscurité.

**B) Préparation de la solution mère 2:** Une quantité de 66,24 mg de persulfate de potassium ( $K_2S_2O_8$ ) est dissoute dans une solution tamponnée d'acide acétique (pH = 4,5). La solution est ensuite diluée à 100 mL jusqu'à ce que la concentration en  $K_2S_2O_8$  soit égale à 2,45 mmol/L et conservée à l'obscurité à une température comprise entre 0 et 4°C.

**C) Préparation de la solution ABTS:** Des volumes de 5 mL de solution mère 1 et 5 mL de solution mère 2 sont mélangés et stockés dans l'obscurité à température ambiante pendant 12-16 h pour préparer la solution de réaction ABTS. La solution réactionnelle d'ABTS est diluée de 2,80 mL à 65 mL dans une solution d'acétate (pH = 4,5), puis maintenue à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. L'absorbance est mesurée à 734 nm.

**D) Procédure de test ABTS:** Dans une plaque 96 puits, des volumes de 200  $\mu$ L de solution de ABTS et 10  $\mu$ L d'échantillon à différentes concentrations sont déposés, puis maintenus après agitation dans l'obscurité pendant 7 min. Le trolox (eau standard et de réserve) est utilisé comme solution à blanc. Dans ce test, l'échantillon doit être dilué jusqu'à ce que l'absorption soit comprise entre 0,2 et 0,8 pour tracer la courbe de mesure.

### II.2.2. Expression des résultats

#### A) Calcul de la valeur ABTS

La valeur ABTS est calculée selon la formule (Bunea *et al.*, 2013):

$$\text{ABTS value}(\mu\text{molTE/g DW}) = c \times V \times t / m$$

Avec:

C: Concentration de trolox ( $\mu$ Mol / mL) de la courbe standard correspondante de l'échantillon dilué

V: Volume d'échantillon (mL).

t: Facteur de dilution.

m: Masse de l'échantillon de matière sèche (g).

### II.2.3. Avantages et inconvénients du test ABTS

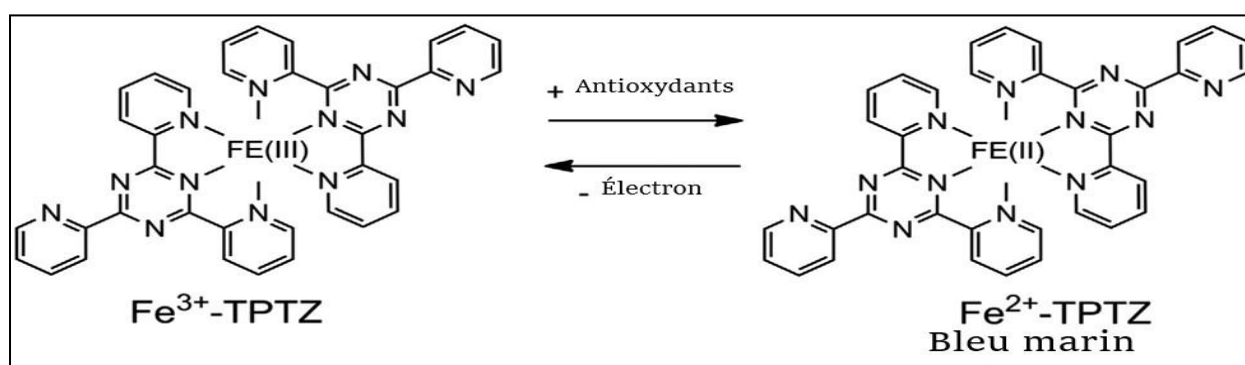
Le test ABTS présente de nombreux avantages et inconvénients qui l'affectent, résumés dans le **tableau 6**.

**Tableau 6.** Les avantages et inconvénients de test ABTS (Munteanu et Apetrei, 2021).

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Pas cher et simple.</li> <li>-Soluble dans les solvants hydrophile et lipophile.</li> <li>-Utilisé dans une large gamme de pH</li> <li>-Peut identifier une grande variété d'antioxydants.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Manque de signification biologique.</li> <li>-Temps de réaction long.</li> </ul>

### II.3. Test FRAP

Ce test mesure la réduction du fer ferrique  $Fe^{3+}$  et du 2,3,5- chlorure de triphényl-1,3,4-triaza-azoniacyclopenta-1,4-diène (complexe incolore) au complexe ferreux  $Fe^{2+}$  (bleu foncé) (**Figure 16**) par des antioxydants dans un milieu acides (pH 3,6). L'absorption est mesurée à 593nm (Haida et Hakiman, 2019; Prabhu *et al.*, 2020).



**Figure 16.** Formation du complexe ( $Fe^{2+}$ -TPTZ) à partir du complexe ( $Fe^{3+}$ -TPTZ) par les antioxydants (Haida et Hakiman, 2019).

### II.3.1. Mode opératoire

**A) Préparation de solutions :** La méthode commence par la préparation du réactif en premier, en mélangeant le tampon acétate (300 Mm) et 10 mL de TPTZ dans le HCl (40 Mm) et le  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (20 mM) à 37°C (**Prabhu et al., 2020**).

### II.3.2. Expression des résultats

#### A) Calcul de la valeur FRAP

Selon **Prabhu et al., (2020)**, la valeur du test de FRAP est calculée par la relation suivante :

$$(\mu\text{mol TE/g DW}) = c \times v \times t/m$$

Dont :

c : Concentration de Trolox ( $\mu\text{mol/ml}$ ) de la courbe standard de l'échantillon dilué .

v : Volume de l'échantillon (ml).

t : Facteur de dilution .

m: Poids de la matière sèche de l'échantillon (g) .

### II.3.3. Avantages et inconvénients du test FRAP

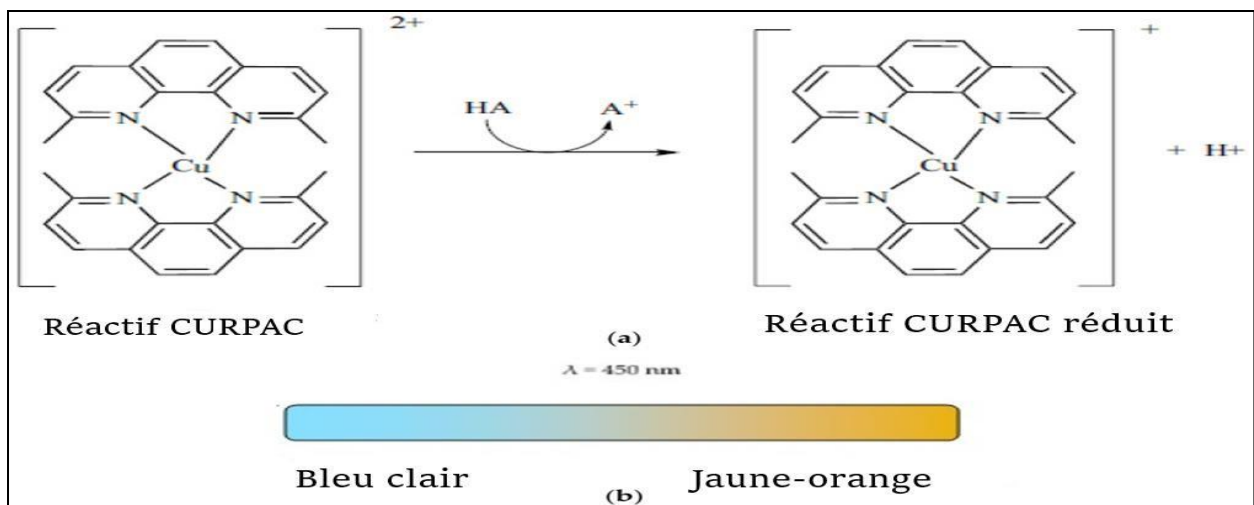
Le **tableau 7** résume les avantages et les inconvénients du test FRAP.

