

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

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



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

*Pouvoir inhibiteur de la
dénaturation thermique des
protéines et activité
antioxydante de Rhamnus*

Présenté par :

M^{em} Azib Chafia & M^{elle} Berkouk Lynda

Devant le jury composé de :

M^r BRIBI N.
M^{me} KHETTAL B.
M^{me} ZAMOURI S.

MCB
MCA
MAA

Président
Encadreur
Examinatrice

Année universitaire : 2016 / 2017

Dédicace



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

J'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

*A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie
ma mère qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude,
pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et
sécurité.*

*A mon cher père qui ma appris le sens de la persévérance tout au
long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses
encouragements.*

A mon très cher frère Hakim.

A mes adorables sœurs : Nora, souhila et Sarah.

A tous ma famille.

Ma binôme et toute sa famille.

*A mes amis de toujours : Nabila, Kayssa, Milissa et wassila
En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments
agréables que nous avons passés ensemble.*

*A tous ceux que j'aurais oublié de citer mais qui existent au fond de
mon cœur et de ma pensée.*

Lynda

Dédicaces



Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents ; pour leurs sacrifices et leurs encouragements durant toutes ma vie.

Mes sœurs : Hayat et ses enfants, Souhila et son fiancé ;

Mes frères : Boubekeur, Boukhalifa, Omar et leurs petites familles.

Ma grande mère et à toute ma famille.

Ma toute belle famille grand et petit surtout ma belle mère Ounissa et khalti Meliha.

Mon marie et mes enfants Adam et Abdelmadjid.

Ma binôme et toute sa famille.

Chafia

Remerciements

Nous tenons d'abord à remercier Dieu le tout puissant de nous avoir donné la volonté et le courage pour réaliser ce modeste travail.

Nous exprimons nos remerciements et notre profonde gratitude à notre promotrice M^{me} KHETTAL, pour avoir accepté de nous encadrer, pour l'aide qu'elle nous a apporté.

NOS vifs remerciements s'adressent aux membres jury pour avoir accepté de juger ce travail :

M^r BRIBI, pour l'honneur qu'il nous a fait d'avoir accepté de présider le jury d'examen.

M^{em} ZAMOURI, pour l'honneur qu'elle nous a accordé en examinant ce modeste travail.

Nous tenons également à remercier toutes personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Introduction

Sommaire

Chapitre I:
Revue bibliographique

Chapitre II :
Matériel et méthodes

Chapitre III:
Résultats et Discussions

Conclusion

*Références
bibliographiques*

Annexes

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Chapitre I : Revue bibliographique	
I. Stress oxydant et antioxydants	3
I. 1. Le stress oxydatif	3
I.1.1. Radicaux libres	3
I.1.2. Stress oxydant	3
I.1.3. Les espèces réactives d'oxygène	3
I.2. Les antioxydants	5
II. Généralité sur les polyphénols	7
II.1. Classification des polyphénols	7
II.1.1. acides phénoliques	8
II.1.2. Les flavonoïdes	8
II.1.3. Les tannins	8
II.1.4. Les anthocyanines.....	9
II.1.5. Les lignines	9
II.1.6. Les stilbènes	9
II.1.6. Les stilbènes	9
II.2. Rôles et intérêts des composés phénoliques	9
III. Inflammation et anti-inflammatoires	11
III.1. L'inflammation.....	11
III.1.1. L'inflammation aiguë	11
III.1.2. L'inflammation chronique	11
III.1.3. Les médiateurs de l'inflammation	12
III.2. Les anti-inflammatoires	13
III.2.1.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens	13
III.2.2. Les métabolites secondaires comme anti-inflammatoires	13
VI. Généralités sur le genre Rhamnus.....	17
VI.1. Espèces de genre rhamnus	17
IV.2. Usage traditionnel et activité biologique.....	18
Chapitre II : Matériels et méthodes	
I. Matériel végétal	20

I.1. Préparation des extraits	20
II. Dosage des polyphénols	21
II.1 Dosage des polyphénols totaux	21
II.2 Dosage des flavonoïdes	21
III. Mesure de l'activité antioxydant de l'extrait de <i>Rhamnus</i>	22
III.1. Activité antiradicalire au radical ABTS+	23
III.2. Pouvoir réducteur	23
IV. Etude <i>in vitro</i> de l'activité anti-thermo dénaturante des extraits d'écorce du rhamnus.....	24
IV. 1. Extraction d'ovalbumine.....	24
IV. 2 .Mesure de la cinétique de la dénaturation d'ovalbumine.....	25
IV.3. Evaluation de l'Effet anti-thermo dénaturant d'extrait de l'écorce de rhamnus	25
Chapitre III : Résultats et discussion	
I. Rendement d'extraction	26
II. Taux des composés polyphénoliques	26
II.1. Teneur en polyphénols totaux.....	26
II.2.Teneur en flavonoïdes	28
III. Activité antioxydant de l'extrait méthanolique	29
III.1. Activité scavengers du radical ABTS	30
III.2. Pouvoir réducteur	31
IV. Effet de quelques paramètres physico-chimique sur la cinétique de dénaturation thermique de l'ovalbumine	33
IV.1. Effet de la concentration d'ovalbumine	33
IV.2. Effet de la concentration de l'éthanol	34
IV.3. Effet de température.....	35
V- Effet inhibiteur de l'extrait d'écorce du <i>Rhamnus</i> sur la dénaturation thermique de l'ovalbumine	36
Conclusion	38
Références bibliographiques	39
Annexes	

Liste des figures

Figure	Titres	Page
01	Sources et conséquences des espèces réactives oxygénées.	5
02	Classification es quelques métabolites secondaires.	7
03	Monographies des différentes espèces de <i>Rhamnus</i> .	18
04	Broyeur électronique (a) ; Poudre de l'écorce de <i>Rhamnus</i> .	20
05	Histogramme représentant les Rendements d'extraction à partir d'écorce de différentes espèces de <i>Rhamnus</i> issus de la bibliographie (rouge, jaune et bleu) (Boussahel et <i>al.</i> , 2015)et Kremer et <i>al.</i> ,2012) en comparaison avec celui obtenu (vert).	26
06	Courbe d'étalonnage avec l'acide gallique comme référence pour le dosage des polyphénols totaux.	27
07	Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes en utilisant la quercétine.	28
8	Histogrammes représentant les teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes de l'extrait méthanolique d'écorce de <i>Rhamnus</i> .	29
9	Taux d'inhibition de l'activité scavenging du radicale ABTS ⁺ en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique du <i>Rhamnus</i> .	30
10	Concentrations inhibitrices (IC ₅₀) d'extrait d'écorce <i>Rhamnus</i> et de standard trolox.	31
11	Taux de réduction de fer ferrique par l'extrait en fonction de Concentration de l'extrait de l'écorce de <i>Rhamnus</i>	31
12	Pourcentages de réductions (IC ₅₀) d'extrait d'écorce et de standard BHA.	32
13	Variation des DO (660 nm) des différentes concentrations de la protéine ovalbumine incubé à 70°C en fonction du temps.	33
14	Variation des DO (660 nm) d'ovalbumine en présence de différentes concentrations d'éthanol en fonction du temps.	34
15	Cinétique de dénaturation de l'ovalbumine à une dilution au 1/20 à différentes températures	35
16	Absorbances à différentes concentrations d'ovalbumine en présence d'extrait d'écorce de <i>Rhamnus</i> (a) et diclofenac sodium (b) en fonction du temps mesure à λ : 660nm.	36

Liste des tableaux

Tableau	Titres	page
I	Origines et propriétés des espèces réactives d'oxygènes.	4
II	Quelques antioxydants et leurs modes d'action.	6
III	Rôles physiologiques et biologiques des principales classes des polyphénols.	10
IV	Quelques médiateurs de la réaction inflammatoire.	12
Va	Quelques plantes à effet anti-inflammatoire.	14
Vb	Quelque métabolite secondaire de plantes à effets anti-inflammatoire.	15
VI	Quelques activités biologiques de <i>Rhamnus</i> .	19

Liste des abréviations

AG : Acide gallique.

AINS : Anti inflammatoires non stéroïdiens.

BHA : Buty-Hydroxyde-Acétique.

CAT : Catalase.

C_oA : Coenzyme A.

COX : cyclooxygénases.

Cu : Cuivre.

DO : Densité optique.

EAG : Equivalent Acide gallique.

EQ : Equivalent Quercétine.

ERO : d'espèces oxygénées réactivées.

Fe : Fer.

GPx : Glutathion peroxydase.

GSH : glutathion.

GSSG : glutathion-disulfure.

IC₅₀ : Concentration inhibitrice 50%.

ICAM-1 : molécules adhérence intracellulaire-1.

IFN- α : Interféron alpha.

IFN- β : Interféron beta.

IFN- γ : Interféron gamma.

IL: Interleukine.

IL-1Ra : Récepteur Interleukine-1.

ABTS⁺ : l'acide 2,2'-azino bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).

NF-κB : Nuclear Factor-kappa B.

RNS : espèces réactives d'azote.

Se : Selsium.

SOD : Superoxyde dismutase.

TCA: Acide Terchloroacétique.

TNF-α : Tumor Necrosis Factor.

vitamine C : acide ascorbique.

vitamine E : Tocophérol.

Zn : zinc.

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) ont une grande importance dans la vie des organismes aérobies. Les ERO sont impliquées comme médiateurs dans des réactions enzymatiques, transport d'électron dans la chaîne respiratoire au niveau de la mitochondrie et produit par les neutrophiles et les macrophages, ils sont caractérisés par leur action antimicrobienne (**Frädrich et al, 2016**). Les ERO interviennent dans la transduction du signal, activation des facteurs nucléaires de transcription, expression des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires ou des protéines d'adhésion pour déclencher une inflammation qui elle-même aggrave les maladies liées au stress oxydant tels que sclérose en plaques, diabète, les maladies cardiaques, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, l'athérosclérose, le cancer et les maladies inflammatoire (**Olugbami et al., 2015**).

Des substances à pouvoir antioxydant et/ou anti-inflammatoire pourraient constituer des principes actifs potentielles dans le traitement des pathologies liées directement ou indirectement à l'inflammation et au stress oxydant. La découverte, l'identification et la caractérisation des propriétés de telles substances bioactives à partir de sources naturelles microbiennes, animales ou végétales fait actuellement l'objet de nombreux travaux de recherche et d'application dans l'industrie pharmaceutique. De par leur grande place dans la médecine traditionnels chez la majorité des populations dans la plupart des pays sous développés, les plantes en particulier celles dites médicinales, représentent une source naturelle très importante à exploiter par l'industrie pharmaceutique notamment pour leurs métabolites secondaires (**Chermat et Gharzouli, 2015**). En effet, les vertus thérapeutiques des plantes médicinales sont en générale liées à ces métabolites secondaires. Ainsi, les polyphenols et les huiles essentielles ont été identifiés comme anti-oxydants par leur rôle important dans le piégeage et la neutralisation des radicaux libres. (**Djeridane et al, 2006**)

Dans cet axe de recherche globale sur les plantes douées de propriétés thérapeutique s'insère l'objectif de notre thème de mémoire de master dont le but étant l'évaluation des activités anti oxydante et anti-inflammatoire de l'écorce d'une plante locale appartenant au genre *Rhamnus*.

Le travail que nous présentons dans ce manuscrit comporte :

- (i) une synthèse bibliographique des différents aspects liés à la problématique du thème en l'occurrence, les poly phénols, le stress oxydatif et les antioxydants, l'inflammation et les anti-inflammatoires et un aperçu sur le genre de rhamnus.
- (ii) une étude expérimentale traitant ; (i) l'extraction et dosage des polyphenols, (ii) l'évaluation de l'activité anti-oxydante par le test antiradicalaire à l'ABTS et par la mesure du pouvoir réducteur d'un complexe ferrique, (iii) l'évaluation du potentiel anti-inflammatoire par le test de l'inhibition de la thermo-dénaturation des albumines.

I. Stress oxydant et antioxydants

I. 1. Le stress oxydatif

I.1.1. Radicaux libres

On appelle un radical libre à toute espèces chimiques (atome, molécule ou ion) qui possède un ou plusieurs électrons non appariés sur la couche externe (**Gutteridge, 1995**) les radicaux libres sont des dérivés réactifs de l'oxygène (**Valko et al., 2007**).

Dans les conditions physiologiques normales de la cellule, les radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité comme des médiateurs tissulaires ou des résidus des réactions énergétiques (métabolisme) ou de défense (immunité) ; mais ils peuvent aussi provenir de sources extérieures comme le tabac, l'exposition aux UV, la pollution et le stress (**Favier, 2003**).

I.1.2. Stress oxydant

C'est un état physiologique où la cellule ne contrôle pas la production excessive de radicaux oxygénés toxiques, qui aboutis à un déséquilibre de la balance antioxydants/prooxydants (**Favier, 2003**). Cette rupture d'équilibre peut avoir différentes origines : intoxications aux métaux lourds, irradiation, carence en vitamines, en oligo-éléments et défaillance nutritionnelle (**Duray et al., 2014**).

I.1.3. Les espèces réactives d'oxygène

L'oxygène est une molécule indispensable à la vie, mais est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées réactivées (ERO) parmi ces derniers on a l'anion superoxyde, le radical hydroxyle, l'oxygène singulet, peroxyde hydrogène, monoxyde d'azote, l'acide hypochloreux et nitroperoxyde. Leurs rôle est très complexe car ces ERO peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration. L'origine et les propriétés des ERO sont illustrées dans le (Tableau I) (**Haleng, 2007**)

Tableau I : Origines et propriétés des espèces réactives d'oxygène

ERO	Origine et propriétés	Références
L'anion superoxyde (O₂^{•-})	facteur oxydant dans de nombreuses réactions, formé suite à des électrons qui fuient à la chaîne respiratoire dans la mitochondrie et peut être synthétisé en grandes quantités par NADPH oxydase	(Favier <i>et al.</i> , 2003)
Le radical hydroxyle (OH[•])	C'est la forme neutre de l'ion hydroxyde. Radical dangereux avec forte réactivité et demi-vie très courte (10 ⁻⁹). Il peut induire la peroxydation des lipides	(Gutteridge, 1995 ; Valko <i>et al.</i> , 2007).
L'oxygène singulet (¹O₂)	N'est pas un radical libre, il est produit à partir des électrons qui fuient à la chaîne respiratoire dans la mitochondrie	(Haleng <i>et al.</i> , 2007).
peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)	Produit par la mitochondrie pendant la respiration et éliminé par glutathion peroxydase (GPx)	(Haleng <i>et al.</i> , 2007)
Le monoxyde d'azote (NO[•])	Un radical important, c'est une molécule labile très diffusible régulatrice de la plupart des fonctions physiologiques de l'organisme. Il est synthétisé à partir d'arginine sous l'action d'oxyde nitrique synthétase dans les cellules endothéliales.	(Bartosz, 2003 ; Haleng <i>et al.</i> , 2007)
L'acide hypochloreux HOCl	Un oxydant puissant qui a une activité antibactérienne importante. synthétisé par les neutrophiles	Gutteridge, 1995 ; Barouki, 2006

Les ERO sont produits continuellement à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule par divers mécanismes. On parle de source exogènes et de sources endogènes. La défense antioxydant enzymatique et non enzymatique empêche et régule le niveau global des ERO pour maintenir l'homéostasie. De même, des ERO augmentés peuvent aussi être Préjudiciable et conduire à la mort cellulaire ou à une accélération du vieillissement et maladies .Par contre une déficience cause la diminution de la réponse proliférative. (Figure 1)

