

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique
Spécialité Biochimie fondamentale



Réf :.....

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

MASTER

Thème

**Screening phytochimique et étude de l'effet
antioxydant des extraits phénoliques de la
plante *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae)**

Présenté par :

HAMMOUCHE Karima & TOUATI Assia

Soutenu le : **20 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

Mme BERBOUCHA M

Mme SEBAIHI S

Mme ARKOUBE L

MAA

MAA

MAA

Présidente

Encadreur

Examinatrice

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciement

Avant tout, nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir donné la force, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Tout d'abord, nous remercierons M^{me} SEBAIHI S pour avoir accepté de nous encadrer et de nos diriger

Nos vifs remerciements vont également aux membres de jury : M^{me} ARKOUB L et M^{me} BARBOUCHA M pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

*Nous exprimons nos profondes reconnaissances à monsieur ABBASI pour son aide à confirmer le nom de la plante *R.alaternus*.*

Un grand merci pour M^{er} BELKASEM pour sa gentillesse, son aide durant la réalisation de ce travail et d'avoir partagé avec nous ces connaissances.

Nous remercions également M^{elle} CHERIFI Meriem pour son aide et ses conseils, ainsi que le personnel technique les deux Naima du laboratoire de BPC et génétique : de mettre à notre disposition le matériel nécessaire et leurs aides précieuses dans nos manipulations.

Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à tous nos proches et amis, qui nous ont toujours encouragées au cours de la réalisation de ce mémoire

Dédicaces

C'est avec l'aide et grâce du dieu qu'on a achevé ce modeste travail que je dédie :

A mes Chers parents Hocine et zoulifha qui ne cessent de m'encourager et de prier pour moi, que dieu vous garde longtemps près de nous.

A mes sœurs (Sabrina et Imaine à) et mes frères (Mohend et nassim), je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A toutes mes amies :

KAHINA, MADHA

A tous ceux que j'aime et que j'estime,

A l'ensemble des personnes qui m'ont aidé durant la réalisation de ce travail et qui m'ont soutenu moralement

KARIMA

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail et ma profonde gratitude

*Aux êtres les plus chères aux monde « mes parent » Bachir et Ndjima,
Pour l'éducation qu'ils m'ont prodiguée et pour leur soutiens, leurs confiances
ainsi que leurs prière tout au long de mes études.*

*Sans eux je ne serais jamais arrivé à ce stade de ma vie, que dieu vous accorde
santé, long vie et vous garde à mes coté.*

*A mes frères Lyes et Kamel, à ma sœur Bahia, pour leurs soutien moral et
financier.*

A mon cher ami Rahim

*Pour ces encouragements permanents, et son soutien moral ainsi que sa
disponibilité.*

A mes adorables amies :

Karima, Nacira, Sabrina, Loubna, nachida, chana.

A mes chères cousines

Narimaine, Tiziri, Amel, Lamia, Nadjma, Saliha

Mes petits cousins : Hamane, Aksil, Ferial

Avec les quelles j'ai partagé des moments de joie et de bonheur

A ceux que ma plume a oubliés.

Assia

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Chapitre I : Synthèse bibliographique

| | |
|---|----|
| Introduction..... | 1 |
| I.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)..... | 2 |
| I.1.1. Origine des espèces réactives de l'oxygène (ERO)..... | 3 |
| I.1.2. Principales cibles des espèces réactives de l'oxygène..... | 4 |
| I.2. Stress oxydatif..... | 5 |
| I.2.1. Les pathologies liées au stress oxydant..... | 6 |
| I.2.2. Les antioxydants..... | 7 |
| I.2.3. Mécanisme d'action des antioxydants..... | 9 |
| I.3. Description botanique de la plante..... | 9 |
| I.3.1. Habitat et description..... | 9 |
| I.3.2. Classification botanique..... | 10 |
| I.3.3. Nomenclature..... | 10 |
| I.3.4. Usage traditionnel..... | 11 |
| I.3.5. Composition chimique..... | 11 |

Chapitre II : Matériels et méthodes

| | |
|---|----|
| II .1. Matériels..... | 12 |
| II.2. Méthodes..... | 13 |
| II .2.1. Extraction..... | 13 |
| II.2.2. Etude phytochimique des extraits de <i>Rhamnus alaternus</i> L..... | 15 |
| II.2.3. Evaluation des taux des composés phénoliques..... | 16 |
| II.2.3.1. Dosage des polyphénols totaux..... | 16 |

| | |
|---|----|
| II.2.3.2. Dosage des flavonoïdes..... | 17 |
| II.2.4. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits..... | 17 |
| II.2.4.1 Teste du pouvoir réducteur..... | 17 |
| II.2.4.2. Activité anti- DPPH..... | 18 |
| II.2.3.3. Activité anti-ABTS..... | 19 |
| II.2.3.4. Activité chélatrice de fer..... | 19 |

Chapitre III : Résultats et discussions

| | |
|---|----|
| I. Taux d'extractions..... | 21 |
| II. Mise en évidence de quelques métabolites secondaires..... | 21 |
| III. Analyse quantitative des composés phénoliques..... | 23 |
| IV. Evaluation de l'activité antioxydante..... | 25 |
| IV.1. Mesure du Pouvoir réducteur..... | 25 |
| IV.2. L'activité scavenger du radical DPPH..... | 27 |
| IV.3. Activité scavenging du radical ABTS..... | 30 |
| VI.5. Chélation du fer ferreux..... | 32 |
| Conclusions..... | 35 |
| Références..... | 37 |

Annexes

Résumé

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 01: Les processus de formation des ERO | 4 |
| Figure 2: Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants | 5 |
| Figure 3: <i>Rhamnus alaternus</i> L | 10 |
| Figure 04: Protocol experimental | 14 |
| Figure05: pouvoir réducteur des extraits et du standard à une concentration de 100µg/ml | 25 |
| Figure06: Pouvoir réducteurs fonction de la concentration des différents solvants..... | 26 |
| Figure 07: Activité anti-DPPH des extraits et le standard à une concentration de 100µg/ml..... | 27 |
| Figure 08: Effet de la concentration des différents solvants sur l'activité antiradicalaire du DPPH..... | 28 |
| Figure 09 : Activité anti-ABTS des extraits et le standard à une concentration de 100µg/L | 30 |
| Figure 10: Activité scavenger d'ABTS en fonction de la concentration des différents solvants..... | 31 |
| Figure 12: Activité anti-radicalaire des extraits et le standard à une concentration de 100µg/ml..... | 33 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau I : Les principaux ERO avec leurs caractéristiques..... | 2 |
| Tableau II : Les noms vernaculaires de <i>Rhamnus alaternus</i> L..... | 10 |
| Tableau III : Matériels et réactifs utilisée obtenus chez SIGMA-ALDRICH..... | 12 |
| Tableau IV : Caractérisation des différents extraits (masse et rendement) | 21 |
| Tableau V : Résultats des tests phytochimiques | 23 |
| Tableau VI : Détection chimique de quelques composés phénoliques | 22 |
| Tableau VII : Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes des deux extraits AQ et MOH des feuilles de <i>R.alaternus</i> | 25 |
| Tableau VIII : IC50 de différents échantillons contre le radical DPPH et ABTS | 29 |

Liste des abréviations

ABTS: 2, 2'- azino bis(3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique

ADN: Acide Désoxyribonucléique

AG: Acide Gallique

AlCl₃: Trichlorure d'aluminium

ANOVA: Analysis of Variance

Aq : Aqueux

CAT: Catalase

DPPH: Radical 2.2 Diphényle-1-Picrylhydrazyl

Ext : Extrait

EDTA: Ethylène Diamine Tétra Acétique

ERO: Espèces Réactives de l'Oxygène

EAG : Equivalent d'Acide Gallique

EQ : Equivalent de Quercétine

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène ou Oxygénées

ES : Extrait Sec

FeCl₃ : Chlorure de Fer

FeCl₂: Dichlorure de Fer

Fe³⁺ : Ions Ferriques

Fe²⁺ : Ions Ferreux

GPX : Glutathione peroxidase

GSH : Glutathion réduit

H₂O: Eau distillée

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

IC50: Concentration Inhibitrice à 50 %

LDL: Low Density Lipoprotein

MeOH: Méthanolique

NADPH : Nicotinamide Adinin Dinucléotide Phosphate

NO: Monoxyde d'Azote

¹O² : Anion singulier

O^{2·-}: Anion superoxide

OH·: Le radical Hydroxyle

O₂ : Oxygène

O₂⁻ : Anion Superoxyde

RL : Radicaux Libres

RO· : Radical alkoxyde

RO₂·: Radical Peroxyde

ROO·: Radical Peroxyle

ROOH : Hydro peroxyde organique

SO : Stresse Oxydatif

SOD : Super Oxyde Dismutase

SNV : Science de la Nature et de la Vie

OH : Groupement Hydroxyle

CHAPITRE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

L'utilisation des plantes médicinales, pour guérir ou prévenir certaines maladies, est une pratique rencontrée dans tous les pays du monde. Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales (Elqaj *et al.*, 2007).

En Algérie, on a longtemps eu recours à la médecine traditionnelle grâce à la biogéographie qui offre une très grande diversité écologique et floristique, estimé à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques (Yaniv *et al.*, 1998).

Le monde scientifique est envahi par un nouveau concept, celui du stress oxydant, une situation où la cellule ne contrôle plus la quantité de radicaux libres qu'elle produit, entraînant ainsi à divers maladies telles les cancers, l'athérosclérose... (Pincemail *et al.*, 2002).

La découverte de nouveaux antioxydants avec une meilleure capacité antioxydante et une moindre toxicité s'avère indispensable pour lutter contre les phénomènes d'oxydation.

A cet effet, nous nous sommes intéressées à l'espèce de *Rhamnus alaternus* L, une des plantes les plus utilisées dans le bassin méditerranéen pour ses bienfaits (Ait Youssef, 2006). Cette plante est riche en différents composés phénoliques, tels que les flavonoïdes qui sont responsables de plusieurs effets pharmacologiques et leur capacité antioxydante élevée leur permet de contribuer à la diminution du stress oxydatif (Koyama *et al.*, 1999). Une grande partie des recherches actuelles porte sur l'étude des molécules antioxydantes, et sur leurs effets thérapeutiques.

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail, dont le but principal est d'étudier l'activité anti oxydante de la plante *Rhamnus alaternus*. Pour cela, notre travail sera développé selon le plan suivant:

- La première partie est une synthèse des données bibliographiques sur le stress oxydatif, l'activité antioxydante et la monographie de *Rhamnus alaternus*.
- La deuxième partie présente le matériel et les méthodes utilisés pour doser les composés phénoliques après leur extraction et évaluer l'activité antioxydante.
- La troisième partie est consacrée aux résultats et discussions. Cette partie est achevée par une conclusion et des perspectives.

Notre organisme a besoin d'énergie pour fonctionner correctement. Les cellules transforment les nutriments apportés par l'alimentation en énergie et en eau. Cette transformation génère environ 2% de molécules d'oxygène. L'oxygène peut s'avérer délétère en raison de son caractère oxydant, il est à l'origine de la formation de dérivées plus réactives appelés espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou radicaux libres (RL) (Halliwell et Whiteman, 2004).

I.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) contenant un électron non apparié, dû à l'acceptation d'un autre électron ou au transfert de cet électron libre sur une autre molécule (Afonso *et al.*, 2007).

L'appellation espèces réactives de l'oxygène (ERO) inclut les radicaux libres de l'oxygène (radical superoxyde, radical hydroxyle, monoxyde d'azote, etc..) mais aussi certains dérivés réactifs non radicalaires, dont la toxicité est plus importante tels que le peroxyde d'hydrogène (Halliwell et Whiteman 2004). Donc les ERO sont des radicaux libres issus de l'oxygène moléculaire.

Si les ERO sont produites en quantité très importante, elles exercent des effets néfastes en induisant un phénomène d'apoptose dans des cellules saines ou en activant divers gènes codant pour l'expression de cytokines pro-inflammatoires ou des protéines d'adhésion (Sahabi, 2009).

Le tableau suivant montre les principaux ERO et leurs caractéristiques :

Tableau I: Principaux ERO avec leurs caractéristiques (Devasagayam *et al.* , 2004).

| ERO | Structure chimique | Réactivité et origine |
|--------------------------|--------------------|---|
| Anion superoxyde | $O_2^{\bullet-}$ | Produit dans les mitochondries et le système cardiovasculaire. |
| Radical hydroxyle | OH^{\bullet} | Très réactif, produit lors d'une surcharge en fer ou dans des conditions similaires pour l'organisme. |

| | | |
|-----------------------------|-------------|--|
| Peroxyde d'hydrogène | H_2O_2 | Formé à partir de nombreuses réactions, il conduit à des ERO puissants comme le radical hydroxyle. |
| Radical peroxyde | ROO^\cdot | Formé à partir des lipides, des protéines, de l'ADN, des sucres lors des dommages oxydatifs. |
| Hydroperoxyde | $ROOH$ | Réagit avec les métaux de transition pour conduire à des espèces réactives |
| Oxygène singlet | 1O_2 | Très réactif formé par la photosensibilisation et des réactions chimique. |

I.1.1. Origine des espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les ERO sont produites par un grand nombre de mécanismes endogènes et exogènes. (Cai et Harrison 2008).

- **Source endogène**

L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), principal précurseur des ERO, provient de différentes sources cellulaires en particulier la mitochondrie, et différentes enzymes comme la NADPH oxydase, la xanthine oxydase (XO), les NO-Synthases (NOS), la cyclo oxygénase et les lipoxygénases, ainsi que les enzymes du réticulum endoplasmique (cytochrome P450) (Cai et Harrison 2008).

