

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Béjaïa
Département de Biologie Physico-chimique



Laboratoire de recherche de biotechnologie végétal et ethnobotanique

Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée

Thème

Etude de l'activité antioxydante et anti-radicalaire des extraits de *Rhamnus alaternus*

Présenté par : M^{elle} HELLAL Asma et M^{elle} MENDIL Sabrina

Composition du jury :

M ^{me} B. KHETTAL	MCA	Présidente
Mr M. TACHERFIOUT	MAA	Promoteur
M ^{elle} N. CHAHER	MAA	Examinatrice

Année Universitaire : 2015/2016



Remerciements

En préambule à ce mémoire, nous adressons nos remerciements les plus sincères tout d'abord au « Bon Dieu » le tout puissant de nous avoir guidé vers le chemin du savoir et de nous avoir donné le courage, la patience et la santé qui nous ont été utiles tout au long de nos parcours.

Toute notre estime et notre respectueuse gratitude vont à notre promoteur Mr TACHERFIOUT M. D'avoir accepté de nous encadrer, malgré ses multiples occupations, il a dirigé ce travail avec rigueur et objectivité, ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles, qu'il trouve ici l'expression de notre haute considération et notre profonde reconnaissance.

Nous adressons nos profonds remerciements à M^{me} KHETTAL B. d'avoir accepté de présider le jury ;

Nos vifs remerciements s'adressent à M^{elle} CHAHER N. d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Ces remerciements ne seraient pas complets si n'apparaissait pas tous les membres du laboratoire de recherche biotechnologie végétale et ethnobotanique, particulièrement, Karim, Habiba, Saïda, Lynda, Samia que nous avons eu l'occasion de côtoyer durant notre travail.

Dédicaces

A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

A mes chers parents, en témoignage de ma reconnaissance pour leur patience, leur sacrifice et leur soutien indéfectible tout au long de mes études. Que dieu leur prête santé ;

A ma grand-mère que dieu la garde pour nous ;

A mes très chères sœurs Ibtissem, Radia et Lina ;

A mes chers frères Riad et Fares, et leurs épouses Alia et Siham ;

A mes nièces Maya et Aylène ;

A toute ma famille et mes proches ;

A mon binôme Sabrina et toute sa famille.

A toute la promotion Biochimie appliquée 2015/2016.

-Asma-

Dédicaces

A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie,

J'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

A mes chers parents, en témoignage de ma reconnaissance pour leur patience, leur sacrifice et leur soutien indéfectible tout au long de mes études. Que dieu leur

Prête santé ;

A mes grands parents que dieu les gardes pour nous ;

A ma très chère sœur Salima et mes très chers frères Nassim, Djamel, Missipssa, Yanis ;

A toute ma famille et mes proches ;

A mon binôme Asma et toute sa famille ;

A mes très chers amis en particulier Yamina, Nourdine, Sihem ;

A toute la promotion Biochimie appliquée 2015-2016 ;

A tous ceux que j'apprécie et je n'ai pas mentionné mais que je n'ai pas oublié.

-Sabrina -

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Chapitre I: Synthèse bibliographique

Rhamnus alaternus

I.1. Description botanique 2

I.2. Classification botanique 2

I.3. Noms vernaculaires 3

I.4. Composition chimique et biochimique 4

I.5. Utilisation dans la médecine traditionnelle 5

I.6. Activités biologique 6

I.6.1. Activité anti oxydante 6

I.6.2. Activité antimicrobienne 6

I.6.3. Activité anti-enzymatique 7

Le stress oxydant et les antioxydants

I.7. Radicaux libres 8

I.7.1. Définition des radicaux libres 8

I.7.2. Origine de radicaux libres 8

I.7.3. Les radicaux libres endogènes 9

I.7.4. Les radicaux libres exogènes	9
I.7.5. Classification des radicaux libres.....	10
I.7.6. Rôle des radicaux libres	12
I.7.7. Les cibles biologiques des radicaux libres.....	13
I.1.7.1. Les lipides	14
I.1.7.2. L'ADN	14
I.1.7.3. Les protéines	14
I.8. Le stress oxydant.....	15
I.9. Les antioxydants	16

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. Matériel végétal	20
II.2. Extraction.....	20
II.3. Fractionnement de l'extrait méthanolique.....	21
II.4. Analyses phytochimiques partielles	23
II.4.1. Dosages des polyphénols totaux.....	23
II.4.2. Dosages des flavonoïdes.....	23
II.4.3. Dosages des Tannins	24
II.5. Détermination de l'activité antioxydant et anti-radicalaire	24
II.5.1. Pouvoir anti-radicalaire	24
II.5.1.1 Activité scavenging du radical DPPH	24
II.5.1.2. Activité scavenging du radical ABTS ^{·+}	26
II.5.2. Evaluation du pouvoir réducteur	27

II.5.2.1. Chlorure ferrique	27
II.5.2.2. Phosphomolybdate d'ammonium	28
II.6. Blanchissement de β -carotène	29

Chapitre III: Résultats et discussion

III.1. Rendement d'extraction	30
III.2. Dosage des antioxydants	30
III.2.1. Teneur en polyphénols totaux	31
III.2.2. Teneur en flavonoïdes	32
III.2.3. Dosages des tannins	33
III.3. Activité antioxydante et anti-radicalaire	34
III.3.1. Pouvoir anti-radicalaire	34
III.3.1.1. Activité scavenging du radical DPPH	34
III.3.1.2. Activité scavenging du radical ABTS	36
III.3.2. Pouvoir réducteur	38
III.3.2.1. Réduction de chlorure ferrique	38
III.3.2.2. Réduction de phosphomolybdate d'ammonium	40
III.4. Blanchissement de β -carotène	42
Conclusion	45
Références bibliographiques	46

Annexes

Liste d'abréviations

ABTS^{•+}: 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid

AlCl₃: Chlorure d'aluminium

BSA: Bovin Serum Albumin

DPPH: 2, 2 diphényl-1-pyridyl-hydrazyl

EAG: Equivalent d'Acide Gallique

EAT: Equivalent d'Acide Tannique

ERO: Espèces Réactives d'Oxygènes

EQ: Equivalent de Quercétine

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène (eau oxygéné, dioxyde d'hydrogène)

IC₅₀: Concentration inhibitrice de 50%

min: minutes

MS: Matière sèche

Mo: Molybdate

nm: nanomètre

rpm: rotation par minute

TEAC: Trolox Equivalent Antioxydant Capacity

TCA: Acide Trichloroacétique

Liste des figures

Figure	Titre	page
01	Feuilles, fleurs et graines de <i>Rhamnus alaternus</i>	2
02	La structure chimique des flavonoïdes aglycones de <i>R. alaternus</i> .	4
03	la structure chimique de quelques flavonoïdes glycosylés de <i>Rhamnus alaternus</i> .	4
04	Origine des différents radicaux libres impliqués en biologie.	10
05	Les différents stades de réductions de l'oxygène	12
06	Conséquences du stress oxydatif dans la pathogenèse	16
07	Un déséquilibre entre la production de l'O ₂ ^{•-} et la capacité enzymatique de son élimination par la SOD en pathologie inflammatoire.	17
08	Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants de leurs cofacteurs métallique.	18
09	Les feuilles (fraîches, sèches) et poudre de <i>Rhamnus alaternus L.</i>	20
10	Extraction liquide-liquide dans une ampoule à décanter.	21
11	Protocole de préparation des quatre extraits de <i>Rhamnus alaternus</i> .	22
12	Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.	25
13	Formation et piégeage du radical ABTS ^{•+} par un donneur de H [•]	27
14	Teneur en polyphénols totaux des extraits de <i>Rhamnus alaternus</i> .	31
15	Teneur des extraits de <i>Rhamnus alaternus</i> en flavonoïdes	32
16	Teneur des feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> en tannins.	33
17	Graphe représentant l'activité scavenging du radical DPPH des quatre extraits.	34
18	Effet scavenger contre le radical ABTS ^{•+} des quatre extraits.	37
19	Réduction de fer ferrique par les extraits.	39
20	Représentation graphique de l'évaluation de la réduction du Mo ⁺⁶ par les extraits.	41
21	Structure chimique de β-carotène.	43
22	Pourcentage d'inhibition de blanchissement du β-carotène par les extraits d'acétate d'éthyle et le chloroforme.	43

Liste des figures

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Classification botanique de <i>Rhamnus alaternus</i> .	3
II	Principaux espèces réactives oxygénées (ERO) et espèces réactives de l'azote (ERN) leur structure chimique.	9
III	Les pourcentages d'extraction des extraits des feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> .	30
IV	Valeurs des IC50 obtenues pour les extraits et les standards vis-à-vis du radical DPPH de feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> .	36
V	Les concentrations des extraits ($\mu\text{g/ml}$) des feuilles qui inhibent 50% d'ABTS	37
VI	Activité scavenging vis-à-vis du radical ABTS des extraits des feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> .	37
VII	Valeurs d'IC50 obtenus pour les extraits et les standards lors de la réduction du chlorure ferrique.	38
VIII	Valeurs d'IC50 ($\mu\text{g/ml}$) pour le test de réduction du phosphomolybdate	40
IX	Valeurs d'IC50 pour le teste blanchissement de β -carotène	42
X	Valeurs d'IC50 pour le teste blanchissement de β -carotène	44

Introduction

L'usage des plantes en médecine est très ancien, elles restant encore le premier réservoir pour le concept de nouveau médicament. Les plantes médicinales sont la source principale de molécules bioactifs comme les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénolique, les tanins, les terpènes et les flavonoïdes. Ces composés ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en pharmacie et en cosmétologie (**Bahorun et al., 1996**).

Le potentiel des constituants antioxydants des plantes pour la prévention des cancers, des maladies cardiovasculaires et de la peroxydation lipidique est largement évoqué par les scientifiques (**Rice- Evans et al., 1996 ; Aviram et al., 2002**). En effet, les différentes études expérimentales renforcent l'hypothèse selon laquelle le stress oxydatif est directement impliqué dans l'apparition de ces maladies. Pour lutter contre les radicaux libres nocifs, notre organisme possède des systèmes de défenses antioxydants. Certains sont endogènes, alors que d'autres sont exogènes.

La flore algérienne, l'une des plus riches du bassin méditerranéen, recèle de nombreuses espèces végétales aux vertus thérapeutiques et organoleptiques. Parmi celles-ci, les plantes de la famille des (*Rhamnaceae*) inclut des espèces végétales médicinales bien connues possédant diverses propriétés biologiques (**Mai et al., 2001**). C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à étudier *Rhamnus alaternus*, une plante utilisée en médecine traditionnelle comme purgative, laxative, diurétique, et pour le traitement dermatologique et hépatique (**Ben Ammar et al., 2008**).

Le but de ce présent travail est d'évaluer l'activité anti-oxydante et anti-radicalaire des extraits des feuilles de *Rhamnus alaternus*. Le manuscrit est reparti en deux parties, en premier lieu, la synthèse bibliographique qui est devisée en deux chapitres. Le premier où sont présentées les généralités sur la plante de *Rhamnus alaternus*, le deuxième chapitre traite les différents radicaux libres et le phénomène physiopathologique dont ils sont responsables, le stress oxydant. La deuxième partie est l'étude expérimentale, elle est devisée en deux chapitres. Le premier est la description des matériels et méthodes utilisée dans la réalisation de ce travail. Tandis que le deuxième chapitre est une description des résultats obtenu et un essai de leur d'interprétation.

Généralités sur
Rhamnus alaternus

I.1. Description botanique

Les Rhamnacées sont une famille cosmopolite d'arbres, arbustes, plantes grimpantes, qui sont constituées de 59 genres et environ 900 espèces, y compris *Rhamnus* qui comprend 110 espèces (Marzouk et al., 1999). Ce sont des espèces médicinales bien connues possédant diverses propriétés biologiques. *Rhamnus alaternus* est un arbuste qui est distribué le long du bassin méditerranéen (Gulias et al., 2004). Elle se trouve dans les pays d'Afrique du nord : en Algérie, au Maroc et en Tunisie, et dans les fourrés du littoral méditerranéen ; en Algérie elle pousse dans les forêts, les rocailles et surtout dans les rochers des montagnes (Ait Youssef, 2006).

Rhamnus alaternus est un arbuste dioïque d'origine méditerranéenne avec une longévité de 100 ans (Bas et al., 2009 ; Varone et Gratani, 2009), de 2-6 mètres de hauteur, ayant des tiges droites (Izhaki et al., 2002 ; Hemmami et al., 2006 ; Bas et al., 2009). Les feuilles sont persistantes et ovales, alaternes, épaisses, de formes variées, lancéolées, de dimension de 1-6cm de long et à court pétioles, luisantes et vertes dessus, plus pâles dessous. Les fleurs petites, unisexuées, de couleurs jaunâtre, réunies en petites grappes latérales, qui apparaissent à la fin d'hiver et au début du printemps, avec un pic à la mi-février. Cela produit des fruits sphériques, d'un diamètre 4-6 mm à 3 noyaux, leur surface est d'abord rouge, puis devient noire à la maturité, qui mûrissent en fin de printemps et début de l'été. Chaque fruit a 2-5 graines, ayant une forme triangulaire de 2,5mm de largeur 4,6 mm de longueur et d'un poids environ 9mg (Bayer et al., 1990; Rameau et Mansion, 2008 ; Bas et al., 2009 ; Miralles et al., 2010 ; El Aou-Ouad., 2015).



Figure 1: Feuilles, fleurs et graines de *Rhamnus alaternus* (Bayer et al., 1990).

I.2. Classification botanique

Rhamnus alaternus appartient à la classe des Magnoliopsida-Dicotylédones, à la famille des Rhamnaceae et au genre *Rhamnus*. La classification botanique complète de la plante est représentée dans le tableau I.

Tableau I : Classification botanique de *Rhamnus alaternus* (Yi-ling et Pan-kai, 1982)

Taxon	Nom
Domaine	Eukaryota- eucaryote
Règne	Plantae-Végétal
Sous règne	Viridiaeplantae- Plantes vertes
Règne	Magnoliophyta- plantes à fleurs
Sous phylum	Spermatophytina-plantes à graines
Infraphylum	Angiospermae-Angiosperme
Classe	Magnoliopsida-Dicotylédones
Sous classe	Rosidae
Super ordre	Rhamnanae
Ordre	Rhamnales
Famille	Rhamnaceae
Genre	<i>Rhamnus</i>
Espèce	<i>Rhamnus alaternus</i>

I.3. Noms vernaculaires

Le nom de genre *Rhamnus* provient du grec *rhamnos*, nom du Nerprun purgatif et le nom d'espèce *alaternus* est l'ancien nom latin de la plante. En arabe : Soitfaïr, Oud El-khir ou bien Safir. En Kabyle : Mélilés. En anglais : alaternus barrem pruvet. En Français : Nerprun, alaterne, sanguin blanc .En Allemand : alternbaum, immergrumer. En Espagnol : Aladierna. En Italien : Alaterno, Legno Puzzo. En corse alaternu scotanu (**Rameaun et Mansion, 2008**).

I.4. Composition chimique et biochimique

Rhamnus alaternus est caractérisée d'un point de vue phytochimique par l'abondance des substances phénoliques, particulièrement les tannins, anthraquinones comme l'émodin, chysophanol, alaternin et physcion qui sont les quatre anthraquinones aglycones isolés à partir des parties aériennes de *Rhamnus alaternus* (Izhaki et al., 2002 ; Ben Ammar et al., 2007). Des flavonoïdes aglycones, comme le kaempférol, la quercétine et l'apégénine (Figure 2) (Wojdylo et al., 2007), et des flavonoïdes glycosylés tel que le kaempférol-3-O-bisorhamninoside (1), rhamnocitrin 3-Ob-isorhamninoside (2) et rhamnétine-3-O-bisorhamninoside (3) (Figure 3) (Ben Ammar et al., 2009).

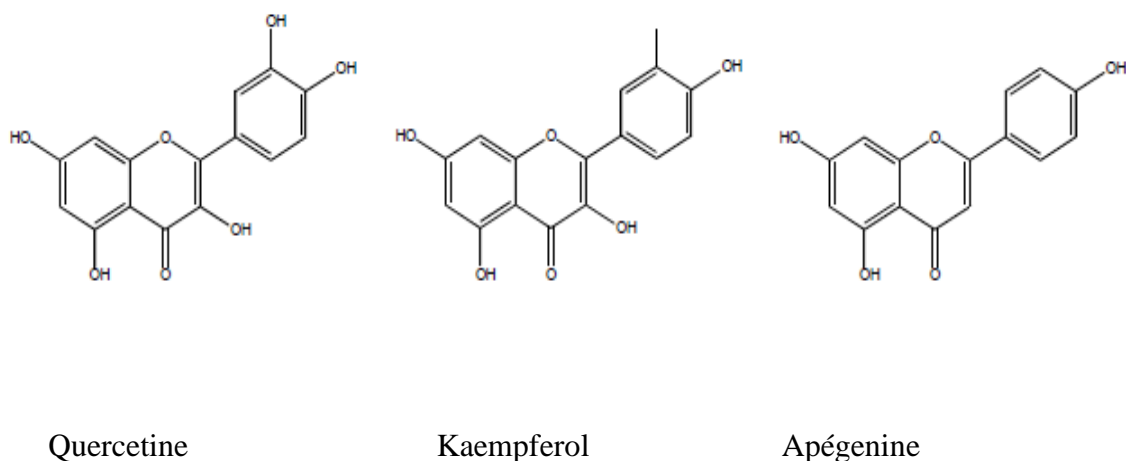


Figure 2: la structure chimique des flavonoïdes aglycones de *R.alaternus* (Wojdylo et al., 2007).

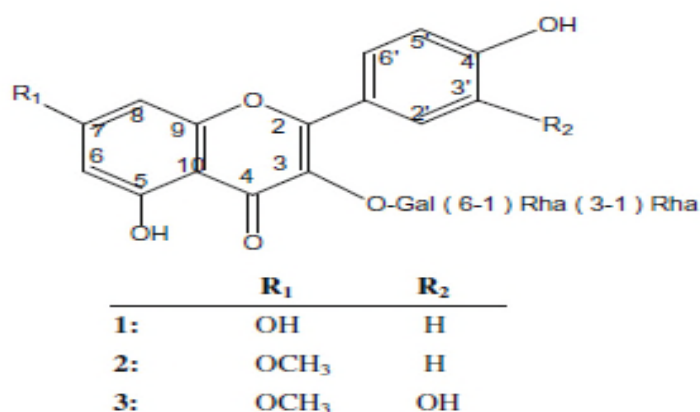


Figure 3: la structure chimique de quelques flavonoïdes glycosylés de *R.alaternus* (Ben Ammar et al., 2009)

La pulpe de *R. alaternus* est composée principalement d'eau (68%), de minéraux (Fe, Zn, Mn, K, Na, Ca, Mg, P, Cu) dont le plus abondant est le K (12.90%), de lipides, protéines et de fibres (cellulose, hemicellulose et lignine). Les fruits relativement volumineux de *Rhamnus alaternus* contiennent plus d'eau et de Phosphore, les fruits de taille intermédiaire contiennent plus de lipides, Magnésium et de Calcium et les fruits plus petits contiennent plus de protéines, Potassium et zinc. Des données prouvent que la pulpe de fruit contient toujours moins d'emodin que les feuilles (**Izhaki et al ., 2002**).

