

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

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



**Réf : .....**

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

**MASTER**

*Thème*

*Etude du potentiel bioactif et des activités  
biologiques de Rhamnus alaternus*

Présenté par :

**Benabderrahmane Cylia & Belayel Samira**

Soutenu le : 14 Septembre 2022

Devant le jury composé de :

|                   |            |              |
|-------------------|------------|--------------|
| Mme Khettal B.    | Professeur | Président    |
| Mr Tacherfiout M. | MCB        | Encadreur    |
| Mme Ait Atmane S. | MAB        | Co-encadrant |
| Mme Kasmi S.      | MCB        | Examineur    |

**Année universitaire : 2021/2022.**

## *Dédicace.*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Ma très chère mère qui a sacrifiée ses belles nuits rien pour que me  
voire réussir, et qu'a été toujours pour moi une source de tendresse et de  
courage.*

*Mon très cher père qui est ma source d'espoir, du savoir, son  
courage et sa patience toujours pour moi autant d'exemple.*

*Mes chers sœurs et frères : Selma, Amel, Asma, Céline, Karim,  
Mohamed.*

*Tous mes proches.*

*Mes meilleures amies.*

*Ma binôme Samira.*

*Tous mes camarades de promotion.*

*Tous mes enseignants.*

*Tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire.*

*Cylia.*

# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail*

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

*À la mémoire de ma chère grand-mère que dieu la garde dans son vaste paradis.*

*À toute ma famille, mes frères, mes sœurs et mes chers neveux et nièces que Dieu les Protège, je les souhaite la réussite dans leur vie privée.*

*À mon encadrant M<sup>r</sup> Tacherfiout.*

*Et finalement, à mes ami(e)s qui n'ont jamais cessé(e) de me soutenir : Kenza, Ahmed, Taima, Lydia, Nadjjet et sans oublier ma binôme Cylia.*

*Samira.*

## **Remerciements**

*Nos remerciements et notre vive reconnaissance à notre encadrant M<sup>r</sup> TACHERFIOUT Mustapha pour avoir accepté de nous encadrer et diriger ce travail par excellence. Aussi bien pour sa disponibilité, ses pertinents conseils, pour l'ambiance sympathique qu'il a créé lors de la réalisation de ce travail et surtout pour sa confiance et sa patience, qui nous ont permis d'avancer dans notre recherche.*

*Nous remercions également notre Co-encadrant, Mme Ait Atmane S. pour sa disponibilité, ses conseils et ses encouragements.*

*Nos sincères considérations et remerciements sont également exprimés aux membres du jury : Mme Khettal B. qui nous a fait l'honneur de présider ce jury, Mme Kasmi S. d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nous tenons aussi à remercier et exprimer notre reconnaissance à l'ingénieur de laboratoire biologie et physicochimique pour sa gentillesse et sa sympathie.*

*Nos remerciements s'adressent aussi à tous nos enseignants qui nous ont transmis leur savoir, ce qui nous a permis d'acquérir les connaissances indispensables pour réaliser ce travail.*

*Nous témoignons enfin notre reconnaissance à tous ceux et celles ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de notre mémoire de fin de cycle.*

***Cylia et Samira***

**ABTS:** acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)

**AINS:** anti-inflammatoires non stéroïdiens

**AIS:** anti-inflammatoires non stéroïdiens

**AOX:** antioxydants

**CAT:** Catalase

**COX:** cyclooxygénase

**DMSO:** Diméthylsulfoxyde

**DPPH:** 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle

**EAG:** Equivalent d'acide gallique

**EARA:** Extrait aqueux *Rhamnus alaternus*

**EC:** Equivalent de catéchine

**EMRA:** Extrait méthanolique *Rhamnus alaternus*

**EQ:** Equivalent de quercétine

**ERA:** Ecorce de *Rhamnus alaternus*

**ERO:** Espèces réactives de l'oxygène

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peroxyde d'hydrogène

**IL:** interleukine

**GC :** glucocorticoïde

**GPx:** Glutathion peroxydase

**PGE:** prostaglandine

**PMN :** polynucléaires macrophages neutrophiles

**RL:** Radical libre

**SOD:** Superoxydes dismutase



**Liste des figures**

| N°        | Titre  | Page      |
|-----------|--|-----------|
| <b>1</b>  | Arbuste de <i>Rhamnus alaternus</i> (A) écorce nettoyé (B) écorce à l'étuve (C) et poudre fine (D)   | <b>13</b> |
| <b>2</b>  | Teneurs en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique et aqueux de l'écorce de <i>R. alaternus</i> .   | <b>23</b> |
| <b>3</b>  | Teneurs en flavonoïdes de l'extrait des méthanolique et aqueux de <i>R. alaternus</i>  | <b>24</b> |
| <b>4</b>  | Teneurs en flavones et flavonols de l'extrait méthanolique et aqueux de l'écorce de <i>R. alaternus</i>  | <b>24</b> |
| <b>5</b>  | Teneurs en tanins condensés de l'extrait méthanolique et aqueux de l'écorce de <i>R. alaternus</i> .   | <b>25</b> |
| <b>6</b>  | Histogramme de l'effet scavenger du radical DPPH par les extraits méthanolique et aqueux de l'écorce de <i>R. alaternus</i> à différentes concentrations.                                | <b>26</b> |
| <b>7</b>  | Histogramme de l'effet scavenger du radical ABTS par les extraits méthanolique et aqueux de l'écorce de <i>R. alaternus</i> à différentes concentrations.                                | <b>27</b> |
| <b>8</b>  | Activité antioxydante utilisant le phosphomolybdate d'ammonium des extraits méthanolique et aqueux de l'écorce de <i>R. alaternus</i> .  | <b>28</b> |
| <b>9</b>  | Courbes des absorbances obtenues de la réduction du fer ferrique en fer ferreux par les extraits méthanolique et aqueux de l'écorce de <i>R. alaternus</i> à différentes concentrations. | <b>29</b> |
| <b>10</b> | Effet de l'extrait méthanolique de L'écorce de <i>R. alaternus</i> sur le nombre de contraction abdominale induit par l'acide acétique.  | <b>30</b> |
| <b>11</b> | Effet analgésique de l'extrait méthanolique de l'écorce de <i>R. alaternus</i> sur la douleur (temps de léchage) induite chez la souris par injection du formaldéhyde.                   | <b>30</b> |
| <b>12</b> | Effet de l'extrait méthanolique de L'écorce de <i>R. alaternus</i> sur l'œdème de l'oreille induit par xylène chez la souris.  | <b>31</b> |

**Liste des tableaux**

| <b>N°</b>   | <b>Titre</b>   | <b>Page</b> |
|-------------|--|-------------|
| <b>I</b>    | Classification scientifique de <i>R. alaternus</i>   | <b>2</b>    |
| <b>II</b>   | Les composés biochimiques de <i>R. alaternus</i> .   | <b>3</b>    |
| <b>III</b>  | Usage traditionnel de <i>R. alaternus</i> .  | <b>4</b>    |
| <b>IV</b>   | Principales sources de production des radicaux libres.   | <b>6</b>    |
| <b>V</b>    | Structures des différents composés phénoliques accompagnées de quelques mécanismes antioxydants.   | <b>8</b>    |
| <b>VI</b>   | Principaux glucocorticoïdes.   | <b>11</b>   |
| <b>VII</b>  | Exemples d'anti-inflammatoires non stéroïdiens.  | <b>11</b>   |
| <b>VIII</b> | Plantes à activité anti-inflammatoires.  | <b>12</b>   |
| <b>IX</b>   | La masse et le rendement des extraits  | <b>22</b>   |
| <b>X</b>    | Valeurs des IC50 des extraits méthanolique et aqueux de l'écorce de <i>R. alaternus</i> , ainsi que les standards vis-à-vis du radical DPPH. | <b>27</b>   |
| <b>XI</b>   | Valeurs des IC50 des extraits méthanolique et aqueux de l'écorce de <i>R. alaternus</i> vis-à-vis du radical ABTS.                           | <b>28</b>   |

# **Table des matières**

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Introduction ..... 1**

**Chapitre I : Synthèse bibliographique**

|  |    |
|--|----|
| I.1. Aperçu sur <i>Rhamnus alaternus</i> .....                 | 2  |
| I.1.1. Caractéristiques morphologiques .....                   | 2  |
| I.1.2. Composition biochimiques .....                          | 3  |
| I.1.3 Usage traditionnel.....                                  | 4  |
| I.1.4 Activités biologiques.....                               | 4  |
| I.1.4.1 Activité antioxydant.....                              | 4  |
| I.1.4.2 Activité antimutagène.....                             | 5  |
| I.1.4.3 Activité anti-inflammatoire .....                      | 5  |
| I.1.4.4 Activité antihyperlipidémique .....                    | 5  |
| I.1.4.5 Activité antimicrobienne .....                         | 5  |
| I.2. Phénomène du stress oxydatif et pouvoir antioxydant ..... | 5  |
| I.2.1. Radicaux libres.....                                    | 5  |
| I.2.2 Stress oxydatif .....                                    | 6  |
| I.2.3 Les antioxydants .....                                   | 6  |
| I.2.3.1 Les antioxydants endogènes (Enzymatiques) .....        | 6  |
| I-2-3-2-Source exogènes (Non enzymatique).....                 | 7  |
| I.3 Inflammation et anti inflammatoires.....                   | 9  |
| I.3.1 Inflammation .....                                       | 9  |
| I.3.1.1 Inflammation aiguë .....                               | 9  |
| I.3.1.2 Inflammation chronique .....                           | 10 |
| I.3.2 Médiateurs de l'inflammation.....                        | 10 |
| I.3.3 Anti-inflammatoires.....                                 | 10 |
| I.3.3.1 Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) .....            | 10 |

|   |    |
|---|----|
| I.3.3.2 Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) .....          | 11 |
| I.3.3.3 Anti-inflammatoires d'origine végétale .....              | 12 |
| <b>Chapitre II : Matériel et méthodes</b>                         |    |
| II.1. Appareillages et produits chimiques.....                    | 13 |
| II.2. Matériel végétal .....                                      | 13 |
| II.3. Préparation des extraits de <i>Rhamnus alaternus</i> .....  | 13 |
| II.3.1. Extraction par macération .....                           | 13 |
| II.3.2. Extraction par décoction .....                            | 14 |
| II.4. Analyses phytochimiques .....                               | 14 |
| II.4.1. Dosage des polyphénols totaux.....                        | 14 |
| II.4.2. Dosage des flavonoïdes.....                               | 15 |
| II.4.3. Dosage des flavones et flavonols .....                    | 15 |
| II.4.4. Dosage des tanins condensés .....                         | 15 |
| II.5. Détermination de l'activité antioxydante.....               | 16 |
| II.5.1. Activité scavenging du radical DPPH.....                  | 16 |
| II.5.2. Activité scavenging du radical ABTS <sup>•+</sup> .....   | 16 |
| II.5.3. Activité antioxydante totale .....                        | 17 |
| II.5.4. Evaluation du pouvoir réducteur.....                      | 17 |
| II.6. Etude des activités analgésique et anti-inflammatoire.....  | 18 |
| II.6.1. Animaux.....  | 18 |
| II.6.2. Activité analgésique .....                                | 18 |
| II.6.2.1. Test de torsion abdominale .....                        | 18 |
| II.6.2.2. Test d'irritation induite par formaldéhyde .....        | 19 |
| II.6.3. Activité Anti-inflammatoire.....                          | 20 |
| II.6.3.1. Test de l'œdème de l'oreille induit par le xylène ..... | 20 |
| II.7. Analyse statistique .....                                   | 21 |

**Chapitre III : Résultats et discussion**

|   |           |
|---|-----------|
| III.1. Résultats et discussion.....                                 | 22        |
| III .1.1. Taux d'extraction.....                                    | 22        |
| III .1.2. Dosage des métabolites secondaires.....                   | 22        |
| III.1.2.1. Teneur en polyphénols totaux.....                        | 22        |
| III.1.2.2. Teneur en flavonoïdes.....                               | 23        |
| III.1.2.3. Teneur en flavones et flavonols.....                     | 24        |
| III.1.2.4. Teneur en tanins condensés.....                          | 25        |
| III.1.3. Détermination de l'activité antioxydant.....               | 26        |
| III.1.3.1. Activité scavenging du radical DPPH.....                 | 26        |
| III.1.3.2. Activité scavenging du radical ABTS.....                 | 27        |
| III.1.3.3. Activité antioxydant totale.....                         | 28        |
| III.1.3.4. Pouvoir réducteur.....                                   | 29        |
| III.1.3 Etude des activités analgésique et anti-inflammatoire.....  | 30        |
| III.1.3.1. Activité analgésique.....                                | 30        |
| III.1.3.1.1. Test de torsion abdominale.....                        | 30        |
| III.1.3.1.2. Test d'irritation induite par le formaldéhyde.....     | 30        |
| III.1.3.2. Activité Anti-inflammatoire.....                         | 31        |
| III.1.3.2.1. Test de l'œdème de l'oreille induit par le xylène..... | 31        |
| III.2. Discussion.....  | 32        |
| <b>Conclusion.....</b>  | <b>38</b> |
| <b>Références bibliographiques.....</b>                             | <b>40</b> |
| <b>Annexes</b>  |           |
| <b>Résumé</b>   |           |

# **Introduction**

## **Introduction**

Depuis l'Antiquité, les plantes médicinales sont largement utilisées pour résoudre les problèmes de la santé. Selon l'OMS, plus de 80% de la population africaine à recours aux plantes pour ses besoins en soins de santé (**Sofowora, 2010**).

De nos jours le traitement par les plantes est reconnu pour sa facilité d'utilisation et son efficacité, en effet le développement des recherches des molécules actives d'origine naturelle remplacent les produits et médicaments chimiques synthétiques qui présentent des effets secondaires indésirables (**Riahi et al., 2013**).

Les études chimiques des plantes ont augmenté au cours de ces dernières années, non seulement pour isoler les principes actifs, mais aussi pour caractériser des métabolites secondaires qui ont des intérêts multiples et qui sont mis à profit dans les industries alimentaires, cosmétique et en pharmaceutique. Parmi ces composés on retrouve, les flavonoïdes, les acides phénoliques, les tannins, les coumarines, les alcaloïdes et les terpènes...etc. (**Bahorun et al., 1996**). Ces composés sont connus pour leur capacité antioxydante très importante, ils peuvent contribuer à la diminution du stress oxydatif. Ils possèdent aussi des propriétés pharmacologiques telles qu'anti-inflammatoire, analgésique.

*Rhamnus alaternus* appartenant à la famille des Rhamnacées a fait l'objet de nombreuses indications thérapeutiques en médecine traditionnelle dans la région méditerranéenne, comme le traitement des complications hépatiques, contre la jaunisse et certaines affections dermatologique (**Harrar, 2018**). Il a été signalé que cette plante contient principalement des composés phénoliques, qu'ils seraient responsables de plusieurs de ses effets pharmacologiques (**Rigane et al., 2013**).

L'objectif de la présente étude est de déterminer la composition phytochimique des deux extraits méthanolique et décoction des écorces de *Rhamnus alaternus* d'une part, et d'évaluer leur l'activité antioxydant (*in vitro*) et leur capacité anti-inflammatoire et analgésique (*in vivo*) d'autre part.

En effet, ce manuscrit est réparti en trois chapitres, le premier chapitre donne un aperçu général de *Rhamnus alaternus*, du phénomène du stress oxydatif et du pouvoir antioxydant ainsi que de l'inflammation et des anti-inflammatoires. Le deuxième chapitre est consacré pour la description de l'étude expérimentale. Tandis que le dernier chapitre résume les résultats obtenus, ainsi que leur interprétation.

# **Chapitre I**

## **Synthèse bibliographique**

# 1. Synthèse bibliographique

## I.1. Aperçu sur *Rhamnus alaternus*

*Rhamnus alaternus*, Mélilés en arabe local et Amliles en kabyle (**Beloued, 2001**) est un arbrisseau de la famille des Rhamnaceae, qui comprend environ 50 genres et 900 espèces (**Richardson et al., 2000**). Cet arbuste pousse lentement mais peut vivre jusqu'à 100 ans, généralement distribué dans tout le bassin méditerranéen, en Asie et en Europe (**Gulias et al., 2004**). Il se développe de façon spontanée sur les coteaux secs et calcaires bien ensoleillés dans les broussailles et forêts du Sud de la France, de la Corse, de l'Algérie et du Nord de la Tunisie (**Ben Ammar et al., 2008**).

*R. alaternus* possède différents noms vernaculaires en fonction des pays et des régions (**Annexe 1**). Sa classification systématique est détaillée dans le Tableau I.

**Tableau I :** Classification botanique de *R. alaternus* (**Yi-Ling et Pan-Kai, 1982**)

| Règne              | Plantae       |
|--------------------|---------------|
| Embranchement      | Spermaphytes  |
| Sous embranchement | Angiospermes  |
| Division           | Magnoliophyta |
| Classe             | Magnoliopsida |
| Ordre              | Rhamnales     |
| Famille            | Rhamnaceae    |
| Genre              | Reynosia      |
| Sous genre         | Rhamnus       |
| Espèce             | alaternus     |

### I.1.1. Caractéristiques morphologiques

*Rhamnus alaternus* est un arbuste ou arbrisseau indigène peut atteindre 4 à 5 m de hauteur pour 2 à 3 m d'envergure, il est toujours vert, il se caractérise par une écorce verte puis gris et lisse devient brun-noir, rêche et gercé en travers avec le temps. Il porte des feuilles alternes, ovoïdes-lancéolées, pétiolées et luisantes, à bords cartilagineux dentés et vertes des deux côtés. Quant à ses fleurs elles sont dioïques verdâtres, petites et unisexuées dépourvues de pétales et groupées en bouquets, apparaissent de janvier à Avril (**Beloued, 2001**). La tige est dressée et rameuse, les rameaux sont glabres, alternes et non épineux (**Chancerel, 1920**). Le fruit de cet arbuste est une baie de très petit diamètre

(4-6 mm), peu charnu, de couleur rouge puis noire à maturité, la récolte des baies s'effectue en automne (**Gulias et al., 2004**).

### I.1.2. Composition biochimiques

En raison de sa large utilisation en médecine traditionnelle, les différentes parties de *R. alaternus* ont fait l'objet de plusieurs études phytochimiques afin d'identifier leurs principes actifs. En effet, les études sur les extraits de la partie aérienne et les racines ont révélé la présence de diverses quantités d'anthraquinones, de coumarines, de tannins et en particulier des flavonoïdes (**Ben Ammar et al., 2008**). Le tableau II résume les principaux composés biochimiques de ses différentes parties.

