

Etude comparative des indices d'activité antioxydante des essais du Cérium et du DPPH: Application sur trois plantes médicinales locales

[Comparative study of antioxidant activity index by the tests of cerium and DPPH: Application on three local medicinal plants]

Asmaa Noureddine¹, Boubakeur Saidat¹, Boulanouar Bakchiche², and Mohamed Maatallah³

¹Faculté des Sciences,
Université Amar Telidji de Laghouat, Algérie

²Faculté de Technologie,
Université Amar Telidji de Laghouat, Algérie

³Faculté des Sciences Semlalia,
University Cadi Ayyad, Av. My Abdellah, BP 2390, Marrakech, Maroc

Copyright © 2015 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: The aim of this work is to check the new index of antioxidant activity (AAI and AAU) by using test DPPH and to introduce a new method, simple, inexpensive, significant, which is the test of cerium. We evaluated the capacity antioxidant by the both methods (DPPH, cerium test). The values of IC₅₀ (µg/ml) of each standard vary according to the concentration of the DPPH or the cerium (IV) whereas AAI and AAU do not have any significant difference. The coefficient of variation not exceeding the 3% for the two standards of gallic acid and the trolox in the case of the DPPH and 2.5% for the three standards tested by the cerium (IV). The calibration curves of selected antioxidants (trolox, ascorbic acid, and gallic acid), are linear for the three concentrations of Ce (IV) (99.87, 75.159, 60.127 µg/ml). The coefficients of correlation are close to unit. The two tests were applied to the study of the antioxidant activity of three local plants: *Artemisia campestris*, *Juniperus phoenicea*, and *Thymus algeriensis*. The proportioning of total polyphenols and the flavonoids by the method of Folin-Ciocalteu and the method of AlCl₃ respectively revealed that *Artemisia* presents a content of (13.655 ± 0.101 mg EAG/g) polyphenols and that *Génivrier* contains (05.338 ± 0.619 mg ER/g) in flavonoids. A weak correlation (R² = 0.646) and (R² = 0.559) is obtained for the two tests of DPPH and cerium, between the content of polyphenols and the antioxidant activity. A good correlation (R² = 0.994) was obtained between the two methods and thus the two tests are comparable. A good correlation (R² = 0.994) obtained between the two methods and thus the two tests are comparable. The expression of the results of the antioxidant activity showed that the extracts of *Thymus* were more active, like antioxidant agents.

KEYWORDS: Antioxidant activity, DPPH, Ce (IV), AAI, AAU, Polyphenols, Flavonoids.

RÉSUMÉ: Le présent travail a pour objectif de vérifier des nouveaux indices d'activité antioxydante (AAI et AAU) en utilisant le test DPPH et d'introduire une nouvelle méthode, simple, peu coûteuse, sensible, qui est le test du cérium. Nous avons tout d'abord évalué la capacité antioxydante par la méthode de DPPH et par la méthode du cérium. Les valeurs de IC₅₀ (µg/ml) de chaque standard varient en fonction de la concentration du DPPH ou du cérium (IV) alors que celles des indices AAI et AAU n'ont aucune différence significative. Nous avons obtenu des valeurs du coefficient de variation ne dépassant pas les 3% pour les deux étalons d'acide gallique et le trolox dans le cas du DPPH et 2.5% pour les trois standards testés par le cérium (IV). Les courbes d'étalonnage des antioxydants choisis (c.-à-d., trolox, acide ascorbique, acide gallique), présentent des domaines de linéarité acceptables pour les trois concentrations de Ce (IV) (99.87, 75.159, 60.127 µg/ml). Les

coefficients de corrélation sont proches d'unité. Les deux tests ont été appliqués à l'étude de l'activité antioxydante de trois plantes locales : l'*Artemisia campestris*, le *Juniperus phoenicea*, et le *Thymus algeriensis*. Le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes par la méthode de Folin-Ciocalteu et par la méthode d' AlCl_3 respectivement ont révélé que l'*Artemisia* présente une teneur de $(13.655 \pm 0.101 \text{ mg EAG/g})$ en polyphénols et que le *Génivrier* contient $(05.338 \pm 0.619 \text{ mg ER/g})$ en flavonoïdes. Une faible corrélation ($R^2=0.646$) et ($R^2=0.559$) est obtenue pour les deux tests de DPPH et de cérium, entre la teneur en polyphénols des extraits et l'activité antioxydante. Une bonne corrélation ($R^2 = 0.994$) entre les deux méthodes est obtenue et donc les deux essais sont comparables. L'expression des résultats de l'activité antioxydante a montré que les extraits du *Thymus* étaient plus actifs, comme agents antioxydants.

