

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 de l'activité antioxydante des extraits de tige
et feuille de *Crataegus laciniata***

Présenté par :

M^{lle} HAMIDOUCHE Sonia

Soutenu le : **22 Juin 2017**

Devant le jury composé de :

M^{me} M. RAHMANI-BERBOUCHA

Présidente

M^{lle} N. CHAHER

Promotrice

M^{me} S. ABDERAHIM-KHAMTACHE

Examinatrice

Année universitaire : 2016/2017

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord Dieu le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce modeste travail. Car l'homme propose mais Dieu dispose.

Seigneur, veuillez toujours diriger nos pas.

Je tiens tout particulièrement à adresser mes plus vifs remerciements à ma promotrice M^{lle} CHAHER N. qui a fait preuve d'abnégation, de générosité et de disponibilité infailible. Ses précieux conseils, ses remarques pertinentes m'ont été d'un apport inestimable

Je voudrais également remercier M^{me} RAHMANI M. de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de ce modeste travail. Mes remerciements vont aussi à l'adresse de M^{me} ABDERRAHIM S. pour m'avoir fait l'honneur d'examiner cette étude aussi modeste qu'elle soit

Comme je tiens à remercier tout le personnel du laboratoire biophysique ainsi que celui de biologie physico-chimique sans oublier le personnel du laboratoire de génétique pour leurs soutiens constants et consistants.

Au demeurant, j'exprime ici toute ma profonde gratitude à toutes les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin et directement ou indirectement durant ,avant et après cette belle aventure même si elle n'était pas du tout une sinécure

SONIA



DEDICACE

*Prière et bénédiction d'Allah sur le prophète Mohamed paix et salut sur lui le seau
des prophètes ainsi que ses compagnons pour nous avoir apporté une religion
comme l'Islam*

Je dédie ce modeste travail

A la plus belle créature que Dieu a crée sur terre...

A cette source de tendresse, de patience et de générosité et placitude

A ma mère !

A mon cher père idem

A mes deux frères NASSIM et YANIS

A mes deux sœurs MELLISA et DYHIA

A tout ma famille de coté père et mère

A mon oncle ZAHIR en particulier

*A tous mes amies, mes collègues et tous les étudiants de notre
promotion 2016/2017*

Et à celui qui ma donné la force de continue KARIM

HAMIDOUCHE Sonia



TABLe DES MATIÈRES

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION.....1

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Etude bibliographique de *Crataegus laciniata*.....3

I.1.1. Description botanique du *Crataegus laciniata*.....3

I.1.2. Systématique de la plante.....4

I.1.3. Etymologie et appellations.....4

I.1.4. Localisation géographique de *Crataegus laciniata*.....4

I.1.5. Utilisation traditionnelle de la plante.....5

I.2. Radicaux libres et stress oxydant.....5

I.2.1. Radicaux libres.....5

I.2.2. Stress oxydant.....7

I.3. Antioxydants.....8

I.3.1. Définition d'un antioxydant.....9

I.3.2. Polyphénols.....9

I.3.3. Acide ascorbique ou la vitamine C.....12

I.3.4. Caroténoïdes.....13

I.3.5. Mécanisme d'action des antioxydants.....13

I.3.6. Effets protecteurs des antioxydants d'aubépine.....14

CAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II .Matériel et méthodes.....16

II.1 Matériel végétale.....16

II.1.1. Récolte.....16

II.2. Méthodes.....16

II.2.1. Etapes de préparation des échantillons16

II.3. Méthode d'extraction.....17

II.4. Analyse chimique	18
II.4.1. Dosage des phénols totaux.....	18
II.4.2. Dosage des flavonoïdes.....	18
II.4.3. Dosage des tannins condensés.....	19
II.5. Activité antioxydante.....	19
II.5.1. Mesure du pouvoir réducteur.....	19
II.5.2. Activité antiradical Anti-DPPH.....	20
II.5.3. Activité de piégeage de l'anion superoxyde.....	21
II.4.4. Test de blanchiment du beta carotène.....	21
II.5.5. Détermination de l'activité chélatrice du fer.....	22
II.5. Analyse statistique	22

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUTSSION

III.1. Taux d'extraction	23
III.2. Analyse chimique	24
III.2.1. Dosages de différentes substances phénoliques.....	24
III.3. Evaluation de l'activité antioxydante	25
III.3.1. Mesure du pouvoir réducteur.....	26
III.3.2. Activité anti-DPPH.....	27
III.3.3. Blanchiment du β carotène.....	29
III.3.4. Détermination de l'activité chélatrice de fer.....	31
III.3.5. Activité de piégeage de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$	34
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	38
Références bibliographiques	40

Annexes

Glossaire

ABBREVIATIONS

- ◆ **ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ◆ **AlCl₃** : Chlorure d'aluminium
- ◆ **ANOVA** : Analysis of variance
- ◆ **BHA** : Butylhydroxyanisole
- ◆ **DPPH** : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
- ◆ **E AT**: Equivalent de l'acide tanique
- ◆ **E C**: Equivalent de catéchine
- ◆ **E AqF** : Extrait aqueux feuille
- ◆ **E AqT** : Extrait aqueux tige
- ◆ **EDTA** : Acide éthylène diamine tétracétique
- ◆ **EOF** : Extrait organique feuille
- ◆ **EOT** : Extrait organique tige
- ◆ **EQ** : Equivalent de quercétine
- ◆ **ERO** : Espèce réactive de l'oxygène
- ◆ **H₂O₂** : Peroxyde d'hydrogène
- ◆ **IC₅₀** : Concentration inhibitrice médiane à 50 %
- ◆ **K₃Fe(CN)₆**: Ferricyanure de potassium
- ◆ **LDL** : Low density lipoprotein
- ◆ **NADH** : Nicotinamide adénine di nucléotide
- ◆ **NBT** : Tétrazolium nitro-bleu
- ◆ **PCM** : Méthosulfate de phénazine
- ◆ **PI%** : Pourcentage d'inhibition
- ◆ **PMA** : Acide phosphomolybdique
- ◆ **PMC** : Méthosulfate de phénazine
- ◆ **PTA** : Acide phosphotungstique
- ◆ **RLs** : Radicaux libres
- ◆ **TCA** : Acide trichloracétique
- ◆ **Tris-HCl** : Trishydroxyméthylaminométhane-Chlorure d'hydrogène
- ◆ **VLDL** : Very low density lipoprotein

LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
1	Photos de la plante <i>Crataegus laciniata</i>	03
2	Origine et réponse cellulaire aux l'espèce réactives d'oxygène	08
3	Effet biologiques des polyphénols	10
4	Structure de base des flavonoïdes	11
5	Structures de l'acide gallique et l'acide ellagique	11
6	Structure de la catéchine	12
7	Structure de l'acide ascorbique	12
8	Structure de lycopéne	13
9	Mécanisme d'action d'un antioxydant donneur d'hydrogène	13
10	photographies de différentes parties tige et feuille avant et après le broyage	17
11	La réaction entre la vanilline est les tannins condensés	19
12	Pouvoir réducteur des extraits aqueux et organiques du <i>Crataegus laciniata</i> et la molécule de référence (concentration 100µg/ml)	27
13	Pourcentage d'inhibition de radical DPPH· des extraits aqueux et organiques de <i>Crataegus laciniata</i> et la rutine (à 100µg/ml).	28
14	Effet de différentes concentrations des extraits aqueux de <i>C.laciniata</i> et la rutine sur le radical DPPH (de 10 à 100µg/ml)	29
15	Effets piègeurs de l'anion superoxyde des différents extraits tiges et feuilles du <i>Crataegus laciniata</i> et la molécule pure a une concentration de 100µg/m	30
16	effet piègeur de l'anion superoxyde des extraits aqueux tiges et feuilles du <i>Crataegus laciniata</i> et la molécule pure a des concentrations de 100 à 200 µg/ml	31
17	le pourcentage d'inhibition de blanchiment de la beta carotène pour les extraits aqueux et organiques du <i>Crataegus laciniata</i> et la molécule de référence BHA (100µg/ml)	33
18	Effet des différentes concentrations de tiges aqueux de <i>C. laciniata</i> et de la BHA sur le blanchiment de la beta carotène (de 100 à 500µg/ml)	34
19	Effet chélateur de fer des extraits aqueux et organiques de <i>C .laciniata</i> et EDTA près comme composé de référence à la concentration 100µg/ml	35
20	Effet chélateur de fer de la molécule pure EDTA a des concentrations de 10 à100 µg/ml	36
21	Effet chélateur de fer des extraits aqueux et organiques de <i>C .laciniata</i> a différentes concentrations (de 100 à 500µg/ml)	37

LISTE DES TABLEAUX

N°	titre	Page
I	Différents noms vernaculaires de <i>Crataegus laciniata</i>	04
II	Caractéristiques des différents extraits du <i>Crataegus laciniata</i> (masse et rendement et la couleur des extraits)	23
III	Résultats de dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et des tanins condensés des Extraits du <i>Crataegus laciniata</i>	24
IV	Les IC50 acide gallique et des extraits aqueux tige et feuille dans activité de piégeage de anion superoxyde	31

Introduction

INTRODUCTION

Les plantes médicinales revêtissent une importance incommensurable et constituent de véritables pharmacies naturelles afin d'entretenir notre peau, protéger notre corps, prévenir nos maux voire les guérir même.

Elles sont une source inépuisable de panoplies de produits utilisés dans le traitement de plusieurs maladies telles que les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives et les cancers de tout acabit.

De nos jours la recherche pharmacologique s'attache beaucoup à ces plantes médicinales pour se passer carrément des molécules synthétiques qui présentent souvent des effets secondaires indésirables (Veer *et al.*, 2000; Sarige, 2001).

L'indispensabilité de l'oxygène moléculaire pour notre survie et notre développement et ce, lors d'une prise régulière mais à fortes doses, elle peut être très toxique. Cette toxicité est le corollaire de la formation inéluctable de diverses espèces chimiques qui, le plus souvent, sont des radicaux libres, dotées de propriétés oxydantes importantes (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

L'organisme se protège toujours contre la formation et l'agression de ces oxydants grâce à un système de défense hyper efficace, complétés par des apports alimentaires en des substances antioxydantes tels que les caroténoïdes, les vitamines et les composés phénoliques.

Ces derniers sont des métabolites secondaires très répandus chez les plantes. Ils sont étudiés avec engouement et de façon large pour leurs activités biologiques, pharmacologiques et antioxydantes (Palanisamy *et al.*, 2008).

Des recherches récentes ont montré que les métabolites secondaires issus des plantes représentent une source importante d'antioxydants naturels tels que les polyphénols, qui ont potentiellement des conséquences bénéfiques pour la santé humaine (Thaipong *et al.*, 2006).

La capacité des polyphénols à piéger les radicaux libres, précurseurs du stress oxydatif, a fait l'objectif de nombreuses études, et plus récemment un grand intérêt, en raison de leurs puissantes activités antioxydantes (Li *et al.*, 2006 ; Govindarajan *et al.*, 2007).

Dans cette optique, nous avons entrepris une étude qui s'inscrit dans le cadre des travaux du laboratoire de biochimie appliquée de l'Université de Bejaia, portant sur l'étude de l'activité antioxydante des extraits aqueux et organiques des parties tiges et feuilles de *Crataegus laciniata* qui 'est une plante largement exploitée dans la médecine traditionnelle.

INTRODUCTION

L'objectif essentiel de ce travail consiste à répondre à la problématique suivante : « Peut-on considérer la plante *Crataegus laciniata* une source naturelle d'antioxydants ? »
Autrement dit « cette plante serait-elle une source naturelle d'antioxydants »

*Revue
bibliographique*

I.1. Etude bibliographique de *Crataegus laciniata*

Crataegus appartient à la famille des rosacées : c'est l'un des genres les plus importants de ladite famille ; il contient un nombre variable d'espèces allant jusqu'à 3500 de distribution mondiale (Kashyap *et al.* , 2012 ;Kumar *et al.*, 2012) .

Il a été rapporté que le *Crataegus* est riche en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, tannins, quercétine, lutéoline, apigénine, rutine, hespéridine, orientin, isoorientin, et vitamine C (Avila-Sosa *et al.*, 2017). Les flavonoïdes, les pro-anthocyanidines et les polyphénols sont caractérisés par la présence des acides pentacycliques, des triterpénoïdes, des acides phénoliques et des acides aromatiques (Bruneton, 1999).

Les procyanidines oligomères, flavonoïdes, triterpènes, polysaccharides, des catécholamines ont été identifiés dans le genre du *Crataegus* et beaucoup de ces derniers ont été évalués pour leurs activités biologiques (Kumar *et al.* , 2012).

Des espèces de *Crataegus* ont été employées traditionnellement depuis l'antiquité. En outre, Miller (1998) et Ju (2005) sont amenés à dire que la présence d'antioxydants au sein desdites plantes expliquent amplement leurs effets thérapeutiques bénéfiques.

I.1.1. Description botanique du *Crataegus laciniata*

La plante *Crataegus laciniata* est un arbuste aromatique épineux, d'une hauteur de 4 à 6 m. Ces feuilles sont insérées isolément sur un axe à différents niveaux, de forme caduque, possèdent de 5 à 9 lobes, leurs fleurs de couleur blanche sont ordinairement sur un seul plan, portées par des pédoncules de longueurs inégales. Le calice est séparé en 5 parties, la fleur est hermaphrodite à 5 pétales et est constituée de 5 à 25 organes mâles. Le fruit charnu à noyau rouge couronné ordinairement par le calice qui se dessèche sur la plante (figure 1) (Bellakhdar, 1997 ; Bachiri *et al.*, 2015)



Figure 1: Photos représentant la plante *Crataegus laciniata* (Bachiri *et al.*, 2015)

I.1.2. Systématique de la plante

Selon Bellakhdar, (1997), la classification de la plante *Crataegus laciniata* est donnée comme suit :

Règne : *Planta* (Plantes)

Sous règne : *Tracheobionta* (plantes vasculaires)

Embranchement : *Spermatophyta* (spermaphytes)

Sous embranchement : *Angiospermae* (angiospermes)

Classe : Magnoliophyta (dicotylédones)

Famille : *Rosaceae*

Genre : *Crataegus*

Espèce : *Crataegus laciniata*.

I.1.3. Etymologie et appellations

L'aubépine est le nom commun de toutes les espèces végétales du genre *Crataegus*, dérivant du mot grec *Kratos* qui signifie la dureté du bois (Verma *et al.*, 2007)

Tableau I : Différents noms vernaculaires de *Crataegus laciniata* (Bellakhdar, 1997 ; Bachiri *et al.*, 2015)

Langues	Noms vernaculaires
Français	Aubépine lacinié, Bois de mai, épine de mai, Poire d'oiseau, Cenelle, Valériane du cœur.
Anglais	Hawthorne
Arabe	Tabgha
Kabyle	Admam
Latin	<i>Crataegus laciniata</i>

I.1.4. Localisation géographique de *Crataegus laciniata*

On rencontre cette plante au niveau des forêts-rocailles, matorrals et pelouses des montagnes calcaires et siliceuses supérieures à 1300 m d'altitude, ainsi que sur les sols riches en éléments fins. Cet arbuste peuple Haut-Atlas, Moyen-Atlas, Rif, Maroc Oriental (Emberger, 1938).

I.1.5. Utilisation traditionnelle de la plante

Une décoction de feuilles et de fruits de *Crataegus* est employée pour traiter les maladies cardio-vasculaires, le cancer, le diabète et la faiblesse sexuelle dans le système traditionnel de la médecine Arabe (Kumar *et al.* , 2012).

Les fruits d'aubépine ont été utilisés aussi dans la médecine traditionnelle chinoise et européenne, ils contiennent des quantités significatives de divers acides organiques pour cette raison la plante en question est employée comme adjuvant dans le traitement des maladies coronariennes et les troubles cardiovasculaire (palpitations cardiaque et la faiblesse du myocarde) Ainsi que pour traité les diarrhées, les coliques et hypertensions (Bellakhdar, 1997) ;

La partie aérienne de la plante possède des propriétés antioxydantes, calmantes, cardiotoniques, relaxantes et toniques du système veineux ;

Les feuilles, les fleurs et les baies d'aubépine sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour traiter l'insuffisance cardiaque chronique, l'hypertension artérielle et divers troubles digestifs, ainsi que les remèdes gériatriques et anti-artériosclérose (Tadic *et al.*, 2008).