**Tableau II :** Les composés biochimiques de *R. alaternus*.

| Partie  | Composé  | Référence                                |
|---------|--|--|
| Feuille | Flavonoïdes tri-glycosidiques : Kaempferol 3-O- $\beta$ -isorhamninoside, rhamnocitrin 3-O- $\beta$ isorhamninoside et le rhamnetin -3- O- $\beta$ -isorhamninoside. | ( <b>Ben Ammar et al., 2009</b> )        |
|         | Flavonoïdes aglycones : l'apigénine, le Kaempferol et la quercétine  | ( <b>Abou-chaar et Shamlian, 1980</b> ). |
|         | Anthraquinones aglycones : l'émodyne, Alaternin, le Physcion, Chrysophanol   | ( <b>Stocker et al., 2004</b> ).         |
| Racine  | Flavones hétéroside  | ( <b>Ben Guazela et al., 2015</b> )      |
|         | Anthraquinones aglycones : Alaternin, le Physcion, l'émodyne, Chrysophanol   | ( <b>Ben Guazela et al., 2015</b> )      |
| Fruit   | Eau (68%), les minéraux (Fe, Mn, K, Ca, Mg, P, Cu), les lipides, protéines et des fibres (cellulose, hémicellulose et lignine)                                       | ( <b>Izhaki et al., 2002</b> )           |
|         | La rhamnoémodyne et la shestérine  | ( <b>Beloued, 2001</b> )                 |
| Ecorce  | Anthraquinones aglycones : Alaternin, le Physcion,   | ( <b>Abou-chaar et Shamlian, 1980</b> ). |
|         | l'émodyne, Chrysophanol  | ( <b>Beloued, 2001</b> )                 |
|         | la rhamnicoside et la franguline   | ( <b>Beloued, 2001</b> )                 |

### I.1.3 Usage traditionnel

*R. alaternus* est une plante médicinale bien connue et utilisée depuis longtemps pour le traitement de diverses maladies et en préparation culinaire. Le tableau III résume les principales utilisations de ses différentes parties.

**Tableau III :** Usage traditionnel de *R. alaternus*.

| Partie  | Principales utilisations   | Référence                        |
|---------|--|----------------------------------|
| Feuille | Purgatif et laxatif (Décoction)  | (Moussi <i>et al.</i> , 2015)    |
|         | Traitement de la jaunisse et les troubles hépatiques provoqué par le paludisme (fraichement) | (Moussi <i>et al.</i> , 2015)    |
|         | Gargarismes astringents contre les maux de gorge. (infusion)                                 |                                  |
| Fruit   | Purgatif et laxatif (Décoction)  | (Ait Youssef, 2006)              |
|         | Employés en médecine vétérinaire   | (Gubb, 1913)                     |
| Ecorce  | Maladies dermatologiques   | (Nekkaa <i>et al.</i> , 2021)    |
|         | Traitement du diabète  | (Ait Youssef, 2006)              |
|         | Traitement de la jaunisse et l'anémie(décoction)   | (Beloued, 2001)                  |
|         | Traitement des affections hépatiques(décoction)  | (Ait Youssef, 2006)              |
|         | Traitement des affections dermatologiques (décoction)  | (Ben Ammar <i>et al.</i> , 2008) |

### I.1.4 Activités biologiques

#### I.1.4.1 Activité antioxydant

Des études *in vitro* ont démontré le potentiel antioxydant de certains extraits de *R. alaternus* liés à sa composition en flavonoïdes et polyphénols qui ont la capacité de piéger les radicaux libres (Ben ammar, *et al.*, 2008 Bhourri *et al.*, 2012). Ces composés sont également connus pour leur activité inhibitrice de la peroxydation lipidique et la chélation des métaux divalents ainsi les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Aschok, 2001).

#### I.1.4.2 Activité antimutagène

Des études antérieures ont montré que l'extrait aqueux de *R. alaternus* possède une propriété antimutagène qui se traduit par l'inhibition des agents mutagènes (l'azoture de sodium) dans le modèle de *Salmonella typhimurium* TA1535. Un effet qui est dû probablement à la présence des flavonoïdes et des tannins (**Ben Ammar et al., 2005 ; Ben Ammar et al., 2007**).

#### I.1.4.3 Activité anti-inflammatoire

Des études menées sur *R. alaternus* ont montré que ses extraits organiques sont une source d'anthraquinones, flavonoïdes, tannins et d'autres phénols qui agissent comme des agents antioxydants multifonctionnels avec un effet anti-inflammatoire (**Ben Ammar et al., 2005**).

#### I.1.4.4 Activité antihyperlipidémique

Selon **Tacherfiout et al. (2018)**, les flavonoïdes contenus dans l'extrait brut méthanolique des feuilles de *R. alaternus* exercent une activité antihyperlipidémique chez les rats rendus hyperlipidémique par le triton WR-1339 grâce à une forte réduction des taux de lipides sanguins et sur les cellules hépatiques HepG2 en culture.

#### I.1.4.5 Activité antimicrobienne

L'extrait méthanolique et les fractions de feuilles et d'écorce de *R. alaternus* ont un puissant effet antimicrobien contre une large gamme de microorganismes, particulièrement les bactéries pathogènes, les dermatophytes et les levures et cette activité importante pourrait s'expliquer par la richesse des extraits en anthraquinones (**Zeouk et Bekhti, 2020**).

### I.2. Phénomène du stress oxydatif et pouvoir antioxydant

#### I.2.1. Radicaux libres

Un radical libre (RL) est une espèce chimique très instable et très réactive contenant un ou plusieurs électrons non appariés sur la couche électronique la plus externe (**Favier, 2003**). Les radicaux libres primaires souvent appelé "espèces réactives de

l'oxygène" (**Annexe 2**) dérivent directement de l'oxygène ou de l'azote (**Annexe 3**) tels que le radical du monoxyde d'azote ( $\text{NO}\bullet$ ) et les autres radicaux dits secondaires (radical peroxy  $\text{ROO}\bullet$ , radical alkoxy  $\text{RO}\bullet$ ) (**Novelli, 1997**). Les principales sources de production des radicaux libres sont résumées dans le tableau IV:

**Tableau IV** : Principales sources de production des radicaux libres (**Pastre, 2005**).

| Sources endogènes   | Sources exogènes               |
|---|--------------------------------|
| Production de radicaux libres lors des respirations oxydatives (mitochondries). | Rayonnement électromagnétique. |
| Cellules phagocytaires.   | Métaux de transition.          |
| Métabolisme de l'acide arachidonique.   | Pesticides                     |
| Système xanthine/xanthine oxydase.  | Médicaments                    |

## I.2.2 Stress oxydatif

Dans un tissu sain, on dit que la balance oxydant/antioxydant est en équilibre quand la production et la neutralisation d'ERO s'équilibre. En pathologie un déséquilibre entre le système générateur d'ERO et le système de défense antioxydant est appelé le stress oxydatif, qui est parmi les principales cause initiale de plusieurs pathologies telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Bidie, 2010**).

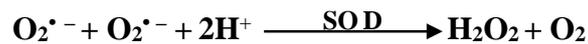
## I.2.3 Les antioxydants

Les antioxydants sont toute substance à des concentrations physiologiques relativement faibles ayant la capacité de retarder, neutraliser ou réduire les dommages causés par les radicaux libres. Cette défense se caractérise par l'inhibition des réactions à l'intérieur des cellules provoquées par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives de l'azote (ERA). Il existe deux sources de défenses antioxydants (**Benbrook, 2005**).

### I.2.3.1 Les antioxydants endogènes (Enzymatiques)

- **Superoxydes dismutases (SOD)** : Sont des métallo-enzymes qui accélèrent la dismutation de l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ) en dioxygène et peroxyde

d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Arora *et al.*, 2002) selon la réaction suivante :



- **Catalase (CAT)** : La catalase est une enzyme tétramérique agit en synergie avec la SOD, elle est principalement présente dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Cette enzyme accélère la dismutation de peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène qui sont des composées stables (Nicholls, 2012) selon la réaction suivante :



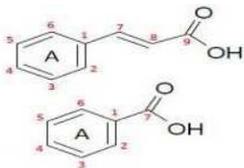
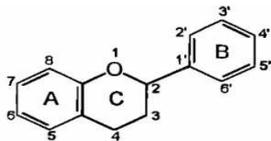
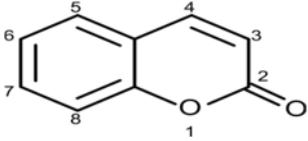
- **Glutathion peroxydase (GPx)** : est une glycoprotéine tétramérique à cofacteur de sélénium, se localise dans le cytoplasme et la matrice mitochondriale. Elle réduit d'une part le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau (H<sub>2</sub>O), et tous les peroxydes organiques (ROOH) d'autre part (Valko *et al.* 2006).

### I-2-3-2-Source exogènes (Non enzymatique)

- **Les oligo-éléments** : les éléments-traces ou oligo-éléments comme le zinc, le sélénium et le manganèse, jouent le rôle de cofacteurs pour les enzymes antioxydantes, en tant que catalyseurs de la SOD. De même, le sélénium (Se) est l'élément catalyseur de la GPx (De Moffarts *et al.*, 2005).
- **Vitamine E** : la vitamine E ou tocophérol est présente en grande quantité dans les huiles végétales, les noix, les fruits et les légumes. Elle est considérée comme une substance antioxydante principale des membranes cellulaires utilisée pour inhiber la peroxydation lipidique (Valko *et al.* 2006).
- **Vitamine C** : une vitamine appelée acide ascorbique est l'antioxydant hydrosoluble majeur, elle agit en synergie avec la vitamine E, le sélénium et le zinc. Cette vitamine réagit essentiellement avec l'anion superoxyde, l'oxygène singulet et le peroxyde d'hydrogène (Pourrut, 2008).
- **Caroténoïdes** : sont des pigments végétaux lipophiles. Ils interagissent avec les radicaux libres par abstraction d'hydrogène, transfert d'électron et addition de radical (Marc *et al.* 2004).
- **Composés phénoliques** : les phénols sont des métabolites secondaires

synthétisés par les végétaux. Ils sont caractérisés par la présence d'un noyau aromatique dans leur structure avec un ou plusieurs groupes hydroxyles. Ces composés sont considérés comme des antioxydants bénéfiques qui peuvent neutraliser les ERO (**Sakihama et al.,2002**). Ces composés sont en général catégorisés en acides phénoliques, flavonoïdes, stilbenes, coumarines et tanins (Tableau V).

**Tableau V** : Structures des différents composés phénoliques accompagnées de quelques mécanismes antioxydants.

| Composé phénoliques   | Structure   | Les mécanismes antioxydants   |
|---|---|---|
| Acide Phénolique :<br>Les acides hydroxybenzoïques, Acides hydroxycinnamiques |    | Propriétés redox très élevées. Agents réducteur, donneur d'hydrogène en piégeant les radicaux libres et en chélatant les ions ( <b>Valko et al .,2006</b> )         |
| Flavonoïdes : Flavones et flavonols, Flavanones, Anthocyanines.               |  | Le piégeage direct des ERO, l'inhibition des enzymes responsables de leur production et la chélation des ions métalliques de transition ( <b>Halliwell, 1994</b> ). |
| Tanins : tannins condensés et tanninshydrolysables.                           |   | Des donneurs des protons aux radicaux libres lipidiques produit au cours de la peroxydation ( <b>Diallo., 2005</b> ).   |
| Coumarines  |  | Le piégeage des RL hydroxyles, superoxydes et peroxydes et la prévention de la peroxydation des lipides membranaires ( <b>Diallo., 2005</b> ).                      |

## I.3 Inflammation et anti inflammatoires

### I.3.1 Inflammation

L'inflammation est la réaction normale de l'organisme en réponse à des stimuli nocifs telle qu'une infection ou une agression tissulaire. Elle a pour objectifs de reconnaître, détruire et éliminer toutes les substances qui sont étrangères. Cette réaction se manifeste cliniquement par quatre signes cardinaux qui sont la rougeur, la chaleur, la douleur et l'œdème (Sarkhel, 2015). L'inflammation est classée en deux catégories selon la durée et la cinétique des processus inflammatoires : inflammation aiguë et chronique.

#### I.3.1.1 Inflammation aiguë

C'est la première ligne de défense de l'organisme à une infection. Elle est immédiate, brutale et dure quelques jours à quelques semaines. L'inflammation aiguë s'effectue en trois phases principales (Weill *et al.*, 2003 ; Charles *et al.*, 2010) :

- **La phase vasculaire (initiation)** : cette phase commence par une vasoconstriction due à l'action du système sympathique suivie d'une vasodilatation des vaisseaux sanguins qui va permettre l'afflux massif de sang vers le foyer inflammatoire. La diapédèse s'ensuit, après l'adhérence des cellules à la paroi endothéliale des vaisseaux sanguins (Hajjaj, 2017).
- **La phase cellulaire (amplification)** : elle correspond à l'arrivée des leucocytes au foyer inflammatoire dont les premiers sont les polynucléaires (environ 6 heures) qui sont remplacés progressivement par les cellules monocytes. La libération des enzymes hydrolytiques des polynucléaires et le pouvoir phagocytaire des macrophages permettent la destruction et l'élimination des micro-organismes pathogènes et des tissus lésés (Hajjaj, 2017).
- **La phase de résolution (effectrice)** : c'est la phase de réparation et d'élimination des agents agresseurs et des débris cellulaires et tissulaires du foyer inflammatoire par les polynucléaires, macrophages et les neutrophiles (PMN). Les macrophages vont alors sécréter des cytokines (IL-4 et IL-10), les fibrocytes et fibroblastes vont produire les protéines matricielles des tissus intercellulaires comme le collagène, la fibronectine et la laminine pour permettre la

reconstruction des tissus (Carip, 2010 ; Mebirouk, 2017).

### I.3.1.2 Inflammation chronique

Est une inflammation de durée prolongée, elle peut durer plusieurs mois ou années. Elle est caractérisée par la persistance de la lésion tissulaire qui est due en général aux cellules inflammatoires de l'infiltrat, la présence d'un infiltrat inflammatoire chronique et l'existence d'une fibrose (Stevens *et al.*, 2004).

### I.3.2 Médiateurs de l'inflammation

La réponse inflammatoire provoque la libération de divers médiateurs inflammatoires qui peuvent être des substances protéiques plasmatiques, présentes dans le sang circulant, ou proviennent de cellules telles que les mastocytes, les thrombocytes, les neutrophiles, les monocytes et les macrophages (Annexe 4) (Henrotin *et al.*, 2001 ; Iwalewa *et al.*, 2007).

### I.3.3 Anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont des médicaments antagonistes des processus inflammatoires. Ce sont des traitements symptomatiques, qui n'agissent pas sur la cause de l'inflammation. Parmi ces médicaments anti-inflammatoires, on distingue les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).

#### I.3.3.1 Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)

Les anti-inflammatoires stéroïdiens ou les glucocorticoïdes (GC) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol, une hormone sécrétée par les glandes surrénales (Faure, 2009). Les AIS comme les glucocorticoïdes agissent par le biais d'un récepteur spécifique, appartenant à la superfamille des récepteurs aux stéroïdes, intracellulaires. Il est ubiquitaire, avec une densité dans le cytosol variable selon la cellule. Il s'ensuit une translocation intranucléaire du récepteur ainsi activé ce qui aboutit à la modulation positive ou négative des gènes cibles qui codent les protéines responsables de l'action des glucocorticoïdes. Le tableau VI résume les principaux glucocorticoïdes(GC).

**Tableau VI :** Principaux glucocorticoïdes (Henzen, 2003).

| Glucocorticoïde              | Nom commercial                                |
|------------------------------|---|
| Cortisol<br>(Hydrocortisone) | Hydrocortone®, Solu-<br>Cortef®Cortison CIBA® |
| Cortisone                    | Prednison Streuli®                            |
| Prednisone                   | Spiricor®t, Ultracorten®                      |
| Prednisolone                 | Urbason®, Solu-                               |
| Méthylprednisolon            | Medrol®Kenacort®,                             |
| eTriamcinolone               | Ledercort® Celestene®,                        |
| Bétaméthasone                | Diprostene®                                   |
| Dexaméthasone                | Fortecortin®, Decadron®                       |

### I.3.3.2 Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (dépourvus de noyau stéroïde) sont des médicaments aux propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques. Ils agissent par inhibition des deux isoformes de la cyclo-oxygénase (COX-1 et COX-2), enzyme qui permet la production de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. L'action des AINS entraîne donc une diminution de la production des prostaglandines (PG) notamment la PGE2 et la PGI2 (**Risser *et al.*, 2009**). Le tableau VII résume les principaux anti-inflammatoires non stéroïdiens.

**Tableau VII :** Quelques anti-inflammatoires non stéroïdiens. (**Wallace et Staats, 2004**).

| Classe structurale          | Nom scientifique    | Nom commercial |
|-----------------------------|---------------------|----------------|
| Salicylates                 | Acétylsalicylique   | Aspirine®      |
|                             | Diflusal            | Dolobid®       |
| Dérivés d'acide propénoïque | Ibuprofène          | Ibuprofène®    |
|                             | Fénopropène calcium | Nalfon®        |
|                             | Flurbiprofène       | Ansaid®        |
|                             | Ketoprofène         | Nalfon®        |
| Dérivés d'acide acétique    | Diclofénac          | Voltarene®     |
| Indoles                     | Indométacine        | Indocine®      |
|                             | Tolmétin            | Tolectine®     |
|                             | Sulindac            | Clinoril®      |

### I.3.3.3 Anti-inflammatoires d'origine végétale

Les composés phytochimiques issus du règne végétal et fongique sont très nombreux avec une gamme variée d'activités biologiques (Dhingra *et al.*, 2018). Quelques exemples de plantes douées d'activités anti-inflammatoires sont cités dans le tableau VIII.

**Tableau VIII** : Plantes à activité anti-inflammatoires.

| Plantes                                | Famille        | Sites d'action   | Références                        |
|--|----------------|--|-----------------------------------|
| Salix sp<br>(Ecorces)                  | Salicacée      | -Inhibe la synthèse des prostaglandines par inhibition de la voie de la COX-2 et de la lipoxygénase.   | (Fiebich et Chrubasik, 2004)      |
| Ribes nigrum<br>(Feuilles)             | Grossulariacée | -Diminuent le taux de TNF- $\alpha$ et d'IL-1 $\beta$ .<br>-Effet inhibiteur sur la COX-1 et de la COX-2.  | (Garbacki <i>et al.</i> , 2004)   |
| Urtica dioica<br>(Feuilles)            | Urticaceae     | -Inhibe l'activation du facteur NF- $\kappa$ B en empêchant la dégradation de sa sous-unité inhibitrice I $\kappa$ B- $\alpha$ .<br>-Inhibition de la COX-1 et COX-2 ainsi qu'une inhibition de la production de Prostaglandine D2 | (Marrassini <i>et al.</i> , 2010) |
| Fraxinus japonica<br>(Feuille, écorce) | Oleaceae       | -Inhibe l'activation de la voie classique et alterne du complément.<br>-Inhibent la formation des leucotriènes issus de l'acide arachidonique par inhibition de la lipoxygénase  | (Kostova et Iossifova, 2007)      |
| Curcuma longa<br>(Rhizome)             | Zingibéracée   | -Inhibe la production de PGE2 et l'augmentation de l'expression de COX-2.  | (Kim <i>et al.</i> , 2012)        |
| Harpagophytum procumbens<br>(Racine)   | Pedaliaceae    | -Inhibe l'expression de COX-1 et COX-2 et la biosynthèse de la leucotriène.  | (Grant <i>et al.</i> , 2007)      |



# **Chapitre II**

## **Matériel et méthodes**

## II. Matériels et méthodes

### II.1. Appareillages et produits chimiques

Les équipements et les produits chimiques utilisés pour la réalisation de ce travail sont rapportés dans l'annexe 5.