I.5.Utilisation dans la médecine traditionnelle

R. alaternus est l'une des espèces utilisées généralement dans le programme de reboisement dans la méditerranée, en raison de sa capacité de survivre dans les environnements xériques (**Gulias et al., 2004**). Les tiges et les feuilles de *Rhamnus alaternus* L. étaient utilisées en Algérie- dans le constantinois, contre la jaunisse et les troubles hépatiques provoqué par le paludisme. Le bois ou l'écorce de *Rhamnus alaternus* L. est employé dans l'Est du Maroc, en décocté et dans un bouillon de viande pour traiter des affections hépatiques. Le fruit était utilisé en Algérie comme purgatif doux ; au Maroc- dans le Haut Atlas et le Moyen Atlas, il est toujours employé comme laxatif (**Ait Youssef, 2006**). Le fruit de *R. alaternus* représente aussi une source important d'eau d'éléments nutritifs (**Izhaki et al., 2002 ; Gulias et al., 2004**). Ces feuilles émettent des petites quantités de l'isoprène (2-méthyl-1,3-butadiene) qui affectent l'oxydation de l'atmosphère en nettoyant les radicaux OH, et peut indirectement influencer sur l'accumulation du méthane atmosphérique, et surtout protège les feuilles contre la photooxydation en réagissant avec O₂ produit lors de la photosynthèse (**Affek et Yakir, 2002**).

L'espèce *Rhamnus alaternus* L. comme une bonne source d'anthraglucosides. L'écorce des racines ou des tiges (rameaux) sont riches en dérivés anthracénitque. Les feuilles en sont également riches et les fruits en contiennent probablement aussi. Cette richesse rend parfaitement compte des propriétés laxatives et surtout purgatives de toutes les parties utilisées (**Ait Youssef, 2006**).

L'émodine produit sur la surface des feuilles à plusieurs activités biologiques. Il peut protéger la plante contre les effets nocifs de la lumière UV, il represent aussi des effets purgatifs chez l'homme, et des effets d'allélopathie, antibactériens et antifongiques (**Izhaki et al., 2002**). Cette plante est efficace dans le traitement des complications hépatique et certaines

affections dermatologiques (**Ben Ammar et al., 2009**). D'autres indications sont rapportées comme le traitement des brûlures, d'odontalgie et pour le soin oculaire (**Ben Ammar et al., 2008**).

I.6. Activités biologiques

I.6.1. Activité anti oxydante

Certains extraits de *Rhamnus alaternus*, ont un potentiel d'activité antioxydante liée à la composition de la plante en flavonoïdes et polyphénols (**Ben ammar, et al., 2008 Bhourri et al., 2012**). Les flavonoïdes neutralisent les radicaux libres, en se liant directement à ces derniers.

Les flavonoïdes de *Rhamnus alaternus* sont de bon chélateurs de métaux qui jouent un rôle important dans le métabolisme de l'oxygène et l'apparition des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la réduction du H₂O₂ par génération de quantité importante de radicaux libres hydroxyles [**Aschok, 2001**]. Les travaux de **Kelly (2002)** et **Yen (1995)** ont démontré que les flavonoïdes, sont de bons donneurs d'électrons et d'hydrogène ce qui leur confère la capacité de terminer la chaîne de formation des radicaux, en convertissant les radicaux libres et les ERO en produits stables.

I.6.2. Activité antimicrobienne

L'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* exercent une activité antimicrobienne contre une large gamme des microorganismes, particulièrement les bactéries résistantes aux multiples antibiotiques (**Percival, 2004**). L'EM de *Rhamnus alaternus* inhibe la croissance des bactéries Gram⁺ représentées par, *Staphylococcus aureus*, et Gram – représentées par *Escherichia coli* et sur une levure, *Candida albicans* (**Mashhadian et Rakhshandeh, 2005**).

I.6.2. Activité antimutagène

L'effort oxydant provoqué par des espèces réactives de l'oxygène induit l'oxydation des biomolécules menant aux dommages cellulaires (**Ben Ammar et al., 2008**). L'extrait organique de *R. alaternus* a une propriété antimutagène qui se traduit par l'inhibition des agents mutagène (Aflatoxine B1) probablement à son abondance en flavonoïdes et en tannins (**Ben Ammar et al., 2005 ; Ben Ammar et al ., 2007**).

I-1-6-3-Activité anti-inflammatoire

Des études ont montré que les extraits organiques de *R. alaternus* possèdent des activités anti-inflammatoires. Ces activités sont corrélées avec la composition en polyphénols surtout en flavonoïdes, tannins et anthraquinones tel que l'émodin. Cette propriété est due principalement à l'activité de ce métabolite à piégeger des radicaux libre (**Ben Ammar et al., 2005**).

I-6-5- Activité anti-enzymatique

Des études *in vitro* ont montré que les extraits organiques de *R. alaternus* inhibent significativement l'activité des carboxyl estérases, enzymes largement distribuées dans les tissus animaux, essentiellement impliqués dans le catabolisme du nombreux xénobiotiques, tels que des carboxylesters, des thio-esters et des amides. Cette propriété inhibitrice est attribuée aux flavonoïdes qui exercent une activité non compétitive (**Stocker et al., 2004**).

Radicaux libres et stress oxydatif

De nos jours, Il existe un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. Ce n'est pas seulement dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme ou l'ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire (**Guinebert et al., 2005**).

I.7. Radicaux libres

I.7.1. Définition des radicaux libres

Un radical libre une espèce chimique (atome ou molécule) contenant un électron non apparié sur un orbitale externe. Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé par l'acceptation d'un autre électron ou par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule qui devient, à son tour un radical libre (**Figure 5**). La probabilité d'aller vers l'une ou l'autre de ces deux possibilités dépend essentiellement de l'instabilité du radical libre considéré, ce dernier a donc la propriété d'être extrêmement réactif vis-à-vis des autres molécules et possédant un temps de demi-vie extrêmement court (de nano à la millisecondes) Ils sont émis soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente pendant laquelle chaque atome conserve son électron, soit au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'électron à partir d'un composé non radicalaire (**Dusser, 1997 ; Christelle, 2006 ; Afonso et al., 2007 ; Karunakaran et Kumaran, 2007**).

I.7.2. Origine de radicaux libres

La production des radicaux libres (Tableau II) dans l'organisme et au sein des différentes cellules est continue par nombreux mécanisme tant exogène ou endogène (**beaudeux et al., 2006**).

Tableau II: Principaux espèces réactives oxygénées (ERO) et espèces réactives de l'azote (ERN) leur structure chimique

Espèce réactive	Formule chimique
Dioxygène singulet	$^1\text{O}_2$
Anion superoxyde	$\text{O}_2^{\cdot-}$
Radical hydroxyle	OH^{\cdot}
Radical hydroperoxyde	HOO^{\cdot}
Radical peroxyde	ROO^{\cdot}
Hydroperoxyde	ROOH
Radical alkoxyde	RO^{\cdot}
Peroxyde de d'hydrogène	H_2O_2
Radical oxyde nitrique	NO^{\cdot}
Peroxynitrite	$\text{ONOO}^{\cdot-}$
Hypochlorite	$\text{ClO}^{\cdot-}$

I.7.3. Les radicaux libres endogènes

Les radicaux libres endogènes peuvent provenir de différents compartiments cellulaires. La mitochondrie représente une source importante, même en cas d'hypoxie (chaîne respiratoire). Ainsi, les radicaux superoxydes ($\text{O}_2^{\cdot-}$) sont produits au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale, par réduction monovalente d'une petite proportion du dioxygène, parallèlement au processus de phosphorylation oxydative (**Bonnefont-Rousselot et al., 2013**). Ils peuvent être produits par le réticulum endoplasmique (RE) (mono-oxygénases), la membrane plasmique (oxydases), les peroxysomes et le cytoplasme (**Barouki, 2006**). (**Figure 4**)

I.7.4. Les radicaux libres exogènes

Les radicaux libres exogènes proviennent d'un apport extérieur, incluant la fumée de tabac, les rayonnements ionisants, certains polluants, les solvants organiques et les pesticides. Ces quelques toxines peuvent pénétrer au cerveau et induire la formation de radicaux libres (**Yildirim et al., 2001**). Les rayonnements sont capables de générer des radicaux libres, en activant des molécules photosensibilisantes. Les rayons ultraviolets, ce mécanisme vont produire des anions superoxydes et de l'oxygène singulet (**favier, 2003**). (**Figure 4**)

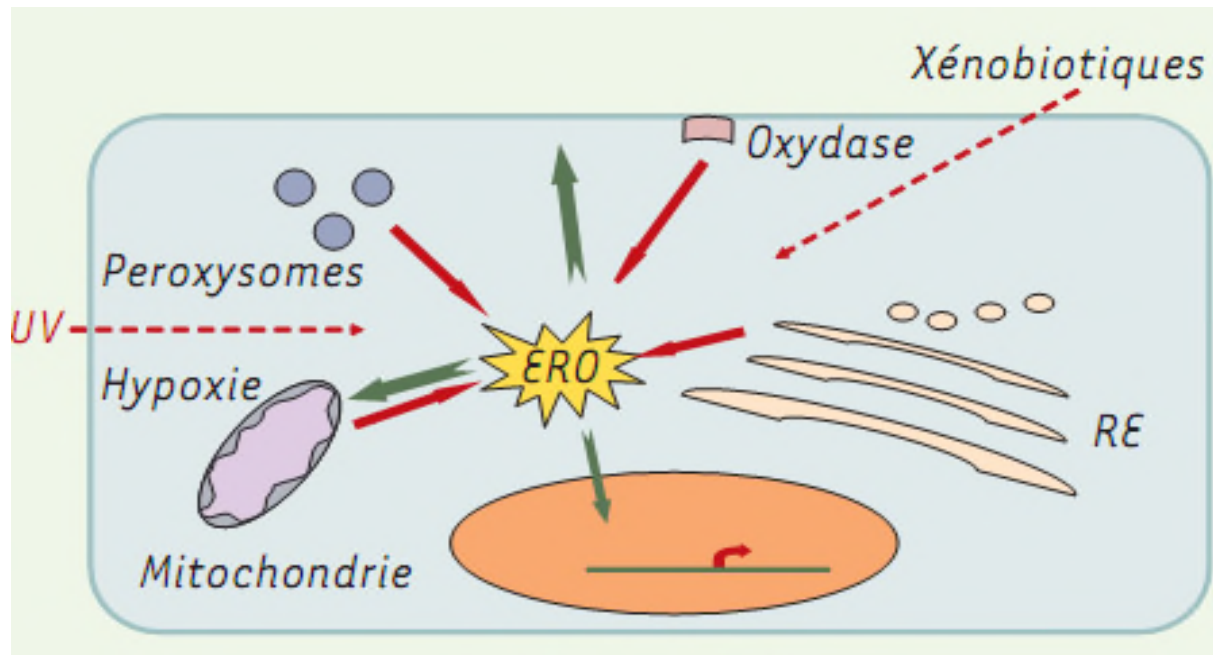


Figure 4: Origine des différents radicaux libres impliqués en biologie (**Barouki, 2006**).

I.7.5. Classification des radicaux libres

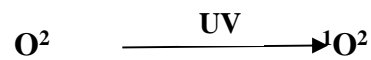
Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et qui seront appelés radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (**Favier, 2003**).

I.7.5.1. Les radicaux libres primaires

Les radicaux libres primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) ou de l'azote tel le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}). D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces réactives de l'oxygène comme l'oxygène singulet (1O_2) le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde ($ONOOH$) ne sont pas des radicaux libres mais sont réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux (**Favier, 2003**).

- ✓ Le radical oxygène singulet (1O_2)

L'oxygène singulet est formé à partir de l'oxygène sous l'influence de rayonnement UV (Barouki, 2006).



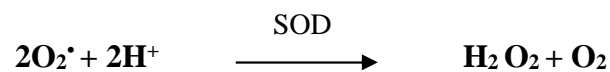
✓ **Anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$)**

Le dioxygène est capable de capter un électron en présence de rayonnements, de métaux ou d'enzymes de type oxydases ou mitochondriales, il est capable de capter un électron pour donner le radical superoxyde, qui est un radical modérément réactif (Barouki, 2006)



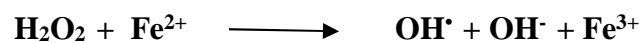
✓ **Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)**

Le peroxyde d'hydrogène est formé à partir de l'anion superoxyde par la voie des superoxydes dismutases (SODs) (Rochette, 2008).



✓ **Le radical hydroxyle (OH^{\cdot})**

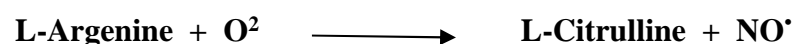
Le radical hydroxyle est formé à partir de l'eau oxygénée H_2O_2 en présence de métaux, en particulier le fer Fe^{2+} par la réaction de Fenton (Barouki, 2006).



Le radical hydroxyle est extrêmement réactif et va oxyder très rapidement les molécules voisines formant parfois d'autres radicaux libres.

✓ **L'oxyde nitrique (NO^{\cdot})**

L'oxyde nitrique est produit à partir de L-Argénine sous l'action de NO synthase (Bonnefont-rousselot et al., 2002).



✓ Anion peroxyntrite (ONOO^-)

L'anion peroxyntrite est une espèce oxydante importante, car sa réactivité est assez proche de celle de radical hydroxyle (OH^\bullet), la plus réactives des espèces réactive d'oxygène, il est formé à partir de NO^\bullet et $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Vamecq *et al.*, 2004).

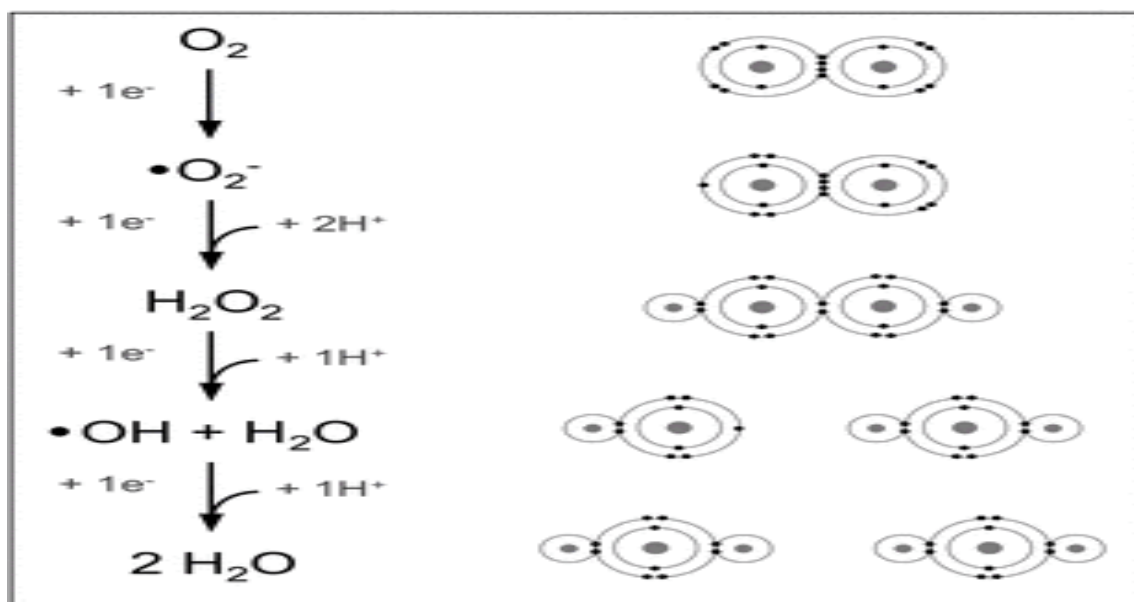
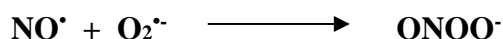


Figure 5 : Les différents stades de réductions de l'oxygène (Fontaine, 2007).

I.7.5.2. Les radicaux libres secondaires

Les radicaux libres secondaires ne sont pas formés spontanément: ils sont formés par l'action d'un radical primaire sur un composé cellulaire. Exemple le radical peroxy (ROO^\bullet) qui est formé après que le radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ ou OH^\bullet ait agi sur un acide gras insaturé de la membrane cellulaire. Ces radicaux libres secondaires sont très dangereux puisqu'une fois formés, ils sont capables de créer une réaction en chaîne (Lacan, 2001).

I.7.6. Rôle des radicaux libres

En situation physiologique, il y a un équilibre parfait entre la production des radicaux libres et les systèmes de défenses antioxydants. Il faut souligner que les radicaux libres peuvent d'ailleurs jouer un rôle physiologique important comme dans la phagocytose des bactéries, la croissance, la migration, la sénescence, la survie des cellules endothéliales et des

cellules musculaires lisses, la réponse inflammatoire et la prolifération des cellules musculaires lisses (**Bonnefont-rousselot., 2002 ; Pincemail, 2002**).

Il est cependant apparu plus récemment que les radicaux libres, lorsqu'ils sont formés en faibles concentrations, ce sont des régulateurs des voies de signalisation et de l'expression des gènes au niveau des cellules vasculaires jouant ainsi un rôle important dans les processus pathologiques de ces cellules (**Bonnefont-rousselot., 2002**).

L'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ joue un rôle clé dans l'inflammation en général, et dans les maladies rhumatismales en particulier (**Afonso et al., 2007**).

Les ERO (peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ et hydroxyles OH^{\bullet}) sont responsables d'une manière directe ou indirecte, de nombreux dommages oxydatifs au niveau moléculaire (acides nucléiques, protéines, lipides...), pouvant affecter considérablement les mécanismes cellulaires (**Gardès-albert et al., 2003**).

Le dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites est à l'origine des phénomènes de stress oxydant dont l'importance dans de nombreuses pathologies est maintenant largement démontrée. C'est ainsi que dans l'athérosclérose, le rôle des ERO apparaît comme majeur, validant la « théorie oxydative de l'athérosclérose » proposée il y a une quinzaine d'années par Steinberg *et al* et rejoignant la théorie inflammatoire (**Gardès-albert et al., 2003**).

Les ERO seraient également impliquées dans les maladies neuro dégénératives à début tardif, notamment la maladie d'Alzheimer, où la mort neuronale pourrait être liée à un phénomène d'apoptose impliquant les radicaux libres. La maladie de Parkinson s'accompagne aussi d'un stress oxydant en relation à la fois avec un dysfonctionnement mitochondrial et un défaut de l'élimination des protéines oxydées par le protéasome (**Gardès-albert et al., 2003**).

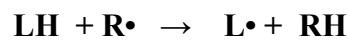
Enfin, les ERO semblent également jouer un rôle non négligeable dans la cancérogenèse, puisque ces espèces peuvent être responsables de mutations dans l'ADN, ce qui constitue un facteur de risque dans l'initiation et le développement du cancer. (**Gardès-albert et al., 2003**).

I.7.7. Les cibles biologiques des radicaux libres

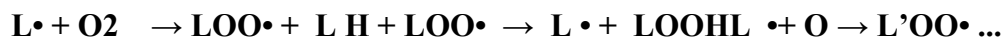
Les radicaux libres peuvent interagir avec des protéines, de l'ADN, des lipoprotéines et des acides gras polyinsaturés pour former des dérivés oxydés pouvant être décelés dans des échantillons biologiques, le plasma, le sérum ou l'urine (**Pincemail et al., 1999**).

I.7.7.1. Les lipides

Les acides gras polyinsaturés comme les acides linoléique ou arachidonique sont les cibles privilégiées de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé peroxydes lipidiques (**Pincemail et al., 1999**). Ceci conduit à une réaction en chaîne de peroxydation lipidique, qui modifie la fluidité et la perméabilité de la membrane et peut aussi altérer le fonctionnement des protéines membranaires. La peroxydation des lipides est généralement initiée par un radical ($R\bullet$) particulièrement réactif selon la réaction :



Le radical lipidique ($L\bullet$, radical alkyle) formé lors de cette réaction réagit avec l'oxygène pour former un radical peroxyde capable de transformer un autre acide gras polyinsaturé en radical lipidique propageant ainsi la réaction de peroxydation (**Ré et al., 2005**).



