

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico chimique
Filière : Sciences Biologiques
Option : Biochimie et Biologie Moléculaire



Réf :

Mémoire de fin de cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Extraction, dosage et fractionnement sur
CCM des composés phénoliques des feuilles
de *Melia azedarach*.

Présenté par :
Mouloud TAOUZINET
Soutenu le : 27 Juin 2017

Devant le jury composé de :

Mme : AOUDIA H
Mme : ATMANI D
Mme : CHAHER N

MCB
MCA
MCA

Promotrice
Présidente
Examinatrice

Année Universitaire : 2016 / 2017

Remerciements

Louange à ALLAH, le miséricordieux, qui nous a donné patience et courage, afin d'achever ce travail.

*Nous adressons ensuite nos plus sincères remerciements à notre promotrice **M^{me} AOUDIA H.** pour avoir accepté de nous encadrer et pour son caractère très compréhensif, sa patience, sa disponibilité, ses précieuses orientations, ses conseils hautement précieux ainsi que pour tout le temps qu'elle nous a consacré pour diriger ce travail.*

*Nous remercions également **M^{me} ATMANI D.** pour l'honneur qu'elle nous fait de présider le jury de ce mémoire.*

*Nous tenons beaucoup à remercier aussi **M^{me} CHAHER N.** pour avoir accepté d'être l'examinatrice de ce travail.*

*Nos vifs remerciements s'adressent à **M^r ZAIDI F.** pour ses conseils scientifiques toujours avisés, ses remarques, ses suggestions pertinentes et ses nombreux traits d'esprits, et de nous avoir permis de réaliser la pratique de notre mémoire au sein du laboratoire de Nutrition et Alimentation dont il est à la tête.*

Nous remercions tous ceux et celles qui nous ont marqués par leur soutien et encouragements : tous les membres de notre laboratoire et tous les collègues de la promotion, nous leur exprimons nos respects et nos profondes sympathies.

Enfin nos sentiments de reconnaissance et remerciements vont à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Avec ma gratitude et tous mon amour, je dédie ce travail à :

Mes très chers parents, qui ont consacré leur vie pour bâtir la mienne, qui ont toujours été là pour mes joies ainsi que pour mes peines. C'est avec émotion que je leurs exprime toute mon affection, mon admiration et mon profond respect, j'espère que par ce modeste travail, je vous rends un peu de ce sentiment de fierté que j'éprouve d'être votre fils.

Mes très chères sœurs : Halima et Sonia, pour leurs conseils et leurs encouragements.

Mes amis.

A toute la promotion Biochimie et Biologie Moléculaire « 2016 - 2017 ».



Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Sommaire

Introduction 1

Partie théorique : synthèse bibliographique

I. <i>Melia azedarach</i> L. et ses composés phénoliques	3
I.1. Origine	3
I.1.2. Description botanique de <i>Melia azedarach</i>	3
I.1.3. Classification.....	4
I.1.4. Répartition géographique	4
I.1.5. Nomenclature	5
I.2. Composition phytochimique de <i>Melia azedarach</i>	5
I.2.1. Composition chimique globale	5
I.2.2. Teneurs en composés phénoliques	7
I.2.3. Teneurs en d'autres métabolites secondaires	7
I.3. Classification des polyphénols	7
I.3.1. Les Flavonoïdes	8
I.3.2. Les Tannins.....	10
I.3.2.1. Tannins hydrolysables	10
I.3.2.2. Tannins condensés	11
I.4. Propriétés biologiques des polyphénols	11
I.5. Propriétés biologiques de la plante	12
I.5.1. Intérêt thérapeutique	12
I.5.2. Potentiel insecticide	13
I.5.3. Potentiel antibactérien	13
I.5.4. Potentiel antifongique	14
I.5.5. Potentiel antioxydant	14

Partie expérimentale : Matériel et méthodes

I. Matériel et méthodes 16

I.1. Préparation du matériel biologique végétal	16
I.1.1. Récolte	16
I.2. Préparation de l'échantillon	16
I.2.1. Séchage	16
I.2.2. Broyage et tamisage	17
I.3. Matière sèche	17
I.4. Extraction des composés phénoliques	17
I.5. Dosage des composés phénoliques	18
I.5.1. Dosage des phénols totaux	18
I.5.2. Dosage des flavonoïdes.....	19
I.5.3. Dosages des tanins condensés	19
I.5.4. Dosage des tanins hydrolysables	20
I.6. Fractionnement des extraits par CCM	21
I.6.1. Identification des fractions	21
I.6.2. Test du pouvoir anti-radicalaire du DPPH sur plaque CCM	23
I.7. Analyse statistique	24

Partie expérimentale : Résultats et discussion

II. Résultats	25
II.1. Teneur en composés phénoliques	25
II.1.1. Teneur en phénols totaux	25
II.1.2. Teneur en flavonoïdes	25
II.1.3. Teneur en tannins hydrolysables	26
II.1.4. Teneur en tannins condensés	27
II.2. Analyse des chromatogrammes par CCM	27
II.2.1. Caractérisation dans le système Chloroforme/Méthanol/Acide acétique.....	28
II.2.2. Caractérisation dans le système Toluène/Éthyle acétate/Méthanol	31
II.2.3. Test de DPPH sur plaque CCM	34
III. Discussion générale	36
Conclusion et perspectives	39
Références bibliographiques	40
Annexes.	

Liste des abréviations

CCM : Chromatographie sur couche mince.

CG/SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse.

CLHP : Chromatographie liquide à haute performance.

CMI : concentration minimale inhibitrice.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil.

Eq AG: Equivalent d'acide gallique.

Eq AT: Equivalent d'acide tannique.

Eq Cat: Equivalent de catéchine.

Eq Q: Equivalent de quercétine.

Eq: Equivalent.

MS: Matière sèche.

NNE : Extractif de non-nitrogène.

Rf : Rapport frontal.

RMN : Résonance magnétique nucléaire.

Liste des figures

Numéro de la figure	Titre	Page
Figure 01	Images sur les différentes parties de <i>Melia azedarach</i> .	03
Figure 02	Carte géographique représentant la gamme native et exotique de <i>Melia azedarach</i> .	04
Figure 03	Structure de base des flavonoïdes.	09
Figure 04	Structures génériques des flavonoïdes majeurs.	09
Figure 05	Structure chimique de l'acide gallique.	10
Figure 06	Structure chimique de l'acide ellagique.	10
Figure 07	L'unité de base récurrente des tannins condensés.	11
Figure 08	Photographie du lieu de récolte des feuilles de <i>M.azedrach</i> .	16
Figure 09	Photographie des feuilles de <i>M.azedarach</i> .	16
Figure 10	Extraction des composés phénoliques.	17
Figure 11	Protocole détaillant le dosage des phénols totaux solubles.	18
Figure 12	Protocole détaillant le dosage des flavonoïdes.	19
Figure 13	Protocole de dosage des tanins condensés.	20
Figure 14	Protocole de dosage des tannins hydrolysables.	20
Figure 15	Protocole montrant les étapes de la révélation chimique par la vanilline sulfurique.	22
Figure 16	Protocole détaillant les étapes de la révélation chimique par le chlorure d'aluminium AlCl ₃ .	22
Figure 17	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH et un antioxydant.	23
Figure 18	Protocole détaillant la méthode appliquée pour évaluer l'effet scavenger du radical DPPH sur plaque CCM.	23
Figure 19	Teneur en phénols totaux.	25
Figure 20	Teneur en flavonoïdes.	26
Figure 21	Teneur en tannins hydrolysables.	26
Figure 22	Teneur en tannins condensés.	27
Figure 23	Photographie des chromatogrammes des extraits de feuilles de <i>M.azedarach</i> (Chloroforme/Méthanol/Acide acétique).	29
Figure 24	Photographie des chromatogrammes des extraits de feuilles de <i>M.azedarach</i> (Chloroforme/Méthanol/Acide acétique).	30

Figure 25	Photographie des chromatogrammes des extraits de feuilles de <i>M.azedarach</i> (Chloroforme/Méthanol/Acide acétique).	30
Figure 26	Photographie des chromatogrammes des extraits de feuilles de <i>M.azedarach</i> (Chloroforme/Méthanol/Acide acétique).	31
Figure 27	Photographie des chromatogrammes des extraits de feuilles de <i>M.azedarach</i> (Toluène/Éthyle acétate/Méthanol).	32
Figure 28	Photographie des chromatogrammes des extraits de feuilles de <i>M.azedarach</i> (Toluène/Éthyle acétate/Méthanol).	33
Figure 29	Photographie du test de l'activité anti-radicalaire au DPPH sur plaque CCM (Chloroforme/Méthanol/Acide acétique).	35
Figure 30	Photographie du test de l'activité anti-radicalaire au DPPH sur plaque CCM (Toluène/Éthyle acétate/Méthanol).	36

Liste des tableaux

Numéro du tableau	Titre	Page
Tableau I	Classification botanique de <i>Melia azedarach</i> L.	04
Tableau II	Noms vernaculaires les plus courants de <i>Melia azedarach</i> .	05
Tableau III	Analyses chimiques (moyen \pm carte type) des feuilles de <i>Melia azedarach</i> selon l'étape de maturité.	06
Tableau IV	Analyses phytochimiques d'extrait à éthanol de <i>M.azedarach</i> .	07
Tableau V	Squelettes structurels de composés phénoliques et polyphénoliques.	08
Tableau VI	Potentiels thérapeutiques des feuilles et des graines de <i>M.azedrach</i> .	13
Tableau VII	L'activité antibactérienne de feuilles de <i>M.azedarach</i> par l'essai de diffusion sur disque.	14
Tableau VIII	Fractionnement des extraits par CCM.	28
Tableau IX	Fractionnement par CCM des extraits dans le système d'élution (A).	28
Tableau X	Fractionnement par CCM des extraits dans le système d'élution (B).	31
Tableau XI	Rapports frontaux et colorations des standards dans les deux systèmes.	34

Introduction

) Introduction

Au travers des âges, l'Homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base : nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux (**Gurif, 2006**).

Arbre à feuilles caduques et originaire de l'Inde, portant plusieurs nomenclatures (Margousier, Lilas de Perse, Chinaberry, ...), ce qui explique sa répartition très large et son introduction dans plusieurs pays d'Asie, et d'Amérique et en Afrique du nord (Algérie ...).

Melia azedarach est une plante médicinale appartenant au règne végétal est considérée comme une source importante de molécules bioactives, ces dernières présentent de multiples intérêts dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie. Ces composés regroupent les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes (**Bahorun et al., 1996**).

Les polyphénols présentent un impact positif sur la santé ainsi dans la prévention de différentes maladies comme le cancer, ils permettent aussi d'empêcher la peroxydation lipidique. Ils sont repoussés en raison de leurs divers propriétés physiologiques comme les activités antiallergiques, anti-atherogéniques, anti inflammatoires, hépatoprotectives, antimicrobiennes, antivirales, antibactériennes, anticarcinogéniques, anti-thrombotiques, cardioprotectives et vasodilatatoires (**Middleton et al., 2000 ; Ksouri et al., 2007**), ce qui explique leur grande utilisation dans la fabrication des médicaments.

C'est une plante qui est reconnue et depuis longtemps pour ses vertus médicinales et insecticides (**Bohnenstengel et al., 1999**). Ses extraits ont été étudiés pour des applications médicales potentielles, y compris les propriétés anti-bactériennes, anti-paludiques, antifertilité et antivirales (**Vishnukanta et Rana, 2008**), anti-oxydantes, anti-microbiennes, anti-inflammatoires, cardio-protecteurs, analgésiques, anti-cancéreuses, anti-ulcère, anti-pyrétique, anti-plasmodiales et contraceptives (**Azam et al., 2013**).

L'objectif de notre travail est de déterminer les teneurs en composés phénoliques des feuilles de *Melia azedarach*, ainsi que le fractionnement des extraits sur CCM (chromatographie sur couche mince) et l'évaluation du pouvoir anti-radicalaire du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil) sur plaque CCM.

Synthèse
Bibliographique

I. *Melia azedarach* L. et ses composés phénoliques :

I.1. Origine :

Melia azedarach L. (*Meliaceae*), également connu sous le nom de 'Chinaberry' ou l'arbre de lilas persan, est un arbre à feuilles caduques originaire d'Inde (**Bohnenstengel et al., 1999**) plus précisément du Nord-ouest de l'Inde (**Hajaniaina, 1996**) où il se trouve jusqu'à environ 1800 mètre au-dessus du niveau de la mer (**Capinera, 2008**). Il est largement employé en Argentine comme arbre d'ombre ornementale (**Wachsman et al., 1982**).

I.1.2. Description botanique de *Melia azedarach* :

Le tronc de cet arbre (**figure 01.A**) est sombre et très rameux avec une écorce craquelée de couleur blanche claire, ses feuilles (**figure 01.B**) sont alternes, courtes et minces, persistantes et caduques en particulier au moment de la maturation des fruits, feuillage léger, en buisson d'un vert foncé relativement pâle, contrastant avec le tronc (**Ramya et al., 2009 ; Hajaniaina, 1996**).

Les fleurs blanchâtres (**figure 01.C**) présentent des rayures pourpres et sont caractérisées par la présence d'un parfum typique donnant naissance à des fruits (**figure 01.D**) ou plus précisément des baies jaunes, rondes, lisses et charnues (**Ramya et al., 2009**).

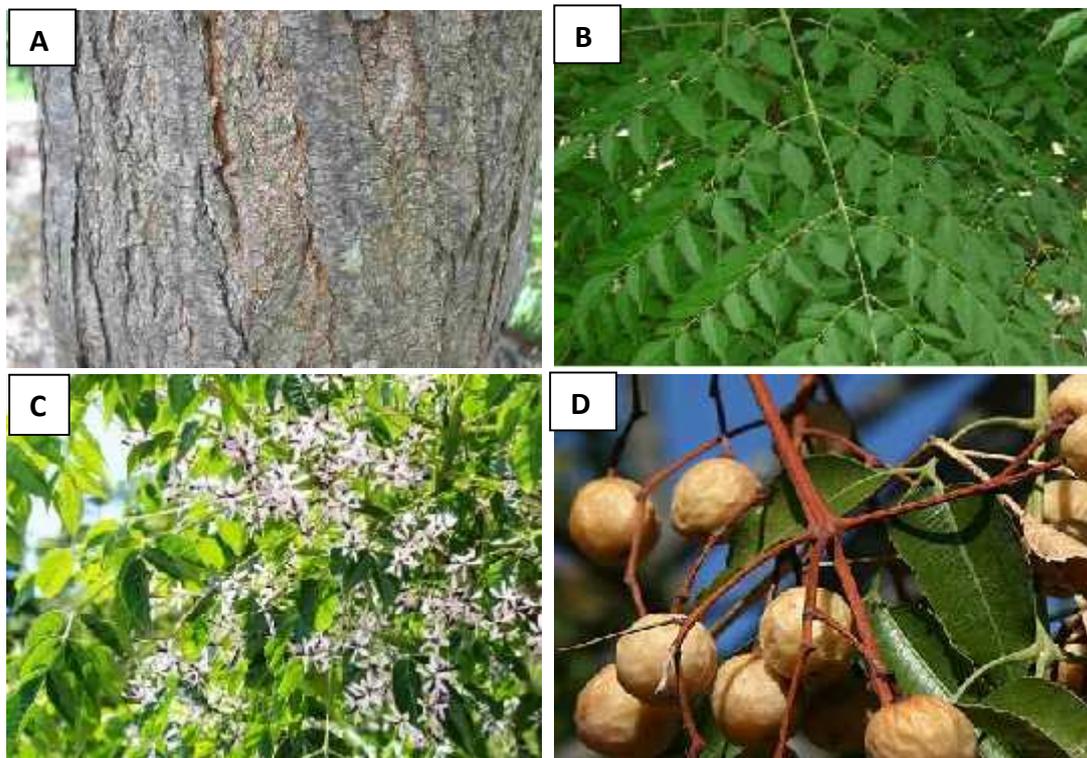


Figure 01 : Images sur les différentes parties de *Melia azedarach* (A : Tronc ; B : Feuilles ; C : Fleurs ; D : Fruits) (**Deepika et Yash, 2013**).

I.1.3. Classification

La classification systématique de *Melia azedarach* L. est représentée dans le **tableau I**.

Tableau I : Classification botanique de *Melia azedarach* L. (Azam et al.,2013).

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Sapindales
Famille	Meliaceae
Genre	<i>Melia</i>
Espèce	<i>Melia azedarach</i>

I.1.4. Répartition géographique

M.azedarach pousse préférentiellement au niveau des zones climatiques chaudes. C'est un arbre indigène au Balushistan, à la vallée de Jhelum et au Kashmir. Toutes fois, il est cultivé et naturalisé tout au long de l'Inde, de la Birmani et de la Péninsule Malaisienne, en Perse et en Chine. Il se retrouve également au sud de l'Europe et dans les régions méditerranéennes comme dans le sud de la France, le nord de l'Italie et en Croatie. Bien que l'arbre de chinaberry soit originaire d'Asie tropicale, il est maintenant largement distribué dans les régions sèches du sud-ouest des États-Unis. (Capinera, 2008), il est également planté en Algérie (**figure 02**).

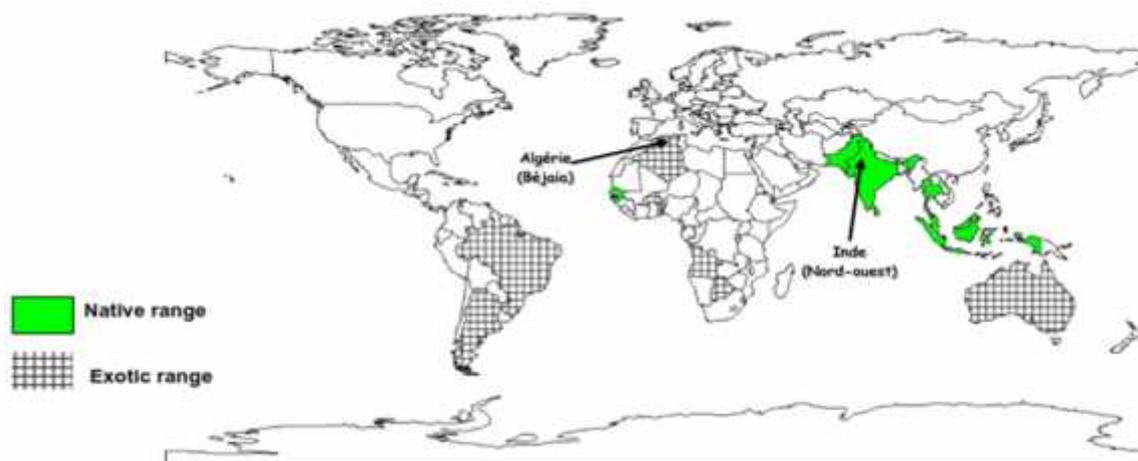


Figure 02 : Carte géographique représentant la gamme native et exotique de *Melia azedarach* (Orwa et al., 2009).