### II.2. Matériel végétal

La présente étude a été réalisée sur les écorces de *Rhamnus alaternus* qui ont été récoltées le mois d'avril 2022 au Parc National de Gouraya, wilaya de Bejaia. Une fois récoltées, les écorces ont été bien nettoyées et lavées pour éliminer les impuretés, séchées à l'air libre pendant 2 jours, puis transférées dans une étuve à 40°C pendant 4 jours. Après le séchage, les écorces ont été broyées au broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine homogène. La poudre obtenue a été conservée dans une boîte et stockée à l'abri de la lumière et de l'humidité.



**Figure 1** : Arbuste de *Rhamnus alaternus* (A) écorce nettoyé (B) écorce à l'étuve (C) et poudre fine (D)

### II.3. Préparation des extraits de *Rhamnus alaternus*

#### II.3.1. Extraction par macération

L'extraction a été réalisée par macération du matériel végétal. 50g de la poudre de l'écorce de *R. alaternus* ont été macérés dans 500 ml de méthanol à 80% et laissés sous agitation magnétique pendant 24h à température ambiante. Le mélange obtenu a été

centrifugé à 3000 rpm pendant 3 min et le surnageant a été récupéré. Ce dernier a été mis dans une étuve à 40°C pendant 72h pour évaporation complète du solvant jusqu'à ce que le poids des extraits reste constant (**Belhattab et al., 2004**).

### II.3.2. Extraction par décoction

Cette extraction consiste à verser une substance dans de l'eau bouillante pour récupérer à la fin un extrait. En effet, 25g de la poudre de l'écorce de *R. alaternus* ont été versés dans 250 ml de l'eau distillée bouillante. Cette solution bout pendant 20 min sur une plaque chauffante avec une agitation, le mélange obtenu a été centrifugé. Le surnageant placé dans une étuve à 40 °C pendant 72h pour sécher. L'extrait sec est conservé au réfrigérateur jusqu'à l'utilisation (**Belhattab et al., 2004**).

Pour chaque extrait, le rendement d'extraction est exprimé en pourcentage par la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction (rendement) (\%)} = [(P1 / P0)] \times 100$$

Avec :

*P0* : poids de la poudre avant extraction.

*P1* : poids de l'extrait sec après extraction.

## II.4. Analyses phytochimiques

### II.4.1. Dosage des polyphénols totaux

Le taux de polyphénols totaux a été déterminé par spectrophotométrie en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif en milieu alcalin, oxyde les phénols en ions phénolates et réduit le mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique, d'où la formation d'un complexe molybdo-tungstique bleu (**Ribéreau-Gayon et al., 1982**).

Dans un tube à essai, un volume de 125 µl de chaque extrait a été ajouté à 625 µl de folin-ciocalteu (0.1 N), et incubés à température ambiante pendant 5 minutes. 500 µl de carbonate de sodium à 6% sont ajoutés et l'ensemble a été bien mélangé au vortex. La préparation a été laissée incuber pendant 90 min à l'obscurité, puis l'absorbance a été mesurée à 720 nm contre un témoin préparé suivant la même méthode, en remplaçant l'extrait par le solvant. Les teneurs en polyphénols totaux des deux extraits ont été déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions en utilisant comme

standard l'acide gallique. Les taux des polyphénols totaux sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g) (Bouchenak *et al.*, 2020).

#### II.4.2. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes contenus dans nos extraits a été estimée par la méthode au chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) décrite par Quettier-Deleu *et al.* (2000) avec quelques modifications. Le principe de ce dosage repose sur la capacité de ces composés à former des complexes chromogènes (jaunâtres) avec le chlorure d'aluminium (Ali Rachedi *et al.*, 2018

Brièvement, 500  $\mu$ l d'une solution de trichlorure d'aluminium à 2% ont été additionnés à 500  $\mu$ l de chaque extrait, le mélange a été bien agité au vortex. L'absorbance est lue après 15 min à 434 nm contre un témoin préparé dans les mêmes conditions. La teneur en flavonoïdes est calculée en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage réalisée avec la quercétine comme standard. La quantité des flavonoïdes est exprimée en milligramme équivalent de quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g extrait sec).

#### II.4.3. Dosage des flavones et flavonols

La quantité des flavones et flavonols a été évaluée par la méthode de Kosalec *et al.* (2004), qui consiste à mettre 250  $\mu$ l d'extraits dans un tube à essai ; ajouter 1,4 ml d'eau distillée, 750  $\mu$ l d'éthanol (95%), 50  $\mu$ l d' $AlCl_3$  à 10% puis 50  $\mu$ l d'acétate de sodium 1M. Le mélange a été bien homogénéisé au vortex puis incubé pendant 15 min à température ambiante et l'absorbance est mesurée à 430 nm. La concentration en flavones et flavonols est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage préparée avec la quercétine. Les teneurs sont exprimées en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g d'extrait sec).

#### II.4.4. Dosage des tanins condensés

L'évaluation quantitative des tanins condensés des deux extraits est réalisée par la méthode de la vanilline qui réagit avec les unités des tanins condensés en présence d'acide donnant une coloration rouge (Price *et al.*, 1978).

Dans un tube à essai et à température ambiante, un volume de 625  $\mu$ l d'une solution méthanolique de vanilline à 4% a été mélangé avec 250  $\mu$ l de chaque extrait. Le mélange

obtenu a été bien homogénéisé puis 625 µl d'HCl à 8% ont été ajoutés. La préparation est immédiatement placée dans un bain marie (50°C) pendant 15 minutes. L'absorbance est mesurée à 500 nm (**Chaouche et al., 2020**). L'étalonnage a été effectué dans les mêmes conditions en utilisant la catéchine comme standard et les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents de catéchine par gramme d'extrait sec (mg EC/g d'extrait sec).

## II.5. Détermination de l'activité antioxydante

### II.5.1. Activité scavenging du radical DPPH

Afin d'étudier l'activité antiradicalaire des écorces de *R. Alaternus*, nous avons utilisé le protocole décrit par **Sanchez-Moreno**. C'est un test colorimétrique, utilisant le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), comme un radical relativement stable. En présence des antioxydants ce radical ayant une couleur violette se réduit en 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine de couleur virant au jaune (**Athamena et al., 2010**).

25 µl de la solution méthanolique de DPPH (5 mM) ont été additionnés à 1,225 ml de chaque extrait à différentes concentrations allant de 20 à 120 µl. Après un temps d'incubation de 30 min à l'abri de la lumière et à température ambiante, l'absorbance du mélange réactionnel a été lue à 517 nm. L'acide gallique et la BHA ont servi comme standards antioxydants et les résultats de l'effet scavenger du radical DPPH sont exprimés en pourcentage selon la relation suivante:

$$\text{Activité scavenging du radical DPPH (\%)} = ((AT - AEch) / AT) \times 100$$

Avec :

*AT* : Absorbance du témoin

*AEch* : Absorbance de l'échantillon

### II.5.2. Activité scavenging du radical ABTS<sup>•+</sup>

L'ABTS<sup>•+</sup> est un radical libre et stable capable de réagir avec des antioxydants, en effet, le sel d'ABTS perd un électron pour former un radical cationique (ABTS<sup>•+</sup>) de couleur sombre (vert bleu) en solution. En présence de l'agent antioxydant, le radical ainsi formé est réduit pour donner ABTS-H, ce qui entraîne la décoloration de la solution (**Božidar et al., 2006**).

L'activité scavenger du radical ABTS a été mesurée en utilisant la méthode décrite par (Re et al., 1999), avec une légère modification. Le radical (ABTS<sup>•+</sup>) a été préparé par la réaction de la solution d'ABTS (7 mM) avec du persulfate de potassium (2,45 mM), cette solution a été incubée à l'obscurité et à température ambiante pendant 16h h (formation du radical ABTS<sup>•+</sup>). La solution ABTS<sup>•+</sup> obtenue a été diluée dans l'éthanol afin d'obtenir une absorbance de 0,7 à 734 nm. Un volume de 950 µl de la solution diluée a été ajouté à un volume de 50 µl de chaque extrait à différentes concentration de 10 à 50 µl. L'ensemble a été bien mélangé à l'aide d'un vortex et l'absorbance a été mesurée à 734 nm après 7 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante.

Le pourcentage de l'activité scavenging a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Activité scavenging du radical ABTS (\%)} = ((AT - AEch) / AT) \times 100$$

Avec:

*AT* : Absorbance du témoin;

*AEch* : Absorbance de l'échantillon.

### II.5.3. Activité antioxydante totale

Ce test repose sur la réduction du Mo<sup>6+</sup> en Mo<sup>5+</sup> avec la formation d'un complexe phosphate Mo<sup>5+</sup> de couleur verte qui se caractérise par une absorption maximale à 695 nm. La méthode consiste à introduire dans un tube à essai 200 µl de chaque extrait à différentes concentrations et 2 ml du réactif composé de HCl (0,1 M), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (28 mM) et du molybdate d'ammonium (4 mM). Le tube fermé a été incubé dans un bain-marie à 95°C pendant 90 minute, puis les absorbances ont été mesurées à 695 nm contre un blanc. Une courbe standard a été réalisée dans les même conditions en utilisant l'acide ascorbique et les résultats ont été exprimés en milligramme équivalent d'acide ascorbique par grammes d'extrait (mg EAA/g d'extrait).

### II.5.4. Evaluation du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est un mécanisme important pour examiner l'activité antioxydante des composés phénoliques. Cette méthode tire profit de la réduction de l'ion ferrique (Fe<sup>3+</sup>) présent dans le complexe ferricyanure de potassium K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>) (Ou et al., 2001). En solution, cette forme réduite prend une couleur verte, dont l'intensité est proportionnelle au pouvoir réducteur des extraits (Wojdylo et al., 2007).

Le protocole utilisé est celui décrit par **Oyaizu (1986)**. Dans un tube à essai en verre contenant 250 µl d'extrait à différentes concentrations, 500 µl de tampon phosphate (0,2 M : pH 6,6) et 500 µl de ferricyanure de potassium ont été ajoutés successivement. L'ensemble a été chauffé à 50°C au bain marie pendant 20 minutes. Un volume de 500 µl d'acide trichloracétique TCA (10%) a été ajouté et le mélange obtenu a été centrifugé à 3000 rpm pendant 10 minutes. Ensuite, un aliquote de 500 µL de surnageant a été transféré dans un autre tube auquel ont été ajoutés 500 µl d'eau distillée et 100 µl de chlorure ferrique (0,1%). Un blanc a été préparé dans les mêmes conditions en remplaçant l'extrait par le solvant et l'absorbance est directement lue à 700 nm.

## II.6. Etude des activités analgésique et anti-inflammatoire

### II.6.1. Animaux

Des souris mâles NMRI saines dont le poids varie entre 24 et 28 g provenant de l'institut pasteur (Alger, Algérie) ont été utilisées pour les différentes expériences. Les souris ont été logées dans des cages en polyéthylène propre dans des conditions expérimentales standard d'humidité (60–70%), et de température (25 – 26°C), tout en respectant un cycle de lumière/obscurité de 14/10 heures. Les souris ont accès libre à l'eau et à l'aliment standard provenant de l'ONAB (office national de l'aliment du bétail). Elles ont été acclimatées à leur environnement pendant une semaine. L'entretien et la manipulation des animaux ainsi que les procédures expérimentales suivies étaient conformes à la directive européenne 2010/63/EU relative à l'expérimentation animale.

### II.6.2. Activité analgésique

#### II.6.2.1. Test de torsion abdominale

Ce test consiste à induire une douleur périphérique par une injection intrapéritonéale (IP) d'une solution d'acide acétique à 0,6% suivant la méthode décrite par **Koster et al. (1959)**. Un effectif de 20 souris a été réparti en 4 groupes (5 souris par groupe) et a été traité comme suite :

- **Groupe I (Contrôle négatif)** : reçoit une solution d'eau physiologique à une dose de 10 ml/kg.

- **Groupe II (Contrôle positif)** : reçoit un analgésique de référence (diclofénac) à 50mg/kg
- **Groupe III (250 mg/kg)** : reçoit 250 mg/kg d'EMRA.
- **Groupe IV (500 mg/kg)** : reçoit 500 mg/kg d'EMRA.

Une heure après l'administration intra-gastrique (gavage) des différents traitements, un volume de 10µl d'acide acétique à 0.6% a été injecté par voie intrapéritonéale. Cinq minutes après l'induction de la douleur, le nombre d'étirements et de torsions abdominales de chaque souris a été compté pendant 20 minutes. L'effet analgésique a été exprimé en pourcentage d'inhibition des torsions abdominales selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{(\text{nombre de TA du contrôle négatif} - \text{nombre de TA test})}{(\text{nombre de TA du contrôle négatif})} \times 100$$

TA : Torsions Abdominales.

### II.6.2.2. Test d'irritation induite par formaldéhyde

Le test d'irritation a été réalisé selon la méthode décrite par **Dubuisson et Dennis (1977)**. La douleur a été induite par l'injection d'une solution du formaldéhyde à 1% dans la patte de la souris, ce qui entraîne l'apparition d'un syndrome douloureux.

Quatre groupes de cinq souris ont été traités comme suit :

- **Groupe I (Contrôle négatif)**: reçoit une solution d'eau physiologique à une dose de 10 ml/kg.
- **Groupe II (Contrôle positif)** : reçoit un analgésique de référence (acide salicylique) à 100 mg/kg.
- **Groupe III (250 mg/kg)** : reçoit 250 mg/kg d'EMRA.
- **Groupe IV (500 mg/kg)** : reçoit 500 mg/kg d'EMRA.

Une heure après le gavage, un volume de 20 µl d'une solution de formaldéhyde à 1% a été injecté par voie sous cutanée dans la patte avant droite des souris. Les souris ont été placées individuellement dans une enceinte transparente qui permet d'observer la patte traitée. Le temps de léchage des pattes a été enregistré durant les deux phases du syndrome douloureux : la première phase de 0 à 5 min (phase neurogène) et la seconde de 05 à 30 min (phase inflammatoire).

Le pourcentage d'inhibition de la douleur a été calculé selon la formule suivante:

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{(\text{TL du contrôle négatif} - \text{TL test})}{(\text{TL du contrôle négatif})} \times 100$$

*TL : Temps de léchage des pattes*

### II.6.3. Activité Anti-inflammatoire

#### II.6.3.1. Test de l'œdème de l'oreille induit par le xylène

Le test de l'effet anti-inflammatoire (anti-oedémateux) a été réalisée selon le protocole décrit par **Nunez-Guillen et al. (1997)**. Le principe de ce test est basé sur l'induction d'un œdème par une application topique du xylène sur l'oreille de la souris.

Un effectif de 20 souris a été réparti en 4 groupes (5 souris par groupe) qui ont été traité comme suit :

- ✓ **Groupe I (Contrôle négatif):** reçoit une solution d'eau physiologique à une dose de 10 ml/kg.
- ✓ **Groupe II (Contrôle positif):** reçoit un antalgique de référence (dicolfénac) à 50 mg/kg.
- ✓ **Groupe III (250 mg/kg) :** reçoit 250 mg/kg d'EMRA.
- ✓ **Groupe IV (500 mg/kg) :** reçoit 500 mg/kg d'EMRA.

Une heure après l'administration des traitements, un volume de 30 µl de xylène a été administré sur la surface interne du lobe de l'oreille droite. 15 minutes après l'induction de l'inflammation, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale et des sections circulaires de 6 mm de diamètre ont été récupérées des oreilles traitées et non traitées, puis pesées.

Le pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{(\Delta \text{ contrôle négatif} - \Delta \text{ test})}{(\Delta \text{ du contrôle négatif})} \times 100$$

*Δ : Différence de poids entre l'oreille droite et gauche.*

## **II.7. Analyse statistique**

Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata pour les tests *in vitro* et les résultats ont été exprimés comme moyenne  $\pm$  SD. Les résultats de l'étude *in vivo* ont été exprimé en moyenne  $\pm$  SEM. L'analyse statistique a été effectuée en utilisant le logiciel GraphPad Prism 6. Les résultats ont été comparés entre les différents groupes par le test t de Student, analyse de la variance (ANOVA), suivi par le test post-hoc de Tukey. Le degré de signification statistique des données a été pris à la probabilité de \* $p < 0,05$  (différence significative), \*\* $p < 0,01$  (différence hautement significative), \*\*\* $p < 0,001$  (différence très hautement significative).

**Belhattab, R., Larous, L., Kalantzakis, G., Boskou, D., Exarchou, V., 2004. Antifungal properties of *Origanum glandulosum* Desf. extracts. *Journal of Food Agriculture and Environment* 2, 69-73.**

# **Chapitre III**

## **Résultats et discussion**

### III.1. Résultats

#### III .1.1. Taux d'extraction

Dans ce travail, deux méthodes d'extraction ont été réalisées sur la poudre des écorces de *R. alaternus*, une extraction par macération avec le méthanol 80% et la seconde par décoction (l'eau distillée). La masse et le rendement de chaque extrait ont été calculés par rapport à la matière sèche initiale et présentés dans le tableau IX.

**Tableau IX** : La masse et le rendement des extraits

| Extrait | Masse en (g) | Rendement (%) |
|---------|--------------|---------------|
| EMRA    | 8,56         | 17,72         |
| EARA    | 3            | 12            |

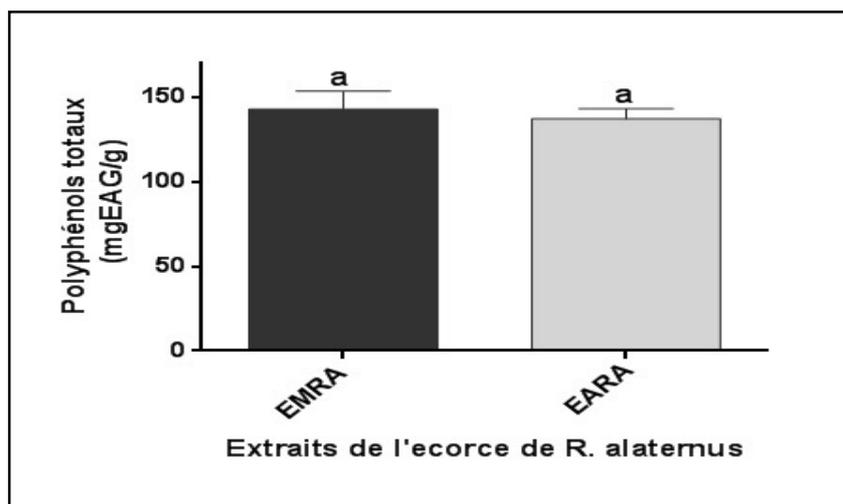
Le rendement obtenu avec l'extraction au méthanol (17,72%) est meilleur que celui de l'extraction aqueuse (12 %). Une étude réalisée par **Boussahel et al. (2015)** a montré un rendement de 6,8% pour l'extrait méthanolique de l'écorce de *R. alaternus*. D'autres études menées par **Ben Ammar et ses collaborateurs (2008)** ainsi que **Ljubunic et ses collaborateurs (2005)** sur l'extrait aqueux de la même espèce de Tunisie ont révélé des rendements de 9% et de 8% respectivement.