I.2. Radicaux libres et stress oxydant

I.2.1. Radicaux libres

Un radical libre est défini comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur la couche électronique la plus externe, ce radical est très instable il réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir sa stabilité (Favier, 2003)

La plupart des espèces radicalaires sont dérivées de l'oxygène à l'exception des radicaux libres qui dérivent du soufre ou de l'azote (Slater *et al.*, 1995).

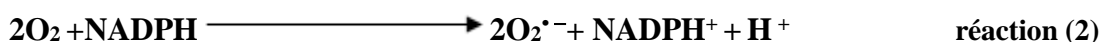
I.2.1.1. Principaux radicaux libres

* Anion superoxyde : $O_2^{\bullet -}$

La molécule d'oxygène, mise en présence d'une quantité d'énergie suffisante, peut acquérir un électron supplémentaire et forme ainsi l'anion superoxyde. L'origine principale de ce radical est la chaîne respiratoire mitochondriale et l'enzyme qui catalyse cette réaction c'est le cytochrome oxydase :

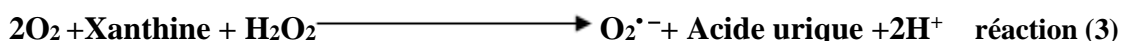


Il peut également se former lors de la phagocytose grâce à la NADPH oxydase présente dans la membrane plasmique de phagocytés :



I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

La xanthine oxydase peut être aussi une source de radical superoxyde par oxydation de la xanthine en acide urique voir la réaction 3



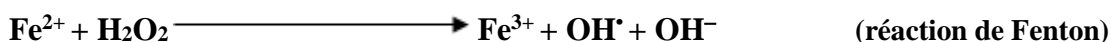
L'anion superoxyde est peu réactif en milieu aqueux, ce qui lui permet de se déplacer assez loin. Chimiquement, il est incapable d'exercer directement des effets sur l'ADN et sur la peroxydation lipidique mais il représente un précurseur d'autres ERO plus agressives. Avec l'apport d'un autre électron, il devient un ion peroxyde plus l'ajout de deux hydrogènes, il produit le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Kay et Jams, 1996).

* Radical hydroxyle OH^{\cdot}

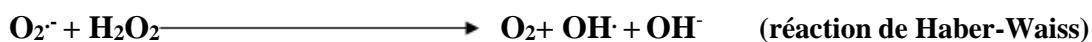
Ce radical peut être formé par une rupture homolytique de la liaison O-O de la molécule H_2O_2 ou obtenue par chauffage ou par action des rayons UV ;

Il est très réactif vis-à-vis des structures organiques et joue un rôle initiateur et précurseur dans l'auto-oxydation lipidique, il est principalement formé lors des réactions d'ions métalliques avec la peroxyde d'hydrogène, (Puppo et Halliwell, 1988)

ces réactions sont décrites sous le nom de réaction de Fenton



Le fer aussi, catalyse la transformation de l'anion superoxyde en présence de peroxyde d'hydrogène avec la production d'un radical hydroxyle selon la réaction de Haber-Weiss (Gardés-Albert *et al.*, 2003).



* Radical peroxyde ROO^{\cdot}

Les radicaux peroxydes se forment par l'addition d'oxygène moléculaire (réaction 6) sur des radicaux libres carbonés. Ils sont peu réactifs, mais ils diffusent facilement à travers les membranes biologiques (Lee *et al.*, 2004)



Cette réaction de peroxydation peut se propager en réaction en chaîne qui va donner à son tour un nouveau radical carboné

* Oxygène singulet ^1O

C'est une molécule non radicalaire caractérisée par la présence des électrons périphériques à spin antiparallèles. ^1O est très instable et est extrêmement réactive. La forme excitée de l'oxygène moléculaire peut être formée par des réactions chimiques, enzymatiques et photochimiques (Christopher *et al.*, 1995).

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Lorsque les espèces réactives de l'oxygène ne sont pas neutralisées par le système de défense antioxydant de l'organisme, il y a indubitablement excès de radicaux libres et des dommages peuvent se produire. Le déséquilibre peut aussi être dû à un apport insuffisant d'antioxydants par le régime alimentaire (Halliwell et Gutteridge, 1990)

I.2.2. Stress oxydant

La perturbation de l'équilibre endogène entre radicaux libres et antioxydants de courte ou longue durée, provoque des effets délétères dus, soit à une défense antioxydante défailante, soit à un état pro-oxydant accru, nommé le stress oxydant (Biesalski *et al.*, 1997).

I.2.2.1. Origine du stress oxydant

Un stress oxydant surviendra lorsqu'il y a un déséquilibre dans la balance antioxydants / pro-oxydants en faveur de ces derniers. Chaque individu ne possède pas le même potentiel antioxydant (Pincemail *et al.*, 1999).

Il peut avoir diverses origines : mauvaise alimentation, phénomènes inflammatoires chroniques ou aigus, habitudes de vie non adéquates (exposition inconsidérée à de grandes sources productrices d'ERO), intervention chirurgicales (transplantation d'organes et pontages coronariens) (Favier, 2003)

La source principale des espèces réactives de l'oxygène dans les cellules des mammifères est d'origine enzymatique parmi ces enzymes la NADPH oxydase, les peroxydases la xanthine oxydase, les cyclooxygénases et les lioxygénases sont parmi les sources endogènes d'ERO les plus importantes ; les mitochondries, éléments essentiels au fonctionnement cellulaire puisqu'elles métabolisent le dioxygène et produisent également en permanence des ERO (Droge, 2002 ; Valko *et al.*, 2006 ; Afonso *et al.*, 2007).

I.2.2.2. Conséquence du stress oxydant

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes des molécules biologiques par exemples l'oxydation de l'ADN, des lipides, des protéines et des glucides mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérées notamment lors de l'oxydation des lipides ; l'attaque des radicaux libres au sein des doubles liaisons lipidiques membranaires induit le processus de peroxydation, aboutissant à la désorganisation complète de la membrane altérant de ce fait, ses fonctions d'échange (Favier, 2003)

Les radicaux sont capables aussi de réagir avec les différents acides aminés dont les acides aromatiques comme le tryptophane et la tyrosine, sur lesquels le radical OH[•] s'additionne en modifiant ainsi la conformation de la protéine. (Dean *et al.*, 1997)

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Sur les acides aminés contenant un atome de soufre telles que la cystéine et la méthionine, leur oxydation par les RLs conduit à la formation des ponts disulfures, donc à l'agrégation de plusieurs molécules et de protéines.

Ils peuvent couper aussi les liaisons peptidiques et forment ainsi des fragments protéiques. Par ailleurs le radical OH^\bullet et l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$, attaquent également les protéines des tissus de soutien, comme le collagène du tissu conjonctif.

L'oxydation de ces acides aminés conduit à la modification de la conformation spatiale et à l'altération de la fonction protéique (Dean *et al.* , 1997)

Les lipides sont considérés comme étant une cible privilégiée des radicaux libres, ces derniers provoquent l'oxydation des acides gras polyinsaturés et des phospholipides membranaires (Singal *et al.* , 1988)

Le stress oxydant est la principale cause de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigue, rhumatisme et les maladies cardiovasculaires. La figure 2 montre les différentes origines et les réponses cellulaires liées aux ERO (Favier ,2003)

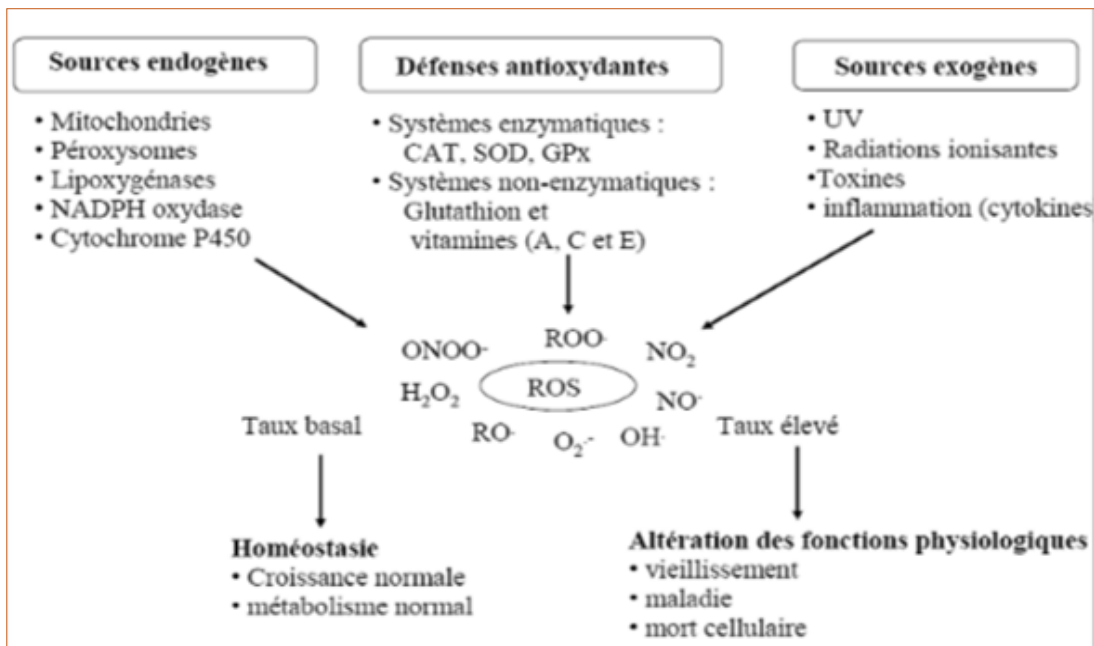


Figure 2 : Origine et réponse cellulaire aux espèces réactives d'oxygène (Petropulos ,2003).

I.3. Antioxydants

I.3.1. Définition d'un antioxydant

C'est l'ensemble des substances ou molécules capables d'inhiber la production, limiter la propagation ou destruction d'ERO ; les antioxydants peuvent agir en réduisant ou en dismutant l'espèce ou en la piégeant pour former un composé stable, en séquestrant le fer libre ou en générant du glutathion (Favier, 2003).

Le terme substrat oxydable inclut toutes sortes de types de molécules *in vivo*. Ainsi lorsque les ERO sont générées *in vivo*, de nombreux antioxydants interviennent.

Il s'agit principalement d'enzymes dont la superoxyde dismutase, le glutathion peroxydase, la catalase et aussi des molécules de faible masse moléculaire comme le glutathion ou acide urique (Michiels *et al.*, 1994).

Les antioxydants alimentaires comprennent des vitamines (A, C et E), certains oligoéléments et aussi des éléments bioactifs qui ne sont ni des vitamines ni des minéraux et qui se trouvent naturellement dans les végétaux appelés phytonutriments ou les métabolites secondaires (Liu, 2003).

I.3.2. Polyphénols

Les polyphénols peuvent être classés en deux groupes : les composés flavonoïdes par exemple les flavanes, flavanols, flavonols, isoflavonones, anthocyanidines ; et d'autres composés non flavonoïdes comme acides phénoliques et stilbènes dont le principe actif est le resveratrol (Ou *et al.*, 2002; Stratil *et al.*, 2006).

Ils possèdent plusieurs groupements phénoliques, avec ou non d'autres fonctions (alcoolique ou carboxylique) (Bahorun *et al.*, 1994)

Ils constituent une importante famille d'antioxydants au sein des plantes, les fruits et les légumes puisqu'ils comprennent plus de six mille molécules. Des études récentes ont montré que le contenu en polyphénols dans les fruits et les légumes sont responsables de la capacité antioxydante totale de ces aliments (Ou *et al.*, 2002; Stratil *et al.*, 2006)

Des recherches sur les composés phénoliques en général et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs diverses propriétés physiologiques comme anti-allergiques et d'autres activités mentionnées dans la figure 3 (Middleton *et al.*, 2000 ; Ksouri *et al.*, 2007)

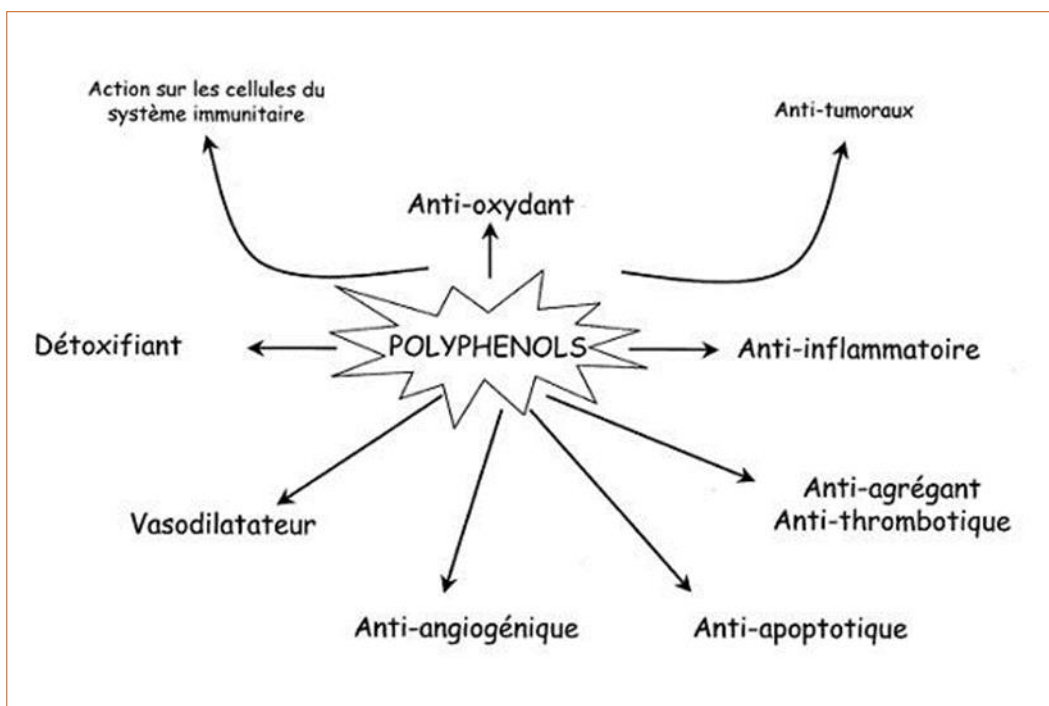


Figure 3 : Effets biologiques des polyphénols (Martin et Andriantsitohaina, 2000)

I.3.2.1. Flavonoïdes

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Seyoum *et al.*, 2006), ils sont souvent responsables de la coloration des fleurs, fruits et parfois des feuilles. La plupart du temps, les flavonoïdes se trouvent sous forme d'hétérosides (Bruneton, 1999 ;). Ils peuvent être présents dans toutes les parties des plantes : racines, feuilles, tiges, bois, écorce, fleurs, fruits et les grains (Chira *et al.*, 2008 ; Kathirvel *et al.*, 2009)

En tant qu'antioxydants, les flavonoïdes sont capables d'inhiber le processus de la carcinogenèse, résultat des mutations engendrées suite à l'altération de l'ADN par les radicaux libres. Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les RL grâce à leur groupement hydroxyle fortement réactif (Nijveldt *et al.*, 2001).

Ils sont également capables de chélater les ions métalliques ; ces derniers renforcent les effets périlleux du stress oxydant en stimulant la production des radicaux hydroxyles OH[•] (Sahnoun *et al.*, 1998; Nijveldt *et al.*, 2001).

La composition de l'aubépine en flavonoïde est différente en terme de quantité et de qualité dans les fleurs, les tiges et les fruits de celle-ci (Hansel *et al.*, 1992).

Les flavonoïdes se trouvent sous forme de flavonols-O-glycosides tels que les hyperosides et flavone-C-glycosides tels qu'acetylvitexin-2-rhamnoside. (Svedstrom *et al.*, 2006)

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Les flavonoïdes dérivent de benzo-γ-pyranne; constitué de deux noyaux aromatiques A et B reliés par un hétérocycle oxygéné C (figure 4) (Skerget *et al.*, 2005)

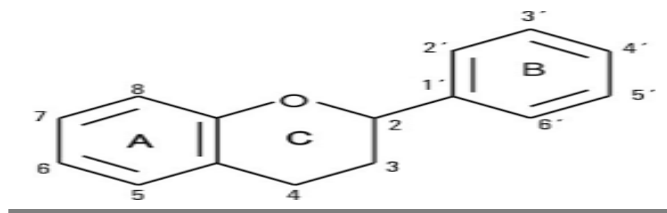


Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes (Di Carlo *et al.*,1999)

* Anthocyanines

Les anthocyanines sont issus de l'hydrolyse des anthocyanidines qui donnent aux fleurs et aux fruits leurs teintes bleues, rouges ou pourpres (Bruneton, 1999). L'effet antioxydant des anthocyanidines est expliqué en partie, par le piégeage des radicaux libres et la chélation des métaux (Kong *et al.*, 2003). Il s'agit, en outre, de composés veino-actifs doués d'une propriété vitaminique (P) (Bruneton, 1999)

I.3.2.2. Tannins

Ce sont des substances polyphénoliques de structure variée, de saveur astringente ayant en commun la propriété de tanner la peau, cette aptitude est liée à leur propriété de se combiner aux protéines (Haslam, 1996 ; Cowan, 1999). Ils existent dans toutes les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (Scalbert, 1991). On distingue deux groupes de tannins différents par leur structure et par leur origine biogénétique

* Tannins hydrolysables :

Ce sont des polyesters de glucides et d'acides phénoliques, ils sont facilement scindés par les enzymes de tannases en oses et en acide phénolique selon la nature desdits tannins. On distingue les tannins galliques et les tannins éllagiques (figure 5) (Cowan, 1999).