**Tableau 7.** Les avantages et les inconvénients de test FRAP (**Bibi Sadeer et al., 2020**).

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Simple , sensible et peu coûteux .</li> <li>-Hautement reproductible .</li> <li>-Peut dépister un large éventail d'échantillons biologiques y compris le plasma, le sang, le sérum, la salive, les larmes, l'urine...etc.</li> <li>- Bonne corrélation avec le dosage de piégeage de <math>\text{H}_2\text{O}_2</math>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Non spécifique .</li> </ul>

## II.4. Test CUPRAC (Pouvoir antioxydant réducteur cuivrique)

Le test CUPRAC est un test colorimétrique repose sur la réduction du cuivrique ( $\text{Cu}^{2+}$ ) en cuivreux ( $\text{Cu}^+$ ) qu'il est intensément coloré en jaune-orange (**Figure 17**), par l'action de antioxydants donneurs d'électrons. La néocuproïne (Nc; 2,9-diméthyl-1, 10-phénanthroline) est le ligand couramment utilisé dans le test CUPRAC. Ce test peut être appliqué à de nombreuses matrices contenant des antioxydants lipophiles et hydrophiles. Les réactions CUPRAC sont terminées en 30 minutes et l'absorption est ensuite mesurée à 450 nm (**Figure 17**) (**Apak *et al.*, 2004; Munteanu et Apetrei, 2021**).



**Figure 17.** Réaction inclus dans le dosage antioxydant au pouvoir antioxydant du cuivre (CUPRAC) ,(a): Formation du ( $\text{Cu}^+$ ) à partir de ( $\text{Cu}^{2+}$ ) ,(b) :le changement de couleur dans le test (**Munteanu et Apetrei, 2021**).

### II.4.1. Mode opératoire

**A) Préparation des solutions:** La solution CUPRAC doit être fraîchement préparée avant chaque expérience, en préparant une solution de chlorure de cuivre avec une concentration de  $10^{-2} \text{ mol/L}$ , une quantité de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  est dissous dans l'eau puis dilué avec 250 mL d'eau. Un tampon acétate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ ) à pH 7,0 est préparé en dissolvant 19,27 g de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  dans de l'eau et après dilué à 250 mL. Le NC est dissous et dilué à 25 mL avec de l'éthanol pour préparer une solution de néocuproïne à une concentration de  $7,5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ . Ces solutions préparées sont mélangées à un volume de 1mL pour préparer le réactif CUPRAC, qui est de couleur jaune pâle (**Haque et Canete, 2018**).

**B) Procédure de test CUPRAC:** Pour établir des courbes de titrage standard, qui représentent l'absorbance en fonction de la concentration, 1 ml de chaque solution est prélevé des solutions préalablement préparées (chlorure de cuivre(II), solution de néocuprone et  $\text{NH}_4\text{Ac}$ ) et placé dans un tube à essai, puis un échantillon à tester et  $\text{H}_2\text{O}$  sont ajouté jusqu'à ce que la solution dans le tube à essai devienne 4 mL . Après incubation pendant 1 heure, l'absorbance d'une solution à blanc est mesurée à 450 nm( **Trofin *et al.*, 2019**).

#### II.4.2. Avantages et inconvénients du test CUPRAC

Les avantages et les inconvénients du test CURPAC sont résumés dans le **tableau 8**.

**Tableau 8.** Les avantages et les inconvénients de test CURPAC (**Apak *et al.*, 2005**; **Bibi Sadeer *et al.*, 2020**).

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Les réactifs utilisés sont pas cher , disponibles et stables.</li> <li>-Développement rapide des couleurs.</li> <li>- Il peut détecter les AO de type glutathion et thiol contrairement au FRAP.</li> <li>- Appareils simples et pas équipement de haute technologie.</li> <li>-Peut cribler des échantillons lipophiles et hydrophiles.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Il ne peut pas mesurer les enzymes antioxydants.</li> <li>- Temps de mesure plus long.</li> <li>-Ne convient pas pour combiner avec TPC, ABTS, FRAP, ou dosages DPPH.</li> </ul>

#### II.5.Test PFRAP (Méthode du pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium )

L'antioxydant a une capacité réductrice à convertir le ferricyanure de potassium ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) en potassium ferrocyanure ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ). De plus, il génère un complexe de ferrocyanure ferrique, un bleu de Prusse intense en réagissant avec le trichlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ), et montre le maximum d'absorbance à 700 nm (**Figure 18**) ( **Guglani *et al.*, 2020**).

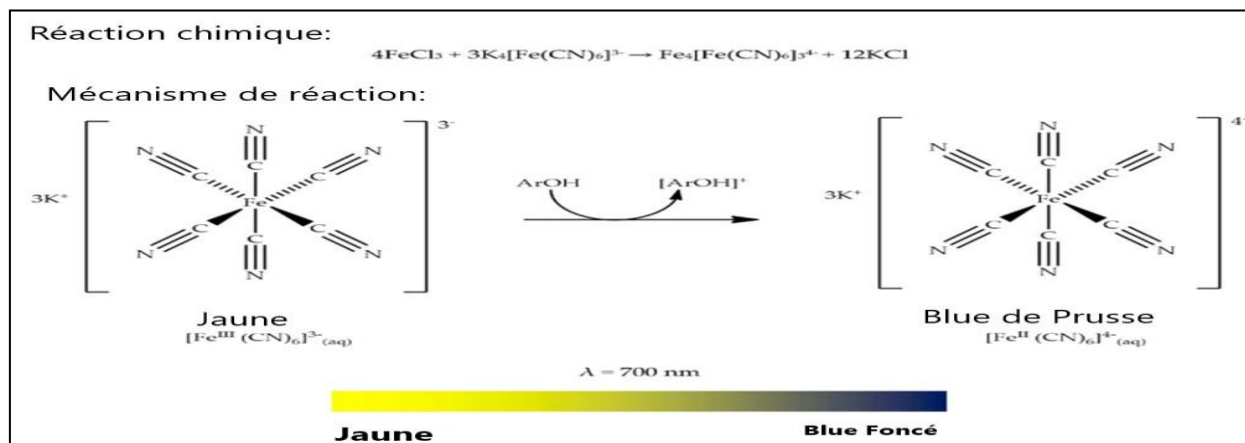


Figure 18. Mécanisme de réaction du ferricyanure de potassium (Bibi Sadeer *et al.*, 2020).

### II.5.1. Mode opératoire

**A) Procédure de test PFRAP:** Différentes aliquotes d'échantillons sont prélevées et mélangées avec 0,5 mL de tampon de phosphate à pH = 6,6 et 0,5 mL d'une solution à 1 % de ferricyanure de potassium ( $K_3Fe(CN)_6$ ), le tout est incubé pendant 20 minutes à 50°C. A la fin de la période d'incubation, 1,5 mL de solution d'acide trichloracétique à 10 % sont ajoutés dans chaque tube. Ensuite, 4 mL d'eau distillée et 0,5 mL de solution de chlorure ferrique à 0,1% sont ajoutés. L'absorbance est mesurée à 700 nm (Ferreira, 2005).

### II.5.2. Avantages et inconvénients du test PFRAP

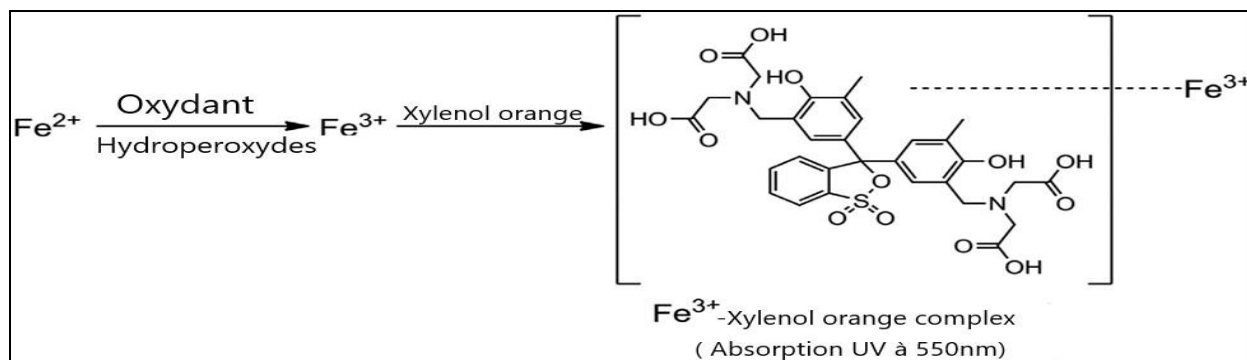
Les avantages et des inconvénients du test PFRAP sont résumés dans le **tableau 9**.