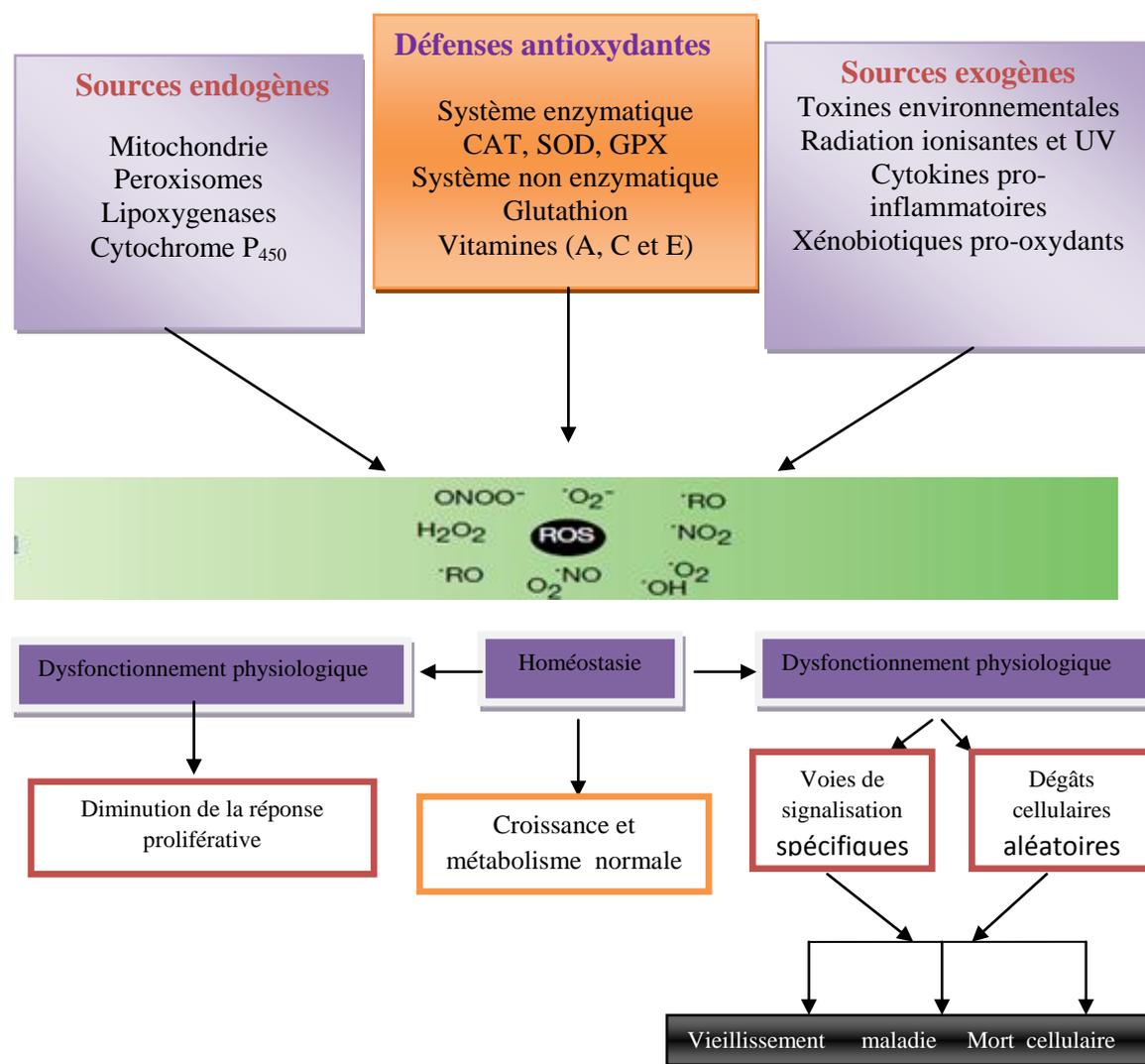


Figure 1: Source et conséquences des espèces réactives oxygénées (Finkel et Holbrook., 2000).

I.2. Les antioxydants

Les antioxydants sont des molécules qui assurent la protection de l'organisme contre les effets délétères des ERO. On distingue deux groupes importants d'antioxydants chez les organismes vivants (Tableau II) ; antioxydants enzymatiques tels que la catalase (CAT), glutathion peroxydase(GPx) et superoxyde dismutase(SOD), les Antioxydants non-enzymatiques : d'origine endogène, tel que métalloprotéines comme (ferritine, lactoferrine) et l'albumine comme (albumine sérique), d'origine exogène (nutritif) : comme vitamines (E, A, C) et oligoéléments ,d'origine photochimique tels que la quercétine et resvératol (Shebis et al., 2013).

Tableau II : Quelques antioxydants et leurs mode d'action (Haleng et al., 2007 ; Shebis, 2013 ; Rolland, 2004)

	Nom	Mode d'action	
Antioxydants Enzymatiques	Catalase	Transforme le peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire $2\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ localisées dans les peroxysomes.	
	Glutathion peroxydase (GPx)	Elimination du peroxyde d'hydrogène et des peroxydes lipidiques $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \xrightarrow{\text{GPx}} 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$ $\text{ROOH} + 2\text{GSH} \xrightarrow{\text{GPx}} \text{ROH} + \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$ Localisé dans la mitochondrie et le cytosol.	
	Superoxyde dismutase (SOD)	Elimination de l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \xrightarrow{\text{SOD}} \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	
Antioxydant Non Enzymatiques	Vitamine C	Piégeur de radicaux libres, localisé dans le cytosol. réduit le radical α -tocophérol pour assuré l'efficacité de la vitamine E (recyclage de la vitam E) Source les fruits surtout les agrumes.	
	Tocophérol (vitamine E)	Inhibiteur de la peroxydation lipidique. piégeage des radicaux libres. se fixe aux membranes biologiques. D'origine alimentaire (les huiles végétales).	
	Glutathion	Piégeur de radicaux libres Protecteur des protéines, lipdes, ADN Cofacteur des Glutathion peroxydases.	
	b- carotène	Piégeur de l'oxygène singulet Précurseur de la vitamine A D'origine alimentaire (les légumes).	
	Ubiquinone	Inhibiteur de la peroxydation lipidique Localisé dans les mitochondries.	
	OLIGOELEMENTS	Sé	Co - facteur des différentes GPx rôle dans l'immunité
		Cu	Co - facteur de la SOD facteur prooxydant à forte concentration
		Zn	Co - facteur de la SOD, rôle dans l'immunité Inhibe les réactions d'oxydation induites par le cuivre
	Polyphénols	Flavonoïdes, tannins, anthocyanines. Lutter contre les radicaux libres et stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides.	

II. Généralité sur les polyphénols

Les polyphénols sont les constituants les plus répandus chez les végétaux, ils sont considérés comme des métabolites secondaires (Bennick, 2002). Ils ne sont pas impliqués dans la croissance et le métabolisme énergétique des plantes car ils sont synthétisés en réponse aux facteurs environnementaux dans le but de protéger les plantes contre les prédateurs ; microorganisme et l'effet des UV (D'Archivio et al., 2007).

II.1. Classification des polyphénols

Les polyphénols dans leur biosynthèse sont des dérivés d'acétylcoenzyme A, acides aminés et shikimate (James et al., 2007). Ils possèdent un ou plusieurs cycles aromatiques avec un ou plusieurs groupes d'hydroxyles. Ils sont classés en acides phénoliques, flavonoïdes, anthocyanes, tannins et stilbènes (Dai et Mumper, 2010)

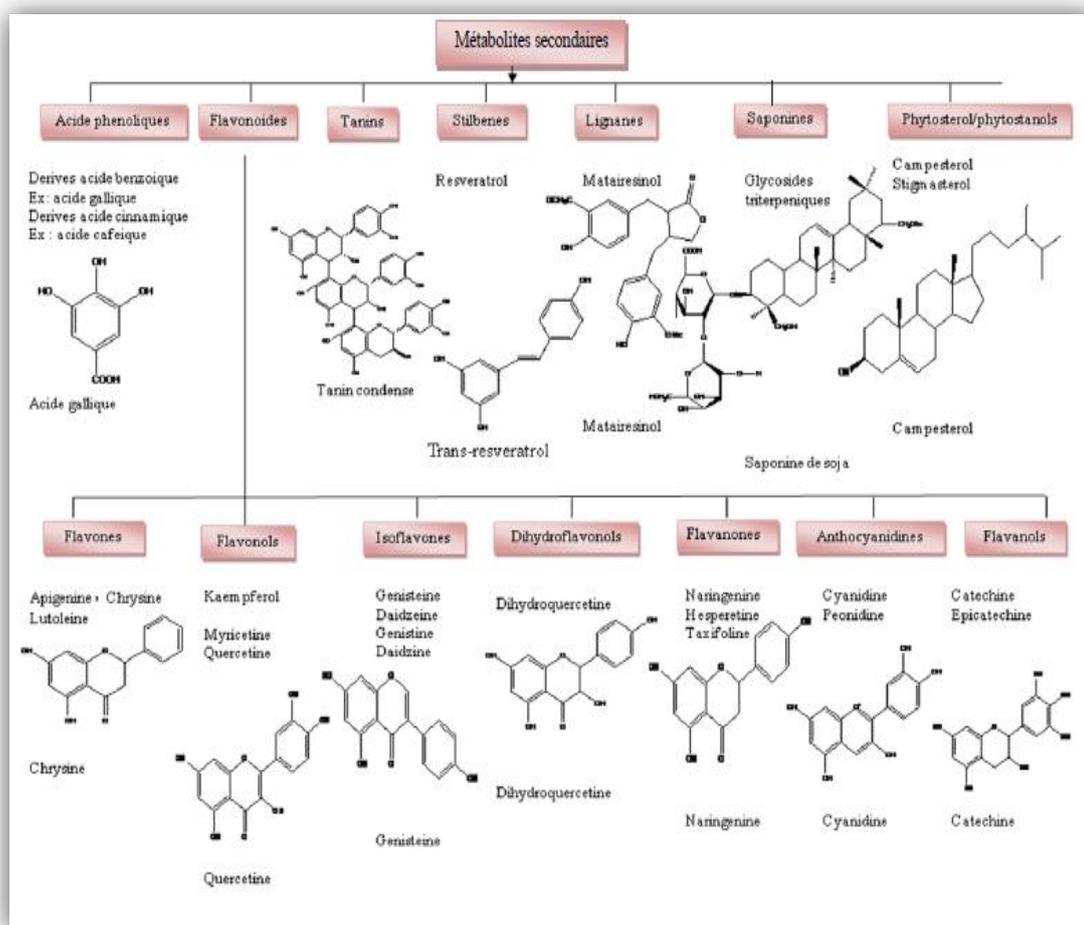


Figure 2 : Classification es quelques métabolites secondaires (Muanda, 2010)

II.1.1. acides phénoliques

Les acides phénoliques peuvent être divisés en deux classes, cette division est basée sur la variation du nombre et du l'endroit des groupes d'hydroxyle sur le cycle aromatique. On distingue : les dérivés d'acide benzoïque (acide hydroxybenzoïque) tels que l'acide gallique, et les dérivés d'acide cinnamique (acides hydroxycinnamiques) tels que l'acide coumarique, caféique et férulique. Ils se produisent sous forme d'esters, glycosides ou amides, et rarement sous forme libre **(Dai et Mumper, 2010; Khoddami et al., 2013)**.

II.2.2. Les flavonoïdes

Ce sont des composés phytochimiques complexes, ils sont synthétisés à partir des acides aminés aromatiques (phénylalanine et la tyrosine) **(Khoddami et al., 2013)**. La famille des flavonoïdes est depuis bien des années définie par la nature de son squelette carboné qui comprend 15 atomes de carbone répartis selon la séquence C₆-C₃-C₆ commune à tous les flavonoïdes et dans laquelle deux cycles **benzéniques** A et B sont reliés par un élément à 3 atomes de carbone **(Duthie ,2003)**. Ils se subdivisent en six sous-classes : flavones, flavonols, flavanols, flavanones, isoflavones, et anthocyanines (figure3), selon l'état d'oxydation du cycle central(C) **(Dai et Mumper, 2010)**.

II.2.3. Les tannins

Ce sont des métabolites phénoliques avec un poids moléculaire supérieur à 500 Daltons, caractérisés par leur capacité de précipiter la gélatine et d'autres protéines, ils ont un rôle biologique dans les plantes ; qui est la défense contre les prédateurs et les herbivores **(Bennick, 2002)**. Selon leur structure biochimique, il est usuel de distinguer deux classes : les tannins hydrolysables et tannins condensés.

➤ Les tannins hydrolysables

Ce sont des composés contenant une unité structurale fondamentale qui est le glucose sur lequel se fixe avec des liaisons esters des acides comme l'acide gallique pour donner les gallotannins ou l'acide ellagique pour le groupe des ellagitannins **(Sébastien ,2006)**.

➤ **Les tannins condensés**

Ce sont des oligomères hydrosolubles, contenant de deux à dix unités de catéchine ou des polymères (non hydrosolubles) de flavan-3-ol liés par liaisons carbone-carbone. Ils sont également appelés les proanthocyanidines par ce que lors de chauffage dans des conditions acide ils se décomposent en anthocyanidines (**Bennick, 2002 ; Dai et Mumper, 2010**).

II.2.4. Les anthocyanines

Les anthocyanines sont des composés hétérosides stables et hydrosolubles, sont responsables des colorations rouges, bleues, et pourpres pour les fruits, les légumes, les fleurs et d'autres tissus végétaux. (**Vatai et al., 2008**). Ce sont des pigments avec une grande importance industrielle en raison de leur utilisation comme colorants naturels dans les nourritures (**Longo et al., 2005**).

II.2.5. Les lignines

Les lignines sont des composés phénoliques de la paroi cellulaire. Ils sont insolubles et se trouvent complexés avec d'autres types de constituants. Ils assurent la protection des plantes contre des infections et l'effet des UV pendant la croissance (**Khoddami et al., 2013**).

II.2.6. Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés naturels synthétisés par la plante en réponse à une infection par des agents pathogènes ou au stress. Ils ont été détectés chez plus de 70 espèces végétales et l'exemple le plus connu est le resvératrol qui se trouve en quantités importantes dans l'écorce des fruits frais des raisins ; caractérisés par leur propriété anticancéreuse (**Massimo, 2007**).

II.2. Rôles et intérêts des composés phénoliques

Depuis plusieurs années les polyphénols ont un intérêt croissant de la part des consommateurs et des chercheurs pour leurs propriétés antioxydantes et ainsi que leur implication probable dans la prévention de diverses pathologies (**D'Archivio et al., 2007**).