#### III .1.2. Dosage des métabolites secondaires

##### III.1.2.1. Teneur en polyphénols totaux

Le taux en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique et aqueux de l'écorce de *R. alaternus* a été évaluée par le réactif de Folin-Ciocalteu qui est réduit par les groupements oxydables des composés phénoliques (figure 2).

Les Taux des polyphénols correspondant à chaque extrait ont été rapportés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g), et déterminées par l'équation de la courbe d'étalonnage de type :  $y = 0,0937x - 0,0137$  avec  $R^2 = 0,9985$  (**Annexe 6**).



**Figure 2 :** Teneurs en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique (EMRA) et aqueux (EARA) de l'écorce de *R. alaternus*. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type (n=3). Le test t de Student a été utilisé pour examiner la signification statistique des données. Les valeurs ne partageant pas une lettre commune sont statistiquement différentes (P < 0,05).

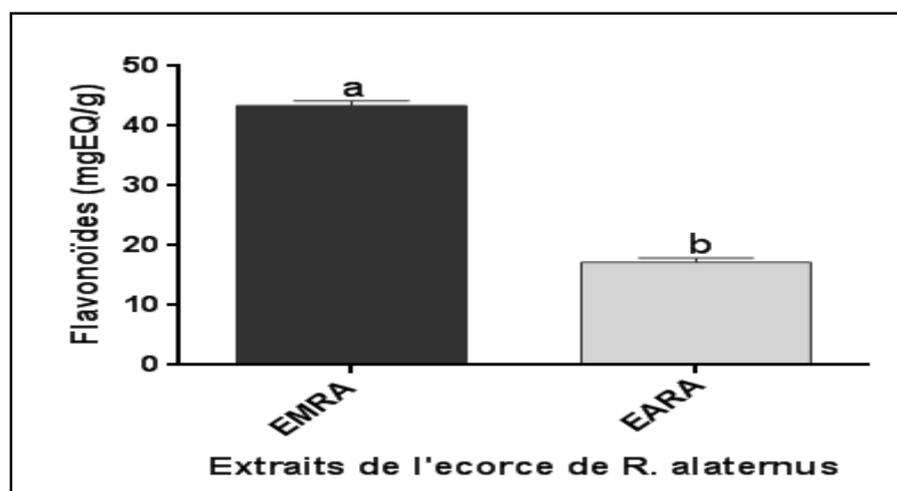
Les résultats montrent qu'il n'existe aucune différence significative entre les teneurs en polyphénols totaux des deux extraits. C'est l'extrait méthanolique (EMRA) qui a donné une teneur légèrement plus élevée par rapport à celle de l'extrait aqueux (EARA) avec des taux respectifs de l'ordre de  $143,003 \pm 10,783$  et  $137,377 \pm 5,887$  mg EAG/g d'extrait sec.

### III.1.2.2. Teneur en flavonoïdes

La présence des flavonoïdes dans les extraits de *R. alaternus* a été révélée grâce à la formation d'une couleur jaunâtre après l'addition d'une solution de trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de l'extrait en flavonoïdes. Les résultats du dosage des flavonoïdes totaux sont illustrés dans la figure 3.

La quantité des flavonoïdes est exprimée en milligramme équivalent de quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g extrait sec). Les taux des flavonoïdes des deux extraits ont été obtenus à partir de la courbe d'étalonnage (quercétine) qui suit une équation de type :  $y = 0,0696x + 0,0087$  avec  $R^2 = 0,9994$  (Annexe 7).

Les résultats représentés sur l'histogramme montrent qu'il existe une différence très hautement significative (P < 0,001) entre les teneurs en flavonoïdes des deux extraits. La concentration des flavonoïdes est plus importante dans l'EMRA ( $43,39 \pm 0,82$  mg EQ/g d'extrait sec), alors que, l'EARA contient environ  $17,172 \pm 0,735$  mg EQ/g d'extrait sec.

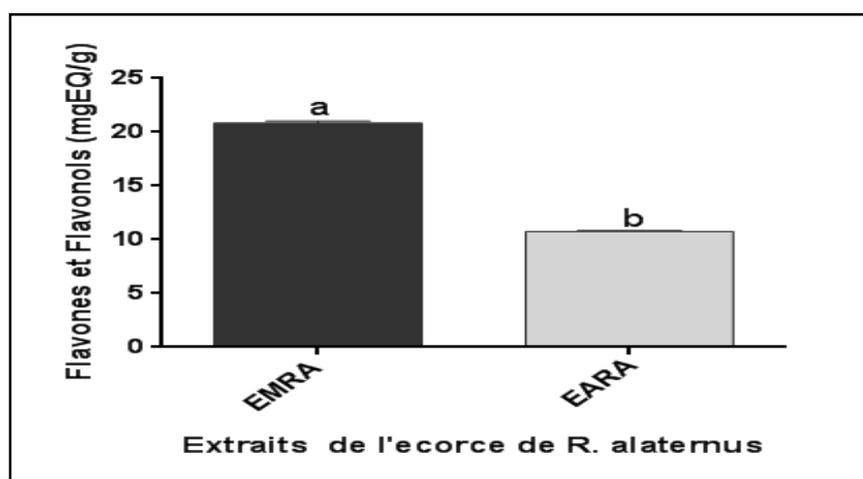


**Figure 3 :** Teneurs en flavonoïdes de l'extrait des méthanolique (EMRA) et aqueux (EARA) de *R. alaternus*. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type (n=3). Le test t de Student a été utilisé pour examiner la signification statistique des données. Les valeurs ne partageant pas une lettre commune sont statistiquement différentes ( $P < 0,05$ ).

### III.1.2.3. Teneur en flavones et flavonols

Les taux des flavones et flavonols des deux extraits ont été obtenus à partir de la courbe d'étalonnage réalisée avec la quercétine et qui a donné une équation de type :  $y = 0,0666x - 0,0126$  avec  $R^2 = 0,9987$  (Annexe 8).

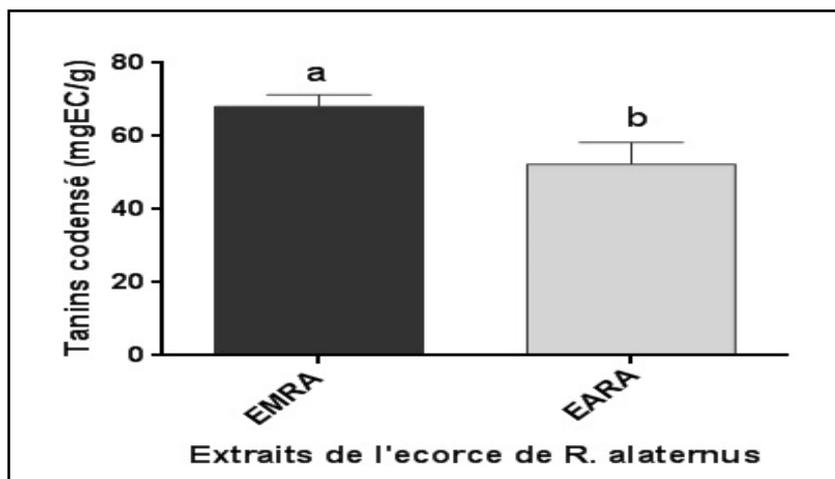
L'étude statistique montre une différence très hautement significative ( $p < 0,001$ ) entre les deux extraits de *R. alaternus* (figure 4). La teneur en flavones et flavonols est presque deux fois plus élevée pour l'EMRA avec un taux de  $20,852 \pm 0,183$  mg EQ/g d'extrait sec, contre  $10,76 \pm 0,0987$  mg EQ/g d'extrait sec pour l'EARA



**Figure 4 :** Teneurs en flavones et flavonols de l'extrait méthanolique (EMRA) et aqueux (EARA) de l'écorce de *R. alaternus*. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type (n=3). Le test t de Student a été utilisé pour examiner la signification statistique des données. Les valeurs ne partageant pas une lettre commune sont statistiquement différentes ( $P < 0,05$ ).

#### III.1.2.4. Teneur en tanins condensés

La teneur en tanins condensés des deux extraits de l'écorce de *R. alaternus* a été déterminée par la méthode de la vanilline qui réagit avec les unités des tanins condensés en présence d'acide donnant une coloration rouge. Les résultats obtenus indiquent une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre les deux extraits, et sont illustrés dans la figure 5. Différentes concentrations de catéchine ont permis de tracer la courbe d'étalonnage, dont l'équation est de type :  $y = 0,0065x + 0,0575$  avec  $R^2 = 0,9882$  (Annexe 9).



**Figure 5 :** Teneurs en tanins condensés de l'extrait méthanolique (EMRA) et aqueux (EARA) de l'écorce de *R. alaternus*. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type ( $n=3$ ). Le test t de Student a été utilisé pour examiner la signification statistique des données. Les valeurs ne partageant pas une lettre commune sont statistiquement différentes ( $P < 0,05$ ).

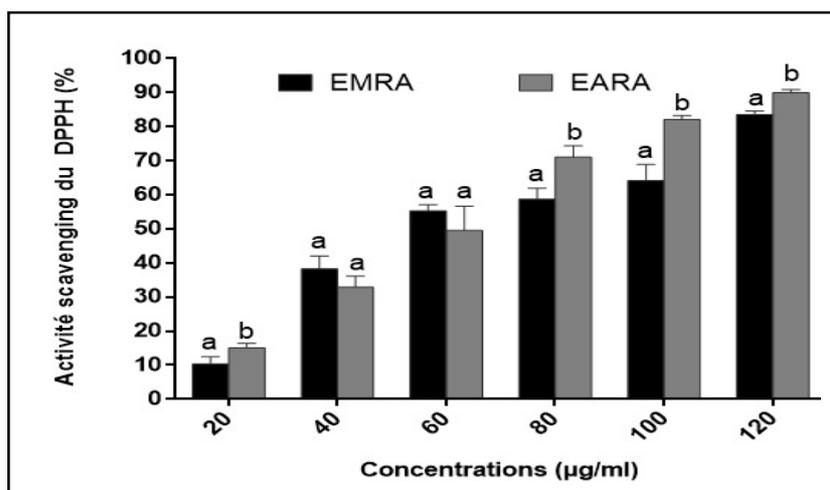
La teneur la plus élevée est enregistrée pour l'extrait méthanolique qui est de  $62,31 \pm 10,29$  mg EC/g d'extrait sec, comparativement à celle de l'extrait aqueux qui est de  $52,36 \pm 5,942$  mg EC/g d'extrait sec.

#### III.1.3. Détermination de l'activité antioxydant

L'évaluation de l'activité antioxydant de l'extrait méthanolique et aqueux de l'écorce de *R. alaternus* été effectuée par quatre tests : test de piégeage du radical DPPH•, activité scavenger contre le radical ABTS, évaluation de l'activité antioxydante totale et le test du pouvoir réducteur.

##### III.1.3.1. Activité scavenging du radical DPPH

Le test du DPPH est utilisé généralement pour évaluer le pouvoir anti-radicalaire des extraits de plantes, il est décrit comme étant simple et rapide (Jayaprakasha et Pati, 2007). Les résultats obtenus pour l'extrait méthanolique et aqueux de l'écorce de *R. alaternus* sont présentés dans la figure 6.



**Figure 6** : Histogramme de l'effet scavenger du radical DPPH par les extraits méthanolique (EMRA) et aqueux (EARA) de l'écorce de *R. alaternus* à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type ( $n = 3$ ). Le test de Student a été utilisé pour examiner la signification statistique des données. Les valeurs ne partageant pas une lettre commune pour la même concentration sont statistiquement différentes ( $P < 0,05$ ).

D'après les résultats, le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour l'EMRA, ou pour EARA. Pour une concentration de 120  $\mu\text{g/ml}$ , on constate que les extraits de l'écorce de *R. alaternus* ont exhibé un effet scavenging très important, avec des pourcentages respectifs de l'ordre de  $83,5 \pm 1,05\%$  et  $89,92 \pm 0,89\%$ , respectivement.

**Tableau X** : Valeurs des IC<sub>50</sub> des extraits méthanolique (EMRA) et aqueux (EARA) de l'écorce de *R. alaternus*, ainsi que les standards vis-à-vis du radical DPPH.

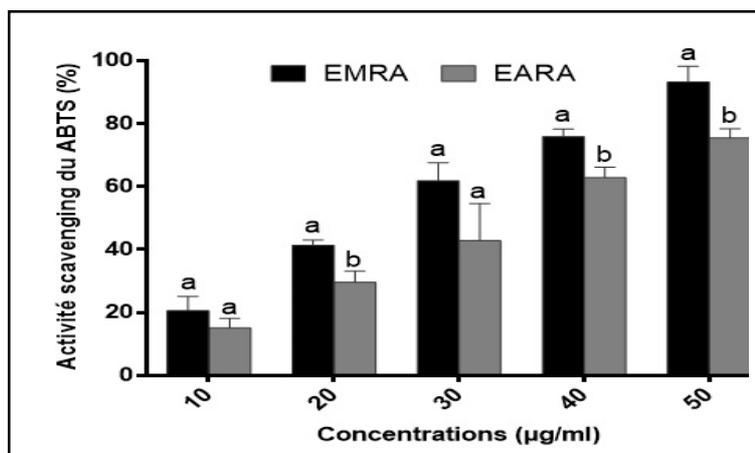
| Extraits et standards | IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|-----------------------|---------------------------------------|
| EMRA                  | $58,31 \pm 3,07$                      |
| EARA                  | $54,77 \pm 3,16$                      |
| BHA                   | $3,58 \pm 0,24$                       |
| AG                    | $4,43 \pm 0,25$                       |

A partir des données de tableau X, les standards butylhydroxyanisole (BHA) et acide gallique (AG) dans les mêmes conditions ont marqués les plus faibles valeurs d'IC<sub>50</sub> de l'ordre  $3,58 \pm 0,24$  et  $4,43 \pm 0,25$   $\mu\text{g/ml}$ , respectivement, donc une activité anti-DPPH la plus

importante. Cependant, les IC<sub>50</sub> des extraits méthanolique et aqueux sont estimés à  $58,31 \pm 3,07$  et  $54,77 \pm 3,16$ , respectivement.

### III.1.3.2. Activité scavenging du radical ABTS

L'ABTS est l'une des molécules les plus exploitées dans les études de l'activité antioxydant. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition dans la figure 7. Les extraits EMRA et EARA ont présenté une importante activité inhibitrice vis-à-vis le radical ABTS<sup>•+</sup> allant de 75,45 % à 93,17 % respectivement, pour seulement une concentration maximale de 50 µg/ml.



**Figure 7** : Histogramme de l'effet scavenger du radical ABTS par les extraits hydro-alcooliques des feuilles (FRA) et de l'écorce (ERA) de *R. alaternus* à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type (n=3). Le test t de Student a été utilisé pour examiner la signification statistique des données. Les valeurs ne partageant pas une lettre commune pour la même concentration sont statistiquement différentes ( $P < 0,05$ ).

**Tableau XI** : Valeurs des IC<sub>50</sub> des extraits méthanolique (EMRA) et aqueux (EARA) de l'écorce de *R. alaternus* vis-à-vis du radical ABTS.

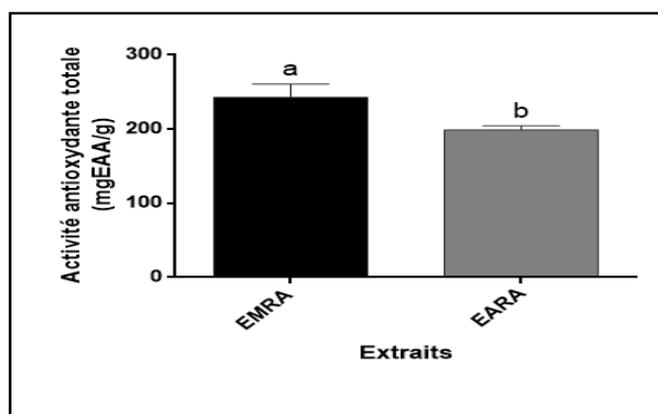
| Extraits | IC <sub>50</sub> (µg/ml) |
|----------|--------------------------|
| EMRA     | $22,33 \pm 0,35$         |
| EARA     | $31,01 \pm 2,64$         |

Selon le tableau XI, les extraits méthanolique et aqueux de l'écorce de *R. alaternus* présentent une forte activité antioxydant vis-à-vis du radical ABTS. En effet, l'extrait aqueux

montre une activité anti-radicalaire un peu plus faible que celle de l'extrait méthanolique avec des IC50 de l'ordre de  $31,01 \pm 2,64$  et  $22,33 \pm 0,35$   $\mu\text{g/ml}$ , respectivement.

### III.1.3.3. Activité antioxydant totale

La méthode du phosphomolybdate d'ammonium est basée sur la réduction du molybdate  $\text{MO}^{+6}$  en  $\text{MO}^{+5}$  par les antioxydants de l'extrait méthanolique et aqueux de l'écorce de *R. alaternus*. Différentes concentrations d'acide ascorbique ont permis de tracer la courbe d'étalonnage dont l'équation est de type :  $y = 0,0429x - 0,0753$  avec  $R^2=0,9721$



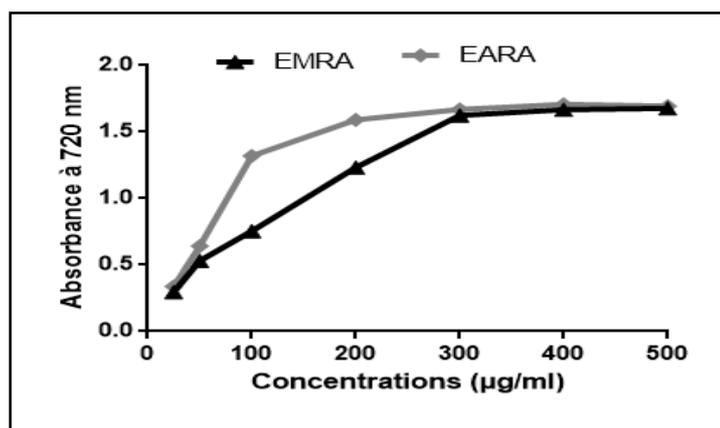
**Figure 8 :** Activité antioxydante totale des extraits méthanolique et aqueux de l'écorce de *R. alaternus*. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type (n=3). Le test t de Student a été utilisé pour examiner la signification statistique des données. Les valeurs ne partageant pas une lettre commune sont statistiquement différentes ( $P < 0,05$ ).