Tableau 9. Les avantages et les inconvénients de test PFRAP (Bibi Sadeer *et al.*, 2020).

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Simple, pas cher et fiable.</li> <li>-Interférence potentielle du mélange réactionnel est minimisé.</li> <li>-Equipement simples et pas de haute technologie .</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nécessite une centrifugation si les échantillons sont très actifs.</li> <li>- Prendre plus de temps et d'efforts .</li> <li>- Si les échantillons contiennent un niveau élevé de protéines, la précipitation avec de l'acide trichloracétique peut être difficile.</li> </ul>

## II.6. Test FOX

Le principe du test FOX est l'oxydation des ions ferreux pour former des ions ferriques, qui sont ensuite traités avec du xylénol orange (XO) pour donner un complexe ferrique-XO (couleur bleu-violet) qui ont une absorbance maximale à 550 nm (**Figure 19**). Le test FOX a été développé pour déterminer les taux de lipides hydroperoxydes dans les systèmes biologiques (**Marasca et al., 2016**).



**Figure 19.** Formation d'un complexe  $Fe^{3+}$ -xylénol orange à partir de  $Fe^{2+}$  avec un oxydant suivid'un traitement au xylénol orange (**Marasca et al., 2016**).

### II.6.1. Mode opératoire

**A) Préparations des solutions de test FOX:** Le réactif FOX est préparé frais avant chaque analyse. Tout d'abord, une solution de sulfate d'ammonium est préparée en dissolvant  $25\mu M$  de d'ammonium ferreux sulfate dans  $2.5 M$  de  $H_2SO_4$ . Ensuite, une solution de xylénol orange-sorbitol est aussi préparée en dissolvant  $125\mu M$  de xylénol orange et  $100mM$  de sorbitol dans de l'eau. Après avoir préparé les deux solutions,  $1 mL$  de la solution de sulfate d'ammonium est prélevé et mélangé avec  $100 mL$  de la solution de xylénol orange-sorbitol (**Yuen et Benzie, 2003**).

**B) Procédure de test FOX :** Le test FOX se fait en par l'ajout de  $100 \mu L$  d'un échantillon à  $1 mL$  de réactif FOX dans des flacons à centrifuger de couleur ambre de  $2 mL$ , qui sont incubés à température ambiante pendant  $20 min$ . L'absorbance de chaque échantillon est mesuré à  $560 nm$  à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS par rapport à un blanc de référence (**Gupta et al., 2018**).

## II.7. Test FTC (Thiocyanateferrique)

Les mécanismes associés au FTC sont les mêmes que ceux associés au test FOX, la seule différence est que l'ion ferreux est composé d'oxydant A et l'ion ferrique est détecté comme un composé thiocyanate par un spectrophotomètre à 500 nm (Anesini *et al.*, 2008).

### II.7.1. Mode opératoire

**A) Procédure de test FTC:** Brièvement, 0,80 mL d'extraits sont mélangés avec du tampon phosphate (0,05 M) à pH 7 et de l'acide linoléique à 2,5 % dans l'éthanol pour obtenir 4 mL de solution. La solution résultante est incubée dans un bécher en verre à 38,5°C. Des Aliquotes sont retiré et une solution de FeCl<sub>2</sub>/thiocyanate d'ammonium sont ajoutés pour permettre à tous les peroxydes dus à l'oxydation de l'acide linoléique de réagir et de former un complexe. L'absorbance est mesurée à 500 nm et cette étape est répétée toutes les 24 heures jusqu'à l'obtention de l'absorbance maximale. Le tampon phosphate est utilisé comme solution à blanc (Anesini *et al.*, 2008).

### II.7.2. Expression des résultats

#### A) Calcul du pourcentage de peroxydation lipidique

Selon Anesini *et al.*, (2008), il est calculé en appliquant l'équation suivante:

$$\text{Pourcentage (\%)} = 100 - [(A_s/A_0) \times 100]$$

Où:

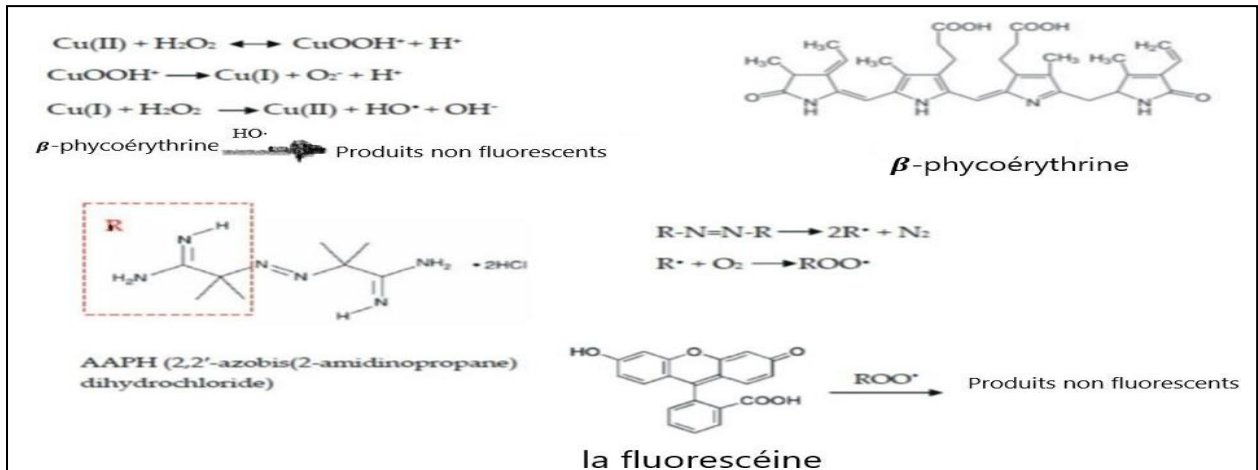
A<sub>0</sub>: Absorbance de la réaction témoin (acide linoléique seul, 100% peroxydation).

A<sub>s</sub>: Absorbance obtenue dans la présence de l'extrait d'échantillon ou contrôle positif de l'activité antioxydante (1 mg/ml d'acide ascorbique).

## II.8. Test ORAC (Capacité d'absorption des radicaux oxygène )

Ce test est basé sur les travaux de Ghiselli (1995) et développé par Cao en 1998, il mesure la capacité antioxydante par les radicaux peroxyde résultant de la décomposition thermique de l'AAPH (2,2-azobis 2-amidopropanedihydrochloride) à 37 °C. Elle est appliquée aux solutions biologiques et aux extraits de légumes et de fruits en particulier, et la fluorescéine a été utilisée comme sonde fluorescente, où la fluorescence de la fluorescéine indique l'étendue de son

interaction avec les radicaux peroxydes (**Figure 20**). L'effet protecteur des antioxydants est mesuré en évaluant l'aire sous la courbe de décroissance de la fluorescence (AUC) pour l'espace qui ne contient pas les antioxydants (Crichton *et al.*, 2002; Prior *et al.*, 2003; Thaipong *et al.*, 2006).



**Figure 20.** Schémas réactionnels impliqués dans le test ORAC (Capacité d'absorption des radicaux oxygénés) pour la détection de l'hydroxyle et les radicaux peroxydes (Muntteneau et Apetrei, 2021).

### II.8.1. Mode opératoire

**A) Préparation de la solution AAPH:** 414 mg d'AAPH sont dissous dans une solution de phosphate (pH égal à 7,4) à une concentration de 75 mmol/L, où la concentration de la solution d'AAPH est de 153 mmol/L, ensuite, la solution est diluée à 10 mL.

**B) Préparation de la solution de fluorescéine sodique:** 20 mg de fluorescéine sont dissous dans du PBS à une concentration de 75 mmol/L et dilués à 25 mL jusqu'à l'obtention de fluorescéine A liquide. Ensuite, la solution de fluorescéine A liquide est diluée à 25 mL avec une solution de tampon phosphate jusqu'à l'obtention de fluorescéine B liquide. La solution de fluorescéine avec la fluorescéine B liquide est diluée jusqu'à l'obtention d'une concentration de  $8,4 \times 10^{-8}$  mol/L.

**C) Préparation de solutions de Trolox avec différentes concentrations:** 2,5 g de réactif Trolox sont dissous dans une solution et dilués à 10 mL pour obtenir 10 mmol/L de solution mère de Trolox.