MOTS-CLEFS: Activité Anti-oxydante, DPPH, Ce(IV), AAI, AAU, Polyphénols, Flavonoïde.

1 INTRODUCTION

L'activité antioxydante définit la capacité d'un organisme de se protéger contre les radicaux libres. La détermination de l'activité antioxydante et l'une des méthodes pour évaluer la qualité biologique et nutritionnelle d'un aliment [1]. Nous avons besoin ainsi des méthodes commodes pour la quantification rapide et simple de la capacité antioxydante. Les méthodes les plus utilisées généralement pour déterminer la capacité antioxydante sont divisées en deux groupes importants: Des analyses basées sur une réaction de transfert d'atome d'hydrogène, où l'antioxydant et le substrat sont en concurrence pour fixer des radicaux libres tel que l'essai du DPPH, ABTS etc. et des analyses basées sur une réaction de transfert d'électron, surveillée par un changement de couleur quand l'oxydant est réduit tel que le FRAP, CUPRAC et récemment introduit l'essai du Cérium. Dans la première catégorie l'essai le plus couramment utilisé est l'essai de DPPH. Le DPPH est connu comme un radical libre stable, mais est sensible à la lumière, à l'oxygène, au pH et au type de solvant utilisé [2]. En dépit de l'utilisation importante de la méthode de DPPH, le manque de l'étalonnage des résultats le rend difficile de comparer la force antioxydante de différents extraits de plante et des composés purs [3]. Récemment certains travaux ont évoqué les problèmes de normalisation des essais ou de standardisation des méthodes [4]. En effet, des investigations ont été réalisées sur ce sujet et certains auteurs ont suggérés de revoir les conditions expérimentales de l'essai, d'autre ont introduit un nouveau indice AAI pour éliminer surtout l'effet du choix de la concentration initiale du réactif [3]. Tout récemment un autre indice a été introduit AAU basée sur des faits théoriques et appliquée avec succès pour les composés purs connus puisqu'il faut connaître la masse molaires de ces derniers [4]. Dans le présent travail, nous avons apporté une amélioration sur la détermination de l'indice AAI par la méthode du test DPPH et nous l'avons déterminé pour la première fois par la méthode du test du cérium (IV). Les résultats des deux tests sont comparés et appliqués aux trois plantes médicinales locales.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 RÉACTIFS ET STANDARDS

La vitamine E, le 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH), le sulfate de Ce (IV) et la Rutine ont été achetée de Sigma-Aldrich, le Trolox (acide 6-hydroxy-2, 5, 7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique), a été achetée de Fluka. L'acide gallique, la vitamine C, Foline-Ciocalteu, Le méthanol et tous autres solvants étaient catégorie analytique et ont été achetée de Biochem Chemopharma (France). L'eau bi-distillée a été employée dans toutes les expériences. Les mesures spectrophotométrique sont effectués par le spectrophotomètre (UV-Vis SHIMADZU Modèle 1240).

2.2 CHOIX DES PLANTES D'APPLICATION

Trois plantes de l'Algérie dans la région de Laghouat (récolte Avril 2010) sont étudiées pour évaluer leurs teneurs en composés phénoliques puis mesurer leurs capacités antioxydantes par les méthodes de DPPH et du cérium. Ces plantes sont l'*Artemisia campestris*, le *Juniperus phoenicea*, et le *Thymus algeriensis*.

2.3 EXTRACTION DES POLYPHÉNOLS

Nous avons utilisé la même méthodologie d'extraction et de purification d'écrite par Amiot 1989 [5], une quantité de 1g des poudres fines des plantes choisies sont macérées, pendant une nuit à température ambiante, dans un mélange hydro-alcoolique méthanol-eau (8:2 V/V). Après filtration et évaporation du méthanol, la phase aqueuse obtenue est lavée par

l'hexane pour l'élimination des pigments chlorophylliens et tous les produits apolaires. L'extraction des polyphénols est réalisée par l'acétate d'éthyle. Après évaporation sous vide du solvant, le résidu est repris dans 10mL de méthanol pur, qui sera stocké à 4°C pour être utilisé par la suite pour les analyses.