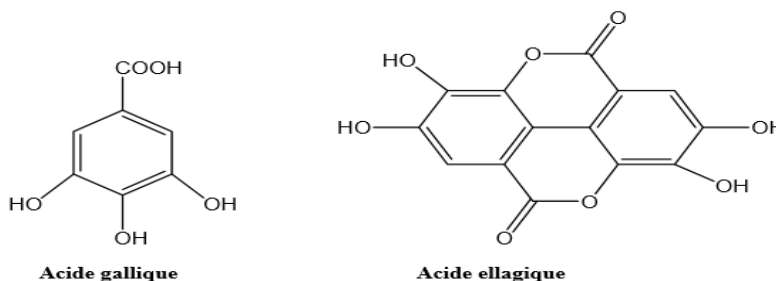


Figure.5: Structures de l'acide gallique et l'acide éllagique

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

* Tannins condensés

C'est une famille complexe des polymères de polyphénols, ce sont des composés monomériques de flavan-3-ol de catéchine (figure 6) ou épicatechine ;

Les proanthocyanidines sont des puissants agents antioxydants, les formes oxydées correspondantes, acquièrent la stabilisation additionnelle, due à la délocalisation de l'électron induite par l'unité de catéchol sur la partie aromatique (Rice-Evans *et al.* 1996). Ils sont non hydrolysables et correspondent à la condensation de 2 à 10 molécules monomères possédant le noyau flavane hydroxyle (Bruneton, 1999).

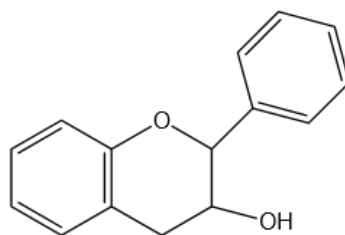


Figure 6: Structure de la catéchine

I.3.3. Acide ascorbique ou la vitamine C

La vitamine C est nécessaire pour de nombreuses fonctions physiologiques de la biologie humaine. La plupart des plantes et des animaux peuvent synthétiser l'acide ascorbique sauf les singes et les humains en raison du manque de l'enzyme gulonolactone oxydase (Naidu, 2003 ; Valko *et al.* , 2006).

C'est un antioxydant puissant hydrosoluble, capable de piéger ou neutraliser à des concentrations très faibles d'ERO (Carr et Frei, 1999;).

Elle est susceptible de limiter la peroxydation lipidique et intervient dans la régénération des autres antioxydants tels que le α -tocophérol (figure 7) (Halliwell et Gutteridge, 1986; Greff, 2011).

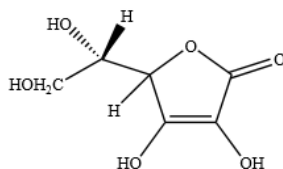


Figure 7 : Structure de l'acide ascorbique

I.3.4. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des constituants membranaires des chloroplastes et forment un groupe de pigments liposolubles, ce sont des précurseur de la vitamine A et contribuent à la coloration jaune, orange ou rouge des fruits et légumes. Ils dérivent par cyclisation, oxydation et déshydrogénation de la même molécule : le lycopène (figure 8) (Bruneton, 1999)

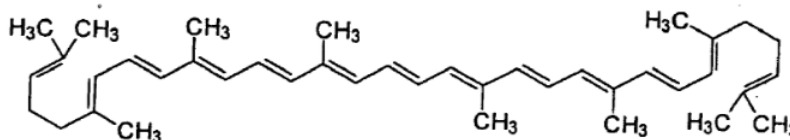


Figure 8: Structure de lycopène (Bruneton ,1999)

Les caroténoïdes jouent un rôle important grâce à leur activité antioxydante qui est établie dans différentes pathologies comme les maladies cardiovasculaires. Les caroténoïdes réagissent avec l'oxygène singulet, les radicaux peroxydes et alkoxydes en capturant les radicaux libres (Krinsky ,1989). Grace à leur longue chaine carbonée polyinsaturés, elles présentes une forte activité anti radicalaire (Faure et *al.*,1999)

I.3.5. Mécanisme d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers y compris la chélation des métaux de transition, le captage de l'oxygène singulet, l'élimination des hydro-peroxydes, la désactivation des radicaux libres par la réaction d'addition covalente. D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène cas de la vitamine E (α tocophérol) ou d'électrons souvent aromatiques, cas de dérivés du phénol. (Figure 9) (Cillard et Cillard ,2006 ;Favier, 2006 ;)

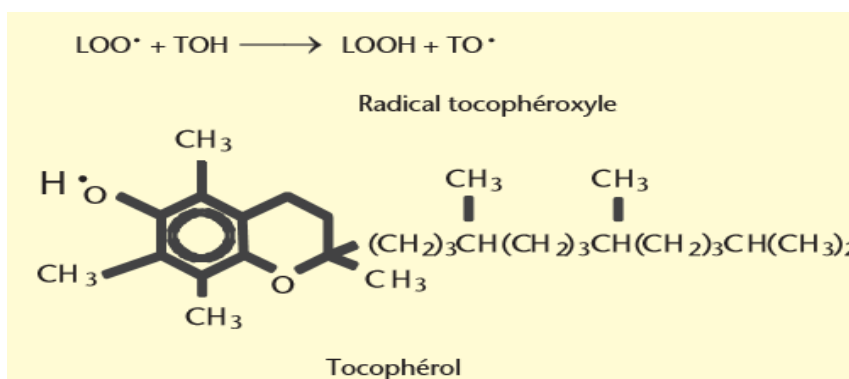


Figure 9 : Mécanisme d'action d'un antioxydant donneur d'hydrogène (Cillard et Cillard ., 2006)

I.3.6. Effets protecteurs d'aubépine

Les proanthocyanidines peuvent exercer une protection contre l'oxydation des protéines. Ils réduisent ainsi le risque de maladies chroniques et certains types de cancer qui constituent les causes principales de la mortalité dans le monde (Lananjinha *et al.* , 1992).

Les acides phénoliques, acide catécholique, acide citrique, acide tartrique, acide chlorogénique et acide triterpénique augmentent et favorisent l'écoulement du sang (Rice Evans *et al.* ,1996).

Les composés phénoliques peuvent agir sur les radicaux libres en captant un électron sur le groupement hydroxyle pour former des radicaux stables ou par la délocalisation d'un électron non appariée par la réaction avec d'autres antioxydants et portent à la hausse la stabilité des aliments et en même temps, améliorent leurs propriétés saines liées aux activités anticancéreuses, antiallergiques et antiinflammatoires dans le corps humain (Rice Evans *et al.* 1996 ; Moure *et al.* 2001)

Les constituants responsables des effets pharmacologiques des préparations d'aubépine incluent les flavonoïdes et proanthocyanidines, ont des propriétés antioxydantes et antiinflammatoires qui peuvent se protéger contre des dommages et des arythmies myocardiques (Zhang *et al.* ,2001 ; Svedstrom *et al.* ,2002)

Les métabolites secondaires sont fortement impliqués en prophylaxie du plusieurs cancers et pathologies chroniques (Liu, 2003)

Des extraits d'aubépine ont été employés dans l'arrêt du cœur congestif, l'angine de poitrine, et la réduction de tension artérielle et de cholestérol total de plasma (Zhang *et al.* , 2001)

L'aubépine peuvent améliorer le flux de sang d'artère coronaire et les contractions du muscle du cœur, par conséquent appliquées largement dans les désordres cardio-vasculaires comme l'arythmie, l'infarctus du myocarde, arrêt du cœur congestif ((Tauchert *et al.* , 1994 ; Kumar *et al.* , 2012)

Les extraits de crataegus empêchent également l'élimination des lipides de plasma tels que le cholestérol total, triacylglycerides et LDL et VLDL. Crataegus peut être utilisé en tant que agent anti-inflammatoire, gastro-protecteur, antimicrobien et être employé en tant qu'agent hepatoprotective (Tadic *et al.*, 2008).

Il empêche modérément l'angiotensine convertissant l'enzyme et réduit la production de l'angiotensine, par conséquent agit en tant qu'hypotendu et diurétique (Schroder *et al.*, 2003).

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

La racine la feuille et la fleur de *Crataegus* contiennent tous des composés radioactifs (McGuffin *et al.* , 1997).

Selon les études de Sun *et al.*(2002), les extraits de *Crataegus* ont montré des effets cardioprotecteurs via l'activité de piéger des radicaux et d'inhiber l'élastase.

Les études effectuées par Ozcan *et al.* (2005) ont confirmé le potentiel cardiotonique de fruit *crataegus* car ils sont employés pour le traitement de la faiblesse du cœur, plus particulièrement si ceci est accompagné par une hypertension.

Les fruits sont employés pour le traitement de diverses maladies cardiovasculaires, y compris l'insuffisance cardiaque, l'hypertension et l'athérosclérose (Veveeris *et al.*,2004 ; Chang *et al.* , 2006).

L'activité antioxydante de l'aubépine pour les parties fruits , fleurs et feuilles a été prouvée *in vitro* (Bahorun *et al.* ,1996 ;Fong *et Bauan* ,2002,Vivar *et al.* ,2007)

Le Genre *crataegus* a été longtemps employé dans la médecine folklorique pour le traitement de divers maux tels que le cœur (désordres cardio-vasculaires), le système nerveux central, le système immunitaire, les yeux, le système reproducteur, le foie et le rein. Il montre également l'éventail de cytotoxique, de gastro protective, d'anti-inflammatoire, anti-HIV et d'activités antimicrobiennes (Kumar *et al.*, 2012) .

*Matériel et
méthodes*

II. Matériel et méthodes

Le matériel expérimental et les réactifs utilisés durant le travail pratique sont rapportés en (Annexe1).

II.1. Matériel végétal

Cette étude a été réalisée sur les parties aériennes, tiges et feuilles d'une plante d'une espèce de la famille des rosacées appelée *Crataegus laciniata*

II.1.1. Récolte

Les échantillons de *Crataegus laciniata* ont été récoltés au mois de juin 2016 à Djurdjura, appelé aussi « Adrar n Jerjer » en kabyle, est un massif montagneux du nord de l'Algérie, sur la bordure méditerranéenne.

II.2. Méthodes

II.2.1. Préparation de la matière végétale

❖ Identification de la plante

La plante a été identifiée au niveau du laboratoire de Botanique de de la faculté des sciences de la nature et de la vie, de l'université de Bejaia.

❖ Lavage

Après l'identification de *Crataegus laciniata* la plante a été bien nettoyée, puis lavée avec de l'eau afin de se débarrasser de toutes poussières.

❖ Séchage

Les échantillons ont été séchés à l'aire libre pendant 15 jours afin d'éliminer tout trace d'humidité.

❖ Broyage

Les produits obtenus par le séchage sont réduits en poudres à l'aide d'un broyeur électrique.

❖ Tamisage

Les particules obtenues après le broyage, sont tamisées à travers un tamis afin d'obtenir des poudres fines et homogènes (figure 10).

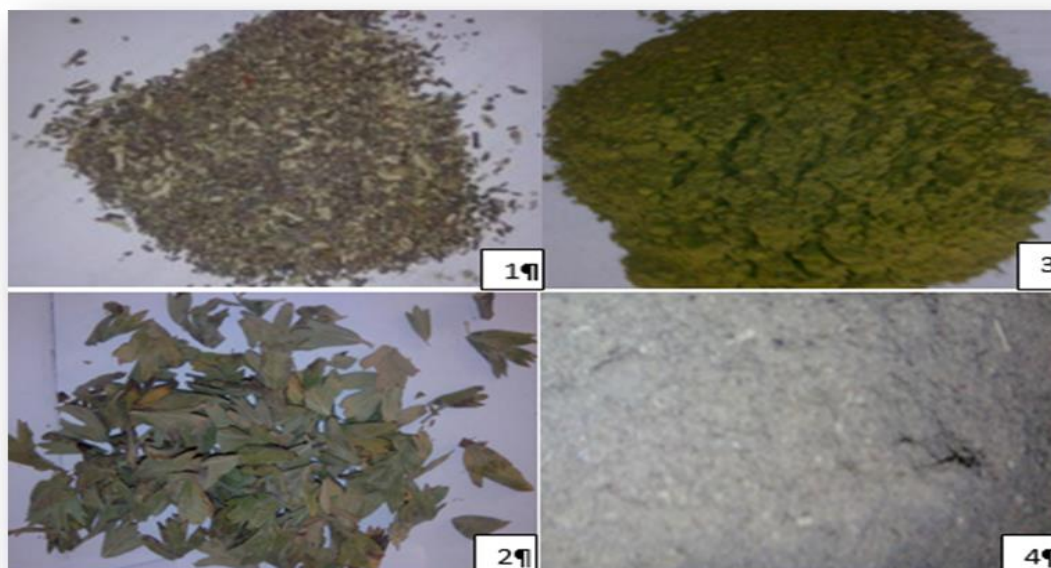


Figure 10 : photos de différentes parties tiges et feuilles avant et après le broyage.

II.3.Méthode d'extraction

La méthode utilisée pour l'extraction des polyphénols de *Crataegus laciniata* est celle élaborée par Chiang *et al.* (1994) par le protocole suivant :

Les poudres de *crataegus laciniata* dont les parties feuilles (81,5g) et tiges (70,3g) ont été macérées dans l'éthanol (96%) pendant 24 heures d'agitation dans deux ballons, à un rapport de 1gramme de poudre pour 4ml d'éthanol.

Après les 24H, deux décantations ont été réalisées en mettant les solutions dans deux éprouvettes pendant une nuit. Après avoir récupéré les deux phases, ces derniers ont subi une élimination totale de toute trace d'éthanol à l'aide d'un rotavapeur à 40°C. Les deux extraits secs obtenus ont été mélangés avec l'eau et du chloroforme. A la fin, les extraits ont été mis dans les cristallisoirs afin de subir un séchage sous la hôte.

La pesée des extraits a été prise après la stabilisation du poids sec des différents extraits.

Le taux ou le rendement d'extraction a été calculé selon la formule suivante :

$$R = (P1 - P2 / E) * 100$$

P₁ : poids d'extrait après évaporation ;

P₂ : poids du cristallisoir vide ;

E : poids du l'échantillon initial R : rendement d'extraction

II.4. Analyse chimique

II.4.1. Dosage des phénols totaux

La teneur en phénols totaux dans les différents extraits de *Crataegus laciniata* a été effectuée selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Djeridane *et al.*, 2006). C'est un mélange d'acide phosphotungstique (PTA) et d'acide phosphomolybdique (PMA), qui est réduit lors de l'oxydation des polyphénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et molybdène. La coloration bleue est proportionnelle aux taux des composés phénoliques présents dans les extraits (Lapornik *et al.*, 2005).

Le protocole de dosage des polyphénols est le suivant : 2ml de la solution d'extrait (100µg/ml) ont été dilués dans 1ml d'eau distillée et le tout a été mélangé successivement avec 1,5 ml de carbonate de sodium (20%) et 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu. Après 120 minutes d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 750 nm.

Le taux de phénols totaux a été exprimé en milligramme équivalent de catéchine par gramme d'extrait à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe 2).

II.4.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été effectué suivant la méthode développée par Maksimovic *et al.* (2004). Le principe de cette méthode repose sur la capacité des flavonoïdes à former des complexes chromogènes avec le chlorure d'aluminium (AlCl₃) qui donne à la solution une coloration jaunâtre.