I.7.7.2. L'ADN

Les radicaux libres peuvent provoquer des lésions des acides nucléiques susceptibles d'entraîner des mutations ou d'altérer l'expression des gènes (**Ré et al., 2005**). Ils peuvent réagir avec la guanine, base constitutive de l'ADN, pour la transformer en 8-hydroxy-2' déoxyguanosine (8-OH2DG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

I.7.7.3. Les protéines

Les modifications des structures primaire, secondaire et tertiaire des protéines par les radicaux libre sont à la base de la formation de dérivés protéiques carbonylés via plusieurs mécanismes incluant la fragmentation et l'oxydation des acides aminés. En présence de dinitrophénylhydrazone (DNPH) (**Pincemail et al., 1999**). Les plus sensibles à leur action sont les acides aminés aromatiques comme le tryptophane et la tyrosine sur lesquels le radical $OH\bullet$ s'additionne, modifiant la conformation de la protéine. Sur les acides aminés contenant

un atome de soufre tels que la cystéine et la méthionine, l'oxydation par les radicaux libres conduit à la formation de ponts disulfures (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

I.8. Le stress oxydant

I.8.1. Définition

Le stress oxydant est défini comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre les réactions des espèces pro oxydantes, cela est dû à un déséquilibre lié soit à une production massive d'espèces réactives, soit à une diminution de la capacité anti-oxydante de l'organisme (**Defragine et al., 2007**).

En effet, le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications. La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydants et augmente la multiplication mitochondriale de radicaux (**Sohal et al., 2002**). Le stress oxydant est la principale cause initiale de plusieurs maladies. C'est le facteur potentialisant l'apparition des maladies plurifactorielles telles que le diabète, la maladie d'alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Bidie, 2010**).

I.8.2. Origine de stress oxydant

La rupture d'équilibre, de la balance antioxydant/pro-oxydant, peut avoir de multiples origines comme une production beaucoup trop forte de radicaux libres. Elle peut provenir également d'une défaillance nutritionnelle ou d'une carence en un ou plusieurs antioxydants apportés par la nutrition comme les vitamines ou les oligo-éléments présents en quantité limitée ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques) ou bien d'une mauvaise adaptation qui peut résulter d'anomalies génétiques responsables d'un mauvais codage d'une protéine soit enzymatiquement antioxydant, soit synthétisant un antioxydant (comme la gamma glutamyl synthétase produisant le glutathion) (figure 6) (**Favier, 2003**).

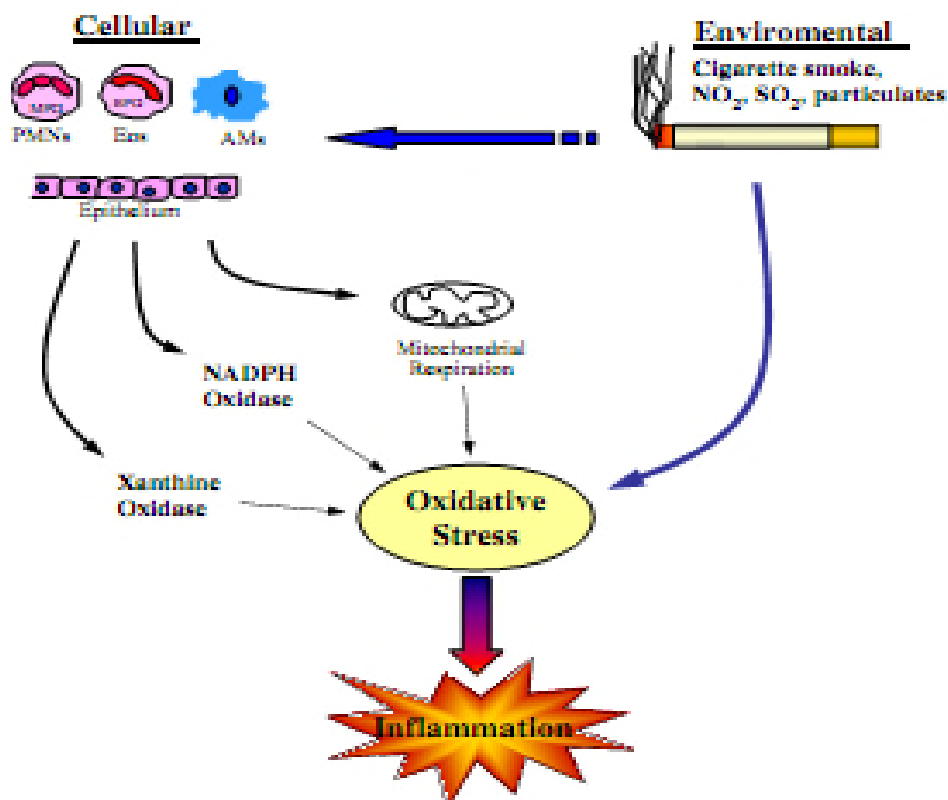


Figure 6 : Conséquences du stress oxydatif dans la pathogénèse (Kirkham et Rahman, 2006).

I.9. Les antioxydants

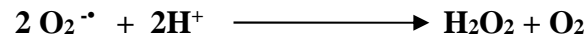
Les antioxydants sont des substances capables d'inhiber l'oxydation et diminuent la concentration des radicaux libres dans le corps. L'organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule (Favier, 2003).

I.9.1. Le système endogène

Constitué de molécules de petite taille (glutathion, acide urique), d'enzymes ou d'agents réducteurs (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase, complexe enzymatique de la thiorédoxine) dont l'action est de neutraliser les radicaux libres par leur transformation en molécules stables et non réactives. Ou de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine, protéines de choc thermique, hème oxygénase). A cela s'ajoutent quelques oligo-éléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs importants pour l'activité de certaines enzymes antioxydantes. (Pincemail et al., 2009)

I.9.1.1. Superoxydes dismutases (SOD)

Sont des metalloenzymes qui catalysent la dismutation du radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène et oxygène moléculaire. SOD 1 des membres de la famille des SODs, par la réaction suivante :



Les SODs contiennent soit du manganèse (Mn-SOD), soit du cuivre et du zinc (Cu/Zn-SOD), et qui sont restreintes à des compartiments cellulaires différents (Ré et al., 2005). Il existe trois types de SOD : la SOD 1 ou Cu/Zn-SOD, est cytosolique ; la SOD 2 ou Mn-SOD est mitochondriale ; la SOD 3, qui comme la SOD1 comporte du cuivre et du zinc, est extracellulaire et est donc aussi appelée EC-SOD (figure 7) (Afonso et al., 2007)

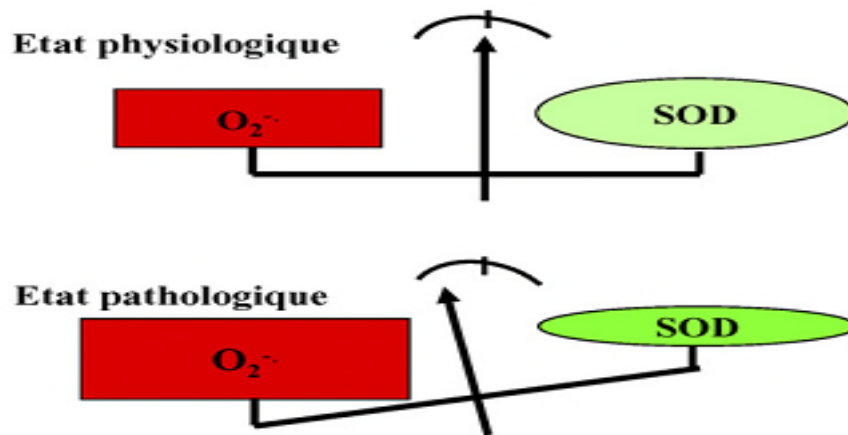
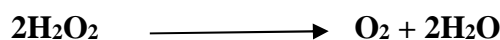


Figure 7 : Un déséquilibre entre la production de l'O₂^{•-} et la capacité enzymatique de son élimination par la SOD en pathologie inflammatoire.

I.9.1.2. Catalase

Cette enzyme hémique se produit principalement dans les peroxysomes et les érythrocytes. Sont la classe d'enzymes qui catalysent la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire suite à la réaction suivante:



I.9.1.3. Glutathion peroxydase (GPx)

Cette enzyme est présente dans le cytoplasme et dans la mitochondrie. C'est une glycoprotéine tétramérique qui réduit d'une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau, et d'autre part tous les peroxydes lipidiques. Lors de cette réaction, qui demande l'intervention de deux molécules de glutathion GSH, celles-ci se transforment en glutathion-disulfure GSSG selon la réaction suivante

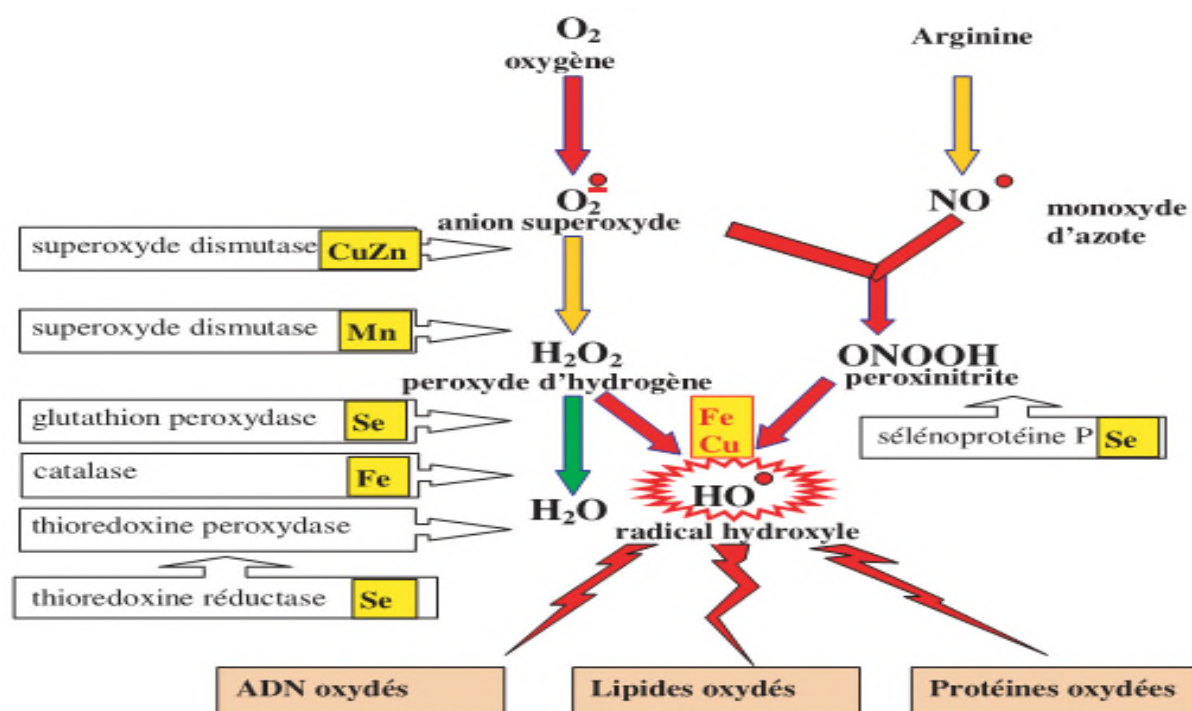
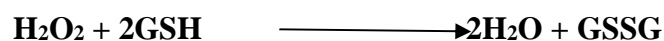


Figure 8 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants de leurs cofacteurs métallique (Favier, 2003).

I.9.2. Le système naturel exogène

L'organisme possède une seconde ligne de défense « les piègeurs de radicaux libres » qui sont des composés pour la plupart apportés par l'alimentation et dont le rôle essentiel est de neutraliser les effets toxiques des EOR, limitant ainsi toute atteinte de l'intégrité cellulaire. Les principaux antioxydants non-enzymatiques (Vitamine C, Vitamine E, β -carotène, Flavonoïdes, Acides phénoliques, Tanins) retrouvés dans l'alimentation qu'ils montrent toute l'importance d'une alimentation équilibrée, riche en fruits et légumes, pour l'efficacité Nutritionnel afin de préserver un équilibre cellulaire adéquat entre oxydants et antioxydants (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Matériel et méthodes

II-1- Matériel végétal

Cette étude a été réalisée sur les feuilles de *Rhamnus alaternus L.*, récoltées au niveau du village taghzouit de la région de Bejaïa durant le mois de mars 2014. Une fois récoltées, les feuilles fraîches de *Rhamnus alaternus L.* ont été séchées à l'air libre pendant 20 jours, puis transférées à l'étuve à 35°C pendant 02 jours pour affiner le séchage et pour obtenir un meilleur broyage et meilleure extraction. Après séchage, les feuilles sont broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à obtention d'une poudre fine. Les particules ainsi obtenues sont tamisées sur un tamis de porosité 250 µm pour avoir une poudre homogène. La poudre obtenue est conservée dans un récipient en verre et stockée à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à extraction (figure 9).



Figure 9: Les feuilles (fraîches, sèches) et poudre de *Rhamnus alaternus L.*

II-2- Extraction

L'extraction est réalisée selon la méthode décrite par **Tahiya et al., 2014**. La quantité de méthanol doit être appropriée à la quantité de matière végétale à extraire. L'extraction est effectuée par épuisement du matériel végétal. 90g de la poudre des feuilles de *Rhamnus alaternus* sont macérés dans 700 ml de méthanol. Le mélange est maintenu sous agitation magnétique pendant 24 heures à température ambiante. Après macération, la solution obtenue a été filtrée plusieurs fois sur papier wattman N°03 et le filtrat est récupéré (filtrat 1). La même opération a été répétée avec 400 ml de méthanol, afin d'avoir une extraction exhaustive et le filtrat 2 est récupéré. Les deux filtrats ont été mélangés et le méthanol est évaporé dans un évaporateur rotatif jusqu'à ce que le poids de l'extrait reste constant, le taux de l'extraction est calculé selon la formule suivantes :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = \frac{P_1}{P_0} \times 100$$

P_0 : poids de la poudre avant extraction.

P_1 : poids de l'extrait sec après extraction.

II-3-Fractionnement de l'extrait méthanolique

Après évaporation du méthanol, l'extrait méthanolique brut a été solubilisé dans 120 ml d'eau distillé, puis il a été lavé trois fois avec le même volume d'hexane dans une ampoule à décanter pour éliminer les graisses, les stérols et les pigments (chlorophylle et caroténoïdes). Une extraction liquide-liquide a été ensuite réalisée avec trois solvants de polarité croissante, chloroforme, acétate d'éthyle et le butanol, la récupération de phase contenant le solvant est obtenu selon la densité. Toutes les étapes de l'extraction et du fractionnement sont illustrés dans les figures 10 et 11.

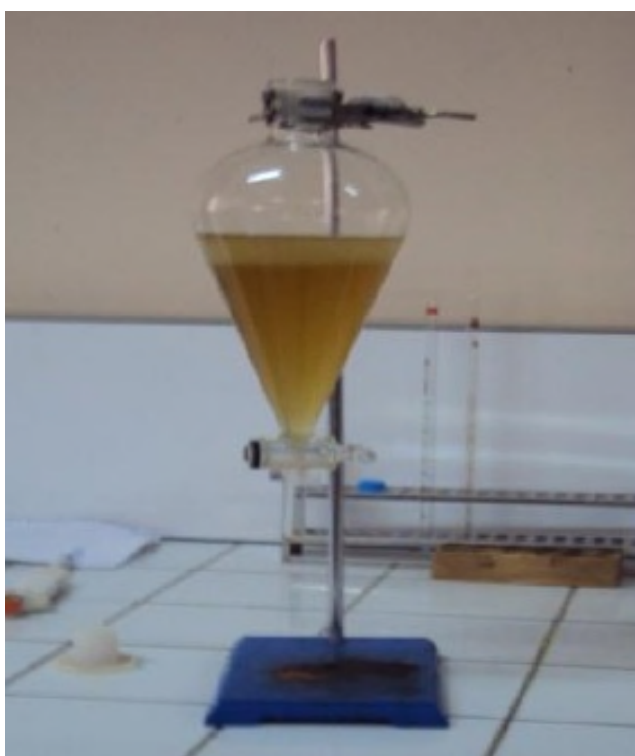


Figure 10 : Extraction liquide-liquide dans une ampoule à décanter (**Prise au niveau de laboratoire**)

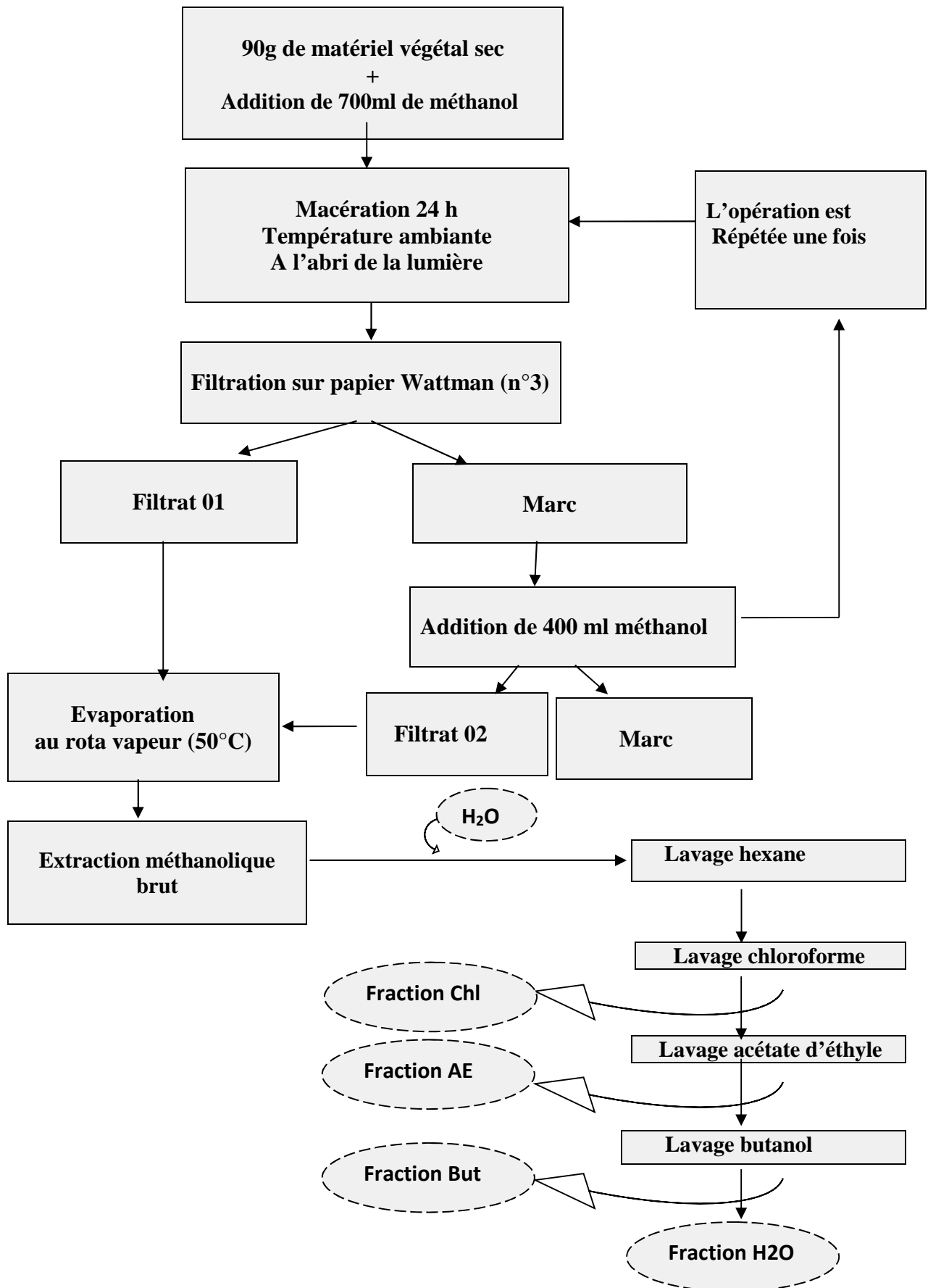


Figure 11: Protocole d'extraction des quatre extraits de *Rhamnus alaternus L.*

II-4- Analyses phytochimiques

II-4-1- Dosages des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux des quatre fractions de l'extrait méthanolique ou des standards est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu (**Singleton et al., 1999**). Cette méthode de quantification des polyphénols totaux exploite la propriété du réactif de Folin-Ciocalteu, composé d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolibdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$), de couleur jaune réduit par les polyphénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (MO_8O_{23}). Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu.