(Annexe 10), et d'exprimer l'activité antioxydant totale en mg EAA/g d'extrait sec.

Les résultats illustrés dans la figure 8 montrent qu'il existe une différence significative ( $P < 0,05$ ) de l'activité antioxydant au phosphomolybdate entre les deux extraits. L'activité la plus élevée est enregistrée pour l'extrait méthanolique qui est de  $242,8 \pm 17,96$  mg EAA/g extrait sec, comparativement à celle de l'extrait aqueux qui est de  $198,81 \pm 5,61$  mg EAA/g extrait sec.

### III.1.3.4. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur du fer ferrique peut servir d'indicateur significatif du potentiel antioxydant des extraits méthanolique et aqueux de l'écorce de *R. alaternus*, par la réduction du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ).



**Figure 9 :** Courbes des absorbances obtenues de la réduction du fer ferrique en fer ferreux par les extraits méthanolique (EMRA) et aqueux (EARA) de l'écorce de *R. alaternus* à différentes concentrations.

D'après les résultats graphiques représentés par l'absorbance à 700 nm en fonction des concentrations des extraits (Figure 9), on remarque que l'absorbance des deux extraits méthanolique et aqueux de l'écorce augmente en fonction de l'augmentation des concentrations, ce qui signifie une évolution de la puissance de réduction du fer ferrique en fer ferreux. On constate que cette augmentation est considérablement significative à partir d'une concentration de 50 µg/ml jusqu'à une concentration de 300 µg/ml, dont l'EARA est plus puissant (absorbance = 1.6) que l'EMRA (absorbance = 1.24). À partir des concentrations allant de 300 à 500 µg/ml, le pouvoir réducteur se stabilise pour les deux extraits et atteint presque son maximum qui se situe autour de 1,69.

### III.1.3 Etude des activités analgésique et anti-inflammatoire

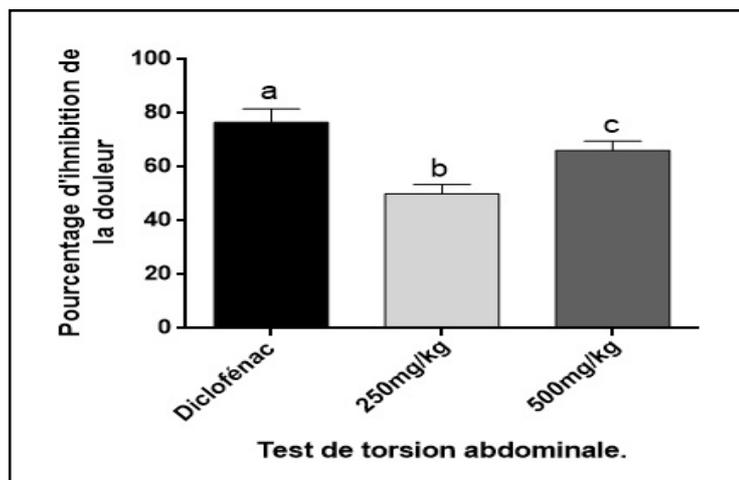
#### III.1.3.1. Activité analgésique

##### III.1.3.1.1. Test de torsion abdominale

Le test de Koster est un modèle non spécifique, simple et fiable, largement utilisé pour l'évaluation rapide de l'effet antalgique périphérique des médicaments ou des substances naturelles. L'injection intrapéritonéale de l'acide acétique cause une douleur inflammatoire (Shukla *et al.*, 2010 ; Hossain *et al.*, 2011 ; Jan et Khan, 2016).

Les résultats présentés dans la figure 10 montrent qu'en présence de dicolfénac qui est le produit de référence, la douleur abdominale diminue significativement par rapport à l'extrait méthanolique (250 et 500 mg/kg), ceci correspond à des pourcentages d'inhibition

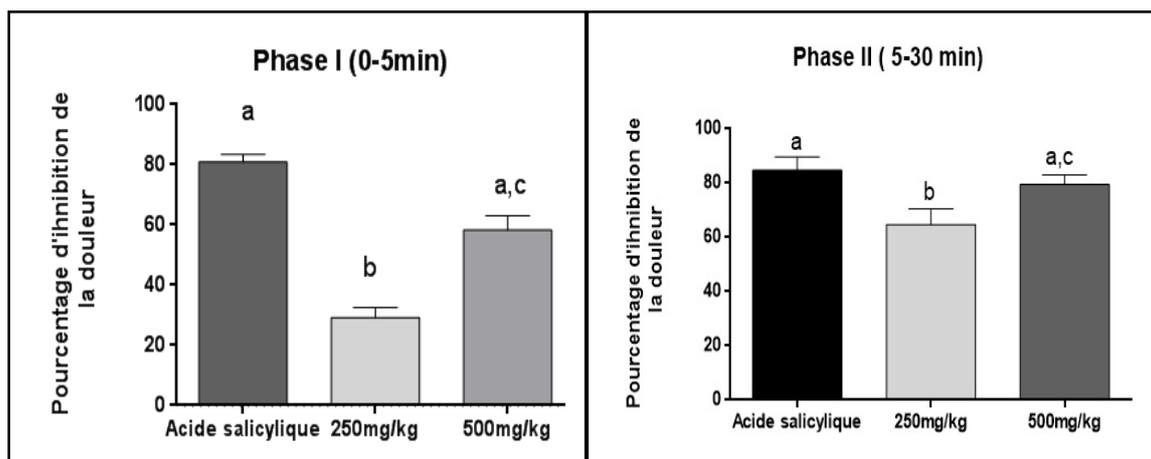
des contorsions de 76,66 % pour le diclofénac, 66,19% pour la dose de 500 mg/kg et un taux d'inhibition de 50,12% pour le lot qui a reçu une dose de 250 mg/kg d'extrait.



**Figure 10 :** Effet de l'extrait méthanolique (EMRA) de l'écorce de *R. alaternus* sur l'inhibition du nombre de contraction abdominale induit par l'acide acétique (0,6%). Les souris sont traitées par 250, 500 mg/Kg d'extraits et 50 mg/kg diclofénac. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (n = 5). Les différences entre les moyennes ont été testées statistiquement par le test ANOVA one way, suivi du test post hoc de Tukey. Les valeurs ne partageant pas une lettre commune sont statistiquement différentes (P < 0,05).

### III.1.3.2. Test d'irritation induite par le formaldéhyde

Dans ce test les souris ont été traitées avec une injection du formaldéhyde dans la patte, ce qui induit des douleurs et des irritations caractérisées par une augmentation de la fréquence de léchage des pattes pendant deux phases (phase neurogène et phase inflammatoire).



**Figure 11 :** Effet analgésique de l'extrait méthanolique de l'écorce de *R. alaternus* (250 mg/Kg et 500 mg/kg) et l'acide salicylique (100 mg/kg) sur la douleur (temps de léchage) induite chez la souris par injection du formaldéhyde. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (n=5). Les différences entre les moyennes ont été testées statistiquement par le test ANOVA one way, suivi du test post hoc de Tukey. Les valeurs ne partageant pas une lettre commune sont statistiquement différentes (P < 0,05).

D'après les résultats, on remarque que la dose de 250 mg/kg de l'EMRA a réduit la douleur induite par le formaldéhyde dans les deux phases neurogène et inflammatoire. Elle a montré une inhibition de la douleur avec des pourcentages de 29,12% et 64,7% respectivement pour les deux phases neurogène et inflammatoire, respectivement.

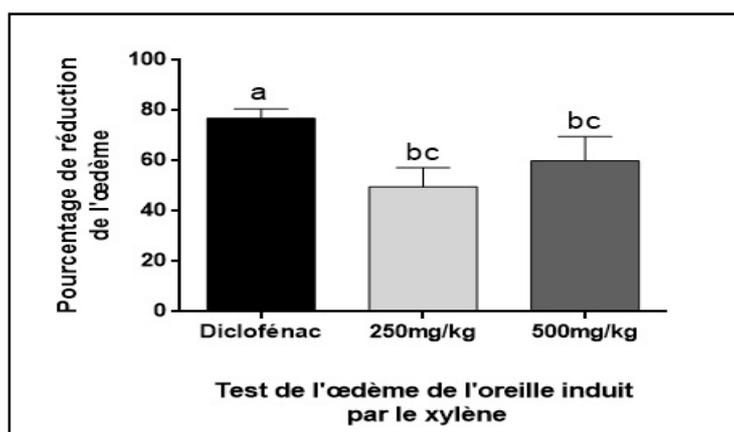
Par contre, pour la dose de 500 mg/kg, aucune différence significative ( $P < 0.05$ ) n'a été enregistrée par rapport au groupe traité avec l'acide salicylique. Elle inhibe les deux phases avec un pourcentage de 58,3% dans la phase I et 79,54% dans la phase. L'acide salicylique (100 mg/kg) utilisé comme référence, a un effet analgésique significatif qui est de 80,9% et 84,9% pour la phase I et la phase II, respectivement.

### III.1.3.2. Activité Anti-inflammatoire

#### III.1.3.2.1. Test de l'œdème de l'oreille induit par le xylène

Afin d'évaluer l'effet anti-inflammatoire de l'extrait méthanolique de l'écorce de *R. alaternus*, la mesure du pourcentage de réduction de l'œdème de l'oreille induit par le xylène a été effectuée chez les souris.

Selon les résultats présentés dans la figure 12, on note que le diclofénac (contrôle positif) à une dose de 50 mg/Kg a fortement inhibé l'œdème de l'oreille, avec un pourcentage de 77,21%. Le prétraitement avec l'extrait méthanolique de l'écorce de *R. alaternus* aux doses de 250 et 500 mg/Kg a réduit de manière significative l'inflammation. Les deux doses ont présenté des pourcentages d'inhibitions de 49,72% et 59,81%, respectivement.



**Figure 12** : Effet de l'extrait méthanolique de L'écorce de *R.alaternus* sur l'œdème de l'oreille induit par xylène chez la souris. L'œdème est induit par application locale de 30 µg xylène sur la face interne de l'oreille avant droite. Une heure avant l'induction de xylène, les souris sont traitées par 250, 500 mg/Kg d'extraits et 50 mg/kg Diclofénac. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). Les différences entre les moyennes ont été testées statistiquement par le test ANOVA one way, suivi du test post hoc de Tukey. Les valeurs ne partageant pas une lettre commune sont statistiquement différentes ( $P < 0,05$ ).

## III.2. Discussion

Les plantes sont utilisées en médecine traditionnelle, pour soulager et guérir différentes maladies humaines. En effet, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence des composés naturels bioactifs appelés « les métabolites secondaires » (**Boudjouref et Mourad, 2018**).

Dans cette étude, le rendement des deux extraits méthanolique et aqueux des écorces de *R. alaternus* obtenu a été comparé aux résultats des différents extraits rapportés dans la littérature. Il a été montré que la différence de rendement d'extraction est due à un ensemble de paramètres comme l'origine géographique, la période de récolte, la méthode d'extraction, la nature de solvant, le diamètre des particules de l'échantillon, aux conditions expérimentales (**Naczk et Shahidi, 2004**), et également à la différence dans les polarités des solvants d'extraction qui influence la solubilité des constituants chimiques d'un extrait (**Sulaiman et al., 2011**).

Les rendements élevés de nos deux extraits peuvent être expliqués par le fait que la méthode de préparation traditionnelle est basée sur le chauffage de l'écorce de *R. alaternus*, et donc certains composés qui nécessitent une température élevée peuvent être dissous davantage dans cet extrait (décocté). **Dai et Mumper (2010)** ont rapporté qu'une température élevée de l'eau pouvait extraire des composés phénoliques en grande quantité. Cependant, l'extrait méthanolique a également donné de bon rendement, des études précédentes ont rapportés que le méthanol pur est l'un des solvants les plus efficaces pour récupérer les composés antioxydants (**Anwar et al., 2011 ; Azizah et al., 1999**).

Les résultats obtenus montrent que les teneurs en polyphénols totaux varient considérablement entre les deux extraits (EMRA et EARA) de l'écorce de *R. alaternus*. L'EMRA possède une teneur plus élevée en polyphénols totaux par rapport à celle de l'extrait aqueux. **Kosalec et al. (2013)** et **Chaouche et al. (2020)** ont obtenu des teneurs en polyphénols totaux égales à 38,4 mg EAG/g d'extrait (méthanol) et 0,64 mg EAG/g MS (méthanol/acétone) dans l'écorce de la même espèce. Et d'autres résultats obtenus pour les extraits méthanolique (**Moussi et al., 2015**) et éthanolique (**Khettal et al., 2011**) des feuilles de *R. alaternus* ont rapporté un taux de 155,6 mg EAG /g et  $150 \pm 9,7$  mg EAG/g d'extrait, respectivement.

Cette différence pourrait s'expliquer par l'origine, la variété ainsi que la saison de récolte de la plante (**Ebrahimzadeh et al., 2008 ; Park et Cha, 2003**). La partie de la plante étudiée (feuille et écorce), la méthode d'extraction et la nature des solvants peuvent également influencer la teneur en composés phénoliques (**Benchaachoua et al., 2018 ; Chaouche et al., 2020**). Le réactif de Folin Ciocalteu est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles (**Vuorela, 2005**). Le dosage par ce réactif donne une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait mais il peut être réduit par d'autres composés comme les sucres réducteurs et les protéines (**Bessada et al., 2015**).

Les taux des flavonoïdes totaux, flavones et flavonols obtenues dans la présente étude sont majoritairement plus élevés dans l'extrait méthanolique que dans l'extrait aqueux, ce qui montre que l'extraction par macération au méthanol est la meilleure méthode d'extraction des flavonoïdes, flavones et flavonols dans cette étude. Une étude réalisée par **Kosalec et al., (2013)** a rapporté que l'extrait méthanolique d'écorce de *R. alaternus* contient environ 33,6 mg EQ/g d'extrait. **Boussahel et ses collaborateurs (2013)** ont confirmé la présence des flavonoïdes chez cette espèce avec une teneur de  $61,127 \pm 1,217$  mg EQ/g de l'extrait. **Khettal et al. (2011)** ont également trouvé que les feuilles de ce dernier est riche en flavonoïdes avec un taux de  $92 \pm 14$  mg EQ/g d'extrait. La différence observée peut être due à la région dans laquelle les plantes sont cultivées, ainsi qu'à la période de la récolte et à la différence de distribution des flavonoïdes durant le développement de la plante (**Benchaachoua et al., 2018**).

D'après les résultats obtenus, l'extrait méthanolique contient une teneur plus élevée en tanins condensés par rapport à l'extrait aqueux de l'écorce de *R. alaternus*. **Chaouche et ses collègues (2020)** ont rapporté un taux de 3 mg EC/g d'extrait de l'écorce de *R. alaternus* en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction. Une étude sur l'extrait méthanolique des feuilles de la même espèce a montré un taux de 736 mg EAT/g d'extrait en tanins condensés (**Ben ammar et al., 2007**). Cette variation peut s'expliquer par le fait que l'extraction des tanins condensés dépend de leur nature chimique, du solvant utilisé et des conditions opératoires (**Bessada et al., 2015**).

L'évaluation du potentiel antioxydant s'effectue en déterminant les produits résultant de l'oxydation ou en évaluant la capacité à piéger les radicaux (**Enneb et al., 2015**). D'après les résultats présentés, il ressort que l'activité scavenging du radical DPPH est approximativement similaire et importante pour les extraits méthanolique et aqueux.

L'analyse phytochimique des écorces de *R. alaternus* confirme sa richesse en composés phénoliques, notamment en flavonoïdes, ces derniers sont des composés connus par leurs activités antioxydant et antiradicalaire (**Barreca et al., 2011**).

Une étude réalisée par **Kosalec et ses collaborateurs (2013)** sur l'écorce de *R. alaternus* en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction a révélé un IC<sub>50</sub> de 78,7± 3,166 µg/ml, donc une valeur supérieure par rapport à celles que nous avons obtenue. D'autre part, ces résultats sont complètement différents de ceux de **Ben Ammar et ses collaborateurs (2008)** où ils ont trouvé une valeur d'IC<sub>50</sub> de 7 µg/ml pour l'extrait méthanolique des racines. Cette différence de pouvoir antioxydant peut être due à la nature des composés phénoliques présents dans chaque extrait et à leur répartition dans la plante ainsi qu'à leur comportement vis-à-vis de la réduction des radicaux libres (**Abate, 2019**).

Par ailleurs, l'inhibition du radical cationique ABTS par les extraits de *R. alaternus* est considérable, dans laquelle l'extrait méthanolique a enregistré une activité légèrement supérieure avec une IC<sub>50</sub> = 22,33 ± 0,35 µg/ml, tandis que l'extrait aqueux a enregistré une IC<sub>50</sub> = 31,01 ± 2,64 µg/ml. En effet, des études ont rapporté l'existence d'une relation étroite entre le contenu en polyphénols totaux des substances végétales et leur capacité antioxydant (**Kahkonen et al., 1999**).

Des résultats différents pour l'évaluation de l'activité antioxydant au phosphomolybdate des écorces de *R. alaternus* ont été obtenus. L'extrait méthanolique a enregistré une activité un peu plus élevée par rapport à l'extrait aqueux avec un taux de 242,8 mg EAA/g et 198,8 mg EAA/g respectivement. Cette différence de pouvoir antioxydant observée dans les deux extraits peut être due essentiellement à la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux qui ont été observées en quantité importante dans l'extrait méthanolique. La capacité réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydant (**Yang et al., 2008**).

D'après les résultats obtenus, on remarque que la capacité de réduction du fer ferrique est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des deux extraits, avec un taux légèrement plus puissant enregistré dans l'extrait aqueux par rapport à celui de l'extrait méthanolique. Des résultats similaires aux nôtres ont rapporté que l'extrait aqueux possède une grande capacité à réduire le fer que celle de l'extrait méthanolique, une activité qui est due probablement à la présence d'un taux élevé de polyphénols donateurs d'électrons qui peuvent mettre fin à la réaction en chaînes des radicaux libres. L'extrait méthanolique

présente quant à lui une activité chélatrice très appréciable, probablement due à sa richesse en flavonoïdes et en tanins condensés (**Babili et al., 2013**).