**D) Procédure de test ORAC:** un volume de 100  $\mu\text{L}$  de la solution de travail est déposé dans une plaque 96 puits et la valeur de la fluorescéine A0 est mesurée à 490 et 514 nm, puis 50  $\mu\text{L}$

de solution de travail de différentes concentrations est ajoutée pendant 3 min, puis 10 min à 37°C. Ensuite, 50 µL de d'AAPH sont ajoutés pour effectuer la réaction. La valeur de fluorescence (Fn) est enregistrée toutes les 90 s jusqu'à l'obtention d'une ligne droite et donc la fin de la réaction.

### II.8.2. Expression des résultats

#### A) Calcul de l'absorption des radicaux oxydatifs capacité

D'après **Litescu et al., (2014)**, la capacité d'adsorption radicalaire oxydative des échantillons et des étalons est calculée selon de l'équation suivante :

$$AC_{FI} = (AUC_{\text{Échantillon}} - AUC_{\text{blanc}} / AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{\text{blanc}}) C_{\text{Trolox}}$$

Dont :

$AC_{FI}$ : Représente la capacité antioxydante

$AUC_{\text{Échantillon}}$ : la surface nette sous la courbe du mélange (échantillon+AAPH+ sonde fluorescente)

$AUC_{\text{blanc}}$ : Zone nette sous le tampon de courbe vierge, AAPH, sonde fluorescente.

$AUC_{\text{Trolox}}$ : Zone nette sous la courbe de la sonde fluorescente trolox, AAPH.

$C_{\text{Trolox}}$ : Concentration molaire de Trolox.

Pour calculer les équivalents de trolox, la courbe de mesure du trolox doit être obtenue en examinant différentes concentrations de Trolox par ce test et en soustrayant l'AUC de l'échantillon de l'AUC du blanc et en obtenant ainsi une AUC nette qui représente les lectures de fond données par la fluorescence (la zone entre le courbe d'échantillon et le courbe de blanc représente le nette AUC) (**Garrett, 2011**).

$$\text{Nette AUC} = AUC_{\text{Échantillon}} - AUC_{\text{blanc}}$$

La capacité d'absorption des radicaux oxydatifs de l'échantillon est exprimée en µmol TE/g DW, et trois mesures parallèles sont conçues pour la même mesure (**Denev et al., 2014**).

### II.8.3. Avantages et inconvénients du test ORAC

Le **tableau 10** regroupent les avantages et les inconvénients du test ORAC.

**Tableau 10.** Les avantages et les inconvénients du test ORAC (Tolba, 2016; Abeyrathne *et al.*, 2021).

Avantages	Inconvénients
-Précis et sensible. -Détection des antioxydants hydrophiles et hydrophobes.	-Sensible à la température. -Légère différence de température peut se produire, réduisant ainsi la reproductibilité de méthode. -Prendre un longtemps. -S'associe facilement à d'autres composés et donne ainsi de fausses valeurs

### II.9. Test HORAC (Capacité de prévention des radicaux hydroxyles )

Le principe de ce test repose sur la mesure de l'activité chélatant les métaux d'antioxydants, dans les conditions de réactions de type Fenton. Cette méthode évalue la capacité de protection contre la formation de radical hydroxyle en utilisant le complexe Co(II) (Denev *et al.*, 2014).

#### II.9.1. Mode opératoire

**A) Préparation des solutions:** Il consiste à préparer une solution de peroxyde d'hydrogène à 0,55 mol/L en utilisant de l'eau distillée. 15 mg de  $\text{CoF}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  et 20 mg d'acide picolinique sont dissous dans 20 mL d'eau distillée pour préparer une solution de CO(II). La procédure suivie dans le test HORAC commence par l'incubation de la fluorescéine et 10  $\mu\text{L}$  d'échantillon à 37 °C pendant 10 min directement dans le lecteur de plaque. Après l'incubation, 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et 10  $\mu\text{L}$  de CO(II) sont ajoutés (Lee et Lee, 2014). La fluorescence est mesurée à 485 nm et 520 nm. Le tampon de phosphate est utilisé comme blanc, et l'acide gallique est utilisés pour établir la courbe d'étalonnage (Wasek *et al.*, 2014 ).

#### II.9.2. Avantages et inconvénients du test HORAC

Les avantages et les inconvénients du test HORAC peuvent être résumés dans le **tableau 11**.

**Tableau 11.** Les avantages et les inconvénients de test HORAC (Denev *et al.*, 2010; Echegaray *et al.*, 2021).

Avantages	Inconvénients
-Sensible . - Mesure directe de capacité antioxydant. - Outil important pour l'étude de la capacité antioxydante préventive des denrées alimentaires.	-Nécessite des techniques complexes. - Calcul indirect . - Ne peut pas être mis en œuvre dans tous les laboratoires. - Prend beaucoup de temps.

## II.10. Test TRAP (Procédure d'amplification de répétition de télomères)

Dans ce test, l'effet des radicaux libres (radical peroxy) est suivi, ou de la présence d'antioxydants sur la fluorescence générée par la molécule fluorescente, le luminol peut également être utilisé comme substance chimioluminescente. Cette méthode surveille la quantité de l'oxygène lors de la peroxydation des lipides causée par le freinage thermique de substances telles que l'ABAP ou alors AAPH. La méthode TRAP est sensible aux changements de température et de pH (Pisoschi et Negulescu, 2011; Martín *et al.*, 2017).

### II.10.1. Mode opératoire

**A) Procédure de test TRAP :** Il consiste à mélanger 1 mL d'échantillon avec 2 mL de mélange réactionnel final contenant 0,43 mg de R-phycoérythrine et 0,3 g d'AAPH (radicaux peroxy) dans 50 mmol/L de tampon de phosphate (pH 7,4). Après incubation à 37°C pendant 5 min, la fluorescence est mesurée dans une cuvette en quartz à l'émission de 565 nm et à l'excitation de 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre à fluorescence.

### II.10.2. Expression des résultats

#### A) Calcul de la valeur TRAP

La valeur de test TRAP est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{TRAP} = 2.0 [\text{Trolox}] \text{ T l'échantillon} / \text{fT Trolox}$$

Le facteur stœchiométrique du trolox est de 2,0 (le nombre de radicaux peroxy est trappée par une molécule de trolox) .Le **f** est la dilution de l'échantillon. L'activité de l'échantillon est exprimée en équivalents Trolox par extrait sec de gramme (**Denev *et al.*, 2014**).

### II.10.3. Avantages et inconvénients du test TRAP

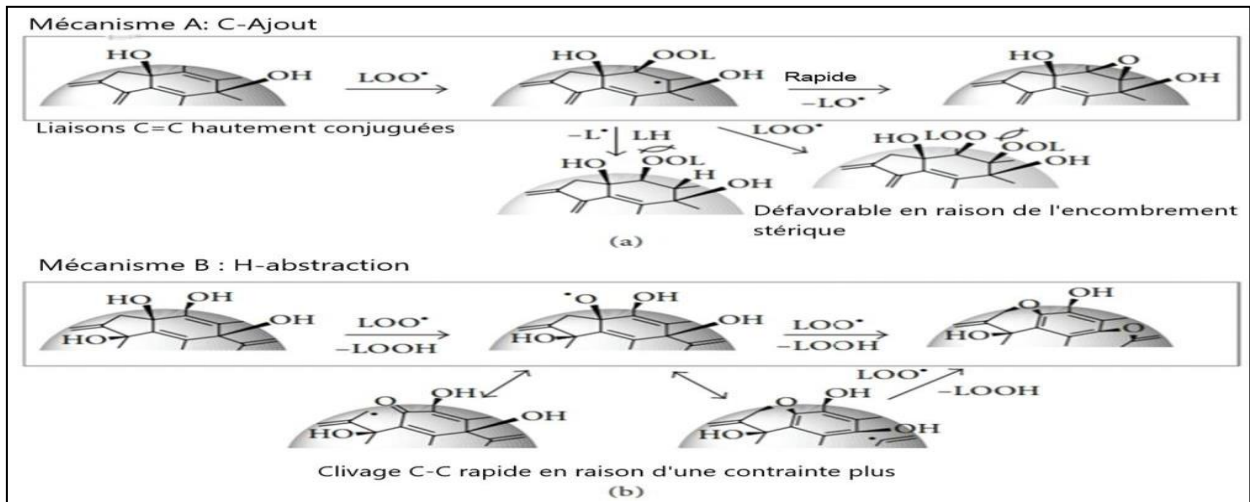
Les avantages et les inconvénients du test TRAP peuvent être résumés dans le **Tableau 12**.