Un volume de 100 μ l de chaque fraction a été ajouté à 0,5 ml de réactif de Folin (0,1N), agité vigoureusement puis laissé agir 5 minutes avant l'ajout de 0,4ml de monohydrate carbonate de sodium (7,5 % p/v). Après une heure d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 760 nm contre un blanc préparé suivant la même procédure sauf que l'extrait est remplacé par le méthanol. Toutes les mesures ont été réalisées en triple. Une courbe standard est réalisée avec différentes concentrations de l'acide gallique dans les mêmes conditions que le dosage des échantillons. La quantité des polyphénols totaux a été exprimée en équivalents milligramme d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g d'extrait) (**Annexe I**).

II-4-2- Dosages des flavonoïdes

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans les fractions de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* est réalisée par la méthode décrite par **Quettier-Deleu et al., (2002)**. Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyl libre qui forme un complexe jaunâtre en présence du trichlorure d'aluminium ; la couleur obtenue est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes dans les extraits.

Un volume de 0,5ml de différentes fractions de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* ou des standards a été ajouté à 0,5ml d'une solution de trichlorure d'aluminium (2%). Après une incubation de 15 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante l'absorbance est lue à 410 nm, le blanc est représenté par le méthanol additionné à $L'AlCl_3$, toutes les opérations sont réalisées en triple. Une courbe standard a été réalisée avec différentes concentrations de la quercétine dans les mêmes conditions que le dosage des

échantillons. La quantité des flavonoïdes est exprimée en équivalents milligramme de quercétrine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g d'extrait) (**Annexe II**).

II-4-3- Dosages des Tannins

Les dosages de la teneur des quatre fractions de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* en tannins ont été accomplis en suivant la méthode décrite par **Hagerman et butler 1978**. Celle-ci consiste à précipiter la BSA dans une solution tampon par les tannins des extraits à doser. Après une hydrolyse alcaline et réaction de l'hydrolyse avec le réactif de chlorure Ferrique (FeCl_3), la teneur du précipité en complexe tannins-protéines est déterminée par spectrophotomètre.

Un volume de 1ml de chaque extrait a été ajouté à 2ml d'une solution de l'albumine de sérum bovin (BSA) préparé dans un tampon acétate (0,2 M, pH = 4,9) à une concentration 1mg/ml. Le mélange a été bien agité et incubé à 4°C pendant 24h. Un précipité tannins – BSA est formé. Une centrifugation à 4000 rpm pendant 15min a été effectuée, puis le surnageant a été éliminé et le culot est récupéré et ensuite solubilisé et hydrolysé avec 4ml de SDS/TEA avec agitation vigoureuse au vortex. Enfin 1ml de FeCl_3 (0,01%) a été ajouté. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 510 nm. La concentration en tannins est calculée en se référant à une courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide tannique comme standard suivant la même opération sauf que sa durée d'incubation avec la BSA est de 15min à 4°C. La teneur en tannins est exprimée en équivalent milligramme d'acide tannique /gramme (mg EAT/g d'extrait) (**Annexe III**).

III-5- Détermination de l'activité antioxydante et anti-radicalaire

L'activité antioxydante des extraits a été déterminée selon deux méthodes, la première évalue le pouvoir anti-radicalaire en mesurant le pourcentage de neutralisation de différents radicaux (DPPH, ABTS⁺), la deuxième est l'estimation du pouvoir réducteur qui mesure la capacité des extraits à réduire les ions métalliques par différents tests (Réduction de chlorure ferrique, de phosphomolybdate).

III-5-1- Pouvoir anti-radicalaire

III-5-1-1- Activité scavenging du radical DPPH

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre de couleur violette est réduit en un composé de couleur jaune (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) en présence de capture de

radicaux libres. La décoloration du DPPH lors de la réaction de la réduction est suivie par mesure de l'absorbance à 517nm (Molyneux, 2004).

L'analyse de l'activité anti-radicalaire de des fractions de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* sur le DPPH a été effectuée selon le protocole d'Akrout et ses collaborateurs (2010).

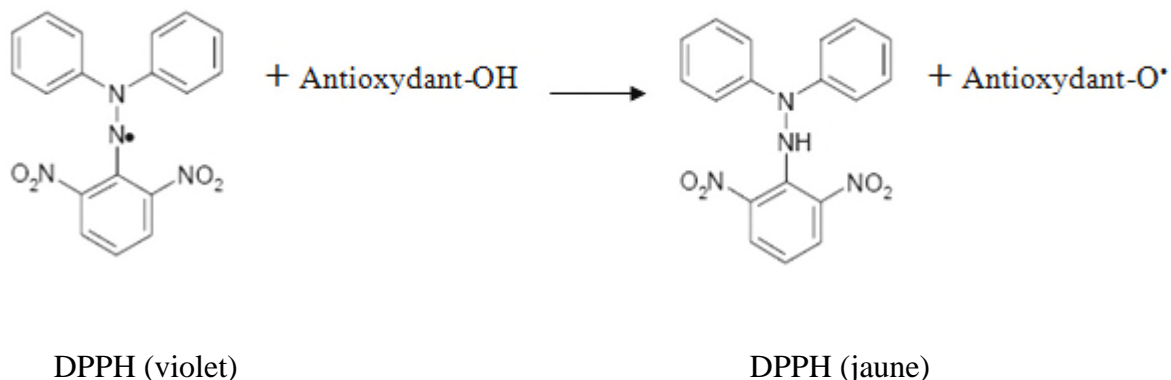


Figure 12 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

Une solution méthanolique de 5mM de DPPH a été préparée, 50 μ l de la solution DPPH (5mM) ont été mélangés à 2,45ml de différentes concentrations de chaque fraction de l'extrait méthanolique (10, 25, 50 et 100 μ g/ml). Après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance est mesurée à 517nm. Les résultats obtenus de la mesure de l'activité scavenger du DPPH, ont été exprimés par rapport à ceux obtenus par la mesure de l'activité de la quercétine et de l'acide gallique, les antioxydants de références, à différentes concentrations (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 μ g/ml) réalisés sous les mêmes conditions. L'activité anti-radicalaire des extraits a été exprimée en pourcentage selon la formule :

$$\% = [A_T - (A_E - A_B) / A_T] \times 100$$

A_T : Absorbance du témoin (Méthanol + DPPH) ;

A_E : Absorbance d'échantillon (Extrait + DPPH) ;

A_B : Absorbance de blanc et d'échantillon (Extrait + Méthanol).

La concentration inhibitrice de 50% (IC50) a été déterminée à partir des pourcentages de réduction de DPPH. L'IC50 est exprimé en µg/ml et est comparé avec celle des standards.

IV.1.2. Activité scavenging du radical ABTS^{·+}

C'est une méthode TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity), basée sur la capacité des composés à piéger le radical-cation ABTS^{·+}. Le radical-cationique (ABTS^{·+}) est formé par oxydation de l'ABTS [Sel d'ammonium de l'acide 2, 2'-azinobis- (3-ethylbenzothiazothiazoline-6-sulfonique)] après l'addition du persulfate de potassium (2,45mM) et laissé à incubation pendant 16h. Le radical ABTS^{·+}, en contact avec un donneur d'hydrogène (H[·]) conduit à l'ABTS⁺ et à la décoloration de la solution à 734nm (figure 13). L'analyse de l'activité scavenging du radical ABTS^{·+} a été effectuée en suivant le protocole de **Lien et al., 1999**.

Le radical ABTS^{·+} a été préparé comme cité précédemment. La solution ABTS^{·+} est diluée en suite avec de l'eau distillé à fin d'obtenir une absorbance de $0,7 \pm 0,02$ à 734 nm. A 1,9ml d'une solution d'ABTS^{·+}, 100µl de l'extrait à différentes concentrations (5, 10, 25, 50, 75 et 100µg/ml) sont ajoutés. Le Trolox a été réalisé dans les mêmes conditions que les extraits a différentes concentrations (0, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2 ug/ml). Après 7min d'incubation à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 734nm. Le pourcentage de l'activité scavenger du radical ABTS des extraits est calculé comme suite :

$$\% = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A₀ : Absorbance du témoin (Méthanol + ABTS^{·+}) ;

A₁ : Absorbance d'échantillon (Extrait + ABTS^{·+}) .

La concentration inhibitrice de 50% (IC50) a été déterminée à partir du pourcentage de réduction d'ABTS^{·+}. L'IC50 est exprimé en µg/ml et est comparée avec celle du standard.

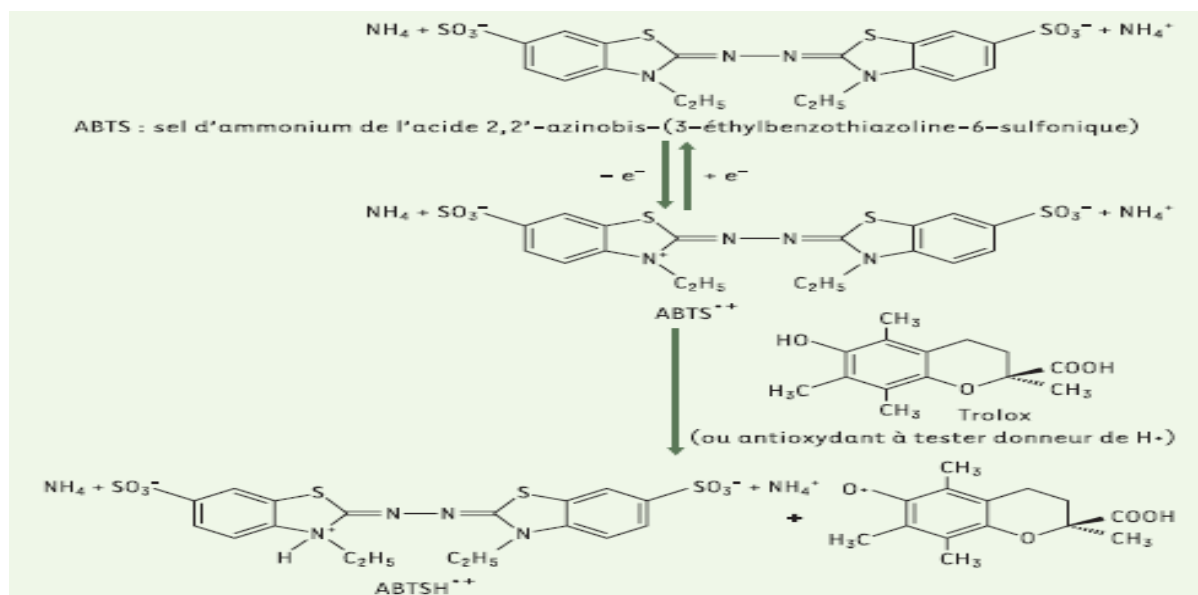


Figure 13: Formation et piégeage du radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ par un donneur d'électron

(Marc et L, 2004).

III-5-2- Evaluation du pouvoir réducteur

La détermination du pouvoir réducteur des quatre fractions de l'extrait méthanolique des feuilles de *Rhamnus alaternus* est réalisé en utilisant deux tests : teste chlorure ferrique et celui de phosphomolybdate d'ammonium.

III-5-2-1- Chlorure ferrique

La détermination du pouvoir réducteur a été réalisée en suivant le protocole de **Lim et al., (2006)**. Le pouvoir réducteur est l'aptitude des antioxydants présents dans les extraits à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) du complexe ferricyanure de potassium en fer ferreux (Fe^{2+}). Après l'ajout de chlorure ferrique, la couleur jaune de ferricyanure de potassium vire vers une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur des extraits.

Un volume de 0,5 ml de chaque extrait à différentes concertations est mélangé à 20 μl de tampon phosphate (0,2 mM, pH 6,6) suivi de 1ml de ferricyanure de potassium (1%). Après agitation, le mélange est soumis à l'obscurité à 50° C pendant 20 minutes, 1 ml d'acide trichloracétique TCA à 10% est additionné au mélange, centrifugé à 3000 rpm pendant 10min. Ensuite 1ml de surnagent sont additionnés de 1ml de l'eau distillé est de 0,2 ml de chlorure ferrique (0,1 %). Le mélange homogénéisé préalablement est incubé à

l'obscurité pendant 10min et à température ambiante, l'absorbance est lue à 700 nm. Les résultats obtenus ont été exprimés par rapport à ceux obtenus par la mesure de l'activité de la quercétine et l'acide gallique, des antioxydants de référence réalisés sous les mêmes conditions. Le pouvoir réducteur de chaque extrait a été exprimé en pourcentage de réduction suivant la formule suivante :

$$\% = [(A_E - A_T) / A_E] \times 100$$

A_E : Absorbance de l'extrait (extrait + chlorure ferrique) ;

A_T : Absorbance de témoin (chlorure ferrique +méthanol) ;

La concentration inhibitrice de 50 % (IC 50) a été déterminée à partir de la courbe de pourcentage de réduction de chlorure ferrique. L'IC50 est exprimé en µg/ml et est comparée avec celle des standards.

III-5-2-2- Phosphomolybdate d'ammonium.

C'est une méthode spectroscopique quantitative pour la détermination de la capacité antioxydante grâce à la formation d'un complexe molybdène. Le test phosphomolybdate d'ammonium est basé sur la réduction en milieu acide, de l'ion Mo^{+6} en ion Mo^{+5} par des substances réductrices présentes dans l'extrait végétal qui forment avec le phosphate Mo^{+5} des complexes de couleur verdâtre (Nur Alam et al., 2012).

La réduction du phosphomolybdate par les fractions de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* a été effectuée en suivant le protocole d'Ekici et al. (2010). 200µl de chaque extrait à différentes concentrations sont mélangés à 2ml de réactif molybdate (préparée à partir de molybdat d'ammonium à 4mM; du phosphate de sodium à 28 mM et de l'acide sulfurique à 0,6 Mm). Les mélanges sont ensuite incubés à 95°C pendant 90 min. L'absorbance a été mesurée à 695nm. Les résultats obtenus ont été exprimés par rapport à ceux obtenus par la mesure de l'activité de la quercétine et de l'acide gallique, des antioxydants de référence réalisés sous les mêmes conditions (Cheurfa et Allem, 2015). Le pourcentage de réduction de phosphomolybdate d'ammonium est calculé comme suite :

$$\% = [(A_E - A_T) / A_E] \times 100$$

A_E : Absorbance de l'extrait (extrait + phosphomolybdate d'ammonium) ;

A_T : Absorbance de témoin (méthanol + phosphomolybdate d'ammonium).

La concentration inhibitrice de 50 % (IC 50) a été déterminée à partir de la courbe de pourcentage de réduction de phosphomolybdate d'ammonium. L'IC50 est exprimé en $\mu\text{g/ml}$ et est comparée avec celle des standards.

III-6- Blanchissement de β -carotène

Dans ce test, la capacité antioxydante des extraits est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydatif du β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique. Le test de blanchissement de β -carotène utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des fractions est celui du **Bougatf et al., 2009**.

Le mélange de β -carotène/acide linoléique est préparé par solubilisation de 2mg de β -carotène dans 10ml de chloroforme, 20 μl de l'acide linoléique et 200mg de Tween 20 sont additionnés. Après évaporation du chloroforme au rotavapeur, 100ml d'eau oxygéné sont ajoutées avec agitation vigoureuse. 100 μl de chaque extrait ou d'antioxydant de référence (Acide ascorbique) à différentes concentrations sont additionnés à 2ml de mélange précédent. Après agitation, l'absorbance est mesurée immédiatement à 470 nm, ce qui correspond à $t = 0$ min. Tous les tubes sont incubés dans un bain marie à 50°C pendant 120min. Ensuite, l'absorbance de chaque extrait est mesurée à 470 nm à $t = 120$ min.

Le pourcentage de l'activité antioxydante des extraits est évalué en termes de blanchissement de β -carotène en employant la formule suivante :

$$\% = [(A_{A(120)} - C_{C(120)}) / (C_{C(0)} - C_{C(120)})] \times 100$$

$A_{A(120)}$: représente l'absorbance en présence de l'extrait (antioxydants) à 120 min ;

$C_{C(120)}$: représente l'absorbance du contrôle à 120 min ;

$C_{C(0)}$: représente l'absorbance du contrôle à 0 min.

La valeur IC50 est définie comme la concentration des antioxydants correspondant à 50 % d'inhibition. Elle est calculée en traçant la courbe des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait.

Résultats et discussion

III.1. Rendement d'extraction

L'extraction méthanolique des feuilles de *Rhamnus alaternus* a donné un rendement de 30,57% d'extrait sec par rapport à la matière sèche initiale. Le taux d'extraction est assez important comparant aux résultats d'une autre étude faite au sein du même laboratoire, qui été réalisé en 2014 par les étudiants (**Yousfi et Zadi**), qui a eu un taux d'extraction 18.3%. Cette différence peut être exprimée par la méthode utilisée, la nature et la concentration des solvants utilisés, la durée et le nombre de macération, la technique utilisée pour l'évaporation des solvants et enfin, la région et la période de récolte des feuilles utilisées pour l'extraction.

Cet extrait méthanolique brut solubilisé dans l'eau distillé et soumis à un partage liquide-liquide dans une ampoule à décanter en utilisant des solvants de polarité croissante (Chloroforme, Acétate d'éthyle et Butanol) a donné 04 fractions différentes qui ont été appelé (Chloroforme, Acétate d'éthyle, Butanol et H₂O). Le calcul du taux d'extraction pour chaque fraction a donné les résultats présentés dans le tableau III

Tableau III: Les pourcentages d'extraction des extraits des feuilles de *Rhamnus alaternus*

Extraits	Taux d'extraction (%)
H ₂ O	12,92
Butanol	3,96
Chloroforme	1,95
Acétate d'éthyle	0,45

D'après les résultats obtenus, on constate que la fraction H₂O représente le rendement le plus élevé (12,92%) suivie de la fraction butanol (3,96%) puis de celle de chloroforme (1,95%). Enfin, le rendement le plus faible (0,45%) est obtenu par la fraction d'acétate d'éthyle (**Tableau III**).

III.2. Dosage des antioxydants

Les différents dosages réalisés ont mis en évidence la présence de polyphénols totaux, de flavonoïdes et de tannins dans toutes les fractions.

III.2.1. Teneur en polyphénols totaux

Au cours du dosage de polyphénols totaux des différentes fractions de l'extrait méthanolique des feuilles de *Rhamnus alternus*, une coloration bleue est apparue après 60 mins de l'ajoute du réactif Folin-ciocalteau et de carbonate de sodium, ceci témoigne de la présence d'une quantité de polyphénols totaux dans les différentes fractions.

La courbe d'étalonnage (**Annexe I**), montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations, le taux en composés phénoliques dans les différents extraits a été exprimé en mg EAG/g d'extrait sec est déterminée par l'équation $Y = 0,127 x - 0,053$ sachant que $R^2 = 0,9827$. La quantité en polyphénols totaux des 04 fractions des feuilles de *Rhamnus alaternus*, sont représentées dans la figure 14.