Selon **Barreca et al. (2011)**, *R. alaternus* est riche en polyphénols surtout en flavonoïdes qui sont connus par leurs activités antioxydant et antiradicalaire. En effet, l'action de ces substances est due à leur structure, au nombre de groupements donneurs d'hydrogène et au nombre élevé des groupements hydroxyles (**Heim et Tagliaferro, 2002**). D'après **Ferreira et al. (2006)**, le potentiel réducteur des extraits végétaux est dû à la présence de molécules capables de donner des électrons qui peuvent réagir avec les radicaux libres et les convertir en produits stables.

Dans la présente étude, nous avons établi une base scientifique pour l'utilisation des écorcés de *R. alaternus* en médecine traditionnelle comme anti-inflammatoire. Ce travail a démontré que l'extrait méthanolique d'écorce de *R. alaternus* possède des propriétés pharmacologiques à savoir anti-inflammatoire et analgésique.

Le test de Koster a été utilisé pour tester l'activité analgésique périphérique, qui consiste à induire une injection intrapéritonéale de l'acide acétique à 1%, ce qui provoque des douleurs abdominales intenses (contorsion abdominale). La douleur provoquée par l'injection de l'acide acétique est due à la libération de médiateurs chimiques tels que le potassium, les ions hydrogènes, la bradykinine, la sérotonine, et l'histamine, qui stimulent les neurones nociceptifs périphériques et induisent l'augmentation de la perméabilité vasculaire, ainsi que des médiateurs inflammatoires comme la prostaglandine E2 provenant des cellules inflammatoires (**Figueiredo et al., 2013**). L'extrait méthanolique à une dose de 500 mg/kg a inhibé les contractions abdominales de manière significative et d'une façon très proche à celui du diclofénac. Cette réponse analgésique peut être en relation à la présence d'un contenu élevé en polyphénols dans la plante, en particulier les flavonoïdes et les tanins (**Handa et al., 1992 ; Orhan et al., 2007**).

Des études biochimiques sur le mécanisme d'action des flavonoïdes ont montré que ces composés peuvent inhiber une grande variété d'enzymes, par exemple la cyclooxygénase qui permet la formation de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique (**Williams et al., 1995 ; Middleton et al., 2000**). Des études ont rapporté que les composés chimiques présents dans les extraits d'autres plantes médicinales sont responsables de l'activité analgésique (**Bittar et al., 2000 ; Delporte et al., 2007 ; Middleton et al., 2000**).

Par ailleurs, le test au formaldéhyde a été utilisé également pour évaluer l'effet analgésique de l'extrait méthanolique (EMRA). L'injection de cette solution dans la patte de la souris entraîne l'apparition d'un syndrome douloureux pendant deux phases (neurogène et inflammatoire). La première phase (0-5min) est caractérisée par stimulation des fibres C et la libération de la substance P et bradykinine. La deuxième phase (5-30min) retardée est due à la libération des médiateurs de l'inflammation comme la sérotonine, l'histamine, la bradykinine, et les prostaglandines initiées par les fibres C (**Shibata et al., 1989**). Les composés à action centrale (les antalgiques centraux) inhibent les deux phases tandis que les composés à action périphérique (analgésiques périphériques) inhibent seulement la deuxième phase (**Banerjee et al., 2013**).

La présente étude a montré que les deux doses de l'extrait méthanolique de l'écorce de *R. alaternus* ont inhibé les deux phases provoquées par l'injection de la solution du formaldéhyde. L'effet analgésique a été significatif dans les deux phases ; cela suggère que l'EMRA agit de la même façon que les AINS. Cependant, l'effet analgésique enregistré avec la dose de 500 mg/kg d'EMRA est considérablement plus important que celui de la dose de 250mg/kg dans les deux phases. L'étude menée par **Soro et ses collègues (2009)** utilisant des extraits de *Ximenia Americana* à dose de 100 mg/kg a montré qu'elle possède un effet analgésique avec un pourcentage d'inhibition 6,66% et 38,33% pour les phases I et II respectivement. **Kouakou et ses collaborateurs. (2010)** ont montré que pour l'extrait de *Mitracarpus scaber* (10 mg/kg), a des pourcentages d'inhibition de 27,27% et 98,18% au cours de la première et la seconde phase respectivement.

Concernant l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait méthanolique des écorces de *R. alaternus*, le test d'œdème de l'oreille induit par xylène décrit par **Nunez-Guillen et al. (1997)** a été réalisé. Le xylène est un agent flogistique, promoteur de l'inflammation neurogène qui agit sur des cellules cibles dans la périphérie telles que les mastocytes (polynucléaires), les cellules immunitaires (macrophage) et les muscles lisses vasculaires, produisant une inflammation, qui se caractérise par une rougeur, un gonflement et une hypersensibilité (**Eidi et al., 2016**).

A partir des résultats obtenus il a été révélé que le traitement des souris par l'extrait méthanolique des écorces de *R. alaternus* (250 et 500 mg/kg) conduit à une réduction significative de la taille de l'œdème de l'oreille par rapport à celle obtenue par le diclofénac. Il a été mentionné, dans plusieurs articles de synthèse, que les écorces *R. alaternus*, contenant

en quantité importante des flavonoïdes et des tanins, sont utilisées depuis longtemps comme anti-inflammatoire (**Kim et al., 2017**). Les flavonoïdes limitent la production des superoxydes en inhibant la synthèse des prostaglandines. Des radicaux libres sont également produits par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles au cours de la phagocytose. Selon **Tapas et al. (2008)**, les flavones et les flavonols, sous forme glycosylée ou libre comme la quercétine, ont une activité inhibitrice de la cyclo-oxygénase (COX). Dans une autre d'étude, les flavonoïdes sont connus pour être des cibles des prostaglandines, qui sont impliquées dans la phase finale de l'inflammation aigue et la perception de la douleur (**Morimoto et al., 1988**).

# **Conclusion**

## **Conclusion**

Au terme de ce travail, il s'avère que l'écorce de *R. alaternus* est riches en divers composés phénolique tel que les polyphénols totaux, les flavonoïdes, les flavones et flavonols ainsi que les tanins condensés.

L'extrait méthanolique (EMRA) possède les teneurs les plus élevées en polyphénol totaux ( $143,003 \pm 10,78$  mg EAG/g), en flavonoïdes ( $43,39 \pm 0,82$  mg EQ/g), en flavones et flavonols ( $20,85 \pm 0,18$  mg EQ/g) et en tannins condensés ( $62,31 \pm 10,29$  EC/g) par rapport à l'extrait aqueux ( $137,37 \pm 5,887$  mg EAG/g ;  $17,17 \pm 0,735$  mg EQ/g ;  $10,76 \pm 0,09$  mg EQ/g et  $52,36 \pm 5,942$  mg EC/g, respectivement)

L'évaluation de l'activité antioxydant par les différents tests (DPPH, ABTS, activité antioxydant totale et pouvoir réducteur) a montré que les deux extraits de l'écorce possèdent une forte activité de piégeage des radicaux DPPH et ABTS avec des IC50 respectifs de  $58,31 \pm 3,07$  et  $22,33 \pm 0,35$  µg/ml pour l'extrait méthanolique et  $54,77 \pm 3,16$  et  $31,01 \pm 2,64$  µg/ml pour l'extrait aqueux. L'extrait méthanolique a exhibé une activité antioxydant totale de  $242,8 \pm 17,96$  mg EAA/g extrait, contre  $198,81 \pm 5,61$  mg EAA/g extrait pour l'extrait aqueux. Cependant, l'extrait aqueux s'est montré un peu plus efficace pour réduire le fer ferrique en fer ferreux comparé à l'extrait méthanolique.

L'extrait méthanolique *R. alaternus* possède des effet analgésique et antiinflammatoire assez importants. En effet, l'extrait méthanolique possède une forte activité analgésique à travers l'inhibition des contorsions abdominale chez la souris induite par l'injection de l'acide acétique. L'inhibition maximale est atteinte à la dose de 500 mg/kg avec 66,19% qu'est proche à celle du Diclofinac 76,66%. De plus, dans le test d'irritation par le formaldéhyde, l'effet analgésique à la dose de 500 mg/kg dans les deux phase neurogène et inflammatoire (58,3% et 79,54%, respectivement) était proche à celui de l'acide salicylique à 100 mg/kg (80,9% et 84,9%, respectivement)

Enfin, l'activité anti-inflammatoire évaluée à l'aide du test d'œdème de l'oreille induit par le xylène a montré que l'extrait méthanolique de l'écorce aux doses de 250 et 500 mg/Kg entraine une inhibition significative du développement de l'œdème, avec un pourcentage d'inhibition respectifs de 49,72% et 59,81%, et proche par rapport à celui du control positif qui était le Diclofenac (77,21%).

Les résultats de notre travail nécessitent des études complémentaires approfondies à différents niveaux. Il sera intéressant de réaliser une caractérisation par des techniques plus

avancées (HPLC, HPLC/MS) et un fractionnement des extraits bruts afin de déterminer la structure des différents composés révélés. Les activités étudiées à savoir antioxydante, anti-inflammatoire et analgésique doivent être évaluées aux niveaux cellulaire et moléculaire pour mieux cerner les interactions moléculaires et les mécanismes d'action de ces composés vis-à-vis de leurs cibles.

# **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

- ✓ **Abou-chaar, C.I., Shamlian, S.N., 1980.** A chromatographic study of the anthraquinones of *Rhamnus alaternus* L. Extraction, isolation and identification of the aglycones. *Quarterly Journal of Crude Drug Research* 18(1), 49-55.
- ✓ **Ali-Rachedi, F., Meraghni, S., Touaibia, N., Mesbah, S., 2018.** Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne *Scabiosa Atropurpurea* sub. *Maritima* L. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*.
- ✓ **Arora, A., Sairam, R., Srivastava, G., 2002.** Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current science*, 1227-1238.
- ✓ **Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., Khebri, S., 2010.** Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Lebanese science journal* 11(1), 69-81.
- ✓ **Azizah, A., Ruslawati, N.N., Tee, T.S., 1999.** Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. *Food Chemistry* 64(2), 199-202.
- ✓ **Babili, F., Valentin, A., Chatelain, C., 2013.** *Lawsonia inermis*: its anatomy and its antimalarial, antioxidant and human breast cancer cells MCF7 activities. *Pharmaceut Anal Acta* 4(203), 2.
- ✓ **Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, J., Pinkas, M., 1996.** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-forschung* 46(11), 1086-1089.
- ✓ **Banerjee, N., Kim, H., Talcott, S., Mertens-Talcott, S., 2013.** Pomegranate polyphenolics suppressed azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci and inflammation: possible role of miR-126/VCAM-1 and miR-126/PI3K/AKT/mTOR. *Carcinogenesis* 34(12), 2814-2822.
- ✓ **Barreca, D., Bellocco, E., Caristi, C., Leuzzi, U., Gattuso, G., 2011.** Kumquat (*Fortunella japonica* Swingle) juice: Flavonoid distribution and antioxidant properties. *Food research international* 44(7), 2190-2197.
- ✓ **Belhattab, R., Larous, L., Kalantzakis, G., Boskou, D., Exarchou, V., 2004.** Antifungal properties of *Origanum glandulosum* Desf. extracts. *Journal of Food Agriculture and Environment* 2, 69-73.
- ✓ **Ben Ammar, R., Kilani, S., Bouhlel, I., Ezzi, L., Skandrani, I., Boubaker, J., Ben Sghaier, M., Naffeti, A., Mahmoud, A., Chekir-Ghedira, L., 2008.**

- Antiproliferative, antioxidant, and antimutagenic activities of flavonoid-enriched extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L.: Combination with the phytochemical composition. *Drug and chemical toxicology* 31(1), 61-80.
- ✓ **Ben Ammar, R., Kilani, S., Bouhlel, I., Skandrani, I., Naffeti, A., Boubaker, J., Ben Sghaier, M., Bhourri, W., Mahmoud, A., Chekir-Ghedira, L., 2007.** Antibacterial and cytotoxic activities of extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae). *Annals of microbiology* 57(3), 453-460.
  - ✓ **Benbrook, C.M., 2005.** Elevating antioxidant levels in food through organic farming and food processing. Organic Center Washington, DC.
  - ✓ **Benchaachoua, A., Bessam, H.M., Saidi, I., Bel-abbes, S., 2018.** Effects of different extraction methods and solvents on the phenolic composition and antioxidant activity of *Silybum marianum* leaves extracts. *Int. J. Med. Sci. Clin. Invent* 5(3), 3641-3647.
  - ✓ **Bessada, S.M., Barreira, J.C., Oliveira, M.B.P., 2015.** Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review. *Industrial Crops and Products* 76, 604-615.
  - ✓ **Bhourri, W., Boubaker, J., Kilani, S., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L., 2012.** Flavonoids from *Rhamnus alaternus* L.(Rhamnaceae): Kaempferol 3-O- $\beta$ -isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O- $\beta$ -isorhamninoside protect against DNA damage in human lymphoblastoid cell and enhance antioxidant activity. *South African journal of botany* 80, 57-62.
  - ✓ **Bidie, A.D.P., Koffi, E., Yapi, F., Yémié, A.A., Djaman, J., Guede-Guina, F., 2010.** Evaluation of the toxicity of a methanolic total extract of *Mitragyna ciliata* a natural anti-malaric. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 4(5).
  - ✓ **Bittar, M., de Souza, M.M., Yunes, R.A., Lento, R., Delle Monache, F., Cechinel Filho, V., 2000.** Antinociceptive activity of I3, II8-binarigenin, a biflavonoid present in plants of the guttiferæ. *Planta medica* 66(01), 84-86.
  - ✓ **BOUCHENAK, O., YAHIAOUI, K., BENHABYLES, N., LAOUFI, R., TOUBAL, S., EL HADDAD, D., OUSSAID, S., BLIZAK, D., ARAB, K., 2020.** CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE ET ÉVALUATION DU POUVOIR ANTIOXYDANT DES FEUILLES DE *MYRTUS COMMUNIS* L. ET *RHAMNUS ALATERNUS* L. *Revue Agrobiologia* 10, 1749-1761.
  - ✓ **Boudjouref, M., 2018.** Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L.

- ✓ **Boussahel, S., Speciale, A., Dahamna, S., Amar, Y., Bonaccorsi, I., Cacciola, F., Cimino, F., Donato, P., Ferlazzo, G., Harzallah, D., 2015.** Flavonoid profile, antioxidant and cytotoxic activity of different extracts from Algerian *Rhamnus alaternus* L. bark. *Pharmacognosy magazine* 11(42), 102.
- ✓ **Carip, C., de Beaumont, T., 2002.** Malignant histiocytofibroma of the small intestine in a young immune deficient patient. *Presse Medicale (Paris, France: 1983)* 31(5), 214-216.
- ✓ **Cerchiaro, G., Ferreira, A.M.d.C., 2006.** Oxindoles and copper complexes with oxindole-derivatives as potential pharmacological agents. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 17, 1473-1485.
- ✓ **Chaouche, T.M., Haddouchi, F., Boudjemai, O., Ghellai, I., 2020.** Antioxidant and hemolytic activity of *Ziziphus jujuba* Mill and *Rhamnus alaternus* L (Rhamnaceae) extracts from Algeria. *Activité antioxydante et hémolytique des extraits de Ziziphus jujuba* Mill et *Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae) d'Algérie. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*.
- ✓ **Charles, S.T., 2010.** Strength and vulnerability integration: a model of emotional well-being across adulthood. *Psychological bulletin* 136(6), 1068.
- ✓ **Dai, J., Mumper, R.J., 2010.** Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15(10), 7313-7352.
- ✓ **De Moffarts, B., Kirschvink, N., Pincemail, J., Lekeux, P., 2005.** Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval, *Annales de médecine vétérinaire. Annales Medecine Veterinaire, Liege, Belgium*.
- ✓ **Delporte, C., Backhouse, N., Inostroza, V., Aguirre, M.C., Peredo, N., Silva, X., Negrete, R., Miranda, H., 2007.** Analgesic activity of *Ugni molinae* (murtilla) in mice models of acute pain. *Journal of ethnopharmacology* 112(1), 162-165.
- ✓ **Dhingra, G., Kumar, V., Joshi, H.D., 2018.** Study of digital image processing techniques for leaf disease detection and classification. *Multimedia Tools and Applications* 77(15), 19951-20000.
- ✓ **Diallo, A., 2005.** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd.(Myrtaceae). PhD. of the University Bamako, Mali, 38-47.
- ✓ **Dubuisson, D., Dennis, S.G., 1977.** The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *pain* 4, 161-174.

- ✓ **Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F., Bekhradnia, A.R., 2008.** Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology* 7(18).
- ✓ **Eidi, A., Oryan, S., Zaringhalam, J., Rad, M., 2016.** Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the aerial parts of *Artemisia dracunculus* in mice. *Pharmaceutical biology* 54(3), 549-554.
- ✓ **Enneb, H., Belkadhi, A., Cheour, F., Ferchichi, A., 2015.** Comparaison des composés phénoliques et du pouvoir antioxydant de la plante de henné (*Lawsonia inermis* L.). *Journal of New Sciences* 20.
- ✓ **Ercisli, S., Orhan, E., 2007.** Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chemistry* 103(4), 1380-1384.
- ✓ **Faure, H., Mahy, S., Soudry, A., Duong, M., Chavanet, P., Piroth, L., 2009.** Déterminants de la prescription ou de la non-prescription d'antibiotiques en médecine générale. *Médecine et maladies infectieuses* 39(9), 714-721.
- ✓ **Favier, A., 2003.** Le stress oxydant. *L'actualité chimique* 108(10), 863-832.
- ✓ **Fiebich, B., Chrubasik, S., 2004.** Effects of an ethanolic *Salix* extract on the release of selected inflammatory mediators in vitro. *Phytomedicine* 11(2-3), 135-138.
- ✓ **Garbacki, N., Tits, M., Angenot, L., Damas, J., 2004.** Inhibitory effects of proanthocyanidins from *Ribes nigrum* leaves on carrageenin acute inflammatory reactions induced in rats. *BMC pharmacology* 4(1), 1-9.
- ✓ **Grant, L., McBean, D., Fyfe, L., Warnock, A., 2007.** A review of the biological and potential therapeutic actions of *Harpagophytum procumbens*. *Phytotherapy Research* 21(3), 199-209.
- ✓ **Gubb, A.S., 1913.** La flore algérienne, naturelle et acquise. Paul Geuthner.
- ✓ **Gulías, J., Traveset, A., Riera, N., Mus, M., 2004.** Critical stages in the recruitment process of *Rhamnus alaternus* L. *Annals of Botany* 93(6), 723-731.
- ✓ **Hajjaj-Hassouni, N., Mawani, N., Allali, F., Rkain, H., Hassouni, K., Hmamouchi, I., Dougados, M., 2017.** Evaluation of vitamin D status in rheumatoid arthritis and its association with disease activity across 15 countries: "The COMORA Study". *International journal of rheumatology* 2017.
- ✓ **Halliwell, B., 1994.** Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition reviews* 52(8), 253-265.