Tableau III : Rôles physiologiques et propriétés biologiques des principales classes des polyphénols

Classe	Rôle physiologique	Propriétés biologiques
Flavonoïdes	<ul style="list-style-type: none"> - Jouent un rôle dans la protection contre les UV. -La défense des plantes contre les microorganismes pathogènes. -La fertilité des plantes -dans les interactions plantes micro-organismes (Winkel-Shirley.B. 2002) 	<ul style="list-style-type: none"> -Diminution de la perméabilité des capillaires sanguins et renforcement leur résistance (Derbel et Ghedira ,2005). -Anti hépatotoxique, anti-inflammatoire antiallergique, antivirales et l'anti-ulcère. -Inhibent également certaines enzymes telles que l'aldose réductase et xanthine oxydase. -Ce sont des antioxydants efficaces avec leur capacité de piégeage des radicaux libres (Narayana et al., 2001).
Anthocyanines	<p>Pigments de coloration des différents tissus végétaux (Dai et Mumper., 2010).</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Ce sont des antioxydants ; de piégeage des radicaux libres et de chélation des Métaux. - Bloquent la production du NO à partir des polynucléaires neutrophiles au cours de la phase précoce de l'inflammation (Derbel et Ghedira , 2005)
Tannins	<p>protection contre les prédateurs (Bennick, 2002).</p>	<ul style="list-style-type: none"> -ont la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (Haslam, 2007). -Inhibent les enzymes digestives des animaux, et causent la byssinose chez l'homme (Bennick, 2002). -Forme des complexes avec les protéines ou les polysaccharides de la paroi cellulaire (Wollgast, 2000).

III. Inflammation et anti-inflammatoires

III.1. L'inflammation

C'est un processus physiologique de défense de l'organisme contre une agression qui entraîne une altération tissulaire. Elle peut être déclenchée par un traumatisme, une brûlure, une irradiation ou par la pénétration d'agents pathogènes extérieurs (virus, bactérie, parasite, antigènes) (**Cassier, 2004**).

L'inflammation se déroule dans le tissu conjonctif vascularisé. Les tissus dépourvus de vaisseaux (cartilage, cornée) sont incapables de développer une réaction inflammatoire complète. La douleur et la fièvre sont les signaux les plus courants associés à une inflammation (**Ruslan, 2008**). Selon la durée et les symptômes observés On distingue deux types ; d'inflammation aiguë et chronique.

III.1.1. L'inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est une réponse à des dommages ou à une infection qui est produit immédiatement et elle est de courte durée. Cette réaction a comme conséquence la guérison : les leucocytes infiltrent la région endommagée, enlevant le stimulus et réparant le tissu (**Yucel-Lindberg et Bage ,2013 ; Medzhitov, 2008**).

C'est une réponse locale compte sur des types spécialisés de cellules (neutrophiles, monocytes, éosinophiles et basophiles) qui sont typiquement recrutés dans la circulation. Elle est Caractérisée par la rougeur, l'œdème, l'augmentation de la chaleur locale et la douleur qui constituent les signes cardinaux connus depuis Galien (« rubor, tumor, dolor, calor ») (**Duyckaerts, 2000; Chovatiya ,2014**).

III.1.2. L'inflammation chronique

L'inflammation chronique est une réponse prolongée qui implique la destruction de tissu, n'ayant aucune tendance à la guérison spontanée et qui évolue en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années (**Richard et al., 2003**). Une telle inflammation persistante est associée à différentes maladies chroniques, y compris l'allergie, l'athérosclérose, le cancer, l'arthrite et les maladies auto-immunes (**Medzhitov, 2008**).

III.1.3. Les médiateurs de l'inflammation

Les inducteurs de l'inflammation déclenchent la production de nombreux médiateurs inflammatoires par les cellules du système immunitaires, qui changent à leur tour le fonctionnement de beaucoup de tissus et organes (**Kuby et al., 2003**).

Les changements locaux qui surviennent au niveau du site inflammatoire sont le résultat de la formation et/ou de la libération séquentielle de médiateurs pro et anti-inflammatoires de natures divers ; amine (histamine et sérotonine), médiateurs lipidiques (prostaglandines et leucotriènes), et des cytokines de nature peptidique, protéique ou glycoprotéique (**Botting, 2000**) (tableau IV)

Tableau IV: Quelques médiateurs de la réaction inflammatoire (**Charles et 2003 ; Loisa, 2008; Medzhitov, 2008**)

Médiateurs		Source	Rôles
Cytokines inflammatoires	Pro inflammatoire TNF- α , IL-1, IL-6	Macrophages mastocytes	Activation de l'endothélium et des leucocytes et l'induction de la réponse inflammatoire aigue.
	Anti-inflammatoire IL-10, IL-8, IL-1Ra		Production de prostaglandines, suppression le super oxyde de nitrite. Inhibition des macrophages. Activation et migration des neutrophiles. Inhibition d'IL-1.
Histamine-Sérotonine	Amines vasoactives	Mastocytes polynucléaires basophiles plaquettes	Augmentation de la perméabilité vasculaire.
Prostaglandins et leucotriènes	Acides gras comportant 20 atomes de carbones	synthétisés dans les membranes à partir de l'acide arachidonique	Vasodilatation, douleur, attraction des polynucléaires comme effets locaux et la fièvre comme effets généraux.
Radicaux libres	ROS RNS	Synthétisés par les cellules normales	Peroxydation lipidique des membranes des macrophages. Provoquant la synthèse des cytokines et des chimiokines.

III.2. Les anti-inflammatoires

III.2.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) regroupent l'ensemble des médicaments qui présentent différentes activités pharmacologiques de type anti-inflammatoire, analgésique, antipyrétique et antiplaquettaire ainsi que des effets secondaires gastro-intestinaux et rénaux, qui inhibent la synthèse des prostaglandines par l'inhibition non spécifique de deux cyclooxygénases la COX-1 et la COX-2. Parmi ces AINS on a l'aspirine (inhibe plus la COX-1 que la COX-2), diclofenac et piroxicam (**Chiolero et al., 2000**).

III.2.1.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens

Ce sont des glucocorticoïdes appliqués largement pour traiter la plupart des maladies chroniques d'origine auto-immunes. Ils agissent par l'inhibition des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B d'où l'inhibition de l'expression des gènes qui codent pour les facteurs de croissance à cellule T, les cytokines tels que IL-2, IL-4, IL-15, et IL-17 et l'interféron- γ (IFN- γ). Ils réduisent l'expression des gènes codant pour COX-2 et les molécules adhérence intracellulaire (ICAM-1).

Les glucocorticoïdes favorisent l'expression des gènes codant aux molécules anti-inflammatoires, telles que les cytokines IL-10 et IL-1Ra (**Dinarelo ,2010**).

III.2.2. les métabolites secondaires comme anti-inflammatoires

Le système immunitaire peut être modifié par le régime, agents pharmacologique et produits chimiques alimentaires naturels. Les plantes contiennent une large variété de métabolites secondaires tel que ; stérols, alcaloïdes, flavonoïdes, glycosides, saponines, tannins, alfa - tocophérol, acide ascorbique, curcumine, acide salicylique et les terpènes qui ont une activité anti-inflammatoire (tableaux Va et Vb) traduite par la capacité d'inhiber les processus qui mènent à l'inflammation par empêchement de l'activation du de TNF- β , inhibition de la sécrétion des cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6), inhibition d'expression des molécules d'adhérence cellulaires (ICAM-1) et par l'inhibition des enzymes pro inflammatoires COX-1 et COX-2 (**Iwalewa,2007**).

Tableau Va: Quelques plantes à effet anti-inflammatoire (Iwalewa et al., 2007)

plantes	Partie étudiée	Indications
<i>Acacia sieberiana</i> (Fabaceae)	Ecorce de la tige	Fièvre, douleurs parties génitales et maux dorsales.
<i>Berchemia zeyheri</i> (Rhamnaceae)		Mal de dos et ulcère rectal.
<i>Croton gratissimus</i> (Euphorbiaceae)		Inhalé pour soulager la douleur.
<i>Cryptocarya lantifolia</i> (Lauraceae)		Doleurs et fièvre abdominaux et utérins.
<i>Erythrophleum lasianthum</i> (Fabaceae)		Douleur de corps persistante et spasme intestinal.
<i>Erythrina lysistemon</i> (Fabaceae)		Gonflement et abcès.
<i>Diospyros villosa</i> (Ebenaceae)		Douleurs internes et utérines, crampes musculaires.
<i>Pittosporum viridiflorum</i> (Pittosporaceae)		Fièvre, douleurs abdominales, estomac et dos.
<i>Ilex mitis</i> (Aquifoliaceae)		Fièvre, éruptions et blessures et rhumatisme
<i>Capparis tomentosa</i> (Capparaceae)	Ecorce de la racine	Fièvre
<i>Chaetacme aristata</i> (Ulmaceae)		Hémorroïdes et anodins dentaires
<i>Acacia burkei</i> (Fabaceae)	Ecorce de la tige et la racine	Douloureux de dos et les yeux
<i>Peltophorum africanum</i> (Fabaceae)		Toux, douleurs des dents, de dos et fièvre.
<i>Bridelia micrantha</i> (Euphorbiaceae)	Ecorce de tige, la racine et feuilles	Douleur de poumon, toux, diabète, douleur épigastrique, mal des dents et fièvre.
<i>Harpephyllum caffrum</i> (Anacardiaceae)	Ecorce racine / tige	Acné, problèmes de peau.
<i>Ocotea bullata</i> (Lauraceae)	Fruits secs et l'écorce	articulations, dos et rhumatisme douloureux.
<i>Kigelia africana</i> (Bignoniaceae)	Feuilles et l'écorce de tige	Mal de tête, toux et grippe et hémorroïdes fébriles.
<i>Leonotis leonurus</i> (Laminaceae)	Ecorce	Mal de tête et douleurs urinaires.
<i>Euphorbia ingens</i> (Euphorbiaceae)		Ulcère et cancer chronique, asthme et bronchite.

Tableau Vb : Quelque métabolites secondaires de plantes à effets anti-inflammatoire (Azab et al., 2016 ; Furst et Zundorf, 2014 ; Shahin et al., 2007)

Métabolites secondaires	Plantes qui les comporte	Site d'action
Triterpènes : Acétate d'amyrine ; nimbine, filicene, acide oleanolique	<i>Thymus serpyllum, Syzygium aromaticum, Salvia triloba, Rosmarinus officinalis,, Origanum majorana, Ligustrum lucidum, Lavandula latifolia</i>	Réduction significative du volume de l'œdème. Les effets étaient comparables à ceux de l'hydrocortisone
Quercetine	<i>Allium cepa, Camellia sinensis, Hypericum perforatum, Podophyllum peltatum</i>	Réduction significative du volume de l'œdème dans les maladies aiguës et chroniques Les effets étaient comparables à ceux du phenylbutazone
Allicin	<i>Allium sativum</i>	Réduction significative du volume de l'œdème qui était semblable à celui du diclofenac.
Myrtenole	<i>Tanacetum vulgare, Aralia cachemirica</i>	Réduction significative du volume de l'œdème comparable à celui de l'indométhacine. Diminution significative des niveaux d'IL-1. Un effet analgésique significatif qui était comparable à celui de la morphine
Divers terpènes et polyphénols	<i>Nepenthes mirabilis (Lour.) Rafarin</i> (Carnivorous plant)	Réduction significative de niveaux d'IL-6, d'IL-12 et de TNF α

Tableau Vb : Quelques métabolites secondaires de plantes à effets anti-inflammatoires (suite et fin)

Acide ferulique	<i>Solanum lycopersicum L.</i> (Tomate)	Diminution significative d'expression d' IL-1 β et du de TNF α . Réduction significative d'activité du NF κ _B.
Acide 3-Hydroxyanthranilique	<i>Hibiscus tiliaceus</i>	Diminution significative de l'expression de NON, de IL-1 β , d'IL-6 et de TNF α , Croissance significative dans l'expression IL-10 Réduction significative d'activité du NF κ _B
Curcumine	<i>Curcuma longa</i> , Zingiberaceae	Empêche la synthèse des médiateurs pro inflammatoires Inhibe NF κ B, MAPK, COX 1 et COX 2 et inhibe la sécrétion des cytokines (TNF α , IL-1 β , IL-6). Bloque l'expression des molécules d'adhérence des cellules (ICAM-1)
Kaempferol, resveratrol (un dérivé de stilbène)	Diverses plantes	Empêche l'expression de COX-2 par l'inhibition des tyrosines kinases.
Capsaïcine	Poivrons (espèces ; <i>Solanaceae</i>)	Empêche l'activité COX-2, l'expression d'NOS, et la voie de NF κ B dans les macrophages.

VI. Généralités sur le genre *Rhamnus*

Les *Rhamnus* appartiennent à la famille des *Rhamnaceae*, ordre des célastrales. Le nom de ce genre vient du grec *rhamnos* qui désignait plusieurs espèces de nerpruns et était associé au bourge de Rhamnonte en Attique. Le genre *Rhamnus* regroupe environ une centaine d'espèces d'arbustes ou de petits arbres de 1 à 10 m de haut, presque toutes originaires des régions tempérées de l'hémisphère Nord. Quelques-unes croissent aussi au Brésil et en Afrique du Sud (Cuoco et al., 2014).

Les nerpruns sont de petits arbres et surtout des arbustes, souvent épineux, au feuillage caduc ou persistant, à feuilles alternes ou opposées, penninervées, serretées ou entières, stipulées. Les fleurs, polygames ou dioïque, sont petites, verdâtres, jaunâtres ou blanchâtres, et forment des glomérules axillaires, des ombelles ou des grappes. Les fruits sont des drupes subglobuleuses, ainsi que l'écorce de leur tronc, brune à noirâtre, est crevassée longitudinalement, alors que celle de leurs rameaux est lisse et lenticelle (Brosse, 2000).

VI.1. Espèces de genre *Rhamnus*

Les espèces les plus répandues et exploitées pour leur activités et pour leurs usages traditionnelles en Algérie sont : (figure 7)

➤ *Rhamnus alaternus* L (nerprun alaterne)

C'est un arbre glabre qui pouvant atteindre 1 à 5 m de hauteur avec l'écorce gris (Bayer et al., 2005). Les feuilles sont persistantes, coriaces, alternes, ovales, lancéolées et lâchement dentées ou entières. Les fleurs unisexuées et jaunâtres. Le fruit est une baie d'abord rouge puis noire, ovoïdes de la grosseur d'un pois chiche à peine charnue, d'un noir bleuâtre à graines peu nombreuses (Quezel et Santa ,1963 ; Beloued ,2001).

➤ *Rhamnus cathartica* L (nerprun purgatif)

Arbrisseau de 2 à 4 m de hauteur, avec des rameaux à bout épineux et un feuillage caduque. Les feuilles sont ovales, finement dentées, opposées sur les jeunes rameaux, puis alternes sur les plus âgés. Les fleurs sont jaunes verdâtres et sont présentes entre mai et juin. Les fruits sont de petites drupes noires à maturité (août-septembre) (Hensel, 2008).

➤ *Rhamnus frangula L* (frangula alnus)

C'est un bel arbuste de 2 à 5 m de haut, aux rameaux effilés, alternés et peu nombreux. Son feuillage caduc, d'un vert lustré, devient jaune clair à l'automne. Il porte des fruits globuleux, d'abord rouge, puis pourpre sombre en été (**Brosse, 2000**).

➤ *Rhamnus alpina L* (nerprun des alpes)

Cette espèce caractéristique des rochers et des éboulis calcaires, c'est un arbrisseau noir épineux ne dépassant pas 3 m de haut et qui croît lentement. Les feuilles sont ovales ou suborbiculaire et finement dentées. Les fleurs sont vert jaunâtre de petite taille, avec des fruits globuleux de la grosseur d'un pois noir violacé (**Guinochet et Vilmorin, 1975**).