I.1.5. Nomenclature :

De la répartition très large de *Melia azedarach*, découle différentes appellations (**Tableau II**) selon la région où elle se trouve à travers le monde.

Tableau II : Noms vernaculaires les plus courants de *Melia azedarach*.

Localisation Géographique	Nom Vernaculaires	Références
Angleterre	Persian lilac, China tree, Chinaberry	Rishi et singh., 2003 ; Lungu et al., 2011 ; Deepika Sharma et Yash Paul, 2013.
France	Fleurs lilas, Lilas des Indes, Lilas de chine, Lilas de perse, Paraiso, Margousier.	
Amérique du Sud	Paraiso ou paradis, Lilas des Indes ou cèdres blanc.	
Inde	Bakana Nimb, Bakain, Ramyaka	
Singapore	Lelaila, Aleli, Pasilla, Violeta.	
Malaisie	Mindi Kechil, Persischer zedrachbaurn.	
Allemagne	Chewesischer holunder, Poteronosterbaurn, Paradiesbaurn, Persischer fleider.	
Brésil	Cinarnorno	
Chine	Ku /ian	
Argentine	Giant Paradis	
Afrique de sud	Syringa tree	
Jordanie	Zanzalacht	

I.2. Composition phytochimique de *Melia azedarach* :**I.2.1. Composition chimique globale :**

D'Après **Chifelle et al., (2009)**, les feuilles de *Melia azedarach* contient des cendres, protéines et des fibres (**Tableau III**) à différences étapes de son évolution.

Tableau III : Analyse chimique des feuilles de *Melia azedarach* selon l'étape de maturité (Chiffelle *et al.*, 2009).

Analyses (%)	Feuille	
	Juvenile	Mûre
Cendres	13.14 ± 0.02	11.92 ± 0.47
Protéines	6.60 ± 0.32	6.10 ± 0.28
Lipides	2.80 ± 0.08	1.08 ± 0.10
Fibres crues	10.94 ± 0.33	10.33 ± 0.39
NNE	66.52 ± 0.75	70.57 ± 1.24

NNE : extractif de non-nitrogène.

Plus de 280 limonoïdes ont été isolés et identifiés à partir de plantes de la famille des *Meliaceae*. Les constituants les plus actifs de *M. azedarach* sont classés parmi les limonoïdes C-seco de type azadirachtin et les limonoïdes apo-euphol comme les trichilines avec un 14,15-époxyde et un pont de lactol C-19 / C-29. **Alché *et al.* (2003)** ont rapporté l'isolement d'un limonoïde à partir d'extrait de feuilles de *Melia azedarach* qui est le 1-cinnamoyl-3,11-dihydroxymeliacarpin.

On retrouve aussi des tétranortriterpénoïdes toxiques (méliatoxines A₁, A₂, B₁, B₂) isolés des fruits de *M. azedarach*. Les principaux constituants insecticides de *M. azedarach* ont été isolés à partir d'extraits méthanoliques de fruits verts et se sont révélés être deux tétranortriterpénoïdes insecticides très puissants. Ces terpénoïdes incluent une nouvelle méliacine appelée 1-cinnamoyl melianone, et une nouvelle dérivée de la méliacarpine appelée 1-cinnamoyl-3, 11-dihydroxy meliacarpin. Des analogues d'azadirachtin ont également été retrouvés dans les extraits de fruits. Les autres limonoïdes de *M. azedarach* sont : azedarchol, nimbin, santonium, sandolactone, acétate ochinique et ochinine, sandanol, la mélianone, la mellanine, le mélianol et de la 1-cinnamoyl melianone (**Capinera, 2008**).

I.2.2. Teneurs en composés phénoliques :

Dans l'analyse préliminaire par CLHP des polyphénols du fruit de *Melia azedarach* réalisé par **Chiffelle et al., (2009)**, a montré la présence de 14 composés dont trois sont des flavonoïdes (catéchine et deux kaempférols).

L'analyse CLHP des extraits éthanoliques à 50% et aqueux des feuilles de *Melia azedarach*, a permis la mise en évidence d'environ 34 composés phénoliques :

16 composés non identifiés, 07 dérivés de l'acide chlorogénique, 02 dérivés de la quercétine, 03 dérivés de l'acide p-coumarique, 02 dérivés du kaempférol-conjugués (**Aoudia et al., 2013**).

I.2.3. Teneurs en d'autres métabolites secondaires :

Le criblage phytochimique préliminaire des extraits éthanoliques de feuilles de *M.azedarach* rapporté par **Ahmed et al. (2008)**, a montré la présence d'alcaloïdes, des terpènes et des saponines (**Tableau IV**).

Tableau IV : Analyses phytochimiques d'extrait à éthanol de *M.azedarach* (**Ahmed et al., 2008**).

Tests phytochimiques	Résultats
Alcaloïdes	++++++
Stéroïdes	++++++
Saponines	++++++
terpènes	++++++

++++++ : Présence de composé

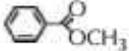
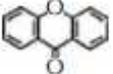
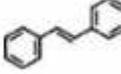
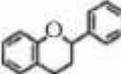
I.3. Classification des polyphénols :

Les polyphénols sont caractérisés par l'existence d'au moins un cycle aromatique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles. Plus de 8 000 structures phénoliques ont été rapportées qui sont largement dispersées dans tout le règne végétal (**Strack, 1997**).

Ces polyphénols se diversifient de simples composés à faible poids moléculaire et anneaux aromatiques simples, à de complexes molécules à haut poids moléculaire comme les tannins. Ils peuvent être classés en fonction du nombre et de la position de leurs atomes de carbone (**Tableau V**) et sont communément conjugués aux sucres et aux acides organiques.

Les polyphénols peuvent être classés en deux grands groupes : les flavonoïdes et les non-flavonoïdes (Crozier *et al.*, 2006).

Tableau V : structure des squelettes de polyphénols (Crozier *et al.*, 2006).

Nombre de Carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C ₆ -C ₁	Acides phénols	Acide gallique	
8	C ₆ -C ₂	Acétophénonnes	Gallacetophénone	
8	C ₆ -C ₂	Acide phénylacétique	Acide <i>p</i> -Hydroxyphénylacétique	
9	C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinamiques	Acide <i>p</i> -coumarique	
9	C ₆ -C ₃	Coumarines	Esculitine	
10	C ₆ -C ₄	Naphthoquinone	Juglone	
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Mangiférine	
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resveratrol	
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes	Naringénine	

I.3.1. Les Flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont l'une des classes de polyphénols les plus importants avec une abondance assez marquée dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge et autres dérivés des plantes (Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006). Ces molécules sont présentes dans toutes les cellules végétales vertes participant au processus photosynthétique (Mukohata *et al.*, 1978) et jouent ainsi un rôle dans la régulation de

l'expression des gènes, le métabolisme et la croissance (Havsteen, 2002). À l'heure actuelle, environ 4000 structures flavonoïdiques ont été élucidées (Endenharder et Grünhage, 2003) présentant un même squelette de base carboné C₆-C₃-C₆ et dérivant d'un composé parent, le 2-phényl chromane (Yao *et al.*, 2004) (figure 03 et 04).

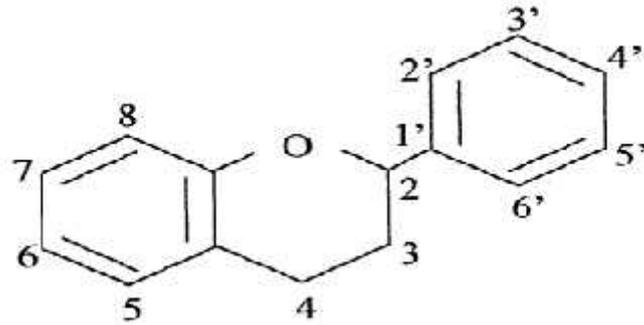


Figure 03 : Structure de base des flavonoïdes (Yoshie-Stark *et al.*, 2003)

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, de leur degré d'hydroxylation et de méthylation, et du degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C, impliquant la présence des doubles liaisons C₂-C₃, du groupe 3-O et la fonction 4-oxo (Yao *et al.*, 2004 ; Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006). En se basant sur le squelette des flavonoïdes, ces derniers peuvent être classés comme suit : anthocyanidines, flavonoles, isoflavonoles, flavones, isoflavones, flavanes, isoflavanes, flavanols, isoflavanols, flavanones, isoflavanones et auronnes (Havsteen, 2002 ; Edenharder et Grünhage, 2003) (figure 04).

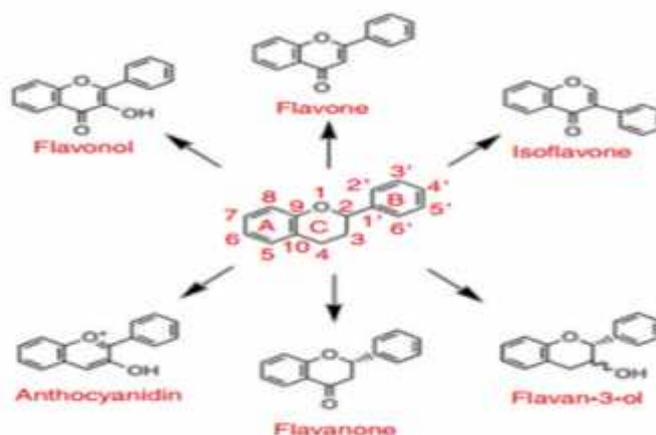


Figure 04 : structures génériques des flavonoïdes majeurs (Crozier *et al.*, 2006)

I.3.2. Les Tannins :

Les tannins représentent un groupe de substances phénoliques polymériques, ayant la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (Haslam, 1996 ; Cowan, 1999). Les tannins sont trouvés dans toute les différentes parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (Scalbert, 1991). Les tannins se divisent en deux groupes qui se différencient de leur structure et de leur origine biologique :

I.3.2.1. Tannins hydrolysables :

Ce sont des oligo ou bien des poly-ester d'un sucre (généralement c'est un D-glucose) et d'un nombre variable d'acide phénolique qui est l'acide gallique (Figure 05) dans le cas des gallotannins, ou bien qui est l'acide ellagique (Figure 06) dans le cas des ellagitannins. (Bruneton, 1993 ; Cowan, 1999).

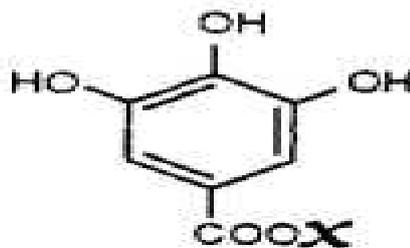


Figure 05 : Structure chimique de l'acide gallique. (Aruoma *et al.*, 1993).

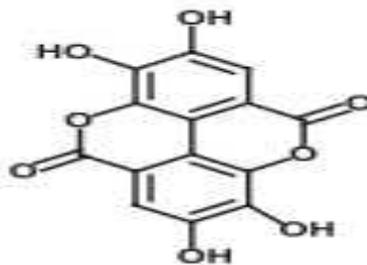


Figure 06 : Structure chimique de l'acide ellagique. (Seeram *et al.*, 2004).

I.3.2.2. Tannins condensés :

Ce sont des oligo ou bien des polymères de flavane-3 ol dérivés de la (+) catéchine ou des nombreux isomères (Macheix, 2005), ce qui leurs donne une structure voisine à celle des flavonoïdes (Figure 07), contrairement aux tannins hydrolysables, les tannins condensés ne possèdent pas de sucre dans leur molécule (Bruneton, 1999).

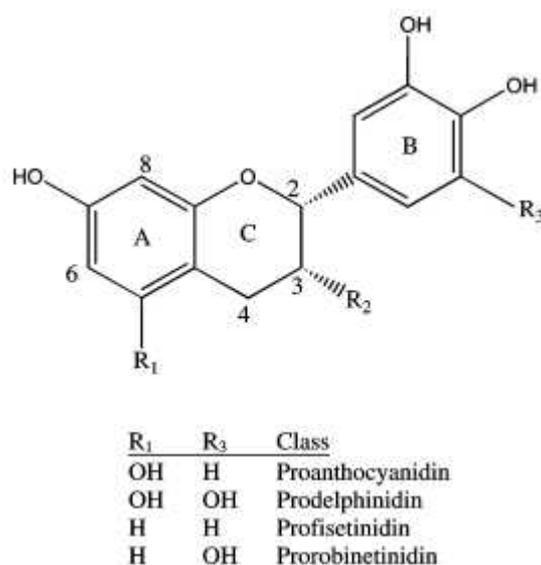


Figure 07 : L'unité de base récurrente des tannins condensés (Schofield *et al.*, 2001).

I.4. Propriétés biologiques des polyphénols :

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en général et les flavonoïdes en particulier sont repoussés en raison de leurs diverses propriétés physiologiques comme les activités antiallergiques, anti-atherogéniques, anti inflammatoires, hépatoprotectives, antimicrobiennes, antivirales, antibactériennes, anti-carcinogéniques, anti-thrombotiques, cardioprotectives et vasodilatatoires (Middleton *et al.*, 2000 ; Ksouri *et al.*, 2007).

Après plusieurs études sur l'impact positif de la consommation des polyphénols sur la santé ainsi que la prévention des différentes maladies, les industriels commercialisent en ce moment des aliments enrichis en polyphénols. De plus leur activité antioxydante empêche la peroxydation lipidique dans le but d'assurer une bonne conservation des denrées alimentaires. Dans l'industrie cosmétique, les composés phénoliques sont appliqués pour lutter contre la production des radicaux libres qui peuvent endommager la beauté de la peau. En phytothérapie les propriétés vasculoprotectrices, sont par exemple aussi bien attribuées aux

flavonoïdes qu'aux autres polyphénols, donc chaque classe chimique est utilisée pour des bénéfices spécifiques (**Hennebelle et al., 2004**).

Les composés des flavonoïdes ont le pouvoir d'empêcher les dommages oxydatifs soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxydes et peroxydes (**Hodek et al., 2002**), soit par chélation des métaux (fer et cuivre), ou bien par l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres (**Van Acker et al., 1998 ; Benavente-García et al., 1997**).

En ce qui concerne les tannins, le pouvoir antioxydant est une propriété très remarquable due à leurs noyaux phénols et la présence des groupes di- ou trihydroxyles sur le cycle B et les groupes méta 5, 7 dihydroxyles sur le cycle A. Les tannins catéchiques chélatent les ions Cu^{2+} qui catalysent l'oxydation des lipoprotéines dans les macrophages *in vitro* (**Yoshida et al., 1999**).

I.5. Propriétés biologiques de la plante :

Depuis longtemps reconnu pour ses vertus médicinales et insecticides (**Bohnenstengel et al., 1999**), ses propriétés antivirales ont conduit les chercheurs à évaluer *Melia azedarach* comme un traitement potentiel pour le virus de l'herpès simplex de type 1 (**Barquero et al., 1997**).

Ses extraits ont été utilisés comme pesticides (**Miller et al., 1995**). Une étude a révélé que les feuilles de chinaberry séchées avaient des effets inhibiteurs limités sur les mauvaises herbes dans les terres cultivées (**Hong et al., 2004**). En Algérie, cette plante est utilisée comme tonique et anti pyrétique (**Oelrichs et al., 1983**).

I.5.1. Intérêt thérapeutique :

D'après **Ben Ghnaya et al., (2013)**, *Melia azedarach* est une plante médicinale, présentant essentiellement un intérêt pharmaceutique. Son contenu est riche en substances qui sont naturellement insecticides (**Hadjiakoondi et al., 2006**). Ses feuilles auraient une action spermicide (**Priscila et al., 2007**). Les extraits de chinaberry ont été étudiés pour des applications médicales potentielles, y compris les propriétés anti-bactériennes, anti-paludiques, antifertilité et antivirales (**Vishnukanta et Rana, 2008**), anti-oxydantes, anti-microbiennes, anti-inflammatoires, cardio-protecteurs, analgésiques, anti-cancéreuses, anti-ulcère, anti-pyrétique, anti-plasmodiales et contraceptives (**Azam et al., 2013**), et plusieurs autres activités qui sont mentionnées dans le **tableau VI**.

Tableau VI : Potentiels thérapeutiques des feuilles et des graines de *M.azedrach* (Al-Rubae, 2009).

Activités médicinales	Organisme ou maladie	Extraits	Références
Antibactérienne	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Shigella flexeneri</i> <i>Plesimonas shigellidis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Feuille	Abdul <i>et al.</i> , (2008)
Antivirale	Fièvre aphteuse Herpès simplex, (VSV) (HSV)(VSV), (HSV1) Herpes Oculaire simplex, (HSV1)	Feuille Feuille Feuille Feuille	Wachsman <i>et al.</i> , (2008) Wachsman <i>et al.</i> , (1982) Alche <i>et al.</i> , (2002) Pifarri <i>et al.</i> , (2002)
Antiprotozoaire	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Graine, Feuille	Lee <i>et al.</i> , (2007)
Antinephrolihiasis	Ethylène glycol-Induced Nephrolthiasis	Feuille, Graine	Christina <i>et al.</i> , (2006)
Antiulcéreuse	Ulcère d'estomac chez les rats	Feuille, Graine	Oursi <i>et al.</i> , (1984)
Anti helminthique	<i>Haemonchus contortus</i>	Feuille, Graine	Maciel <i>et al.</i> , (2006) Akhtar <i>et al.</i> , (2008)

I.5.2. Potentiel insecticide :

M.azedarach est l'une des plantes appartenant à la famille des Méliacées et qui a suscité beaucoup d'intérêt pour l'exploration de son activité insecticide (Timbo, 2003). Elle est connue pour sa richesse en contenu de variété de composés, qui ont montré des propriétés insecticides, anti-appétantes, anti-nutritionnelles (Al-Rubae, 2009), de régulation de la croissance, et de modification du développement (D'Ambrosio et Guerriero, 2002).

Bohnenstengel *et al.* (1999) rapportent l'isolation de trois meliacarpines dérivées des feuilles de *M.azedarach*, l'activité des dérivés qui ont été examinés sur les larves de parasite d'insecte polyphagique de *Spodoptera littoralis* en l'incorporant dans leur régime artificiel dans un essai biologique d'alimentation chronique. Les résultats obtenus indiquent l'activité insecticide comparable au lipopesticide d'azadarachtine qui a été trouvé dans l'arbre de neem.

I.5.3. Potentiel antibactérien :

Asadujjaman *et al.* (2013) ont décrit que l'extrait éthanolique de feuilles de *M.azedarach* a montré une activité antibactérienne contre plusieurs souches bactériennes testées avec des zones d'inhibitions qui s'étendent de 8,40 mm à 10,39 mm et 11,56 mm à

15,87 mm pour 250 µg / disque et 500 µg / disque de l'extrait respectivement (**Tableau VII**). Cette activité peut être due à la présence des alcaloïdes, flavonoïdes, glycosides, saponines et tannins trouvées dans l'extrait éthanolique des feuilles.