2.4 DOSAGE DES POLYPHÉNOLS

Le dosage des phénols totaux a été effectué par la méthode adaptée de Singleton et Ross (1965) avec le réactif de Folin-Ciocalteu [6]. Pour ce faire, 250µl de chaque extrait est mélangé à 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué dans l'eau bi-distillée. Après agitation du mélange, 1ml de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (20%) est ajoutée. Le mélange est incubé pendant 30 minutes dans l'obscurité à la température ambiante. L'absorbance de tous les extraits est mesurée par spectrophotométrie UV-Visible à 760 nm. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique (0.1-0.01)mg/ml et exprimée en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g).

2.5 DOSAGE DES FLAVONOÏDES

La méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits, en utilisant comme standard la rutine, les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en milligrammes d'équivalents de la rutine par gramme de matière sèche (mg ER/g). 1ml de chaque extrait ou du standard avec les dilutions convenables est ajouté à un volume égal de la solution d' AlCl_3 (2%). Le mélange est vigoureusement agité et l'absorbance à 430 nm est mesurée après 15 minutes d'incubation [7].

2.6 DÉTERMINATIONS D'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE

Le pouvoir antioxydant des différentes solutions standard et des extraits phénoliques sont déterminé selon la méthode de DPPH d'une part et la nouvelle méthode de cérium d'autre part. Les mesures spectrophotométriques sont alors effectuées.

2.6.1 TEST AU DPPH

Ce test permet de mettre en évidence le pouvoir antiradicalaire d'un antioxydant pur ou d'un extrait antioxydant, la solution d'alcool de DPPH est de couleurs mauve-foncé caractérisé par son spectre UV avec un maximum d'absorbance à 517nm. Sous l'action d'un antioxydant AOH qui le réduit en DPPHH, cette absorbance diminue jusqu'à atteindre un palier (Figure.1). La cinétique de la réaction variant selon l'antioxydant utilisé [8,9].

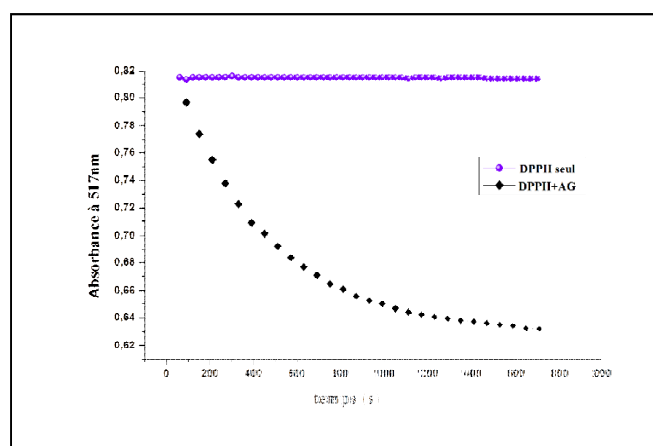


Fig. 1. Courbe représentant la variation de l'absorbance en fonction du temps dans le test DPPH.

Deux solutions standards d'acides galliques et de Trolox sont utilisées pour vérifier la méthode des nouveaux indices d'activités antioxydantes puis appliquer sur les trois extraits phénoliques de nos plantes. Des dilutions différentes sont préparées pour chaque standard ou extraits de plante.

Selon la loi de Beer Lambert, la gamme identifiable de l'absorbance optimale d'un spectrophotomètre est fixée entre 0.221 et 0.798, qui correspondent à des concentrations de DPPH entre 25 et 90 µM [10]. Trois solutions de DPPH sont alors

examinées : 60 ,70 et 80 μ M. 100 μ l des dilutions préparées de chaque échantillon sont incubées avec 3.9 ml de solution de DPPH. Après une période d'incubation de 30 minutes, à la température ambiante et dans l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 517 nm contre un blanc contenant la solution de DPPH et du solvant. La valeur de l'absorbance du blanc est prise comme étant le temps du début de la réaction.

2.6.2 TEST AU CÉRIUM

Le test de cérium est basé sur l'oxydation des composés antioxydants avec du sulfate de cérium (IV) à la température ambiante dans des conditions bien déterminées de concentration en réactif et de pH. Le Ce(IV) se réduit en Ce(III) lors de la réaction des sels de cérium (IV) avec des espèces réductrices [11,12].

Nous avons déterminé la longueur d'onde maximale d'absorption du Ce (IV) par le spectre (UV-Vis) avec une solution diluée de Ce(IV). Le spectre obtenu est illustré dans la figure.2 (courbe a). Le maximum d'absorption est à 318nm. Ceci est en accord avec la bibliographie [11].