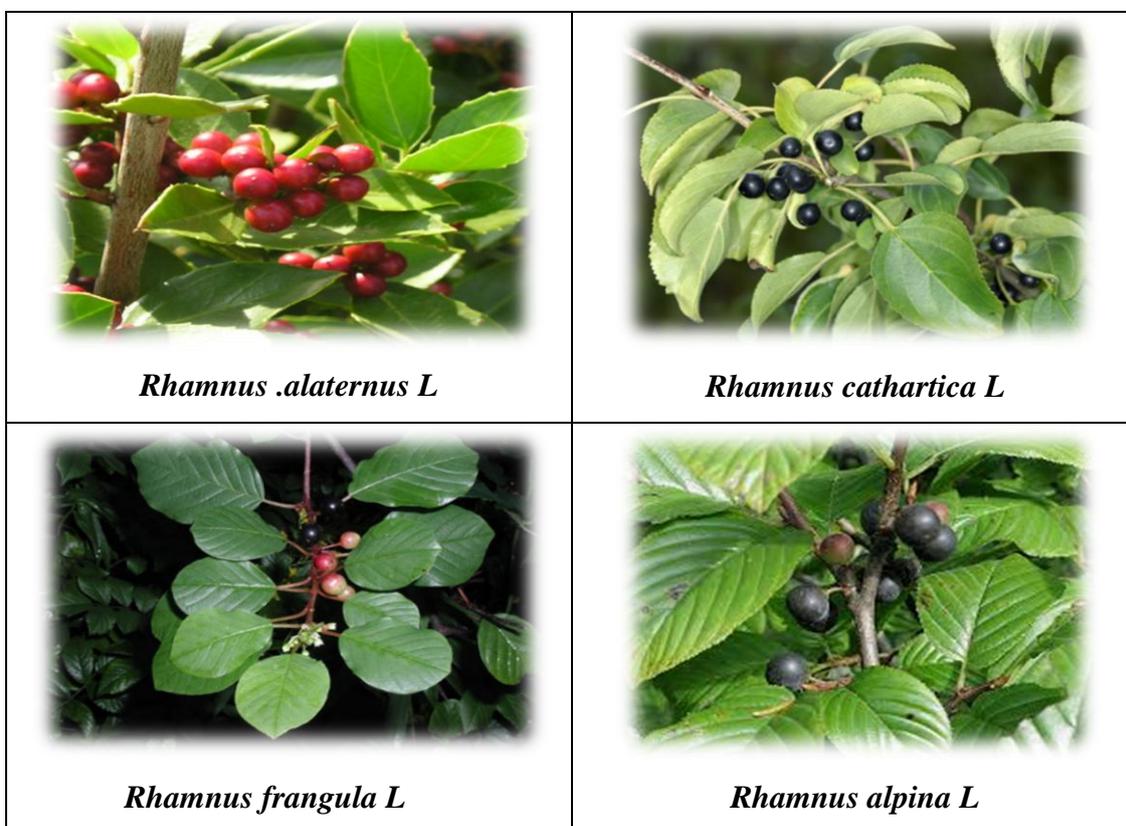


Figure 3: Monographies des différentes espèces de Rhamnus.

IV.2. Usage traditionnel et activité biologique

En médecine traditionnelle les plantes du genre *Rhamnus* ont été employés en tant que digestif, diurétique, laxatif, hypotenseur et pour le traitement des complications des maladies hépatiques et dermatologiques (**Ben Ammar et al., 2008**). L'écorce de la racine ou du tronc de *Rhamnus alaternus* sont utilisés avantageusement contre la jaunisse. On prépare à cet effet 10g d'écorce de racine ou du tronc dans un demi litre d'eau, laisser bouillir 10mn, filtrer, prendre 2 tasses par jour (**Beloued, 2001**). Les espèces du *Rhamnus* représentent plusieurs activités biologiques parmi elles on cite l'activité anti-enzymatique, antioxydante et anti-inflammatoire (Tableau VI).

Tableau VI: Quelques activités biologiques de *rhamnus*.

Activités biologiques	Partie étudiée de la plante	Action	Références
Anti-enzymatique	Parties aériennes de <i>Rhamnus alaternus</i>	Inhibition significatif l'activité de Carboxylesterase (CE)	(Stocker et al., 2004).
Antioxydante	L'écorce de <i>R. alaternus</i> , <i>R. fallax</i> , <i>R. intermedia</i> , <i>R. pumila</i> .	Les anthraquinones sont connues comme des agents antioxydants. piégeage des radicaux libres, élimination d'anion superoxyde, chélation des métaux, inhibition de xanthine oxydase	(Kosalec et al., 2013).
Anti-inflammatoire	Feuilles de l'espèce de <i>R. alpinus</i>	Réduire la synthèse des chimiokines.	(Chiavaroli.A, et al., 2008).

I. Matériel végétal

Cette étude a été réalisée sur l'écorce de *Rhamnus*, achetée le moins de septembre 2016 dans un magasin d'arboriste de la ville Bejaia. Après rinçage avec de l'eau distillée l'écorce a été séchée à l'air libre et à température ambiante et mise à l'étuve pendant 48h à 40°C afin d'éliminer toute trace d'humidité tout en préservant le maximum de ses composés. A l'aide d'un broyeur électrique de type PLANESAT (figure4), l'écorce a été pulvérisée jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Cette dernière a été tamisée à granulométrie inférieure à 63 µm afin de récupérer une poudre très fine dans l'optique d'optimiser le taux d'extraction. La poudre a été conservée dans des flacons en verre hermétiquement fermés et stockés à l'abri de

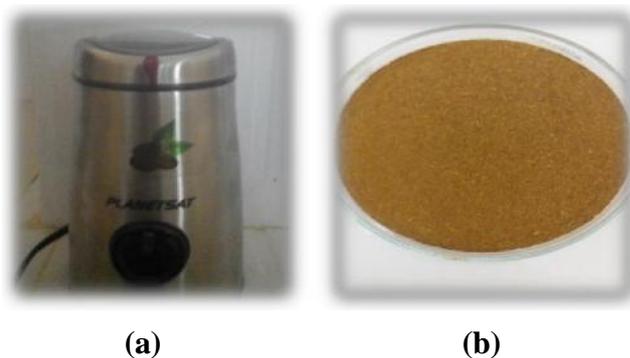


Figure 4 : Broyeur électronique (a) ; Poudre de l'écorce de *Rhamnus* (b).

I.1. Préparation de l'extrait

L'extraction a été préparée à partir de la poudre de *Rhamnus* par macération à froid au méthanol selon le protocole de **Chiang et al., (1994)**.

On a mélangé 50 g de poudre d'écorce avec 500 ml de méthanol à 80% et laissé à macérer sous agitation magnétique pendant 24h à température ambiante. Après macération, la solution a été filtrée et évaporée à l'aide d'un rotavapor ; le résidu sec a été conservé dans un flacon brun jusqu'à l'utilisation.

➤ Calcul de rendement en extrait secs

Le rendement de la plante en extrait sec exprimé en (%) a été déterminé selon la formule suivante :

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = \frac{P1 - P2}{P3} \times 100$$

P1 : poids du ballon après évaporation.

P2 : poids du ballon avant évaporation.

P3 : poids de la matière végétale de départ.

II. Dosage des polyphénols

II.1 Dosage des polyphénols totaux

Le contenu en polyphénols totaux d'extrait a été déterminé en suivant le protocole de **Ryan(2013)**.

➤ Principe

Le dosage des composés phénoliques repose sur la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés (**Ribereau-Gayon et al., 1982; Bucic-Kojic et al., 2007**).

➤ Mode opératoire

Un volume de 200µl de l'extrait de l'écorce de *Rhamnus* solubilisé dans le méthanol (1mg /ml) a été mélangé avec 1.5 ml de réactif Folin-ciocalteu (0.1N) dilué 1/10. Le mélange a été incubé pendant 5 mn à l'obscurité puis 1.5ml d'une solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 7.5% a été additionnés. Après agitation et incubation à température ambiante pendant 90 mn, l'absorbance (Abs) a été mesurée à 765 nm contre un blanc préparé suivant la même méthode, sauf que l'extrait est remplacé par le solvant. une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant l'acide gallique comme standard. La quantité des polyphénols totaux a été exprimée en équivalents milligramme d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g).

II.2 Dosage des flavonoïdes

Le contenu en flavonoïdes d'extrait a été déterminé en suivant le protocole de **Quettier-Deleu et al., (2000)**.

➤ Principe

La teneur en flavonoïdes est basée sur la formation de complexe flavonoïdes-métaux tel que l'aluminium sous forme de chlorure d'aluminium (AlCl₃). La liaison des atomes d'oxygène présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes avec le chlorure d'aluminium forme des complexes jaunâtres. (**Ribereau-Gayan, 1868**)

➤ Mode opératoire

A température ambiante, 1 ml de la solution d'extrait (1mg/ml) a été ajouté à 1 ml d'une solution de chlorure d'aluminium (2%), le tout est bien mélangé. Après incubation pendant 10 mn à l'obscurité, la mesure de l'absorbance a été effectuée à 448 nm contre un blanc préparé suivant la même méthode sauf que l'extrait est remplacé par le solvant. La quantité des flavonoïdes a été exprimée en équivalents milligramme de quercétine par gramme d'extrait sec (mg EAG/g).

III. Mesure de l'activité antioxydant de l'extrait de *Rhamnus*

III.1. Activité antiradicalaire au radical ABTS⁺

➤ Principe

Ce test est basé sur le mécanisme d'oxydoréduction de l'ABTS. L'activité antioxydante totale d'une molécule est déduite de sa capacité à inhiber le radical ABTS^{•+}, obtenu à partir de l'oxydation d'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) avec le persulfate de potassium qui est alors réduit en présence des antioxydants sous une forme stable comparativement à un antioxydant de référence : le Trolox® (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique)

un cation ABTS⁺ est produit directement par oxydation d'ABTS avec le persulfate de potassium qui est alors réduit en présence des antioxydants sous une forme stable (**Re et al.,1999**)

➤ Mode opératoire

Le protocole utilisé pour mesure l'activité antiradicalaire au radical ABTS⁺ est celui décrit par **Re et al., (1999)**.

ABTS a été dissous dans l'eau à une concentration de 7mM. Le radical Cation ABTS (ABTS⁺) a été produit en mélangeant un volume de la solution ABTS avec le même volume de persulfate de potassium [2,68 mM] et le tout est conservé à l'abri de la lumière à température ambiante durant 16 h avant utilisation. La solution ABTS⁺ a été diluée avec du méthanol jusque à l'obtention d'une absorbance de (0,70 ± 0,02) à 734 nm. 2 ml de cette solution fraîchement préparée sont ajoutés à 20µl d'extrait et la lecture est faite à 734 nm après 30 min.

Le Trolox a été utilisé comme standard à différentes concentrations. Le pourcentage de l'activité scavenging du radical ABTS⁺ des différents extraits est calculé comme suit :

$$\text{Pourcentage d'inhibition du radical ABTS}^+ = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A₀ : Absorbance du contrôle (contenant seulement l'ABTS⁺).

A₁ : Absorbance de la solution de l'ABTS⁺ contenant l'extrait

III.3.2. Pouvoir réducteur

> Principe

Le principe repose sur le fait que la présence d'un composé réducteur dans les échantillons entraîne la réduction du Fe⁺³ présent dans le ferricyanure de potassium en forme ferreuse Fe⁺², celle-ci se traduit par le virage de la couleur jaune du ferricyanure de potassium vers la couleur bleue verte dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur (**Moreira et al., 2008**).

> Mode opératoire

Le protocole utilisé pour mesure le pouvoir réducteur est celui décrit par **Oyaizu (1986)**.

1ml de différentes Concentrations de l'extrait sont mélangées avec 1ml de la solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 1 ml de ferricyanure de potassium [K₃Fe(CN)₆] (1%). Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20 min. Après, 1 ml de TCA (10%) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min.

A la fin, 1.5 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 1.5 ml de l'eau distillée et 150 µl de FeCl₃ (0.1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm.

L'augmentation de l'absorbance à 700 nm indique l'augmentation de la réduction de fer. Le BHA est utilisé comme contrôle positif.

Le pouvoir réducteur de chaque extrait a été exprimé en suivant la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de réduction (\%)} = [(A_E - A_T) / A_L] \times 100$$

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

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

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

IV. Etude *in vitro* de l'activité anti-thermo dénaturante des extraits d'écorce du rhamnus

La dénaturation des protéines est un processus dans lequel elles perdent leur structure tertiaire et secondaire qui due à plusieurs facteurs endogène et exogènes. La chaleur parmi les facteurs exogènes qui provoque la dénaturation des protéines et la perte de leur fonction biologique comme conséquence peut induire une inflammation (**Adarsh et al., 2011**).

L'étude de l'activité anti-inflammatoire d'extrait de l'écorce de rhamnus *in vitro* à été faite par l'évaluation de l'effet anti dénaturation thermique sur l'ovalbumine qui une protéine de blanc d'œuf.

IV. 1. Extraction d'ovalbumine

L'extraction d'ovalbumine a été réalisée suivant le protocole de **Glwadys et Lionel, (2001)** avec quelques modifications.

Un œuf frais a été cassé soigneusement et le jaune est séparé du blanc en passant le jaune entre les deux moitiés de la coquille. On a mis le blanc dans un béccher qui se trouve dans un bain de glasses, puis on additionne 50ml du tampon phosphate (0.1M, PH=6.6) et on homogénéise sous agitation magnétique pendant 5mn. L'homogénat obtenu d'aspect trouble a été ensuite centrifugé à 3000 rpm (4°C) pendant 5 mn puis filtré à l'aide d'une bande à gaz pour éliminer les globulines précipitées. Le filtrat obtenu, enrichi en ovalbumine, a été ensuite fractionné en des aliquotes de 3ml et congelé à -20°C.

IV. 2 .Mesure de la cinétique de la dénaturation d'ovalbumine

Pour évaluer l'activité anti-thermo dénaturante d'extrait d'écorce de Rhamnus sur l'ovalbumine, on a réalisé des tests pour déterminer la température, les concentrations d'ovalbumine et d'éthanol à utiliser dans l'expérience.

Dans un volume total de 5ml, en mélange 250µl d'extrait (1/100,1/75, 1/50 et 1/25) avec du tampon phosphate (à pH 6,6), en présence de différentes concentrations d'éthanol (0 à 10%) et on suive la cinétique de dénaturation pendent 30 minutes à différentes températures (60,70°C et à température ambiante).

IV.3. Evaluation de l'Effet anti-thermo dénaturant d'extrait de l'écorce de rhamnus Pour évaluer l'activité anti- inflammatoire d'extrait de l'écorce de Rhamnus on a réalisé un test sur effet anti-thermo dénaturant d'ovalbumine suivant le protocole de **Mondal et al., (2015)** avec quelque modification.

➤ **Mode opératoire**

400µl d'extrait de Rhamnus solubilisé dans l'éthanol à différentes concentration ont été mélangé avec 7,6 ml de solution d'ovalbumine dilué à 1/20, après l'homogénéisation à l'aide d'un vortex les solutions ont été incubées à 70°C pendant 30mn. Les lectures des DO ont été faites sur spectrophotomètre à 660nm chaque 10nm d'incubation après être refroidir pendant 3mn.

Dans les mêmes conditions opératoires on a réalisé un essai avec le diclofinac de sodium comme référence au quel on a comparé l'efficacité de notre extrait.

➤ **Expression des résultats**

Le taux d'inhibition de la dénaturation thermique de l'ovalbumine à 70°C est exprimé par l'expression suivante :

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = [(\Delta AbsC - \Delta AbsE) / \Delta AbsC] \times 100$$

AbsC: Variation d'absorbance à 660nm de l'ovalbumine en absence d'extrait de *Rhamnus* (contrôle) pendant 30 minutes.