Tableau VII : L'activité antibactérienne de feuilles de *M.azedarach* par l'essai de diffusion sur disque.

Souche bactérienne	bactérie	Type de diamètre de la zone d'inhibition (mm)			
		Blanc	A	B	C
<i>Escherichia coli</i>	Gram (-)	-	24,65	10,39	15,87
<i>Salmonella typhi</i>	Gram (-)	-	23,30	8,54	12,15
<i>Shigella dysenteriae</i>	Gram (-)	-	22,12	8,40	11,56
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram (+)	-	22,15	9,45	14,05
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Gram (+)	-	24,34	9,21	12,55

I.5.4. Potentiel antifongique :

Carpinella et al., (2003) ont montré qu'une activité fongistatique est exprimée par les extraits hexaniques et éthanoliques du fruit, amandes et des feuilles sénescents de *M.azdarach* contre *Aspergillus flavus*, *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionales*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium verticillioides*, et *Sclerotinia sclerotiorum*. Que ce soit l'extrait hexanique des feuilles ou l'extrait éthanolique d'amande, tous les deux s'avèrent très efficaces sur toutes les souches fongiques testées avec des valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI) qui s'étendent de 0,5 à 25 mg/ml et 0,5 à 5 mg/ml.

I.5.5. Potentiel antioxydant :

Les antioxydants représentent une classe de substances avec des structures chimiques variées et divers mécanismes d'action (**Pokorny, 2001**), parmi ces substances il existe la bêta carotène, l'albumine, l'acide urique, les oestrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, la vitamine E, et les composés phénoliques (**Mouhammedi, 2006**). Ces derniers possèdent des activités antioxydantes remarquables qui se présentent très souvent dans les plantes appartenant à la famille des Méliacées (**Nahak et sahu., 2010**).

Il est rapporté que les phénols sont responsables de l'activité antioxydante de *M.azedarach* (**Nahak et Sahu, 2010**). Ils présentent cette activité en inactivant les radicaux libres lipidiques ou en empêchant la décomposition des hydroperoxydes en radicaux libres ; le plus important est leur réaction avec des produits chimiques exempts de lipides pour former

un produit inactif ; des recherches récentes suggèrent que les antioxydants ont un rôle dans la limitation des maladies cardiovasculaires et du cancer (**Pokorny *et al.*, 2001**).

L'utilisation d'antioxydants dans des aliments contenant des lipides est une méthode pour minimiser la rancidité, ralentir la formation de produits d'oxydation toxiques, maintenir la qualité nutritionnelle et augmenter la durée de conservation des produits alimentaires (**Judhav *et al.*, 1995**).

***Matériel
&
Méthodes***

I. Matériel et méthodes :

I.1. Préparation du matériel biologique végétal :

I.1.1. Récolte :

Les feuilles de *M.azedarach* sont utilisés comme matériel végétal. Ces feuilles ont été récoltées à Targa Ouzemour, wilaya de Béjaia (**Figure 08**).



Figure 08 : Photographie du lieu de récolte des feuilles de *M.azedarach*.

I.2. Préparation de l'échantillon :

I.2.1. Séchage :

Les feuilles de *M.azedarach* sont préalablement nettoyées avec de l'eau de robinet pour éliminer la poussière et autres particules contaminants, puis séchées à l'air libre sur la paillasse du laboratoire (**Figure 09**).



Figure 09 : Photographie des feuilles de *M.azedarach*.

I.2.2. Broyage et tamisage :

Une fois sèches, les feuilles ont été réduites en une poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique puis tamisées pour obtenir une poudre dont la taille des particules est 0,5 mm ; la poudre obtenue a été conservée dans des bocaux en verre hermétiquement fermés et à l'abri de la lumière.

I.3. Matière sèche :

) Teneur en eau :

La teneur en eau a été déterminée en introduisant 2g d'échantillon dans des creusets dans une étuve réglée à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. La teneur en eau (%) de la matière végétale est représentée dans la formule suivante :

$$\text{Teneur en eau (\%)} = (P - P1) / P \cdot 100$$

P : masse en g de la prise d'essai avant séchage.

P1 : masse en g de la prise d'essai après séchage.

Le taux de la matière sèche est donné par la formule suivante :

$$\text{Taux de matière sèche (\%)} = 100 - \text{teneur en eau (\%)}$$

I.4. Extraction des composés phénoliques :

La poudre des feuilles de *M.azedarach* délipidées au Soxhlet avec l'hexane comme solvant, ont fait l'objet d'une extraction de composés phénoliques selon la technique décrite par Oomah *et al.*, (2008). Pour se faire, l'éthanol est utilisé comme solvant d'extraction à différentes concentrations (50% et 80%).

) Mode opératoire :

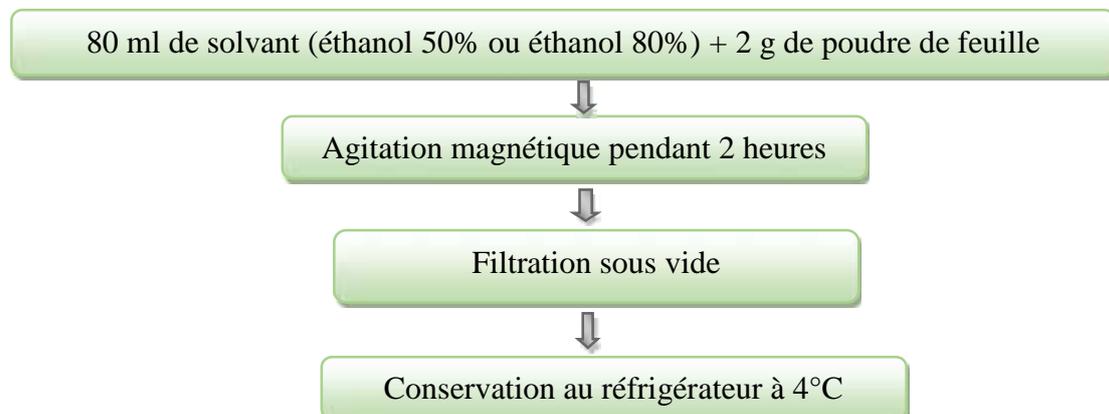


Figure 10 : Extraction des composés phénoliques selon Oomah *et al.*, (2008).

I.5. Dosage des composés phénoliques :

I.5.1. Dosage des phénols totaux :

)Principe

Le principe de cette méthode repose sur l'interaction des composés phénoliques avec le réactif de Folin-Ciocalteu, ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$).

Ce réactif est réduit, lors de l'oxydation des phénols en un complexe de coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques se trouvant dans le milieu, et donnant un maximum d'absorption à une longueur d'onde de 760 nm (Ribéreau-Gayonet *al.*, 1968).

)Mode Opérateur :

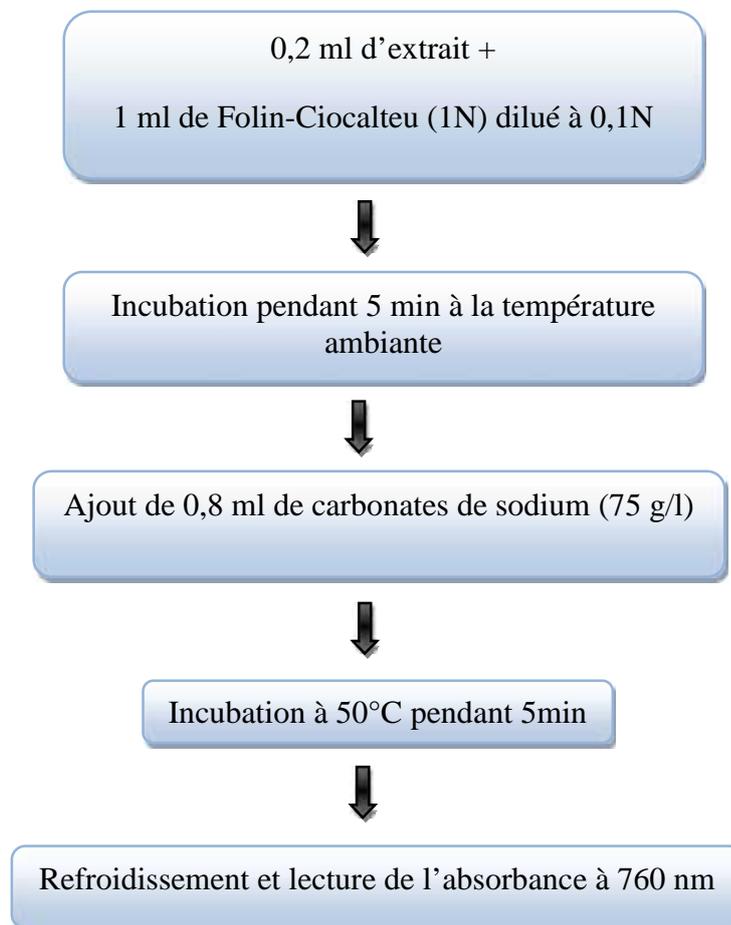


Figure 11 : Protocole détaillant le dosage des phénols totaux (Skerget *et al.*, 2005).

Les teneurs des extraits en phénols totaux sont déterminées en se référant à une courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide gallique (**annexe I**). Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (**mg Eq. AG/gMS**).

I.5.2. Dosage des flavonoïdes

)Principe :

Le dosage des flavonoïdes repose sur leur aptitude à chélater les métaux (fer et aluminium), cette propriété est propre aux groupements hydroxyles des flavonoïdes capables de donner un complexe jaunâtre en présence d'aluminium (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

)Mode Opératoire :

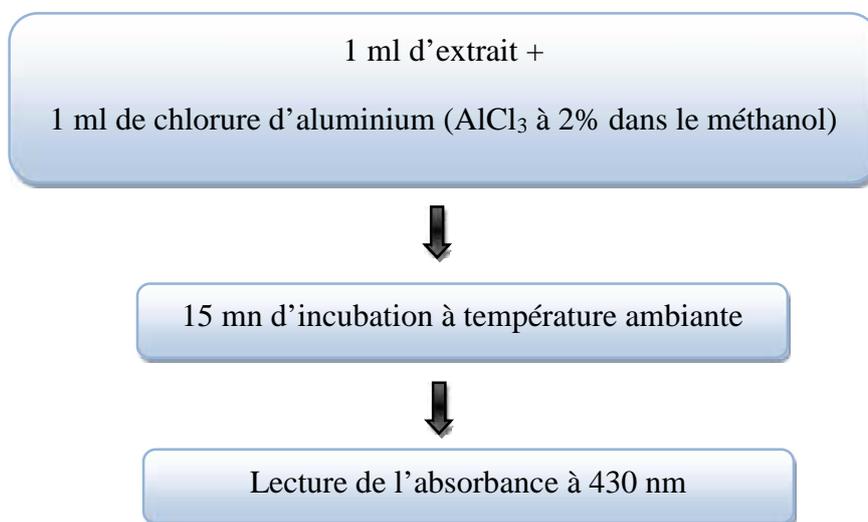


Figure 12 : Protocole détaillant le dosage des flavonoïdes
Djeridane *et al.* (2006).

Les teneurs en flavonoïdes ont été déterminées en se référant à une courbe d'étalonnage utilisant la quercétine comme standard (**annexe I**). Les résultats ont été exprimés en milligramme équivalent en quercétine par gramme de matière sèche (mg Eq. Q/g MS).

I.5.3. Dosages des tannins condensés :

)Principe :

L'estimation du contenu en tannins condensés également connu sous le nom de proanthocyanidines (dérivés polymériques de flavan-3-ol) consiste à une dépolymérisation de

ces molécules en milieu acide suivit d'une formation d'anthocyanidols en présence de vanilline analysables à 500 nm (Price *et al.*, 1978).

Mode opératoire :

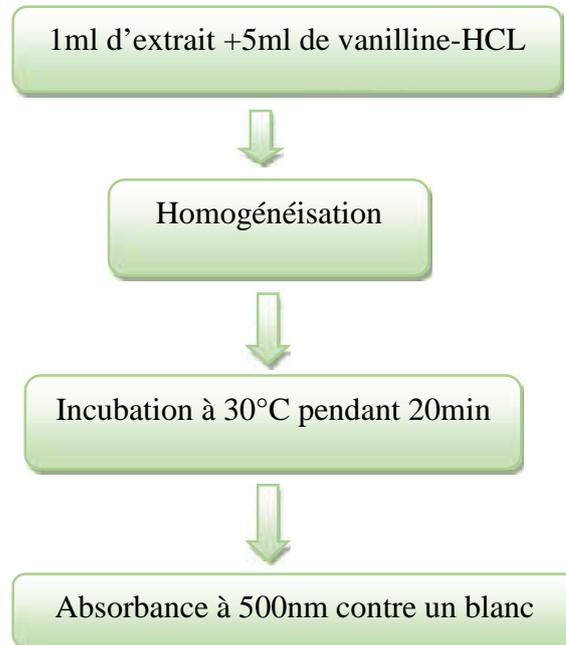


Figure 13: Protocole de dosage des tannins condensés (Deshpande *et al.*, 1986).

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant de la catéchine comme contrôle positif. Les résultats ont été exprimés en milligramme équivalent en catéchine par gramme de matière sèche (mg Eq. Cat/g MS).

I.5.4. Dosage des tannins hydrolysables :

Principe :

Les tannins hydrolysables réagissent avec le chlorure ferrique et donnent une coloration bleue mesurée par spectrophotométrie (Mamadou, 2002).

Mode opératoire :

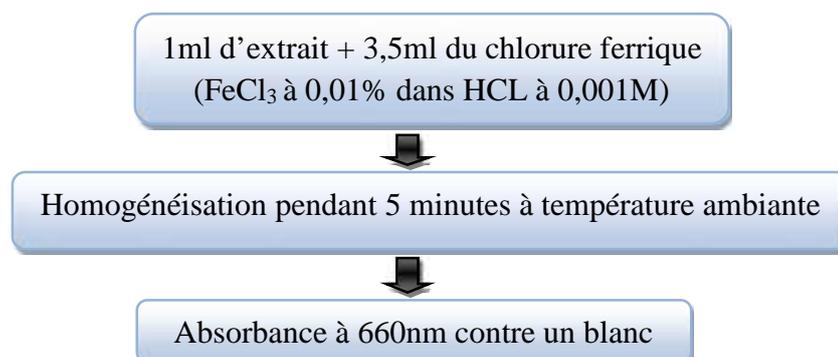


Figure 14: Protocole de dosage des tannins hydrolysables (Deshpande *et al.*, 1986).

I.6. Fractionnement des extraits par CCM :

) Supports Utilisés dans cette expérimentation :

Des plaques en verre (20 cm sur 20 cm) sont rincées avec du méthanol et séchées, le gel de silice est répandu uniformément sur ces plaques à l'aide d'un étaleur pour avoir une épaisseur de 0.5 mm. Ensuite, les plaques sont séchées à l'aire libre pendant 15 minutes, puis activées dans une étuve à 110 °C pendant 30 minutes. Les différents dépôts sont espacés de 2 cm en laissant 1.5 cm aux deux extrémités latérales.

) Fonctionnement :

Lors de dépôt de l'échantillon sur la plaque qui sera mise par la suite dans une cuve à CCM, l'éluant monte à travers la phase stationnaire par capillarité. Les différents composés se déplacent de la phase stationnaire à la phase mobile derrière le front du solvant avec des différentes vitesses qui dépendent des forces électrostatiques retenant le composant sur la phase stationnaire et, de sa solubilité dans la phase mobile.

) Systèmes d'élution utilisés :

Deux systèmes d'élution ont été testés afin de choisir le système le plus adéquat pour la séparation de composés des extraits des feuilles de *Melia azedarach*.

- Chloroforme /Méthanol /Acide acétique (5%) → 60 : 40 : 5 (Bitencourt *et al.*, 2014).

-Toluène /Éthyle acétate /Méthanol → 5 : 3 : 2 (Srinivasa et Mohammed, 2013).

60 ml d'éluant sont versés dans une cuve à CCM, cette dernière est préparée une heure avant que les manipulations aient lieu, et est fermée hermétiquement pour saturer l'atmosphère en vapeurs de l'éluant.

I.6.1. Identification des fractions :

) Dépôt de l'échantillon :

20µl de chaque extrait de feuille de *M.azedarach* (à Ethanol 50% et à Ethanol 80%) sont déposés. 10µl des standards suivants : rutine, acide gallique, quercétine, acide caféique, acide p-coumarique, catéchine et acide ferrulique (préparés à raison de 1 mg par 1 ml du solvant), sont également déposés.

)] Développement, élution et identification :

Des plaques chargées d'échantillons ont été séchées à l'aide d'un sèche-cheveux afin de les placer dans la cuve qui est bien fermée avec un couvercle adhésif. Lorsque l'élution s'approche de la limite du bord supérieur à 1 cm qui représente le front du solvant, ce dernier est marqué avec un crayon, les plaques sont retirées directement de la cuve. Après séchage sous hotte, des différents spots sont observés à l'œil nu, sous UV et après révélation chimique.

)] Méthodes de révélation chimique :

Le principe est de mettre en contact de la plaque un réactif spécifique qui donne une coloration spécifique par réaction chimique. Cette révélation est réalisée avec deux réactifs :

➤ La Vanilline sulfurique :

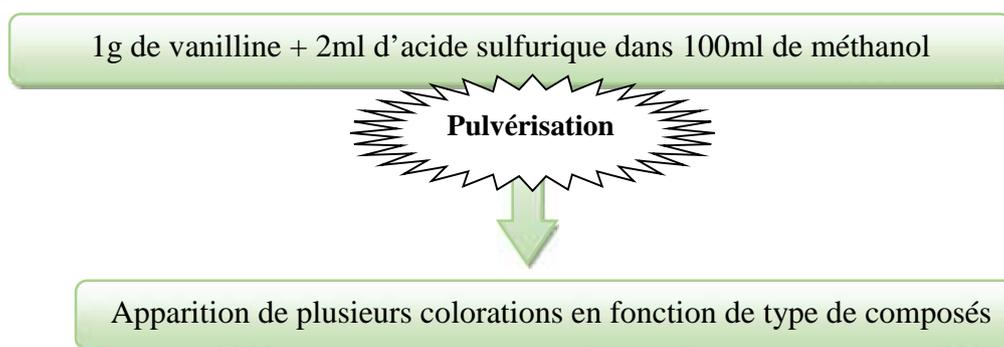


Figure 15 : Protocole montrant les étapes de la révélation chimique par la vanilline sulfurique (Lhuilier, 2007).