Afin de vérifier une possible interférence entre le Ce (IV) et les deux molécules standard de l'acide gallique et l'acide ascorbique, nous avons déterminés les spectres d'absorbance de la réaction entre le cérium et ces derniers. Pour ce faire, 1.9 ml de Ce(IV) dilué est ajouté à 100 μ l de l'acide gallique (ou acide ascorbique). Après 10 mn d'incubation les spectres à différentes concentrations en acide gallique (ou acide ascorbique) sont enregistrés successivement entre 250 et 500nm (figure.2 courbes b, c et d).

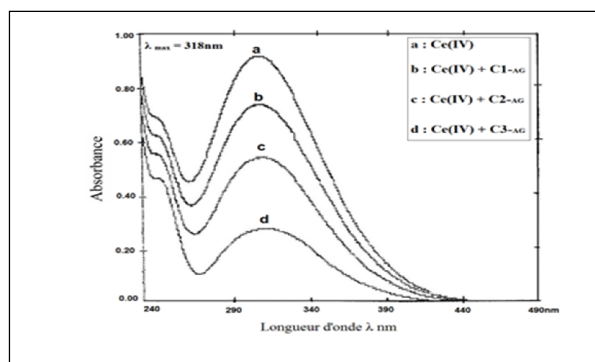


Fig. 2. Spectre d'absorption de Ce(IV), de l'acide gallique et la solution binaire (Ce(IV) + Acide gallique)

Avant d'entreprendre les expériences effectuées dans ce test pour l'évaluation de la capacité antioxydante, nous avons examiné la stabilité du cérium seul et en présence de l'acide gallique à différentes concentrations. Comme le montre la figure.3, la solution du Ce (IV) présente un large domaine de stabilité qui dépasse les 60 min.

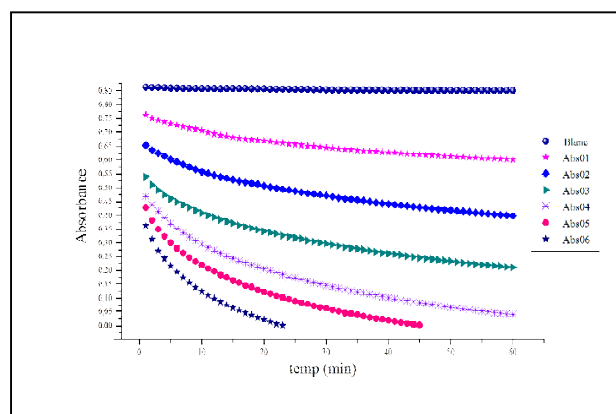


Fig. 3. Suivi cinétique de la réaction de cérium(IV) avec l'acide gallique à différentes concentrations

Le protocole expérimental adapté est décrit en deux étapes

Etape 01 : Choix d'un temps de la réaction :

Nous avons choisis trois composés standard pour l'optimisation, pour chaque standard (acide gallique, acide ascorbique, ou le Trolox), une gamme de concentrations est préparée puis une solution diluée de Ce(IV) est ajoutée, la variation de l'absorbance à 318 nm est alors mesurée immédiatement, à chaque minute durant une heure. L'ensemble des mesures permet de tracer pour chacun, la cinétique de la réaction (Figure.4) À partir de ces courbes, la quantité de Ce(IV) restante est déterminée pour chaque concentration lorsqu'un palier est atteint. D'après ces courbes nous avons choisis 40 minutes comme temps d'incubation de la réaction.