- **Source exogène**

Elles sont surtout d'origines physique et chimique, elles proviennent de l'exposition aux rayons ionisants, aux métaux de transition, à l'oxygène en quantité excessive, à certains médicaments et à la radiolyse de l'eau. Elles peuvent être aussi issues des cytokines pro-inflammatoires, rayonnements, lors de la chimiothérapie, et l'environnement toxique (Cai et Harrison, 2008). Les différents processus de formation des ERO sont résumés dans la figure ci-après :

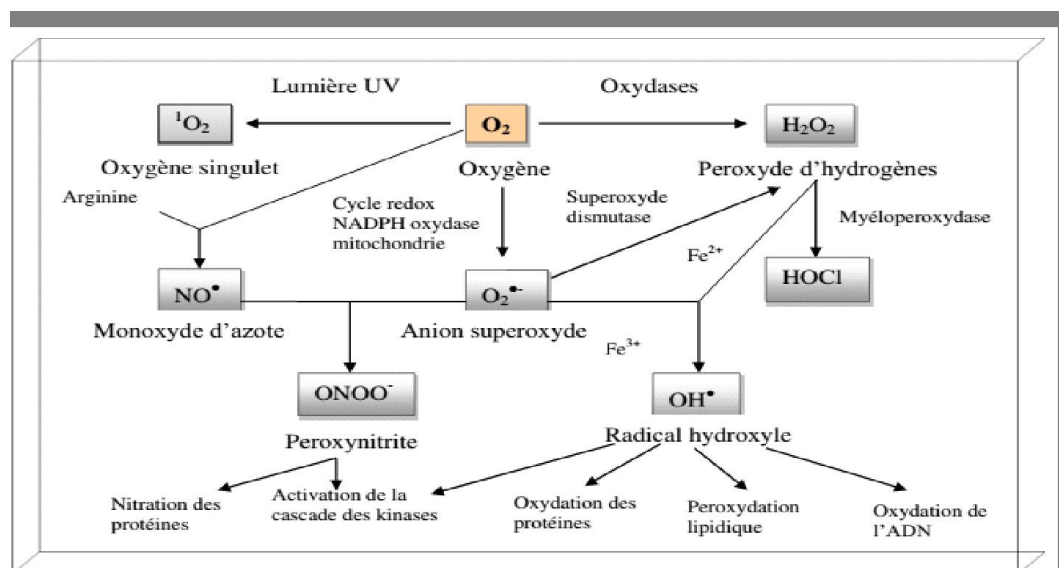


Figure 01 : Processus de formation des ERO (Linard *et al.*, 1976).

I.1.2. Principales cibles des espèces réactives de l'oxygène

Les ERO sont capables de provoquer des dégâts cellulaires importants comme

- **Inactivation des protéines**

Les acides aminés possèdent des réactivités différentes vis-à-vis des ERO. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, tryptophane, cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus avec pour conséquences, l'apparition de groupements carbonyles, des clivages des chaînes peptidiques. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (Heim *et al.*, 2002).

- **Provocation des cassures et des mutations au sein de l'ADN**

L'ADN est une cible privilégiée pour les ERO. La guanine, par exemple, peut réagir avec OH pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG), 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 (Halliwell et Whiteman 2004).

- **Induction des processus de peroxydation des lipides**

Le radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras poly-insaturés (AGPI) : c'est la phase d'initiation. Le radical lipidique réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxyde (ROO[•]). Suffisamment réactif pour arracher un H⁺ à un AGPI voisin, propageant ainsi la réaction. Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire (Heim *et al.*, 2002).

I.2. Stress oxydatif

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et le système de défense antioxydants de l'organisme, en faveur des premières. Notre mode de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité, exercice physique intense), mais aussi nos mauvaises habitudes alimentaires, augmentent de façon anormale la production des ERO dans notre organisme (Haleng *et al.*, 2007).

Aux conditions normales, la balance oxydative est définie par l'équilibre entre les espèces réactives de l'oxygène et les espèces antioxydantes. Mais en conditions d'oxydation, les pro- oxydants emportent sur les antioxydants (Bayala, 2014).

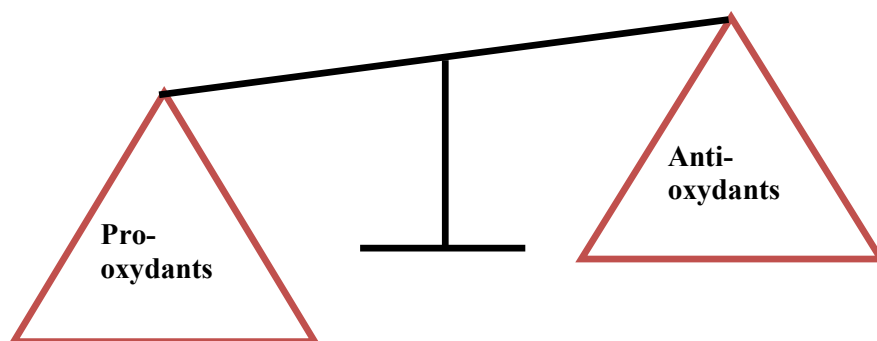


Figure 2: déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants (Bayala, 2014).

I.2.1. Les pathologies liées au stress oxydant

De nombreuses études, stipulent que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement de plusieurs pathologies humaines, quelques exemples de maladies dues au stress oxydatif :

- **Athérosclérose**

L'athérosclérose est un processus inflammatoire chronique et évolutif, liée à la peroxydation des LDL, ce qui conduit à la genèse des plaques athéromateuses. Les LDL oxydés vont attirer les cellules monocytes-macrophage vers l'intima des vaisseaux et puis les phagocytes se transforme en cellules spumeuses (surchargées des lipides) qui concourent à la formation de stries lipidiques. Ces réactions provoquant la prolifération des cellules musculaires, conduisant ainsi à la formation des plaques athéromateuses surmontées par une couche fibro-cellulaire dense (Donnet, 2001 ; Lesgards *et al.*, 2002).

- **Oxydation de l'ADN et cancer**

Le risque de développer un cancer est associé à l'accumulation de dommages oxydatifs à l'ADN dus aux mécanismes oxydatifs. Il a été suggéré que les ERO interagissent avec l'ADN dans des régions appelées nues (contiennent des métaux de transition [Fe, Cu,...etc] qui ne sont pas protégées par les histones) activant ainsi des pro-carcinogènes en carcinogènes, et inhibant les gènes suppresseurs comme la P⁵³ (Favier, 2003).

- **Maladies neurodégénératives**

Les neurones dopaminergiques sont riches en mitochondrie, ils sont plus susceptibles à être endommagés par les ERO. De ce fait, le stress oxydant est impliqué dans plusieurs maladies neurodégénératives, telle la maladie de Parkinson ou d'Alzheimer (Servais, 2004). Dans cette dernière, les radicaux libres sont responsables de la mort des neurones qui pourrait être liée à un phénomène d'apoptose, alors que dans la maladie de Parkinson il a eu lieu de la destruction de la matière noir sécrétrice de la dopamine (un neuromédiateur inhibiteur) (Lesgards *et al.*, 2002).

I.2.2. Les antioxydants

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les RL dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques des ERO (Berger, 2006). On distingue:

I.2.2.1 .Les antioxydants enzymatiques

Trois enzymes ont un rôle essentiel dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène. Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (Pham-Huy *et al.*, 2008).

- **La superoxyde dismutase (SOD)**

La superoxyde dismutase (SOD), est l'enzyme qui constitue la première ligne de défense contre les radicaux libres de l'oxygène, elle catalyse la transformation l'anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène, composés stables et moins toxiques (Pham-Huy *et al.*, 2008).



- **La catalase (CAT)**

C'est une enzyme localisée essentiellement dans les peroxysomes hépatiques et aussi dans le cytosol, elle permet de convertir deux molécules de H_2O_2 en H_2O et O_2 (Pham-Huy *et al.*, 2008).



- **La glutathione peroxydase (GSH-PX)**

La glutathione peroxydase est une enzyme qui constitue l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection, elle se trouve dans le cytoplasme et dans les mitochondries. En présence de deux molécules de glutathion sous forme réduites, la glutathione peroxydase catalyse la transformation de peroxyde d'hydrogène en deux molécules d'eau (Jacques et André, 2004).



I.2.2.2. les antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants non enzymatiques peuvent être des composés phénoliques (flavonoïdes, et les acides phénoliques), des composés azotés (alcaloïdes, des acides aminés et les amines), ou des caroténoïdes ainsi que l'acide ascorbique. Ils incluent tous les antioxydants capables de neutraliser seulement un radical libre par molécule tels que les vitamines C, E, les composés phénolique, les flavonoïdes, etc. (Meddour *et al.*, 2013).

- **Vitamine C**

La vitamine C ou l'acide ascorbique est un antioxydant majeur présent dans tous les organes, elle est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présents dans les fluides intra et extracellulaire, la vitamine C peut directement réagir avec des espèces réactives de l'oxygène comme OH et O₂, la vitamine C régénère la vitamine E à l'interface membrane/cytosol (Delattre *et al.*, 2005).

- **Les composés phénoliques**

Les antioxydants les plus couramment rencontrés dans les plantes sont les composés phénoliques, Ils englobent plus de 8000 molécules divisées en classes chimiques, parmi elles : les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins. Ils sont considérés comme des métabolites secondaires, qui n'ont pas de fonction métabolique spécifique dans les cellules végétales, mais ils assurent à la plante sa défense contre les agressions environnementales (Macheix *et al.*, 2005). Les composées phénoliques sont répartis en plusieurs classes, parmi elles : les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins.

- **Les acides phénoliques**

C'est la forme la plus simple des composés phénoliques. Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils sont représentés par deux sous-classes : les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique (Watson *et al.*, 2013).

- **Les flavonoïdes**

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs ; des fruits et parfois des feuilles, leur structure de base est celle d'un diphenyle propane à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), constitué de deux noyaux aromatiques qui désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C (Nascimento *et al.*, 2013).

- **Les tanins**

Les tanins sont un groupe des polyphénols à haut poids moléculaire (entre 500 et 3000 Dalton). Ce sont des molécules fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments, ils peuvent être liés à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux. On distingue classiquement deux grands groupes de tanins : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Alkurd *et al.*, 2008).

I.2.3. Mécanisme d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers y compris la chélation des métaux de transition, le captage de l'oxygène singulet, l'élimination des hydro-peroxydes, la désactivation des radicaux libres par la réaction d'addition covalente. D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène cas de la vitamine E (α tocophérol) ou d'électrons souvent aromatiques, cas de dérivés du phénol. (Favier, 2006).

I.3. Description botanique de la plante

I.3.1. Habitat et description

Le nom du genre *Rhamnus* vient du grec « rados » qui signifie baguette, en référence à la flexibilité des rameaux, il est typiquement méditerranéen (Europe méridionale, Afrique du Nord et Asie occidentale) et caractéristique de la forêt de chêne vert (Rameau *et al.*, 2008).

Rhamnus alaternus est fréquemment utilisés dans le programme de reboisement, en raison de sa résistance aux environnements xériques. Ce genre appartient à la famille de Rhamnaceae et contenant approximativement 100 espèces. Très connu dans le nord de l'Algérie, c'est un arbuste ou petite arbre de 1 à 5m de haut, glabre, sans épine, dioïque. C'est une espèce de nerprun d'Europe toujours vert, à fruits purgatifs (Gulias *et al.*, 2004).

Les fruits mûrs de la plante *Rhamnus alaternus* L sont des drupes noires porte habituellement deux à cinq graines triangulaires (Largeur :2.5 millimètres, Longueur :4.6 millimètres et le poids : 9 ,1 mg) et chaque graine est inclus dans un endocarpe qui s'ouvre quand la pulpe de fruit est éliminée (figure 3) (Gulias *et al.*, 2004).

I.3.2. Classification botanique

La classification de *Rhamnus alaternus* L selon (Yi-ling et Pan-kai, 1992)

Domain : Eucaryota- eucaryote

Règne : Plantae-Végétal

Sous règne : Viridaplantae-Plantes vertes

Phylum: Magnoliophyta-plantes à fleurs

Sous phylum : spermatophytina-plantes à graines

Infraphylum : Angiospermes

Classe: Magnoliopsida – Dicotylédones

Sous Classe : Rosidae

Famille: Rhamnaceae

Genre: Rhamnus

Espèce: *Rhamnus alaternus* L

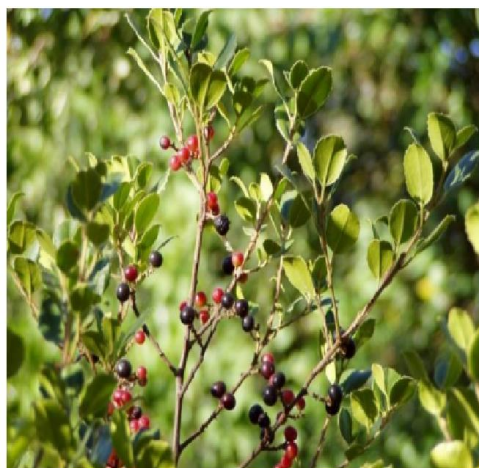


Figure 3 : *Rhamnus alaternus* L (Rameau *et al.*, 2008).

I.4.3. Nomenclature

Les noms vernaculaires sont indiqués dans le tableau I.

