

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITÉ SALAH BOUBNIDER CONSTANTINE 3

Faculté de médecine

Département de pharmacie



Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de

Docteur en Pharmacie

**Évaluation du pouvoir antioxydant de l'acide
ascorbique par une méthode de PFRAP
optimisée via un plan Box-Behnken**

Réalisé et présenté par :

GHELLAB Ayat Errahmane

LEZGHEB Amani

SEKHSOUKH Alya

Encadré par :

Dr. DJAOU M Maitre-assistante

Hospitalo-Universitaire en

Chimie Analytique

Membres du jury :

Pr. LALAOUNA Abd El Djalil

Pr. TITEL Faouzi

Année universitaire : 2024/2025

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

DEDICACES

TABLE DES MATIERES	v
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES ABREVIATIONS	xiv
RESUME	xx
ABSTRACT	xxi
ملخص	xxii
INTRODUCTION	1

REVUE DE LA LITTÉRATURE

CHAPITRE I: Fondements théoriques : réactions d'oxydoréduction et radicaux libres

1.Les réactions d'oxydoréduction (principe général).....	5
2.Exemples de réaction d'oxydoréduction	5
3.Qu'est-ce qu'un radical libre	6
3.1 Définition et caractéristique	6
3.1.1 Définition.....	6
3.1.2 Caractéristiques	6
3.2 Origine des radicaux libres dans l'organisme	7
3.2.1 Les radicaux libres d'origine endogène.....	7
3.2.2 Les radicaux libres d'origine exogène.....	8
3.3 Les types des radicaux libres	8
3.3.1 Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO)	8
3.3.2 Espèces Réactives de l'Azote (RNS)	11
3.3.3 Espèces Réactives du Soufre (ERS)	12
3.3.4 Espèces Réactives du Carbone (ERC).....	13

3.3.5 Radicaux Métalliques	13
4.Principales cibles biologiques des ERO.....	14
4.1 L'acide désoxyribonucléique ou L'ADN	14
4.2 Les protéines.....	15
4.3 Les Lipides membranaires.....	15
4.4 Les Lipoprotéines	16
5. Rôle physiologique des radicaux libres.....	16

CHAPITRE II : Stress oxydant : concepts et implications biologiques

1. Définition du stress oxydant.....	19
2. Origine du stress oxydant.....	19
3. Mécanismes cellulaires du stress oxydant.....	21
4. Conséquence du stress oxydatif	22
5.Stress oxydant et pathologies humaines.....	23
5.1 L'inflammation	23
5.2 Diabète sucré	24
5.2.1 Auto-oxydation du glucose.....	26
5.2.2 Glycation des protéines	26
5.2.3 Polyols	27
5.2.4 Protéine kinase.....	27
5.3 l'insuffisance cardiaque	28
5.4 Athérosclérose	28
5.5 Le cancer.....	29
5.6 Maladies neurodegeneratives	30
5.6.1 La maladie d'Alzheimer.....	31
5.6.2 La maladie de parkinson.....	32
5.6.3 Sclérose latérale amyotrophique (SLA)	32
5.7 Vieillesse	32

CHAPITRE III : Les antioxydants : défense contre le stress oxydatif

1. Définition des antioxydants.....	35
2. Classification des antioxydants	36
3. Mécanismes d'action des antioxydants	37
3.1 Les antioxydants endogènes	37
3.1.1 Les systèmes de défense enzymatiques	37
3.1.2 Les antioxydants non enzymatiques	41

3.2 Les antioxydants exogènes	47
3.2.1 Les anti-oxydants naturels	47
3.2.2 Anti-oxydants de synthèse	53
4. Les utilisations des antioxydants	54

CHAPITRE IV : Évaluation de l'activité antioxydante in vitro

1. Techniques spectrophotométriques	56
1.1 Les tests basés sur une réaction de transfert d'atome d'hydrogène (HAT – Hydrogen Atom Transfer).....	56
1.1.1 Le teste ORAC	56
1.1.2 Test ABTS.....	58
1.2 Les tests basés sur une réaction de transfert d'électron (ET – Electron Transfer)	59
1.2.1 Le test au DPPH	60
1.2.2 Test de FRAP	61
1.2.3 Méthode PFRAP (Potassium Ferricyanide Reducing Antioxidant Power)	62
1.2.4 Test TEAC	63
1.2.5 Test de CUPRAC.....	64
2. Techniques électrochimiques	66
2.1 La voltampérométrie cyclique	66
2.2 La méthode ampérométrique	67
2.3 La méthode biampérométrique.....	68
3 Méthodes chromatographiques	68
3.1 Chromatographie phase gazeuse	68
3.2 Chromatographie liquide haute performance (HPLC)	68