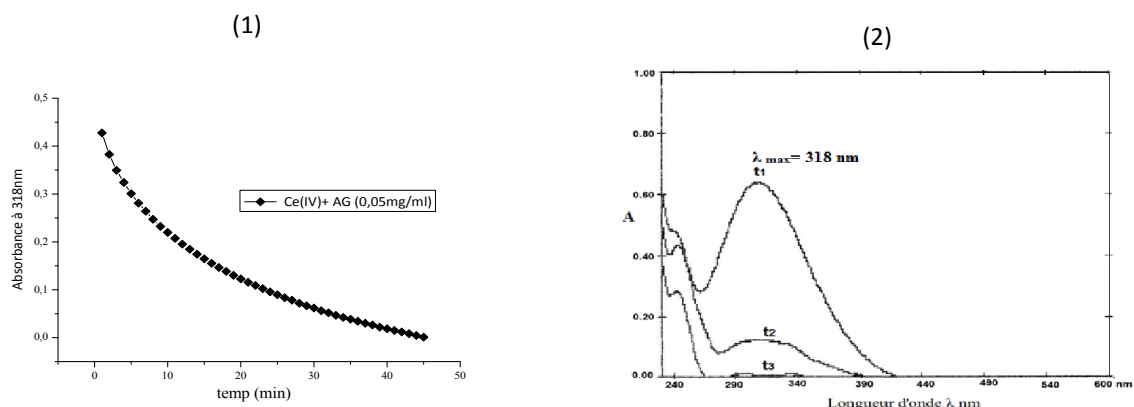


Fig. 4. (01): Suivi cinétique de la réaction de (Cérium+ AG (0.05mg/ml)). (02) : Disparition de cérium (IV) et l'apparition de cérium (III) après : ($t_1 = 5$ min), ($t_2=15$ min), et (t_3 après 40min)

Etape 02 : Mesure de l'activité antioxydante :

Pour déterminer la valeur d'IC50 avec le test de cérium et examiner les différents indices d'activité antioxydant, trois concentrations de Ce (IV) sont choisies 99.87, 75.159, 60.127 $\mu\text{g/ml}$. L'addition d'un antioxydant dans une solution de Ce(IV) conduit à une décoloration de ce dernier qui est directement proportionnelle à la capacité antioxydante du produit ajouté. Cette décoloration peut être suivie par spectrophotométrie en mesurant la diminution de l'absorbance à 318 nm. Des solutions de Ce(IV) sont incubées pendant 40 minutes en absence (du contrôle) ou en présence de concentrations décroissantes des antioxydants, Acide gallique 0.1 mg/l, Acide ascorbique (0.24 mg/ml) et le Trolox (0.044 mg/ml) et les extraits de l'*Artemisia Campestris*, le *Juniperus Phoenicea* et le *Thymus Algeriensis*

3 RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Les teneurs en phénols totaux ainsi que les teneurs en flavonoïdes des extraits phénoliques de l'*Artemisia Campestris*, le *Juniperus Phoenicea*, et le *Thymus Algeriensis* sont présentés dans le tableau 01.

Tableau 1. Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes

Extrait	Teneur en polyphénole mg EAG/g	Teneur en flavonoïde mg ER/g
<i>A. campestris</i>	13.655 \pm 0.101	3.893 \pm 0.348
<i>J. phoenicea</i> ,	9.445 \pm 0.403	5.338 \pm 0.619
<i>T. algeriensis</i>	10.646 \pm 0.234	4.859 \pm 0.206

3.1 ACTIVITÉ ANTI-OXYDANTE

3.1.1 TEST DPPH

Les résultats de l'analyse par le test de DPPH ou de cérium sont exprimés par la valeur de l'IC50. L'activité est définie par l'indice de la réduction de l'activité anti-radicalaire en pourcentage I% ou RSA% (Radical Scavenger Activity) déterminé par la relation suivante : [4,13].

$$I\% = [(Abs_0 - Abs_1) / (Abs_0)] \times 100$$

Où (Abs₀) est l'absorbance du blanc et (Abs₁) est l'absorbance en présence de l'antioxydant à différentes concentrations.

La valeur de l'IC50 varie en fonction de la nature de l'échantillon et de la concentration finale résiduelle du DPPH [13]. Récemment deux grandeurs ont été introduites pour uniformiser le test du DPPH et pour pouvoir comparer l'activité antioxydante entre deux composés différents. En effet, ces grandeurs, appelées indices, sont indépendantes de la concentration initiale du DPPH. Ces indices sont définis comme :

- **Indice d'activité antioxydante AAI déterminé par la relation suivante** [3] :

$$AAI = (\text{Concentration finale de DPPH } (\mu\text{g.ml}^{-1})) / (IC_{50} (\mu\text{g.ml}^{-1}))$$

L'indice AAI varie proportionnellement avec la capacité antioxydante de l'antioxydant

- **Unité d'activité antioxydante AAU déterminé par la relation** [4]:

$$AAU = 394.32 \times (R) / (B \times C \times Mr)$$

Où (R) est le rapport volumique de l'échantillon au volume de solution de DPPH pour chaque réaction. (B) : est la pente de la courbe d'étalonnage de l'inhibition de l'acide gallique ou du Trolox. (C) : est la concentration initiale de la solution du DPPH (g.ml⁻¹). (Mr) : est le poids moléculaire de l'échantillon.

Cet indice est spécialement utilisé pour des composés purs, il est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante de l'antioxydant.