AbsE: Variation d'absorbance à 660nm de l'ovalbumine en présence de l'extrait de *Rhamnus* (essai) pendant 30 minutes.

I. Rendement d'extraction

L'extraction par macération au méthanol à partir de l'écorce de *Rhamnus* a permis d'obtenir un rendement de 5% d'extrait sec par rapport à la matière sèche initiale. Ce rendement est proche celui obtenu par l'équipe **Boussahel et al., (2015)** qui ont obtenu un rendement de 6,8% pour l'écorce de *Rhamnus alaternus*, mais assez faible par rapport au rendement d'extraction obtenu par **Kremer et al.,(2012)** de 15.6% pour l'extraction à partir de l'écorce *R. frangula. L.* (Figure 5). Les différences dans les rendements d'extraction sont influencées par divers facteurs tels la méthode, nature et la concentration du solvant d'extraction ainsi que par la technique utilisée pour l'évaporation du solvant. Comme elles peuvent être dues à l'espèce étudiée, la région et la période de sa récolte.

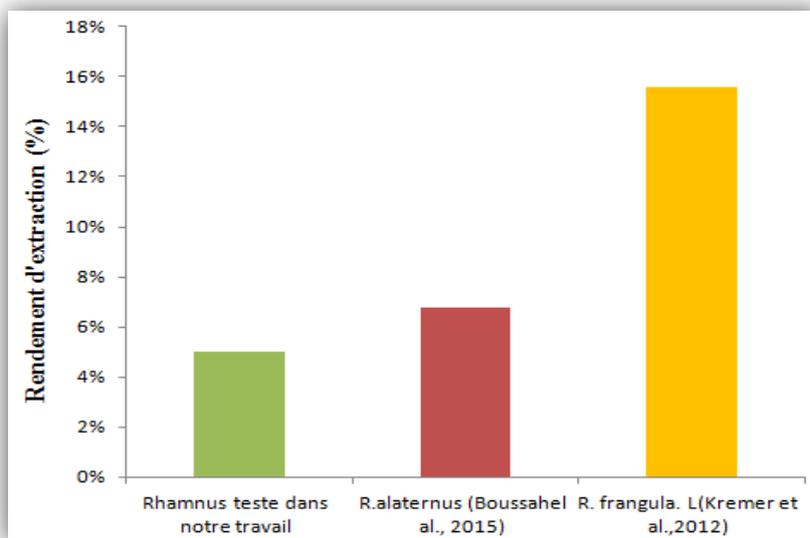


Figure 5 : Histogramme représentant les Rendements d'extraction à partir d'écorce de différentes espèces de *Rhamnus* issus de la bibliographie (*R.alaternus*, *R.frangula. L.*) (Boussahel et al., 2015) et (Kremer et al.,2012) respectivement en comparaison avec celui obtenu dans notre travail (*Rhamnus*)

II. Taux des composés polyphénoliques

II.1. Taux polyphénols totaux

Après addition du réactif de Folin-Ciocalteu et du carbonate de sodium, une couleur bleue a été constatée dans le milieu réactionnel témoignant de la présence de polyphénols.

En se référant à courbe d'étalonnage obtenue avec l'aide d'acide gallique comme standard (figure 6), la teneur en polyphénols totaux en milligramme équivalent d'acide par gramme d'extrait sec a été déterminée. L'extrait obtenu par macération au méthanol à partir d'écorce de rhamnus contient un taux en polyphénols totaux de $113,93 \pm 3,57$ mg EAG/g d'extrait sec.

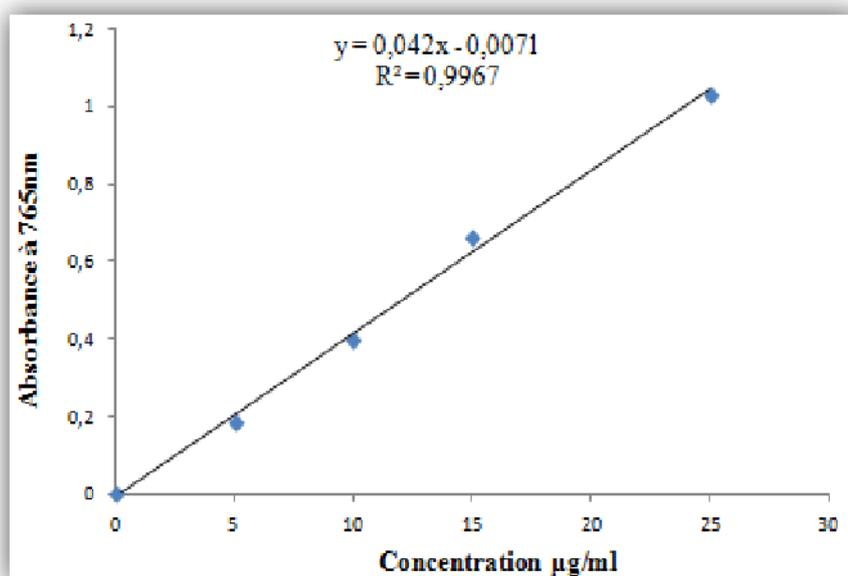


Figure 6 : Courbe d'étalonnage avec l'acide gallique comme référence pour le dosage des polyphénols totaux.

Kosalec et al., (2013), ont rapportés des teneurs en polyphénols totaux sensiblement proches de notre résultat. En effet, Kosalec et son équipe ont trouvé des taux en polyphénols totaux dans les extraits de l'écorce de *R. fallax* et de *R. pumila* de 139 ± 7.88 mg EAG/g d'extrait sec et 123 ± 6.44 mg EAG/g d'extrait sec respectivement. Mais pour les espèces *R. intermedia* et *R. alaternus*, ils ont enregistré les taux de polyphénols totaux inférieurs (29 ± 1.19 et 43.8 ± 1.56 mg EAG/g d'extrait sec respectivement). **Kremer al.,(2012)** ont aussi enregistré des taux de polyphénol plus bas pour l'espèce *R. frangula .L ou R. frangula P.* dont les teneurs sont respectivement de $62,3 \pm 1,4$ et $30,8 \pm 1,0$ mg EAG/g d'extrait sec).

II.2. Teneur en flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé suivant la méthode au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$). Après addition de ce dernier, une coloration jaune d'intensité qui varie positivement en fonction de la concentration d'extrait sec témoigne de la présence des flavonoïdes dans l'extrait de rhamnus dosé.

En se rapportant à la courbe d'étalonnage réalisée avec la quercétine, un flavonoïde standard (figure 7), la teneur en flavonoïdes de l'extrait méthanolique d'écorce de *Rhamnus* est de $43,34 \pm 0,42$ mg EQ/g d'extrait sec

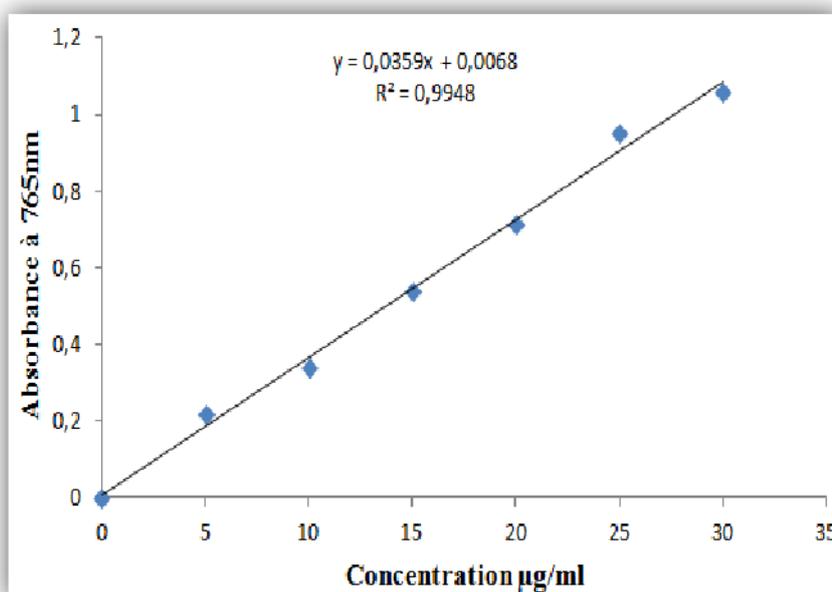


Figure 7 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes en utilisant la quercétine.

Les résultats d'analyses quantitatives de flavonoïdes de **Kremer *al.*, (2012)** sur l'extrait méthanolique sont de l'ordre de ($17,4 \pm 0,7$ et $30,7 \pm 0,8$ mg EQ/g d'extrait sec) d'écorce de *R.frangula.L* et *R. Frangula .P* respectivement ; ces teneurs sont largement inférieure par rapport à notre résultats ($43,34 \pm 0,42$ mg EQ/g d'extrait sec). Dans une autre étude réalisée par **Boussahel et *al.*, (2015)** ; sur l'extrait d'écorce de *R. alaternus* une teneur en flavonoïdes d'ordre de ($51,17 \pm 0,409$ mg EQ/g d'extrait sec) est étroitement supérieure a celle de notre résultat.

Les différences observées entre nos résultats (polyphénols totaux et flavonoïdes) et ceux rapportées par la bibliographie peuvent être dues aux points suivants : méthode utilisée pour l'extraction et le dosage, la différence des conditions expérimentales, l'emplacement géographique de la plante ainsi que la saison de récolte et le type d'espèce étudiée.

D'autre part, en réalisant le rapport entre les teneurs en flavonoïdes et en polyphénols totaux (figure 8), on en déduit que les flavonoïdes représentent environ 38,5% des polyphénols totaux. Ce qui signifie que l'écorce de *Rhamnus* contient en plus des flavonoïdes d'autres polyphénols tels que les acides phénoliques, les tannins ou autres (environ 65% des polyphénols totaux).

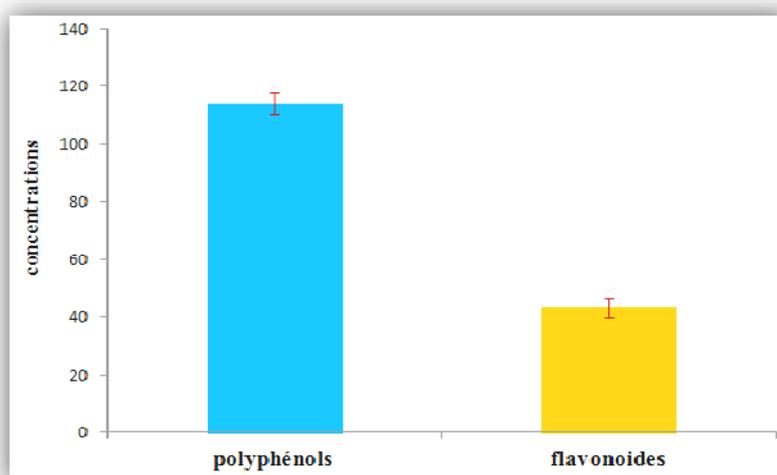


Figure 8: Histogrammes représentant les teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes de l'extrait méthanolique d'écorce de *Rhamnus*.

III. Activité antioxydant de l'extrait méthanolique

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique d'écorce de *Rhamnus* a été effectuée par deux tests ; le test ABTS, pour déterminer le pouvoir antiradicalaire en mesurant leur capacité à neutraliser ou à piéger les radical libre ABTS et le test de pouvoir réducteur qui est un test simple, rapide et reproductible.

III.1. Activité scavengers du radical ABTS

Pour des concentrations d'extraits d'écorces de *Rhamnus* entre à 0,1 et 1mg/ml, la capacité de l'extrait à piéger le radical ABTS augmente avec la concentration. La courbe de variation des taux d'inhibition du radical avec la variation de concentration (figure 9) montre que la capacité de l'extraits de plante à piéger 100% du radicale ABTS est observée pour une concentration supérieure à 1mg/ml. Pour la concentration 100 µg/ml d'extrait, une activité antiradicalaire contre le radical ABTS de 22,00% est enregistrée.

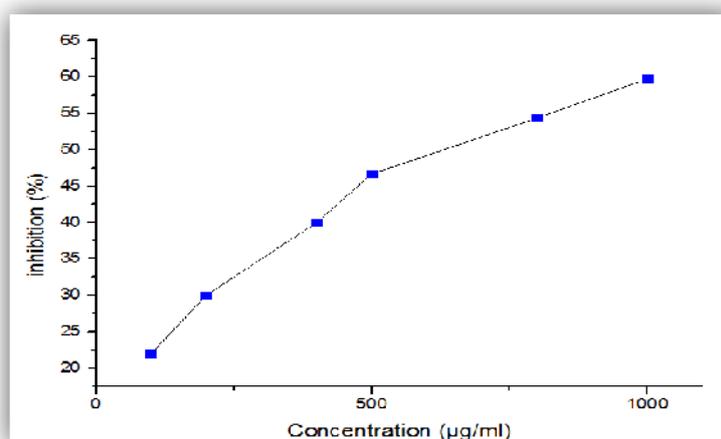


Figure 9 : Taux d'inhibition de l'activité scavenging du radical ABTS⁺ en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique du *Rhamnus*

L'efficacité anti radicalaire exercée par l'extrait de *Rhamnus* est exprimée en IC₅₀ (concentration inhibitrice à 50%). concentration d'extrait capable de neutraliser (réduit) 50% du radical libre (ABTS⁺). Plus l'IC₅₀ est faible et plus l'antioxydant est puissant. En utilisant ce paramètre, l'efficacité de l'extrait de rhamnus est de IC₅₀ = 621,96 µg/ml. Par comparaison à l'antioxydant standard de nature phénolique qu'est le trolox dont l'IC₅₀ est de 77,65 µg/ml (Figure 10), l'extrait de *Rhamnus* présente une efficacité antiradicalaire contre le radical ABTS beaucoup plus faible que le trolox avec un facteur de différence de 8.

L'étude rapportée sur l'activité antiradicalaire par **Boussahel et al., (2015)** a montré que l'extrait méthanolique d'écorce de *Rhamnus alaternus* présente une efficacité de IC₅₀ = 220,35 µg/ml est assez proche de l'efficacité de notre extrait

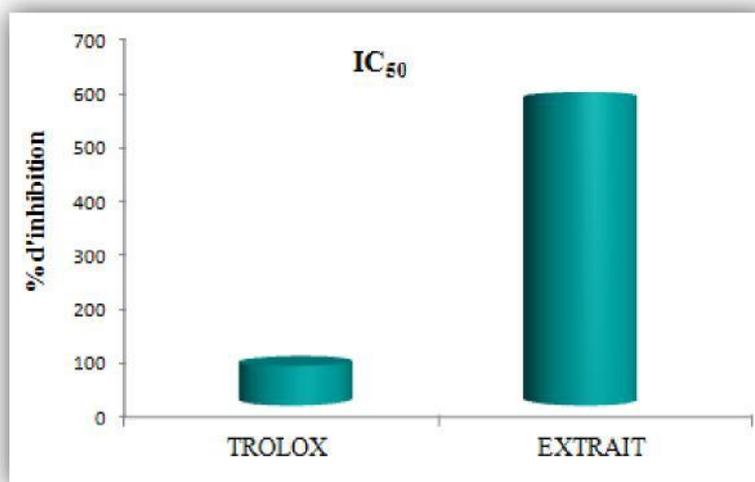


Figure 10 : Concentrations inhibitrices (IC_{50}) d'extrait d'écorce *Rhamnus* et de standard trolox.