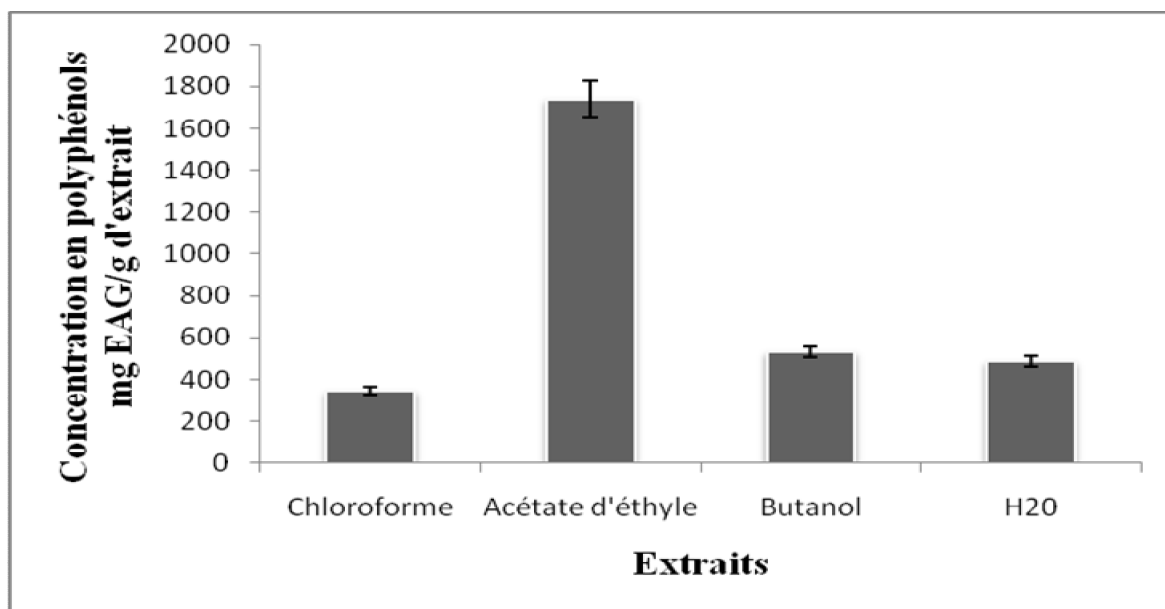


Figure 14: Teneur en polyphénols totaux des extraits de *Rhamnus alaternus*.

D'après les résultats obtenus, les polyphénols sont présents dans les quatre fractions de l'extrait méthanolique avec des teneurs variables d'un extrait à un autre. Et, l'extrait acétate d'éthyle qui a donné la teneur la plus élevée ($1740,133 \pm 115,135$ mg EAG/ g d'extrait), suivi par l'extrait butanol, H₂O et chloroforme avec des concentrations de l'ordre de $531,533 \pm 149,907$, $486,711 \pm 86,011$ et $345,356 \pm 21,530$ mg EAG/g d'extrait, respectivement. Ces résultats révèlent l'effet important du type de solvant sur le taux d'extraction des composés phénoliques. Cette différence en polyphénols totaux dans les quatre fractions peut être

expliquée par plusieurs paramètres, tels que la nature des composés phénoliques et leurs degré de solubilité dans les solvants utilisés (Naczak et Shahidi, 2004).

Comparant aux résultats obtenus par Ben Ammar et ses collaborateurs, (2007), la teneur en polyphénols de l'extrait acétate d'éthyle est de 250 mg EAG/g d'extrait, qui est relativement inférieur à celle trouvée dans cette étude. Cette absence de similitude peut être expliquée tout d'abord par la méthode d'extraction et le solvant utilisés, ainsi l'origine, la période de la récolte et aux facteurs environnementaux.

III.2.2. Teneur en flavonoïdes

Une couleur jaunâtre est formée dans tous les extraits des feuilles de *Rhamnus alaternus* après l'addition de la solution de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), cette coloration révèle la présence des flavonoïdes dans les extraits.

Le taux des flavonoïdes des quatre extraits ont été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage réalisé par la quercétine (Annexe II), suite à une équation de type :

$y = 0,0541x + 0,00324$ avec $R^2 = 0,983$. Les concentrations obtenues sont présentées dans la (figure 15), elles sont exprimées en mg EQ/g d'extrait sec.

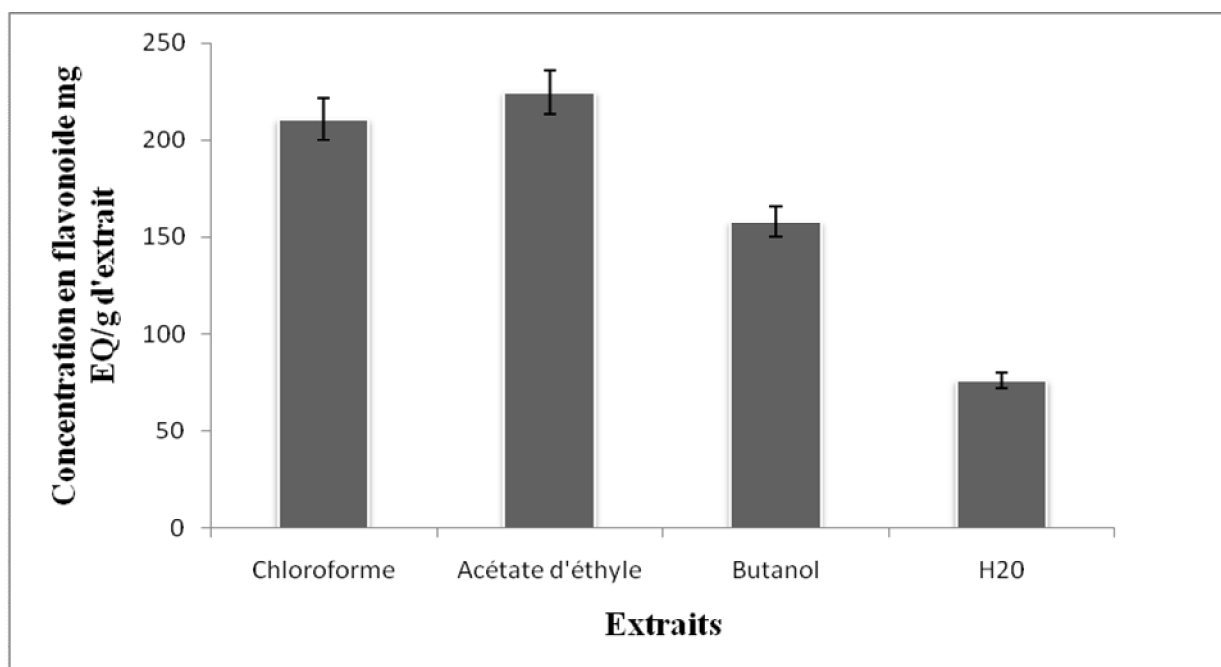


Figure 15: Teneur des extraits de *Rhamnus alaternus* en flavonoïdes.

D'après les résultats obtenus, les proportions des flavonoïdes varient d'un extrait à un autre, la teneur la plus élevée est notée pour l'extrait, acétate éthylique ($224,599 \pm 15,61$ mg EQ/g d'extrait), suivie de celle d'extrait chloroforme et butanol avec des teneurs respectivement de l'ordre de $210,64 \pm 16,04$ et $157,64 \pm 28,90$ mg EQ/g d'extrait sec. Enfin l'extrait H₂O a donné la plus faible teneur en flavonoïdes qui est de l'ordre $76,33 \pm 11,45$ mg EQ/g d'extrait.

Ben Ammar et ses collaborateurs, (2007), ont démontré que l'extrait Acétate d'éthyle des feuilles de *Rhamnus alaternus* de Tunisie contient environ 338 ± 34 mg EQ/g d'extrait. Ce résultat est inférieur à la teneur obtenue dans le présent travail. Cette différence peut être due au solvant utilisé, la modification apportée dans le protocole, à la différence des conditions expérimentales telles que les appareils utilisés

III.2.3. Dosages des tannins

Les résultats de dosage des tannins hydrolysables obtenus à partir des quatre extraits de *Rhamnus alaternus*, exprimés en mg EAT/g d'extrait sec, sont représentés dans la figure 16.

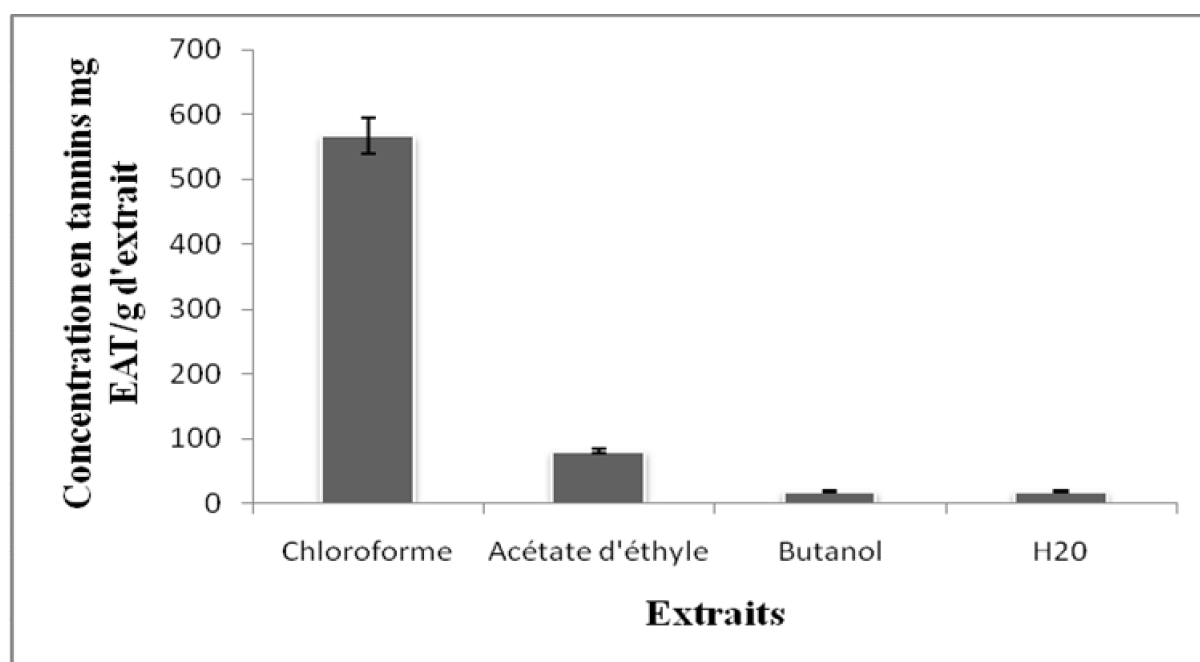


Figure 16: Teneur des feuilles de *Rhamnus alaternus* en tannins.

La figure ci-dessus montre clairement que l'extrait chloroforme présente une quantité plus élevée en tannins ($556,97 \pm 19,61$ mg EAT/g d'extrait), suivi par l'extrait acétate

d'éthyle ($81,21 \pm 9,32$ mg EAT/g d'extrait). Enfin les deux extraits butanol et H₂O avec une teneur de (18 mg EAT/g d'extrait). Cela peut être expliqué par la polarité des solvants qui extraient des entités différentes ayant des polarités différentes aussi, ce qui implique la présence de différentes structures phénoliques dans chaque extraits.

En comparant aux résultats obtenus par **Ben Ammar et ses collaborateurs, (2007)**, dont le taux en tannins dans l'extrait acétate d'éthyle des feuilles de *Rhamnus alaternus* de Tunisie est de 838 ± 41 mg EAT/g d'extrait). Ce résultat est supérieur à la teneur dans le présent travail. Cette différence peut être due à la méthode d'extraction, la nature des solvants utilisés et qu'à l'origine géographique (climat et sol).

III.3. Activité antioxydante et anti-radicalaire

III.3.1. Pouvoir anti-radicalaire

III.3.1.1. Activité scavengings du radical DPPH

Le test de DPPH est un des tests les plus utilisés pour déterminer l'activité anti-radicalaire des extraits de plante. Les résultats obtenus lors du test de mesure de la réduction du radical DPPH sont présentés dans la figure 17.

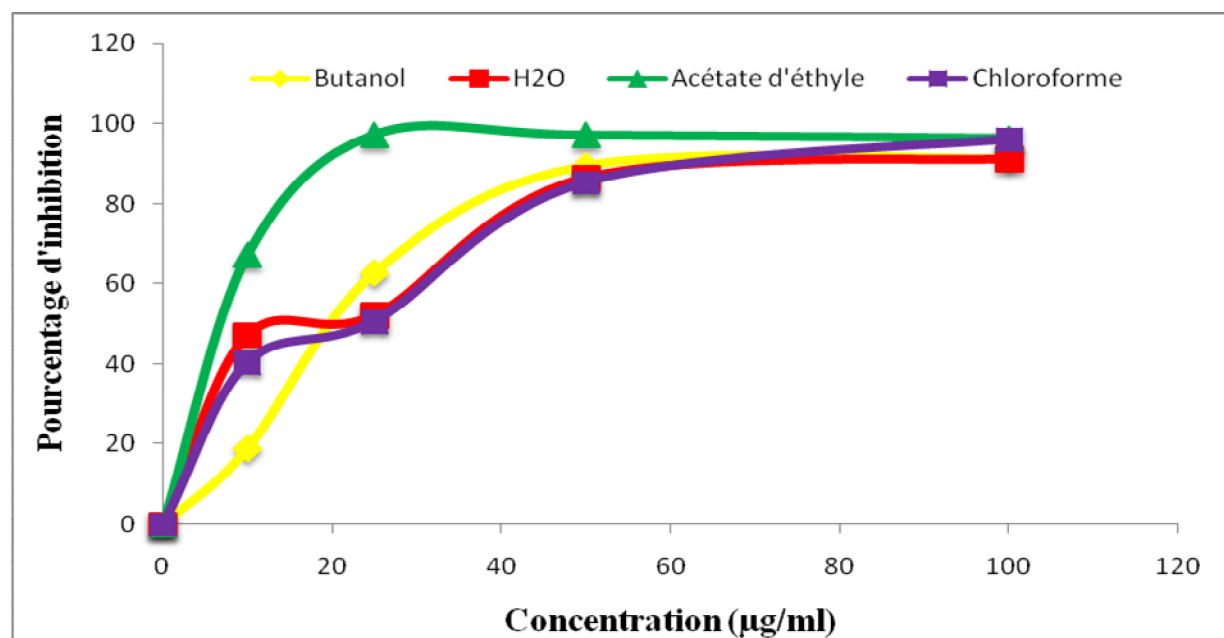


Figure 17 : Taux d'inhibition de l'activité scavenging du radical DPPH des quatre extraits en fonction de la concentration.

Le premier constat tiré de la figure 17, est que le pourcentage d'inhibition du radical DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration quelque soit la fraction étudiée.

Les résultats exprimés en tant que pourcentage de l'activité anti-radicalaire (**figure 17**), révèlent que tous les extraits testés présentent une importante activité inhibitrice vis-à-vis le radical DPPH. Les fractions acétate d'éthyle et chloroforme ont présenté l'activité anti-radicalaire la plus élevée $96,35 \pm 0,32\%$ et $96,11 \pm 0,46\%$, suivie par le butanol et H₂O avec $91,85 \pm 0,57\%$ et $91,19 \pm 2,13\%$ respectivement pour une concentration maximale de 100 µg/ml.

L'effet scavengers des extraits vis-à-vis du radical DPPH• est exprimé par la concentration Inhibitrice de 50 % (IC₅₀) qui correspond à la concentration nécessaire pour inhiber ou réduire 50% de DPPH•. Une valeur faible d'IC₅₀ indique une activité antioxydante forte (**Molyneux, 2004**). Tous les IC₅₀ sont calculés à l'aide du logiciel origine 9.0

Comme le montre le tableau IV, les antioxydants standards, acide gallique (acide phénolique) et quercétine (flavonoïde) présentent une meilleure efficacité anti-radicalaire que les extraits de *Rhamnus alatenus* avec des IC₅₀ de l'ordre 3,612 µg/ml et 5,811µg/ml respectivement. Parmi les quatre fractions, la fraction acétate d'éthyle est la plus active vis-à-vis du radical DPPH avec un IC₅₀ de l'ordre de 9,562 µg/ml. Par contre, les trois autres fractions (H₂O, chloroforme et butanol) montrent une faible activité anti-radicalaire avec des IC₅₀ de l'ordre de 16,38, 19,10, et 20 µg/ml respectivement. L'activité de l'extrait acétate d'éthyle est inférieure à celle de l'acide gallique et la quercétine (Tableau IV). Tous les extraits ont un pouvoir anti radicalaire envers le DPPH. Une étude faite par **kang et al., 2003** a suggéré que les molécules polaires présentent dans des extraits végétaux contribue à l'augmentation de l'activité antiradicalaire.

Tableau IV: Valeurs des IC50 obtenues pour les extraits et les standards vis-à-vis du radical DPPH de feuilles de *Rhamnus alaternus*.

Extraits et standards	IC50 (µg/ml)
Acide gallique	3,512
Quercétine	5,811
Chloroforme	19,101
Acétate éthyle	9,562
Butanol	20,428
H ₂ O	16,387

Afin d'évaluer l'activité anti oxydante par le teste DPPH des quatre extraits de *Rhamnus alaternus*, les courbes de régression linéaire (**Annexe IV**) ont été générés et leurs relation a été étudié. Les résultats obtenus montrent, pas de corrélation entre leurs efficacité à piéger le radical DPHH et les taux en Tannins et en flavonoïdes de leurs extraits ($R^2 = 0,07$ et $0,10$), par ailleurs une bonne corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité anti-radicalaire avec ($R^2 = 0,86$). Cette différence peut être attribué à la présence d'autre composé non phénoliques qui peuvent contribuer à l'activité antioxydante totale des extraits d'une part (**Goulas et Manganaris, 2012**). Et a des réaction de décompositions et d'interaction induisant un effet po-oxydant (antagoniste) à celui de piégeage des radicaux libres d'autres part (**Popovici et al., 2009**).

III.1.2. Activité scavengings du radical ABTS

Selon **Re et al. (1999)**, la méthode de piégeage du radical ABTS est une excellente méthode pour déterminer l'activité antioxydante pour une large diversité des substances, comme antioxydants donneurs d'hydrogène ou piégeurs de radicaux en phase aqueuse. L'activité anti-radicalaire est considérée comme étant la capacité des composés testés à diminuer directement la couleur du radical ABTS. Le contacte avec un donneur d'électron du radical ABTS^{•+} conduit à l'ABTS⁺ et à la décoloration de la solution du bleu foncé en bleu vert (**Lien et al., 1999**). Le pourcentage d'inhibition du radical cationique ABTS^{•+} par les

extraits des feuilles de *Rhamnus alaternus* étudié est représenté dans les (figures 18).