**Tableau 12.** Les avantages et les inconvénients du test TRAP (**Pisoschi et Negulescu, 2011** ;**Denev *et al.*, 2010**; **Denardin *et al.*, 2015** ).

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Convient aux aliments liquides.</li> <li>- Applicable aux des échantillons biologiques comme plasma humain ou échantillons naturels comme extraits des plantes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nécessite une technologie complexe.</li> <li>-Dépend du compte indirect.</li> <li>- Sensible aux changements de température et de pH .</li> <li>-Comparaisons Inter laboratoire difficile.</li> </ul>

### II.11. Test de blanchissement du $\beta$ -Carotène

Le test de blanchiment au bêta-carotène fait partie des méthodes couramment utilisées dans le domaine de la chimie alimentaire. Le principe de ce test dépend de la coloration jaune de la solution de  $\beta$ -Carotène due à la rupture du couplage bêta par réaction avec des lipides (par exemple l'acide linoléique) ou des lipides peroxy ( $L\cdot$  ou  $LOO\cdot$ ) pour produire des époxydes de à une  $\beta$ -Carotène double liaison  $C=C$  du  $\beta$ -Carotène, en présence de ERO et d' $O_2$ . Lorsque les antioxydants appropriés sont ajoutés à la solution, la réaction compétitive entre le  $\beta$ -Carotène et les antioxydants entrave le changement de couleur et donc le contrôle des antioxydants en blanchissant la couleur du test solution à l'aide d'un spectrophotomètre  $\beta$ -Carotène typique (470 nm) (**Figure 21**) (**Ueno *et al.*, 2014**).



**Figure 21.** Mécanisme possible du test de blanchiment du  $\beta$ -carotène (Uneo *et al.*, 2014).

### II.11.1. Mode opératoire

**A) Procédure de test du blanchiment du  $\beta$ -carotène:** La méthode utilisée est celle décrite par Miraliakbari et Shahidi (2008). Une solution stock de mélange émulsion  $\beta$ -carotène/acide linoléique est préparée comme suit : 0,5 mg de cristaux de  $\beta$ -carotène a été dissous dans 1 mL de chloroforme et 1 mL de cette solution est transféré dans un ballon contenant 25  $\mu$ L d'acide linoléique et 200  $\mu$ L de Tween-40. Après l'élimination complète de chloroforme par évaporation, 100 mL d'eau distillée enrichie en oxygène a été ajoutée sous agitation vigoureuse. Des aliquotes de 2,5 mL de ce mélange ont été transférés dans une série de tubes à essai contenant 350  $\mu$ L d'extrait dilué dans le Diméthylsulfoxyde(DMSO). Après une agitation vigoureuse, les tubes ont été incubés à 50 °C pendant 2 h. Un tube témoin négatif a été construit en remplaçant l'extrait par DMSO. L'absorbance a été finalement mesurée à 470 nm contre un blanc (émulsion sans  $\beta$ - carotène) (Bibi sadeer *et al.*, 2020).

### II.11.2. Expression des résultats

#### A) Calcul du taux de blanchiment (R) du $\beta$ -carotène

Ce taux est calculé selon l'équation suivante (Bibi sadeer *et al.*, 2020):

$$R = [\ln(a/b)] / t]$$

ln = log naturelle

a = Absorbance au temps 0

b = Absorbance au temps t (30, 60, 90, et 120 min).

### B) Calcul de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante est calculée en pourcentage par rapport au taux de blanchiment selon l'équation suivante (**Bibi sadeer et al., 2020**):

$$AA(\%) = (R_{\text{blanc}} - E_{\text{échantillon}} / R_{\text{blanc}})$$

Il est également calculé par rapport à l'échantillon témoin (Blanc) sans ajout d'extrait par l'équation suivante (**Burda et Oleszek, 2013**):

$$AA(\%) = 100 \times [1 - (A_s^0 - A_s^{120} / A_c^0 - A_c^{120})]$$

$A_s^0$ : Absorbance de l'échantillon à 0 min

$A_s^{120}$ : Absorbance de l'échantillon à 120 min

$A_c^0$ : Absorbance de l'échantillon témoin(Blanc) à 0 min,

$A_c^{120}$ : Absorbance de l'échantillon témoin(Blanc) à 120 min

#### II.11.3. Avantages et inconvénients du test blanchiment du $\beta$ -carotène

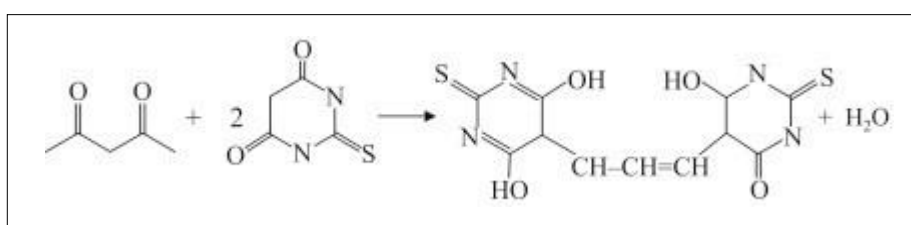
Le test blanchiment du  $\beta$ -carotène a de nombreux avantages et inconvénients qui l'affectent, résumés dans le **tableau 13**.

**Tableau 13.** Les avantages et les inconvénients du test blanchiment du  $\beta$ -carotène (Bibi sadeer *et al.*, 2020; Abeyrathne *et al.*, 2021).

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Simple et rapide</li> <li>-Applicable aux échantillons aqueux et huileux.</li> <li>-Hautement reproductible</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Prendre un longtemps.</li> <li>-Sensible pour le pH, la température O2 et l'effet de solvant.</li> <li>-Difficile de traduire ses résultats.</li> <li>-Parfois, les résultats des composants vitaux totaux (phénols, flavonoïdes) ne correspondent pas aux résultats de ce test.</li> <li>-Relation relative avec les autres testes(DPPH, ABTS, CUPRAC et FRAP).</li> </ul>

## II.12. Test TBA (Acide thiobarbiturique)

Le test TBA mesure la teneur du produit de dégradation secondaire, le malonaldéhyde, qui réagit avec l'acide thiobarbiturique lorsqu'il est chauffé dans des solutions acides pour former un adduit de base de Schiff qui est de couleur rose (absorbe à 532-535 nm) et fluorescent (sortie 515 nm, émission 553 nm) (Figure 22) (Yang et Boyle, 2016; Dorsey et Jones, 2017).



**Figure 22.** Formation d'adduit TBA-MA (Schaich, 2016).

### II.12.1. Mode opératoire

**A) Procédure de test TBA:** Des volumes appropriés d'extraits sont ajoutés à une solution aqueuse contenant 200  $\mu$ L de tampon Tris (pH = 7,4), 300  $\mu$ L de KCl (1 mol/L), 400  $\mu$ L de SDS à 1%, 40  $\mu$ L de FeCl (1  $\mu$ L) et 20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1  $\mu$ L) dans un flacon opaque marron pour éviter l'oxydation. Le mélange est incubé à 37°C pendant 18 h. Après incubation, 50  $\mu$ L de BHT à 4% sont ajoutés dans une solution d'éthanol et 2  $\mu$ L de réactif TBA (TBA à 0,67%, TCA, SDS à 1%, HCl à 5N). Le mélange résultant est vortex, puis chauffé à 80°C pendant une heure et refroidi dans un bain de glace pendant 10 min. Le BHT, Vitamine A, Vitamine C sont utilisés

comme contrôle positif dans le test. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 532 nm (Bai *et al.*, 2022).

### II.12.2. Expression des résultats

Les résultats des analyses TBA sont généralement exprimés en  $\mu\text{mol TBA/g}$  d'échantillon pour couvrir tous les réactifs, ou en mg de malonaldéhyde/kg d'échantillon si le réactif moléculaire est vérifié.

### II.12.3. Avantages et inconvénients du test TBA

Les avantages et les inconvénients du test TBA sont résumés dans le **tableau 14**.