Le mélange réactionnel contient 2ml de la solution d'extrait (100µg/ml) et 1 ml du réactif de chlorure d'aluminium (133mg de chlorure d'aluminium et 400mg d'acétate du sodium cristalline dans 100ml d'eau distillée) après l'incubation pendant 10 minutes, l'absorbance a été mesurée à 430 nm. L'intensité de la coloration du complexe produit est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes contenus dans l'extrait végétal. Le taux des flavonoïdes a été exprimé en milligramme équivalent quercétine par gramme d'extraits à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe 3).

II.4.3. Dosage des tannins condensés

Le dosage des tannins condensés a été évalué selon la méthode de Swain et Hillis (1959).

Le principe de cette méthode est basé sur la capacité de la vanilline à réagir avec les tannins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré (figure 12).

II.MATERIEL ET METHODES

Le mélange réactionnel contient 1ml de la solution d'extrait (100µg/ml) et 2ml du réactif de la vanilline (1g de la poudre de vanilline dans 100ml de l'acide sulfurique à 70%). Après l'incubation à 50°C pendant 20 minutes, l'absorbance a été mesurée à 500 nm.

Les résultats ont été exprimés en milligramme de l'acide tannique par gramme de la matière sèche à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe 4).

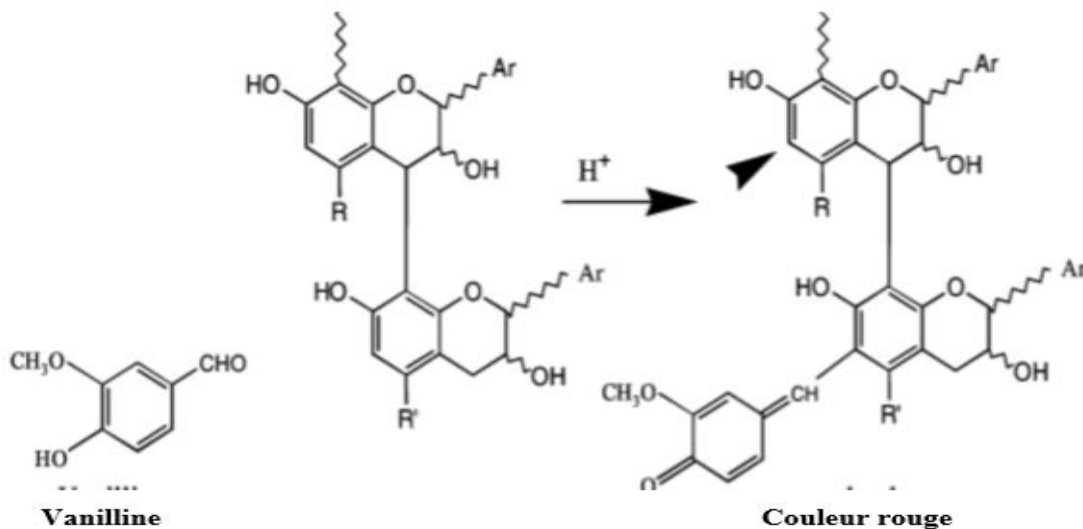


Figure 11 : La réaction entre la vanilline est les tannins condensés (Schofield et *al.*, 2001)

II.5. Activité antioxydante

II.5.1. Mesure du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des extraits de *crataegus laciniata* a été déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu (1986).

Le principe de cette dernière repose sur la réduction du complexe Fe^{3+} / ferricyanure de potassium en forme ferreuse et ce en présence d'un réducteur dans les extraits celle-ci est traduite par le virage de la couleur jaune de ferricyanure de potassium vers une couleur bleue verte dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur de chaque extrait à différentes concentrations. Le mélange réactionnel est le suivant :

1ml d'extrait de la plante (100µg/ml) à été mélangé avec 2,5 ml de tampon phosphate (0,2M, pH6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium $[K_3Fe(CN)_6]$ 1%. Le mélange a été incubé dans étuve à 50°C pondant 20 minutes, après incubation 2,5 ml d'acide trichloracétique(TCA) 10% a été ajouté et le mélange est alors centrifugé à 3000 t/mn pondant 10 minute .le surnageant (2,5ml) a été récupéré, puis mélangé avec 2,5 ml d'eau

II. MATERIEL ET METHODES

distillée et 0,5 ml de chlorure ferrique (FeCl₃) 0,1%. L'absorbance a été mesurée à 700 nm. Une absorbance plus élevée indique un pouvoir réducteur plus élevé.

II.5.2. Activité Antiradical DPPH•

La molécule DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), de couleur violette intense, elle est considérée comme étant un radical libre instable ; ce radical perd sa coloration native quand il se lie avec des substances antioxydantes (AH), qui lui transfèrent des électrons ou des protons, et la forme réduite du DPPH• (réaction 7), confère à la solution une couleur jaune. Le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration découle de la nature, la concentration et la puissance des principes actifs



AH : antioxydants ; DPPH : Couleur violet; DPPH-H : incolore

L'effet des extraits de *Crataegus laciniata* sur le radical DPPH• a été mesuré selon la méthode de Masuda *et al.*(1999). 50µl d'une solution DPPH préparée dans le méthanol (5 mM) ont été ajoutés à 2,45 ml de la solution d'extraits (100µg/ml). Après 30 minutes d'incubation a température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 517 nm.

L'activité anti-DPPH a été évaluée selon la formule suivante :

$$\% \text{Activité antiradicalaire} = [A_0 - (A_1 - A_s) / A_0] * 100$$

A₀ l'absorbance de la solution du contrôle (contient seulement le DPPH); A₁ l'absorbance du DPPH et l'extrait; A_s l'absorbance de l'extrait sans DPPH.

II.5.3. Activité de piégeage de l'anion superoxyde

La mesure de l'activité d'élimination de l'anion superoxyde des extraits de tiges et de feuilles du *Crataegus laciniata* est basé sur la méthode décrite par Liu *et ces collaborateurs* (1997). Les radicaux superoxyde sont générés dans le système non enzymatique de phenazine méthosulfate-nicotinamide dinucléotide d'adénine (PMC-NADH) par oxydation du NADH et analysés par la réduction du nitrobleu tetrazolium (NBT). Dans ce protocole, les radicaux superoxyde ont été produits dans 3ml de Tris-HCl (10mM, pH 7,4) contenant 750 µl de NBT (300 µM), 750 µl NADH (936 µM) et 300 µl de différentes concentration de l'échantillon. La réaction a été lancée en ajoutant 750 µl de méthosulfate de phénazine PMC (120 µM). Le mélange réactionnel a été incubé à 25 °C pendant 5 minute dans un bain marie ; l'absorbance a été mesuré à 560 nm

La BHA a été utilisée comme un standard, une diminution de l'absorbance du mélange réactionnel indiquait une augmentation de l'activité de piégeage des anions superoxyde.

II.MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le pourcentage d'inhibition de la génération d'anions superoxyde a été calculé en utilisant la formule suivante :

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

Où A_0 et A_1 sont les absorbances de la solution en absence et en présence de l'extrait respectivement

II.5.4. Test de blanchiment du β carotène

Le test de blanchiment du β carotène a été évalué selon la méthode de Sun et Ho.(2005). Le principe de cette méthode est basé sur la présence de 11 paires de doubles liaisons qui rend le β carotène extrêmement sensible aux radicaux libres dérivés d'hydroperoxydes qui sont formés à partir de l'oxydation de l'acide linoléique dans un système d'émulsion en résultant la décoloration du β carotène (Unten *et al.* ,1997). La présence des antioxydants réduisent l'ampleur de la destruction du β carotène en neutralisant les hydroperoxydes et d'autres espèces radicalaires formées à l'intérieur de ce système. Le mélange réactionnel de ce protocole est le suivant : 2mg du β carotène ont été dissous dans 10ml de chloroforme.

1ml de cette solution est prélevé dans une fiole contenant 200mg de Tween 20 et 20 μ l d'acide linoléique .la solution est évaporée sous le rotavapeur jusqu'à la disparition du chloroforme ; puis un volume de 100 ml de l'eau oxygénée diluée est ajouté dans la fiole et le mélange résultant est agité vigoureusement.

Dans les tubes à essai 4ml de l'émulsion β carotène/acide linoléique est additionnée à 200 μ l de l'extrait à différentes concentrations (de 0,1 jusqu'à 0,5mg/ml), la BHA a été utilisée comme un standard .après une agitation l'absorbance est mesurée immédiatement à 470nm ce qui correspond à t=0min contre le blanc contenant l'émulsion sans β carotène et le contrôle négatif constitué 200 μ l de méthanol au lieu de l'extrait .les tubes bien fermés sont placés dans l'étuve à 50°C pendant 120 minute.

L'activité antioxydante des extraits est évaluée en termes de blanchiment de β carotène en employant la formule suivante :

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

$A_{A(120)}$: absorbance de l'extrait à 120min

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

$C_{C(0)}$: absorbance du contrôle a 0min

II.MATERIEL ET METHODES

II.5.5. Détermination de l'activité chélatrice du fer

La mesure du pouvoir chélateur du fer à été réalisée selon le protocole élaboré par Decker et Welch (1990).

Dans cette étude, les activités de chélation des métaux de transition Fe^{2+} ont été déterminées par mesure du taux de réduction de la couleur rouge violacée qui a été quantitativement formé par la ferrozine avec les ions ferreux. 250 μ l de la solution d'extrait ont été additionnés à 25 μ l de $FeCl_2$ (2mM) et 800 μ l d'eau distillée. Après 5 minutes, 50 μ l de ferrozine (5mM) sont ajoutés au mélange. L'absorbance a été mesurée à 562nm, et ce après 5 min de la réaction.

Les résultats sont exprimés en pourcentage, selon la formule suivante :

$$\% \text{chélation du fer} = [A_0 - A_1/A_0] * 100$$

A_0 : absorbance du contrôle contenant l'eau distillée ;

A_1 : absorbance de la solution contenant l'échantillon

II.6. Analyse statistique

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm écartype. Les sigmoïdes de activité antioxydante ont été effectuées par le logiciel Graph pad. Les différences entre les groupes ont été déterminées en utilisant le logiciel de l'analyse de la variance (ANOVA). Suivie par le test Student Newman-Keuls pour une analyse post hoc. Les différences sont significatives à $p \leq 0,05$

Résultats et Discussion

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III. Résultats et discussion

III.1. Taux d'extraction

Le taux d'extraction des composés phénoliques est influencé par le type du solvant, le rapport solide-liquide, la granulométrie de la poudre végétale, la température et le pH du milieu (Shahidi et Nazck., 2006 ; Falleh *et al.*, 2008).

Afin d'avoir une bonne extraction, nous avons utilisé une poudre très fine d'un diamètre inférieur ou égal à 63 μm pour augmenter la surface d'échange entre le solvant et la poudre (Jayakumar *et al.*, 2009). Les composés phénoliques sont généralement solubles dans les solvants organiques polaires et les solutions aqueuses et peu solubles dans les solvants organiques apolaires (Bruneton, 1999 ; Makris *et al.*, 2006).

La méthode utilisée a été choisie pour son caractère de sélectivité, visant ainsi l'optimisation de l'extraction des composés susceptibles d'avoir une activité biologique.

Dans cette étude, nous avons utilisé l'éthanol comme un solvant d'extraction polaire ; le rendement, la masse et le rendement de chaque extrait sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau II : Caractéristiques des différents extraits (masse et rendement des échantillons).

Extraits	Masses (g)	Rendements %
Aqueux tige	5,48	7,80
Organique tige	1,42	2,02
Aqueux feuille	0,30	0,37
Organique feuille	1,30	1,60

L'éthanol étant connu pour être le solvant par excellence de l'extraction des polyphénols, a donc été utilisé comme solvant d'extraction pour extraire le maximum de métabolites secondaire. De plus les conditions de séchage des extraits à températures ambiante dans un milieu abrité de la lumière ont été respectées pour assurer une élimination de l'eau préservant au mieux la composition chimique des extraits.

D'après le tableau II, le meilleur taux d'extraction est obtenu par EAqT (7,80%) suivi des deux extraits OT et OF avec des taux d'extraction de 2,02% et 1,60%, respectivement. Quant à l'extrait EAqF, le taux d'extraction est de 0,37%.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.2. Analyse chimique

III.2.1. Dosages de différentes substances phénoliques

Les extraits des végétaux renferment un mélange de plusieurs , voire d'un millier de composés, présents à différentes concentrations, se différentes techniques peuvent être utilisées pour obtenir des informations sur la composition des métabolites secondaires d'un extrait inconnu.

Dans cette étude nous avons caractérisé quantitativement les extraits préparés à partir de la partie aérienne (tige et feuille), en utilisant la technique de dosage (polyphénols, flavonoïdes et tannins condensés). Les résultats sont représentés dans le tableau III.

Tableau III : Résultats de dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et des tannins condensés des Extraits du *Cratægus laciniata*.

Dosages	Polyphénols	Flavonoïdes	Tanins
Extraits	mg EC/g d'extrait	mg EQ /g extrait	mg E AT /g extrait
Aqueux tige	640,23	15,75	216,38
Organique tige	33,20	6,73	57,49
Aqueux feuille	514,41	43,13	80,63
Organique feuille	330,15	41,55	69,10

La méthode de Folin-Ciocalteu est la méthode la plus employée pour doser les phénols totaux (Kahkonen *et al.*, 1999). Cependant, cette méthode est sensible à la réduction de tous les groupes hydroxyles, non seulement ceux des composés phénoliques, mais également de certains sucres et de protéines (Vuorela, 2005 ; Gomez-Caravaca *et al.*, 2006).

D'après le tableau III, l'extrait aqueux tige est le plus riche en polyphénols (640,23 mg EC/g d'extrait) suivi les extraits EAqF et EOT avec des valeurs élevées et voisines de 514,41 et 330,15 mg EC /g d'extrait, respectivement. Tandis que le plus pauvre en ces métabolites se trouve avec une valeur de 33,20 mg EC/g d'extrait.

Les flavonoïdes constituent le groupe le plus hétérogène des composés phénoliques, dont certaines classes son solubles dans les solvants polaires tandis que d'autres dans des solvants apolaires (Makris *et al.*, 2006).

Les teneurs en flavonoïdes totaux (tableau III) révèlent que l'EAqF est en premier ordre avec une teneur de 43,13 mg EQ /g extrait suivi par l'EOF avec 41,55 mg EQ /g d'extrait

III. RESULTATS ET DISCUSSION

par la suite viennent les extraits aqueux et organiques tiges avec les teneurs suivantes 15,75 et 6,73 mg EQ /g d'extrait, respectivement.

Selon des études rapportés par Yoo *et al.*(2008), la teneur des flavonoïdes de l'extrait hydro-alcoolique des feuilles de *Crataegus pinnatifida*, plante appartenant au même genre que *Crataegus laciniata* et ayant presque les mêmes effets thérapeutiques est équivalent à 4,07 mg EQ/g d'extrait. Cette valeur est très faible par rapport à ces résultats, ce qui peut être due à la différence de la méthode d'extraction.

Les résultats de dosage des tannins condensés (tableaux III), montrent que, la plus haute teneur de ces molécules dans l'EAqT (216,38mg EAT /g d'extrait), suivi d'une teneur moyenne dans les extraits aqueux et organiques feuilles avec des valeurs de 80,63 et 69,10mg E AT /g extrait, respectivement.

Ces résultats confirment les données de la littérature qui mentionnent que les plantes du genre *Crataegus* sont riches en proanthocyanidines (Kumar *et al.*,2012) .

Les résultats du tableau III, nous a montré que, la partie tige est la plus riche en polyphénols et tannins condensés tandis que la partie feuille est la plus riches en flavonoïdes.

En effet la teneur en polyphénols n'est pas stable, elle diffère d'une plante à une autre et entre les organes de la même plante, ce qui est le cas de *Crataegus laciniata*. Le contenu polyphénolique varie qualitativement et quantitativement d'un organe à un autre, cela peut être influencé par plusieurs facteurs.

Des études ont montré que plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en composés phénolique, et parmi ces facteurs : les facteurs géographiques, climatiques, le patrimoine génétique, le stade de développement de la plante et son degré de maturation, la période de sa récolte, la durée de stockage, la méthode d'extraction et la méthode de quantification des composés d'intérêt biologique (Stypinski,1997 ; Aganga et Mosase, 2001;Luczkiewicz *et al.*,2001; Podsdek, 2007 ; Falleh *et al.*.,2008; Vicas *et al.*, 2008).

L'analyse statistique a montré une différence significative entre les teneurs des extraits en flavonoïdes, en polyphénols et en tannins à $p \leq 0,05$ entre les différents extraits . Ceci est logique étant donné que les tannins condensés représentent des composés majoritaires dans les plantes de genre *Crataegus*. (Kumar *et al.*.,2012)

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.3. Evaluation de l'activité antioxydant

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à inhiber l'oxydation. Il n'existe guère de méthode universelle de mesure d'activité antioxydante eu égard à la complexité des processus d'oxydation.