➤ Chlorure d'aluminium $AlCl_3$:

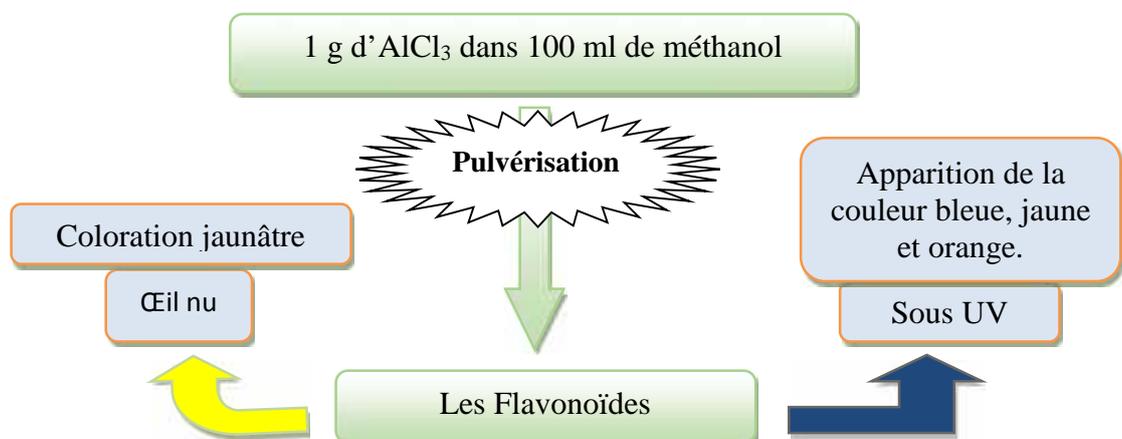


Figure 16 : Protocole détaillant les étapes de la révélation chimique par le chlorure d'aluminium $AlCl_3$ (Roger *et al.*, 2011).

Les spots sont repérés et les distances parcourues sont mesurées, les rapports frontaux (**Rf**) sont calculés par l'équation suivante :

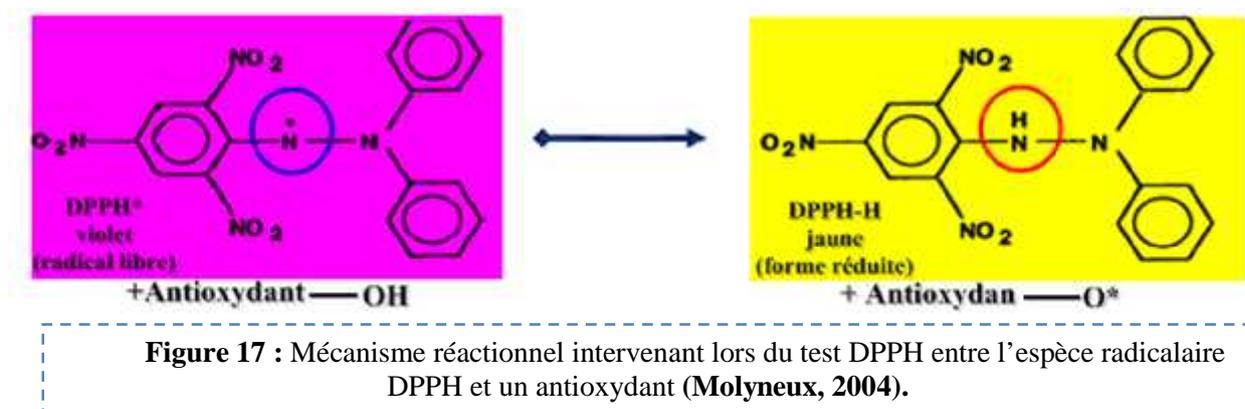
$$Rf = h/H$$

h : Distance parcourue par le constituant.

H : Distance parcourue par le solvant.

I.6.2. Test du pouvoir anti-radicalaire du DPPH sur plaque CCM :

L'activité antiradicalaire des composés polyphénoliques contenus dans les extraits préparés a été évaluée en mesurant leurs capacités de piéger le radical libre DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl), sa couleur violette foncée se transforme en jaune (**Figure 17**) lors de sa réduction (capté par les produits testés) (**Zeghad, 2009**).



L'évaluation de l'effet scavenger du radical DPPH sur plaque CCM est réalisée selon une méthode qui est détaillée dans la **figure 18**.

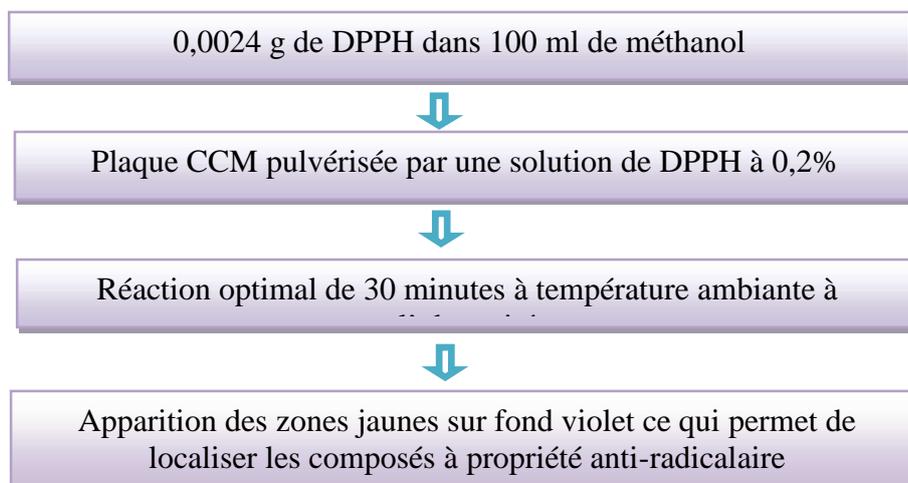


Figure 18 : Protocole détaillant la méthode appliquée pour évaluer l'effet scavenger du radical DPPH sur plaque CCM (**Ferrari, 2002**).

II.7. Analyse statistique :

Toutes les déterminations sont menées en triples et répétées trois fois. Les résultats sont traités par l'analyse de la variance (ANOVA) à un seul facteur suivie d'une comparaison multiple des moyennes grâce au logiciel STATISTICA (version 5.5).

Résultats & Discussion

II. Résultats :

II.1. Teneur en composés phénoliques :

L'analyse de la variance de la teneur en différentes classes phénoliques montre que le facteur solvant exerce un effet significatif ($p < 0,05$).

Quel que soit le composé phénolique dosé, l'éthanol 80% extrait plus de quantité en phénol que l'éthanol 50%. Exception faite pour les phénols totaux solubles où l'éthanol 50% s'avère meilleur solvant d'extraction.

II.1.1. Teneur en phénols totaux :

Les résultats du dosage des phénols totaux obtenus (**Figure 19**) révèlent une variabilité de teneur entre les deux extraits.

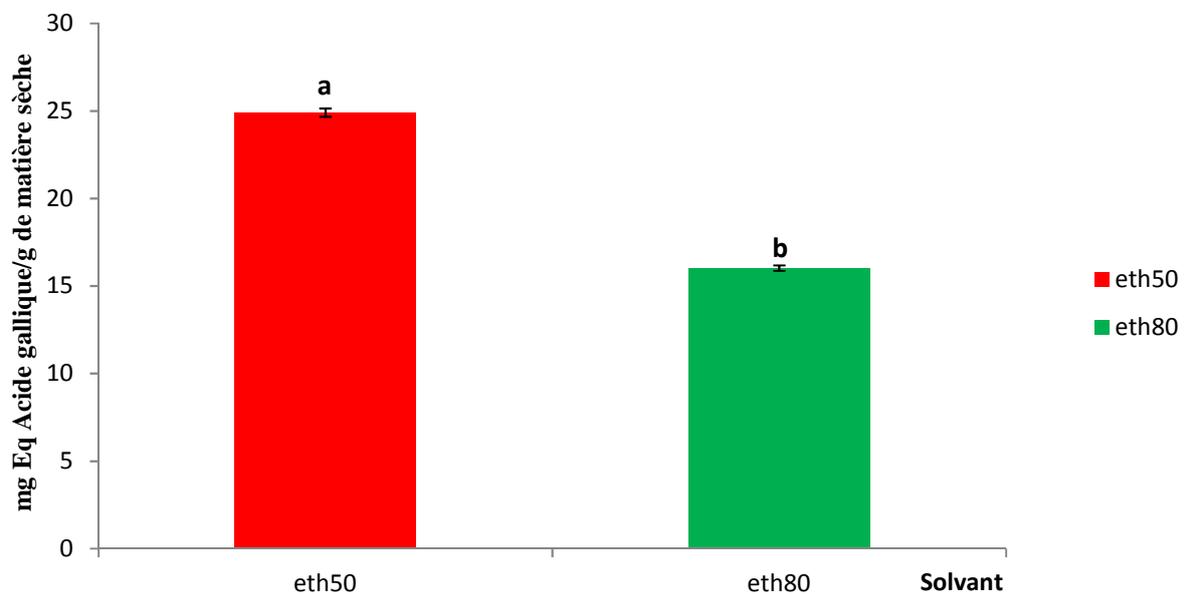


Figure 19 : Teneur en phénols totaux.

Les résultats illustrés par la **figure 19**, montrent que l'extrait de feuille à l'éthanol 50% exprime un contenu en phénols totaux le plus élevé de 64,34 fois par rapport à l'extrait à éthanol 80%.

II.1.2. Teneur en flavonoïdes :

Les résultats présentés dans la **figure 20**, montrent que l'extrait de feuille à l'éthanol 80% est plus riche en flavonoïdes que l'extrait à l'éthanol 50%.

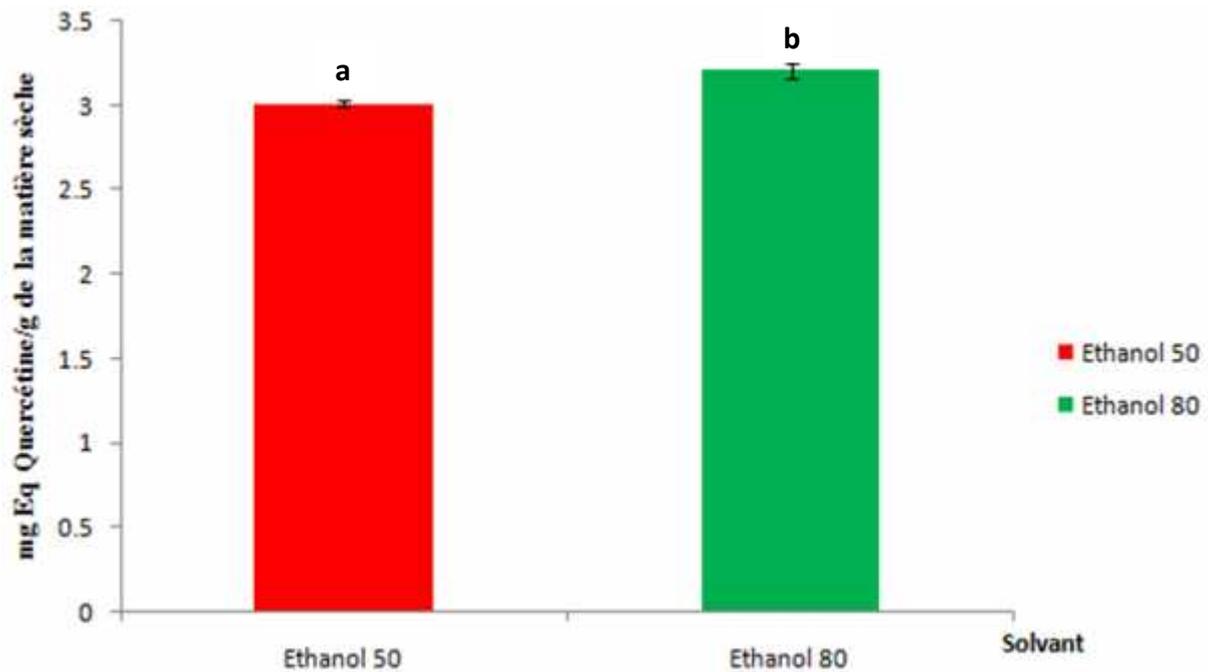


Figure 20 : Teneur en flavonoïdes.

II.1.3. Teneur en tannins hydrolysables :

Une variabilité de teneur en tannins hydrolysables des extraits analysés est présentée dans la **figure 21**.

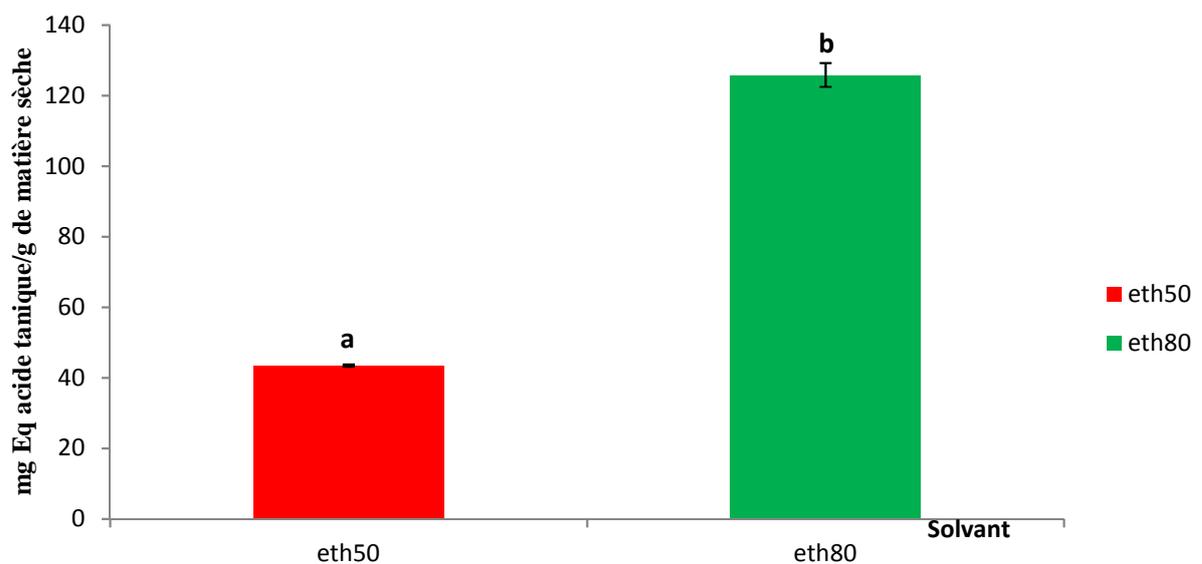


Figure 21 : Teneur en tannins hydrolysables.

Les résultats présentés dans la **figure 21** montrent que la teneur en tannins hydrolysables dans l'extrait de feuille de *M.azedarach* à éthanol 50% est plus faible, contrairement à l'extrait à éthanol 80% qui extrait la teneur la plus élevée avec un rapport de 65,45 fois.

II.1.4. Teneur en tannins condensés :

Les résultats obtenues de dosage des tannins condensés traduisent que l'extrait de feuilles de *M.azedarach* à éthanol 50% renferme la teneur la plus faible qui diminue de 36,42 fois par rapport à l'extrait à éthanol 80% (**Figure 22**).

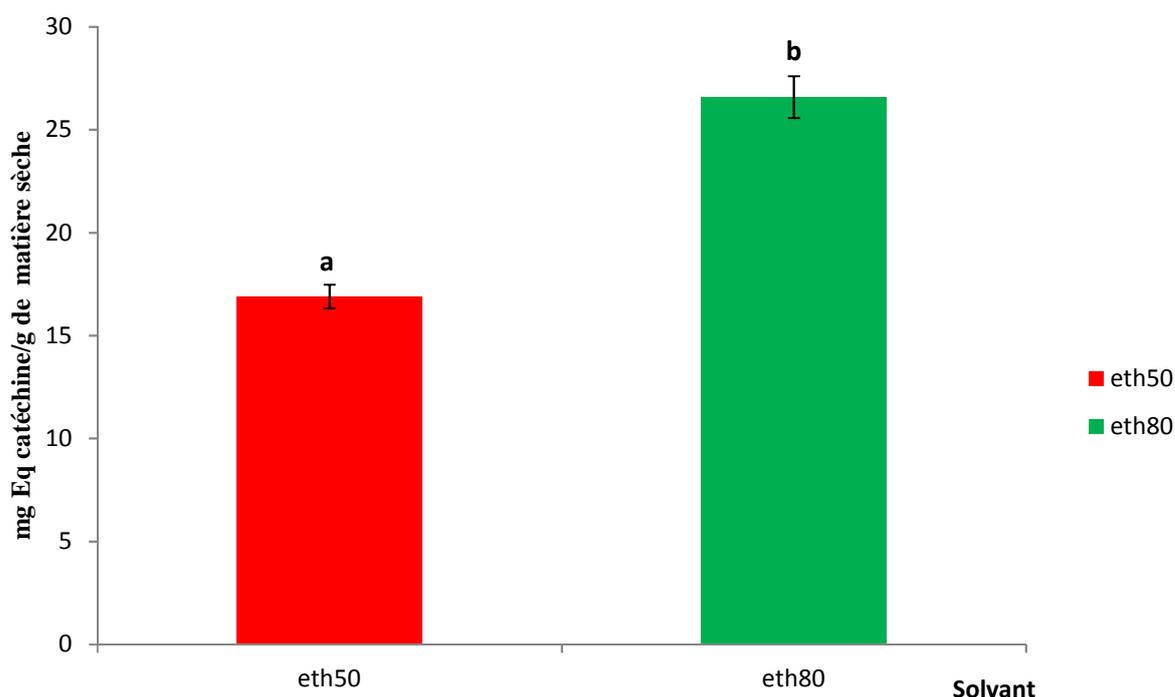


Figure 22 : Teneur en tannins condensés.

II.2. Analyse des chromatogrammes par CCM :

L'analyse chromatographique des différents extraits de feuille de *Melia azedarach* a mis en évidence la présence de nombreux spots.

Le nombre de spots varie en fonction de l'extrait testé et du système d'élution utilisé (**Tableau VIII**). Ces spots se distinguent entre eux par la valeur du rapport frontal (Rf) et de leurs colorations avant et après révélation pour chacun des extraits.

Tableau VIII : Fractionnement des extraits par CCM.