Tableau II : Noms vernaculaires de *Rhamnus alaternus* L (Debeaux, 1984 ; Ben Ghezal *et al.*, 2015).

| | |
|---------------------|---|
| Nom kabyle | Imlillesse, mlillesse |
| Nom Arabe | Am'lile'ce, M'lila, Soitfaïr, Oud El-khir ou bien Safir |
| Nom Français | Nerprun mediterraneen |
| Nom Anglais | Mediterranean Buckthorn. |
| Nom Allemand | Kreülzdorn |
| Nom Espagnol | Aladierna, Cosco Unia, Sanguino de Andaluci |
| Nom Italien | Alaterno, Legno Puzzo |

I.3.4. Usage traditionnel

Le *Rhamnus alaternus* L est largement utilisé dans la médecine dans de nombreux pays Africains. La plante est utilisée en tant que agent, diurétique, laxatif, hypotensif et pour le traitement des complications hépatiques et dermatologiques (Ben Ammar *et al.*, 2008). Les baies de *R. alaternus* ont une action purgative, d'une saveur âpre, employées en médecine vétérinaire. Grâce à son feuillage persistant, touffu et sombre, *R. alatenms* est souvent cultivée dans les parcs, comme plante ornementale, pour former des passifs ou des haies compactes (Bhourri *et al.*, 2011).

I.3.5.Composition chimique

Le genre *Rhamnus* contient des quantités abondantes de composés phénoliques en particulier les anthraquinones, mais aussi des tanins et les flavonoïdes (Tsahar *et al.*, 2002). Les parties aériennes et les racines de *R. alaternus* ont révélés la présence de diverses quantités d'anthraquinones telles que l'émodyne ou chrysophanol, de coumarines, de tanins et en particulier des flavonoïdes. Trois flavonoïdes tri-glycosidique ont été isolés à partir des feuilles de *R.alaternus*, le Kaempferol 3-O-β-isorhamninoside, rhamnocitrin 3-O-β-isorhamminoside et le rhamnetin-3-O-β-isorhamninoside, en revanche trois flavonoïdes aglycones ont été identifiés: l'apigénine, le kaempferol et la quercétine (Ben Ammar *et al.*, 2009).

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

II .1. Matériel

II .1.1. Matériel et réactifs chimiques utilisés

Le matériel expérimental et les réactifs chimiques utilisés durant le travail pratique sont illustrés dans le tableau suivant:

Tableau III: Matériel et réactifs utilisés obtenus chez SIGMA-ALDRICH

| Matériel | Réactifs chimiques |
|---|--|
| -Broyeur électrique (KILALabortechnik M20) | -Méthanol |
| -Balance de précision(BP310P) | -Réactif Folin-Ciocalteu(FC) |
| -Vortex(VELP) | -Carbonate de sodium(Na_2CO_3) |
| -Centrifugeuse (CentrionScientific) | -Chlorure d'Aluminium(AlCl_3) |
| -Etuve (BINDER) | - Trichlorure ferrique (FeCl_3) |
| -Plaque magnétique(MULTISTIRRER) | -Dichlorure de fer(FeCl_2) |
| -Bain marie(MEMMERT) | -DPPH($\text{C}_{18}\text{H}_8\text{O}_6$) |
| -PH mètre(BT675) | -ABTS (2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) |
| -SpectrophotomètreUV-VIS(Spectroscan 50v) | -Persulfate de potassium($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) |
| -Tamiseur(Retsch) | -Ferrozine |
| -Micropipette de $10\mu\text{L}$, $200\mu\text{L}$, $1000\mu\text{L}$ | -Acide sulfurique(H_2SO_4) |
| | - K_2HPO_4 (di-potassium hydrogen phosphate anhydrous) |
| | - KH_2PO_4 (potassium phosphate monobasic) |
| | -Acide trichloroacétique(TCA) |
| | -Ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{NC})_6$) |
| | -Acide gallique($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$) |
| | -Quercétine($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$) |
| | -Trolox |
| | -Acide ascorbique ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) |
| | -EDTA (Ethylène Diamine Tétra-Acétique) |

II.1.2. Matériel végétal

Cette étude a été réalisée sur les feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

- **Préparation du matériel végétal**

Le schéma général de la préparation des extraits est résumé dans la Figure 4.

- **Récolte et séchage**

Les feuilles de *Rhamnus alaternus* L ont été récoltées à maturité durant le mois de février 2018 dans la région de Laazib de la commune d'Aokas au niveau de la wilaya de Béjaia, après la récolte les feuilles ont été triées, nettoyées, puis séchées à l'air libre, puis transférées dans l'étuve. Après séchage, les feuilles ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique (KILALabortechnik M20) puis tamisées jusqu'à l'obtention d'une poudre fine de diamètre < 61 µm. Le nom scientifique de la plante a été confirmé par Monsieur Abbasi enseignant à la faculté SNV université de Bejaia.

II.2. Méthodes

II .2.1. Extraction

L'extraction a été effectuée par épuisement du matériel végétal en utilisant l'eau distillée et le méthanol. 30g de la poudre des feuilles de *R.alaternus* sont macérés dans 300 mL de solvant (méthanol et eau). Le mélange est maintenu sous l'agitation magnétique pendant 24 heures à une température ambiante. Après la macération, les solutions obtenues ont été laissées décanter pendant une nuit puis filtrées, les filtrats récupérés ont été séchés à l'air libre afin d'obtenir deux extrais aqueux et méthanolique.

Après extraction le rendement a été calculé selon la formule suivante:

$$\mathbf{Rd = ((P1-P2)/E)*100}$$

Où :

Rd : Rendement d'extraction

P1: Poids de l'extrait après évaporation

P2: Poids du cristalliseur ou boîte de Pétri vide

E: Poids de la poudre utilisée pour l'extraction

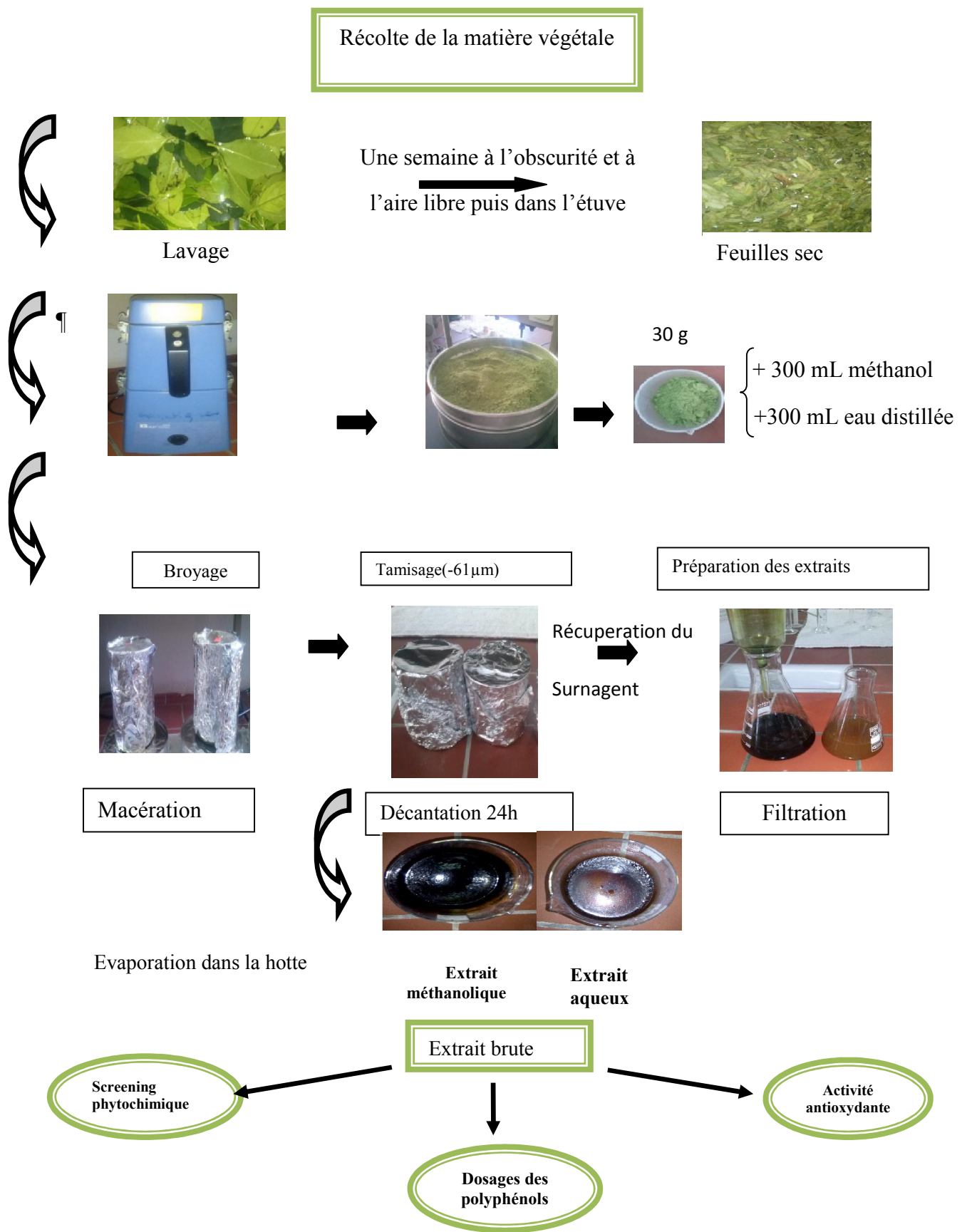


Figure 04: Protocol experimental d'extraction (Moussi *et al.*, 2015)

II.2.2. Etude phytochimique des extraits de *Rhamnus alaternus* L

II.2.2.1. Mise en évidence de quelques classe métabolites secondaires

Afin de mettre en évidence la présence de quelques groupements chimiques dans les extraits, des tests préliminaires ont été effectués permettant une recherche grossière des composants chimiques.

- **Le test de saponine**

Nous avons prélevé 1 mL de l'extrait au quel sont ajoutés 3 mL d'eau distillée. Le mélange est agité au vortex pendant 2 min, la formation d'une mousse persistante nous indique la présence de saponines dans l'extrait (Amana, 2007).

- **Le test des alcaloïdes**

Quelques gouttes du réactifs de Bouchardat sont ajoutées à 2mL d'extrait ; la présence d'alcaloïdes est indiquée par la formation d'un précipité brun-noire et / ou jaune-brun (Amana, 2007).

- **Le test des Tanins**

2 à 3 gouttes de chlorure ferrique à 2% sont ajoutées à 1mL d'extrait. L'apparition d'une coloration vert foncée indique la présence de tanins catéchiques, et une coloration bleue verdâtre indique la présence simultanée des deux types de tanins : Les tanins hydrolysables et condensés (Soulama *et al.*, 2014).

- **Le test des flavonoïdes**

La présence des flavonoïdes est mise en évidence par un test simple et rapide appelé « réaction de Shinoda » (Soulama *et al.*, 2014). Le test consiste à ajouter à 1 mL de l'extrait, quelques gouttes d'HCl concentré et environ 0,5 g de magnésium métallique. Laisser agir pendant 3 min, l'apparition d'une coloration rouge, orangée, rosée ou rouge violacée indique la présence des flavonoïdes.

- **Caractérisation des composés réducteurs**

La réaction à la liqueur de Fehling a été utilisée : 1mL d'extrait a été dilué dans 1 mL d'eau distillée et porté à ébullition pendant 30 min en présence de 1 mL de liquide de

Fehling (I+II). La présence de composés réducteurs est indiquée par la formation d'un précipité rouge brique (Ciulei, 1882).

- **Caractérisation des Terpénoïdes**

1ml de chloroforme est ajouté à 2,5 mL d'extrait, puis le mélange est homogénéisé avant d'ajouter 1,5mL d'acide sulfurique (H₂SO₄) concentré. La formation d'un anneau brun-rouge à l'interface indique la présence de terpénoïdes dans l'extrait (Amana, 2007).

II.2.3. Evaluation des taux des composés phénoliques

II.2.3.1. Dosage des polyphénols totaux

- **Principe**

Les polyphénols ont été déterminés selon la méthode de Folin-Ciocalteu. Les composés phénoliques réagissant avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Le mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀) de ce réactif est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleu de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (MO₈O₂₃). La coloration bleue produite est proportionnelle au taux de composés phénoliques présents dans la solution (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1982).

- **Mode opératoire**

La teneur en composés phénoliques est évaluée selon la méthode décrite par Naithani et ses collaborateurs 2006. 100µl de chaque extrait de *R. alaternus* ont été ajoutés à 100µl du Folin-Ciocalteu (50%) en plus de 2 ml de carbonate de sodium (2%). Après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance est lue à 720 nm. Les teneurs en composés phénoliques sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage (annexe I, figure 1) réalisée avec l'acide gallique, les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par g d'extrait sec (mg EAG/g).

II.2.3.2. Dosage des flavonoïdes

- **Principe**

La méthode de dosage des flavonoïdes est basée sur la formation des complexes flavonoïdes avec des métaux tels que l'aluminium, utilisé sous forme de chlorure

d'aluminium(AlCl_3). Ce dernier forme des complexes jaunâtres avec les atomes d'oxygènes (Ribereau-Gayon, 1968).

- **Mode opératoire**

La méthode du trichlorure d'aluminium a été utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits et consiste à ajouter 1 mL d'extrait ou standard à 1 ml de la solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol). Après 10 min d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm. Les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercétine par g d'extrait (mg EQ/g) en se référant à la courbe d'étalonnage (annexe II, figure 2) qui a été réalisée dans les mêmes conditions que l'extrait (Baharun *et al.*, 1996).