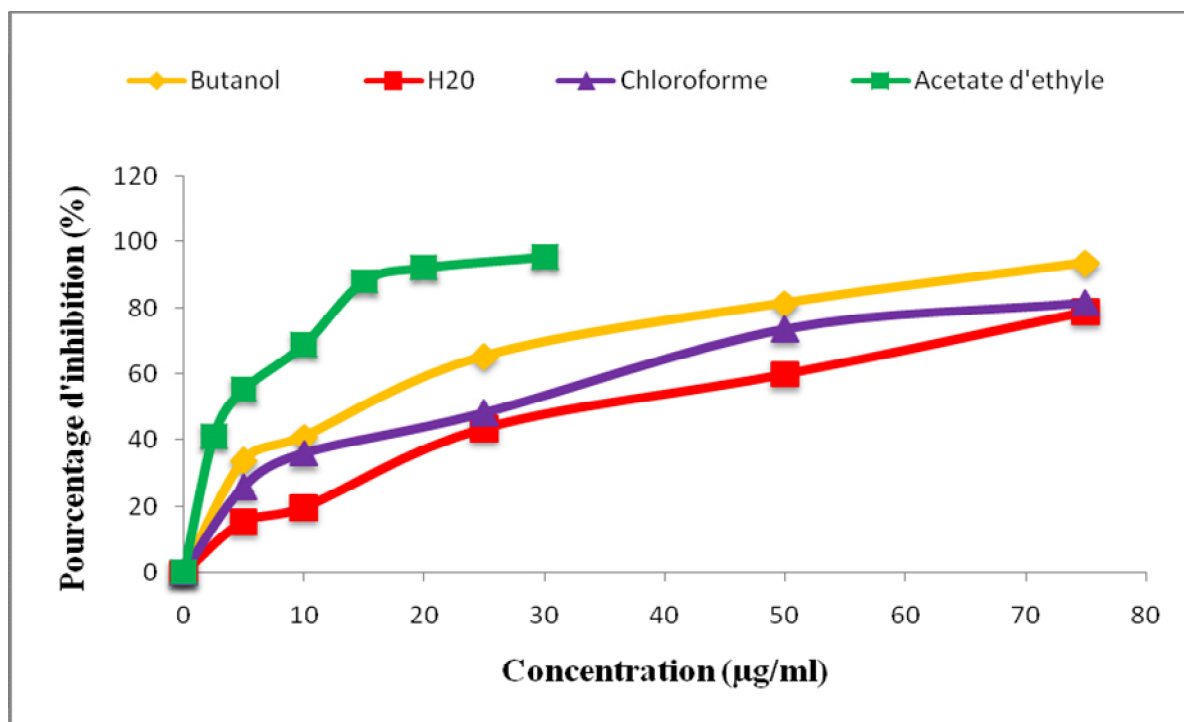


Figure 18: Effet scavengers contre le radical ABTS⁺ des quatre extraits.

D'après les résultats obtenus (**figure 18**) et (**tableau VI** et **tableau VII**), la meilleure capacité antioxydant est montrée par l'extrait d'acétate d'éthyle avec un IC₅₀ de l'ordre de 4,34 µg/ml (Equivalent Trolox), suivi de l'extrait butanol avec un IC₅₀ de 13,46 µg/ml (Equivalent Trolox) et de celui du chloroforme avec 20,90 µg/ml (Equivalent Trolox). Enfin, l'extrait H₂O a donné un IC₅₀ de l'ordre de 35,42 µg/ml (Equivalent Trolox).

Tableau VI : Les concentrations des extraits (µg/ml) des feuilles qui réduit 50% d'ABTS

Extraits	Chloroforme	Acétate d'éthyle	Butanol	H ₂ O
IC ₅₀ (µg/ml)	20,90	4,34	13,46	35,42

Pour pouvoir comparer l'efficacité de nos extraits, avalés par le test ABTS à des antioxydants naturels, l'efficacité anti-radicalaire (**Tableau VII**) a été exprimée par la

capacité antioxydante Equivalent Trolox (TEAC). Plus la valeur de TEAC est élevée, plus l'antioxydant est puissant (Djeridane et al., 2006).

Tableau VII: Activité scavenging vis-à-vis du radical ABTS des extraits des feuilles de *Rhamnus alaternus*

Extraits	µmol Equivalent Trolox
chloroforme	0,23
Acétate éthyle	0,60
Butanol	0,28
H ₂ O	0,07

D'après les résultats obtenus, l'extrait H₂O a exhibé de meilleure capacité antioxydant vis-à-vis de radical ABTS⁺, enregistrant ainsi une valeur TEAC de 0,07 µmol Equivalent Trolox, une valeur inférieure est montrée par l'extrait chloroforme avec une TEAC 0,23 µmol de Equivalent Trolox, tandis que, la plus faible valeur TEAC est enregistrée par les extraits butanol et acétate d'éthyle 0,28 et 0,60 µmol Equivalent Trolox respectivement.

En établissant la relation entre les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins et la capacité antioxydante totale des différents extraits, (Annexe IV) nous montre qu'il n'y a pas de corrélation entre les teneurs en tannins et la capacité antioxydante totale ($R^2 = 0$). Par contre, l'activité réductrice est fortement liée à la teneur en flavonoïdes avec ($R^2 = 0,68$) et en polyphénols avec ($R^2 = 0,51$).

III.3.2. Pouvoir réducteur

III.3.1.1. Réduction de chlorure ferrique

La réduction de fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺) est un test rapide, reproductible, et facile à exécuter (Lim et al., 2006). Les résultats de l'évaluation de pouvoir réducteur des extraits de *Rhamnus alaternus* montre que ces extraits présentent une activité réductrice proportionnelle à la concentration. Les résultats de l'évaluation de pouvoir réducteur des extraits sont illustrés dans (figures 19).

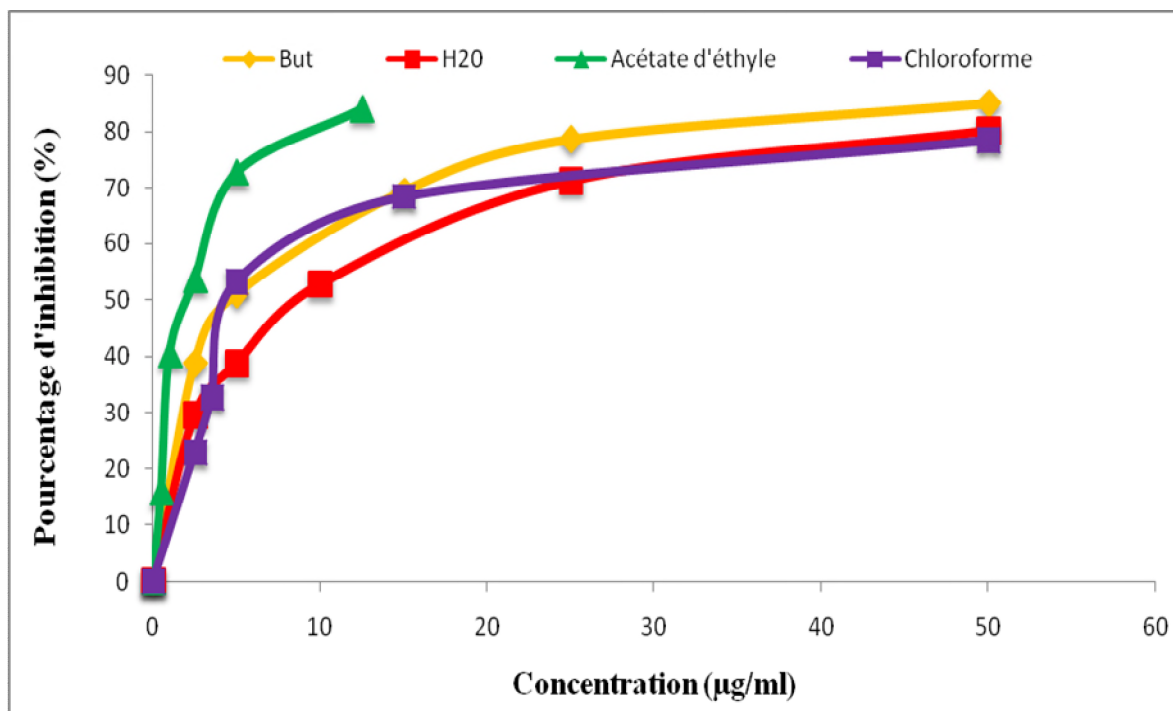


Figure 19: Taux de réduction de fer ferrique par les extraits en fonction de concentration.

D'après les représentations graphiques dessus, l'extrait acétate d'éthyle s'est révélé comme l'extrait le plus puissant, du fait qu'à une concentration de 12,5 µg/ml, il exhibe une activité chélatrice de fer de l'ordre de $83,88 \pm 0,17$. Par contre, concernant les trois autres extraits, ils exhibent un pouvoir réducteur du fer ferrique similaire à une concentration de 50µg/ml. Cette différence est probablement due à la différence de la teneur en polyphénols qui se diffère d'un extrait à un autre. Les standards utilisés, acide gallique, quercétine montrent des pourcentages de $92,14 \pm 0,13$ et $91,98 \pm 0,05$ respectivement à une concentration de 2,5µg/ml. Les valeurs d'IC 50 ont été déterminées pour chaque extrait et les standards, les résultats obtenus sont illustrés dans le Tableau VIII.

Tableau VIII: Valeurs d'IC50 obtenus pour les extraits et les standards lors de la réduction du chlorure ferrique.

Extraits et standards	IC50 (µg/ml)
Acide gallique	0,24
Quercétine	0,23
Chloroforme	4,76
Acétate éthyle	1,92
Butanol	4,52
H2O	7,87

La fraction d'acétate d'éthyle des feuilles de *Rhamnus alaternus* a montré l'IC50 la plus réduite qui est de l'ordre 1,92 µg/ml, après celle des standards quercétine et acide gallique (0.23 et 0.24 µg/ml respectivement). Par contre, les trois autres fractions montrent des valeurs d'IC50 élevées par rapport aux précédentes de l'ordre de 4,52 , 4,76 et 7,87 pour les extraits de butanol, chloroforme et H₂O respectivement.

Nous avons voulu établir une corrélation entre l'efficacité antioxydante et les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins. Les résultats obtenus nous montre la présence d'une bonne corrélation linéaire entre l'activité réductrice de chlorure ferrique et la teneur en flavonoïdes et polyphénols à raison de ($R^2 = 0.81$) et de ($R^2 = 0,57$) respectivement **Annexe IV**. Pour les tannins, la capacité de ces composés à réduire le chlorure ferrique pas de corrélation ($R^2=0$).

III.2.2. Réduction de phosphomolybdate d'ammonium

La méthode de phosphomolybdate d'ammonium est basée sur la réduction de molybdate MO^{6+} par les antioxydants des quatre extraits des feuilles de *Rhamnus alaternus*. Les résultats

du test (**figure 20**), montrent qu'il existe une relation proportionnelle entre le pourcentage de réduction du molybdate et la concentration de l'extrait.

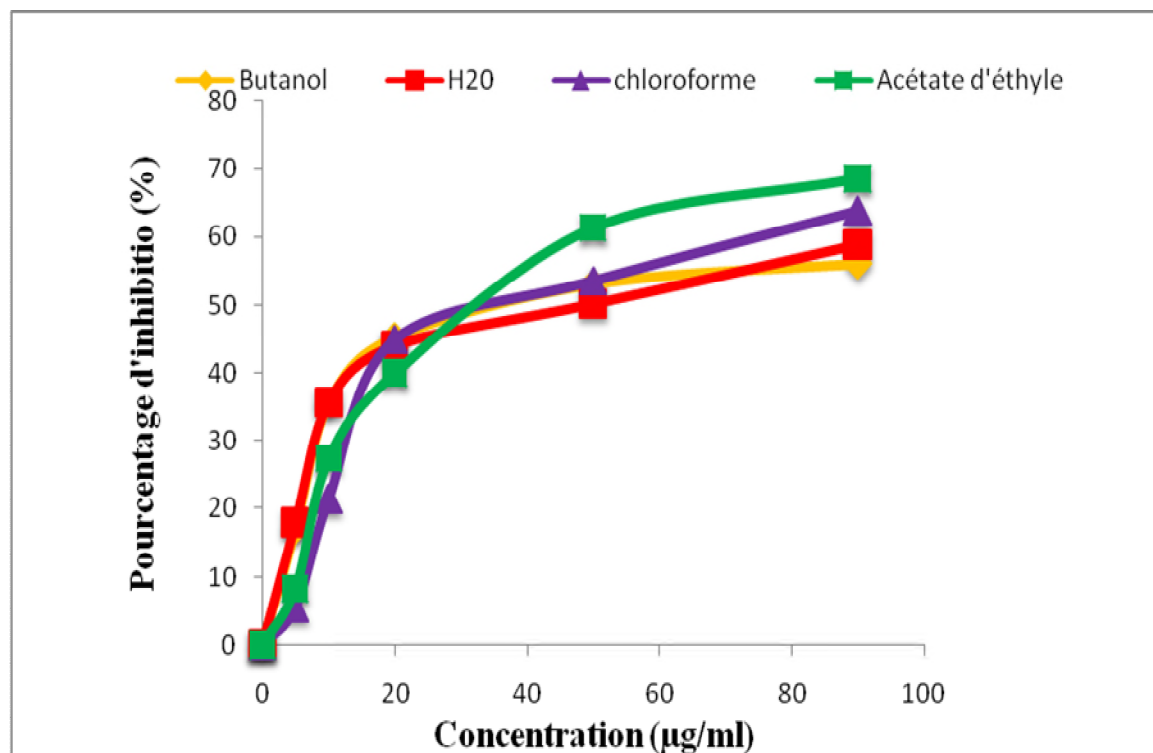


Figure 20: L'évaluation de la réduction du Mo^{+6} par les quatre extraits.

Les valeurs d'IC₅₀ ont été déterminées pour chaque extrait, les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau IX. Selon les résultats obtenus, les quatre extraits de *Rhamnus alaternus* présentent des IC₅₀ différents. L'extrait chloroformique présente l'extrait le plus actif avec un IC₅₀ de l'ordre 23,1µg/ml, suivi par les extraits H₂O et acétate d'éthyle avec 27,19 et 28,96 µg/ml respectivement. Par contre, la fraction butanol a exhibé un IC₅₀ beaucoup plus important qui est de l'ordre de 71,34 par rapport aux autres.

Tableau IX: Valeurs d'IC50 ($\mu\text{g/ml}$) pour le test de réduction du phosphomolybdate.

Extraits et standards	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)
Acide gallique	8,70
Quercétine	2,17
Chloroforme	23,10
Acétate éthyle	28,96
Butanol	71,34
H ₂ O	27,19

Les IC50 des standards quercétine et l'acide gallique sont largement inférieurs à celles des extraits de *Rhamnus alaternus* et qui sont de l'ordre de 2,17 et 8,70 $\mu\text{g/ml}$ respectivement, ce qui leur confère une activité réductrice très forte par rapport à celle des extraits.

La relation entre la teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes, tannins et l'activité antioxydante de Phosphomolybdate d'ammonium **Annexe IV** ont montré que y'a pas de corrélation ($R^2=0$), attestent que le degré de dépendance entre ces composés phénoliques et le Phosphomolybdate d'ammonium des extraits de *Rhamnus alaternus* est nul.

IV. Blanchissement de β -carotène

Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, et des hydroperoxydes diène conjugués (**Kaur et Kapoor, 2002**). Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène hautement insaturé (**Figure21**) qui perd ses doubles liaisons entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivi spectrophotométriquement à 470 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique, et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène (**Yang et al., 2008**).

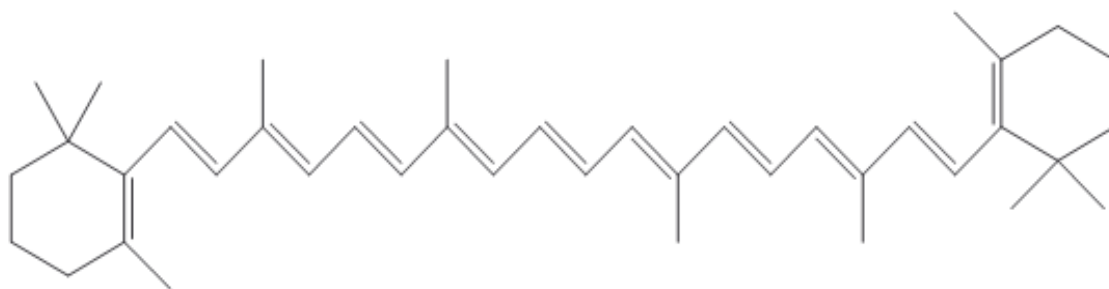


Figure 21: Structure chimique de β-carotène (Diallo, 2005).

Le pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante par le système β-carotène/ acide linoléique est proportionnel à la concentration. Tous les extraits de la plante inhibent le blanchissement du β-carotène à différentes valeurs par le piégeage des radicaux libre, le pourcentage d'inhibition est présenté dans la Figure 22.

D'après les pourcentages d'inhibition, il est évident que tous les extraits et le standard testés inhibent d'une manière efficace l'antioxydant couplé de l'acide linoléique et du β-carotène, Les deux extraits chloroforme et acétate d'éthyle montrent la plus grande activité inhibitrice $96,30 \pm 3,802 \%$ et $96,05 \pm 1,86\%$ à une concentration de $45\mu\text{g/ml}$. Par contre, les deux autres extraits Butanol et H_2O ont donné une activité inhibitrice beaucoup moins importante et qui est de l'ordre $70,12 \pm 2,38$ et $62,96 \pm 5,34 \%$ à une concentration de $90\mu\text{g/ml}$.

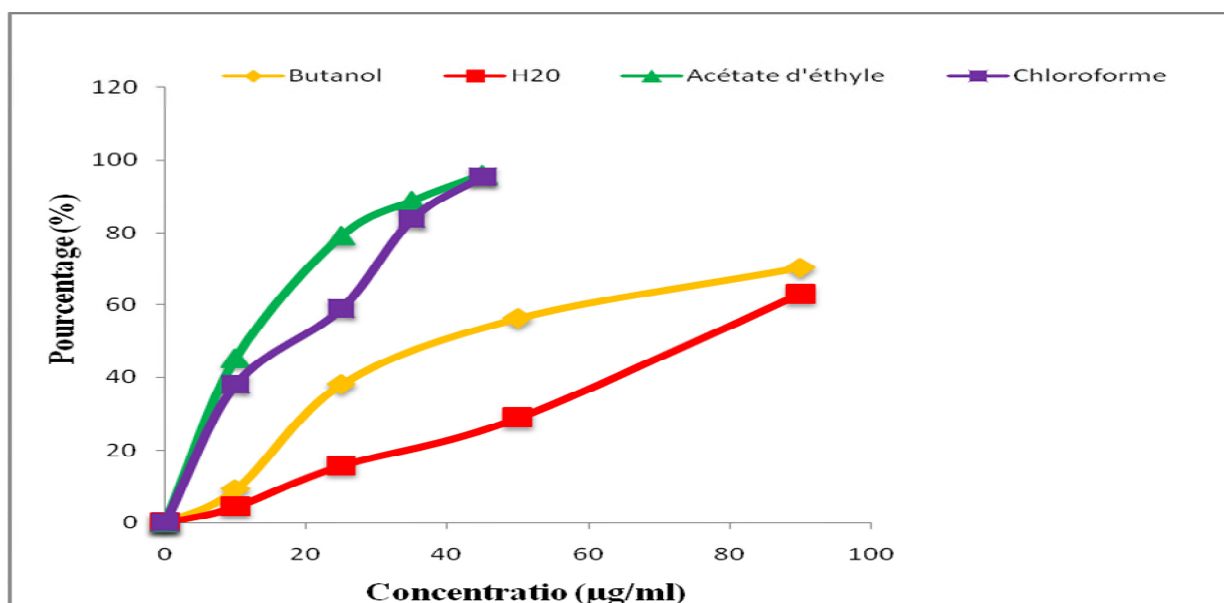


Figure 22: Pourcentage d'inhibition de blanchissement du β-carotène par les quatre extraits

Les valeurs d'IC50 des différents extraits (**Tableau X**) montrent que l'acétate d'éthyle semble avoir l'effet inhibiteur le plus puissant parmi les quatre extraits, avec un IC50 de 11,43 µg/ml, suivie par le chloroforme (IC50 = 17,35 µg/ml), l'extrait butanol (IC50 = 38,50 µg/ml). Enfin, l'extrait H₂O qui a donné un IC50 de l'ordre de 75,67 µg/ml qui est le plus faible. L'IC50 de l'acide ascorbique est très puissant que les quatre extraits et il est de l'ordre 7,96 µg/ml.

Tableau X: Valeurs d'IC50 pour le test blanchissement de β-carotène

Extraits et standards	IC50 (µg/ml)
Acide ascorbique	7,96
chloroforme	17,35
Acétate éthyle	11,43
Butanol	38,50
H ₂ O	75,65

D'une manière générale, ces résultats sont en accord avec la littérature qui suggère que l'activité antioxydante des extraits végétaux dépend du type de solvant d'extraction et de sa polarité, dont la distribution des substances à activités antioxydante entre les différents extraits dépend de polarité des extraits (**Kang et al., 2003**).