Fractionnement des extraits de feuilles de <i>M.azedarach</i>											
(A)						(B)					
F	F _x	Rf	LJ	Rv	Ra	F	F _x	Rf	LJ	Rv	Ra
F50	F150	0,70	jaune	Mauve clair	Mauve	F50	F150	0,63	jaune	violet	Violet foncé
	F250	0,94	jaune	Mauve clair	Mauve		F250	/	/	/	/
F80	F180	0,72	jaune	Violet	Mauve foncé	F80	F180	0,61	jaune	Violet clair	Violet foncé
	F280	0,95	jaune	Violet	Mauve foncé		F280	/	/	/	/
Rut	0,73		jaune	Mauve	Mauve foncé	Rut	0,16		jaune	invisible	invisible
A.Gal	0,62		Beige	Bleu clair	Bleu	A.Gal	/		gris	invisible	invisible
Quer	0,92		Jaune	violet clair	Rose	Quer	0,62		jaune	Violet clair	Violet foncé
A.Caf	0,72		beige	Violet	Bleu fluorescent	A.Caf	0,12		Beige clair	invisible	Bleu clair fluorescent
A.p-c	0,77		Beige clair	Invisible	mauve	A.p-c	/		Invisible	Invisible	Invisible
Cat	0,58		Invisible	Violet	Rose clair	Cat	0,46		jaune	Violet foncé	Violet clair
A.fer	0,61		Jaune clair	Invisible	bleu	A.fer	0,086		Invisible	Invisible	Blue clair fluorescent

Systèmes d'éluion : (A) Chloroforme/Méthanol/Acide acétique à 5% (60 : 40 : 5), (B) Toluène/Ethyle acétate/Méthanol (5 : 3 : 2).

Couleur : (LJ) couleur à la lumière du jour, (Rv) couleur après révélation à la vanilline sulfurique, (Ra) couleur après révélation au chlorure d'aluminium « AlCl₃ ».

Echantillons : (F50) Extrait de feuilles de *M.azedarach* à éthanol 50%, (F80) Extrait de feuilles de *M.azedarach* à éthanol 80%.

Standards : (Rut) Rutine, (A.Gal) Acide gallique, (Quer) Quercétine, (A.Caf) Acide caféique, (A.p-c) Acide p-coumarique, ; (Cat) Catéchine, (A.fer) Acide ferrulique.

II.2.1. Caractérisation dans le système Chloroforme/Méthanol/Acide acétique :

Les résultats illustrés dans le **tableau IX**, mettent en évidence 04 fractions notées, et réparties de façon égale dans les deux extraits, deux fractions sont observées dans l'extrait de feuille à l'éthanol 50% et deux autres sont observées dans l'extrait de feuille à l'éthanol 80%.

Tableau IX : Fractionnement par CCM des extraits dans le système d'éluion (A).

(A)					
F	F _x	Rf	LJ	Rv	Ra
F50	F150	0,70	jaune	Mauve clair	Mauve
	F250	0,94	jaune	Mauve clair	Mauve
F80	F180	0,72	jaune	Violet	Mauve foncé
	F280	0,95	jaune	Violet	Mauve foncé

(A) Chloroforme/Méthanol/Acide acétique à 5% (60 : 40 : 5), (LJ) couleur à la lumière du jour, (Rv) couleur après révélation à la vanilline sulfurique, (Ra) couleur après révélation au chlorure d'aluminium « AlCl₃ », (F50) Extrait de feuilles de *M.azedarach* à éthanol 50%, (F80) Extrait de feuilles de *M.azedarach* à éthanol 80%.

Les fractions obtenues se caractérisent par la présence d'un rapport frontal (Rf) qui varie de 0,70 à 0,95 et des colorations similaires (jaune à l'œil nu).

Des fractions phénoliques révélées par les différents tests à CCM regroupent seulement une classe de composés : fractions de type flavonoïdes (F₁₅₀ et F₁₈₀) mises en évidence par le test de chlorure d'aluminium (coloration jaune à l'œil nu).

Sur les 04 fractions obtenues de type flavonoïde pour chacun des extraits, les deux fractions identifiées (F₁₅₀ et F₁₈₀) se caractérisent par un Rf de 0,70 et 0,72 respectivement et une coloration jaune à l'œil nu et s'identifient à la rutine utilisée comme standard.

Les deux autres fractions (F₂₅₀ et F₂₈₀) se caractérisent par un Rf de 0,94 et 0,95 respectivement avec une coloration jaunâtre, ces deux fractions s'identifient à la quercétine utilisée comme standard.

Les résultats d'éluion avec le système (A) (chloroforme/Méthanol/Acide acétique) a permis la migration de deux standards différents (acide caféique et rutine) à la même distance le long de la phase stationnaire, celle-ci se traduit par le même rapport frontal (Rf) qui est de 0,72 pour l'acide caféique et de 0,73 pour la rutine.

Les résultats d'éluion au chloroforme/Méthanol/Acide acétique des extraits de feuilles de *M.azedarach* ainsi que des standards utilisés, sont illustrés dans les **figures 23-24-25-26**.

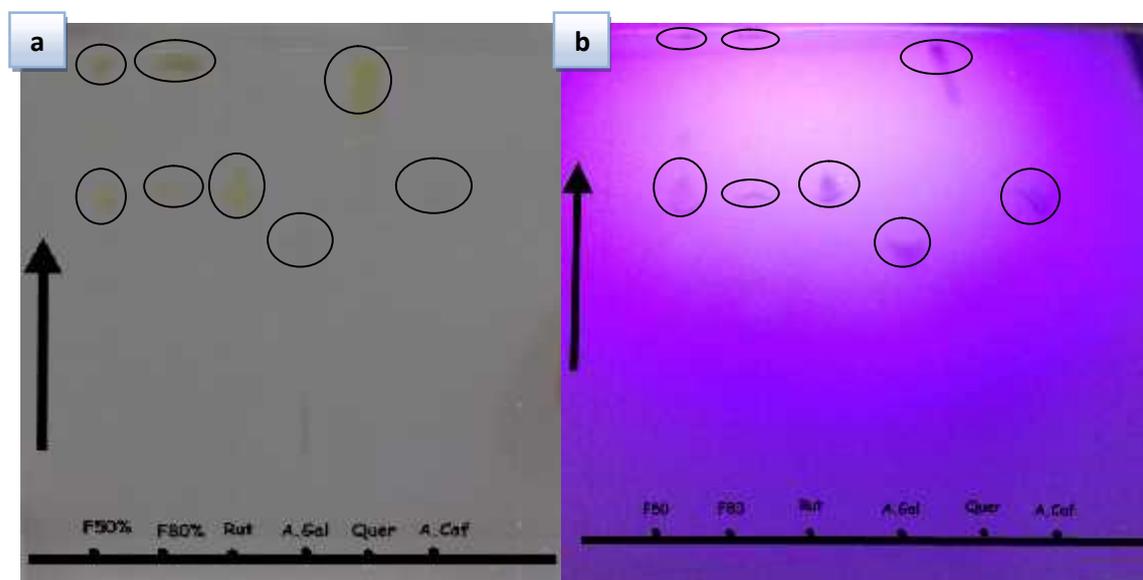


Figure 23 : Photographie des chromatogrammes des extraits de feuilles de *M.azedarach* (Chloroforme/Méthanol/Acide acétique).

(a) à l'œil nu ; (b) sous UV (256 nm) ; F_{50%} : fraction de l'extrait à éthanol 50% ; F_{80%} : fraction de l'extrait à éthanol 80% ; Rut : rutine ; A.Gal : acide gallique ; Quer : quercétine ; A.Caf : acide caféique.

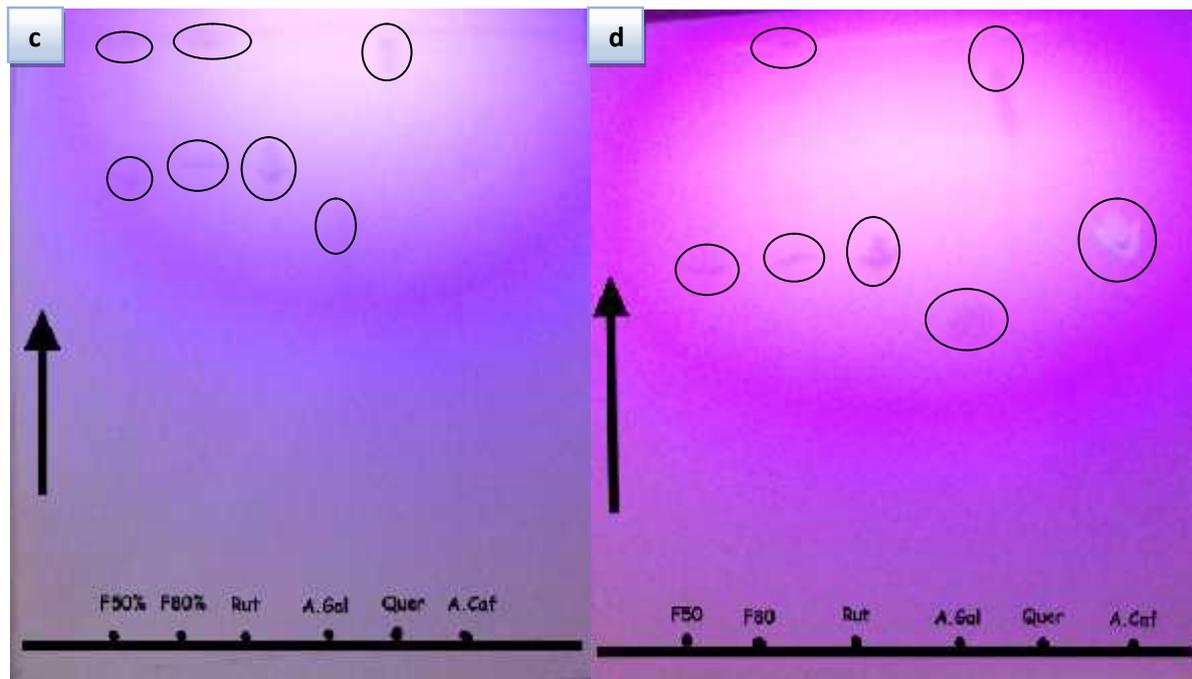


Figure 24 : Photographie des chromatogrammes des extraits de feuilles de *M.azedarach* (Chloroforme/Méthanol/Acide acétique).

(c) après révélation avec la vanilline sulfurique ; (d) après révélation avec $AlCl_3$.

F50% : fraction de l'extrait à éthanol 50% ; **F80%** : fraction de l'extrait à éthanol 80% ; **Rut** : rutine ; **A.Gal** : acide gallique ; **Quer** : quercétine ; **A.Caf** : acide caféique.

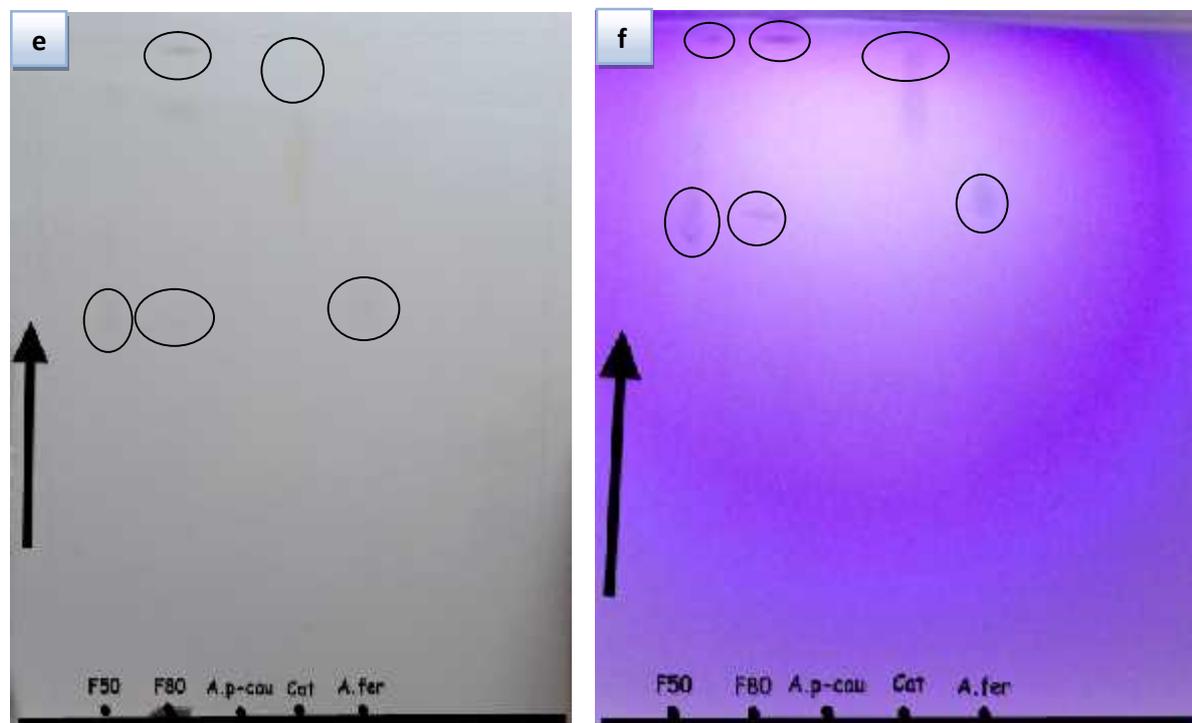


Figure 25 : Photographie des chromatogrammes des extraits de feuilles de *M.azedarach* (Chloroforme/Méthanol/Acide acétique).

(e) à la l'œil nu ; (f) sous UV (256 nm) ; **F50%** : fraction de l'extrait à éthanol 50% ; **F80%** : fraction de l'extrait à éthanol 80% ; **A.p-cou** : acide p-coumarique ; **Cat** : catéchine ; **A.fer** : acide ferrulique.

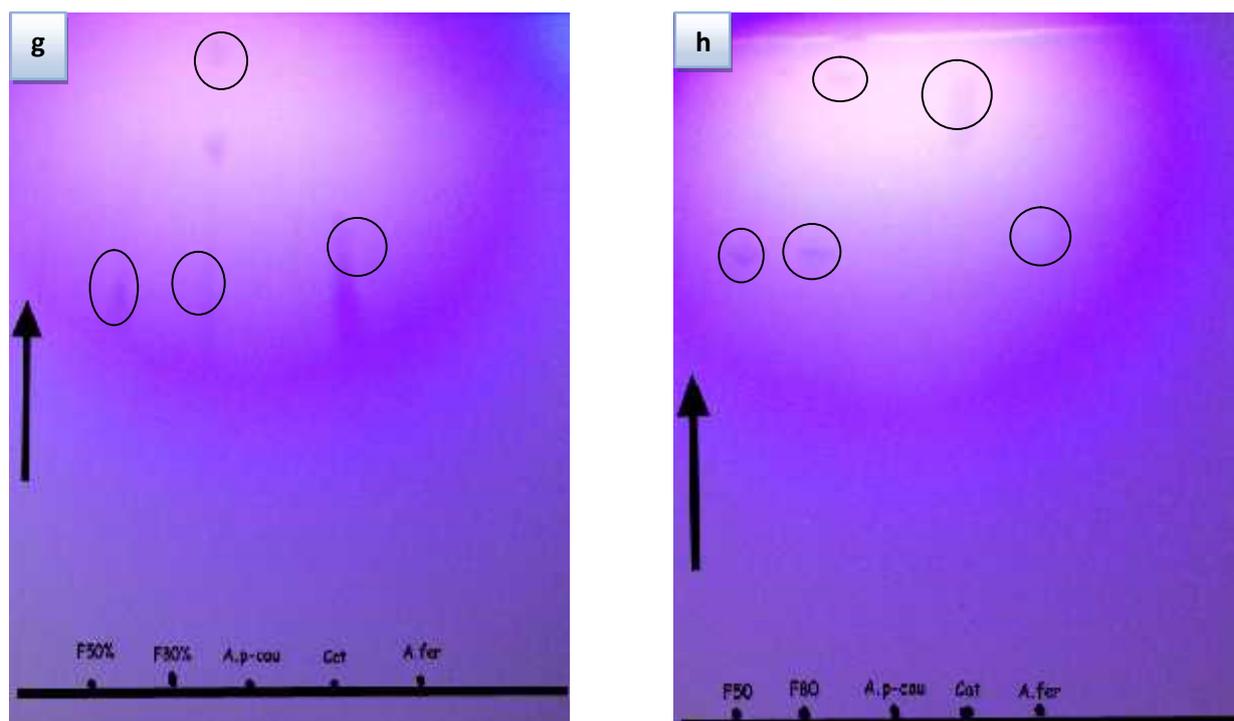


Figure 26 : Photographie des chromatogrammes des extraits de feuilles de *M.azedarach* (Chloroforme/Méthanol/Acide acétique).

(g) après révélation avec la vanilline sulfurique ; (h) après révélation avec $AlCl_3$.

F50% : fraction de l'extrait à éthanol 50% ; **F80%** : fraction de l'extrait à éthanol 80% ;

A.p-cou : acide p-coumarique ; **Cat** : catéchine ; **A.fer** : acide ferrulique.

Nous avons noté que tous les standards utilisés sont entraînés par l'éluant (chloroforme/Méthanol/acide acétique).

II.2.2. Caractérisation dans le système (Toluène/Éthyle acétate/Méthanol) :

L'éluion des plaques par le toluène/Éthyle acétate/Méthanol (5 : 3 : 2) à révéler la présence de deux spots dans nos extraits avec des valeurs de R_f de 0,63 et 0,61 pour l'extrait à l'éthanol 50% et à l'éthanol 80% respectivement (**Tableau X**) avec une coloration jaunâtre à l'œil nu, ces deux fractions s'identifient à la quercétine ($R_f = 0,62$) pour les extraits de feuilles de *M.azedarach*.

Tableau X : Fractionnement par CCM des extraits dans le système d'éluion (**B**).

(B)					
T	F _x	R _f	LJ	Rv	Ra
F50	F150	0,63	jaune	violet	Violet foncé
	F250	/	/	/	/
F80	F180	0,61	jaune	Violet clair	Violet foncé
	F280	/	/	/	/

(**B**) Toluène/Éthyle acétate/Méthanol (5 : 3 : 2), (**LJ**) couleur à la lumière du jour, (**Rv**) couleur après révélation à la vanillinesulfurique, (**Ra**) couleur après révélation au chlorure d'aluminium « $AlCl_3$ », (**F50**) Extrait de feuilles de *M.azedarach* à éthanol 50%, (**F80**) Extrait de feuilles de *M.azedarach* à éthanol 80%

Les résultats d'élution au toluène/éthyle acétate/méthanol des extraits de feuilles de *M.azedarach* ainsi que des standards utilisés, sont illustrés dans les **figures 27 et 28**.