II.2.4. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits

La caractérisation de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *R.alaternus* L a été évaluée par l'utilisation de plusieurs méthodes telles que : le pouvoir réducteur, la méthode au radical libre DPPH \cdot , piégeage de radical ABTS $^{+\cdot}$ et la chélation de Fer.

II.2.4.1. Test du pouvoir réducteur

- **Principe**

Cette méthode est basée principalement sur la capacité de l'extrait à donner un électron tout en convertissant le fer ferrique de la forme Fe^{3+} à la forme Fe^{2+} , en présence des antioxydants, cette réaction se manifeste par l'apparition de la couleur bleu mesurable à 700 nm. Donc une absorbance élevée indique que l'extrait possède un grand pouvoir réducteur (Bijoy *et al.*, 2008).

- **Mode opératoire**

Le pouvoir réducteur est évalué selon la méthode déterminée par Yildirim et ses collaborateurs 2001. Un volume de 2,5 mL de tampon phosphate (0,2M, pH=6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium (1%) sont ajoutés à 1 ml de des différentes concentrations des extraits, suivi par l'agitation et une incubation à 50 °C pendant 30 min dans un bain marie, après nous avons ajoutés 2,5 mL d'une solution de trichloracétique à 10% au milieu réactionnel, et soumis à une centrifugation à 3000tr/min pendant 10 min ; 2,5 mL du surnageant est prélevé pour ajouter 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL de chlorure ferrique à 0,1%. la lecture se fait au spectrophotomètre à 700nm, contre un blanc qui est préparé dans les même conditions. La gamme étalon d'acide ascorbique est utilisée comme référence.

II.2.4.2. Activité anti- DPPH[•]

- **Principe**

Le DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre, stable ou accepteur d'hydrogène de couleur violet intense. Ce radical perd sa coloration native quand il se lie avec des substances antioxydants (AH), qui lui transfèrent des électrons ou des protons. La forme réduite du DPPH confère à la solution une couleur jaune (Gulçin, 2012). La réaction peut se résumer de la façon suivant :



Où : AH est un composé capable de céder un H⁺ au radical DPPH[•]

- **Mode opératoire**

L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la méthode de Shon et ses collaborateurs 2000. Un volume de 100µl de différentes concentrations de chaque extrait ou de standard est ajouté à 3 ml de la solution méthanolique du DPPH de 0.1 mM. Après l'incubation à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante la lecture des absorbances est effectuée à 517 nm contre un blanc qui est le méthanol et un contrôle constitué de 2,5 ml de la solution du DPPH seul. La quercétine est utilisée comme standard. L'activité antioxydante DPPH est calculée selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = ((\text{Abs c} - \text{Abs t}) / \text{Abs c}) \times 100$$

Où :

Abs c : Absorbance du control.

Abs t : Absorbance du test.

II.2.3.3. Activité anti- ABTS^{•+}

- **Principe**

Ce test est basé sur le mécanisme d'oxydation de l'ABTS. Au cours de ce dernier, le sel d'ABTS perd un électron pour former un radical cation (ABTS^{•+}) de couleur bleu

vert. En présence de l'agent antioxydant, le radical ainsi formé est réduit pour donner le cation $ABTS^+$, Ce qui entraîne la décoloration de la solution (Boligon *et al.*, 2014).

- **Mode opératoire**

La mesure de l'activité scavenging du radical ABTS a été effectuée selon la méthode décrite par Re et ses collaborateurs (1999). Une solution ABTS a été préparée 16h avant le test, en mélangeant 7 mM d'ABTS avec 2,45 mM de persulfate de potassium dans l'eau distillée. A partir de cette solution, des dilutions ont été faites avec l'eau distillée jusqu'à l'obtention d'une solution à $0,7 \pm 0,02$ d'absorbance à 734nm. Un volume de 20 μ l de l'extrait est ajouté à 180 μ l de la solution $ABTS^+$. Après incubation pendant 06 min à l'obscurité, les absorbances ont été mesurées à 734nm. Le Trolox a été utilisé comme standard. Le pourcentage d'inhibition de l'ABTS a été calculé comme suit:

$$\% \text{ d'inhibition} = ((\text{Abs c} - \text{Abs t}) / \text{Abs c}) \times 100$$

Où :

Abs c: Absorbance du control.

Abs t: Absorbance de la solution de l'ABTS contenant l'extrait

II.2.3.4. Activité chélatrice de fer

- **Principe**

Le principe de la méthode repose sur l'inhibition de la formation du complexe Ferrozine- Fe^{2+} de couleur violette intense qui absorbe à 563nm, la chélation se manifeste par une diminution de l'absorbance lorsque l'agent chélateur rentre en compétition avec la ferrozine (Alam *et al.*, 2013).

- **Mode opératoire**

La mesure du pouvoir chélateur du fer a été réalisée selon le protocole élaboré par Bourgou et ses collaborateurs 2008. 100 μ L de chaque extrait a été additionnés à 50 μ L de $FeCl_2$ (2mM) et 2,75mL d'eau distillée. Suivie d'une agitation intense et d'incubation à la température ambiante pendant 10 min. L'absorbance a été mesurée à 562 nm, contre un blanc réalisé dans les mêmes conditions. Le pourcentage d'inhibition de la formation du complexe ferrozine- Fe^{2+} est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = ((\text{Abs c} - \text{Abs t}) / \text{Abs c}) \times 100$$

Où :

Abs c : Correspond à l'absorbance de control.

Abs t : Correspond à l'absorbance de l'extrait.

II.2.5. Analyse statistique

Tous les résultats expérimentaux ont été exprimés en moyen \pm SD. Les différences entre les groupes ont été déterminées, en utilisant le logiciel GraphPadPrisme (5.0) en utilisant l'analyse de la variance (ANOVA) suivie par le test Dunnett. Les différences ont été considérées comme significatives (* $p < 0.05$), hautement significatives (** $p < 0.01$), très hautement significatives (***) $p < 0.001$).

Les IC50 des tests ont été calculés à l'aide du même (logiciel GraphPadPrisme (5.0)).

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Taux d'extraction

Dans ce travail, une macération a été réalisée de la poudre des feuilles de *Rhamnus alaternus*, nous avons utilisé deux solvants à différentes polarité (méthanol et l'eau distillée). La masse et le rendement de chaque extrait sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau IV : Caractérisation des différents extraits (masse et rendement).

| | Masse en (g) | Rendement en (%) |
|----------------------------|--------------|------------------|
| Extrait de méthanol | 5,72 | 19,06 |
| Extrait aqueux | 3,23 | 10,76 |

Le rendement obtenu avec le solvant de méthanol (19,06%) est meilleur que celui de l'extrait aqueux (10,76 %).

Des résultats supérieurs aux nôtres ont été trouvés dans une étude réalisée par Moussi et ses collaborateurs (2015) sur les feuilles *R. alaternus* origine d'Algérie (commune d'Adakar). En effet la macération des feuilles dans le méthanol a donné un rendement de 22%.

Autres étude réalisé par Ben Ammar et ses collaborateurs (2008) de la même espèce originaire de Tunisie ainsi celle trouvé par Ljubunic et ses collaborateurs (2005) sur l'extrait aqueux qui ont trouvé un rendement de 9% et de 8% respectivement.

Cette différence de rendement est peut être due à un ensemble de paramètres comme l'origine géographique, la méthode d'extraction, nature de solvant, le diamètre des particules de l'échantillon mais également aux conditions d'expérimentation (Naczka et Shahidi., 2004).

II. Mise en évidence de quelques métabolites secondaires

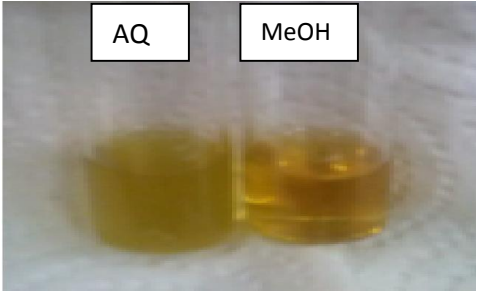
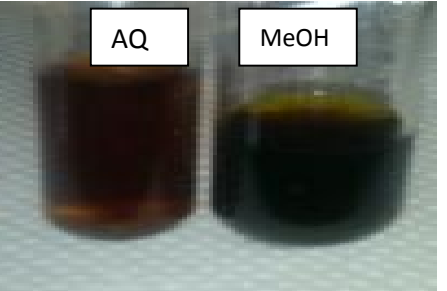
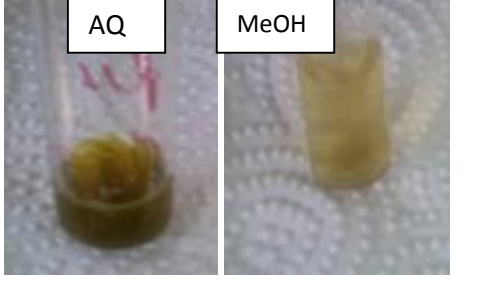
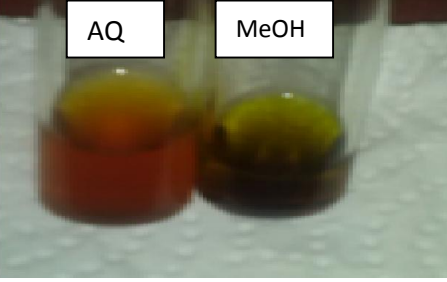
Le tableau V résume les résultats de mise en évidence de la présence de quelque métabolite secondaire dans nos extraits.

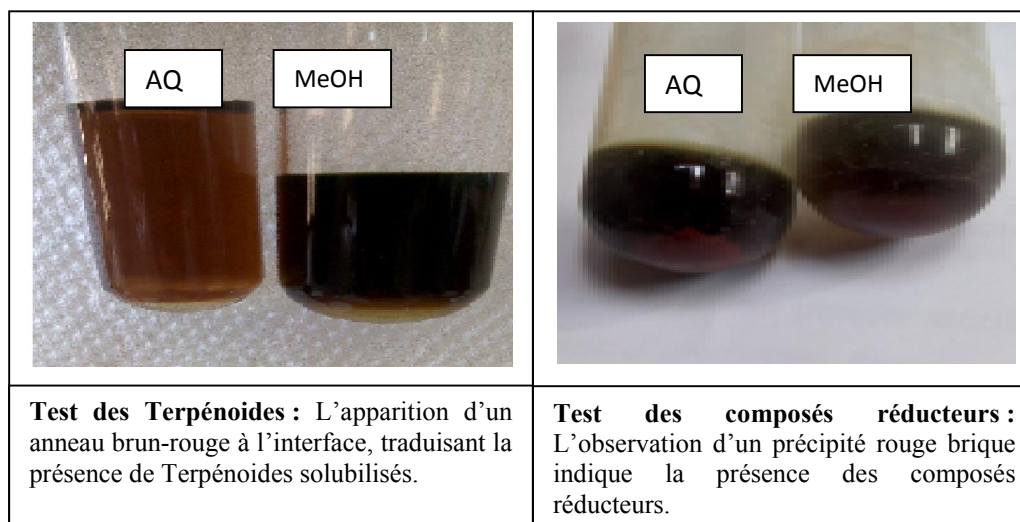
Tableau V : Résultat des tests phytochimiques

| Extrait | Résultats | |
|--|-----------|--------|
| | MeOH | Aqueux |
| Métabolites secondaires flavonoïdes | +++ | +++ |
| Alcaloïdes | +++ | +++ |
| Saponines | - | + |
| Tanins | +++ | +++ |
| Terpénoïdes | +++ | +++ |
| Composés réducteurs | +++ | +++ |

(-) Test négatif. (+) Test faiblement positif. (++) Test positif. (+++) Test fortement positif.

Tableau VI : Détection chimique des composés phénoliques

| | |
|--|---|
|  |  |
| <p>Test des flavonoïdes : L'apparition d'une coloration orange indique la présence des flavonoïdes.</p> | <p>Test des alcaloïdes : L'apparition d'une précipitation brun-noire indique la présence des alcaloïdes.</p> |
|  |  |
| <p>Test des saponines : L'absence de formation d'une mousse persistante dans nos extraits indique l'absence de saponines.</p> | <p>Test des tanins : L'apparition d'une coloration vert foncée indique la présence des tanins catéchiques.</p> |



L'étude du criblage phytochimique de l'extrait méthanolique et aqueux des feuilles de *R.alaternus* montre que les deux extraits contiennent plusieurs composés phénoliques à savoir : les flavonoïdes présent dans les deux extraits, de même pour les alcaloïdes ainsi les tanins, terpénoïdes et les composé réducteurs. Par contre les saponines sont absent dans l'extrait méthanolique et faiblement présent dans l'extrait aqueux.

Afin de caractériser les extraits préparés à partir des feuilles de *R.alaternus* L, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydante des plantes leur sont attribués (Meziti, 2009).

III. Analyse quantitative des composés phénoliques

Cette analyse permet d'avoir une estimation sur la teneur en polyphénols totaux et des flavonoïdes des échantillons. Les tests de dosage des polyphénols totaux a été effectué par une méthode adaptée par Naithani et ses collaborateurs (2006). En utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, tandis que les flavonoïdes ont été quantifiés par le dosage direct par le trichlorure d'aluminium d'après une méthode adaptée par Bahorun et ses collaborateurs (1996).

Les teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes des deux extraits sont déterminées en se référant à des courbes d'étalonnages réalisés avec l'acide gallique et la quercétine, respectivement.