En établissant la relation entre les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins et la capacité antioxydante totale des différents, Annexe IV montre que y'a pas une corrélation entre les teneurs en tannins, polyphénols et la capacité antioxydante totale ($R^2 = 0,25$) et ($R^2 = 0,24$) respectivement. Par contre, l'activité réductrice est fortement liée à la teneur en flavonoïdes avec ($R^2 = 0,99$).

Conclusion

Chaque plante est un réservoir potentiel de métabolites avec des caractéristiques phytochimiques et pharmacologiques originales. Le choix de la partie à étudier, les méthodes et les solvants d'extraction représentent les facteurs déterminants de la composition chimique.

Dans ce travail, l'activité antioxydante et anti-radicalaires des extraits des feuilles de *Rhamnus alaternus* récolté à Bejaïa a été évalué par l'extraction des composés phénoliques en suivant un protocole de type liquide-solide et en utilisant quatre solvant de polarité différentes.

L'évaluation du contenu en polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu a montré que l'extrait d'acétate d'éthyle est le plus riche avec un taux de 1740.13 ± 115.13 mg EAG/g d'extrait, et le plus faible est celui de chloroforme avec un taux de $345,35 \pm 21,53$ mg EAG/g d'extrait. Le dosage des flavonoïdes par la méthode de réduction de trichlorure d'aluminium a montré que l'extrait acétate d'éthyle est le plus riche avec $224,59 \pm 15,61$ EQ/g d'extrait, est celui d'extrait H₂O est le plus faible avec un taux de $76,33 \pm 11,45$ EQ/g d'extrait, Le dosage des tannins par la méthode de précipitation de BSA dans une solution tampon par les tannins des extraits à doser, a montré que l'extraits chloroforme est très riche avec un taux de $556,97 \pm 19,61$ mg EAT/g d'extrait. Par contre, les extraits Butanol et H₂O ont un taux très faible de l'ordre 18 ± 0 mg EAT/g. L'analyse de ces paramètres démontre que les feuilles de *Rhamnus alaternus* sont très riches en polyphénols totaux, en flavonoïdes, et en tannins.

Les extraits présentent une activité anti-radicalaire très importante contre les radical DPPH et ABTS, ou c'est l'extrait d'acétate d'éthyle qui a donné la meilleure activité. Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'extrait d'acétate d'éthyle est de 96,11 % à une concentration de 30µg/ml avec un IC₅₀ de 9,56 µg/ml. Pour le test contre le radical ABTS, le pourcentage d'inhibition à une concentration de 30µg/ml est estimé à 95,44 % pour l'acétate d'éthyle avec un IC₅₀ de l'ordre 4,34 µg/ml.

Pour la réduction de fer ferrique, les résultats montrent que c'est toujours l'extrait acétate d'éthyle qui est le plus puissant avec un IC₅₀ de l'ordre 1,92 µg/ml. Par contre, le test de la réduction du phosphomolybdate, c'est l'extrait chloroforme qui as donné la meilleure activité avec un IC₅₀ le plus bas qui est de l'ordre de 23,10 µg/ml.

Pour le blanchissement de β-carotène, les deux extraits acétate d'éthyle et chloroforme montrent la plus grande activité inhibitrice $96,05 \pm 1,86\%$ et $96,30 \pm 3,802 \%$ à une concentration de 45µg/ml, avec des IC₅₀ respectif de 11.43 et 17.35 µg/ml.

A la lumière des résultats obtenus, il ressort que les extraits des feuilles de *Rhamnus alaternus* révèlent une bonne activité antioxydante pour les différents tests réalisés (DPPH, ABTS, Pouvoir réducteur de fer ferrique et de phosphomolybdate d'ammonium et test de blanchissement β -carotène), et l'existence d'une bonne corrélation linéaire entre les teneurs en polyphénol totaux et en flavonoïdes et les différentes activités antioxydant.

Les résultats de la présente étude, ont ainsi permis de conclure et de confirmé que les feuilles de *Rhamnus alaternus* constitue une bonne source de composés phénoliques avec une activité antioxydant importante.

A l'avenir, il serait intéressant de procéder à une identification précise des constituants de chaque extrait, en utilisant des méthodes d'analyses plus avancées et plus précises RMN et HPLC. Tester *in vivo* les composés identifiés. Enfin, utiliser des techniques pour pouvoir isoler des molécules pures pour pouvoir les étudier.

Références bibliographique

Références bibliographiques

- Aazza, S., Lyoussi, B., Miguel, M.G. (2011a).** Antioxidant activity of some Moroccan hydrosols. *J. Med. Plants Res*, 5: 6688-6696.
- Affek, H. P. et Yakir, D. (2002).** Protection by Isoprene against Singlet Oxygen in Leaves. *Plant Physiology*, 129: 269-277.
- Afonso, V., Champy, R., Mestrovic, D., Collin, P. and Lomri, A.(2007).** Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Revue du rhumatisme*, 74: 636-643.
- Akrout, A., Hajlaoui, H., Najja, H., Neffati, M. (2010).** Antimicrobial and antioxydant activities of Artemisia herba-alba essential oil cultivated in Tunian arid zone C. R. *Chimie*, 13: 380-386.
- Ait youssef, M. (2006).** Les plantes médicinales de kabylie: Edition Ibis press. 278279 p.
- Ali Alabri, T.H., Hamood, A., Al Musalami, S., Amzad Hossain, M., Mohammed Weli, A. and Al-Riyami, Q. (2014).** Comparative study of phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial capacities of fresh and dry leaves crude plant extracts of Datura metel L. *Science*, 26: 237-243.
- Aviram, M., Dornfeld, L., Kaplan, M. and Fuhrman B. (2002).** Pomegranate juice flavonoids inhibit low-density lipoprotein oxidation and cardiovascular diseases: studies in atherosclerotic mice and in humans. *Drugs. Exp. Clinic. Res*, 28: 49-62.
- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, J.C. and Pinkas, M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arznei. Forschung*, 46: 1086-1089.
- Barouki, R. (2006).** Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/ Sciences*, 22: 266-272.
- Bas, G-N., Pons, P. et Gómez, C. (2009).** Myrmecochory and short-term seed fate in *Rhamnus alaternus*: Ant species and seed characteristics. *Acta Oecologica*, 35: 1-5.
- Bas, J-M., Oliveras, J. and Gomez, C. (2009):** Myrmecochory and short-term seed fate in *Rhamnus alaternus*: Ant species and seed characteristics. *Acta Oecologica*, 35: 380–384.

Références bibliographiques

Bayer, E., Buttler, K.F., Finkenzeller, X., Grau, J. (1990). *Flore méditerranéenne*. Paris: delachaux et Niestlé. 287p.

Beaudeau, J-L., Delattre, J., Therond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Legrand A., Peynet, J.(2006). Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose Oxidative stress in the atherosclerotic process. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 21: 144 -150.

Ben ammar, R., Ben Sghaier, M., Bouhel, I., Chekir-Ghedira, L., Dijoux –Franca, M.G, Ghedira, K., Kilani, S., Laporte, F., Mariotte, A.M., Valenti, K. (2007). Transcriptional repose of genes involved in cell defense system in human cells stressed by H₂O₂ and pretreated with (Tunisian) rhamnus alaternus extract: Combination with polphenolic compound and classic in vitro assays. *Cheemico_biological Interaction*, 168: 17-183.

Ben ammar, R., Ben Sghaier, M., Bhour, W ., Boubaker, J., Bouhel I., Chekir-Ghedira, L., Dijoux –Franca, M.G, Ghedira, K., Kilani, S., Mariotte, A.M., Neffati, A ., Skandrani, I. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging proprties threeflavonoides isolated from the leaves of rhamnus alaternus L.(Rhamnaceae): Astructure-activity relationshipstudy. *Food Chemistry*, 116: 258-264.

Ben Ammar, R., Ben Sghaier, M., Boubaker, J., Bhour, W., Naffeti, A., Skandrani, I., Bouhlel I., Kilani, S., Ghedira K., Chekir-Ghedira L. (2008). Antioxidant activity and inhibition of aflatoxin B1-, nifuroxazide-, and sodium azide-induced mutagenicity by extracts from Rhamnus alaternus L. *Chemico-Biological Interaction*, 174: 1-10.

Ben ammar, R., Kilani, S., Abdelwahed, A., Hayder, N., Mahmoud, A., Chibani, J., Chekir-Guedira, L., Ghedira, K. (2005). In vitro mutagenicity, antimutagenicity and free radical scavenging activities of Rhamnus alaternus L. (Rhamnaceae) Extracts. Pakistan. *Journal of biological sciences*, 8(3): 439-445.

Bezerra Almeida M.L., Edelky de Souza Freitas W., Dantas de Moraes P.L., Abrantes Sarmiento J.D., Elesbão Alves R. (2016). Bioactive compounds and antioxidant potential fruit of Ximenia americana L. *Food Chemistry*, 192: 1078–1082.

Bhour, W., Boubaker, J., Kilani, S., Ghedira, K. and Chekir-Ghedira, L. (2012). Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from Rhamnus alaternus L. (Rhamnaceae): Kaempferol 3-O-□-isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O-B-isorhamninoside. *S. Afr. J. Boot*, 80: 57-62.

Références bibliographiques

- Bidie, A.P., N'guessan, B.B., Yapo, A.F., N'guessan, J.D., Djaman, A.J. (2011).** Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences & Nature*, 8 (1): 1-11.
- Bonnefont-Rousselot, D., Peynet, J., Beaudoux, J-L., Thérond, P., Legrand, A., Delattre, J. (2002).** Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose Oxidative stress, vascular function and atherosclerosis. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16: 260–267.
- Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., Nasri M. (2009).** Antioxydant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food chemistry*, 114: 1198-1205.
- Cheurfa, M., Allem, L. (2015).** Évaluation de l'activité anti-oxydante de différents extraits des feuilles d'*Aloysia triphylla* (L'Hérit.) d'Algérie in vitro. *Lavoisier*, 1-7.
- Defraigne, J.O., Degruene, F., Malherbe, C., Paquot, N., Pincemail, J., Voussure, S. (2007).** Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition clinique et métabolisme*, 21: 66-75.
- Diallo, A-M. (2005).** *Etude des plantes médicinales de niafunke (region Tombouctou). Phytochimie et pharmacologie de Maerua crassifolia Forsk. (Capparidacée)*. Thèse de doctorat, Université de Bamako, p. 125.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2007).** Antioxydant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing compounds. *Food Chem.* 97: 654-660.
- Dusser, D. (1997).** Inflammation neurogène, Radicaux libres et tabac. *Allergologie et d'immunologie clinique*, 37(7): 851-858.
- Ekici, L., Sagdic, O., Silici, S. (2010).** Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Rhododendron honeys. *Food chemistry*, 121: 238-243.
- El Aou-Ouad, H., Florez-Sarasa, I., Ribas-Carbo, M., Flexxas, J., Medrano, H., Gulias, J. (2015).** Trade-offs between seedling growth, plant respiration and water-use efficiency in

Références bibliographiques

two Mediterranean shrubs *Rhamnus alaternus* and *Rhamnus ludovici-salvatoris*. *Photosynthèse*, 53(4): 537-546.

Favier, A. (2003). Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Actualité chimique*, 108-115.

Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique*, 91-96.

Goulas, V. et Manganaris, G.A. (2012). Exploring the phytochemical content and the antioxidant potential of Citrus fruits grown in Cyprus. *Food Chemistry*, 131: 39-47.

Guinebert, E., Durand, P., Prost, M., Grinand, R. and Bernigault, R. (2005). Mesure de la résistance aux radicaux libres. *Sixièmes Journées de la Recherche Avicole*, 554-558.

Gulias, J., Traveset, A., Riera, N. et Mus, M. (2004). Critical Stages in the Recruitment Process of *Rhamnus alaternus* L. *Annals of Botany*, 93: 723-731.

Hagerman, A-E. et Butler, L-G. (1978). Protein precipitation method for quantitative determination of tannins. *J Agrico.food.Chem*, 26(4): 809-812.

Hemmami, I., Allagui, M-B., Chakroun, M. et El Gazzah, M. (2006). *Rhamnus lycioides* in Tunisia is a new aecial host of oat crown rust. *European Journal of Plant Patholog.* 115: 357-361.

hydrosols. *Journal of Medecinal Plants Research.* 5(30): 6688-6696.

Izhaki, I., Tsahar, E., Paluy, I., Friedman, J. (2002). Within population variation and interrelationships between morphology, nutritional content, and secondary compounds of *Rhamnus alaternus* fruits. *New Phytologist*, 156: 217-223.

Karunakaran, R.J., Kumaran, A. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five phyllanthus species from India. *LWT.* 40: 344-352.

Kaur, C. et Kapoor, H-C. (2002). Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Food Sci.Technol*, 37: 153-161.

Références bibliographiques

- Kelly, E.H., Anthony, R.T., Dennis, J.B., (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584.
- Kirkham, P. et Rahman, I. (2006).** Oxidative stress in asthma and COPD: Antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacology & Therapeutics*, 111: 476-494.
- Koechlin-Ramonatxo, C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et supplementations antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoire. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20: 165-177.
- Lacan, B.D. (2001).** Oxydants/antioxydants:un equilibre important. Pp: 1-5.
- Lien, E.J., Bui, H.H., Wang, R. (1999).** Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidant. *Free Radical Biology and Medecine*, 26: 285-294.
- Lim, T.T., Lim, Y.Y., Tee, J.J. (2006).** Antioxydant properties of serval tropical fruits : Comparative study. *Food chemistry*, 103: 1003-1008.
- Mai, L.P., Gu-Ñritte, F.İ., Dumontet, V., Tri, M.V., Hill, B., Thoison, O., Gu-Ñnard, D. and S-Ñvenet, T. (2001).** Cytotoxicity of Rhamnosylanthraquinones and Rhamnosylanthrones from *Rhamnus nepalensis*. *J. Nat. Prod.*, 64: 1162-1168.
- Marc, F., Davin, A., Deglene-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M. et Fritsch, P.(2004).** Méthodes d'évaluation de potential antioxidant dans les aliments. *M/S*, 4(20): 458-463.
- Marzouk, M.S., El-Toumy, S.A., Merfort I. and Nawwar, M.A. (1999).** Polyphenolic metabolites of *Rhamnus disperma*. *Phytochem*, 52: 943-946.
- Mashhadian, N.V. et Rakhshandeh, H. (2005).** Antibacterial and antifungal effects of *Rhamnus alaternus* extracts against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*. *Pak J Med Sci*, 21: 47-52.
- Miralles, j., Martínez-Sánchez, J.J., Franco, J.A., Bnón, S. (2011).** *Rhamnus alaternus* growth under four simulated shade environments: Morphological, anatomical and physiological responses. *Scientia Horticulturae*, 127: 562-570.

Références bibliographiques

- Molyneux, P., (2004).** The use of stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of science Technology*, 26: 211-219.
- Naczk, M. et Shahidi, F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *journal of chromatography*, 1054: 9-111.
- Nur Alam, M., Bristi, N-J., Rafiquzzaman, M. (2012).** Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi pharmaceutical*, 21: 143-152.
- Owen, P.L. et Timothy, J. (1999).** Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*, 64: 149–160.
- Percival, S.L. (2004).** *Microbiology of waterborne diseases*. Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press. 480 p.
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K. et Defraigne, G.O. (2002).** Mécanisme physiologiques de la défense antioxydant physiological action of antioxydant defences. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16: 233-239.
- Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R. et Defraigne, G.O. (1999).** L'évaluation de stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le medecin. *Vaisseaux, Cœur, poumon*, 4 (5).
- Popovici, C., Saykova, I. et Tylkowski, B. (2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 4: 25-39.
- Priya, R., Prathapan, A., Raghu, K.G. and Menon, A.N. (2012).** Chemical composition and *in vitro* antioxidative potential of essential oil isolated from *Curcuma longa* L. leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2: S695-S699.
- Quettier-deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M., Cazin, M., Cazin, J.C., Baileul, F. et Trotin, F. (2000).** Phenolic compounds and antioxydants activity of buchwheat hulls and flour. *Journal of Enthopha rmacology*, 72: 35-42.
- Rameau, J.C., Mansion, D., Dume, G., Gauberville, C., Bardat, J., Bruno, E., Kelle, R. (2008).** *Flore forestiere francaise guide écologique illustré 3 région méditerranéenne*. Ministre de l'agriculture et de la pêche Paris (France). 2426p.

Références bibliographiques

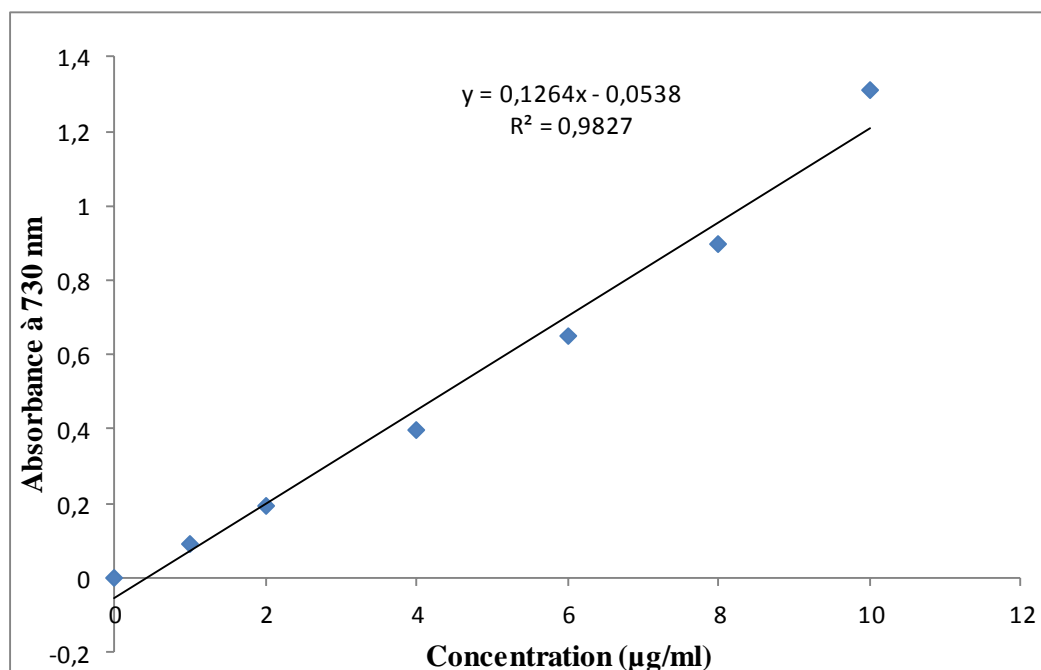
- Ré, D.B., Nafia, I., Nieoullon, A., Kerkerian le Goff, L. et Hade-Aissouni, L. (2005).** Cerebral oxydative stress: are astrocytes vulnerable to low intracellular glutamate concentrations? Consequences for neuronal viability. *Annales Francaise d'Anesthésie et Réanimation*, 24: 502-509.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999).** Antioxydant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26: 1231- 1237.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Pagange, G. (1996).** Structure-antioxydant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med*, 20: 933-956.
- Rochette, L. (2008).** Stress oxydant et sepsis. *Réanimation*, 3: 1-4.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M. (1999).** Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxydants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods Enzymol*, 152-177.
- Sohal, R.S., Mockett, R.J. and Orr, W. C.(2002).** Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical Biol. Med*, 33: 575-586.
- Stocker, P., Yousfi, M., Djerridane, O., Perrier, J., Amziani, R., El Boustani, S. et Moulin, A. (2004).** Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Biochimie*, 86: 919-925.
- Vamecq, J., Vallée, L., Storme, L., Gelé, P., Bordet, R. (2004).** Les acteurs immédiats du stress oxydatif : Key players in oxidative stress. *Pharmacologie*, 18(1): 16-23.
- Wojdyło, A., ski, J.O., Czemerys, R., (2007).** Antioxydant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105: 940–949.
- Yang, J., Guo, J. and Yuan J. (2008).** In vitro antioxydant properties of rutin . *LW*, 41: 1060-1066.
- Yen, G.C., Chen, H.Y. (1995).** Antioxydant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 27–32.
- Yildirim, A., Oktay, M., Bilaloglu, V. (2001).** The Antioxydant Activity of the Leaves of *Cydonia vulgaris*. *Turk J Med Sci*, 31: 23-27.