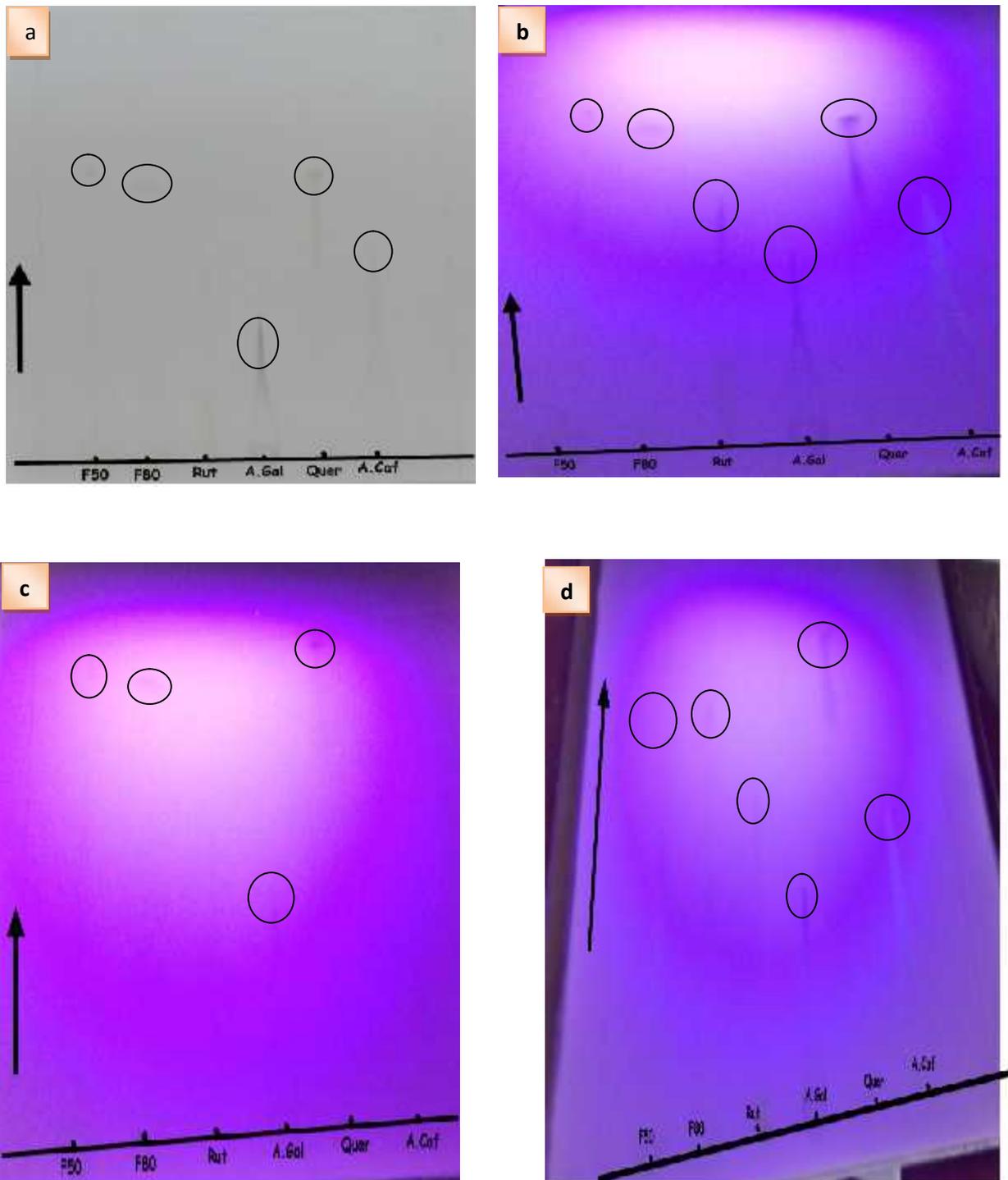


Figure 27 : Photographie des chromatogrammes des extraits de feuilles de *M.azedarach* (toluène/éthyle acétate/méthanol)
(a) à la l'œil nu ; **(b)** sous UV (256 nm) ; **(c)** après révélation avec la vanilline sulfurique ; **(d)** après révélation avec $AlCl_3$.

F50 : fraction de l'extrait à éthanol 50% ; **F80** : fraction de l'extrait à éthanol 80% ; **Rut** : rutine ; **A.Gal** : acide gallique ;

Quer : quercétine ;

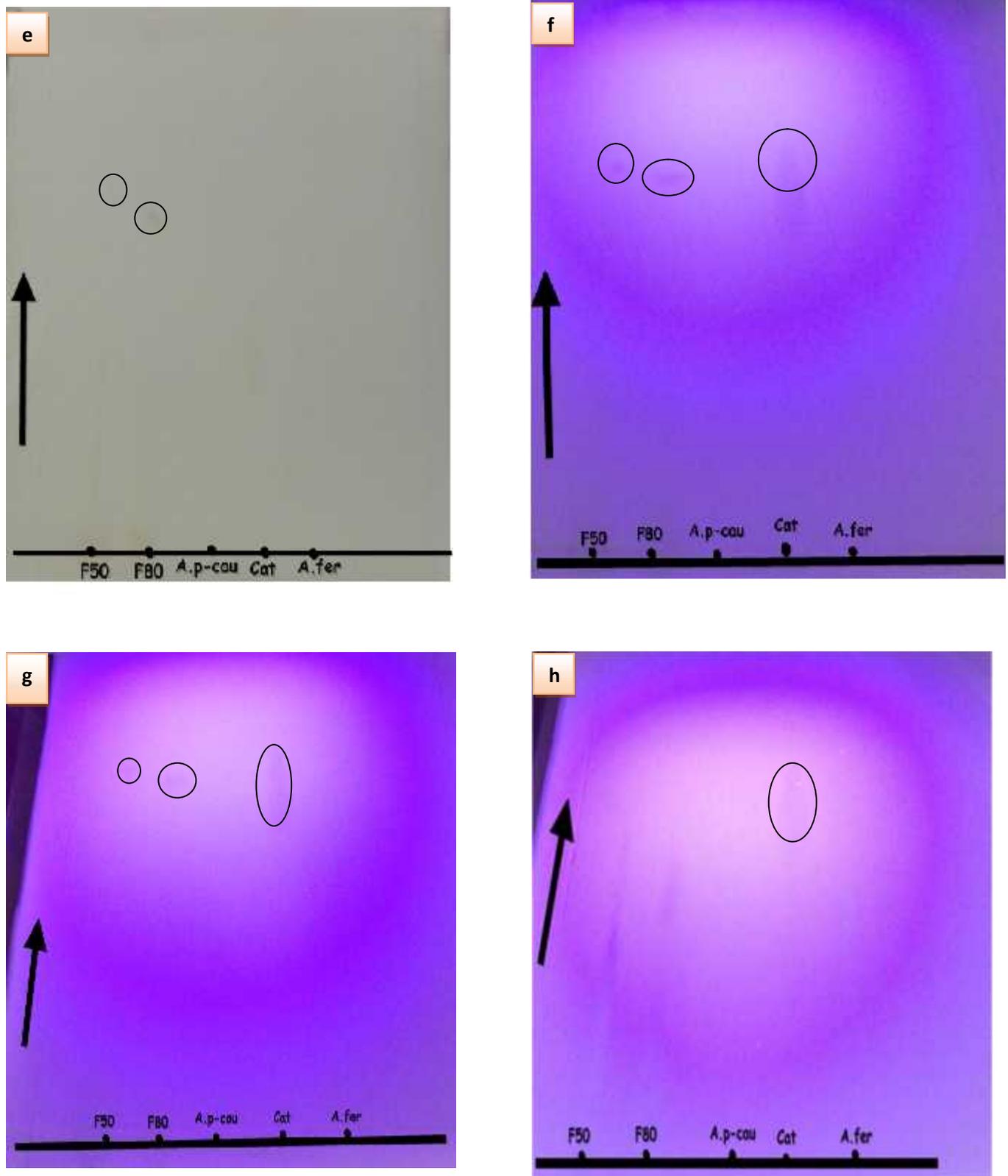


Figure 28 : Photographie des chromatogrammes des extraits de feuilles de *M.azedarach* (toluène/éthyle acétate/méthanol) (e) à la l'œil nu ; (f) sous UV (256 nm) ; (g) après révélation avec la vanilline sulfurique ; (h) après révélation avec $AlCl_3$.

F50% : fraction de l'extrait à éthanol 50% ; F80% : fraction de l'extrait à éthanol 80% ;

A.p-cou : acide p-coumarique ; Cat : catéchine ; A.fer : acide ferrulique.

Le nombre de spots fractionnés est variable en fonction du système d'élution utilisé. Le nombre de fractions passe de 04 fractions avec le système (A) chloroforme/méthanol/acide acétique, et de 02 fractions uniquement avec le système (B) toluène/éthyle acétate/méthanol.

Les deux systèmes d'élution utilisés ne nous ont pas permis un bon fractionnement des extraits, par conséquent, ils ne peuvent pas nous renseigner sur la présence d'éventuels autres fractions qui correspondraient à d'autres composés.

Le **tableau XI** résume les principales caractéristiques (Rf et coloration) des standards utilisés.

Tableau XI : Rapports frontaux et colorations des standards dans les deux systèmes.

(A)					(B)				
Standard	Rf	LJ	Rv	Ra	Standard	Rf	LJ	Rv	Ra
Rut	0,73	jaune	Mauve	Mauve foncé	Rut	0,16	jaune	invisible	invisible
A.Gal	0,62	Beige	Bleu clair	Bleu	A.Gal	/	gris	invisible	invisible
Quer	0,92	Jaune	violet clair	Rose	Quer	0,62	jaune	Violet clair	Violet foncé
A.Caf	0,72	beige	Violet	Bleu fluorescent	A.Caf	0,12	Beige clair	invisible	Bleu clair fluorescent
A.p-c	0,77	Beige clair	Invisible	mauve	A.p-c	/	Invisible	Invisible	Invisible
Cat	0,58	Invisible	Violet	Rose clair	Cat	0,46	jaune	Violet foncé	Violet clair
A.fer	0,61	Jaune clair	Invisible	bleu	A.fer	0,086	Invisible	Invisible	Blue clair fluorescent

Systèmes d'élution : (A) Chloroforme/Méthanol/Acide acétique à 5% (60 : 40 : 5), (B) Toluène/Ethyle acétate/Méthanol (5 : 3 : 2).
Couleur : (LJ) couleur à la lumière du jour, (Rv) couleur après révélation à la vanilline sulfurique, (Ra) couleur après révélation au chlorure d'aluminium « AlCl₃ ».

Standards : (Rut) Rutine, (A.Gal) Acide gallique, (Quer) Quercétine, (A.Caf) Acide caféique, (A.p-c) Acide p-coumarique,

Nous notons une variabilité des valeurs de Rf : (0,58 à 0,92) pour le système (A) Chloroforme/Méthanol/Acide acétique (60 : 40 : 5) et de 0,086 à 0,62 pour le système (B).

II.2.3. Test de DPPH sur plaque CCM :

La révélation des plaques par la solution méthanolique de DPPH permet l'obtention des renseignements supplémentaires sur l'activité antioxydante de différents composants des extraits testés.

L'apparition de taches jaunes à l'œil nu traduit la présence de composés actifs capables de réduire le radical DPPH.

L'application de la solution DPPH sur les plaques a montré que les deux extraits possèdent une activité antioxydante.

Le traitement au DPPH des plaques à CCM éluées, que se soit avec le système **(A)** Chloroforme/Méthanol/Acide acétique ou le système **(B)** Toluène/Ethyle acétate/Méthanol, révèle quelques fractions correspondantes aux constituants à activité anti-radicalaire.

Nous avons relevé l'apparition de deux spots jaunes pour l'extrait de feuille à éthanol 80% et un seul spot pour l'extrait de feuille à éthanol 50% pour le système d'éluion **(A)** Chloroforme/Méthanol/Acide acétique (**figure 29**).

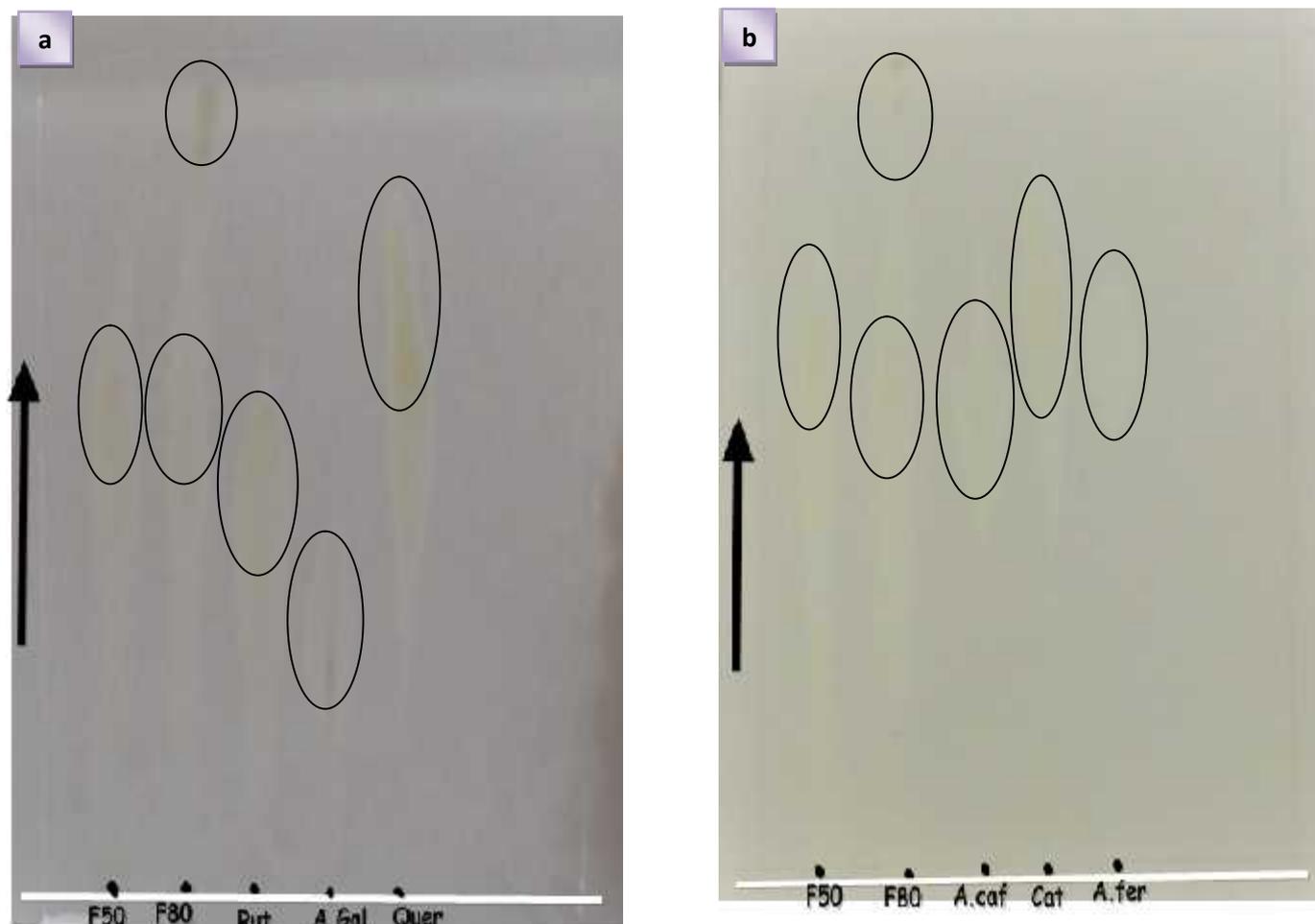


Figure 29 : Photographie du test de l'activité anti-radicalaire au DPPH sur plaque CCM (Chloroforme/Méthanol/Acide acétique).

F50% : fraction de l'extrait à éthanol 50% ; **F80%** : fraction de l'extrait à éthanol 80% ; **(a) Rut** : rutine ; **A.Gal** : acide gallique ; **Quer** : quercétine ; **(b) A.Caf** : acide caféique ; **Cat** : catéchine ; **A.fer** : acide ferrulique.

De mêmes observations ont été relevés pour le système **(B)** Toluène/Ethyle acétate/Méthanol (**figure 30**).

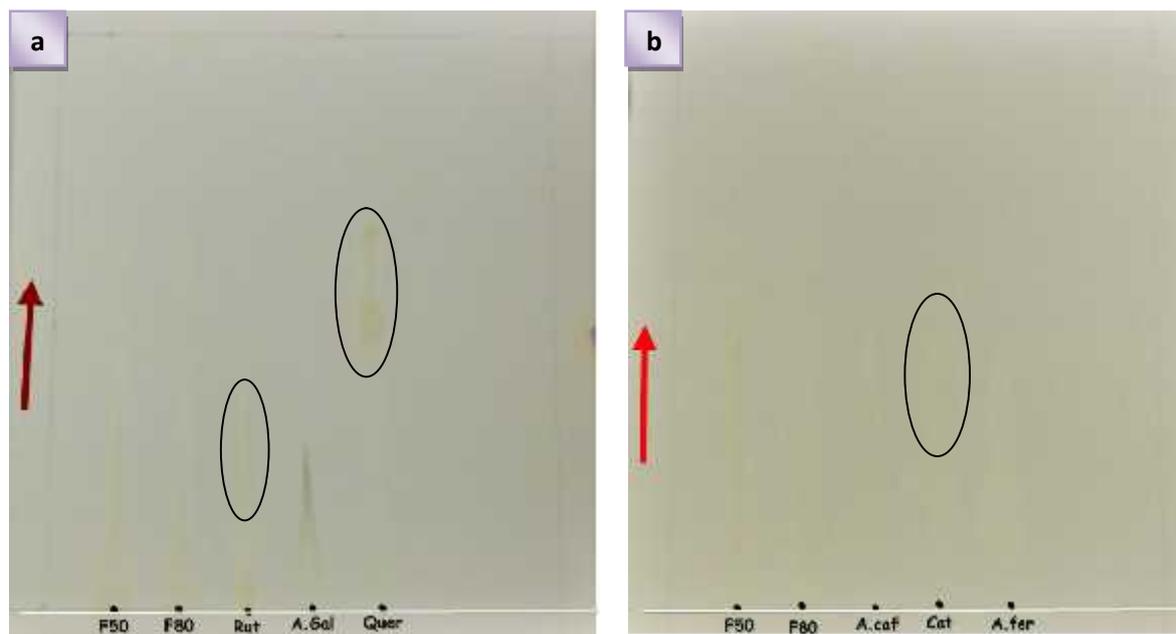


Figure 30 : Photographie du test de l'activité anti-radicalaire au DPPH sur plaque CCM (Toluène/Ethyle acétate/Méthanol).

F50% : fraction de l'extrait à éthanol 50% ; F80% : fraction de l'extrait à éthanol 80% ;

(a) Rut : rutine ; A.Gal : acide gallique ; Quer : quercétine ; (b) A.Caf : acide caféique ; Cat : catéchine ; A.fer : acide ferrulique.

III. Discussion générale :

L'objectif du présent travail est d'évaluer d'une part le contenu en composés phénoliques des feuilles de *M.azedarach* et d'autre part le fractionnement des extraits bruts par CCM et évaluation du potentiel antioxydant sur plaque.

De nombreux auteurs (**Chiffelle et al., 2009** ; **Nahak et Sahu, 2010** ; **Adil et al., 2012** ; **Ahmed et al., 2012**) ont également mis en évidence le contenu de *M.azedarach* en divers classes de composés phénoliques.

Dans notre travail, nous avons mis en évidence quelques classes phénoliques (Phénols totaux solubles, flavonoïdes, tannins hydrolysables et tannins condensés) qui se trouvent dans l'extrait des feuilles de *M.azedarach*.