Les courbes corrélatives d'AAU des échantillons sont tracées en fonction de la concentration de l'échantillon contre le pourcentage de l'inhibition. Nous avons déterminé les valeurs IC50 graphiquement (Figure.5). Par la suite les indices AAU et AAI de l'activité antioxydant correspondant à chaque concentration de DPPH ou de Ce(IV) sont déterminés. Les valeurs moyennes des trois concentrations différentes sont présentées dans les tableaux.2 (A et B).

L'activité antioxydante par le test du cérium qui est exprimée par « indice d'activité antioxydante » (AAI) ou « unité d'activité antioxydant » (AAU) sont calculés de la même façon comme dans le test du DPPH.

Comme le montre le tableau (2) ; la variation des indices AAI et AAU en fonction de la concentration initiale du DPPH est faible. En effet, ces indices sont indépendants des concentrations choisies. Nous avons obtenu des coefficients de variations inférieurs à 3%. La détermination de ces indices a une grande importance dans la comparaison de l'activité antioxydante entre les substances à analyser. D'après ce test l'extrait de l'Artemisia (AAI) a la capacité antioxydante la plus faible par rapport aux deux autres extraits de *Juniperus* et *Thymus* (AAI).

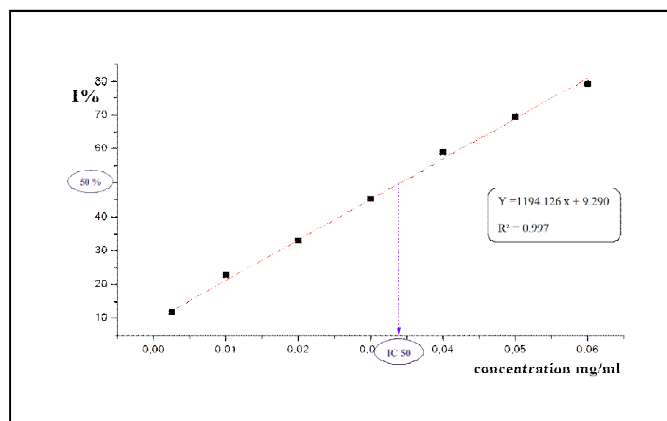


Fig. 5. Détermination graphique de la valeur IC50 %.

3.1.2 TEST AU CÉRIUM

En présence d'un antioxydant la force d'absorption de la solution de cérium est diminuée en présence d'un antioxydant standard ou des extraits des plantes utilisés. Le pourcentage d'inhibition, les indices AAI et AAU sont calculé de la même manière comme dans le test du DPPH. Les courbes corrélatives d'AAU des échantillons ont été tracées en fonction de la concentration de l'échantillon en fonction du pourcentage de l'inhibition. Les indices AAU et AAI de l'activité antioxydante correspondant à chaque concentration de Ce(IV) sont déterminés. Les valeurs moyennes des trois concentrations différents sont présentées dans le tableau 2.

La méthode spectrophotométrie développée de la capacité antioxydante totale due aux antioxydants est basée sur la réaction redox entre les antioxydants et le sulfate de cérium (Ce (IV)) à la température ambiante, la concentration du Ce(IV) restante est mesurée. Le choix d'une longueur d'onde maximale pour le Ce (IV) est important, et l'acidité de la solution devrait être correctement ajustée. Les solutions de cérium(IV) est remarquablement stable dans l'acide sulfurique pendant une longue période elles n'ont pas besoin d'être protégées de la lumière [4].

Les courbes d'étalonnage des antioxydants choisis (c.-à-d., Trolox, acide ascorbique, acide gallique), sont tracées. Ces courbes présentent des domaines de linéarité acceptable pour les trois concentrations de Ce(IV) (99.87, 75.159, 60.127 µg/ml). Les valeurs de l'IC50% ont été déterminées graphiquement pour chaque composé et les indice AAI et AAU correspondants sont calculé et représentés dans le tableau 02B.

Dans ce test le Trolox à la capacité d'antioxydant la plus forte avec des valeurs moyennes respectives de AAI et AAU égales à 5,2, 5,29, 5,22 et à 0,330, 0,339, 0,327 avec un écart type relatif (a RSD%) de 0,902%, et 1,801% respectivement. Les valeurs IC50 pour les trois concentrations différentes de la solution de Ce(IV) (99.87, 75.159, 60.127 µg/ml) ont des valeurs différentes avec un écart type relatif (a RSD%) de 25,67%. La même constatation est observée pour l'acide ascorbique et l'acide gallique. L'Artemisia présente la capacité antioxydante la plus faible par rapport aux standards et aux autres extraits de *Juniperus* et de *Thymus*. Ces résultats indiquent que ces indices AAU et AAI sont constant à différentes concentrations du cérium. Donc ils sont plus adéquats que le IC50% pour la comparaison de la force antioxydant entre deux composés différents.