Le plus souvent, il faut combiner les réponses des tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (De Gaulejac *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2008 ; Tabart *et al.* , 2009).

Les extraits naturels sont des mélanges complexes de nombreuses molécules, aux propriétés chimiques différentes.

Par conséquent une approche avec des analyses multiples pour évaluer le potentiel antioxydant des extraits serait plus instructive et même nécessaire pour bien se renseigner sur les différents mécanismes mis en jeu (Ozturk *et al.*, 2007; Gulçin *et al.*, 2009).

A travers ce travail, les extraits aqueux et organiques de tiges et feuilles de *Crataegus laciniata* ont été étudiés pour leurs activités antioxydantes, en utilisant différentes méthodes basées sur la capacité des composés à piéger des radicaux libres synthétiques (DPPH), en générant des radicaux libres (anion superoxyde), la peroxydation des lipides (blanchiment de la β -carotène), à chélater des métaux de transition (fer) et à tester le pouvoir réducteur de différents extraits.

III.3.1. Mesure du pouvoir réducteur

L'activité antioxydante des extraits de *Crataegus laciniata* a été évaluée en utilisant la méthode de Oyaizu. (1986). Elle est basée sur la capacité des extraits à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} . Les résultats obtenus montrent que tous les extraits ont la capacité de réduire le fer (figure 12). Le meilleur pouvoir réducteur a été obtenu par l'EAqF (0,65 UA) suivi de l'EOF (0,48 UA), l'EOT avec une valeur de (0,23 UA) et l'EAqT avec une valeur de 0,21 UA qui sont proches de la molécule de référence rutine (0,18 UA).

La forte activité de l'extrait des feuilles serait due à sa forte teneur en composés polyphénoliques. L'activité antioxydante attribuée aux polyphénols s'explique en partie par leur capacité à capturer des radicaux libres et de complexer des métaux (Rice-Evans *et al.*, 1996; Bahorun *et al.*, 2004).

III. RESULTATS ET DISCUSSION

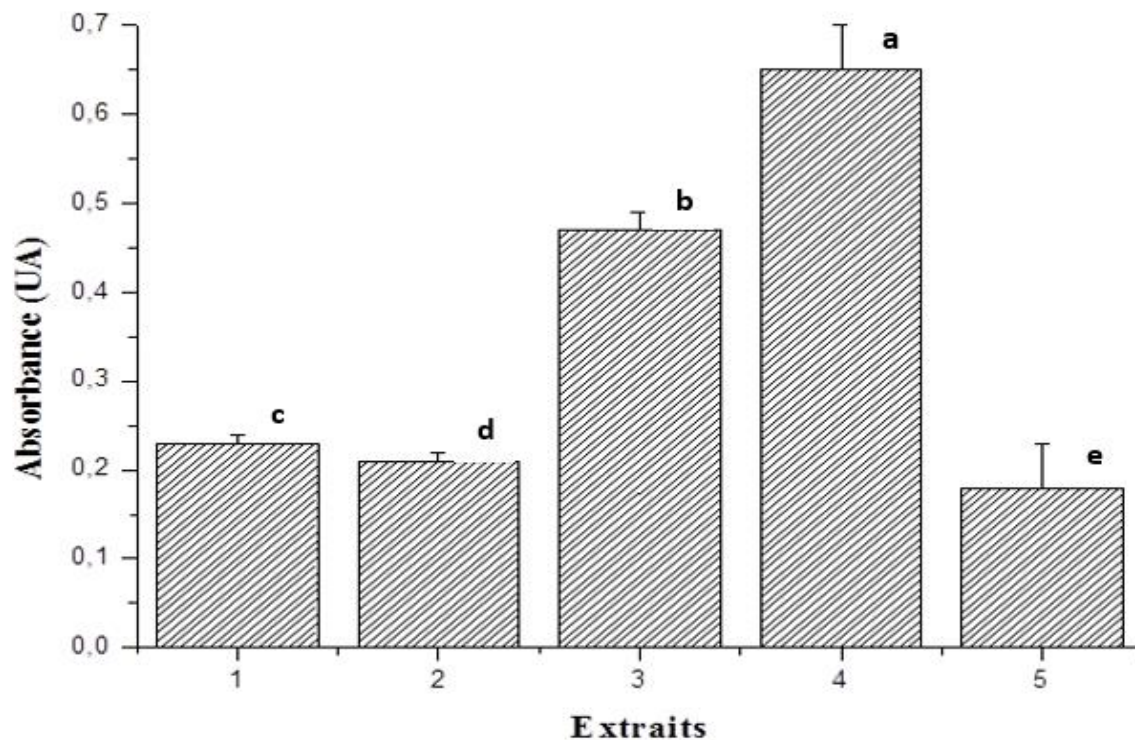


Figure 12 : Pouvoir réducteur des extraits aqueux et organiques du *Crataegus laciniata* et la molécule de référence à une concentration de 100µg/ml. 1 : tige organique ; 2 : tige aqueuse ; 3 : feuille organique ; 4 : feuille Aqueuse ; 5 : rutine.

Les résultats du pouvoir réducteur sont significativement différents entre eux à $p \leq 0,05$.

L'analyse chimique des extraits de tiges et de feuilles de *C. laciniata* ont montré une teneur moyenne en flavonoïdes. Ce qui explique, en partie le bon pouvoir réducteur de *C. laciniata* par rapport à la molécule de référence.

Cette observation est également confirmée par la corrélation (Annexe N°5) observée entre le pouvoir réducteur des extraits et leurs teneurs en flavonoïde ($r = 0,85$) et une corrélation faible avec les phénols totaux et les tannins ($r = 0,02$ et $0,21$, respectivement).

III.3.2. Activité antiradical DPPH

L'activité antiradicalaire des extraits de *Crataegus laciniata* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée par spectrophotométrie à 517 nm, en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage, de la couleur violette à la couleur jaune.

Le DPPH est caractérisé par son adaptation à plusieurs échantillons dans une courte durée, aussi il est assez sensible pour détecter des substances actives à des basses concentrations. A cet effet, il a été employé pour le criblage des activités antiradicalaire des extraits végétaux (Yi *et al.*, 2008).

III. RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats obtenus (figure14), révèlent que, les extraits du *Crataegus laciniata* possèdent une bonne activité antiradicalaire. Les extraits aqueux tige et feuille ont un pourcentage d'inhibition le plus élevé.

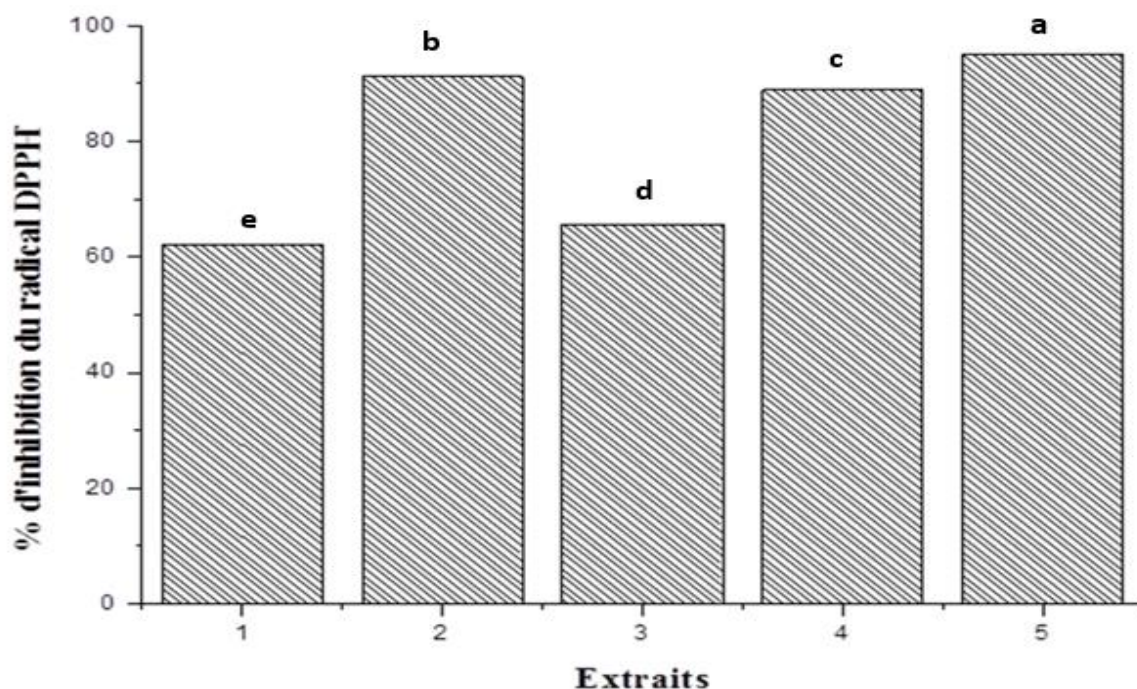


Figure 13: Pourcentage d'inhibition de radical DPPH: Des extraits aqueux et organiques de *Crataegus laciniata* et la rutine (100 μ g/ml).1 : tige organique ;2 :tige aqueuse ;3 :feuille organique ;4 :feuille aqueuse ;5 :rutine.

A des fins comparatives un antioxydant standard a été utilisé : la rutine (figure 13).La rutine a montré une activité antiradicalaire puissante avec IC₅₀ de l'ordre de 5,2 μ g/ml suivi d'extrait aqueux tige (AqT) avec un IC₅₀ de 7,87 μ g /ml, qui est proche de la molécule de référence et aqueux feuilles (AqF) avec IC₅₀ de l'ordre de 16,58 μ g/ml.

Il est évident que la forte activité des extraits AqT et AqF est attribuée à leur richesse en composés phénoliques, flavonoïdes et tannins.

En effet, il a été rapporté par Chung et ses collaborateurs (2006), que l'activité antiradicalaire DPPH par les extraits de plantes médicinales, peut être attribuée à la présence de groupement hydroxyle, à la disponibilité de l'hydrogène phénolique et à la possibilité de la stabilisation du radical formé résultant d'un donneur d'hydrogène.

Une autre étude menée par Kang *et al.* (2003), a suggéré que les molécules polaires présentes dans les extraits végétaux contribuent à l'augmentation de l'activité antiradicalaire cela confirme l'augmentation de pourcentage d'inhibition avec l'augmentation de la concentration d'extraits.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de cette présente étude est en accord avec les différents travaux menés sur les flavonoïdes (Amic *et al.*, 2003; Cia *et al.*, 2006 ; Ben Ammar *et al.*, 2009).

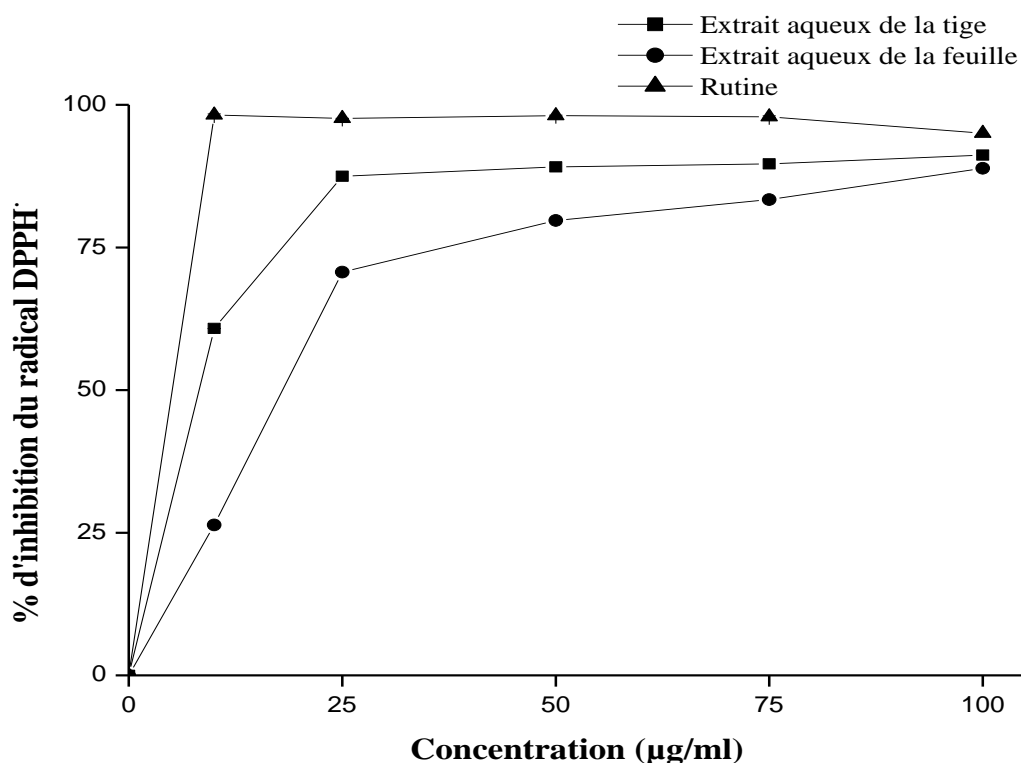


Figure 14: Effet de différentes concentrations des extraits aqueux de *C. laciniata* et la rutine sur le radical DPPH (concentration 10, 25, 50, 75 et 100 µg/ml)

Les résultats obtenus dans le présent travail révèle l'existence d'une corrélation linéaire remarquable et significative (Annexe 6) entre le pouvoir antiradicalaire des quatre extraits de la plante et leur teneur en phénols totaux ($r = 0,84$), une corrélation moyenne avec les tannins ($r = 0,50$) et une corrélation faible ou presque absente avec flavonoïdes ($r = 0,04$). L'analyse statistique nous a montré une différence significative ($p \leq 0,05$) de pourcentage d'inhibition des extraits qui est inférieures à celle exhibée par la rutine.

De nombreuses recherches ont montré une forte relation exprimé sous forme de corrélation entre les activités antiradicalaire et les composés phénoliques (Bidié *et al.*, 2011 ; Jasna *et al.*, 2012 ; Katsarou *et al.*, 2012 ; Santos-Sanchez *et al.*, 2014).

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.3.3. L'activité de piégeage de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$

Le pouvoir piègeur de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) par les différents extraits des tiges et des feuilles de *Crataegus laciniata* a été évalué spectrophotométriquement en suivant la diminution de la réduction de NBT (Nitrobleu tetrazolium) en formazan (λ_{max} = 560nm) par le superoxyde produit chimiquement dans le système PMC-NADH .

Les résultats obtenus (figure 16) montrent que tous les extraits piègent le radical superoxyde ainsi que la molécule de référence.

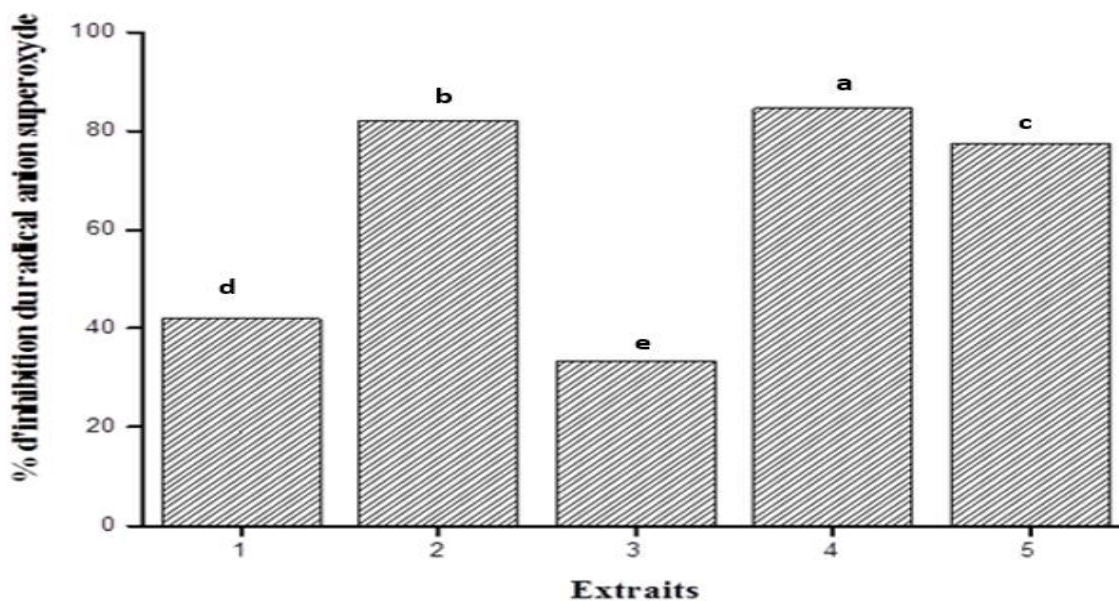


Figure 15 : Effets piègeurs de l'anion superoxyde des différents extraits tiges et feuilles du *Crataegus laciniata* et la molécule pure a une concentration de 100 μ g/ml. 1 tiges organique 2: tiges aqueuse 3 : feuilles organiques 4 : feuilles aqueuse, 5 : acide gallique

Les extraits aqueux tige et feuille présentent une activité de piégeage de l'anion inférieure ou égale à celle d'acide gallique avec un pourcentage d'inhibition respectivement 82 ; 84,6 et 84,2% à une concentration de 100 μ g/ml. Les extraits organiques (tiges et feuilles) ont une activité de piégeage de l'anion superoxyde moyennement efficace avec un pourcentage. respectivement de 40,36% .