Il est difficile de comparer nos résultats aux données d'autres auteurs, en raison de l'implication de divers facteurs dans l'évaluation des teneurs en composés phénoliques : origine géographique des matières premières, méthodes d'extraction, de dosage et l'expression des résultats (**Garcia et al., 1985**; **Ramirez, 1988**; **Clifford et al., 1991**; **Urquiaga et Leighton, 2000** ; **Kahkonen et al., 2001**), facteurs agronomiques (**Pereira et al., 2007**).

Les teneurs en phénols totaux solubles des extraits de feuilles, varient de 16,02 mg Eq AG / g de MS (extrait à éthanol 80%) à 24,90 mg Eq AG / g de MS (extrait à éthanol 50%). Quelque soit pour éthanol 50% ou éthanol 80%, nos résultats obtenues pour la teneur en phénols totaux solubles sont supérieures à ceux rapportés par **Kaanin. (2014)**, pour l'extrait des feuilles de la même plante avec des teneurs correspondantes qui varient d'environ 14,1 mg Eq AG / g de MS (extrait à éthanol 70%) à 16,22 mg Eq AG / g de MS (extrait à éthanol 50%). **Adil et al. (2012)**, ont rapportés des teneurs (82,54 mg Eq AG/g) largement supérieures à nos résultats.

Globalement, les teneurs en phénols totaux solubles notés pour les extraits de feuilles de *M. azedarach* sont inférieurs aux valeurs rapportées par **Sithisarn et al., (2007)**, **Samudram et al., (2009)**, **Adil et al., (2012)** et **Orhan et al., (2012)** pour *Melia azedarach* (32.6 à 91.47 mg EqAG/g MS), et s'intègrent dans l'intervalle des teneurs enregistrés par **Sithisarn et al., (2007)** et **Manikandan et al., (2008)** pour *Azadirachta indica* plante de la même famille que *M. azedarach* (12 à 79 mg Eq Q/g MS).

Les teneurs en flavonoïdes varient de 3,01 mg Eq Q / g de MS (extrait à éthanol 50%) à 3,21 mg Eq Q / g de MS (extrait à éthanol 80%), qui restent fortes comparées aux résultats de **Kaanin. (2014)** qui varient d'environ 0,75 mg Eq Q / g de MS (extrait à éthanol 50%) à 1,90 mg Eq Q / g de MS (extrait à éthanol 70%). Tandis que nos résultats sont très faibles par rapport à ceux obtenus par **Adil et al. (2012)** : 10,99 à 20,75 mg Eq Q / g de MS.

En ce qui concerne les teneurs en tannins hydrolysables, elles varient de 43,48 mg Eq AT / g de MS (extrait éthanolique 50%) à 125,86 mg Eq AT / g de MS (extrait éthanolique 80%), restent très élevées par rapports aux résultats rapportés par **Kaanin. (2014)** qui varient d'environ 19 mg Eq AT / g de MS (extrait éthanolique 50%) à 31.26 mg Eq AT / g de MS (extrait éthanolique 70%).

Nos extraits contiennent des teneurs en tannins condensés qui varient de 16,90 mg Eq Cat / g de MS (éthanol 50%) à 26,58 mg Eq Cat / g de MS (éthanol 80%), qui se révèlent élevées en les comparant avec les résultats de **Kaanin. (2014)** (d'environ 7,9 mg Eq Cat / g de MS) pour l'extrait éthanolique 50% à 12,42 mg Eq Cat / g de MS pour l'extrait à éthanol 70%.

Cette variabilité de teneur est due à plusieurs facteurs : les conditions de séchage (**Couto et al., 2012**), d'extraction en terme de méthode, temps, température, granulométrie, solvant, nombre d'étapes d'extraction), l'expression des résultats, l'état et la provenance géographique (**Luthria, 2008 ; Kahouli, 2010 ; Rodriguez-Rojo et al., 2012**), le stade de

maturité de la plante et les différentes maladies qui peuvent l'affecter (**Park et Cha, 2003**), ainsi que la durée de conservation (**Ozgüven et Tansi, 1998**).

Les composés phénoliques se répartissent qualitativement et quantitativement avec de façon inégale tant chez les différentes espèces végétales qu'à l'échelle de la plante elle-même (**Macheix et al., 2005**).

De telles différences peuvent être aussi attribuées au degré de polymérisation des composés phénoliques, à leur diversité structurale (**Naczki et Shahidi, 2006**), ou à leur implication dans d'autres structures moléculaire formant ainsi avec d'autres composants (glucides et protéines) des complexes insolubles (**Cacace et Mazza, 2002 et Falleh et al., 2008**).

La présence et la variabilité des composés solubilisés par les différents solvants utilisés est confirmée par les résultats du criblage chimique obtenus sur plaques CCM. Ce dernier repose sur la valeur du Rf et de la coloration avant et après révélation. **Ribéreau Gayon (1968)** rapporte que les valeurs du Rf sont propres à chaque composé phénolique et système d'élution.

Les 18 spots révélés sont inégalement répartis entre les deux systèmes d'élution (11 pour le chloroforme/Méthanol/Acide acétique contre 07 pour le Toluène/Ethyle acétate/méthanol).

Le système Chloroforme /Méthanol/Acide acétique à 5% (60 : 40 : 5) a permis de mettre en évidence un profil chromatographique dans lequel de nombreuses fractions ont été bien séparées.

La comparaison avec les données de la littérature n'est pas aisée, tant divers facteurs (végétal, climat, procédé d'extraction ...etc) peuvent influencer.

Nos données analytiques sur CCM confirment le pouvoir antioxydant d'extrait de *Melia azedarach* observé par **Aoudia et al., (2013)** ; **Kaanin. (2004)**, en effet, les fractions F50 et F80 réagissent positivement au test de DPPH.

La quercétine et la rutine sont détectées dans les extraits éthanoliques de feuilles de *M.azedarach* comme étant le composé majoritaire (**Srinivasa et Mohammed , 2013**). Ces résultats sont similaires à ceux que nous avons obtenus.

D'autres spots caractérisés par des couleurs allant du mauve au bleu après révélation chimique avec des Rf différents sont présents dans nos profils chromatographiques selon la littérature, ces spots peuvent correspondre à la classe des anthocyanidines (**Anderiambeloston et al., 1998**).

***Conclusion
&
Perspectives***

Conclusion :

Nos données analytiques ont montré la présence de différentes classes de composés phénoliques aussi bien par les dosages que par le fractionnement par chromatographie sur couche mince (CCM).

La teneur en phénols totaux est plus remarquable que celle des flavonoïdes. Le contenu en tannins condensés pour les extraits de feuilles de *M.azedarach* est riche en le comparant aux tannins hydrolysables.

La séparation par CCM des extraits de feuille de *M.azedarach* a montré la présence des fractions de type « flavonoïdes » (rutine et quercétine) et d'autres composés non-identifiés.

Les extraits testés ont manifesté une activité antioxydante mesurée *in vitro* par le test de DPPH.

Ce travail mérite d'être approfondie afin de :

- Optimiser le rendement d'extraction des composés phénoliques par le choix d'autres solvants.
- Identifier les fractions obtenues par CCM par de fines méthodes (CLHP, CG/SM, RMN ...).
- Utiliser d'autres systèmes d'élutions afin d'avoir une bonne séparation.
- Évaluer l'activité antioxydante des extraits bruts ainsi que des fractions par test de DPPH *in vitro* ou *in vivo*.

Références Bibliographiques

-A-

- Abdul, V K., Athar, A et Shukla I. (2008).** In vitro antibacterial potential of *Melia azedarach* crude leaf extracts against some human pathogenic bacterial strains. *Ethnobotanical Leaflets*, 12: 439-445.
- Adil, M., Sultana, B., Tanveer, B., Asad, B., Muhammad, A et Qadeer ul H. (2012).** Investigation on the antioxidant activity of leaves, fruit and stem bark of Dhraik (*Melia azedarach*). *European Journal of Applied Sciences*, 4 (2): 47-51.
- Ahmed, M. F., Ibrahim, M., Ahmed, M. A., Thayyil, H., et Zameeruddin, K. (2008).** Antioxidative activity of *Melia azedarach* Linn leaf extract. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*, 7(1): 31-34.
- Alché, L. E., Assad Ferek, G., Meo, M., Coto, C. E., et Maier, M. S. (2003).** An antiviral meliacarpin from leaves of *Melia azedarach* L. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 58: 215-219.
- Alouani, A., Rehim, N., et Soltani, N. (2009).** Larvicidal activity of a neem tree extract (Azadirachtin) against mosquito larvae in the Republic of Algeria. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 2(1): 15-22.
- Al-Rubae, A. Y. (2009).** The potential uses of *Melia azedarach* L. as pesticidal and medicinal plant, review. *American and European Sustainable Agriculture Journal*, 3: 185-194.
- Aoudia, H., Oomah, B. D., Zaidi, F., Zaidi-Yahiaoui, R., Drover, J. C., et Harrison, J. E. (2013).** Phenolics, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Melia azedarach* extracts. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 6(2): 19-29.
- Aruoma, O. I., Murcia, A., Butler, J., et Halliwell, B. (1993).** Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(11): 1880-1885.
- Asadujjaman, M., Abu Saed, M., Hossain, A., et Karmakar, U. K. (2013).** Assessment of bioactivities of ethanolic extract of *Melia azedarach* (*Meliaceae*) leaves. *Journal of Coastal Life Medicine*, 1(2): 118-122.

Aufrere, J., Theodoridou, K., et Baumont, R. (2012). Valeur alimentaire pour les ruminants des légumineuses contenant des tannins condensés en milieux tempérés. *Productions Animales*, 25(1): 29.

Azam, M. M., Mamunor, R. A., Towfique, N. M., Sen, M. K. L., et Nasrin, S. (2013). Pharmacological potentials of *Melia azedarach* L. *AJBIOLOGICS*, 1: 44-9.

-B-

Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J.C. et Pinkas M. (1996). Oxygen sepecies scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Rzneimittel Forschung*, 46: 1086-1089.

Barquero, A. A., Alché, L. E., et Coto, C. E. (1997). Antiviral activity of meliacine on the replication of a thymidine kinase-deficient mutant of Herpes simplex virus type 1 alone and in combination with acyclovir. *International journal of antimicrobial agents*, 9(1): 49-55.

Benavente-García, O., Castillo, J., Marin, F. R., Ortuño, A., et Del Río, J. A. (1997). Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12): 4505-4515.

Bitencourt, T. A., TakahasiKomoto, T., Marins, M., et Fachin, A. L. (2014). Antifungal activity of flavonoids and modulation of expression of genes of fatty acid synthesis in the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. In *BMC Proceedings*. Biology Medical Central, 8(4): 53.

Bohnenstengel, F. I., Wray, V., Witte, L., Srivastava, R. P., et Proksch, P. (1999). Insecticidal meliacarpins (C-seco limonoids) from *Melia azedarach*. *Phytochemistry*, 50(6): 977-982.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. Ed. Médicales Internationales Editions Technique et Documentation, 1: 647-673.

Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. Lavoisier Techniques et Documentation.

-C-

Cacace J.E. et Mazza G. (2002). Extraction à l'eau sulfurée des anthocyanines et autres composés phénoliques du cassis. *Institut National de Technologie Agricole. Canada*, 1-16.

Capinera, J. L. (Ed.). (2008). *Encyclopedia of entomology*, Springer Science et Business Media. Florida, 2: 850-856. ISBN: 978-1-4020-6242-1.

Carpinella, M. C., Defago, M. T., Valladares, G., et Palacios, S. M. (2003). Antifeedant and insecticide properties of a limonoid from *Melia azedarach* (*Meliaceae*) with potential use for pest management. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(2): 369-374.

Chiffelle, G., Huerta, F., et Lizana, R. (2009). Physical and chemical characterization of *Melia azedarach* L. fruit and leaf for use as botanical insecticide. *Chilean journal of agricultural research*, 69(1) : 38-45.

Clifford, M N. (1991). Chlorogenic acids and other cinamates-nature, occurrence and dietary burden :les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechnique et universitaires romandes, CH-1050 Lausanne, ISBN 2-88074-625-6.

Crozier, A., Clifford, M. N., et Ashihara, H. (Eds.). (2008). *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. John Wiley & Sons.

Couto, R. O., Conceição, E. C., Chaul, L. T., Oliveira, E. M., Martins, F. S., Bara, M. T. F., Rezende K.R., Alves S.F., et Paula, J. R. (2012). Spray-dried rosemary extracts: Physicochemical and antioxidant properties. *Food Chemistry*, 131(1): 99-105.

Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4): 564-582.

Crozier, A., Clifford, M. N., et Ashihara, H. (2006). *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*.

-D-

D'Ambrosio, M., et Guerriero, A. (2002). Degraded limonoids from *Melia azedarach* and biogenetic implications. *Phytochemistry*, 60(4): 419-424.

Deepika, S and Yash, P. (2013). Preliminary and Pharmacological Profile of *Melia azedarach L.*: An Overview. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3: 133-138.

Deshpande, S. S., Cheryan, M., Salunkhe, D. K., et Luh, B. S. (1986). Tannin analysis of food products. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 24(4): 401-449.

Dey, P. M., et Harborne, J. B. (Eds.). (1997). *Plant biochemistry*. Academic press.

Dirr, M. A. (1998). Manual of woody landscape plants: their identification, ornamental characteristics, culture, propagation and uses. *Manual of woody landscape plants: their identification, ornamental characteristics, culture, propagation and uses*, 5.

Djeridane M., Yousfi M., Nadjema B., Boutassouna D., Stocher P. et Vidal N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97.

-E-

Edenharder, R., et Grünhage, D. (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 540(1): 1-18.

-F-

Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. et Abdelly C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus L.* organs, and their biological activities. *C. R. Biologies*, 331: 372-379.

Ferrari, J. (2002). *Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles: Gnidia involucrata Steud. ex A. Rich.* Thèse de doctorat en Sciences de l'Université de Lausanne. 288.

-G-

G.Kaanin. (2014). Activité antioxydante d'extraits de *Melia azedarach*. Mémoire de Magister. Université de Béjaia. 58-68.

Garcia, L., Vélez, A et Roso M. (1985). Isolation of polyphénols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea L.*) by adsorption on silk fibroin. Biochemecal Engineering Research Laboratory (BERL). Departement of Chemical Engineering. Izmir Institute of Technology. 1-3.

Ghnaya, A. B., Hanana, M., Amri, I., Balti, H., Gargouri, S., Jamoussi, B., et Hamrouni, L. (2013). Chemical composition of Eucalyptus erythrocorys essential oils and evaluation of their herbicidal and antifungal activities. *Journal of pest science*, 86(3): 571-577.

Gurif, F. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspectsof Medicine*, 27: 1 - 93.

-H-

Hadjiakhoondi, A., Vatandoost, H., Khanavi, M., Sadeghipour Roodsari, H. R., Vosoughi, M., Kazemi, M., et Abai, M. R. (2006). Fatty acid composition and toxicity of *Melia azedarach L.* fruits against malaria vector *Anopheles stephensi*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(2): 97-102.

Hajaniaina, (1996). Produits de l'arbre neem en lute antiacridienne : expériences à Madagascar. Le faux neem (*Melia azedarach*) et son utilisation à Madagascar. 164.

Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of natural products*, 59(2): 205-215.

Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics*, 96(2): 67-202.

Hennebelle, T., Sahpaz, S., et Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1): 3-6.

Hodek, P., Trefil, P., et Stiborová, M. (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-biological interactions*, 139(1): 1-21.

Hong, N. H., Xuan, T. D., Tsuzuki, E., Terao, H., Matsuo, M., et Khanh, T. D. (2004). Weed control of four higher plant species in paddy rice fields in Southeast Asia. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 190(1): 59-64.

-J-

Jadhav, S. J., Nimbalkar, S. S., Kulkarni, A. D., et Madhavi, D. L. (1995). Lipid oxidation in biological and food systems. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER*. 5-64.

-K-

Kahkonen, M. A. Hopia, et M. Heinonen. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. *J. Agric. FoodChem*, 49: 4076-4082.

Kahouli, I. (2010). *Effet antioxydant d'extraits de plantes (Laurus nobilis L., Rosmarinus officinalis, Origanum majorana, Oléa Europea L.) dans l'huile de canola chauffée.* Thèse de maître de sciences en génie-agroalimentaire. Université laval Québec.

Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., et Abdelly, C. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(3): 244-249.

-L-

Leong, L. P., et Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food chemistry*, 76(1): 69-75.

Lhuillier, A. (2007). *Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches: Agauria salicifolia Hook. f ex Oliver, Agauria polyphylla Baker (Ericaceae), Tambourissa trichophylla Baker (Monimiaceae) et Embelia concinna Baker (Myrsinaceae).* Thèse de doctorat en sciences des agro ressources à l'Institut National Polytechnique de Toulouse. 200.

Little, E. L. (1961). Sixty trees from foreign lands. *Agriculture handbook/Forest service. United States Department of Agriculture*. 212.

Lungu, L., Popa, C., Morris, J., et Savoiu, M. A. N. U. E. L. A. (2011). Evaluation of phytotoxic activity of *Melia azedarach L.* extracts on *Lactuca sativa L.* *Romanian Biotechnological Letters*, 16(2): 6089-6095.

Luthria, D. L. (2008). Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. *Food Chemistry*, 107(2): 745-752.

-M-

- Macheix J J, Fleuriet A et Jay-Allmand C. (2005).** Nature et diversité des composés phénoliques. IN : les composés phénoliques des végétaux, un complexe de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes, CH-105 Lausanne. 1-31.
- Mamadou B. (2002).** Action pharmacologique des tanins. Thèse de doctorat. Université Cheik Anta Diop de Dakar. 57.
- Manikandan, P., Vidjaya, Letchoumy., Gopalakrishnan, M., et Nagini, S. (2008).** Evaluation of *Azadirachta indica* leaf fractions for in vitro antioxidant potential and in vivo modulation of biomarkers of chemoprevention in the hamster buccal pouch carcinogenesis model. *Food and chemical toxicology*, 46: 2332-2343.
- Middleton, E., Kandaswami, C., et Theoharides, T. C. (2000).** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4): 673-751.
- Miller, J. H. (1995).** Exotic plants in southern forests: their nature and control. In *Herbicide-resistant crops: a bitter or better harvest? Proceedings of the 48th annual meeting of the Southern Weed Science Society, Memphis, Tennessee, USA*. Southern Weed Science Society. 120-126.
- Mohammedi, Z. (2006).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. *Mémoire de Magister. Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen*. 105.
- Molyneux, P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, 26(2): 211-219.
- Mukohata, Y., Nakabayashi, S., et Higashida, M. (1978).** Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation. *FEBS letters*, 85 : 215-218.

-N-

N. Zeghad. (2009). Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire de Magister Université de Constantine. 17-19-41-69.

Nacz, M., et Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41(5): 1523-1542.