**Tableau 14.** Les avantages et les inconvénients du test TBA (Fenaille *et al.*, 2001 ; Williamson *et al.*, 2003 ; Schaich, 2016).

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Largement utilisée dans les analyses d'oxydation des lipides dans les aliments.</li> <li>- Appliquée directement.</li> <li>- Ne nécessite pas d'extraction de lipides.</li> <li>- Résultats bien corrélés avec les analyses sensorielles.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Analyse très controversée.</li> <li>-Long temps de réaction.</li> <li>- Faible sensibilité</li> <li>- Non-spécificité</li> </ul>

# **Conclusion générale**

A travers ce travail, nous avons conclu que les antioxydants s'intéressent de plus en plus au domaine de l'alimentation en raison de leur effet dans l'organisme contre les processus pathologiques oxydatifs par le stress et de leur rôle dans la préservation et la prévention des produits alimentaires contre l'oxydation. Il existe des sources naturelles et synthétiques pour eux. La mesure des antioxydants nécessite des méthodes fiables pour leur évaluation. Ces méthodes dépendent de protocoles méthodologiques spécifiques. Ce dernier est également contrôlé par plusieurs facteurs, dont le pH, il y a ceux qui travaillent en conditions neutres (CURPAC), acides (FRAP) et alcalines. En plus de leur application aux hydrophiles et hydrophobes ou les deux ensembles, les colorants alimentaires jouent également un rôle important dans la modification des absorptions qui ont des effets évidents sur le changement de couleur (DPPH, ABTS), et d'autres qui montrent des réactions de formation de couleur (CURPAC, FRAP). Ces études se terminent par des conclusions sur les tailles actuelles en suggérant des améliorations sur la façon de l'élaborer pour éviter ses aspects négatifs et positifs afin qu'il soit suffisant et universel pour mesurer les antioxydants.

REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abeyrathne, E. D. N. S., Nam K., & Ahn, D. (2021). Analytical Methods for Lipid Oxidation and Antioxidant Capacity in Food Systems. *Antioxidants*, **10(10)**, 1587.
2. Adjadj, M. (2016). Activité antioxydante et anti-inflammatoire de la plante médicinale *Paronychia argentea* L. Thèse de Doctorat Université Ferhat Abbas Sétif 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie ,pp14-16.
3. Aguilar, T.A.F., Navarro, B.C.H., & Pérez, J.A.M. (2016). Endogenous antioxidants: a review of their role in oxidative stress. A master regulator of oxidative stress—the transcription factor nrf2, 3-20.
4. Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, **127**, 183–198.
5. Anesini, C., Ferraro, G.E., & Filip, R. (2008). Total polyphenol content and antioxidant capacity of commercially available tea (*Camellia sinensis*) in Argentina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56(19)**, 9225–9229.
6. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52(26)**, 7970–7981.
7. Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S.E., Altun, M. (2005). Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)-neocuproine as chromogenic oxidant: The CUPRAC method. *Free Radical Researches*, **39**, 949–961.
8. Arshiya, S. (2013). The antioxidant effect of certain fruits: A review. *Journal of pharmaceutical sciences and research*, **5**, 265-268.
9. Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., Corbineau, F. (2008). Rôle de la signalisation par les espèces réactives de l'oxygène dans la germination et la levée de dormance des semences. *Journal de la Société de Biologie*, **202(3)**, 241-248.
10. Baba, L & McGrath, IM. (2008). Oxygen free radicals: effects in the newborn period. *Advance in Neonatal Care*, **8**, 256-264.
11. Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G And Mahomoodally, M.F. (2020). The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *antioxidants*, **9(8)**, 709.

12. Bielecka, M., Cichosz, g., Cieczot, H. (2021).Antioxidant, antimicrobial and anticarcinogenic activities of bovine milk proteins and theirhydrolysates—A review. *International Dairy Journal*,**127**, 105-208 .
13. Bouhadjra, K. (2011). Etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge. Université de Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou Thèse de doctorat. pp 26.Algérie.
14. Burda, S & Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49(6)**, 2774–2779.
15. Çetinus, Ş.A., Göze, İ., Saraç, B. & Vural, N. (2007). Scavenging effect and antispasmodic activity of the essential oil of cyclotrichium niveum. *Fitoterapia* **78 (2)**, 129–133.
16. Codorñer-Franch, P., Valls-Bellés, V., Arilla- Codoñer, A., Alonso-Iglesias, E. (2011).Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. *Transnational Research*. **158(6)**, 369-384.
17. Chandrasekara, A., Shahidi, F. (2018). Herbal beverages: Bioactive compounds and their role in disease risk reduction - A review. *Journal of traditional and complementary medicine*. **8(4)**, 451-458.
18. Crichton, R.R., Wilmet, S., Legssyer, R., Ward, R.J. (2002). Molecular and cellular mechanisms of ironhomeostasis and toxicity in mammalian cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **91(1)**, 9-18.
19. Daenen, K ., Andries, A ., Mekahli, D., Van Schepdael, A., Jouret, F., Bammens, B.(2019). Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatr. Nephrology*, **34**, 975–991.
20. Delattre, J., Beaudeau, J.L., Bonnefont- Rousselot, D. ( 2005). Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène. In : Radicaux libres et stress oxydant, Aspects biologiques et pathologique. Edition Technique et documentation . Paris: Lavoisier, 45-80 .
21. Denev, P., Kratchanova, M., Ciz, M., Lojek, A., Vasicek, O., Nedelcheva, P., Hyrsl, P. (2014). Biological activities of selected polyphenol-rich fruits related toimmunity and gastrointestinal health. *Food Chemistry*, **157**,37–44.
22. Defraige, J.O., J. Pincemail. (2008). stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Revue Médicale de Liège* , **63**, 10-19.

23. Desmier, T. (2016 ).Les Antioxydants De Nos Jours, Définition et Applications. Université de Limoges. Thèse de doctorat, pp14 .France.
24. Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, JPE., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A. (2013). Dietary(poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal*, **18**,1818–1892.
25. Djenidi, H. (2020). Activité antioxydante et antiradicalaire des aliments d'origine végétale consommés dans les régions de Biskra et Setif . université se sétif .thèse de doctorat, pp 56. Algérie.
26. Dobis, d.R et al. (2008). Modulation de la prolifération des lymphocytes T spécifiques duberyllium par les antioxydants. *Current Medicinal Chemistry* ,**110**, 1161-1208.
27. Dridi, w. (2016). Influence de la formulation sur l'oxydation des huiles végétales en émulsion eau-dans-huile . Université de Bordeaux .thèse de doctorat,pp5-9.France.
28. Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiological Reviews*, **82** ,47-95.
29. Ebadi, M. (2001).Antioxidants and free radicals in health and disease:An introduction to reactive oxygen species, oxidative injury, neuronal cell death and therapy in neurodegenerative diseases. Arizona: Prominent Press,13-5.
30. Echegaray, N., Pateiro, M., Munekata, P.E., Lorenzo, J.M., Chabani, Z., Farag, M. A .,& Domínguez, R. (2021). Measurement of Antioxidant Capacity of Meat and Meat Products: Methods and Applications *Molecules*, **26(13)**, 3880.
31. Eddhima, Z .(2019). Les radicaux libre : effets , mécanismes et approches thérapeutique université Mohamed V de rabat. Thèse de doctorat, pp 17. Maroc.
32. Estévez, M., Ventanas, S., Cava, R.(2007). Oxidation of lipids and proteins in frankfurters with different fatty acid compositions and tocopherol and phenolic contents *Food Chemistry*,**100**, 55–63.
33. Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H & Jurgens, G. (1992) The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology and Medicine*,**13**, 341-390.