III.2. Pouvoir réducteur

La réduction de fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux Fe^{2+} est un test rapide, reproductible, et facile à exécuter (Lim et al., 2006). Les résultats de l'évaluation du pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique d'écorce de *rhamnus* montre que ce dernier présente une activité réductrice proportionnelle à la concentration.

Les résultats de l'évolution du pouvoir réducteur d'extrait sont illustrés dans (figure 11) et celle de BHA l'antioxydant de référence, présent dans l'Annexe 4.

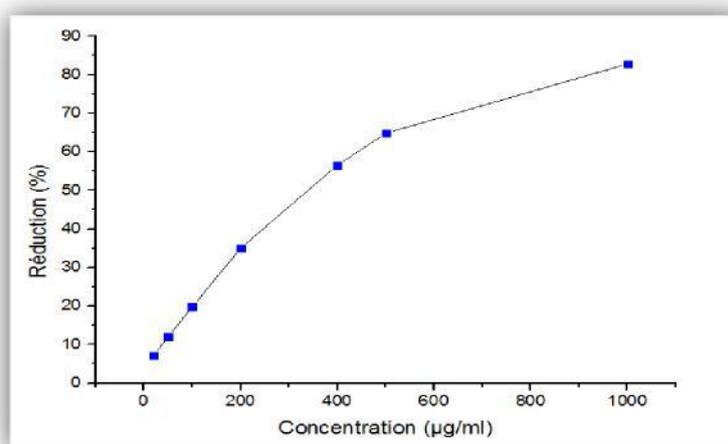


Figure 11 : Taux de réduction de fer ferrique par l'extrait en fonction de Concentration de l'extrait de l'écorce de *Rhamnus*

Les pourcentages de réduction du fer à une concentration de 100 µg/ml de l'extrait de l'écorce de *Rhamnus* et celle de standard (BHA) sont de d'ordre de 19,76% et 82,35% respectivement.

L'efficacité du pouvoir réducteur de l'extrait d'écorce de *Rhamnus* et de standard, déterminés, exprimé en IC_{50} , sont illustrés dans la figure 10. Cette concentration (IC_{50}) est calculée à partir (Annexe 5) et (Annexe 6) pour le standard (BHA). La concentration inhibitrice à 50% de notre extrait est d'ordre de 328,88 µg/ml, son efficacité est huit fois plus faible que celle de standard BHA ($IC_{50} = 38,02$ µg/ml). (figure 12)

La bibliographie regorge des travaux réalisés sur les activités des extraits de plantes à réduire le fer ferrique. **Kosalec et al., (2013)**, ont trouvé pour le *R. pumila* une valeur d' IC_{50} (979 µg/ml) avec une efficacité trois fois plus faible que celle de standard (BHA) utilisé ($IC_{50} = 281$ µg/ml) . Pour **Kremer al.,(2012)**, l'efficacité du pouvoir réducteur de l'extrait de *R. frangula L'* ($IC_{50} = 2,32$ mg /ml) est beaucoup plus faible.

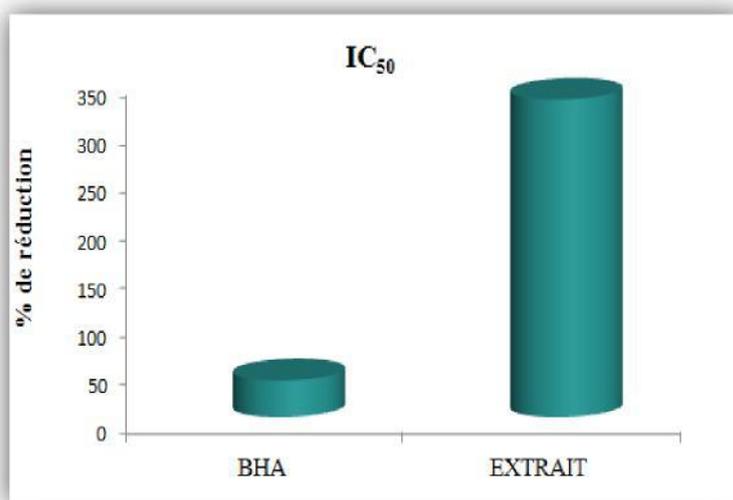


Figure 12: Pourcentages de réductions (IC_{50}) d'extrait d'écorce et de standard BHA.

IV. Effet de quelques paramètres physico-chimique sur la cinétique de dénaturation thermique de l'ovalbumine

IV.1. Effet de la concentration d'ovalbumine

Les résultats de la dénaturation thermique, exprimés en variation de densité optique à 660nm, à différentes concentrations d'ovalbumine en fonction du temps sont illustrés dans la figure 13.

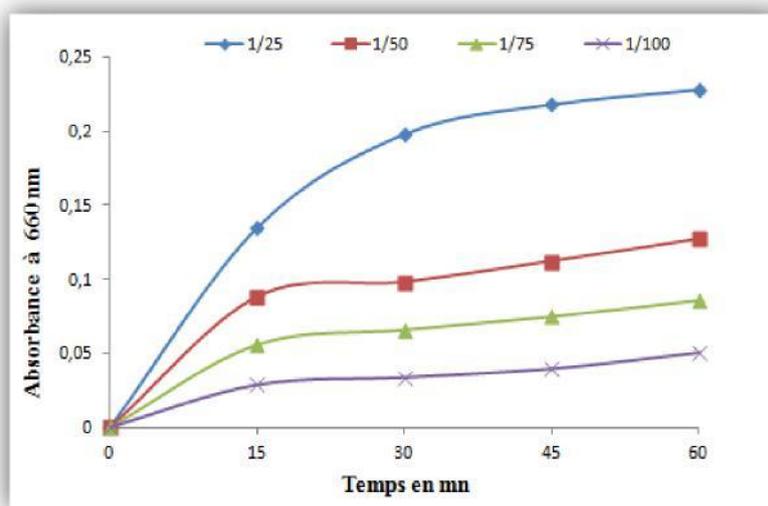


Figure 13: Variation des DO (660 nm) des différentes Concentrations d'ovalbumine incubé à 70°C en fonction du temps.

Selon les résultats obtenus, plus la concentration de l'ovalbumine est élevée plus la variation des DO est grande et plus la turbidité est élevée. Cela signifie une diminution de solubilité de la protéine qui résulte de sa dénaturation.

A la dilution 1/25 de la solution d'ovalbumine, la variation due la turbidité en fonction du temps se fait plus rapidement que pour les dilutions 1/50, 1/75, 1/100. En effet, au bout de 30 min d'incubation à 70°C, la turbidité pour une concentration d'ovalbumine correspond à la dilution 1/25 est d'environ 10fois plus grande que pour une concentration correspondante à une dilution au 1/100.

IV.2. Effet de la concentration de l'éthanol

Les résultats d'étude de l'effet de la concentration d'éthanol (0 à 10%) sur la dénaturation thermique de l'ovalbumine à dilution 1/25 sont représentés sur la figure suivante (figure 14).

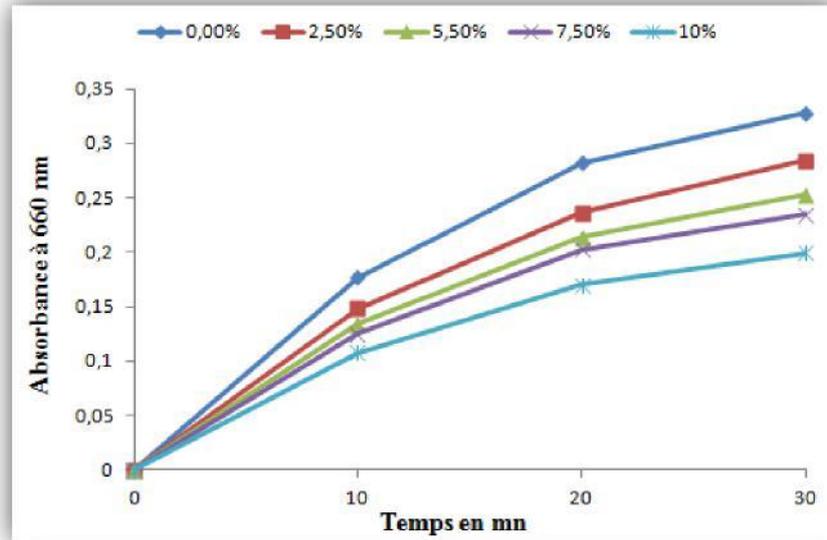


Figure 14 : Variation des DO (660 nm) d'ovalbumine en présence de différentes concentrations d'éthanol en fonction du temps.

D'après les représentations graphiques obtenues, on observe une variation des absorbances plus lente à forte concentration d'éthanol. En absence d'éthanol la vitesse moyenne de dénaturation de l'ovalbumine pour un temps d'incubation à 70°C de 30 min est de 0,011DO/min, alors qu'elle est de 0,006DO/min, 0,008DO/min, 0,0086DO/min et 0,009DO/min pour des concentrations croissantes d'éthanol de 2,5% ; 5% ; 7,5% et 10% respectivement. L'éthanol retarde donc le processus de dénaturation thermique de l'albumine. Bien qu'on sache que l'éthanol est un solvant dénaturant des protéines, nos résultats nous laissent penser qu'au cours d'une dénaturation thermique, l'éthanol pourrait jouer un rôle plutôt stabilisateur.

IV.3. Effet de température

La température est l'un des facteurs physique qui provoque la dénaturation des protéines par la rupture des liaisons électrostatiques, hydrogènes, hydrophobes, ainsi que les ponts disulfures. Comme conséquence de cette rupture on a la perte de la structure secondaire et tertiaire par repliement qui provoque le dysfonctionnement des protéines (Rahman *et al.*, 2015).

Les résultats de l'effet d'incubation d'ovalbumine diluée à 1/25 à différentes températures (60, 70 °C et à température ambiante ($20^{\circ} \pm 2$)) sont illustrés dans la figure 15

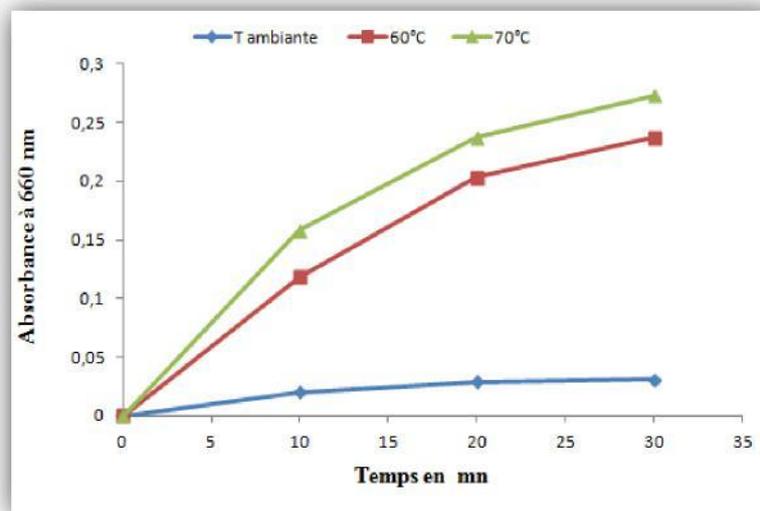


Figure 15: Cinétique de dénaturation de l'ovalbumine à une dilution au 1/25 à différentes températures

D'après les représentations graphiques obtenues, on observe que la cinétique de dénaturation est d'autant plus rapide que la température est élevée. Ainsi, à 70 °C, la vitesse moyenne de dénaturation de l'ovalbumine pendant un temps d'incubation de 30 min est de 0,095DO/min alors qu'elle n'est que de 0,001DO/min à température ambiante ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Le facteur d'accélération de la vitesse de dénaturation avoisine le 10 fois.

V- Effet inhibiteur de l'extrait d'écorce du *Rhamnus* sur la dénaturation thermique de l'ovalbumine

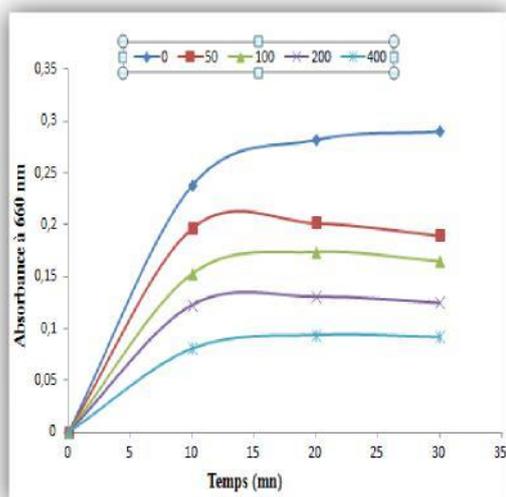
La dénaturation thermique des protéines constitue l'une des causes d'induction de la réaction inflammatoire par la production des auto-antigènes dans les maladies auto immunes, tel que les maladies arthritiques (**Rahman et al., 2015**).

Les recherches sur les plantes médicinales ont prouvées que les plantes contiennent des substances ayant une activité de stabilisation thermique des protéines. Elles pourront donc présenter un potentiel anti-inflammatoire.

Pour évaluer la propriété anti-inflammatoire de notre extrait on a réalisé in vitro un test d'inhibition de la dénaturation thermique d'ovalbumine. Les résultats obtenus ont été ensuite comparés à ceux obtenus dans les mêmes conditions pour l'anti-inflammatoire commercial le diclofénac sodium.

Les résultats obtenus illustrant les cinétiques de dénaturation de l'ovalbumine à 70°C en présence de différentes concentrations d'extrait de *Rhamnus* (figure 16 a) ou de diclofénac (figure 16b) montrent qu'aussi bien le diclofénac que l'extrait de plante inhibent la dénaturation de la protéine.

a



b

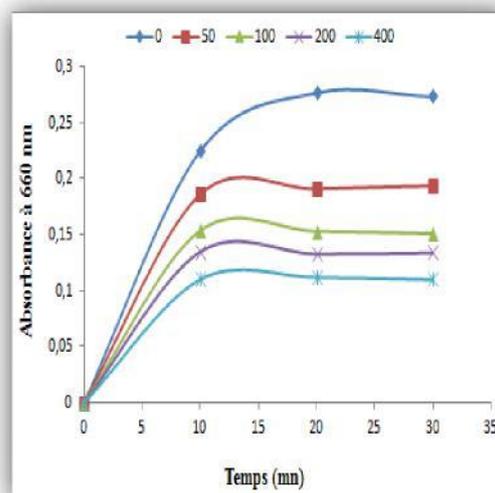


Figure 16: Absorbances à différentes concentrations d'ovalbumine en présence d'extrait d'écorce de *Rhamnus* (a) et diclofénac sodium (b) en fonction du temps mesure à X : 660nm.

Notre résultat montre que la turbidité est faible en fonction des concentrations d'extrait, pour l'absence d'extrait à t=30 mn on obtenu une absorbance à $\lambda = 660\text{nm}$ d'ordre 0.41, alors que est de 0.205, 0.185, 0.160 pour des concentrations croissantes d'extrait de 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Ce qui signifie que l'extrait de *Rhamnus* a un effet stabilisateur sur la dénaturation thermique d'ovalbumine.

Pour evaluer l'efficacité d'extrait d'écorce de *Rhamnus* on a calculé IC_{50} de l'extrait et celui de diclofinac sodium à partir des courbes de pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations (**Annexe7**) et (**Annexe8**) respectivement, d'après les résultats l' IC_{50} de l'extrait est de 188,48 $\mu\text{g/ml}$ et celui de diclofénac sodium est de 112,21 $\mu\text{g/ml}$.