III. RESULTATS ET DISCUSSION

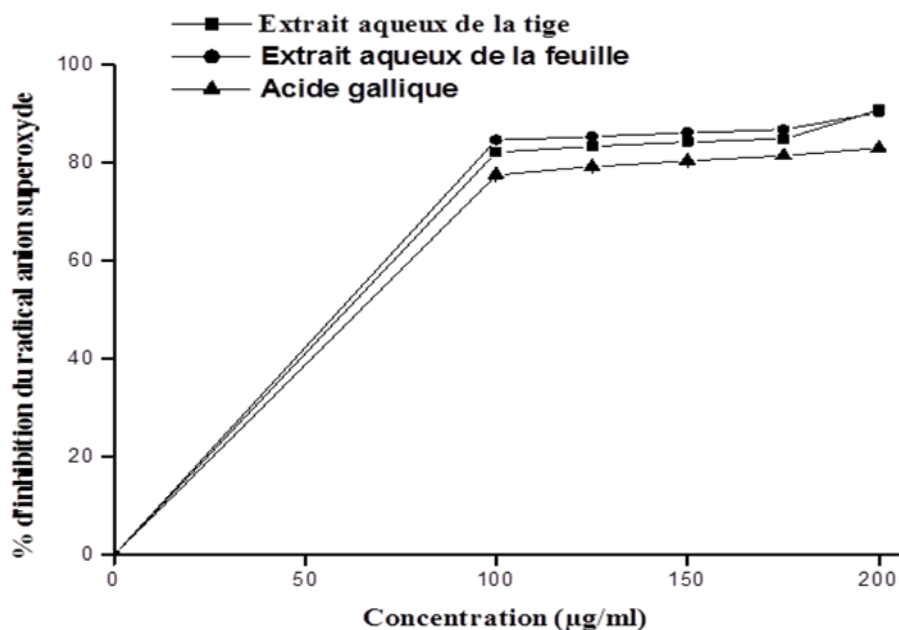


Figure 16 : Effets piégeurs de l'anion superoxyde des différents extraits aqueux tiges et feuilles du *Crataegus laciniata* et la molécule pure à différentes concentrations.

Les résultats de cette étude ont été confirmés par les valeurs IC₅₀ (Tableau IV) ou les extraits aqueux nous ont donné de meilleurs pouvoirs antiradicalaire avec des valeurs de 31,92µg/ml pour la partie feuille et 39,03 µg/ml pour la partie tige cela serait du à la richesse des dits extraits en composés phénoliques en général et en flavonoïdes en particuliers.(figure 16)

Tableau IV : Les IC₅₀ acide gallique et des extraits aqueux tige et feuille dans activité de piégeage de anion superoxyde.

	IC ₅₀ µg/ml
Acide gallique	39,69
Aqueux tige	39,03
Aqueux feuille	31,92

Les résultats obtenus dans l'analyse chimique indique également que les extraits aqueux tiges et aqueux feuilles ont une teneur élevée en phénols totaux et en tannins condensés qui peuvent fournir de bonnes sources d'antioxydants naturels.

Pour cette raison il est évident que les composés phénoliques présents dans les extraits aient des effets puissants contre l'activité de piégeage de l'anion superoxyde. Cependant, Khamsah *et al.*(2006), ont constaté que l'activité de piégeage des radicaux, n'est pas

III. RESULTATS ET DISCUSSION

uniquement due au contenu phénolique lui-même, mais à d'autres composés antioxydants divers. Ils répondent différemment en fonction du nombre de groupes phénoliques qu'ils renferment (Singeton et Rossi, 1965), Plus précisément les composés phénoliques n'intègrent pas nécessairement à tous les antioxydants présents dans les extraits. Par conséquent il existe parfois une corrélation entre les composés phénoliques et plusieurs espèces végétales (Tawaha *et al.* , 2007).

Les résultats obtenus à travers notre analyse statistique, ont indiqué l'existence des activités significativement différentes entre nos échantillons ($p \leq 0,05$). Aussi on remarque, une corrélation moyenne en phénols totaux, les tannins condensés (Annexe 7) et la capacité de piégeage de l'anion superoxyde ($r = 0,63$; $0,38$, respectivement). Quant aux flavonoïdes, il n'y a quasiment aucune corrélation entre cette classe de composés et l'activité de piégeage de l'anion superoxyde ($r = 0,007$).

III.3.4. Test de blanchiment du β carotène

Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique produit des radicaux peroxydes, ces radicaux vont par la suite oxyder la beta carotène hautement insaturée entraînant ainsi la disparition de sa couleur. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés d'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation ainsi que le blanchiment de la beta carotène.

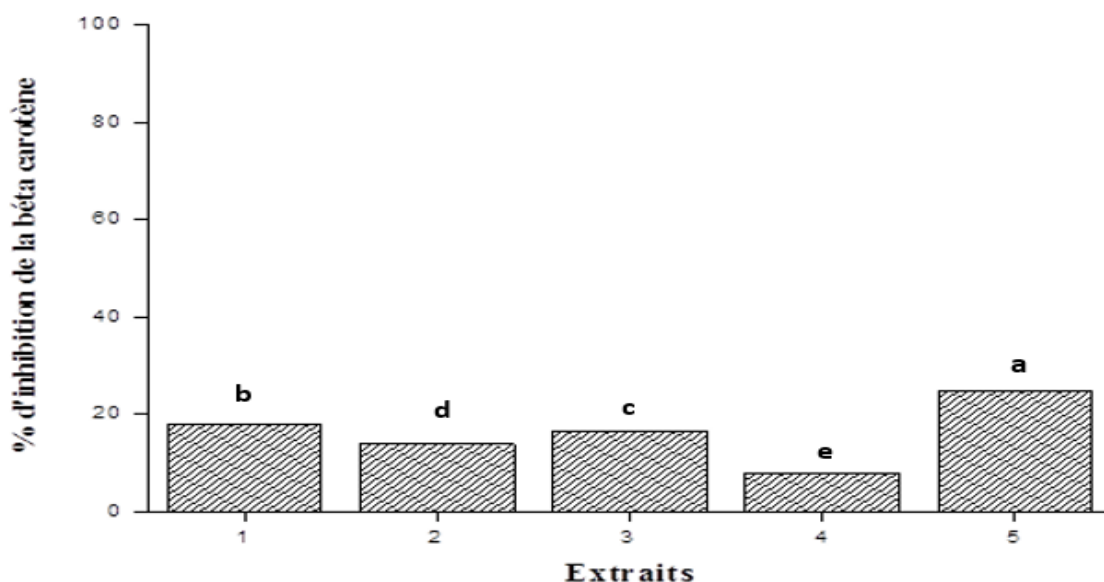


Figure 17 : Le pourcentage d'inhibition de blanchiment de la beta carotène pour les extraits aqueux et organiques du *Crataegus laciniata* et la molécule de référence .1 : tige organique ;2 : tige aqueuse ;3 : feuille organique ;4 : feuille aqueuse ;5 : BHA.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats obtenus dans cette étude (figure 17), ont montré que, les extraits organiques ont un pourcentage d'inhibition plus élevé par rapport aux extraits aqueux et moins élevé en les comparant à la molécule de référence BHA. Cela serait dû à la polarité de ces extraits et à la composition chimique de ces derniers.

Fränkel et Meyer (2000), sont amenés à dire que les antioxydants apolaires montrent des propriétés antioxydantes car ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi la prévention de la formation des radicaux lipidiques et l'oxydation de la β -carotène.

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

Les résultats du test de la beta carotène de l'extrait tige organique *Crateagus laciniata* et de la BHA à des concentrations variées (100, 200, 300, 400 et 500 $\mu\text{g/ml}$) sont représentés dans la figure 19.

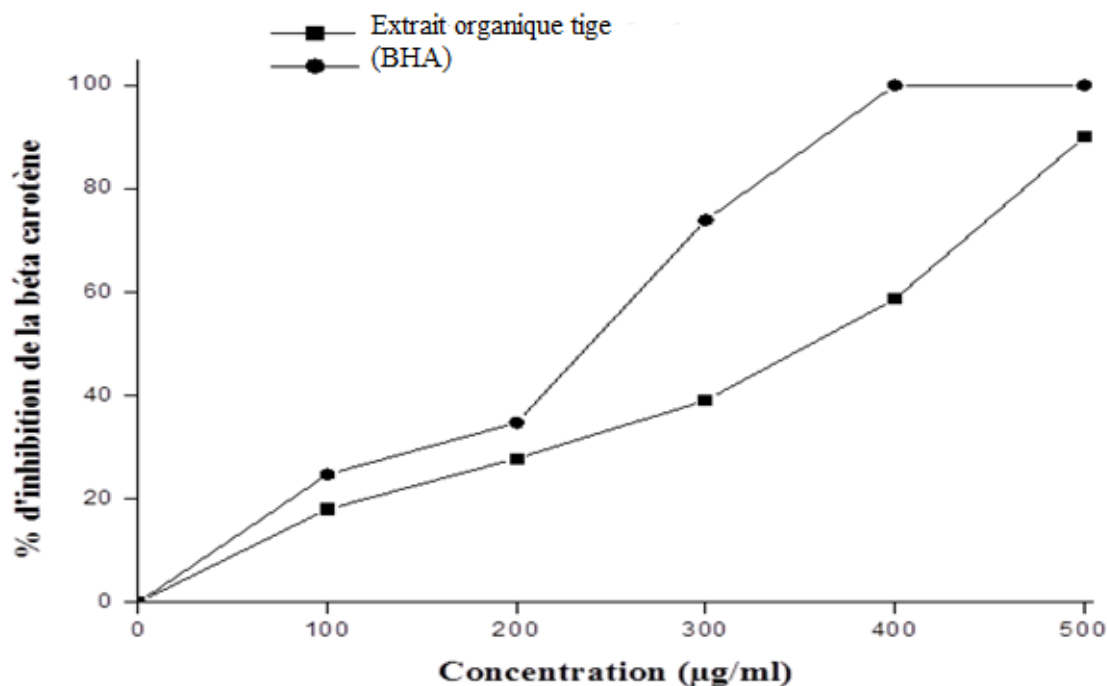


Figure 18: Effet des différentes concentrations de l'extrait tige organique de *C. laciniata* et de la BHA sur le blanchiment de la beta carotène.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

Un extrait qui retarde ou inhibe le blanchiment du β -carotène peut être décrit comme un piègeur des radicaux libres et comme un antioxydant primaire (Liyana-Pathirana *et al.*, 2006).

Selon plusieurs auteurs le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplé à celle de la beta carotène, paraît très utile comme un modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques (Ferrerai *et al.*, 2006)

Ces résultats confirment que cet extrait possède une activité inhibitrice d'oxydation de la beta carotène, comparable à celui de la BHA ($IC_{50} = 355,07$ et $295,58\mu\text{g/ml}$, respectivement).

Une corrélation moyenne et significativement différente à $p \leq 0,05$ a été également trouvée entre les teneurs en composés phénoliques, flavonoïdes et activité de blanchiment de la beta carotène ($r=0,46$; $r=0,32$ et respectivement). Quand aux tannins condensés la corrélation est presque absente ($r=0,02$) (Annexe 8).

III.3.5. Détermination de l'activité chélatrice de fer

L'activité de chélation de fer par les extraits du *Crataegus laciniata* a été menée par la méthode de Decker et Welch (1990).

Selon les résultats obtenus dans cette étude (figure 20), on constate que la meilleure activité est celle de l'EAqF (30%), suivi de l'EAqT (29%). Quand aux extraits organiques tige et feuille ont montrés des activités similaires (20 et 21%, respectivement).

III. RESULTATS ET DISCUSSION

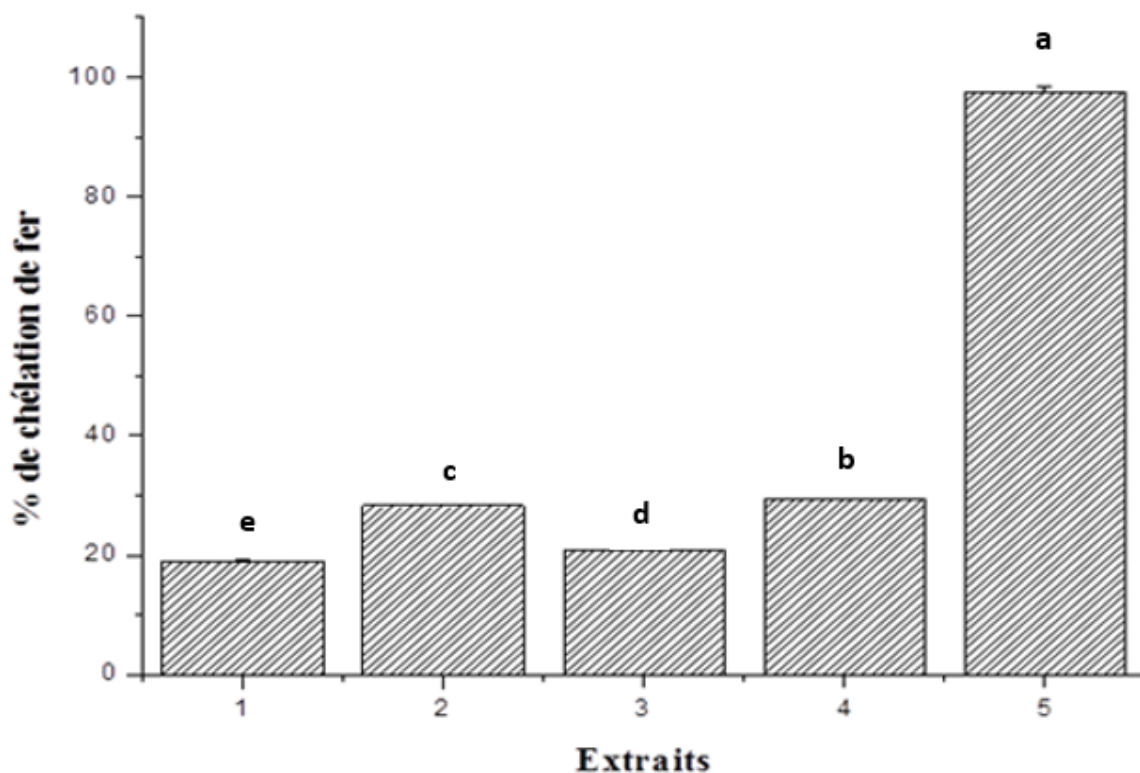


Figure 19 : Effet chélateur de fer des extraits aqueux et organiques de *C. laciniata* et EDTA à la concentration 100µg/ml. 1 : tige organique ; 2 : tige aqueux ; 3 : feuille organique. 4 : feuille aqueux ; 5 : EDTA .

La capacité de chélation du fer par les extraits aqueux de la plante est inférieure à celle d'EDTA (97%), la différence des pourcentages entre les extraits pourrait être due à leur taux en phénols totaux et en flavonoïdes car la chélation nécessite des positions spécifiques des OH afin de chélater le fer.

La ferrozine peut former quantitativement des complexes avec le Fe^{2+} cependant en présence des agents de chélation, la formation du complexe est interrompue de sorte que la couleur rouge du complexe diminue. La mesure de la réduction des couleurs permet d'estimer l'activité chélatrice du fer, aussi le Fe^{2+} possède la capacité de déplacer des électrons simples en vertu duquel il peut permettre la formation et la propagation de nombreuses réactions radicalaires même en commençant par des radicaux relativement non réactifs (Aboul-Enein *et al.*, 2003).