34. Espín, J.C., García-Conesa, M.T and Tomás-Barberán, F. A . (2007). Nutraceuticals: Facts and Fiction *Phytochemical*, **68**( 22), 2986-3008 .
35. Favier, A. (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, 108 – 115.
36. Ferreira, I., Baptista, P., Vilas-Boas, M. Barros, L. (2005). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*, **100**,1511-1516.
37. Felice, DL., Sun, J., Liu RH. (2009). A modified methylene blue assay for accurate cell counting. *Journal of Functional Food*, **1**, 109–118.
38. Finkel, T and Holbrook, N. J. (2000).Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing, *Nature*, 239–247.
39. Finkel, T.(2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *Journal of Cell Biology*, **194**, 7–15.
40. Flieger, J., Flieger, W., Baj, J., Maciejewski, R. (2021). Antioxidants: Classification, Natural Sources, Activity/Capacity Measurements, and Usefulness for the Synthesis of Nanoparticles. *Materials*, **14**, 4135.
41. Gautam, RS., Thul, M., Kumar, NS. (2010). Antioxidants: Types, properties and mechanism.
42. Ghayati, Z. (2019) .Antioxydants et diabète de type 2 . université Mohammed v rabat. Thèse de Doctorat. pp 26-28. Mroc.
43. Guglani, A., Pande, H.K., Rajeshwar, K.K., Arya, and Bala, M .(2020). In-Vitro Antioxidant Activity, Total Phenolic, Flavonoid and Tannin Contents in the *Ajuga Bracteosa* Wall. Ex Benth, Grown at Middle Hill Climatic Condition of Western Himalayas . *Defence Life Science Journal* ,198-203 .
44. Gupta, V., Mahbub, Parvez, Nesterenko, PN and Paull, B. (2018) A new 3D printed radial flow-cell for chemiluminescence detection: Application in ion chromatographic determination of hydrogen peroxide in urine and coffee extracts. *Analytica Chimica Acta*,**1005**, 81 - 92.

45. Garrett, A.R. (2011). Antioxidants in Cancer Research and Prevention: Assay Comparison, Structure-Function Analysis, and Food Product Analysis" . Theses and Dissertations, 2735.
46. Guggenbuhl, N. (2006). Les antioxydants a la source. Bulletin de la Societe Belge d'Ophtalmologie, **301**,41-45.
47. Halliwell, B., Gutteridge, JMC. (2007).Free radicals in biology and medicine. 4th.Oxford, UK: Clarendon Press ,20-31.
48. Haida, Z et Hakiman, M .(2019). A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and non enzymatic antioxidant activities .Food Science & Nutrition, **7**,1555–1563.
49. Haque, S.A., and Cañete, S.J.P.(2018). Journal of Analytical Science and Technology, 9-4.
50. Hyardin , A.(2008). Etude de la fonctionnalité alimentaire de plats industriels .University of Lorraine.Thèse de Doctorat .pp 67-69.France.
51. Jarbi, I. (2018). Etude de l'activité antioxydante et antihyperglycémiant in vitro d'une nouvelle série des dérivés des pyridazin-3 (2H)-ones. Université de Mohamed V Rabat, Thèse de Doctorat.pp59-60. Maroc.
52. Kardeh, S., Ashkani-Esfahani, S., Alizadeh, A.M. (2014). Paradoxical action of reactive oxygen species in creation and therapy of cancer. European Journal of Pharmacology, **735**, 150-168.
53. Karasahin, T., Alkan, H., Satilmis, F., Dursun, S., Ozturk, C., Bulut, g., Akson N.H., Tekindal M.A., Caglayan T., Yesilkaya O.F., et al. (2021). Relationship between total antioxidant/oxidant status, and oxidative stress index and superovulation response indonor cows. Livestok Science, **244**, 104340.
54. Klibet, F., Boumendjel, A., Khiari, M., El Feki, A., Abdennour, C., & Messarah, M. (2016). Oxidative stress-related liver dysfunction by sodium arsenite: Alleviation byPistacia lentiscus oil. Pharmaceutical Biology,**54(2)**, 354-363.

55. Kohen, R., Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*, **30**, 620- 650.
56. Kochelin-Ramonatxo, CH. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, **20**, 165-177.
57. Kumar, S. (2014). The importance of antioxidants and their role in pharmaceutical science - A review. *Asian Journal of Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences*, **1(1)**, 27-44.
58. Lavranos, G., Balla, M., Tzortzopoulou, A., Syriou, V., Angelopoulou, R. (2012). Investigating ROS sources in male infertility: A common end for numerous pathways. *Reproductive Toxicology*, **34**, 298-307.
59. Laguerre, M., López-Giraldo, L. J., Lecomte, J., Pina, M., & Villeneuve, P. (2007). Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, **41(5)**, 278-292.
60. Lee, JI., Lee, JH. (2014). Antioxidant and inhibitory activities of thioflavonones against nitric oxide production. *Food Science and Biotechnology*, **23**, 957-963.
61. Li, R., Jia, Z., and Trush, M.A. (2016). Defining ROS in biology and medicine. *Reactive oxygen species*, 9-21.
62. Litescu, S. C., Eremia, S.A., Tache, A., Vasilescu, I., & Radu, G.L. (2014). The use of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assays in the assessment of beverages' antioxidant properties. In *Processing and impact on antioxidants in beverages*. Academic press, 245-251.
63. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Review*, **4(8)**, 118-126.
64. Marc, F., Davin, A., Deglène-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M., and Fritsch, P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *M/S : médecine sciences*, **20(4)**, 458-463.
65. MacDonald-Wicks, LK., Wood, LG., Garg, ML. (2006). *Journal of the Science of Food Agriculture*, **86**, 2046-2056.
66. Marasca, E., Greetham, D., Herring, S. D., & Fisk, I. D. (2016). Impact of

- nitrogen flushing and oil choice on the progression of lipid oxidation in unwashed fried sliced potato crisps. *Food Chemistry*, **199**, 81–86.
67. Martín, J., Kuskoski, EM., Navas, MJ., Asuero AG .(2017).Flavonoids From Biosynthesis to Human Health: Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. BoD - Books on Demand, Germany.
68. Maamri, S.(2008). Etude de pistacia atlantica de deux régions de sud algérien. Dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens. Université de Boumerdes. Mémoire de Magister. Pp14. Algérie.
69. Mohammedi, Z.,(2013). Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie. Université Aboubekr belkaid. Thèse de Doctorat. pp 60. Algérie.
70. Moniczewski, A., Gawlik, M., Smaga, I., Niedzielska, E., Krzek, J., Przegaliński E., Pera, M., Filipe, M. (2015). Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 1. Chemical aspects and biological sources of oxidative stress in the brain. *Pharmacological Reports*,**67**, 560-568 .
71. Munteanu, I.G., Apetrei, C.A. ( 2022) . Review on Electrochemical Sensors and Biosensors Used in Assessing Antioxidant Activity. *Antioxidants*, **11**, 584.
72. Murphy, MP.(2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, **417**,1-13.
73. Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, **22(7)**,3380.
74. Niki, E.(2010). Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, **49**, 503-515.
75. Nithyanand, P., Balakrishnan, D., Kandasamy, D.(2014). A review on Antioxidant activity of marine organisms. *International Journal of ChemTech Research*, **6(7)**, 3431-3436.
76. Nkhili, E.(2009). Polyphénols de l'Alimentation. Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Université de marrakech. Thèse de doctorat .pp187-193.Maroc.

77. Nosel, I. (2013). Quantification chez l'homme et à l'échelle du génome des modifications d'expression génique induites par de faibles doses de rayonnement ionisant . Université de versailles saint-quentin-en-yvelines .Thèse de Doctorat. pp16.Franc
78. Olugbami, JO., Gbadegesin, MA and Odunola, OA. (2014). In vitro evaluation of the antioxidant potential, phenolic and flavonoid contents of the stem bark ethanol extract of *Anogeissus leiocarpus*. *African Journal of Medicine and Medical Sciences*, **43**, 101–109.
79. Ortega-Ramírez, L., Rodríguez-García, I., Leyva, J., et al. (2014). Potential of medicinal plants as antimicro-bial and antioxidant agents in food industry: A hypothesis. *Journal of Food Science*, **79(2)**, 129-137.
80. Pelli, K., Lyly, M.(2003). Les antioxydants dans l'alimentation. INRA ,French NationalResearch Institute for Agriculture, Food and Environment,France,4-17.
81. Pereira Nunes, X., Souza Silva, F., Alneida, J.R.G. et al. (2012). Biological Oxidations and Antioxidant Activity of Natural Products. Chapter1. In "phytochemicals as Nutraceuticals Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health". 1ère edition Venketeshwer Rao. pp 1-20.
82. Pisoschi, A.M., & Negulescu, G.P .(2011). Methods for total antioxidant activity determination: A review. *Biochem Anal Biochem*, **1(1)**, 106.
83. Pisoschi, A.M., Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **97**, 55-74.
84. Prabhu, K ., Rao, M.R.K., Ravi, A., Kalaivannan, J., Dinakar, S., Vijayalakshmi, N .(2020). Antioxidant studies of one ayurvedic medicine, mahanarayana thailam. department of industrial biotechnology, bharath institute of higher education and research, 642-643.
85. Prior, R.L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B. et Jacob, R.(2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51**, 3273-3279 .
86. Prior, E. (2003 ).Usage des corps gras alimentaires dans les différents secteurs de la technologie alimentaire. In : Graille J, ed. Lipides et corps gras alimentaires. Paris : Technique et documentation, Lavoisier,147-87.