L'extrait de *Rhamnus* présent une efficacité inhibitrice de même ordre de grandeur que le diclofenac de sodium. L'extrait d'écorce de *Rhamnus* présente donc de potentielles propriétés anti-inflammatoires qu'on peu attribuer aux composants actifs de cette plante les polyphenols.

Conclusion

Les plantes ont plusieurs utilisations dans différents domaines comprenant la médecine, nutrition, assaisonnement, boissons, teinture, parfums, produits cosmétiques, et autre buts industriel. Beaucoup de plantes médicinales présentent un grand nombre des métabolites secondaires avec un grand intérêt pharmacologique qui jouent un rôle important dans la prévention et le traitement de nombreuses maladies.

Ce présent travail contribue à la caractérisation et l'évolution de l'activité antioxydante et anti-dénaturante d'extrait de l'écorce de *Rhamnus*. Notre extrait qui a été réalisé par macération à froid avec méthanol a donné un rendement de 5%. Le dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu a donnée un taux de 113,93 mg EAG/g d'extrait sec. Le dosage des flavonoïdes par la méthode de réduction de chlorure d'aluminium a donné le taux suivant : 43 ,34 mg EQ/g d'extrait sec. L'extrait d'écorce de rhamnus présente une activité antioxydante par le piégeage du radical ABTS avec une efficacité IC_{50} de 621,96 μ g/ml et par un pouvoir réduire le complexe fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) avec une efficacité IC_{50} de 328,88 μ g/ml. Notre extrait methanolique montre une activité inhibitrice de dénaturation d'ovalbumine avec une efficacité IC_{50} de 188,48 μ g/ml donc extrait d'écorce de *Rhamnus* présent une activité anti-inflammatoire.

L'ensemble de ces résultats obtenus in vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances phytochimiques biologiquement actives, une étude in vivo est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités antioxydantes et anti-inflammatoires de *Rhamnus*.

Références bibliographiques

A

Azab A., Nassar A., Azab, A. N. (2016). Anti-Inflammatory Activity of Natural Products. *Molecules*. 21(10): 1321.

B

Barouki, R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. *médecine/sciences*. 22(3):266-272.

Bartosz G. (2003). Generation of Reactive Oxygen Species in Biological Systems. *Comments on Toxicology*. 9(1): 5–21

Bayer E., Buttler k.P., Finkenzeller, X .Grau J. (2005).Guide de la flore méditerranéenne. *Delachaux et Niestlé.*, Pris.

Beloued A. (2001) .Plantes médicinales d'Algérie .Edition OPU., Ben Aknoun Alger.

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

Bennick A. (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 13(2):184-196.

Botting R. M. (2000). Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3?. *Clinical Infectious Diseases*, 31(Supplement 5), S202-S210.

Boussahel S., Speciale A., Dahamna S., Amar, Y., Bonaccorsi I., Cacciola F., Cristani M. (2015). Flavonoid profile, antioxidant and cytotoxic activity of different extracts from Algerian *Rhamnus alaternus L.* bark. *Pharmacognosy magazine*.11(Suppl 1), S102.

Brosse, J. (2000). Larousse des arbres et des arbustes. Larousse.

C

Cassier P. (2004). Agression et défense des organismes. Marketing S.A, Paris.

Chermat, S., et Gharzouli, R. (2015). Ethnobotanical study of medicinal flora in the North East of Algeria-An empirical knowledge in Djebel Zdim (Setif). *J Mater Sci Eng*. 5:50-9.

Chiavaroli A., La V. D., Orlando G., Menghini L., Epifano F., Grenier D. (2008). Rhamnus alpinus leaf extract suppresses lipopolysaccharide-induced, monocyte-derived macrophage chemokine secretion. *Inflammation*. 31(5) : 313-318.

Chiolero A., Würzner G., Burnier, M. (2000). Les inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase de type 2: moins d'effets rénaux que les anti-inflammatoires non stéroïdiens classiques?. *Néphrologie*.21 (8): 425-430.

Chovatiya R.,etMedzhitov R. (2014). Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Molecular cell*. 54(2): 281-288.

Cuoco G., Mathe C., et Vieillescazes C. (2014). Liquid chromatographic analysis of flavonol compounds in green fruits of three *Rhamnus* species used in Stil de grain. *Microchemical Journal*. 115: 130-137.

D

D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., et Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-Istituto Superiore di Sanita*. 43(4): 348-361.

Dai J., et Mumper R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 15(10):7313-7352.

Derbel S., et Ghedira K (2005). Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*. 3(1):28-34.

Dinarello C. A. (2010). Anti-inflammatory agents: present and future. *Cell*. 140(6): 935-950.

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P.,Vidal N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry*. 97(4): 654-660.

Duray A., Demoulin S., Petermans J., Moutschen M., Saussez S., Jerusalem G., Delvenne, P. (2014). Vieillissement et cancer: coincidence ou relation etiologique?. *Revue medicale de Liege* . 69 (5-6) :276-81.

Duthie K. (2003). Antioxidants.*Nutrition and coexisting*. 48: 25-26.

Duyckaerts Ch., Fouret P et Hauw J.J. (2003). Anatomie pathologique. *Faculté médecine Université Pierre et Marie Curie*.

F

- Favier, A. (2003).** Le stress oxydant. *L'actualité chimique*. 108.
- Finkel, T., and Holbrook, N. J. (2000).** Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 408(6809):239-247.
- Frädrich C., Beer L. A., Gerhard R. (2016).** Reactive oxygen species as additional determinants for cytotoxicity of Clostridium difficile toxins A and B. *Toxins*, 8(1), 25.
- Fürst R., Zündorf I. (2014).** Plant-derived anti-inflammatory compounds: hopes and disappointments regarding the translation of preclinical knowledge into clinical progress. *Mediators of inflammation*, 2014.
- Fürst, R., et Zündorf, I. (2014).** Plant-derived anti-inflammatory compounds: hopes and disappointments regarding the translation of preclinical knowledge into clinical progress. *Mediators of inflammation*, 2014.

G

- Glwadys C., et Lionel D. (2001)** Purification d'une protéine de lysozyme.
- Gutteridge J. M. (1995).** Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical chemistry*. 41(12):1819-1828.

H

- Haleng J., Pincemail J., Defraigne J. O., Charlier C., & Chapelle J. P. (2007).** Le stress oxydant. *Revue Medicale de Liege*. 62(10) :628-38.
- Haslam, E. (2007).** Vegetable tannins—Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry*. 68(22):2713-2721.

I

- Iwalewa E. O., McGaw L. J., Naidoo V., Eloff J. N. (2007).** Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *African Journal of Biotechnology*. 6(25): 2868-2885.

K

- Khoddami A., Wilkes M. A., Roberts T. H. (2013).** Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*. 18(2): 2328-2375.

Kosalec I., Kremer D., Locatelli M., Epifano F., Genovese S., Carlucci G., Končić M. Z. (2013). Anthraquinone profile, antioxidant and antimicrobial activity of bark extracts of *Rhamnus alaternus*, *R. fallax*, *R. intermedia* and *R. pumila*. *Food chemistry*. 136(2) : 335-341.

Kremer D., Kosalec I., Locatelli M., Epifano F., Genovese S., Carlucci G., Končić M. Z. (2012). Anthraquinone profiles, antioxidant and antimicrobial properties of *Frangula rupestris* (Scop.) Schur and *Frangula alnus* Mill. bark. *Food Chemistry*.131(4):1174-1180.

Kuby J., Kindt T. J., Richard A., Goldsby Barbara A., Osborne. (2008). Immunologie: le cours de Janis Kuby. Dunod.

L

Loisa, Pekka(2008) . Anti-inflammatory response in severe sepsis and septic shock. Kuopio University Publications D. Medical Sciences.

Longo L., Vasapollo G., Rescio, L. (2005). Identification of anthocyanins in *Rhamnus alaternus* L. berries. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53(5): 1723-1727.

M

Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 454(6): 428-435.

Mondal R. D., Banerjee A., Bala A., Sengupta A. (2015). Avicennia alba: The New phytochemical weapon to fight against acute inflammation. *International Journal of Pharmacology*. 2(5) :6-12.

Moreira, L., Dias L., Pereira, J A. et estevinho, L. (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and chemical toxicology*. 46(11): 3482-3485.

Muanda F., (2010). Identification de polyphéols , evaluation de leur activite antioxydante et

N

Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R., Krishna D. R. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology*. 33(1): 2-16.

O

Olugbami J. O., Gbadegesin M. A., Odunola O. A. (2015). In vitro free radical scavenging and antioxidant properties of ethanol extract of *Terminalia glaucescens*. *Pharmacognosy research*.7(1), 49.

Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reaction. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*. 44(6):307-315.

Q

Quettier-Deleu C., Gressier B., Vasseur J., Dine T., Brunet C., Luyckx M., Trotin F. (2000). Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of ethnopharmacology*. 72(1): 35-42.

R

Rahman H., Eswaraiah M. C., Dutta A. M. (2015). In-vitro Anti-inflammatory and Anti-arthritic Activity of *Oryza sativa* Var. Joha Rice (An Aromatic Indigenous Rice of Assam). *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci*. 15(1) : 115-121.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*. 26(9): 1231-1237.

Ribereau-Gayon, P. (1968). Notions generales sur les composés phenoliques, methodes generales d'etudes des composés phenoliques. Les composés phénoliques des végétaux.

Rolland, Y. (2004). Antioxydants naturels végétaux. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*. 11(6):419-424.

Ryan, I. (2013) .Polyphenol bioaccessibility and sugar reducing capacity of black, green, and white teas. *International journal of food science*, 2013

S

Sebastien F. (2006) .Activités biologiques de composés de la famille des flavonoides : Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. *Journal*. 24 :318-324.

Shahin S. A., Kasoju N., Luthra A., Singh A., Sharanabasava H., Sahu A., Bora U. (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*. 41(1):1-15.

Shebis Y., Iluz D., Kinel-Tahan Y., Dubinsky Z., Yehoshua Y. (2013). Natural antioxidants: function and sources. *Food and Nutrition Sciences*. 4(6): 643-649.

Stocker P., Yousfi M., Djerridane O., Perrier J., Amziani R., El Boustani S., Moulin A. (2004). Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Biochimie*.86 (12):919-925.

V

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T.D.c., Mazur M., Telser J d. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 39(1): 44–84

Verma M., Adarsh K. P., Ajay K. D., Anugrag K. B. (2011). Anti Denaturation and Antioxidant Activities of Annona cherimola In vitro. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2(2).

W

Winkel-Shirley B.(2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*. 5(3):218–223.

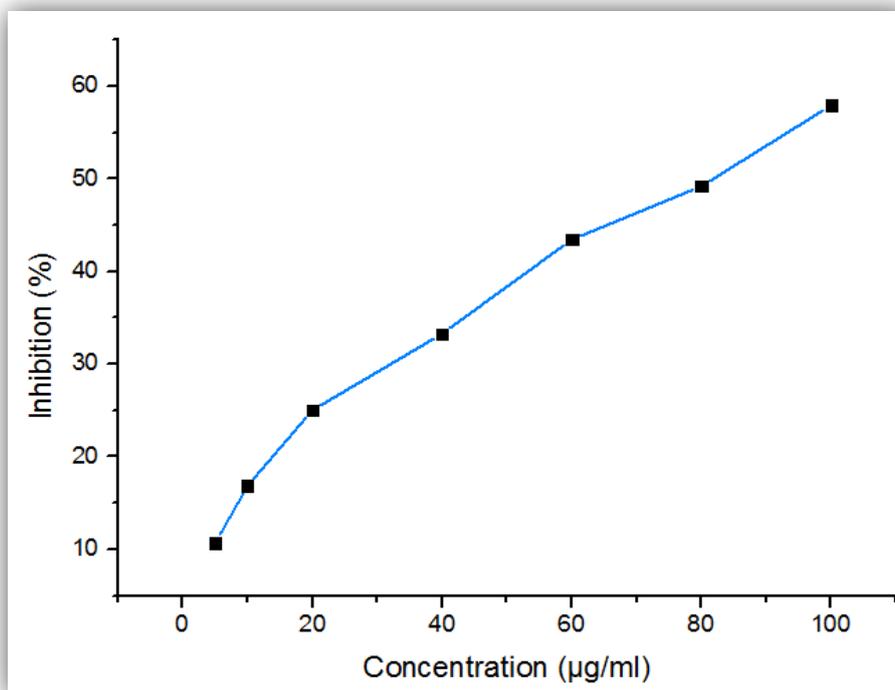
Wollgast J., et Anklam E. (2000). Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*. 33(6): 423-447.

Y

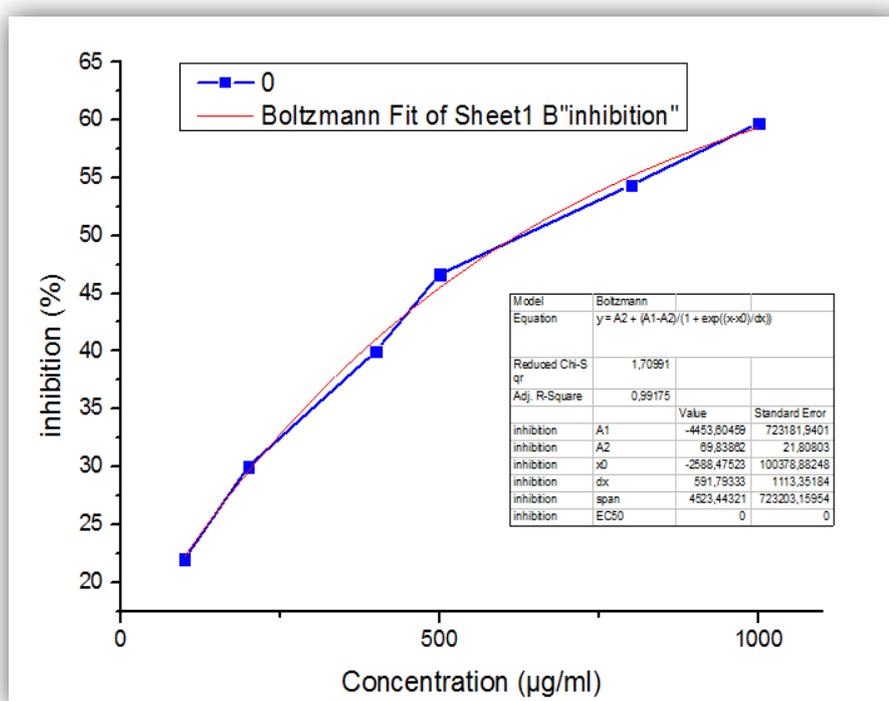
Yucel-Lindberg T., et Båge, T. (2013). Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert reviews in molecular medicine*.15, e7.