CHAPITRE V : Optimisation expérimentale : approche par plan d'expérience

1. Le plan d'expérience (design of experiments DOE).....	72
2. Notions fondamentales des plans d'expériences	72
2.1 Notion d'espace expérimental	72
2.2 Notion de surface de réponse.....	75
2.3 Notion de modélisation mathématique	76
3. Les différents types de plans d'expériences	76
3.1 Plan factoriel.....	76
3.1.1 Plan factoriel complet.....	76
3.1.2 Plan factoriel fractionnaire	77

3.2 Plans pour surface de réponse	77
3.2.1 Plan composite centré (Central Composite Design – CCD)	78
3.2.2 Plan de Box–Behnken	78
3.2.3 Plan de Doehlert	80

PARTIE PRATIQUE

1. Introduction	82
2. Matériels et réactifs	82
2.1 Matériels	82
2.2 Réactifs	83
2.2.1 Les produits chimiques de qualité analytique.....	83
2.2.2 Standards	84
2.3 Préparation des solutions	84
2.4 Développement de la méthode de dosage de l'activité antioxydante de la vitamine C	86
2.4.1 Choix de la méthode d'évaluation du pouvoir antioxydant.....	86
2.4.2 Protocole de la méthode PFRAP utilisant le ferricyanure	87
2.5 Réactions mises en jeu.....	90
2.5.1 Réduction du ferricyanure par l'acide ascorbique.....	90
2.5.2 Arrêt de la réaction avec l'acide trichloroacétique (TCA)	90
2.5.3 Réaction de coloration (complexation du fer)	91
3. Plans d'expériences	91
3.1 Définition de design expert	91
3.2 Choix du modèle.....	92
3.3 Choix des paramètres expérimentaux.....	93
3.4 Matrice d'expérience	94
3.5 Modélisation du modèle statistique	98
4. Interprétation du modèle	105
4.1 Diagnostique.....	105
5. Résultat et discussion	108
5.1 ANOVA	108
5.2 Effet des facteurs	109
5.3 Interaction des facteurs.....	112
5.4 Étape d'optimisation des conditions expérimentales.....	116
5.5 Étape de confirmation expérimentale	117

CONCLUSION	119
SOMMAIRE	121
BIBLIOGRAPHIE	122
ANNEXES	131

RESUME

Les antioxydants jouent un rôle essentiel dans la neutralisation des radicaux libres, responsables de divers désordres cellulaires et du vieillissement prématuré. Leur activité permet de protéger les systèmes biologiques contre le stress oxydatif, d'où l'intérêt croissant pour leur évaluation dans les domaines pharmaceutique, alimentaire et cosmétique.

Parmi ces composés, l'acide ascorbique se distingue par son fort potentiel antioxydant et sa large utilisation dans diverses formulations. L'évaluation de son activité nécessite des méthodes analytiques fiables et reproductibles.

Dans cette étude, nous avons choisi d'exploiter la méthode du Pouvoir antioxydant réducteur du ferricyanure de potassium pour le dosage de l'activité antioxydante de l'acide ascorbique. Afin d'optimiser les conditions expérimentales, un plan d'expérience de type Box-Behnken a été appliqué pour étudier l'influence de cinq facteurs : le pH, la température, le temps d'incubation, le volume de FeCl_3 et le volume de ferricyanure.

Le traitement statistique des données, réalisé à l'aide du logiciel Design Expert (version 12), a permis de modéliser la réponse, de déterminer les facteurs les plus influents et d'identifier les conditions optimales.

Les résultats obtenus constituent une base solide pour la validation future de cette méthode en tant qu'outil analytique applicable à l'évaluation de l'activité antioxydante de l'acide ascorbique.

Mots-clés : Antioxydants, acide ascorbique, activité antioxydante, méthode du Pouvoir antioxydant réducteur du ferricyanure de potassium, plan Box-Behnken, Design Expert