Références bibliographiques

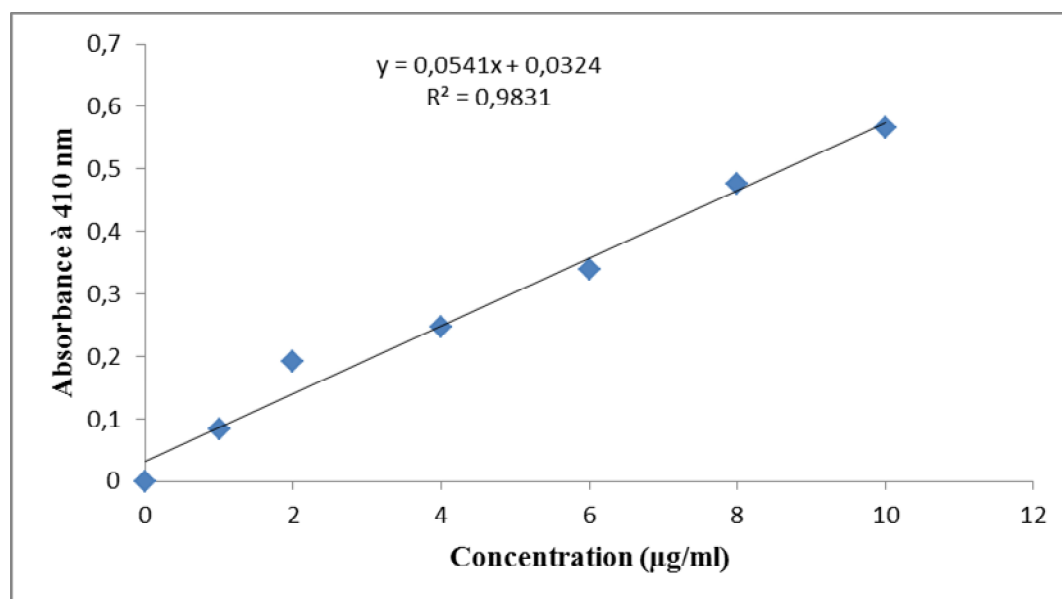
Yi-ling, C. et Pan-Kai, C. (1982). Rhamnaceae. In: Chen Yi-ling, ed., Fl. Reipubl. Popularis Sin, 48(1): 1-169.

Annexes

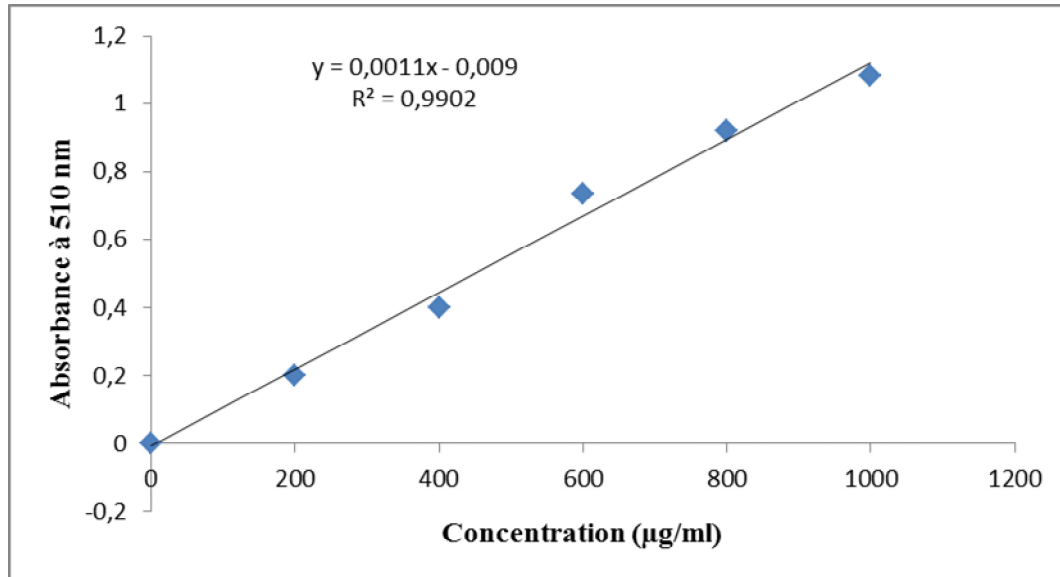
Annexe I: Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux en utilisant l'acide gallique



Annexe II: Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes en utilisant la quercétine

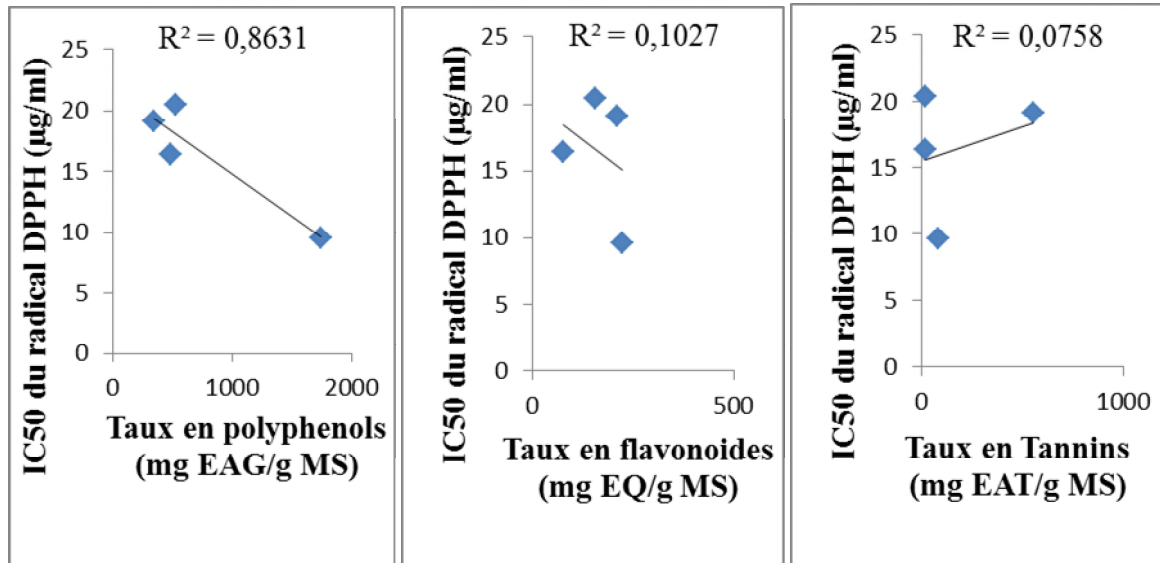


Annexe III: Courbe d'étalonnage pour le dosage des tannins en utilisant l'acide tannique

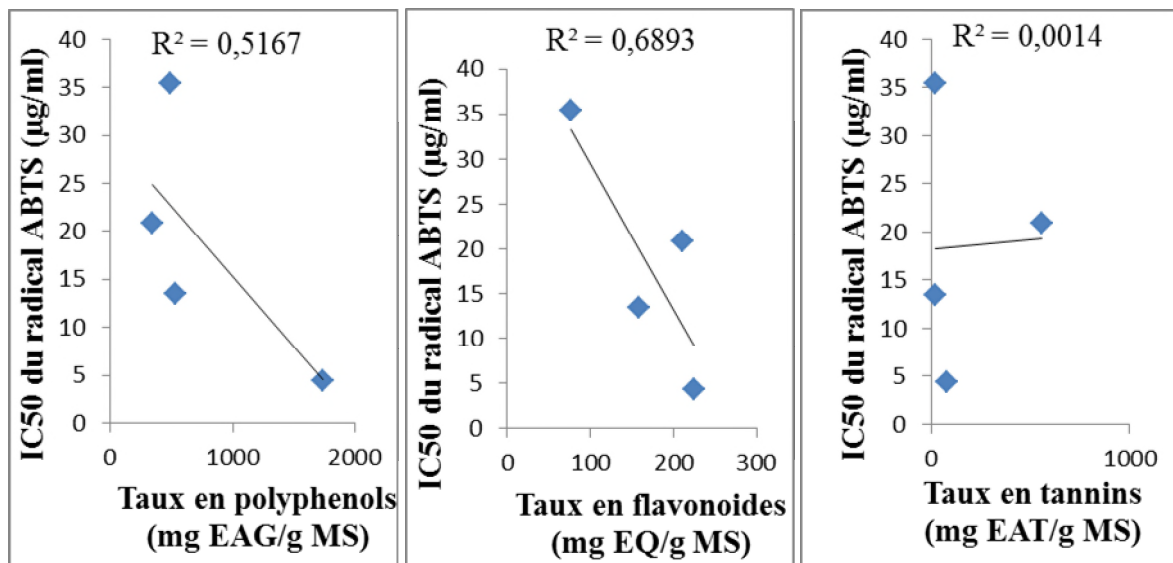


Annexe IV : Corrélation entre l'IC50 et les taux d'antioxydant (polyphénols, flavonoides et tannins)

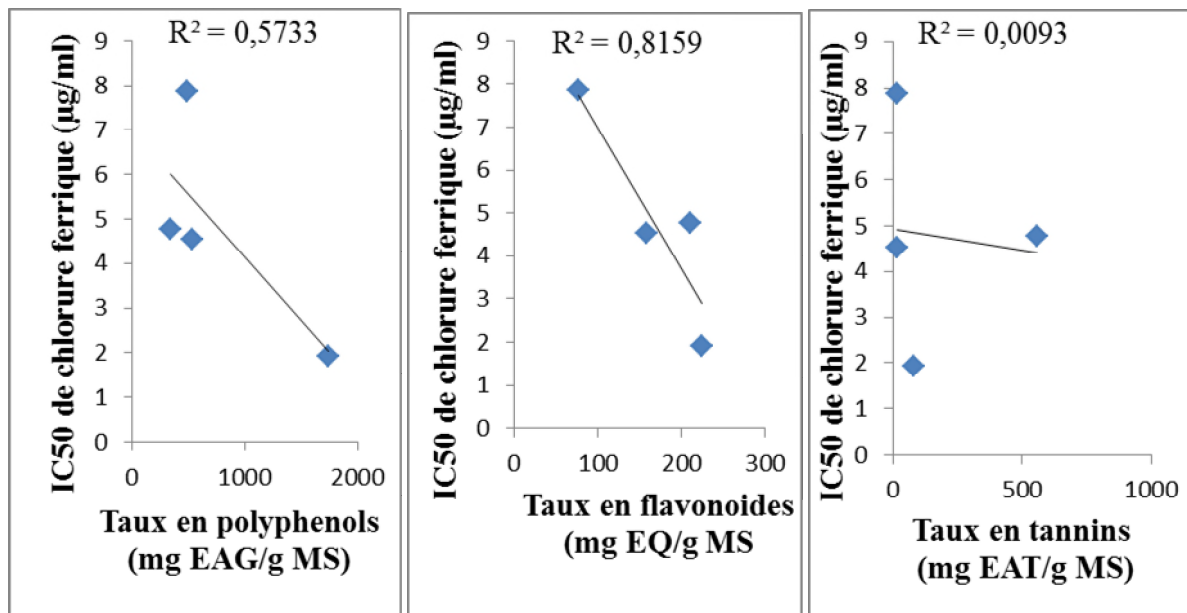
DPPH



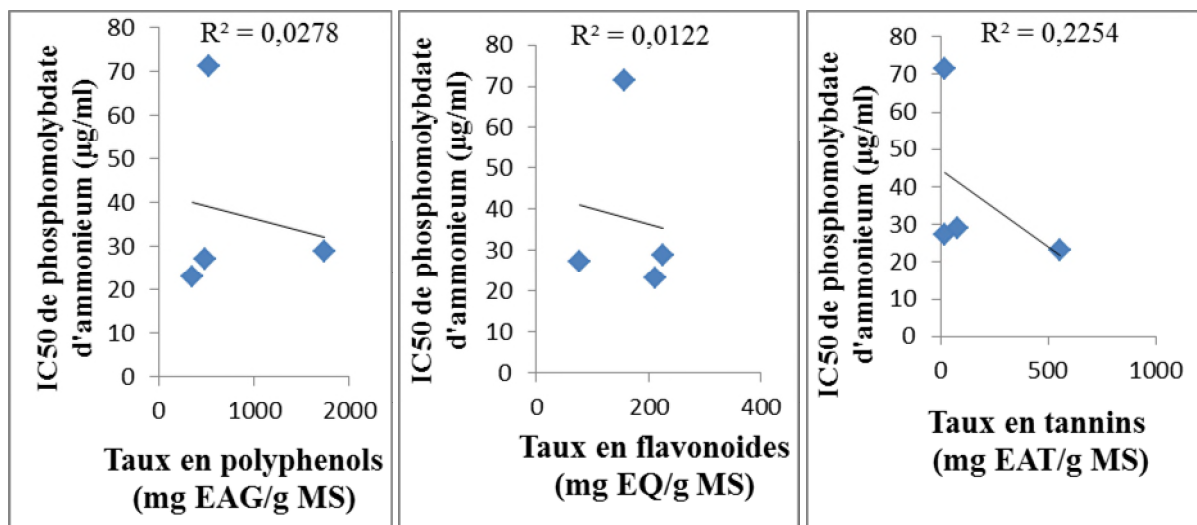
ABTS



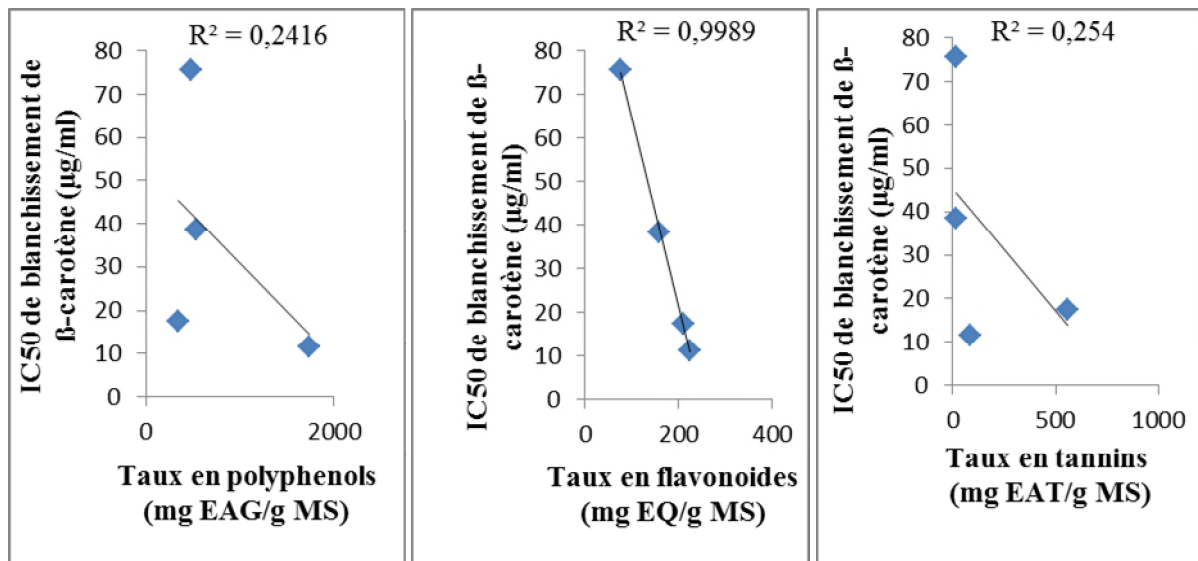
Chlorure ferrique



Phosphomolybdate d'ammonium



Blanchissement de β -carotène



Résumé

Les radicaux libres ont une grande capacité d'endommager presque tous les types de constituants cellulaires dans l'organisme, ce qui explique leur implication dans l'induction et/ou l'amplification de plusieurs pathologies. La supplémentation de l'organisme par des antioxydants exogènes s'avère très utiles pour lutter contre ces espèces nocives.

Dans ce contexte nous avons tenté d'évaluer l'activité antioxydante et anti-radicalaire des différents extraits qu'ont été évalué *in vitro*, préparés à partir des feuilles de *Rhamnus alaternus*. On a effectué le dosage des composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins), pour avoir faire une appréciation quantitatives.

Par la suite, on est passé au pouvoir antioxydant de ces extraits par les tests du DPPH•, ABTS, chlorure ferrique, de phosphomolybdate et du blanchissement de β-carotène. Des résultats obtenus, ils ressortent que ces polyphénols ont une grande capacité de piéger le radical DPPH• avec des IC50 de 9,562 µg/ml pour l'extrait d'acétate d'éthyle. Cette capacité antioxydante est confirmée par les autres.

Mots clés : *Rhamnus alaternus*, stress oxydatif, composés phénoliques, activité antioxydante.

Abstract

The Free radicals have a great capacity to damage almost all types of cellular components in the body, which explains their involvement in the induction and/or amplification of several pathologies. The supplementation of the body by exogenous antioxidants is very useful to fight against these harmful species.

In this context we have tried to evaluate the antioxidant and anti-radical reaction of different extracts which were evaluated *in vitro*, prepared from the leaves of *Rhamnus Alaternus*. We performed the dosage of phenolics (total polyphenols, flavonoids and tannins), in order to get a quantitative assessment.

After that, we have gone through the antioxidant power of these extracts by performing tests for DPPH • ABTS , ferric chloride, phosphomolybdate and bleaching of beta-carotene. As results, it has been shown that these polyphenols have a high capacity to trap the DPPH • radical with IC50 of 9,562 µg/ml for the ethyl acetate extract. This antioxidant capacity is confirmed by others.

Key words: *Rhamnus alaternus*, oxidative stress, phenolics compounds, antioxidant activity

ملخص

الجذور الحرة لديها قدرة كبيرة على افساد تقريبا جميع أنواع المكونات الخلوية في الجسم، وهذا ما يفسر مشاركتهم في استقرار و/أو تضخيم العديد من الأمراض. مكملات الجسم عن طريق مضادات الاكسدة الخارجية هو امر مفيد جدا ضد هذه الامراض الضارة.

في هذا السياق حاولنا تقييم النشاط المضاد للأكسدة والنشاط المضاد للراديكالية المستخلصات المختلفة التي تم تقييمها في المخبر، المعدة من أوراق *Rhamnus alaternus*. اجرينا تقييم كمي لنقاط القوة للمركبات الفينولية (عديدات الفينول الكلية، الفلافونويدات الكلية والتان).

وبعدا اجرينا النشاط المضاد لأكسدة هذه المستخلصات باختبارات ABTS, DPPH, كلوريد الحديد، الفوسفوموليبيدات و تبييض البيتاكاروتين. و منه يستنتج ان هناك قوة مضادة للأكسدة من هذه المقطعات من قبل الاختبارات. النتائج التي تبرز هذه البوليفينول لديها قدرة عالية على اعتراض الجذر الحر DPPH مع $IC_{50}=9.562 \mu g/ml$ لمستخلص اسينات ديثيل. و يؤكد هذه القدرة من قبل الاخرين.

الكلمات المفتاحية *Rhamnus alaternus* , الاكسدة, المركبات الفينولية, النشاط المضاد للأكسدة.