Les concentrations des polyphénols totaux et des flavonoïdes obtenues sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau VII : Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits de *R.alaternus* :

| | Polyphénols totaux (mg EAG /g d'extrait) | Flavonoïdes (mg EQ /g d'extrait) |
|-----------------------------|---|-------------------------------------|
| Extrait méthanolique | 16,56 ± 0,660 | 10,69 ± 1,14 |
| Extrait Aqueux | 24,35 ± 0,877 | 18,16 ± 0,76 |

D'après les résultats présentés dans le tableau VII, l'extrait aqueux possède la teneur la plus élevée en polyphénols totaux par rapport à l'extrait méthanolique des feuilles de la plante étudiée (24,35 ± 0,877, 16,56 ± 0,660 mg Eq AG /g d'extrait) respectivement.

Les résultats exprimés dans le tableau ci-dessus révèlent que l'extrait aqueux est plus riche en polyphénols que l'extrait méthanolique. Cela peut être expliqué par la présence d'un grand nombre de molécules solubles dans l'eau est non solubles dans l'alcool. En fait la solubilité des polyphénols est gouvernée par le type de solvant utilisé, et leur degré de polymérisation. En effet, on constate que le meilleur solvant d'extraction des polyphénols pour la présente étude est l'eau distillée.

L'étude réalisée par Ben Ammar et ses collaborateurs en 2007 sur les feuilles de la même espèce végétale mais de Tunisie, avec une teneur en polyphénols totaux de l'ordre de 250±17 mg EAG/ g d'extrait pour l'extrait d'éthyle acétate, ce résultat est supérieure résultats obtenus dans les deux extraits de la présente étude.

D'autres résultats obtenus par Ben Ammar et ses collaborateurs (2008) qui montre que l'extrait hydro-alcoolique des écorces contiens une teneur de (7 mg EAG/g de matière fraîche) en polyphénols, qui est inférieure à nos résultats. Cette différence peut être expliquée par la partie utilisée (écorce)

Les résultats du dosage des flavonoïdes (tableau VII) révèlent que les proportions des deux extraits ; méthanolique et aqueuse sont respectivement de 10,69 ± 1,14 et 18,16±0,76 mg EQ/g d'extrait. La différence de la teneur en flavonoïdes entre les deux extraits pour est due probablement à la nature de solvant utilisé qui permet une meilleure séparation des flavonoïdes.

Les teneurs rapportées par Ben Ammar et ses collaborateur (2007) ont montré que *R.alaternus* contient 423±19 d'oligomères flavonoïdiques totaux alors que sont extrait méthanolique ne contient que 283±11 de flavonoïdes en mg EQ/ g d'extrait.

L'étude de khattal et ses collaborateurs (2011), sur la même espèce a confirmé la présence des flavonoïdes chez cette espèce avec une teneur de 92 ± 14 mg EQ/ g d'extrait. Une autre étude faite par Boussahel et ses collaborateurs (2013) sur les feuilles de la même espèce révèle une teneur de 61.127 ± 1.217 mg EQ/g d'extrait.

Les résultats obtenus lors de la présente étude sont largement inférieures à ceux trouvés par les chercheurs précédents. Cette différence dans les teneurs peut être expliquée par les conditions climatiques, la localisation géographique, la période de récolte ainsi que par les facteurs génétiques et les conditions expérimentales (Ryan *et al.*, 1999), ainsi que les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante, la température et la nature de solvant d'extraction (Conde *et al.*, 2009).

IV. Evaluation de l'activité antioxydante

IV.1. Mesure du Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est souvent utilisé comme un indicateur de l'activité antioxydante, qu'est un mécanisme important pour tester l'action antioxydante des composés phénoliques (Bijoy *et al.*, 2008).

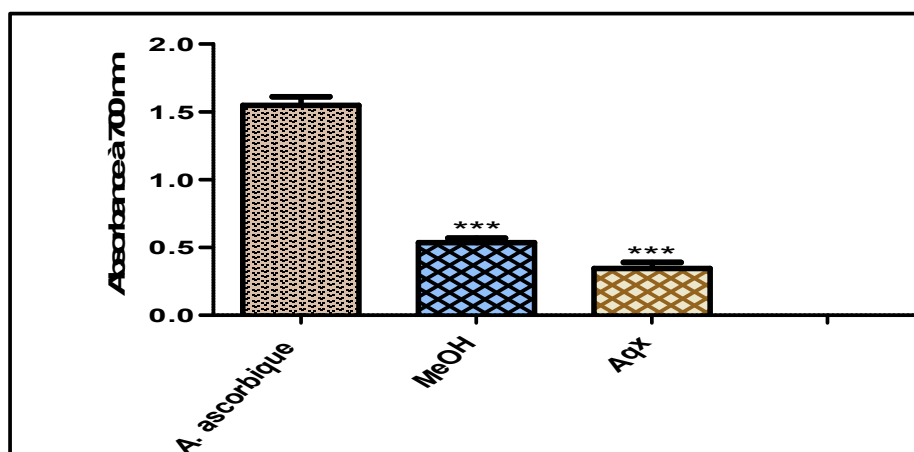


Figure 05 : pouvoirs réducteurs des extraits et du standard à une concentration de $100 \mu\text{g/ml}$. Acide ascorbique, MeOH: extrait méthanolique, Aqx: extrait aqueux. La différence est significative à $*p < 0.05$, très significative à $**p < 0.01$ et très hautement significative à $***p < 0.001$ comparé au contrôle ou standard (Acide ascorbique).

L'étude statistique indique que l'extrait méthanolique et aqueux présente une différence très hautement significative ($***P < 0.001$) comparée au contrôle positif (acide ascorbique).

A partir de ces résultats, nous remarquons aussi que le pouvoir réducteur obtenu par l'acide ascorbique est très puissant avec une absorbance de 1,548 par rapport aux deux autres extraits (méthanolique et aqueux) à la même concentration.

A une concentration de 100 µg/mL, l'extrait méthanolique a révélé un pouvoir réducteur de l'ordre de $0,53 \pm 0,033$ unité d'absorbance, tandis que l'extrait aqueux montre une valeur moins importante qui est de $0,344 \pm 0,045$ unités d'absorbance, ce qui signifie que l'extraction par le méthanol est préférable pour effectuer le test d'évaluation du pouvoir réduction de fer de *R. alaternus*.

Les résultats obtenus au cours de cette étude sont supérieurs à ceux rapportés par Kosalec et ses collaborateurs (2013) sur l'écorce de la même espèce ($0,910 \pm 0,01$) utilisant le méthanol comme solvant d'extraction. Le pouvoir antioxydant des plantes varie également selon la saison de récolte et la partie utilisée (Gardeli *et al.*, 2008).

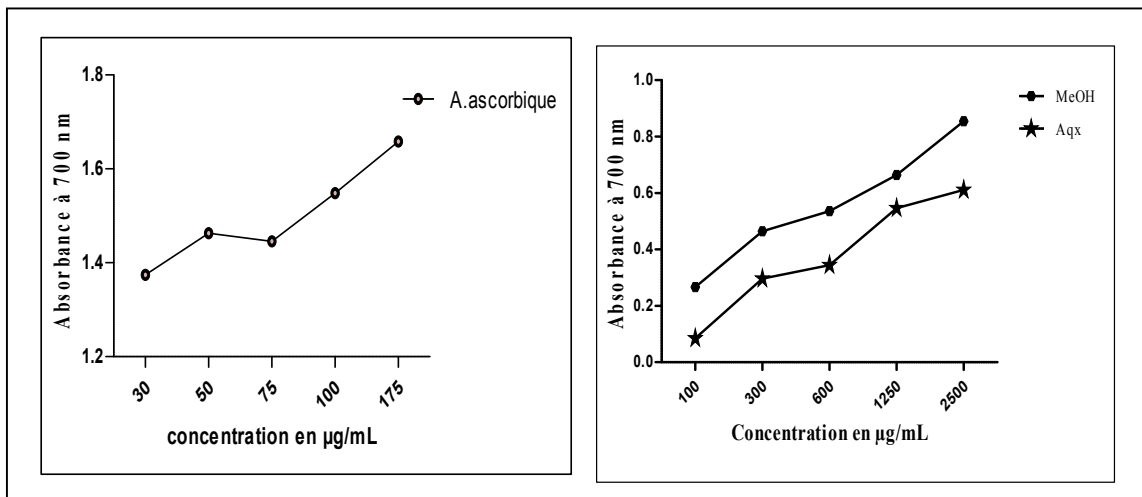


Figure06: Pouvoir réducteurs en fonction des concentrations des différents extraits.

D'après les résultats obtenus nous constatons que l'extrait méthanolique et aqueux ainsi que l'acide ascorbique montrent une capacité réductrice. Cette capacité est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des extraits (Figure 06).

IV.2. L'activité scavenger du radical DPPH

Ce test est largement utilisé pour évaluer l'effet de piégeage des radicaux libres par des extraits ou des composés purs (Ben Ammar *et al.*, 2009). Afin d'évaluer l'effet de piégeage de ces radicaux, nous avons utilisé la méthode de diphenyl-picrylhydrazyl. Le

degré de décoloration indique le potentiel piègeur des antioxydants présents dans les extraits (Molyneux, 2004)

L'effet de l'activité scavenging du radical DPPH et le standard a été testé à une concentration de 100 µg/mL et les résultats sont illustrés dans la figure suivante :

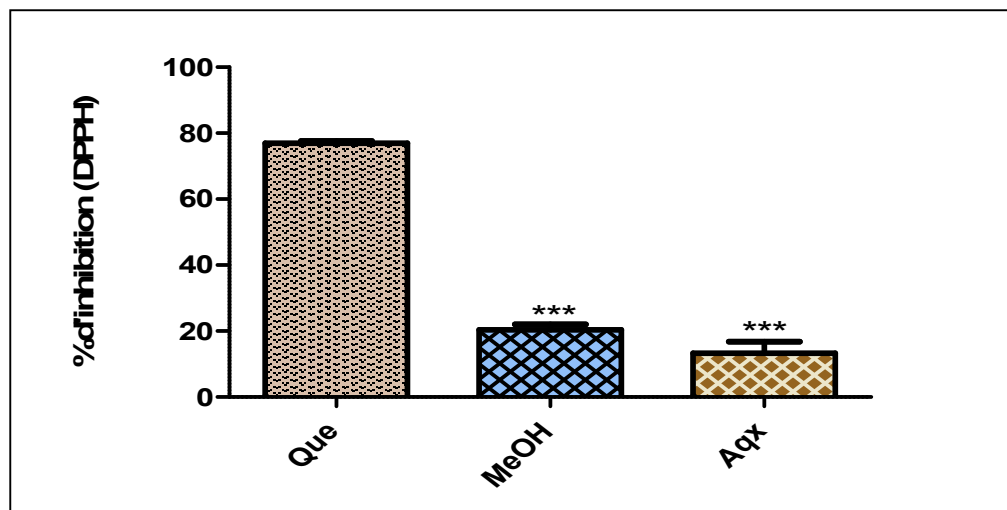


Figure 07: Activité anti-radicalaire des extraits et le standard à une concentration de 100µg/mL. Que: Quercétine, MeOH: extrait méthanolique, Aqx: extrait aqueux. La différence est significative à * $p < 0.05$, très significative à ** $p < 0.01$ et très hautement significative à *** $p < 0.001$ comparé au standard (Quercétine).

Nos résultats ont révélé une différence hautement significatif (** $p < 0.001$) de l'activité anti-oxydant de deux extraits comparé au contrôle positif (quercétine).

Nous remarquons à partir des résultats de la figure 07 que les extraits méthanolique et l'extrait aqueux à une concentration de 100µg/ mL ont exhibé une activité anti DPPH faible avec des pourcentages de 20,41± 1,611 % et 13,33 ± 3,430 % respectivement, largement inférieure à ceux de quercétine qui présente un pourcentage de 76,96 ± 0,702 %. Ces résultats signifient que l'efficacité de la molécule pure (Quercitine) à piéger les radicaux libres comme le radical DPPH' est largement supérieure que celle des polyphénols présents dans l'extrait des feuilles de *R.alaternus* à la même concentration, qui présentent une variété de molécules.

Le pouvoir de piégeage du radical libre DPPH par les extraits et les molécules de référence est généralement présenté par la valeur IC50. Elle est définie comme étant la

concentration de l'antioxydant nécessaire pour piéger 50% du DPPH présent dans la solution d'essai. Plus cette valeur est faible, plus l'activité antioxydante est puissante (Hebi et Eddouk, 2016). Les extraits ont été testés à différentes concentrations (figure 08).

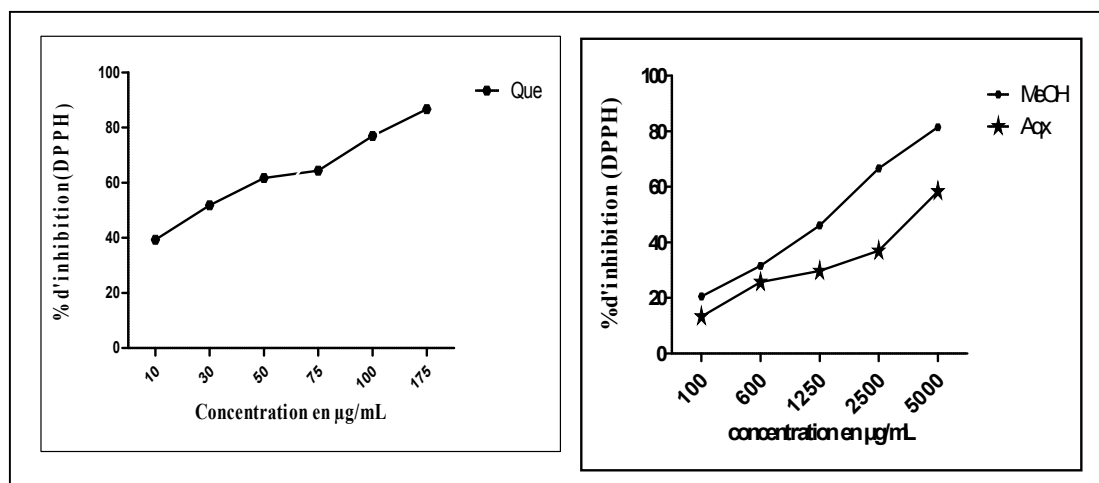


Figure 08: Effet de la concentration des différents solvants sur l'activité antiradicalaire du DPPH

D'après les résultats de la figure 08. Nous remarquons que l'extrait méthanolique manifeste d'une forte activité antiradicalaire du DPPH avec un taux de 81,44 % à une concentration la plus élevée (5000 µg/mL) par rapport à celle obtenue par l'extrait aqueux avec un taux de 58,39% à une même concentration. Par contre la quercétine peut atteindre un taux d'inhibition qui dépasse 86,75% à une faible concentration (175µg/mL).