Tableau 2. Les valeurs des (AAI) (AAU) et leurs comparaisons à celles d'IC50 à différentes concentrations finales de DPPH et de Ce(IV)

A Composés	DPPH ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	Valeurs moyennes					
		IC ₅₀	AAI	AAU	Coefficient de variation		
					RSD _{IC50} %	RSD _{AAI} %	RSD _{AAU} %
Acide gallique	23.65	50.31	0.4709	2.54	4.648	4.608	4.82
	27.6	56.05	0.4925	2.43	1.888	1.873	2.098
	31.54	61.983	0.497	2.373	3.10	3.20	4.67
	^a RSD%	8.492	2.340	2.831			
Trolox	23.65	120.153	0.1981	4.136	0.992	0.995	0.301
	27.6	147.233	0.1874	4.386	2.700	3.737	1.955
	31.54	169.68	0.1858	4.45	0.916	0.922	1.388
	^a RSD%	13.898	2.867	3.133			
Artemisia	23.65	112.22	0.280	-	0.212	0.168	-
	27.6	100.83	0.2736	-	2.923	3.010	-
	31.54	89.434	0.2654	-	2.735	2.382	-
	^a RSD%	9.226	2.188				
Juniperus	23.65	97.12	0.3246	-	0.15	0.123	-
	27.6	78.456	0.347	-	2.889	2.593	-
	31.54	74.83	0.317	-	3.60	3.66	-
	^a RSD%	9.765	3.864				
Thymus	23.65	89.95	0.350	-	0.387	0.356	-
	27.6	84.383	0.3315	-	2.279	0.150	-
	31.54	77.153	0.306	-	3.656	3.575	-
	^a RSD%	6.249	2.71				

B Composés	Ce(IV) ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	Valeurs moyennes					
		IC ₅₀	AAI	AAU	Coefficient de variation		
					RSD _{IC50} %	RSD _{AAI} %	RSD _{AAU} %
Acide gallique	60.127	20.38	2.95	0.87	0.427	0.439	5.925
	75.159	25.04	2.996	0.868	1.415	1.500	1.551
	99.87	34.11	2.928	0.874	1.831	1.826	2.081
	^a RSD%	26,3373	1,1730	0,3508			
Acide ascorbique	60.127	40.35	1.426	2.023	5.306	5.56	3.432
	75.159	52.66	1.49	1.732	3.441	3.634	3.121
	99.87	68.586	1.456	1.82	1.413	1.395	2.941
	^a RSD%	18,5760	1,6321	3,5036			
Trolox	60.127	11.56	5.2	0.330	5.91	0.611	0.147
	75.159	14.12	5.29	0.327	0.283	0.756	5.62
	99.87	19.10	5.22	0.339	0.340	0.383	1.21
	^a RSD%	25,6766	0,9024	1,8018			
Artemisia	60.127	60.36	0.996	-	0.924	0.0262	-
	75.159	75.66	0.994	-	3.4366	0.0469	-
	99.87	104.2	0.999	-	4.384	0.0393	-
	^a RSD%	27,7822	0,2525				

<i>Juniperus</i>	60.127	26.14	2.3	-	0.704	2.41	
	75.159	31.62	2.376	-	1.598	0.1189	-
	99.87	41.92	2.38	-	2.878	0.159	-
	^a RSD%	24,1089	1,8548				
<i>Thymus</i>	60.127	24.54	2.45	-	0.065	0.065	-
	75.159	28.08	2.56	-	1.088	0.077	-
	99.87	43.14	2.31	-	0.145	0.01	-
	^a RSD%	30,9396	5,1352				

IC50:µg/ml. ^aRSD% : est le coefficient de variation dévient des essais des trois concentration (23.65, 27.6, 31.54 µg/ml) de DPPH ou les trois concentration(60.127,

75.159, 99.87 µg/ml) de Ce(IV) étudiés. .RSD% est le coefficient de variation dévient des trois essais effectués pour chaque concentration de DPPH ou de Ce(IV)

4 CONCLUSION

L'activité antioxydante d'un nombre importants des extractions des composés naturels ont été largement étudié par différentes méthodes (DPPH, ABTS ...). Néanmoins de nouvelles méthodes, techniques et de nouveaux réactifs sont actuellement introduits dans la valorisation des plantes médicinales.