- ✓ **Harrar, A., 2018.** Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L.
- ✓ **Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2002.** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry* 13(10), 572-584.
- ✓ **Henzen, C., 2003.** Traitement aux glucocorticoïdes: risques et effets secondaires, *Forum Med. Suisse*. pp. 442-446.
- ✓ **Izhaki, I., 2002.** Emodin—a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. *New Phytologist* 155(2), 205-217.
- ✓ **Jayaprakash, S., Mahapatra, N.R., 2007.** Partitioned Hybrid Encoding to Minimize On-Chip Energy Dissipation of Wide Microprocessor Buses, 20th International Conference on VLSI Design held jointly with 6th International Conference on Embedded Systems (VLSID'07). IEEE, pp. 127-134.
- ✓ **Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M., 1999.** Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(10), 3954-3962.
- ✓ **Kim, H.P., Lim, H., Kwon, Y.S., 2017.** Therapeutic potential of medicinal plants and their constituents on lung inflammatory disorders. *Biomolecules & therapeutics* 25(2), 91.
- ✓ **Kim, J.H., Gupta, S.C., Park, B., Yadav, V.R., Aggarwal, B.B., 2012.** Turmeric (*Curcuma longa*) inhibits inflammatory nuclear factor (NF)- $\kappa$ B and NF- $\kappa$ B-regulated gene products and induces death receptors leading to suppressed proliferation, induced chemosensitization, and suppressed osteoclastogenesis. *Molecular nutrition & food research* 56(3), 454-465.
- ✓ **Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S., Vladimir-Knezevic, S., 2004.** Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta pharmaceutica* 54(1), 65-72.
- ✓ **Kosalec, I., Kremer, D., Locatelli, M., Epifano, F., Genovese, S., Carlucci, G., Randić, M., 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.
- ✓ **Koster, G., Statz, H., 1959.** Method of treating Zeeman splittings of paramagnetic ions in crystalline fields. *Physical Review* 113(2), 445.

- ✓ **Kostova, I., Iossifova, T., 2007.** Chemical components of Fraxinus species. *Fitoterapia* 78(2), 85-106.
- ✓ **Kouakou, S., Code, Q., 2018.** Analgesic and anti-inflammatory properties of synthesized imidazopyridinidyl-chalcones: Relationship activity and structure. *IJPR* 8(11).
- ✓ **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.
- ✓ **Ljubuncic, P., Azaizeh, H., Portnaya, I., Cogan, U., Said, O., Saleh, K.A., Bomzon, A., 2005.** Antioxidant activity and cytotoxicity of eight plants used in traditional Arab medicine in Israel. *Journal of ethnopharmacology* 99(1), 43-47.
- ✓ **Marc, F., Davin, A., Deglene-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M., Fritsch, P., 2004.** Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *M/S: médecine sciences* 20(4), 458-463.
- ✓ **Marrassini, C., Acevedo, C., Miño, J., Ferraro, G., Gorzalczany, S., 2010.** Evaluation of antinociceptive, antiinflammatory activities and phytochemical analysis of aerial parts of *Urtica urens* L. *Phytotherapy Research* 24(12), 1807-1812.
- ✓ **Mebirouk, R., Naimi, D., 2017.** Recherche et évaluation des activités biologiques de trois extraits d'*Helix aspersa* (aqueux, hydro alcoolique et organique). Université Frères Mentouri-Constantine 1.
- ✓ **Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., 2000.** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews* 52(4), 673-751.
- ✓ **Morimoto, C., Romain, P.L., Fox, D.A., Anderson, P., Dimaggio, M., Levine, H., Schlossman, S.F., 1988.** Abnormalities in CD4+ T-lymphocyte subsets in inflammatory rheumatic diseases. *The American journal of medicine* 84(5), 817-825.
- ✓ **Moussi, K., Nayak, B., Perkins, L.B., Dahmoune, F., Madani, K., Chibane, M., 2015.** HPLC-DAD profile of phenolic compounds and antioxidant activity of leaves extract of *Rhamnus alaternus* L. *Industrial Crops and Products* 74, 858-866.
- ✓ **Naczk, M., Shahidi, F., 2004.** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A* 1054(1-2), 95-111.
- ✓ **Nekkaa, A., Benaissa, A., Lalaouna, A.E., Mutelet, F., Canabady-Rochelle, L., 2021.** Optimization of the extraction process of bioactive compounds from *Rhamnus*

- alaternus leaves using Box-Behnken experimental design. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 25, 100345.
- ✓ **Nicholls, P., 2012.** Classical catalase: ancient and modern. *Archives of biochemistry and biophysics* 525(2), 95-101.
  - ✓ **Novelli, E.L., Silva, A.M., Novell F, J.L., Curi, P.R., 1995.** Reactive oxygen generation by azomethine H: a new antimalarial drug. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 73(8), 1189-1194.
  - ✓ **Núñez Guillén, M.E., da Silva Emim, J.A., Souccar, C., Lapa, A.J., 1997.** Analgesic and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of *Plantago major* L. *International Journal of Pharmacognosy* 35(2), 99-104.
  - ✓ **Oreopoulou, A., Tsimogiannis, D., Oreopoulou, V., 2019.** Extraction of polyphenols from aromatic and medicinal plants: an overview of the methods and the effect of extraction parameters. *Polyphenols in plants*, 243-259.
  - ✓ **Oyaizu, M., 1986.** Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese journal of nutrition and dietetics* 44(6), 307-315.
  - ✓ **Pastre, J., 2005.** Intérêt de la supplementation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques.
  - ✓ **Penzig, O., 1902.** Flore coloriée de poche du littoral méditerranéen de Gènes à Barcelone y compris la Corse. Klincksieck.
  - ✓ **Perić, P., Babić-Naglić, Đ., Ćurković, B., Perić, S., Kujundžić Tiljak, M., 2006.** Klinička i radiološka obilježja bolesnika s osteoartritisom koljena. *Reumatizam* 53(1), 11-17.
  - ✓ **Pourrut, B., 2008.** Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*.
  - ✓ **Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M., Cazin, M., Cazin, J.-C., Bailleul, F., Trotin, F., 2000.** Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of ethnopharmacology* 72(1-2), 35-42.
  - ✓ **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(9-10), 1231-1237.
  - ✓ **Riahi, L., Elferchichi, M., Ghazghazi, H., Jebali, J., Ziadi, S., Aouadhi, C., Chograni, H., Zaouali, Y., Zoghلامي, N., Mliki, A., 2013.** *Phytochemistry*,

- antioxydant and antimicrobial activities of the essential oils of *Mentha rotundifolia* L. in Tunisia. *Industrial Crops and Products* 49, 883-889.
- ✓ **Ribéreau-Gayon, P., 1982.** The anthocyanins of grapes and wines. *Anthocyanins as food colors* 6, 214-215.
  - ✓ **Richardson, J.E., Fay, M.F., Cronk, Q.C., Bowman, D., Chase, M.W., 2000.** A phylogenetic analysis of Rhamnaceae using *rbcL* and *trnL-F* plastid DNA sequences. *American Journal of Botany* 87(9), 1309-1324.
  - ✓ **Rigane, G., Younes, S.B., Ghazghazi, H., Salem, R.B., 2013.** Investigation into the biological activities and chemical composition of *Calendula officinalis* L. growing in Tunisia. *International Food Research Journal* 20(6), 3001.
  - ✓ **Risser, F., 2019.** Études d'un mécanisme enzymatique et d'interactions interprotéiques au sein de voies complexes de biosynthèse de polycétides. Université de Lorraine.
  - ✓ **Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C., Yamasaki, H., 2002.** Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177(1), 67-80.
  - ✓ **Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F., 1999.** Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food research international* 32(6), 407-412.
  - ✓ **Sarkhel, S., 2016.** Evaluation of the anti-inflammatory activities of *Quillaja saponaria* Mol. saponin extract in mice. *Toxicology reports* 3, 1-3.
  - ✓ **Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inoki, R., 1989.** Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *pain* 38(3), 347-352.
  - ✓ **Sofowora, A., 2010.** *Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique.* KARTHALA Editions.
  - ✓ **Soro, T.Y., Traore, F., Sakande, J., 2009.** Activité analgésique de l'extrait aqueux de *Ximenia americana* (Linné)(Olacaceae). *Comptes Rendus Biologies* 332(4), 371-377.
  - ✓ **Stevens, M.P., Haque, A., Atkins, T., Hill, J., Wood, M.W., Easton, A., Nelson, M., Underwood-Fowler, C., Titball, R.W., Bancroft, G.J., 2004.** Attenuated virulence and protective efficacy of a *Burkholderia pseudomallei* bsa type III secretion mutant in murine models of melioidosis. *Microbiology* 150(8), 2669-2676.
  - ✓ **Stocker, R., Keaney Jr, J.F., 2004.** Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological reviews* 84(4), 1381-1478.

- ✓ **Sulaiman, S.F., Sajak, A.A.B., Ooi, K.L., Seow, E.M., 2011.** Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. *Journal of Food Composition and analysis* 24(4-5), 506-515.
- ✓ **Tacherfiout, M., Petrov, P.D., Mattonai, M., Ribechini, E., Ribot, J., Bonet, M.L., Khettal, B., 2018.** Antihyperlipidemic effect of a *Rhamnus alaternus* leaf extract in Triton-induced hyperlipidemic rats and human HepG2 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 101, 501-509.
- ✓ **Tapas, A.R., Sakarkar, D., Kakde, R., 2008.** Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Tropical journal of Pharmaceutical research* 7(3), 1089-1099.
- ✓ **Touati, A., Hammouche, K., Sebaihi, S.E., 2018.** Screening phytochimique et étude de l'effet antioxydant des extraits phénoliques de la plante *Rhamnus alaternus* L.(Rhamnaceae).
- ✓ **Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions* 160(1), 1-40.
- ✓ **Vuorela, S., Salminen, H., Mäkelä, M., Kivikari, R., Karonen, M., Heinonen, M., 2005.** Effect of plant phenolics on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(22), 8492-8497.
- ✓ **Wallace, M., Staats, P., Presley, R., Ellis, D., Dissanayake, S., 2004.** Non-opioid analgesics: other: Safety assessment of intrathecal ziconotide treatment for chronic malignant and nonmalignant pain. *The Journal of Pain* 5(3), S55.
- ✓ **Weill, B., Batteux, F., 2003.** Immunopathologie et réactions inflammatoires. De Boeck Supérieur.
- ✓ **Wojdyło, A., Oszmiański, J., Czemerys, R., 2007.** Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* 105(3), 940-949.

# **Annexes**

**Annexe 1** : Les noms vernaculaires de *Rhamnus alaternus*.

| <b>Langue</b> | <b>Noms (références)</b>  |
|---------------|---|
| Berbère       | Ajroudj, Khalis n'imidekh, Amliles<br><b>(Beloued, 2001).</b>   |
| Arabe         | Méliles, Qaced <b>(Beloued, 2001)</b> ; Ouchbat<br>el safar <b>(Saidet al.,2002)</b> ; Oud el khir<br><b>(Beloued, 2001; Ben Ammar et al., 2008;</b><br><b>Ben Ammar et al., 2009).</b> |
| Français      | Alaterne <b>(Beloued, 2001)</b> , Nerprun<br>méditerranéen (Izhaki et al.,2002)   |
| Anglais       | ItalianBuckthorn, MediterraneanBuckthorn<br><b>(Akerreta, 2009).</b>  |

---

**Annexe 2 : Les espèces réactives de l'oxygène les plus importants (Seifried, 2007).**


---

**ERO radicalaires**


---

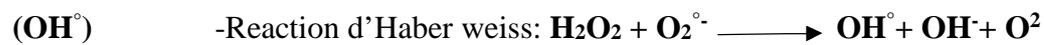
**Anion superoxyde ( $O_2^{\circ-}$ )** -C'est un radical relativement issu de la réduction mono-électronique (Addition d'un seul électron). Selon la réaction :



-Participe à l'inactivation des virus et bactéries

---

**Radical hydroxyle ( $OH^{\circ}$ )** -Il est formé à partir de ( $O_2^{\circ-}$ ) et ( $H_2O_2$ ) en présence d'ions ferriques selon :



-provoqué des lésions oxydatives sur L'ADN, les protéines et les lipides.

---

**ERO non radicalaires**


---

**Oxygène singulet ( $O_2^1$ )** -C'est la forme excitée de l'oxygène moléculaire ou  $O_2^{\circ-}$ , obtenu par appariement des deux électrons célibataire de l' $O_2$ . Selon la réaction :



-Il peut sous l'action des UV d'oxyder de nombreuses molécules

---

**Peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )** -Le  $H_2O_2$  est toxique pour la cellule, formé par dismutation, soit spontanée ou suit à l'action de l'enzyme de superoxyde dismutase, selon la réaction :



## Annexe 3 : Espèces réactives de nitrogène (Dellater et al., 2003).

| ERN radicalaires              |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Monoxyde d'azote (NO°)</b> | <p>-Le <b>NO°</b> est un radical qui possède un seul électron célibataire, il est formé dans les tissus biologiques, par le nitrique oxyde synthase (NO synthase).</p> <p>- Il est susceptible de réagir avec d'autres radicaux libres pour former des espèces oxydantes telles que l'<b>O2</b> pour donner le (<b>ONOO°</b>).</p> $\text{NO}^\circ + \text{O}_2^\circ \longrightarrow \text{ONOO}^\circ$ |
| <b>Dioxyde d'azote (NO2°)</b> | <p>-Le <b>NO2°</b> se forme à partir de radical peroxyde et le monoxyde d'azote, ils est très abondant dans les polluants atmosphérique.</p>  |
| ERN non radicalaires          |   |
| <b>Peroxynitrite (ONOO°)</b>  | <p>-Le <b>ONOO°</b> est un oxydant très puissant, capable d'endommager de nombreuses molécules biologiques (ADN, protéine et lipides...).</p> $\text{ONOO}^\circ + \text{H}^+ \longrightarrow \text{ONOOH} \longleftrightarrow \text{HO}^\circ + \text{NO}_2 \longrightarrow \text{NO}_3^- + \text{H}^+$  |

**Annexe 4 : Origines cellulaires et effets des principaux médiateurs impliqués dans le développement de la réaction inflammatoire (Regnault, 1992 ; Dallegri et Ottonello, 1997 ; Rankin, 2004).**

| Médiateurs                       | Origine   | Effets  |
|----------------------------------|---|---|
| Histamine                        | Mastocytes, basophiles, éosinophiles et plaquettes.             | Assure la vasodilatation, permet la contraction des muscles lisses, provoque la sensation de douleur.   |
| Serotonin                        | Mastocytes et plaquettes.                                       | Augmente la perméabilité vasculaire, dilate les capillaires et stimule la contraction des muscles lisses.   |
| Platelet activating factor (PAF) | Plaquette, neutrophiles, monocytes et cellules endothéliales.   | Vasodilatation, augmente l'adhésivité de la paroi vasculaire, stimule la bronchoconstriction, l'aggregation des plaquettes et la libération des médiateurs qu'elles renferment, induit la production des ROS et la libération des enzymes lysosomiales par les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages. |
| Kalicroïne                       | Plasma  | Transforme et active le système des Kinines   |
| Plasmine                         | Plasma  | Clive le composant du complément C3 pour générer le C3a et le C3b   |
| Leucotriènes : LTC4, LTD4, LTE4  | Essentiellement par les leucocytes                              | Augmente la perméabilité des microvaisseaux.  |
| - LTB4                           | Essentiellement par les leucocytes                              | Augmente la perméabilité vasculaire et le flux sanguin local, induit la libération des enzymes lysosomiales et la production des ROS et attire et active les cellules inflammatoires.   |
| Prostaglandines                  | Essentiellement par les leucocytes                              | Provoquent la vasodilatation, renforce l'action de l'histamine, de la bradykinine et des leucotriènes, augmente la sensibilité des neurones et est responsable de la douleur.   |
| Bradykinine                      | Présente dans le plasma sous forme de kininogènes.              | Accroît la vasodilatation, la perméabilité vasculaire et stimule la contraction des muscles lisses.   |
| Facteur de Hageman (XII)         | Présent dans le plasma et activé par l'adhésion des plaquettes. | Impliqué dans la cascade de coagulation.  |

---

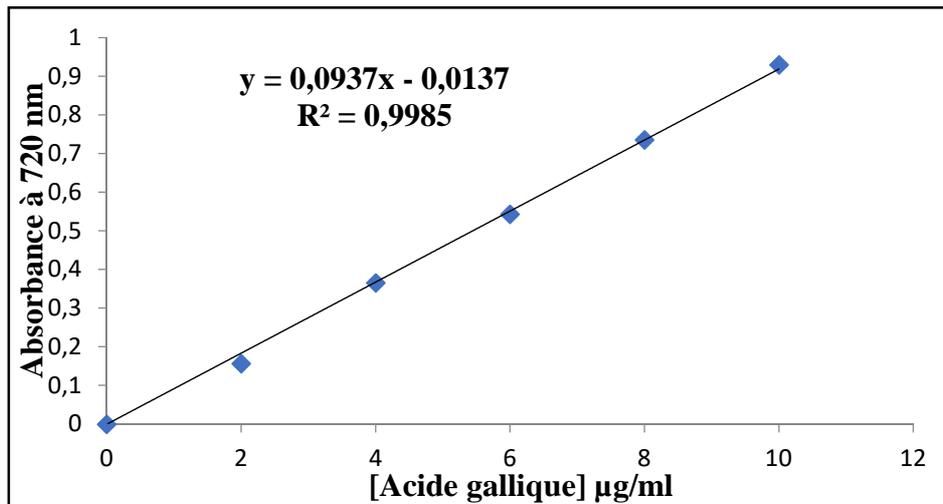
|           |   |   |
|-----------|---|---|
| Thrombine | Présente dans le plasma                                 | Catalyse la transformation du fibrinogène en fibrine et induit la libération de la sérotonine des plaquettes.   |
| Fibrine   | Présente dans le plasma, formée à partir du fibrinogène | Intervient dans la formation du caillot sanguin.  |
| L'IL-8    | Monocytes, macrophages, plaquettes et lymphocytes.      | Chimiotactisme des neutrophiles, des monocytes et des macrophages. Induit la libération des enzymes lysosomiales et la production des ROS. Intervient dans la réparation tissulaire |
| C3a       | Fraction C3 du complément inactif.                      | Provoque la dégranulation des mastocytes.   |
| C5a       | Fraction C5 du complément inactif.                      | Provoque la dégranulation des mastocytes et des neutrophiles, exerce un effet chimiotactique en vers les phagocytes et stimule la contraction du muscle lisse.                      |