Nahak, G., et Sahu, R. K. (2010). In vitro antioxidative activity of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* Leaves by DPPH scavenging assay. *National Science*, 8(4): 22-8.

-O-

Oelrichs, P. B., Hill, M. W., Vallely, P. J., MacLeod, J. K., et Molinski, T. F. (1983). Toxic tetranortriterpenes of the fruit of *Melia azedarach*. *Phytochemistry*, 22(2): 531-534.

Oomah, B.D, Blanchard, C., et Balasubramanian, P. (2008). Phytic acid, phytase, minerals, and antioxidant activity in Canadian dry bean (*Phaseolus vulgaris* L) cultivars. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 56, 11312-11319.

Orhan, I. Erdogan., Guner, E., Ozturk, N., Senol, F.S., Erdem, S. Aslan., M. Kartal, B. Sener, (2012). Enzyme inhibitory and antioxidant activity of *Melia azedarach* L. naturalized in Anatolia and its phenolic acid and fatty acid composition. *Industrial Crops and Products*, 37: 213-218.

Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., et Simons, A. (2009). Agroforestry database: a tree species reference and selection guide version 4.0. *World Agroforestry Centre International Council for Research in Agroforestry, Nairobi, KE.*

Özgülven M., et Tansi S. (1998). Drug yield and essential oil of *Thymus vulgaris* L. as influenced by ecological and ontogenetical variation. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 22(6): 537-542.

-P-

Park, H. J., et Cha, H. C. (2003). Flavonoids from leaves and exocarps of the grape Kyoho. *Korean Journal of Biological Sciences*, 7(4): 327-330.

- Pereira, A.P., Ferreira I. CFR., Marcelino, F., Valentao, P., Andrade, P.B., Seabra, R. Estevinho, L., Bento, A. et Pereira, J.A. (2007).** Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of olive (*olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. *Molecules*, 12: 1153-1162.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., et Gordon, M. H. (Eds.). (2001).** *Antioxidants in food: practical applications*. Cooperative Research Centre press.
- Price, M. L., Van Scoyoc, S., et Butler, L. G. (1978).** A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(5): 1214-1218.
- Priscila D.A., Brandão, M. G., Nunan, E. A., et Vianna-Soares, C. D. (2009).** Chromatographic evaluation and antimicrobial activity of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) leaves hydroalcoholic extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(2B): 510-515.
- R-**
- Ramirez, J. (1988).** Effect of different chemical treatments on nutritional and antinutritional properties of coffee pulp. *Animal Feed Science and technology*, 99, 201.
- Ramya, S., Jepachanderamohan, P. J., Kalayanasundaram, M., et Jayakumararaj, R. (2009).** In vitro antibacterial prospective of crude leaf extracts of *Melia azedarach* Linn. against selected bacterial strains. *Ethnobotanical Leaflets*, (1): 32.
- Rana, A. (2008).** *Melia azedarach*: A phytopharmacological review. *Pharmacognosy Reviews*, 2(3): 173-179.
- Ribéreau-Gayon, P., et Gautheret, R. J. (1968).** *Les composés phénoliques des végétaux*. 173-201.
- Rishi, K., Ram, S., Suhag, M. P., et Kalidhar, S. B. (2003).** Chemical components and insecticidal properties of bakain (*Melia azedarach* L.). *Agriculture Review*, 24(2): 101-115.
- Rodríguez-Rojo, S., Visentin, A., Maestri, D., et Cocero, M. J. (2012).** Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *Journal of Food Engineering*, 109(1): 98-103.

Roger, K. G., Christelle, A. N. T., Akhanovna, M. B. J., et Yves-Alain, B. (2011). CCM d'extraits sélectifs de 10 plantes utilisées dans le traitement Traditionnel du Cancer du sein en Côte d'Ivoire. *European Journal of Scientific Research*, 63(4): 592-603.

-S-

Schofield, P., Mbugua, D. M., et Pell, A. N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 91(1): 21-40.

Seeram, N. P., Lee, R., et Heber, D. (2004). Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum L.*) juice. *Clinica Chimica Acta*, 348(1): 63-68.

Sharma, D., et Paul, Y. (2013). Preliminary and Pharmacological Profile of *Melia azedarach L.*: An Overview.

Sharma, D., et Paul, Y. (2013). Preliminary and Pharmacological Profile of *Melia azedarach L.*: An Overview. *Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol*, 3(12): 133-138.

Sithisarn, P., Charlotte, U. Carlsen., Mogens, L. Andersen., Wandee G, et Leif, H. S. (2007). Antioxidative effects of leaves from *Azadirachta* species of different provenience. *Food Chemistry*, 104: 1539–1549.

Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A. R., Simoni, M., et Knez, Ž. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chemistry*, 89(2), 191-198.

Srinivasa Rao A., Ahmed M. F. (2013). Simultaneous estimation of quercetin and rutin in ethanolic extract of *Melia azedarach*. Linn leaves by HPTLC method. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 3(21), 56.

Strack, D. (1997). 10 Phenolic Metabolism. *Plant biochemistry*. 387.

-T-

Timbo, B. (2003). *Etude phytochimique et des activités biologiques de Trichilia emetica Vahl* (Doctoral dissertation, Thèse de la faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie du Mali).

Tsimogiannis, D. I., et Oreopoulou, V. (2006). The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3, 4-hydroxy substituted members. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 7(1): 140-146.

-U-

Urquiage, I., et Leighton, F. (2000). Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biology Research*, 33: 5564.

-V-

Van Acker, S. A., van Balen, G. P., van den Berg, D. J., Bast, A., et van der Vijgh, W. J. (1998). Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochemical pharmacology*, 56: 935-943.

Vishnukanta, R. A., et Rana, A. C. (2008). Analgesic and anti inflammatory activity of hydroalcoholic extract of leaves of *Plumbago zeylanica*. *Pharmacognosy Magazine*, 4: 133-136.

-W-

Wachsman, M., Martino, V., Gutkind, G. O., Coussio, J. D., et Coto, C. E. (1982). Antiviral activity of a *Melia azedarach* plant extract. *Fitoterapia*.

-Y-

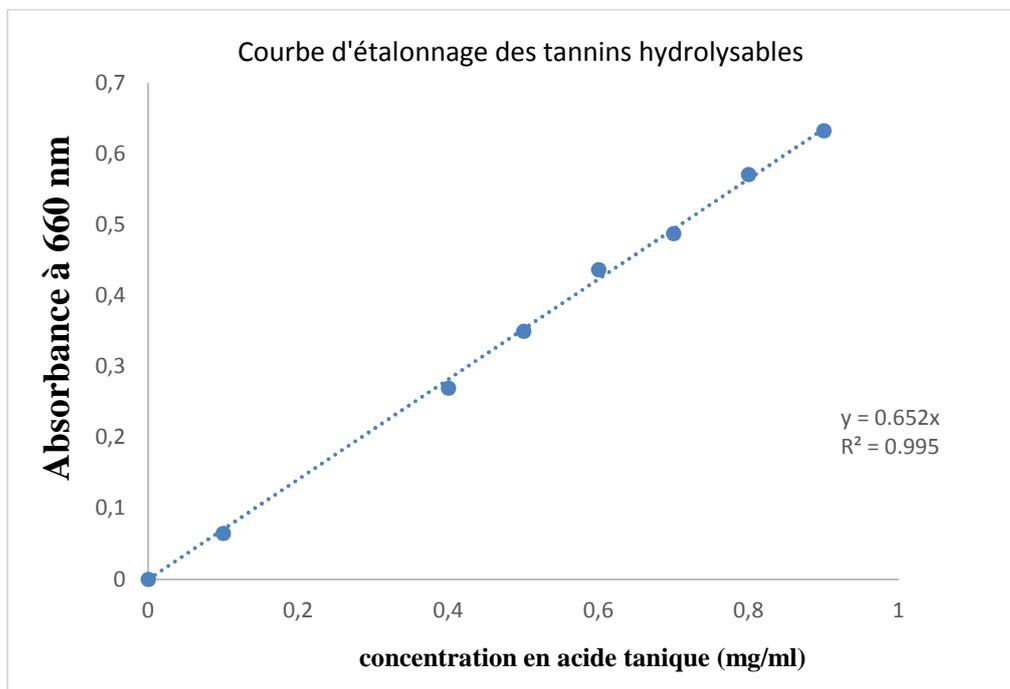
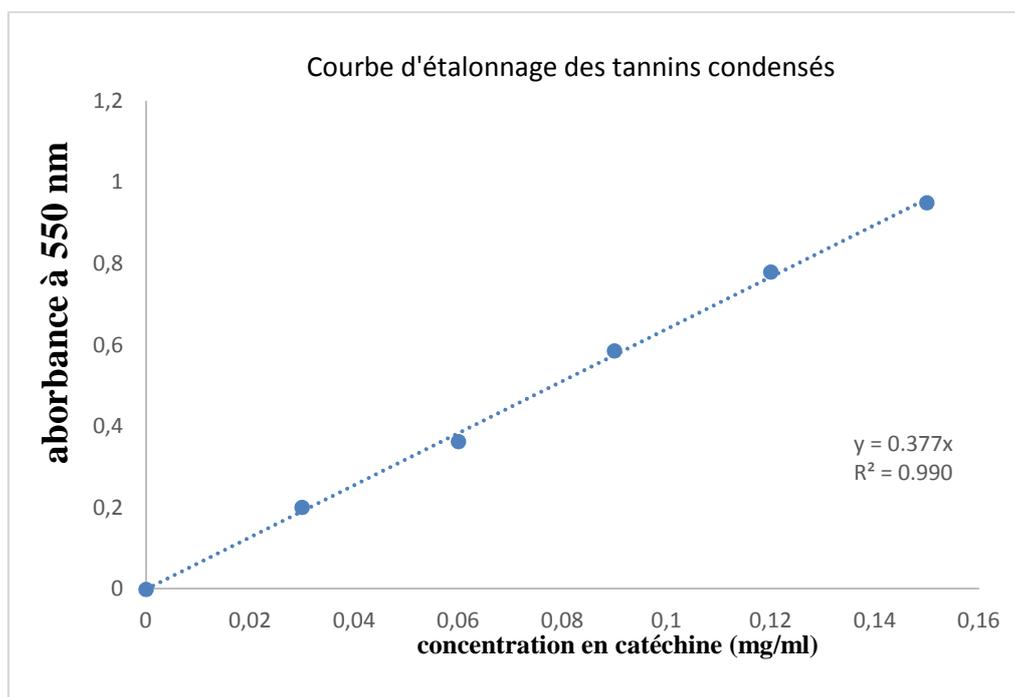
Yao, L. H., Jiang, Y. M., SHI, J., Tomas-Barberan, F. A., Datta, N., Singanusong, R., et Chen, S. S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 59: 113-122.

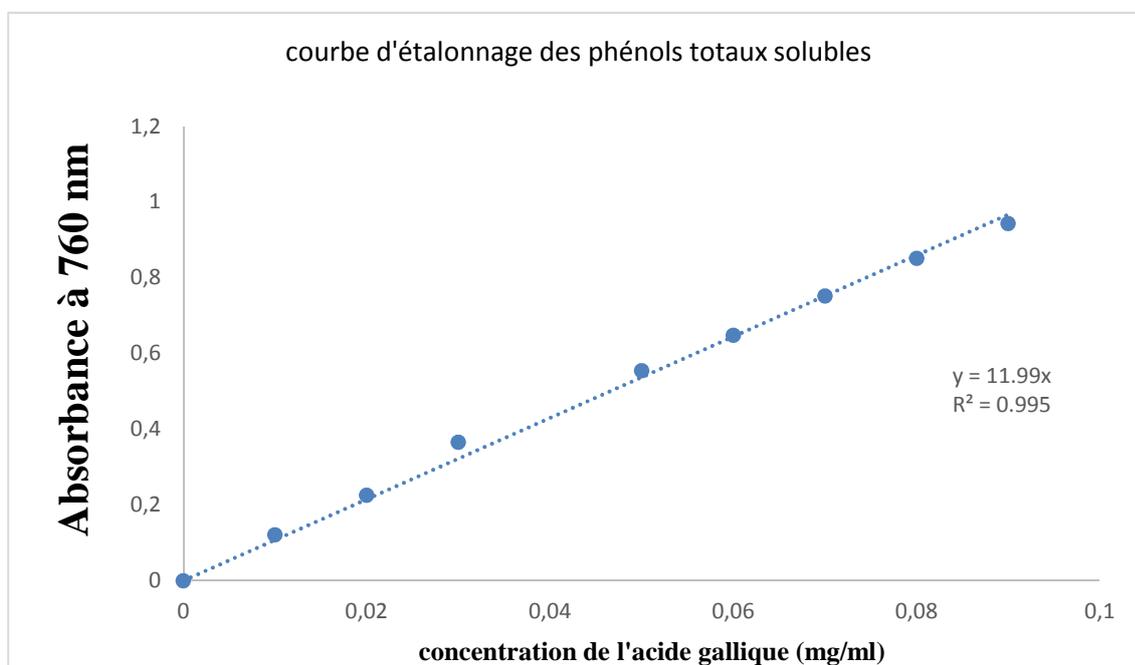
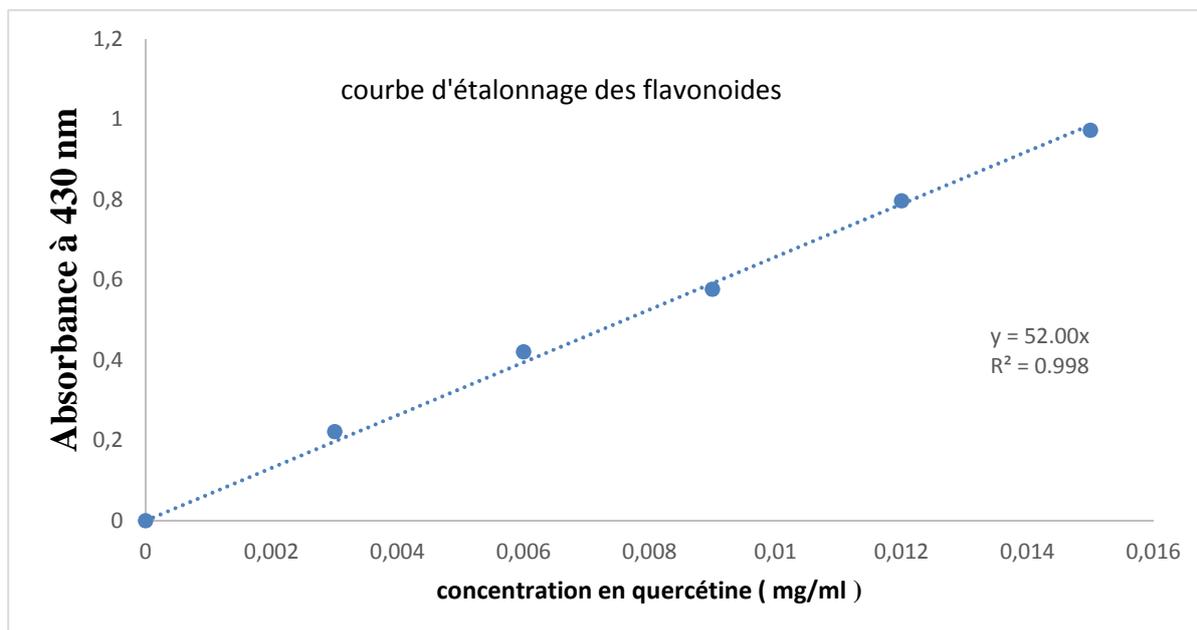
Yoshida, H., Ishikawa, T., Hosoai, H., Suzukawa, M., Ayaori, M., Hisada, T., et Nakajima, K. (1999). Inhibitory effect of tea flavonoids on the ability of cells to oxidize low density lipoprotein. *Biochemical pharmacology*, 58: 1695-1703.

Yoshie-Stark, Y., Hsieh, Y. P., et Suzuki, T. (2003). Distribution of flavonoids and related compounds from seaweeds in Japan. *Journal-Tokyo University of Fisheries*, 89: 1-6.

Annexes

Annexes I : Courbes d'étalonnage.





Résumé :

Melia azedarach est une plante présentant essentiellement un intérêt pharmaceutique, pour le traitement de diverses affections ou maladies et dans la protection phytosanitaire (traitement insecticide). Elle est utilisée en Algérie comme tonique et antipyrétique.

Les résultats obtenus montrent la richesse des extraits en polyphénols avec des teneurs élevées en flavonoïdes (3.21 mg Eq Q / g MS), tannins hydrolysables (125,86 mg Eq AT / g MS), et tannins condensés (26,58 mg Eq Cat / g MS) obtenues par l'éthanol (80%), et une teneur élevée obtenue par l'éthanol (50%) pour les phénols totaux (24,90 mg Eq AG / g MS). Le fractionnement des extraits sur CCM a révélé la présence de fractions flavonoidiques de type quercétine et de la rutine. Les tests de l'activité antioxydante de DPPH sur plaques CCM montrent que tous les extraits présentent des propriétés antioxydantes à différents niveaux.

Mots clés : *Melia azedarach* , composés phénoliques, activité antioxydante, DPPH.

Abstract :

Melia azedarach is a plant of essentially pharmaceutical interest, for the treatment of various conditions or diseases and in phytosanitary protection (insecticide treatment). It is used in Algeria as tonic and antipyretic.

The results obtained show the richness of the polyphenol extracts with high contents of flavonoid (3.21 mg Eq Q / g MS), hydrolysable tannins (125.86 mg TA E / g MS), and condensed tannins (26.58 mg Eq Cat / G MS) obtained with ethanol (80%), and a high content of total phenols (24.90 mg Eq AG / g MS) obtained at ethanol (50%). Fractionation of the extracts on CCM revealed the presence of quercetin and rutin like flavonoid fractions. Tests of the antioxidant activity of DPPH on CCM plates show that all the extracts exhibit antioxidant properties at different levels.

Key words: *Melia azedarach*, phenolic compounds, antioxidant activity, DPPH.

الملخص :

Melia azedarach تعرض أساسيا أهمية في مجال الصيدلة لعلاج مختلف الالتهابات و في حماية النباتات (مبيد الحشرات).

. النتائج المتحصل عليها تظهر ان المستخلصات البوليفينولية غنية بمحتوى عالي من الفلافونويد (3.21 mg Eq Q / g M) ، (125,86 mg Eq AT / g MS) ، (26,58 mg Eq Cat / g MS) المتحصل عليها الايثانول 80 و محتوى عالي متحصل عليه بالايثانول 50% للفينول المجمعة (24,90 mg Eq AG /g MS).

طريقة DPPH الفلافونويد كيرسيتين روتين. CCM تبين ان كل المستخلصات تقدم خواص مضادة للاكسدة على مختلف المستويات.

الكلمات المفتاحية : *Melia azedarach* المركبات الفينولية الأنشطة المضادة للاكسدة DPPH.