Ces données montrent que le pourcentage d'inhibition du radical DPPH augmente proportionnellement avec celle des concentrations des différents extraits.

Cela a été expliqué par Pooter et ses collaborateurs (1986) qui ont démontrés que les molécules antioxydants telles que l'acide ascorbique, la quercétine et le tocophérol réduisent et décolorent le radical DPPH à des concentrations faibles en raison de leur immense capacité à céder l'hydrogène.

Tableau VIII: IC50 de différents échantillons contre le radical DPPH et ABTS :

| Solvents | Extrait méthanolique | Extrait aqueux | Quercétine | Trolox |
|---------------------------|-------------------------|-------------------|------------|--------|
| IC50 μ g/mL (DPPH) | 1771 | 2518 | 16,98 | / |
| IC50 μ g/mL (ABTS) | 1557 | 4534 | / | 8,83 |

D'après ses résultats, l'extrait aqueux présente la plus grande valeur d'IC50 (2518 μ g/mL) donc de plus faible activité anti-DPPH' suivi par celle de l'extrait méthanolique avec une IC50 de 1771 μ g/mL. Le standard (quercitine) dans les mêmes conditions marque la plus faible valeur d'IC50 (16.98 μ g/mL), donc l'activité anti-DPPH' la plus importante.

La valeur IC50 de l'activité antiradicalaire des feuilles de *Rhamnus alaternus* obtenue est comparée avec l'étude de Boussahel et ses collaborateurs (2013) qui ont trouvés une IC50 = 82 \pm 0,6 μ g/mL, une autre étude réalisée par Kosalec et ses collaborateurs (2013) sur l'écorce de *R. alaternus* en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction avec une valeur de IC50=78,7 \pm 3 ,166 μ g/mL inférieure à nos résultats avec une activité plus forte. D'autre part, ces résultats sont complètement différents des résultats de Ben Ammar et ses collaborateurs (2008) où ils ont trouvé une valeur d'IC50 de 7 et 19 μ g/ml des racines, et feuilles, respectivement, lorsque l'extraction a été faite dans le méthanol suivie par une extraction dans le butanol saturé en eau. La différence de l'activité antioxydante des études précédentes est due aux différents parti utilisés et leurs teneurs en composés phénoliques ainsi que leurs compositions (Kahkonen *et al.*, 1999).

L'analyse chimique des feuilles de *Rhamnus alaternus* confirment l'existence de propriétés antioxydants révélées par le test du radical DPPH', dont les résultats obtenus montrent que la richesse de *Rhamnus alaternus* en polyphénols surtout en flavonoïdes, Ces derniers sont des composés phénoliques connus par leurs activités antioxydante et antiradicalaire (Barreca *et al.*, 2011). Mais la qualité de ces molécules serait beaucoup plus intéressante puisqu'elle détermine l'ampleur de propriétés biologiques (Bettaieb *et al.*, 2016). L'action de ces antioxydants est supposée d'être due à leur structure, au nombre de groupements donneurs d'hydrogène et au nombre élevé des groupements hydroxyles présentant une activité antioxydant élevée(Heim *et al.*, 2002).

IV.3. Activité scavengings du radical ABTS

L'activité antiradicalaire des extraits de *Rhamnus .alaternus* a été évaluée par le test de l'ABTS. La méthode de radical ABTS^{•+} est l'un des tests les plus utilisés pour la détermination de l'activité antioxydante pour une large diversité de substance.

Le pourcentage d'inhibition du radical cationique ABTS^{•+} par les différents extraits étudiés de *R.alaternus* et du standard sont présentés dans les figures 18 et 19 respectivement.

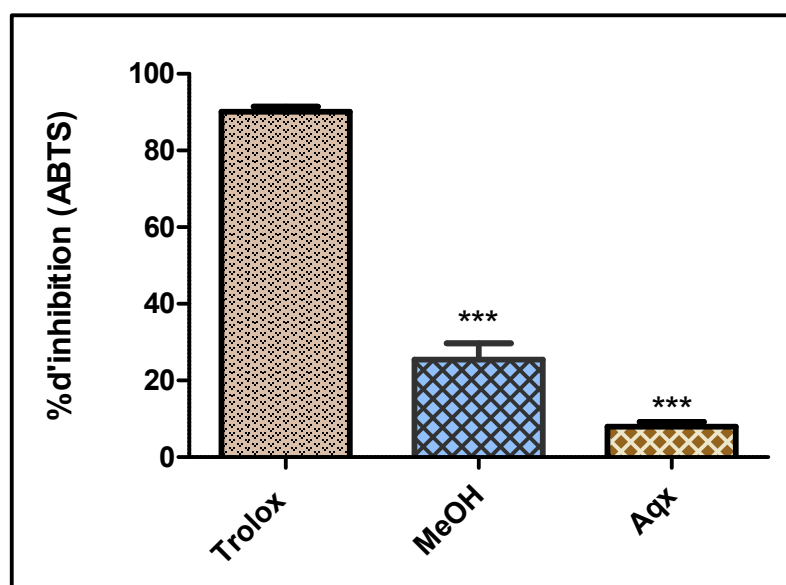


Figure 09: Activité anti-radicalaire des extraits et le standard à une concentration de 100µg/mL. Trolox , MeOH: extrait méthanolique, Aqx: extrait aqueux. La différence est significative à * $p < 0.05$, très significative à ** $p < 0.01$ et très hautement significative à *** $p < 0.001$ comparé au contrôle ou standard (Quercétine).

Nos résultats (figure 09) ont révélé une différence très hautement significative (** $P < 0.001$) de l'activité antiradicalaire des deux extraits comparés au contrôle positif (trolox). Nous avons remarqué que le standard ainsi que les deux extraits présentent la capacité de piéger le radical ABTS^{•+}, mais à des pourcentage différents et dans les mêmes concentrations (100µg/ml). Le trolox a enregistré le taux d'inhibition le plus élevé 90,11% par rapport aux deux extraits, dans lesquels l'extrait méthanolique a enregistré un taux de 25,49% tandis que l'aqueux a enregistré le taux le plus faible avec 7,97%.

Rhamnocitrin-3-O-isorhamnoside et le Kaempférol-3-O-isorhamnoside sont les deux composés flavonoidiques de *Rhamnus alaternus* étudiées par Bhourri et ses collaborateurs (2011), leur effets anti-radicalaire contre l'ABTS ont noté des pourcentages d'inhibition de 72% et 97% respectivement à une concentration (200 µg/mL) qui est deux fois plus importante que celle utilisée dans la présente étude.

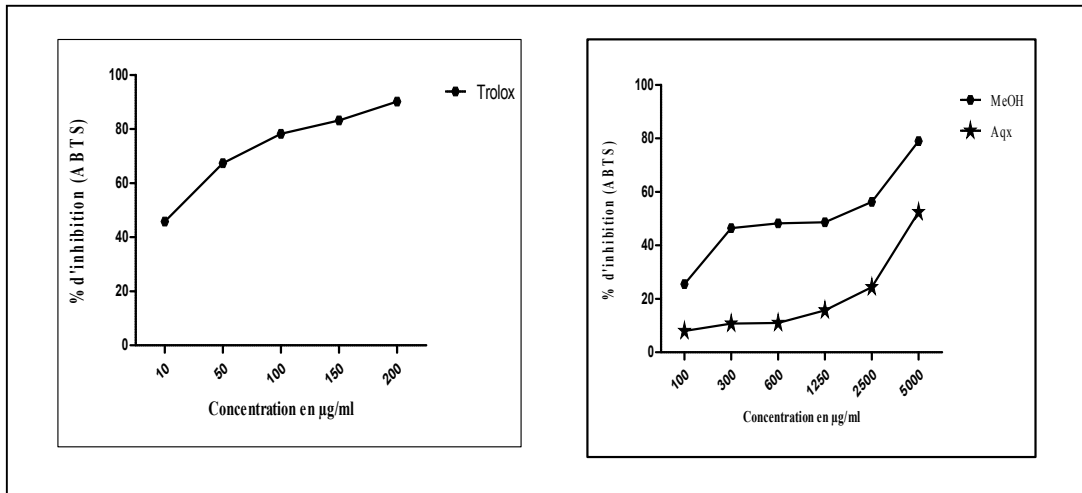


Figure 10 : Activité scavenger d'ABTS en fonction de la concentration des différents solvants.

La figure 10 nous confirme que l'extrait méthanolique présente une activité antioxydante plus forte qui dépasse 75% d'inhibition à 500 µg/mL, comparé à l'extrait aqueux de notre plante étudiée qui atteint pas les 55% à une même concentration.

A partir de ces données, les concentrations qui ont piégé 50% (IC50) du radical ABTS^{•+} de chaque solvant ont été déterminées dans le tableau VIII.

Le tableau VIII montre que l'extrait MeOH exhibe une faible concentration contre le radical ABTS (1557µg/ml) et présente une activité antioxydante puissante. L'extrait aqueux détient la concentration la plus importante, donc l'activité antioxydante la plus faible. Ces résultats montrent que l'extrait méthanolique et aqueux de *R.alaternus* possèdent un potentiel antioxydant dû aux polyphénols notamment les flavonoïdes qui stabilisent le radicale peroxyde par donation d'hydrogène. En effet, des études ont démontré l'existence d'une relation étroite entre le contenu en polyphénols du matériel végétal et sa capacité antioxydante (Kahkonen *et al.*, 1999).

Mais qui reste des activités faibles comparées au phénol synthétique (trolox). Ce qui signifie que l'efficacité du trolox à piéger les radicaux libres est largement meilleure que celle des polyphénols présents dans la plante étudiée.

Les résultats de l'activité antiradicalaire obtenus ne sont pas en accord avec ceux trouvés par Bhourri et ses collaborateurs (2011). Avec une IC50 de 150 µg/mL et de 120 µg/mL, successivement pour Rhamnocitrin-3-O-isorhamnoside et le Kaempférol-3-O-isorhamnoside. Et ceux trouvés par Bakchiche et Gherib (2014) sur les feuilles de *Zizyphus lotus* L (qui appartient à la même famille que *R.alaternus*, (famille des Rhamnaceae)) qui a trouvé une IC50 = 490µg/mL des résultats inférieurs aux nôtres avec une activité plus forte.

Le niveau de corrélation entre le contenu phénolique et l'activité antioxydante des espèces végétales est un aspect intéressant

sant, mais il faut prendre en considération que les composés phénoliques répondent différemment; selon le nombre et la qualité des groupes (Amamri et Cheikh, 2016). Dans la présente étude l'extrait aqueux manifeste par la plus importante teneur en polyphénols totaux ainsi qu'au flavonoïde, mais avec une activité antioxydante élevée au niveau de l'extrait méthanolique. Il convient de dire que la qualité de ces molécules serait beaucoup plus intéressante puisqu'elle détermine l'ampleur de leurs propriétés biologiques (Bettaieb *et al.*, 2016).

VI.5. Chélation du fer ferreux

La chélation du fer ferreux a été évaluée en utilisant la ferrozine qui forme un complexe avec le fer résiduel dans le milieu réactionnel et forme un chromophore rouge (Fe(II) –Ferrozine) ayant un maximum d'absorption à 562nm.

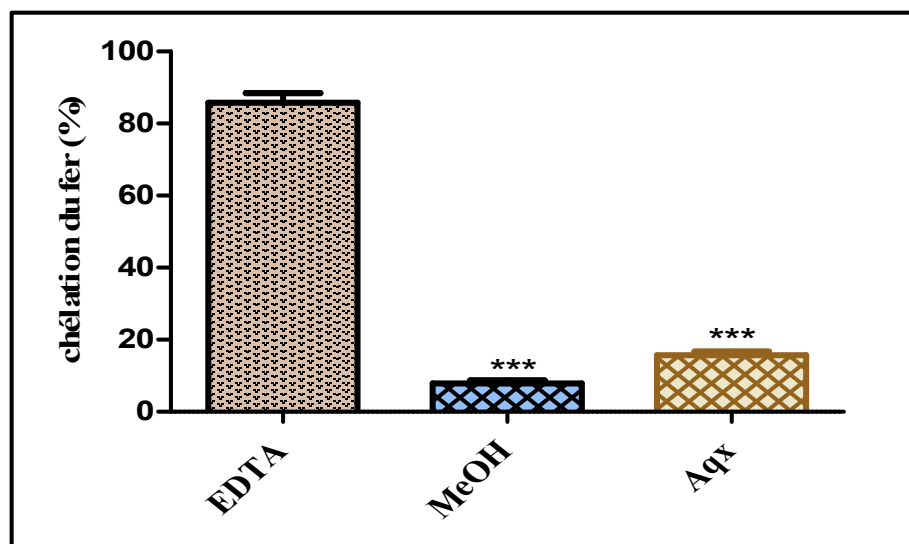


Figure 11: Activité chélatrice des extraits et le standard à une concentration de 100µg/mL. EDTA, MeOH: extrait méthanolique, Aqx: extrait aqueux. La différence est significative à * $p < 0.05$, très significative à ** $p < 0.01$ et très hautement significative à *** $p < 0.001$ comparé au contrôle ou standard (Quercétine).