L'objectif de ce travail est de comparer une nouvelle méthode d'activité anti-oxydante, essai du Cérium avec celle du test DPPH. Deux nouveaux indices d'activité antioxydants AAI et AAU ont été vérifiés sur quelques standards l'acide gallique, l'acide ascorbique et le trolox puis appliqués aux extraits méthanoliques de trois plantes l'Artemisia, le Juniperus, et le Thymus.

En premier lieu, l'évaluation de la capacité antioxydant par la méthode de DPPH et par la méthode du cérium a été réalisé par la détermination du IC50 et des indice AAI et AAU. Les résultats obtenu ont révélé que les valeurs IC50 (µg/ml) de chaque standard varient en fonction de la concentration du DPPH ou du cérium (IV) alors que celles des indices AAI et AAU n'ont aucune différence significative. Nous avons obtenu une valeur du coefficient de variation ne dépassant pas les 3% pour les deux étalons d'acide gallique et le trolox dans le cas du DPPH et 2.5% pour les trois standards. Comparer à la solution du DPPH, la stabilité, de la solution du Ce(IV) utilisée pour la détermination de l'activité est remarquablement stable dans l'acide sulfurique pendant une longue période. Les courbes d'étalonnage des antioxydants choisis (Trolox, Acide ascorbique, Acide gallique), présentent des domaines de linéarité acceptables pour les trois concentrations de Ce(IV) (99.87, 75.159, 60.127µg/ml). Les coefficients de corrélation sont proches d'unité. Le dosage quantitatif des polyphénols totaux, par le réactif de Folin-Ciocalteu a révélé que l'Artemisia est plus riche en polyphénols que le Juniperus et le Thymus. Le dosage quantitatif des flavonoïdes par la méthode d'AlCl₃ a révélé que le Juniperus est plus riche en flavonoïdes que le l'Artemisia et le Thymus. Les résultats du test de DPPH et de cérium ont montré le même classement des extraits dans leur activité inhibitrice. L'Artemisia présente une activité antioxydante la plus faible par rapport aux extraits de Juniperus et le Thymus qui prestent des valeurs comparables. Une bonne corrélation ($R^2 = 0.994$) est obtenue entre les deux méthodes et donc les deux essais sont comparables.

REFERENCES

- [1] Jiri S, Marketa R, Olga K, Petr S, Jaromir H, Vojtech A, Libuse T, Ladislav H, Miroslava B, Josef Z, Ivo Pand Rene K, "Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages", *Journal of Molecules*, 15, pp. 8618-8640, 2010.
- [2] Ozcelik, O., Lee, J. H., & Min, D. B, "Effects of light, oxygen and pH on the Absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl", *Journal of Food Science*, 68, pp. 487-490, 2003.
- [3] Rodrigo S, and Helena T.G, Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Journal of Food Chemistry*, 112, pp. 654-658, 2009.
- [4] Jing D, WangyuanCh, Guangzhong Y, "A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay", *Journal of Food Chemistry*, 125, pp. 1430-1435, 2011.
- [5] Marie-Josèphe Amiot, Annie Fleuriet, and Jean- Jacques Macheix, "Importance and évolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation", *Journal of Agric. Food chem*, 34, pp.823-826, 1986.

- [6] C.P. Singleton, J.A. Rossi, "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents", *Am. J. Enol. Vitic.* 16, pp144, 1965.
- [7] Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. "Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds", *Journal of Food Chem* 97, pp. 654-660, 2006.
- [8] Ito, N., Hirose, M., Fukushima, S., Tsuda, H., Shirai, T., & Tatematsu, M, "Studies on antioxidants: Their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis", *Journal of Food Chemistry and Toxicology*, 24, pp. 1099-1102, 1986.
- [9] Blois M.S, "Antioxidant determinations by the use of stable free radical", *Journal of Nature*, 181, pp. 1199-1200. 1958
- [10] Sharma, O. P., & Bhat, T. K. DPPH antioxidant assay revisited, *Journal of Food Chemistry*, 113, pp.1202-1205, 2009.
- [11] Dilek O, Birsen, Resat A, "Determination of total antioxidant capacity by a new spectrophotometric method based on Ce (IV) reducing capacity measurement" , *Journal of Talanta*, 71, pp.1155-1165, 2007.
- [12] Mendham, Denney, Barnes, Thomas, *Analyse chimique quantitative de Vogel, Ed de Boeck université* ,2006.
- [13] Molyneux P., "The use of stable free radical diphenyl picrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity", *Journal of Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26 (2), pp.211-219, 2004.