87. Puppel, K., Kuczyńska, B. (2016). Metabolic profiles of cow's blood; a review. *Journal of the Science of Food Agriculture*, **96**, 4321–4328.
88. Puppel, K., Kapusta, A., Kuczyńska, B. (2015). The etiology of oxidative stress in the various species of Animals, a review. *Journal of the Science of Food Agriculture*. **95**, 2179–2184.
89. Raedschelders, K., Ansley, D.M., Chen, D.D.Y. (2012). The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacology & Therapeutics*, **133**, 230-255.
90. Réblová, Z. (2012). Effect of temperature on the antioxidant activity of phenolic acids. *Czech Journal of Food Science*, **30**, 171-177.
91. Rezaire, A. (2012). Activité anti-oxydante, caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa). Université des Antilles et de la Guyane. Thèse de doctorat, Antilles-Guyane. pp 56-57 France.
92. Ritter, J.C.S., Budge, S.M. (2012). Key lipid oxidation products can be used to predict sensory quality of fish oils with different levels of EPA and DHA. *Lipids*, **47**, 1169–1179.
93. Rojas-López, A & Ca, M. P. (2013). Antioxidant capacity in vanilla extracts obtained by applying focused microwaves. *Scientific research*, 246-247.
94. Rupeshkumar, M., Kavitha, K, & Basu, SK. (2012). Antioxidant and Hepatoprotective Effect of flavanone from *Cardiospermum halicacabum* N. against Acetaminophen induced Hepatotoxicity in Rats. *Journal of Pharmacy Research*. **5(1)**, 544-547.
95. Sayre, LM., Moreira, PI., Smith, MA., Perry, G. (2005). Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Search Life-sciences Literature*, **41(2)**, 143-164.
96. Sánchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Sciences and Technology International*, **8**, 121-137.
97. Schieber, M and Chandel, N.S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 453–462.
98. Semenza, G. L. (2001). Hypoxia-inducible Factor 1: Oxygen Homeostasis and Disease Pathophysiology. *Trends in Molecular Medicine*, **7**, 345–350.

99. Shahidi, F.(1992).Wanasundara PK. Phenolic antioxidants. *Critical Reviewes in Food Science and Nutrution*. **32(1)**,67-103.
100. Shahidi, F., Zhong, Y. (2011).Revisiting the Polar Paradox Theory: A Critical Overview.*Journal of Agriccultural and Food Chemestry*, **59**, 3499–3504.
101. Shahidi, F. Zhong, Y. (2015) Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, **18**,757–781.
102. Shebis, Y., Iluz, D., Kinel-Tahan, Y., Dubinsky, Z., Yehoshua, Y.(2013). Natural antioxidants:Function and sources. **4**, 643-649.
103. Shi, J., Shi, W et al .(2015).Decreasing GSH and increasing ROS in chemosensitivity gliomas with IDH1 mutation, "Tumour Biology, **36(2)**,655-662.
104. Shimamura, T., Matsuura, R., Tokuda, T., Sugimoto, N., Yamazaki T., Matsufuji H., Matsui T., Matsumoto K., and Ukeda H., (2007). *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 54-482
105. Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R., & Dhaka, N. (2013). Potential applications of antioxidants–A review. *Journal of pharmacy research*, **7(9)**, 828-835.
106. Singh, L., Suruchi, S., Sharma, SK. (2013).A review on medicinal plants having antioxidant potential. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*,**1(3)**,404-409.
107. Szabó, I., Scherer, K., Roesler, U., Appel, B., Nöckler, K., Hensel, A.(2008). Comparative examination and validation of ELISA test systems for *Salmonella typhimurium* diagnosis of slaughtering pigs .*International Journal of Food Microbiology*, 65-69.
108. Seggani, S et Boukehil, H. (2017). Corrélation entre le contenu polyphénolique et l'activité antioxydante et antimicrobienne in vitro de *Curcuma longa* L.

109. Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L and Byrne, D.H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**, 669–675.
110. Topwe, M.M. (2013). Mécanismes de Réactions d'Oxydation en Synthèse Organique(EJSR). *European Journal of Scientific Research*, 25-75.
111. Torres, V.R., Berinck, G.S., Nascimento, G.F., Fortier, S.C., Pessoa, C., Morases, M.O. (2006). Antibacterial activity against resistant bacteria and cytotoxicity of four alkaloid toxins isolated from the marine sponge *Arenosclerabrasiliens*. *Toxicon*, **(40)**, 885-891.
112. Tolba, I. (2016). Détermination d'un méta-paramètre pour l'estimation de la capacité antioxydante globale des thés, tisanes et jus . Université du Québec à Trois-Rivières. Thèse de doctorat. pp37-38. Canada .
113. Toure, D. (2015). Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire . Université Felix Houphoet Boigny, Côte d'Ivoire. Thèse de doctorat. pp 51. pp.France.
114. Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, MA and Nilsa, RD., Huang, P., Trachootham, D.(2008). Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal*, **10**, 1343–74.
115. Trofin, A.E., Trinc a L.C and Ungureanu E. (2019). CUPRAC voltammetric determination of antioxidant capacity in tea samples by using screenprinted microelectrodes. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 8012758.
116. Trabsa, h. (2011). propriétés antioxydantes et activité inhibitrice de la xanthine oxydase des extraits de la plante médicinale *peganum harmala* l. université mohamed khider-biskra .Thèse de doctorat pp 28 .Algérie.
117. Ueno, H., Yamakura, S., Arastoo, R. S., Oshima, T and Kokubo, K. (2014). Systematic evaluation and mechanistic investigation of antioxidant activity of fullereneols using  $\beta$ - carotene bleaching assay. *Journal of Nanomaterials*, **7**, 7.

118. Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico- Biological Interactions*, **160**, 1–40.
119. Villedieu, C.(2018). Rôle de la SIRT3 et de la déacétylation des protéines mitochondriales dans la cardioprotection : effet du vieillissement. Université de Lyon,thèse de doctorat, Français.
120. Wasek, M., giebutowicz, J., sochacka, M., zawada, K., Krzeñniak L, M., and Wroczyński, P.(2015). the measurement of antioxidant capacity and polyphenol content in selected food supplements. *Acta Poloniae Pharmaceutica ñ Drug Research*,**72(5)**, 877-887.
121. Winterbourn, C.C. (2014). The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. *Biochimica et Biophysica Acta*,**1840**, 730-738.
122. Winterbourn, C.C. (2014). The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. *Biochimica et Biophysica Acta*,**1840**, 730-738 .
123. Wolfe, KL., Liu, RH. (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**,8896–8907.
124. Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Hay-towitz ,D.B., Gebhardt, S.E., Prior R.L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**,4026-37.
125. Xing , J., Wang, G., Zhang, Q., Liu, X., Gu, Z., Zhang, H., et al. (2015) Determining Antioxidant Activities of Lactobacilli Cell-Free Supernatants by Cellular Antioxidant Assay: A Comparison with Traditional Methods. *Plos one*, **10(3)**, e0119058.
126. Young, IS., Woodside, JV. (2001) Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, **54**,176–186.

127. Yuen, J., Benzie I., (2003) .Hydrogen peroxide in urine as a potential biomarker of 745 whole body oxidative stress, *Free Radical Reserch*,**37**, 1209-1213.
128. Zhang, Y., Chen, Y., Wan, Y., Zhao, Y., Wen, Q., Tang, X., Shen, J., Wu, X., Li, M., Li X., Li, J., Li, W., Xiao, Z and Du, F (2021)Circular RNAs in the Regulation of Oxidative Stress. *Frontiers in Pharmacology*, **12**, 697903.