Nos résultats ont révélé une différence très hautement significative (** $P < 0.001$) du pouvoir chélateur des deux extraits comparés au contrôle positif (trolox).

À partir des profils de chélation obtenus dans la figure 11, Nous remarquons les deux extraits présentent un faible pouvoir chélateur, un pourcentage maximal de l'ordre de 15,86% pour l'aqueux et de 7,84% pour l'extrait méthanolique, comparés avec la molécule de référence l'EDTA qui marque une valeur importante de 85,80% donc un pouvoir chélateur important par rapport aux extraits testés dans les mêmes conditions.

A notre connaissance, Aucun résultat sur l'activité chélatrice n'a été rapporté par d'autres auteurs sur *Rhamnus alaternus* pour pouvoir comparer nos résultats.

La présence de saponine dans les extraits aqueux peuvent intervenir dans l'expression du pouvoir chélateur (Ashraf *et al.*, 2013). Sachant que l'extrait aqueux de notre plante a présenté une faible présence en saponine ((+) test faiblement positif lors de notre étude phytochimique, et une absence totale de la mousse dans l'extrait méthanolique ((-) Test négative). Cette différence pourrait être la raison pour laquelle il y a une différence de pourcentage de chélation entre ces deux extraits. Et cette absence en saponine pourrait être aussi la raison pour ne pas avoir un bon pouvoir chélateur de *R.alaternus*.

Non seulement les composés phénolique qui sont à l'origine de la principale activité chélatrice, mais en fait c'est un mélange d'acides organiques, d'acide aminés et de sucres qui peuvent contribuer a la séquestration des métaux de transition (Wong *et al.*, 2006).

CONCLUSION ET

PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Les remèdes végétaux sont à l'origine des médicaments, dont les polyphénols qui sont les composés les plus intéressants et les plus étudiés de nos jours. .

Le présent travail a porté sur l'étude qualitative, quantitative et biologique (antioxydante) des extraits ; méthanolique et aqueux des feuilles de *R.alaternus*. Plante appartenant à la famille des Rhamnaceae.

L'extraction à partir des feuilles de la plante a permis d'obtenir des rendements qui diffèrent en fonction des solvants utilisés, alors que la teneur en composés phénoliques, flavonoïdes était conséquente. Les résultats obtenus montrent que l'extrait aqueux a présenté le rendement plus élevé par rapport à l'extrait méthanolique. Le screening phytochimique révèle la présence de quelques composés phénoliques, à savoir les flavonoïdes, alcaloïdes, terpénoïdes, composés réducteurs, et les tanins.

L'évaluation du contenu des phénols totaux en adoptant la méthode Folin-Ciocalteu ont clairement montré que l'eau distillée est plus efficace pour l'extraction avec une teneur de $24,35 \pm 0,877$ mg EAG/g d'extrait. De même pour le dosage des flavonoïdes par la méthode d' $AlCl_3$ qui nous mène à conclure que cette plante est riche en flavonoïdes.

Le test du pouvoir réducteur montre une remarquable activité pour l'extrait méthanolique ($0,53 \pm 0,033$ unité), supérieure à celle de l'extrait aqueux ($0,344 \pm 0,045$ unité).

La mesure de l'activité antiradicalaire de nos extraits, montre que l'extrait méthanolique présente un pouvoir antioxydant vis-à-vis le radical DPPH \cdot , et le radical cationique l'ABTS $^{+\cdot}$ avec des IC₅₀ d'ordre de 1771 μ g/mL et de 2518 μ g/mL respectivement, tandis que l'extrait aqueux et méthanolique ont montrés une faible activité chélatrice vis-à-vis le Fer avec un pourcentage d'inhibition maximal de 15,86% et de 7,84% respectivement.

Globalement, la plante sélectionnée dans ce travail contient probablement des molécules très intéressantes qui peuvent être considérées comme des agents antioxydants

de première classe et peuvent être employées pour des applications thérapeutiques, sachant que les antioxydants contribuent de manière très efficace à la prévention des maladies telles que le cancer, et les maladies cardiovasculaires.

Au terme de ce travail, il serait intéressant de compléter cette étude en réalisant des fractionnements de l'extrait pour pouvoir isoler la fraction active. Comme il serait aussi intéressant de réaliser des tests *in vivo*, ainsi que d'étudier leur toxicités.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Afonso ., Champy , R., Mitrovic, D., Collin, P., et Lomri, A. (2007). Radicaux libre dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutase : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme*, 74(7) : 636 – 643.

Ait Youssef M. (2006). Plantes médicinales de Kabylie. Edition Ibis Press. ISBN: 978-9961-57-259-7 Paris p 18.

Alam, M. N., Bristi, N.J., Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxydant activity. *Saudi pharmaceutical journal* : SPJ : the official publication of the Saudi Phamaceutical Society. 2 : 143-152.

Alkurd, A., Hamed, T. R., & Al-Sayyed, H. (2008).Tannin contents of selected plants used in jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*. 4 : 265 – 274.

Amana, K.(2007). Les anacardiaceae du togo : Etudes botaniques, Ecologiques et propriétés antifongiques. Thèse de Doctorat de l'Université de Reims Champagne Ardenne. p : 182.

Ashraf M.F M., Aziz A., Stanslas J., Ismail I., et Abdul Kadir M.(2013). Assessment of antioxidant and cytotoxicity activities of saponin and crude extracts of Chloro phytum borivillianum . *The Scientific World Journal*: 1 - 7.

Bahorun, T., Gressier, B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luychx M ., Vasseur J., Cazin M., Cazin J.C., and Pinkas M. (1996). Oxygène species scavenging activity of phenolic extracts from haw torn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneiml Forschung*. 46(11) :1086-1089.

Bakchiche, B., Erib, A., (2014). Activités antioxydantes des polyphenols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle d'Algérie. *International Journal of Innovation and Applied Studies* ISSN.9(1) :167-172.

Barreca, D., Bellocco, E., Caristi, C., Leuzzi, U., Kumquat, G.G. (2011). Fortunella japonica swingle juuice : Flavonoid distribution and antioxydant properties. *Food Research International*. 44 :2190-297.

Bayala, B. (2014). Etude des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoire, antiprolifératives et anti-migratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate et de glioblastomes. Thèse de Doctorat de l'Université Blaise Pascal. p : 141.

Bhourri, W., Ben Sghaier, M., Kilani, S., Bouhlel ,I., Dijoux-Franca M. G. Ghedira K. Ghedira L. C. (2011). Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): Kaempferol 3-O-bisorhamminoside and rhamnocitrin 3-O-b-isorhamminoside. *Food and Chemical Toxicology* .49 : 1167–1173.

Ben Ammar, R., Bhourri, W., Ben Sghaier, M., Boubaker, J., Skandrani, I., Neffati, A., Bouhlel, I., Kilani, S., Mariotte, A.M., Chekir-Ghedira, L., DijouxFranca, M.G. and Ghedira, K. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids

isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): A structure-activity relationship study. *Food Chemistry*.116: 258–264.

Ben Ammar, R., Ben Sghaier, M., Boubaker, J., Bhouiri, W., Naffeti, A., Skandrani, I., Bouhlel, I., Kilani, S., Ghedira, K. and 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 Interactions*.174: 01-10.

Ben Ammar, R., Kilani, S., Bouhlel, I., Skandarani, I., Naffeti, A., Boubaker, J., Ben Sghaier, M., Bhouiri, W., Mahmoud, A., Chekir-Ghedira, L. and Ghedira, K. (2007). Antibacterial and cytotoxic activities of extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae). *Annals of Microbiology*.57(3): 453-460.

Ben Ghezala, H., Chaouali, N., Gana I., Snouda, S., Nouioui, A., Belwaer, I., Ouali J., Kaddour, M., Masri, W., Ben Salah D., Amira D., Ghorbal, H. and Hedhili A. (2015). Toxic Effects of *Rhamnus alaternus*: Case Report Emergency Mediteranean. Sous press.

Berger, M .M.(2006).Manipulations nutritionnelles du stress oxydant: état des connaissances *Nutrition clinique et métabolisme*.20 :48-53.

BettaiebRebey, L., Sriti, J., Besbes, B., MakhaddminiHammi, I., Hamrouni, A., Sllami, B., Marzouk, B. and Ksouri, R. (2016). Effet de la prevenance et du solvant d'extraction sur la teneur en composes phénolique et les potentialités antioxydantes des grains de fenouil (*Foeniculumevulgare* Mill), *Journal of New Sciences*. 27(4) :1478-1487.

Bijoy, M., Jayati, S. et Prabir, K.S. (2008). Antioxidant activities of soybean as affected by Bacillus-fermentation to kinema. *Food Research International*. 41:586-593.

Boligon, A. A., Machado,M.M., Athayde,M.L.(2014).Tecknical evaluation of antioxydant activity. *Medicinal chemistry* 4517-522.

Bourgou, S., Ksouri R., Bellila A., Skandrani I., Falleh H., Marzouk B. (2008). Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots.Comptes rendues Biologies. 331: 48-55.

Boussahel,S., Dahamma, S., Ruberto,G., Siracusa,L., Harzallah, D.(2013).Phytochemical study and antioxidant activities of leaves extracts from *Rhamnus alaternus* L.pharmacognosy Communications. 3 :46-47.

Cai, H. et Harrison D.G. (2008). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidant stress. *Circulation Research*. 87: 840- 844.

Ciulei Ioan.(1982). Pratical manuals on the industrial utilization of chemical and aromatic plants. Methodology for analysis of vegetable drugs Ed. ministry of chemical industry, Bucharest.P 67

Debeaux JO. (1984). Flore de la Kabylie du Djurdjura, ou, Catalogue méthodique et raisonné de toutes les plantes vasculaires et spontanées observées jusq'à ce jour dans cette contrée. Edition Paris ,81-82.

Delattre, J., Beaudoux, J.L., Bonneont-Rousselot, D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant : aspect biologiques et pathologiques. Lavoisier Edition TEC et DOC Editions médicales internationales. Paris, P405.

- Devasagayam T.P., Tilak J.C., Bloor K.K., Sane K. S., Ghaskadbi S.S. et Lele R. D. (2004).** Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Journal of the Association of Physicians of India* .52:794- 804.
- Donnet J. (2001).** L'athérosclérose. *Médecine science*, 17(5) :559-567.
- Elqaj M., Ahami A. et Belghyti D.(2007).** "La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires". *Journal scientifique "ressources naturelles et antibiotiques"*.Maroc.
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui , N., Trabelsi ,N., Boulaaba M and Abdelly C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*. 331:372-379.
- Favier A. (2003).** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, p: 108-115.
- Favier, A. (2006).** Stress oxydant: Stress oxydant et pathologies humaines. Département de biologie intégrée du Chu de Grenoble, F 38700 La Tronche, et SCIB-LAN Centre nucléaire de Grenoble, F 38054 Grenoble.64 : 390-396.
- Ferrari , J. (2002).** Contribution à la connaissance du métabolisme secondaires des Thymelaceae et investigation phytochimique de l'une d'elle: *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich. *Thèse de doctorat*. Lausanne. P242
- Ganther H.E. (1999).** Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis*.20 (19): 1657- 1666.
- Gulçin I. (2012).** Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*. 86: 345-391.
- Gulias, J., Traveset, A., Riera, N. and Mus, M. (2004).** Critical stage in the recruitment process of *Rhamnus alaternus* L. *Annal of Botany*.93: 723 -731.
- Haleng, J. Pincemail, J.O. Defraigne, C. Charlier, J.P. Châpelle. (2007).** Le stress oxydant. Lucienne ALI-DELILLE. (2010). les plantes médicinales d'algérie. 2^{ème} édition : BERTI Editions. Alger, 32p.
- Halliwell, B., Whiteman, M. (2004).** Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture : how should you do it and what do the results mean. *British journal of pharmacology*. 142: 31-2.
- Hebi, M., & Eddouks, M. (2016).** Evaluation de l'activité antioxydante de *Stevia rebaudiana*. *Phytothérapie* 14 : 17 – 22.
- Heim, K., Tagliaferro, A.(2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 13(10): 572-584.
- Jacques B, and André R. (2004).** Biochimie métabolique *Ed ellipses*. Paris. pp: 217-219, 220-223.