Annexes

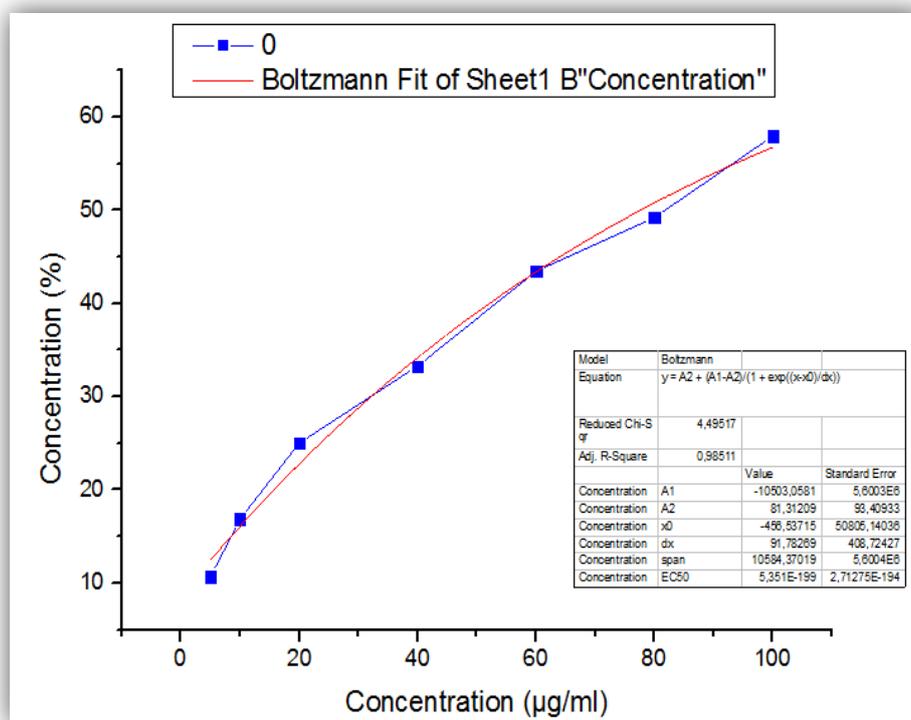
Annexe 1 : Taux d'inhibition de l'activité scavenging du radicale ABTS⁺ de Trolox.



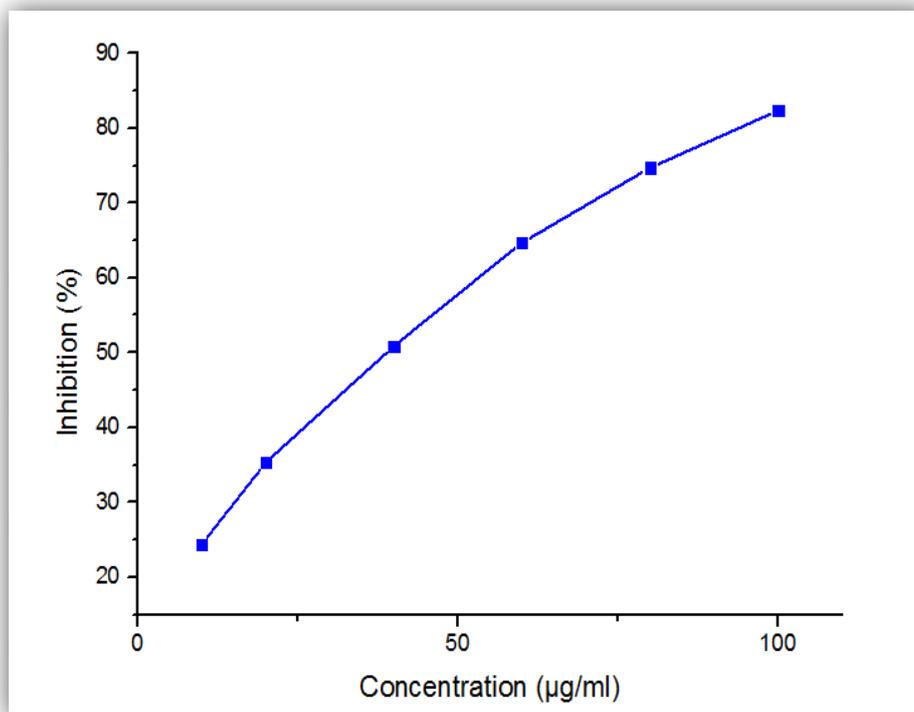
Annexe 2 : Courbe pour le calcul de IC50 de l'extrait d'écorce de Rhamnus dans l'activité scavenging d'ABTS⁺ (origine 9)



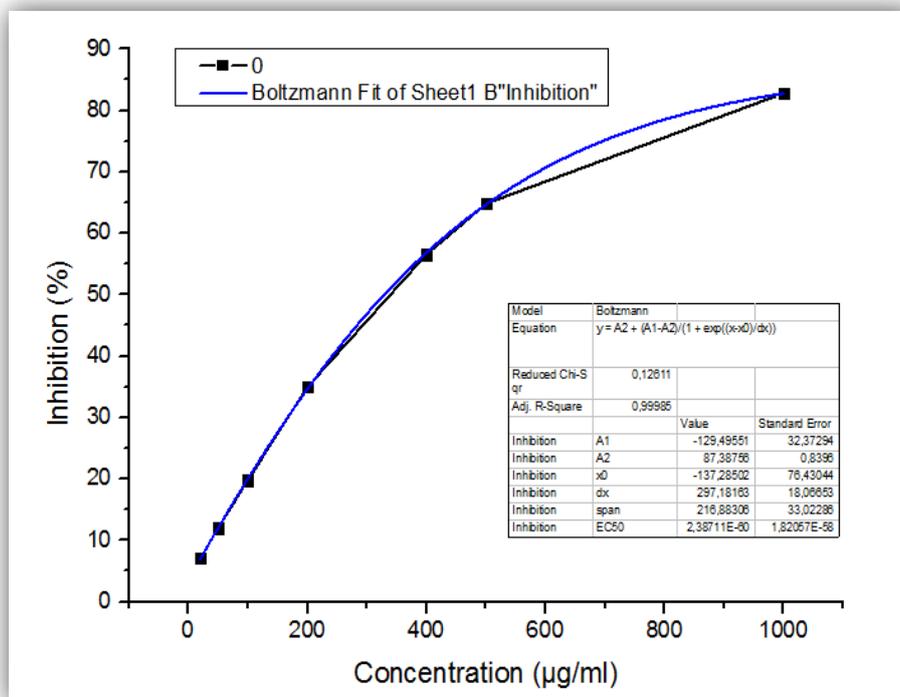
Annexe 3 : Courbe pour le calcul de IC₅₀ de Trolox dans l'activité scavenging d'ABTS+ (origine 9)



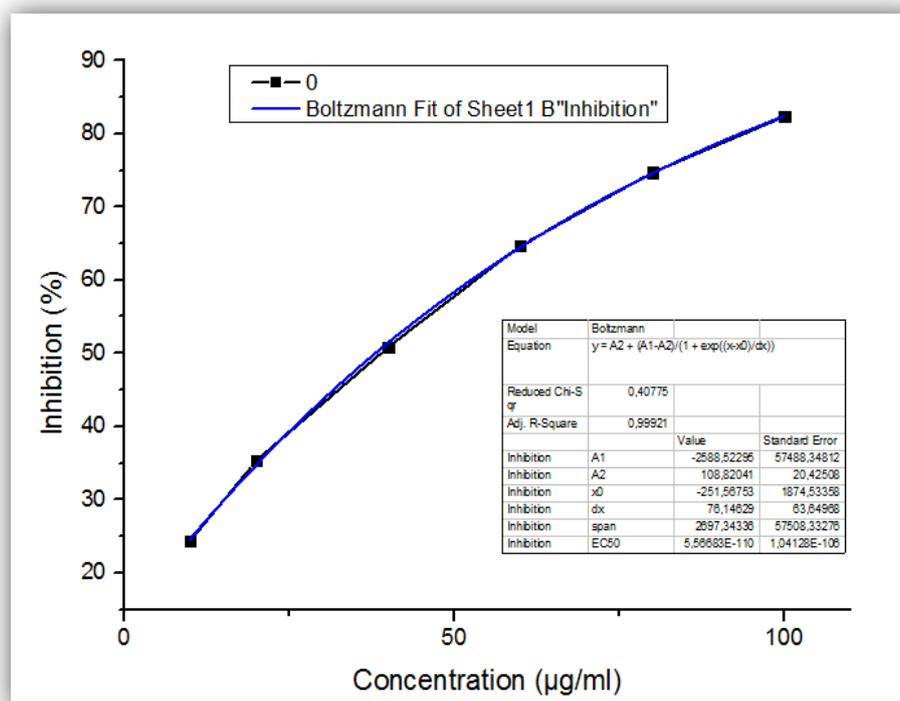
Annexe 4 : Taux de réduction du pouvoir réducteur fer du standard BHA



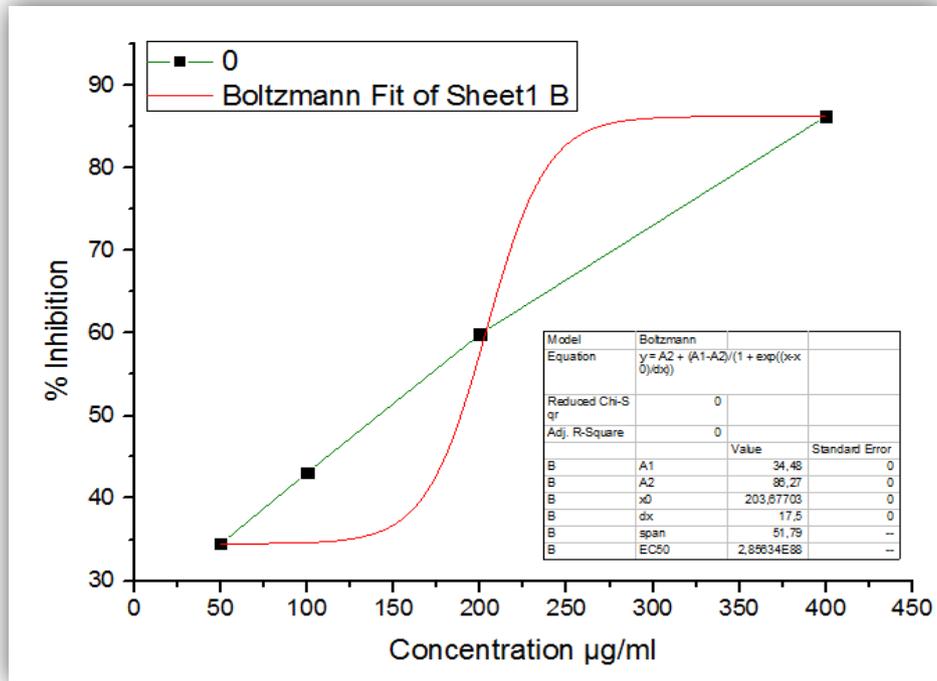
Annexe 5 : Courbe pour le calcul de IC₅₀ de l'extrait d'écorce de Rhamnus dans le pouvoir réducteur fer (origine 9).



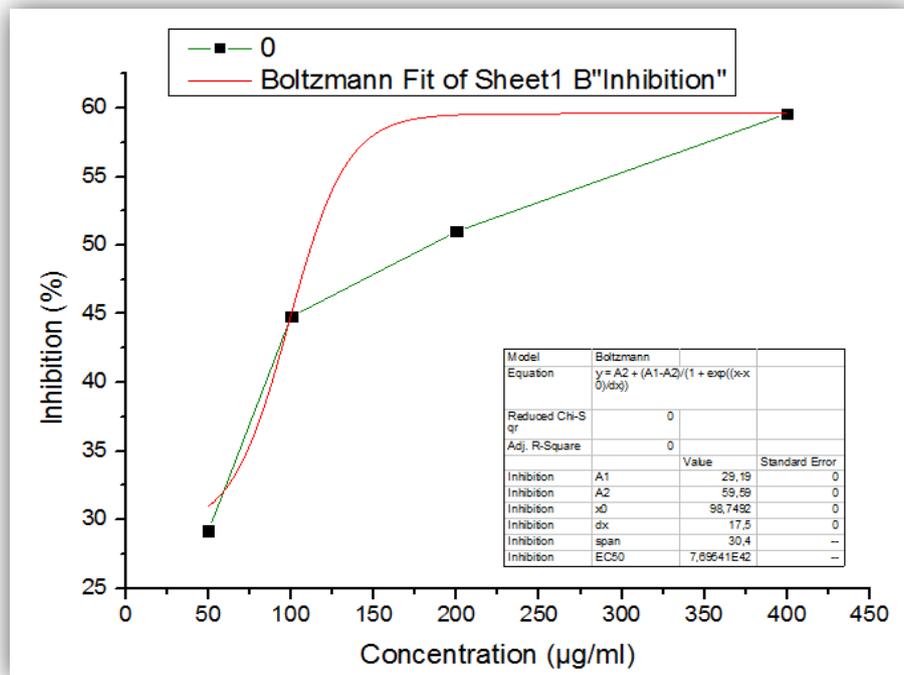
Annexe 6 : Courbe pour le calcul de IC₅₀ de BHA dans le pouvoir réducteur fer (origine 9).



Annexe 7 : Courbe pour le calcul de IC₅₀ de effet d'extrait méthanolique d'écorce de Rhamnus sur la dénaturation de l'ovalbumine. (origine 9)



Annexe 8 : Courbe pour le calcul de IC₅₀ de effet de diclofinac sur la dénaturation de l'ovalbumine. (origine 9)



Résumé

Ce travail a pour objectif la valorisation thérapeutique de l'écorce de *Rhamnus*. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait méthanolique de l'écorce de *Rhamnus* sont riche en composés phénoliques principalement de la classe des flavonoïdes. Les tests d'activité antioxydante ont démontré que l'extrait de *Rhamnus* présente une activité à piéger le radical ABTS et un pouvoir à réduire le complexe ferrique avec des efficacités avec des IC₅₀ respectives de 621,96µg/ml et 328,88 µg/ml. D'autre part, l'extrait de *Rhamnus* a présenté une bonne activité inhibitrice de la dénaturation thermique de l'ovalbumine du blanc d'œuf. L'extrait méthanolique de l'écorce de *Rhamnus* présente donc un potentiel antioxydant et anti-inflammatoire.

Mots clés : *Rhamnus*, composés phénoliques, activité antioxydante, activité anti-inflammatoire, anti-dénaturation.

Abstract

This work aims at the therapeutic valorization of the bark of *Rhamnus*. The results obtained showed that the extract methanolic of the bark of rhamnus are rich in phenolic compounds mainly of the class of the flavonoïdes. The tests of antioxydant activity showed that the extract of rhamnus presents an activity to trap the radical the ABTS and capacity to reduce the ferric complex with effectiveness with respective IC₅₀ of 621,96µg/ml and 328,88 µg/ml. In addition, the extract of rhamnus presented a good inhibiting activity of the thermal denaturation of the ovalbumin of egg white. The extract methanolic of the bark of rhamnus thus presents an antioxydant potential and anti-inflammatory drug.

Kay words: Rhamnus, phenolic compounds, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, anti-denaturation

ملخص

هذا الإنجاز من أجل تقييم الخاصية العلاجية للحاء *Rhamnus*. النتائج المتحصل عليها تبين بأن لحاء *Rhamnus* غني بمركبات فينولية خاصة عائلة فلافونيل. الإختبرات التي أنجزت لنشاط ضد الأكسدة بينت أن لحاء *Rhamnus* له خاصية تثبيط جزئي ABTS و أيضا له خاصية إرجاع المركب الحديدي بطريقة فعالة مع IC₅₀ مقدرة بالترتيب 621,96 ميكروغ/ ملل و 328,88 ميكروغ/ ملل. من جهة أخرى، مستخلص *Rhamnus* يتميز بخاصية تثبيط فعالة اتجاه التخريب بالحرارة لأوفالومين بياض البيض. إذن المستخلص الميثانولي للحاء *Rhamnus* يحتوي على خاصيتي ضد الأكسدة و ضد الإلتهاب.

الكلمات المفتاحية: *Rhamnus* ، المركبات الفنولية، نشاط ضد الأكسدة، ضد الالتهاب، نشاط ضد الأكسدة، ضد التخريب.