III. RESULTATS ET DISCUSSION

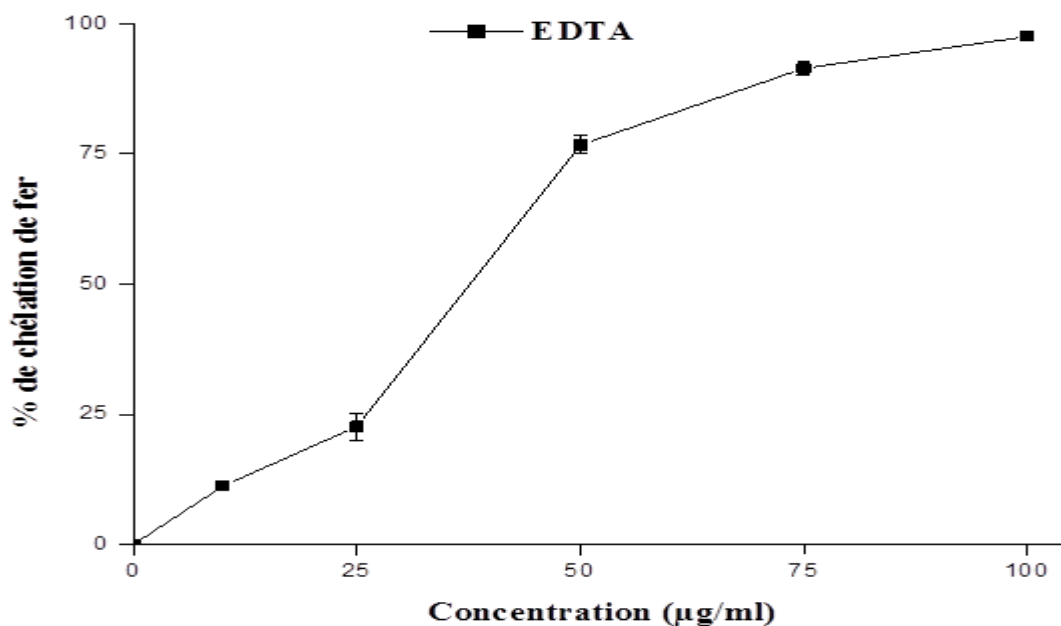


Figure 20 : Effet chélateur de fer par une molécule pure EDTA à différentes concentrations (de 10 à 100 µg/ml).

D'après la figure 20, l'EAqF du *C. laciniata* est le plus actif ce qui a entraîné la formation de complexes ferreux et ferrozine suggérant ainsi une activité de chélation d'ion ferreux. Le IC_{50} de l'extrait aqueux feuille était de 301,45 µg/ml à des concentrations de 100 jusqu'à 500 µg/ml, ce qui est inférieur à l'EDTA ($IC_{50}=37$ µg/ml) à des concentrations allant de 10 à 100 µg/ml

III. RESULTATS ET DISCUSSION

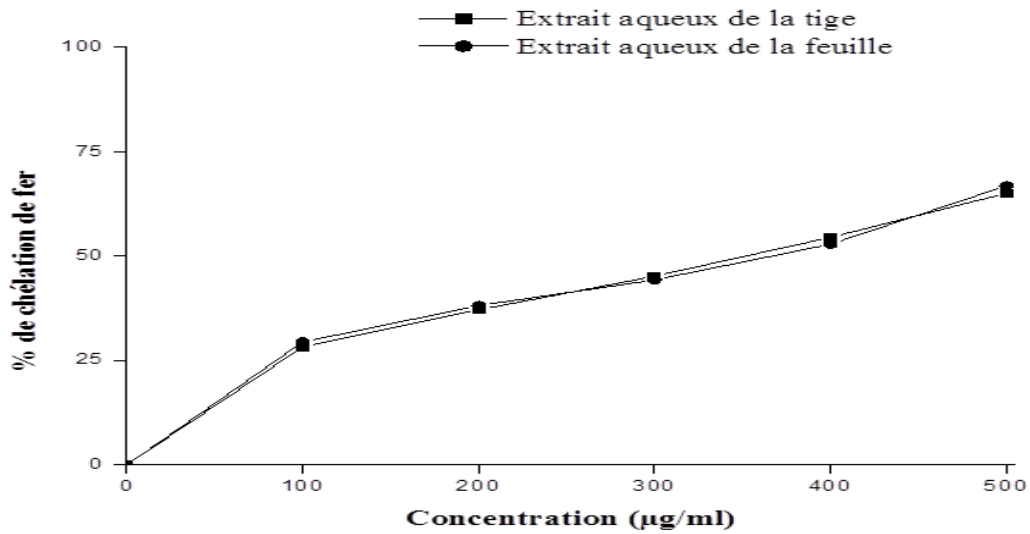


Figure 21 : Effet chélateur de fer des extraits aqueux et organiques de *C. laciniata* a différentes concentrations (100 .200.300.400 et 500 $\mu\text{g/ml}$).

Le test de l'activité chélatrice a révélé que les quatre extraits manifestent un pouvoir chélateur faible à celui de l'EDTA. Une corrélation faible entre l'activité et les teneurs en phénols totaux et les tannins ($r=0,63$; $r= 0,38$, respectivement) et pas de corrélation entre la chélation de fer et les taux en flavonoïdes ($r=0,007$) (Annexe 9).

Ces activités sont significativement différentes ($p\leq 0,05$) inférieures à celle exhibée par l'EDTA.

Conclusion

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail avait pour but d'étudier chimiquement l'espèce *Crataegus laciniata* et d'évaluer son activité antioxydante avec ses différents extraits : aqueux tige (EAqT), aqueux feuille (EAqF), organique Tige(EOT) et organique feuille (EOF)

La plante étudiée *C. laciniata* a été soumise à une extraction des composés phénoliques par macération hydroalcoolique. Les résultats obtenus montrent que les rendements en extraits bruts sont variables selon le type d'extrait. Le rendement le plus élevé est enregistré avec l'EAqT suivi de EOT et EOF (7,80 ; 2,2 et 1,6 %, respectivement) et le rendement le plus bas est enregistré avec l'EAqF à une valeur de 0,37%.

L'évaluation du contenu en phénols totaux, en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu indique que les quatre extraits sont riches en composés phénoliques mais avec des valeurs variables en fonction du type de l'extrait. On peut constater que les teneurs en ces composés varient entre 640,23 et 33,20 mg EC /g d'extrait. Les plus élevées des teneurs ont été détectées dans les extraits EAqT, EAqF et EOT tandis que, la plus basse est décelée à travers l'EOT.

De même la détermination du contenu en flavonoïdes par la méthode d' $AlCl_3$ nous mène à conclure que les teneurs en flavonoïdes varient d'un extrait à l'autre, Elles varient entre 43,13 et 6,73 mg EQ/g d'extrait. Des teneurs maximales sont constatées chez les extraits feuilles alors que les teneurs minimales sont enregistrées au sein des extraits tiges

Quant aux teneurs en proanthocyanidines qui sont révélées par la méthode de la vanilline nous mènent à conclure que les teneurs en tannins condensés sont plus répandues dans les extraits tiges aqueuses avec une valeur de 216,38 mg EAT/g d'extrait ,suivi par les extraits feuilles aqueuse et organiques avec des valeur de 80,63 ET 69,10 mg EAT/g d'extrait respectivement , la teneur en tannins condensés pour la partie tige organique et de 57,50 mg EAT/g d'extrait .

L'étude de l'activité antioxydante des différents extraits aqueux de *C laciniata* a été réalisée par une panoplie de tests : DPPH, $O_2^{\cdot-}$ chélation du métal Fe^{2+} , le blanchiment du β carotène et le pouvoir réducteur. Ces travaux nous ont montrés un bon pouvoir antioxydant de l'EAqF et de l'EAqT dans la totalité des méthodes utilisées.

Le meilleur pouvoir réducteur se situe dans l'EAqF et l'EOF (0,65 et 0,45 UA, respectivement).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les différents extraits *du C. laciniata* ont montré un bon pouvoir antiradicalaire qui dépasse les 80% pour les EAq et 60% pour les EO mais l'EAqT possède le meilleur pouvoir antiradicalaire, ce qui est confirmé par la valeur d'IC50 (7,87µg/ml).

Le meilleur effet anti-péroxydation en utilisant le système acide linoléique-β-carotène est obtenu par l'EOT avec un PI% de l'ordre de 19% à 100 µg/ml.

Les EAqF et EAqT ont montré la meilleure activité chélatrice de fer avec des valeurs de 30 et 29 %, respectivement.

L'activité contre l'anion superoxyde la plus élevée a été observée dans l'EAqF avec une valeur de 84,4% suivi de l'EAqT (82%).

Au terme de la présente étude, il est nécessaire de signaler que la ladite plante constitue une bonne source d'antioxydants naturels car la plante est une véritable source des composés phénoliques, ce qui explique leur explorations en médecine traditionnelle dans le traitement de nombreuse affections lié au stress oxydatif.

En perspective, et pour une meilleure évaluation des différentes parties de l'aubépine lacinié, il est intéressant de pousser et d'approfondir ce travail par :

L'étude de la composition chimique de toutes les parties de la plante : tige, feuille, fleur, fruit et racine ;

La réalisation des études complémentaires et plus approfondies concernant l'identification des composés phénoliques en général et des phénols et tannins en particulier

Déterminer de nouvelles molécules bioactives naturelles ayant la capacité de répondre aux différents problèmes de la santé et d'être l'alternative des médicaments synthétiques.

Elargir le panel des activités antioxydantes *in vivo* et *in vitro* et pour quoi pas d'autres tests biologique : anti-cancéreuse et anti-inflammatoire.

Caractériser et isoler des principes actifs responsables à ces propriétés pharmacologiques.

*Références
bibliographiques*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Aboul-Enein AM, El Baz FK, El-Baroty GS, Youssef AM and Abd El-Baky HH. (2003). Antioxidant activity of algal extracts on lipid peroxidation. *Journal medicinal science*. **3**: 87-98

Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P and Lomri A .(2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales . *Revue du rhumatisme* .**74** :636-643 .

Aganga A A, & Mosase K W. (2001). Tannin content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capassa*, *Zizyphus mucronata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. *Animal feed science and technology*, **91**(1), 107-113.

Amić D, Davidović-Amić D, Bešlo D & Trinajstić, N. (2003). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Journal of nutrition and food chemistry*.**76**(1) : 55-61.

Ávila-Sosa R, Ávila-Crisóstomo E, Reyes-Arcos E A, Cid-Pérez, T S, NavarroCruz A R.& Ochoa-Velasco C E. (2017). Effect of blue and UV-C irradiation on antioxidant compounds during storage of Hawthorn (*Crataegus mexicana*). *Scientia horticultrae*. **217** : 102-106.

B

Bidié A, N'Guessan BB, Yapo AF, N'Guessan JD et Djaman AJ(2011). Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences et nature*.**8** (1):1-11

Bachiri L, Daoudi A, Labazi N, Ibijbijen J et Nassiri L.(2015). Étude floristique du val d'Ifrane « Bassin versant du Oued Tizguit ». *Journal of animal & plant sciences*.**26**(1) : 3977-4006.

Bahorun T, Grinier B, Trotin F, Brunet G, Pin T, Luncky M, vasseur J, Cazin M ,Cazin C et Pinkas M.(1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-forschung*. **46**(11):1086-1089

Bahorun T, Trotin F & Vasseurt J. (1994). Comparative polyphenolic productions in *Crataegus monogyna* callus cultures. *Phytochemistry*.**37**(5) : 1273-1276.

Bahorun T, Luximon-Ramma A, Crozier A, Aruoma OI.(2004). Total phenol, flavonoid, proanthocyanidins and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *Journal science food agricultur*.**84**: 1553-61

Bellakhdar J.(2006). Plantes médicinales au Maghreb et soins de base, Précis de phytothérapie moderne, *Edition le frennec*, p : 385.

Bellakhdar J. (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle, *Edition Ibis Press* p : 759

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ben Ammar R B, Bhourri W, Sghaier M B, Boubaker J, Skandrani I, Neffati A, Bouhlel I, Kilani S, Mariotte A M, Chakir-Ghedira L, Dijoux-Franca M G and Ghedira K .(2009). Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L.(Rhamnaceae): A structure-activity relationship study. *Food chemistry*.**116**(1), 258-264.

Biesalski H k, Bohles H, Esterbauer H ,Furst P ,Gey F and Hundsdorefer G .(1997). Antioxydant vitamins in prevention. Consensus statement *Journal of nutrition* .**16**(3) :151-155.

Bruneton J.(1999). Pharmacology, Phytochemistry. In medicinal plants *Edition lavoisier publishing Paris*. p330 .

C

Cai Y Z, Sun M, Xing J, Luo, Q & Corke H. (2006). Structure radical scavenging activity relationships of phenolic compound from traditional Chinese medicinal plants. *Life sciences*.**78**(25) : 2872-2888.

Carr A, & Frei B (1999). Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions?. *The FASEB Journal*.**13**(9) :1007-1024.

Chaher N, Krisa S, Delaunay J C, Bernillon S, Pedrot E, Mérillon J M, Atmani D & Richard T. (2016). Unusual compounds from *Galium mollugo* and their inhibitory activities against ROS generation in human fibroblasts. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*.**117** :79-84.

Chang Q, Zuo Z, Chow M S S and Ho W K K.(2006). Effect of storage temperature on phenolics stability in hawthorn (*Crataegus pinnatifida* var. major) fruits and a hawthorn drink. *Food chemistry*. **98**: 426-430

Chavan U D, Shahidi F and Naczki M. (2001). Extraction of condensed tannins from beach pea *Lathyrus maritimus* L as affected by different solvents. *Journal food Chemistry*.**75** : 509-512.

Chiang H, Juilo Y and Lu F.(1994). Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Alsophila spinulosa* (hook) Tryo. *Journal of enzyme inhibition*.**8** :61-71 .

Chira K, Suh J, Saucier C et Teissédre P.(2008). Les polyphénols du raisin *Phytothérapie* .**6** :75-82.

Christopher J, Morris J, Charles W and Trenam D.(1995). Reactive oxygen species and iron dangerous partnership in inflammation. *International journal of biochemistry and cellular biology*.**27** :109-122 .

Chung Y C, Chien C T, Teng KY and Chou S T. (2006). Antioxidative and mutagenic properties of *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb and zucc. *Food chemistry*.**97**(3) :418-425.

Cillard J et Cillard P.(2006) .Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oilseeds & fats crops and lipids*.**13**(1):24-29.

Cook N.C et Samman S.(1996). Flavonoids chemistry, metabolism, cardio protective effects, and dietary sources, *Journal nutrition biochimical*.**7**:66-76.

Cowan M.M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical. microbiological research* .**12**(4):564- 582.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

D

- De Bruyne T, Pieters, Deelstra H and Vlietink A.** (1999). Condensed vegetable tannins : Biodiversity and biological activities. *Biochemical systematics and ecology*.**27**:445-459.
- De Gaulejac N S C, Glories Y and Vivas N.** (1999) .Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines .*Food research international*.**32**(5) :327-333.
- Dean R T, Fu S, Stocker R , Davies M J .** (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Journal of biochemistry* .**324** :1-18.
- Decker E A & Welch B.** (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle .*Food journal of agricultural and food chemistry*.**38** : 674-677.
- Di Carlo G, Mascolo N, Izzo A.A, et Capasso F.** (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life science*.**65**(4):337-53
- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B., Boutassouna D, Stocker P & Vidal, N.** (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry*.**97**(4):654-660.
- Dröge W.** (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*.**82**(1) :47-95.

E

- Emberger L.** (1938). Contribution à la connaissance des cèdres et en particulier du deodar er du cèdre de l'atlas .*Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale* .p77-92 .

F

- Falleh H, Ksouri R., Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M and Abdelly, C.** (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs , and their biological activities. *Comptes rendus biologiques*.**331** (5) : 372-379.
- Faure H, Fayol V, Galabert C, Grolier P, Le Moel G, Steghens J P & Nabet, F.** (1999). Les caroténoïdes : 1. Métabolisme et physiologie. In *Annales de biologie clinique* .**57**(2) : 169-83).
- Favier A.** (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. pp : 108-115
- Favier A.** (2006). Stress oxydant et pathologies humaines .*Annales pharmaceutiques françaises*.**64** :390-396.
- Ferreri A, Proenca C, Serralheiro M L M and Araujo M E M.** (2006). The in vitro screening for acetylcholin esterase inhibition and antioxydant activity of medicinal plant from Portugal. *Journal of ethnopharmacology*. **108**: 31-37.
- Fine A M, CPA, Candidate N D.** (2000). Oligomeric proanthocyanidin complexes : history , structure and phytopharmaceutical application alternative medicine review.**5** :144-151.
- Fong H, Bauman JL.** (2002) Hawthorn. *Journal of Cardiovascular Nursing*. **16**(4) :1-8.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Frankel E N and Meyer AS.(2000). The problems of using one- dimensional methods to evaluation multi functional food and biological antioxydant. *Journal of science of food and Agriculture* .**80**: 1925-1940.