- Kahkonen, M.P., Hopia, A. I., Vuorela, H.J., Rauha J.P., Pilaja, K., Kujala, T.S. and Heinonen, M. (1999).**Antioxydant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.47 :3954-3962.
- Khettal, B., Zaidi, A., Tacherfiout, M., et Sobhi, W.(2011).** Effet des extraits de feuilles de *Rhamnus alaternus* à activités antioxydant et antilipasique sur la masse corporelle et le métabolisme des lipides des souris nouries avec un régime enrichie en carbohydrates. *Nutrition clinique et métabolisme*, 28 : S 149-150.
- Kosalec, I., Kremer, D., Locatelli, M., Epifano, F., Genoverse, S., Carlucci, G., Randic, M and Zovkonic, M. (2013).** Anthraquinone profile, antioxidant and antimicrobial activity of bark extracts of *Rhamnus alaternus*, *R. fallax*, *R. intermedia* and *R. pumila*. *Food chemistry*.136 :355-341.
- Lesgards J. F ; Prasn M ; Lehucher-Michel M.P(2002).** Le stress oxydatif et ses implications. *Supplément scientifique*. 2(3) :14-19.
- Linard A., QUEMIN J., PARIS R. (1976).** Plantes Malgaches No XXI sur les flavonoïdes du *Xyris Semfuscata*(xyridacées). *Plantes Rtiédicinales et Phytothérapie Torne X*. 11(4) : 267-275.
- Ljubuncic P., Azaizeh H., Portnaya I., Coganc U., Said O., Saleh K.A., BomzonA. (2005).** Antioxidant activity and cytotoxicity of eight plants used in traditional Arabmedicine in Israel, *Journal of Ethnopharmacology*. 99:43–47.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., et Jay- Allemand, C.H. (2005).** Les composée phénoliques des végétaux. *Presses Polytechniques et Universitaires Romandes*,P;1-31.
- Meddour ,A., Yahia, M., Benkiki ,N., Ayachi ,A.(2013).** Étude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *Capparis spinosa* L. *Lebanese Science Journal*.14(1) :49-60.
- Molyneux, P., 2004.** The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songkanakarinn J .Sci. Technol*.26 :211-219.
- Moussi, K ., Nayak, B., Brian. P.B., Dahmoune, F., Madani, K., Chibane, M. (2015).** HPLC- DAD profile of phenolic compounds and antioxidant activity of leaves extract of *Rhamnus alaternus* L. *Industrail Corps and products*. 74 :858-866.
- Nacz, M. and Shaidi, F.(2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*.1054 :095-111.
- Naithani, V., Nair, S. and Kakkar, P. (2006).** Decline in antioxydant capacity if Indian herbal teas during storage and its relation phenolic content. *Food Research International*. 39: 176-1
- Nascimento, M.S. , Santana, A. , Maranhao, C.A., Oliveira,L.S., Bieber, L.,2013.**Phenolic extratives and natutal resistance of wood,in : chamy,R., Rasenkranz,F. (Eds), biodegradation-Life of science . In Tech, pp. 349-370.
- Pinemail, J., Karine, B., Karine, C. et Jean-Olivier, D.(2002).** Mécanismes Physiologiques de la Défence Antioxydante. *Physiological Action of Antioxydant Defences Nutrition Clinique et métabolisme*.16(6) :233-239.

- Pham-Huy LA., He H & Pham-Huy C. (2008).** Free radicals, antioxidants in disease and health, *International Journal of Biomedical Science*. 4 : 89-96.
- Rameau D, Mansion G, Dumé C(2008).** Flore forestière française, guide écologique illustré, région méditerranéenne ministère de l'agriculture et de la pêche. P2426.
- 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 & medicine*. 26 (9): 01231–1237.
- Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Sudraud, P. et Ribéreau-Gayon, P. (1982).** Composés phénoliques. In « traité d'oenologie, science et technique du vin ». *Edition Dunod*, 477-499.
- Ribéreau-Gayon, p. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux .Edition. Dunod, p254.
- Ryan, M. T., Muller, H., & Pfanner, N. (1999).** Functional staging of ADP/ATP carrier translocation across the outer mitochondrial membrane. *Journal of Biomoléculel Chemécal*. 274 (29) : 20619 – 20627.
- Sahabi , B. (2009).** Etudes phytochimique et potentialités biologiques de cinq espèces d'indigofera (FABACEAE) utilisées en médecine traditionnelle au Burkina Faso. Thèse de Doctorat de Sciences Biologiques Appliquées, Université d'Ouagadougou. p:36.
- Servais, S (2004).** Altération mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'azote : effet de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3. *Thèse de doctorat université claudes bernardes- lyon I*.
- Shon, M.Y., Kim T.H., Sung N.J.(2003).** Antioxydants and free radical scavenging activity of phellinus baumii phellinus of Hymenochaetaceae extracts. *Food Chemistry* .82 : 593-597.
- Soulama, S., Sanon H O., Meda R N T., Boussim J I. (2014).** Teneur en Tanins de 15 ligneux fourragers de burkina faso. *Afrique Science*. 10(4):180-190.
- Tsahar, E., Friedman, J., Izhaki, I. (2002).** Impact on fruit removal and seed predation of a secondary metabolite, emodin, in *Rhamnus alaternus* fruit pulp. *OIKOS*. 99 :290-299.
- Waston, R. R., Preedy, V. R., & Zibadi, S. (2013).** Polyphenol in Human Health and Disease. Edition *Academic Press is an Imprint of Elsevier*, p 643.
- Wong SP, Leong LP and William Koh JH (2006)** antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chem*, 99, 775-783.
- Yaniv, Z., Shabelsky, E., Shafferman D., Granot I. and Kipnis T.(1998).** "Oil and fatty acid changes in Sinapis and Crambe seeds during germination and early development". *Phytochemistry*. 9 (1) :1-8.
- Yildirim, A., Oktay, M., Bulaglu, V.(2001).** The antioxidant activity of the leaves of *Cydonia vulgaris*. *Turk J Med Sci* .31 :23-27.
- Yi-ling,C. et Pan-Kai,C.(1982).** Rhamnaceae.In : Chen Yi-ling,ed.,*Fl.Reipubl. populairis Sin*,48(1) :1-169.

ANNEXES

Annexe N°01

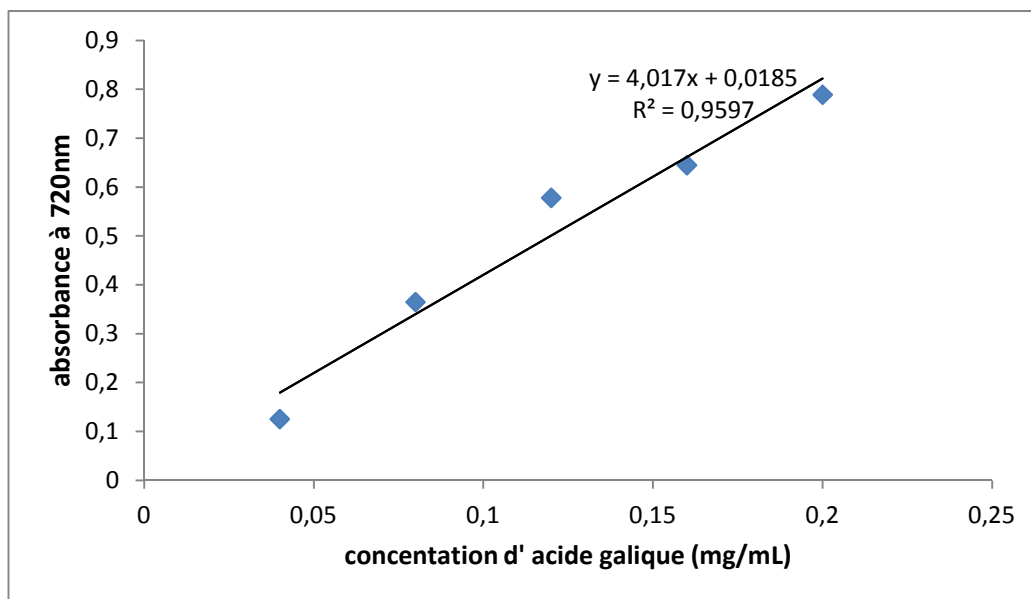


Figure 01: Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux

Annexe N°02

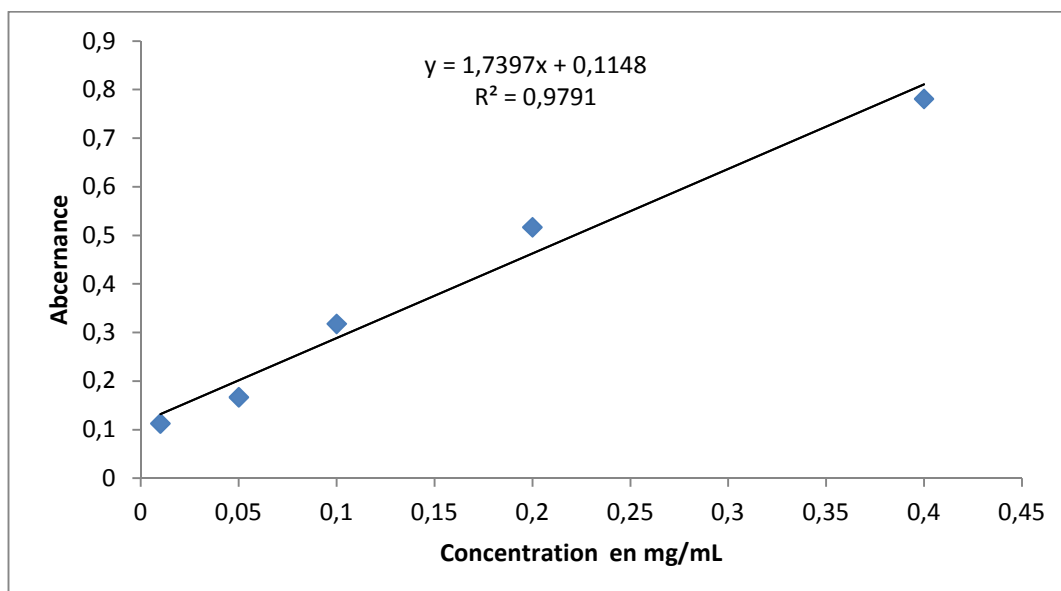


Figure 02: Courbe d'étalonnage des flavonoïdes

Résumé

Notre travail a porté sur l'étude des extraits bruts des feuilles de plante *Rhamnus alaternus* L. Appelée localement « Mlisse » classée parmi les plantes médicinales. Deux extraits bruts ont été préparés à partir des feuilles de cette plante, l'un méthanolique, l'autre aqueux. L'évaluation du contenu en polyphénols montre que les teneurs en ces composés varient entre $16,56 \pm 0,660$ et $24,35 \pm 0,877$ $\mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait. Teneurs maximales ont été détectées dans l'extrait aqueux. De même pour les flavonoïdes varient entre $10,69 \pm 1,14$ et $18,16 \pm 0,76$ $\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait. Les tests phytochimiques révèle la présence des flavonoïdes, Alcaloïdes, Terpénoïdes et les composés réducteurs. L'évaluation de l'activité antioxydante des deux extraits par la méthode de réduction de fer est maximale ($0,85 \pm 0,009$ unité d'absorbance) au niveaux de l'extrait MeOH, le même extrait marque les plus faible IC50 de (1771 $\mu\text{g/ml}$ et 1557 $\mu\text{g/ml}$) respectivement pour l'activité anti-DPPH[•] et anti-ABTS⁺⁺, pour le test de chélation du fer l'extrait aqueux marque le pourcentage d'inhibition le plus important (15,86%)

Mots clés : *Rhamnus alaternus* L, activité antioxydante, polyphénols, flavonoïdes.

Abstract

Our work focused on the study of the crude extracts of leaves of *Rhamnus alaternus* L. Locally called « Mlisse » classified within medicinal plants. Two crude extracts were prepared from the leaves of this plant, a methanolic, and an aqueous. The evaluation of the polyphenols content shows that the levels of these compounds vary between $16,56 \pm 0,660$ and $24,35 \pm 0,877$ $\mu\text{g EAG/mg}$ extract. Maximum levels were detected in the methanolic extract. Similarly, the flavonoids extracts vary between $10,69 \pm 1,14$ and $18,16 \pm 0,76$ $\mu\text{g EQ/mg}$ extracts. Phytochemical tests reveal the presence of flavonoids, alkaloids, Terpénoïdes and reducing compounds. The evaluation of antioxidant activity of both extracts by the method of reduction of iron is maximum ($0,85 \pm 0,009$ unit of absorbance) in the niveaux of extract, the same extract marks the weakest IC50 (1771 $\mu\text{g/ml}$ et 1557 $\mu\text{g/ml}$) respectively for activity anti-DPPH[•] and anti-ABTS⁺⁺, for the test of chélation some iron aqueous extract marks the most important percentage of inhibition (15,86 %).

Key words: *Rhamnus alaternus* L, antioxidant activity, polyphénols, flavonoids

الملخص

يرتكز هذا العمل علي تحليل مستخلصات اوراق مسمات محليا (مليس). في هذا السياق حاولنا تقديم كمية المركبات الفينولية لهذه النبتة حيث من خلال النتائج المتحصل عليها لهذه النبتة. حيث من خلال النتائج المتحصل عليها يظهر لنا وجود المركبات الفينولية بكميات متفاوتة بين 16.56 و 24.35 ملغ مكافئ حمض الغاليك/ غ من المستخلص. نفس الشيء لكمية الفلافونويدات في المستخلص تتراوح بين 10.69 و 18.16 ملغ مكافئ حمض الكارستين/ غ من المستخلص. اظهرت

لنا الكشف الكيميائي عن وجود كل من الفلافونويدات و الريبونويدات والمركب المرجع. تم تحديد مضاد الأكسدة بتقنية قدرة الارجاع (0.85 وحدة الامتصاص) بأعلى نسبة للمستخلص MeOH نفس المستخلص تحصل أعلى IC50

(1771 $\mu\text{g/ml}$ و 1557 $\mu\text{g/ml}$) لمضاد HDPP و مضاد SABB علي توالي. تحصل المستخلص AQ علي أعلى نسبة

. 15,86%

الكلمات الرئيسية: *Rhamnus alaternus* L, مضاد الاكسدة. البولي فينول. الفلافونويد.