---

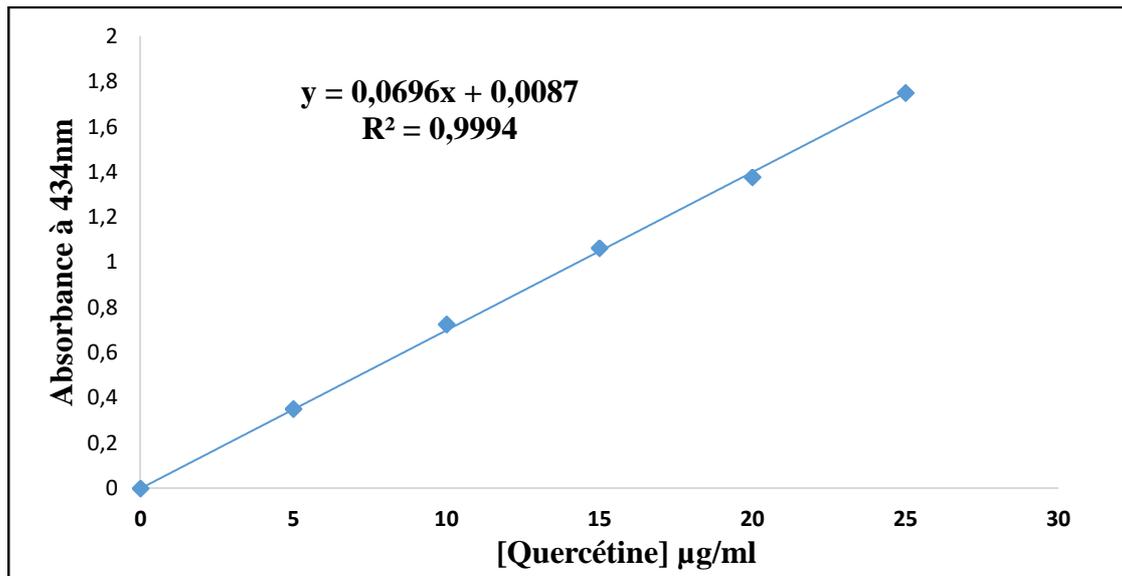
**Annexe 5 : Matériel et produits chimiques utilisés dans la présente étude.**

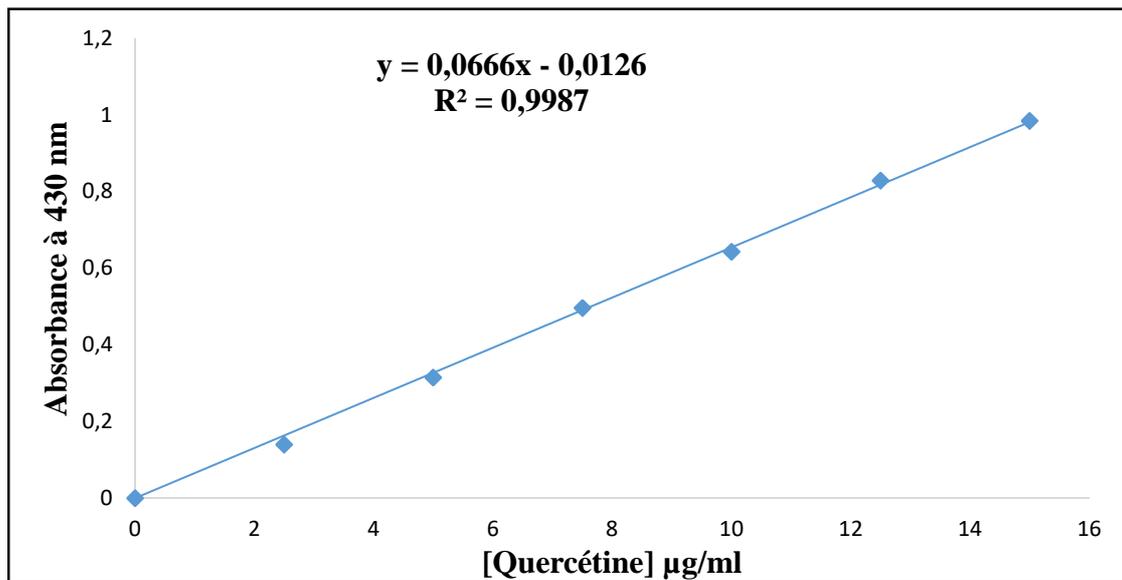
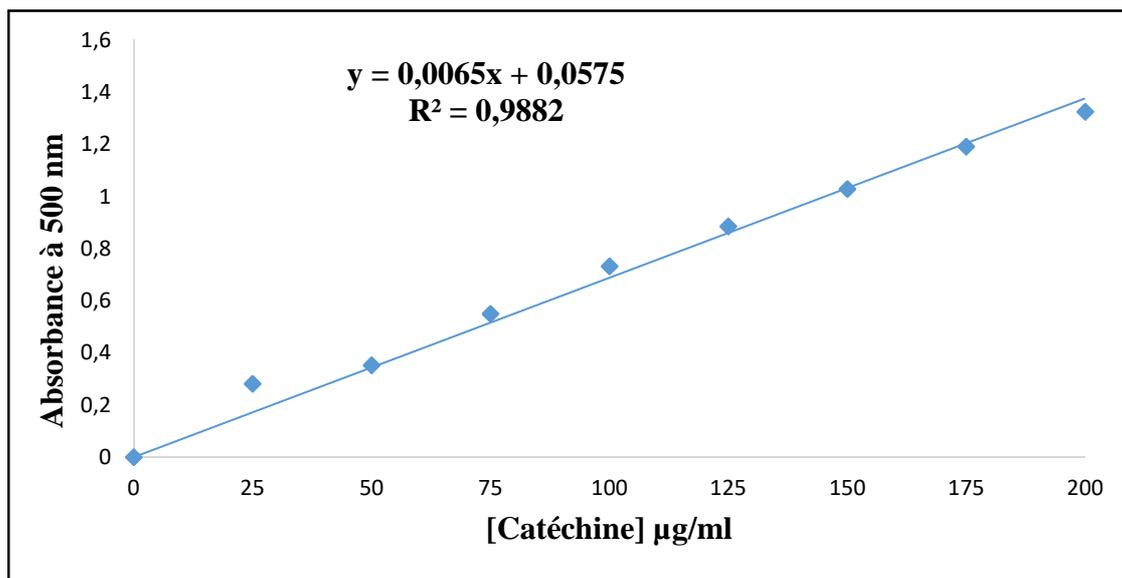
| Matériels   | Produits chimiques  |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agitateur (VELP)</li> <li>• Bain marie (Fisher Scientific)</li> <li>• Balance</li> <li>• Broyeur électrique</li> <li>• Centrifugeuse</li> <li>• Evaporateur rotatif Etuve (POL-EKO)</li> <li>• Gants</li> <li>• Micropipettes</li> <li>• PH mètre</li> <li>• Spectrophotomètre</li> <li>• Vortex (VELP)</li> <li>• Tubes à essais</li> <li>• Tubes Eppendorff</li> <li>• Flacons</li> <li>• Cages en polypropylène transparentes</li> <li>• Biberon</li> <li>• Sonde de gavage</li> <li>• Seringues</li> <li>• Des pinces</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Folin-Ciocalteu</li> <li>• Eaux distillées</li> <li>• Carbonate de Sodium (NaCO<sub>3</sub>)</li> <li>• Acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)</li> <li>• Acide gallique</li> <li>• Triochlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>)</li> <li>• Quercétine</li> <li>• Ethanol absolu (96%)</li> <li>• Méthanol absolu</li> <li>• Diméthylsulfoxyde (DMSO)</li> <li>• Acétate de Sodium (CH<sub>3</sub>COONa)</li> <li>• Vanilline(C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>)</li> <li>• Acide sulfurique</li> <li>• Catéchine</li> <li>• HCL (8%) Acide chlorhydrique</li> <li>• DPPH (2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle)</li> <li>• BHA (ButylHydroxyAnisole)</li> <li>• ABTS</li> <li>• Molybdate d'ammonium</li> <li>• Persulfate de potassium (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>)</li> <li>• KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> phosphate De potassium</li> <li>• K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Hydrogénophosphate de potassium</li> <li>• NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dihydrogénophosphate de sodium</li> <li>• Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Hydrogénophosphate de sodium</li> <li>• Acide ascorbique</li> <li>• Tampon phosphate</li> <li>• Ferricyanure de potassium (1%)</li> <li>• TCA Trichloracétique</li> <li>• Chlorure ferrique (0,1%)</li> <li>• Votrex (Diclofénac 50mg/kg )</li> <li>• Acide acétique</li> <li>• Acide salicylique</li> <li>• Formaldéhyde</li> <li>• Xylène</li> </ul> |

Annexe 6 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux

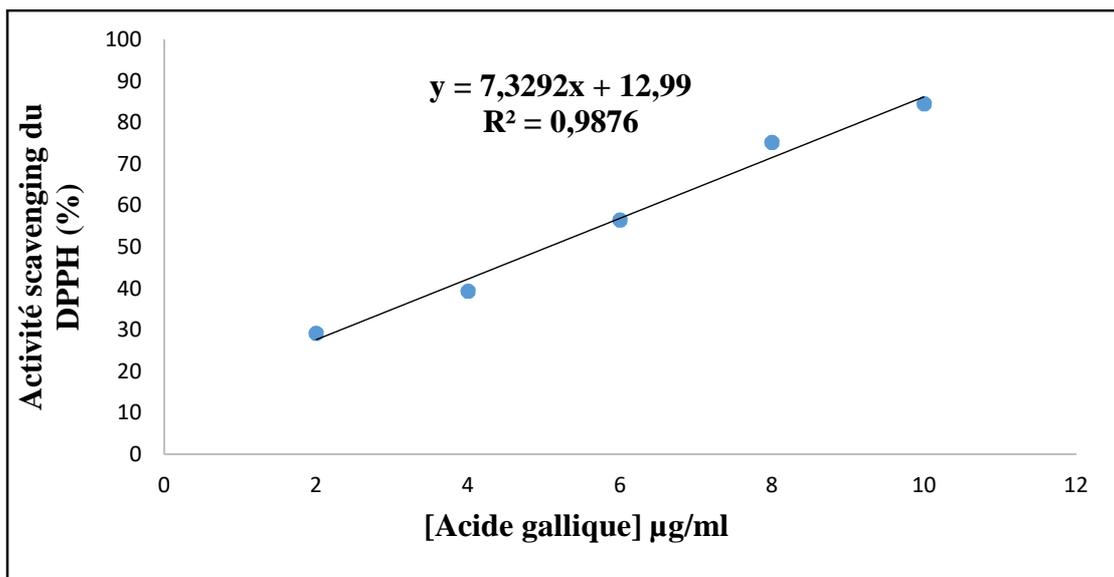
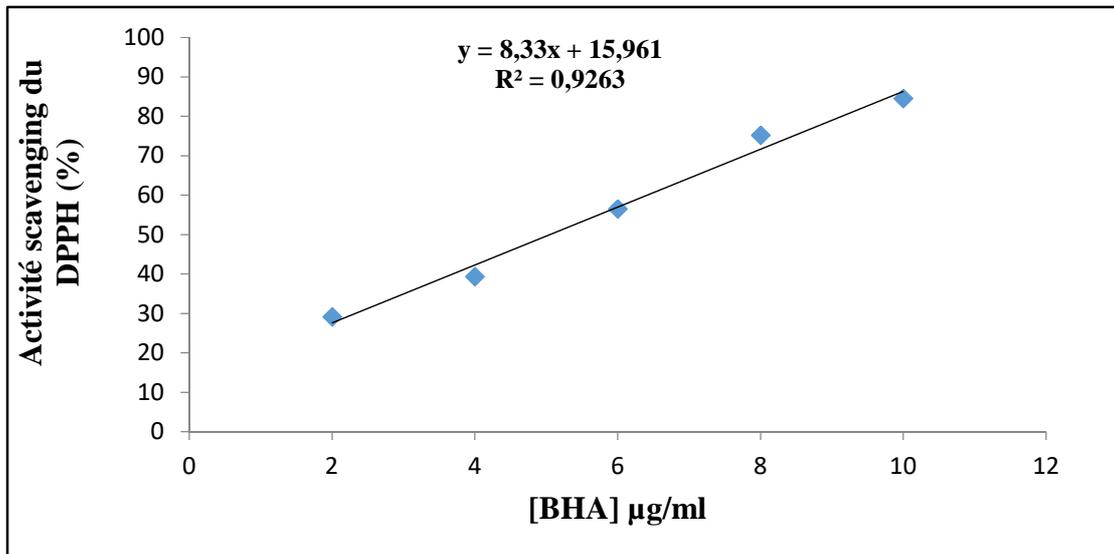


Annexe 7 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes

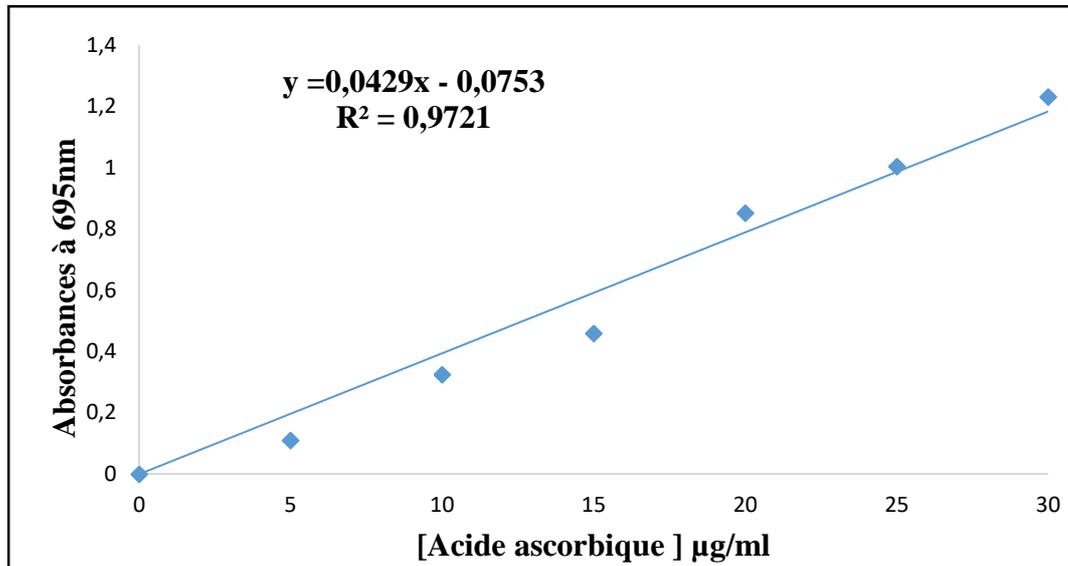


**Annexe 8 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavones et flavonols****Annexe 9 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins condensés**

## Annexe 10 : Courbe d'étalonnage de l'activité scavenging du radical DPPH



Annexe 11 : Courbe d'étalonnage de l'activité antioxydante totale



## Résumé

Les diverses applications médicinales du genre *Rhamnus alaternus* nous ont incités à mener cette étude dont le but est de mettre en évidence, les effets des extraits méthanolique et aqueux *in vitro* et *in vivo* des écorces de *Rhamnus alaternus*. Tout d'abord une étude quantitative colorimétrique des composés phénoliques a été effectuée. Les résultats révèlent que l'extrait méthanolique est plus riche en polyphénols totaux, flavonoïdes, flavonols, flavones et en tanins condensés par rapport à l'extrait aqueux. Le pouvoir antioxydant des deux extraits a été évalué par les tests du radical DPPH, ABTS, pouvoir réducteur, et l'activité antioxydant totale au phosphomolybdate d'ammonium qui ont exhibé une forte activité antioxydante. Par ailleurs, l'évaluation des activités biologiques *in vivo* de l'extrait méthanolique des écorces de *Rhamnus alaternus* à des doses de 250 et 500 mg/kg, ont été démontrées d'une part via des tests d'activité analgésique, comprenant, le test de contraction abdominale induite par l'acide acétique et celui d'irritation induite par le formaldéhyde, d'autre part le test l'œdème de l'oreille induit par le xylène a été effectué pour déterminer l'activité anti-inflammatoire.

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

## Abstract

*Rhamnus alaternus* shrub which belongs to the Rhamnaceae family. It's a medicinal plant largely used in Algerian traditional medicine. This encouraged us to carry out the current study. The aim is to demonstrate the *in vitro* and *in vivo* effects of methanolic and aqueous extracts of *Rhamnus alaternus* bark. First, a quantitative colorimetric study of phenolic compounds was carried out. The results show that the methanolic extract is richer in total polyphenols, flavonoids, flavonols and flavones and in condensed tannins than the aqueous extract. The antioxidant power of the two extracts was evaluated by the DPPH, ABTS, Reducing power, and total ammonium phosphomolybdate tests, which showed a high antioxidant activity. Moreover, the evaluation of the *in vivo* biological activities of the methanolic extract of *Rhamnus alaternus* bark at doses of 250 and 500 mg/kg, were demonstrated with two models of analgesic activity, including, the test of abdominal contraction induced by acetic acid and the test of irritation induced by formaldehyde. In addition, the test of ear edema induced by xylene was also performed to determine the anti-inflammatory activity.

**Key words:** *Rhamnus alaternus*, phenolic compounds, antioxidant activity, analgesic activity, anti-inflammatory activity.

## ملخص

تنتهي شجيرة *Rhamnus alaternus* إلى عائلة Rhamnaceae وهي نبتة طبية واسعة الإستعمال في الطب التقليدي في الجزائر، ما شجعنا على إجراء هذه الدراسة، والتي تهدف إلى توضيح آثار المستخلصات الميثانولية والمائية في المختبر من لحاء *Rhamnus alaternus*. أولاً، تم إجراء دراسة قياس الألوان الكمية للمركبات الفينولية. أظهرت النتائج أن المستخلص الميثانولي أكثر ثراءً في إجمالي البوليفينول والفلافونويد والفلافونول والفلافون والعفص المكثف مقارنة بالمستخلص المائي. تم تقييم القوة المضادة للأوكسدة للمستخلصين من خلال اختبارات جذور DPPH، ABTS، الطاقة المخفضة، والنشاط الكلي مع فوسفوموليبيدات الأمونيوم الذي أظهر نشاطاً قوياً مضاداً للأوكسدة. بالإضافة إلى ذلك، تم إثبات تقييم الأنشطة البيولوجية في الجسم الحي للمستخلص الميثانولي لحاء *Rhamnus alaternus* بجرعات 250 و 500 مغ/كغ، من جهة باختبارات النشاط المسكن، بما في ذلك اختبار تقلص البطن المحرض. بواسطة حمض الأسيتيك (اختبار التلوي) والتهيج الناجم عن الفورمالديهايد، من ناحية أخرى، تم إجراء اختبار وذمة الأذن التي يسببها الزيلين أيضاً لتحديد نشاط المستخلص المضاد للالتهابات.

**المفتاحية الكلمات:** *Rhamnus alaternus*، مركبات فينولية، نشاط مضاد للأوكسدة، نشاط مسكن، نشاط مضاد للالتهابات.