G

Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D , Abedinzadeh Z & Jore D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène. : comment l'oxygene peut-il devenir toxique ?.*L'actualité chimique*, 91-95

Gómez-Caravaca A M, Gómez-Romero M, Arráez-Román D, Segura-Carretero A & Fernández-Gutiérrez A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compound in products derived from bees. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*.**41**(4) : 1220-1234.

Govindarajan R., Vijayakumar M, Rao C V, Shirwaikar A, Kumar S, Rawat A K & Pushpangadan, P. (2007). Antiinflammatory and antioxidant activities of *Desmodium gangeticum* fractions in carrageenan-induced inflamed rats. *Phytotherapy research*.**21**(10) : 975-979.

Gülçin İ, Oktay M, Küfrevioğlu Ö İ, & Aslan, A. (2002). Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) Ach. *Journal of ethnopharmacology*.**79**(3) : 325-329.

Gülçin İ.(2009). Antioxidant activity of l-adrenaline: A structure–activity insight. *Chemico-biological interactions*. **179**(2) : 71-80.

H

Halliwell B and Gutteridge J M C.(1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease : an overview.*Methods enzymol*.**186** :1-85.

Halliwell B and Gutteridge JM C. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problem and concepts. *Arch. Biochem. Biophys*. **246**, 501-514

Hansel D & Sompolinsky, H. (1992). Synchronization and computation in a chaotic neural network. *Physical Review Letters*.**68**(5) :718.

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

Huang H Y, Huang J J, Tso T K, Tsai Y C & Chang, C. K. (2004). Antioxidant and angiotension-converting enzyme inhibition capacities of various parts of *Benincasa hispida* (wax gourd). *Nahrung food*. **48**(3) :230-233.

J

Jasna M, Sanja P, Snježana , Stanzer D, Stehlik-T.(2012). Spirit drinks: a source of dietary polyphenols. *Croat. Journal. food science technologie*. **4** (2) 102-111

Jayakumar P A ,Thomas P and Geraldine P.(2009).*In-vitro* antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom,*Pleurotus ostreatus* .*Innovative food science and emerging technologing*.**10**(2) :228-234 .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Jayaprakasha G K, Singh RP and Sakariah K K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitisvinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food chemistry*.**73**(3) : 285-290.

Ju LY.(2005).*Crataegus oxycantha* (Aubepine) in the use as herb medicine in France. *China journal of Chinese materia medica* .**30** :634-640 .

K

Kahkonen MP ,Hopia A I , Vuorela H J ,Rauha J,Pilaja K ,Kujala T S and Heinonen M.(1999).Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of agricultural and Food chemistry*.**47**(10) :3954-3962.

Kang D G , Yun C K and Lee H S. (2003). Screening and comparison of antioxidant activity of solvent extracts of herbal medicines used in Korea.*Journal of Ethnopharmacology*.**87** :231-236 .

Kashyap C P, Arya V & Thakur N. (2012).Ethnomedicinal and phytopharmacological potential of *Crataegus oxycantha*. *Pacific journal of tropical biomedicine*. **2**(2):1194-1199.

Kathirvel P,Gong Y and Jukic M.(2009).Identification of the compound in a potent cranberry juice extract that inhibits lipid oxydation in comminuted muscle .*Food chemistry* .**115** :924-932 .

Katsarou A, Rhizopoulou S and Panagiotis K.(2012). Antioxidant Potential of the Aerial Tissues of the Mistletoe *Loranthus europaeus* *National. production*..**6** (4) : 394-397.

Keyer K, and Imlay J A. (1996). Superoxyde accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proceedings of the national academy of sciences*.**93**(24) :13635-13640.

Khamsah S M, Akowah G & Zhari, I. (2006). Antioxidant activity and phenolic content of *Orthosiphon stamineus* benth from different geographical origin. *Journal of sustainability science and management*, **1**(2), 14-20.

Khamsah S M, Akowah G and Zhari I. (2006). Antioxidant activity and phenolic content of *Orthosiphon stamineus* benth from different geographical origin. *Journal of sustainability science management* .**1**: 14–20.

Koechlin-Ramonatxo C (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*. **20**(4) :165-177.

Kong J M, Chia L S, Goh N K , Chia T F & Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*.**64**(5) : 923-933.

Krinsky N I.(1989). Antioxidant fonctions of carotenoids. *Free radical biology and médecine*.**7**(6) : 617-635.

Ksouri R,Megdiche W,Debez A,Falleh H ,Grignon C and Abdelly C.(2007).Salinity effects on polyphenol content and antioxydant activities in leaves of the halophyte *cakile maritima* .*Plant physiologi and biochimistry*.**45**(4) :244-249 .

Kumar D, Arya V, Ali Bhat Zq, Ahmad Khan N, Nandan Prasad D.(2012) The genus *Crataegus*: chemical and pharmacological perspectives. *Revista Brasileira de Farmacognosia* .**22**(5) :1187-1200.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

L

- Lapornik B, Prošek M & Wondra, A. G.** (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of food engineering*. **71**(2) : 214-222.
- Laranjinha J A, Almeida L M & Madeira V M.** (1992). Lipid peroxidation and its inhibition in low density lipoproteins: quenching of cis-parinaric acid fluorescence. *Archives of biochemistry and biophysics*, **297**(1), 147-154.
- Lee J, Koo N & Min D B.** (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, **3**(1), 21-33.
- Li H B, Wong C C, Cheng K Wand Chen, F.** (2008). Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT-Food Science and Technology*. **41**(3), 385-390.
- Li Y, Guo C, Yang J, Wei J, Xu J, & Cheng, S.** (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food chemistry*. **96**(2) : 254-260.
- Liu F, Ooi VEC, and Chang ST.**(1997). Free radical scavenging activity of mushroom polysaccharide extracts. *Life science*. **60**(10) :763-771.
- Liu R H.**(2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American journal of clinical nutrition*. **78**(3) : 517-520.
- Liyana-Pathirana CM. And Shahidi F.**(2006). Antioxidant proprieties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. *Journal of the science of Food and agriculture*. **86**: 477-485.
- Luczkiewicz M, Wojciech cisowski P K ,Ochockaz R & Piotrowski A.**(2001). Comparative analysis of phenolic acids in mistletoe plants from various hosts. *System*. **1**(5) : 373-379

M

- Makris D P, Kallithraka S and Kefalas P .**(2006).Flavonols in grapes ,grape products and wines :Burden,profile and influential parameters.*Jurnal of food compstion and analysis*,**19**(5) :396-404.
- Maksimović Z, Malenčić Đ & Kovačević N.** (2004). Polyphenol contents and antioxidant activity of Maydis stigma extracts. *Bioresource technology*. **96**(8) : 873-877.
- Martin S et Andrianttstihaina R.**(2000).Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveaux de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. **51** :304-315.
- Masuda T, Yonemori S, Oyama Y, Takeda Y, Tanaka T, Andoh T, Shinohara A and Nakata M.** (1999). Evaluation of the antioxydant activity of environnemental plants : activity of the leaf extracts from seashore plants. *Journal of agricultural and food chemistry*. **47**(4) :1749-1754.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

McGuffin V L & Chen S H. (1997). Molar enthalpy and molar volume of methylene and benzene homologues in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography* . **762**(2), 35-46.

Michiels C, Raes M, Toussaint O et Remacle J.(1994).Importance of seglutathione perioxydase ,catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress.Free radical *medical biology*.**17** :235-248.

Middleton E,Kandaswami C and Theoharides T .(2000).The effect of flavonoids on mammalian cells :implications for inflamation,heart disease ,and cancer .*Pharmacology review*.**52**(4) :651-674.

Miller AL.(1998).Botanical influences on cardiovascular disease.*Altern Med Rev*.**3** :422-431 .

Morris C J, Earl J R, Trenam C W & Blake D.R. (1995). Reactive oxygen species and iron a dangerous partnership in inflammation. *The international journal of biochemistry & cell biology*. **27**(2) : 109-122.

Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources.*Food chemistry*.**72**(2) :145-171.

N

Naidu, K. A. (2003). Vitamin C in human health and disease is still a mystery. *An Overview. Nutrition journal*.**2** (7) :1-10.

Nijveldt R T ,Nood E V ,Van-Hoorn D E C .(2001).Flavonoids :a review of probable mechanismes of action and potentiel applications .*American journal of cliical nutriment* .**74**(4) :418-25.

O

Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M , Flanagan J A and Deemer E K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of agricultural and food chemistry*.**50**(11) : 3122-3128.

Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reaction. *The japanese journal of nutrition and dietetics*. **44**(6) :307-315.

Ozcan V, Demircan C, Engindeniz Z, Turanoglu G, Ozdemir F, Ocak O and Akgoz S.(2005).Analysis of cardiopulmonary rescitation in an emergency.*Acta cardiol* .**60**(6) :581-587.

Ozsoy N, Can A, Yanardag R and Akev N.(2008).Antioxydant activity of *Smilax excelsa* L.leaf extracts .*Food chemistry*.**110**(3) :571-583 .

Öztürk M, Aydoğmuş-Öztürk F, Duru M E & Topçu G. (2007). Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. *Food Chemistry*.**103**(2) : 623-630.

P

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Palanisamy U, Cheng H M, Masilamani T, Subramaniam T., Ling, L.T& Radhakrishnan, A. K. (2008). Rind of the rambutan, *Nephelium lappaceum*, a potential source of natural antioxidants. *Food Chemistry*.**109**(1) : 54-63.

Petropoulos I.(2003).Stress oxydant et vieillissement modifications oxydatives des protéines au cours du vieillissement.Diderat.Paris .5 p.

Pincemail J,Meurisse M, Limet R et Defraigne J.(1999).Espece oxygénées activée ,antioxydants et cancer .*Coeur,Poumons*.**4**(4) : 1-4 .

Podsedek A.(2007).Natural antioxydants and antioxidant capacity of Brassica vegetables :A review .*LTW Food science and technology*.**40** :1-11.

Puppo A, & Halliwell, B. (1988). Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron.Is haemoglobin a biological Fenton reagent? *Biochemical journal*.**249**(1) : 185-190.

R

Rice-Evans C A, Miller N J & Paganga G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*.**20**(7) :933-956.

S

Sahnoun Z, Jamoussi K et Zeghal KM.(1998).Radicaux libres et antioxydants : physiologie ,*pathologie humaine et aspects thérapeutique*.**53** :39-315 .

Sarige G S. (2001). Candidate foods in the Asia–Pacific region for cardiovascular protection: fish, fruit and vegetables. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*. **10**(2) :134-137

Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30: 3875-3883.

Scherer R, Godoy HT. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1picrylhydrazyl method. *Food chemistry*, **112**: 654–658.

Schofield P,Mbugua D M and Pell A N.(2001).Analyses of condensed tannins. A review *Animal food and technology*.**91** :21-40.

Schroder D, Weiser M, Klein P. (2003). Efficacy of a homeopathic *Crataegus* preparation compared with usual therapy for mild (NYHA II) cardiac insufficiency : results of an observational cohort study. *Eur journal hearth fail* .**5**: 319-26.

Seyoum A., Asres K., and El-Fiky F.K. (2006). Structure–radical scavenging activity relation ships of flavonoids. *Phytochemistry*. **67**: 2058–2070

Shahidi F and. Wanasundara P K J P D.(1992).Phenolic antioxidants *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **32** : 67-103.

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

Singal, PK., Petkau A,Gerrard JM, Hrushovetz S and Foerster J. (1988) .Free radicals in health and disease. *Molecular. cellule .biochemical*. **84**: 121–122.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Santos-Sanchez NF, Flores-Parra A, Valadez-Blanco R, Fernandez-Rojas B, Martinez-Vasquez JB, Salas-Coronado R.** (2014). Polyphenolic content, free radical scavenging activity and isolation of Tiliroside from *Heliocarpus terebinthinaceus* (Tiliaceae). *Journal of biological sciences*. **14** (5): 376-380
- Singleton VL and Rossi J A.**(1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phospho-tungstic acid reagents. *American journal of enology and viticulture* .**16**: 144–158.
- Škerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hraš A R, Simonič M and Knez Ž.** (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chemistry*. **89**(2) :191-198.
- Slater A F, Stefan I ,Nobel D J ,Dobbelsteen V D and Orrenius S.**(1995).Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis .*Toxicology letters* .**83** :149-153
- Sokol-Letowska A, Oszmiansk J et Wojdylo, A.**(2007). Antioxydant activity of the phenolic compound of hawthorn, pine and skullcap. *Food chemistry*. **103**: 853-85.
- Stratil P, Klejdus B & Kubáň, V.** (2006). Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of agricultural and food chemistry*. **54**(3) : 607-616.
- Stypinski P T.** (1997). Biology and ecology of European mistletoe (*Viscum album*, Viscaceae) .*Fragmenta floristica et geobotanica,series polonica ,supplementum*,pp. 1-117
- Sun T, Ho C-H.** (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food chemistry*. **90**: 743– 749
- Svedstrom U, Vuorela H, Kostianen R, Tuominen J, Kokkonen J, Rauha JP, Laakso I, Hiltunen R** .(2006). Isolation and identification of oligomeric procyanidins from *Crataegus* leaves and flowers. *Phytochemistry* **60** : 821825.
- Swain T et Hillis W E** .(1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica* .*The quantitative analysis of the science of food and agriculture* .**10** :63-68

T

- Tabart J, Kevers C, Pincemail J, Defraigne J O & Dommes J.**(2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests.*Food Chemistry*.**113**(4).1226-1233.
- Tadić VM , Dobrić S, Marković GM , Dordevic SM , Arsić IA , Menkovic NR , Stević T** .(2008) Anti-inflammatory, gastroprotective, free-radical-scavenging, and antimicrobial activities of hawthorn berries ethanol extract.*Joutnal agricultural and food Chemistry*.**56** (17): 7700-7709.
- Tauchert M, Ploch M et Huebner WD.**(1994).Effectiveness of the hawthorn extract LI 132 compared with the ACE inhibitor Captopril. Multicentre double-blind study with 132 NYHA stage II heart failure patients. *Muenchener medizinische wochenschrift*, 136.
- Tawaha K, Alali FQ, Gharaibeh M, Mohammad M and El-Elimat T.**(2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry* .**104**: 1372–1378.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L & Byrne D H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*. 19(6) : 669-675.

Thomas S R ,Stocher R .(2000).Molecular action of vitamin E in lipoprotein oxidation implications for atherosclerosis.Free radical Journal of biology medical.28 :238-805 ;

U

Unten L, Koketsu M and Kim,M. (1997). Antidiscoloring activity of green tea polyphenols on β -carotene. *J. Agricultural food. Chemistry*.45: 2009-2019.

V

Valko M, Rhodes C J, Moncol J, Izakovic M M & Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*.160 (1) :1-40.

Veer P, Jansen M C, Klerk M & Kok F. (2000). Intestinal uptake of Quercetin-3-Glucoside in Rats involves Hydrolysis Lacas Phlorism Hydrolas. *Journal public health nutrition*. 3 : 103-107.

Verma SK, Jain V, Verma D, Khamesra R.(2007). *Crataegus oxyacantha*- A cardioprotective herb. *Journal herbal medical toxicological* 1: 65-71.

Veveris M, Koch E & Chatterje S S. (2004). Crataegus special extract WS® 1442 improves cardiac function and reduces infarct size in a rat model of prolonged coronary ischemia and reperfusion. *Life sciences*.74(15), 1945-1955.

Vicas S, Rugina D, Sosaciu C.(2008). Antioxidant activities of *Viscum album*'s leaves from various host trees. *Bulletin UASVM, Agriculture napoca*. 65: 327-332.

Vijaya L, Anita P, Jossy Vand Naresh C.(2009). *In vitro* antioxidant Activity of *Moringa pterigosperma* (Gaertn) leaves. *Pharmacognosy journal*. 1:184-9.

Vivar-Vera M A, Salazar-Montoya J A, Calva-Calva G & Ramos-Ramírez E G. (2007). Extraction, thermal stability and kinetic behavior of pectinmethylesterase from hawthorn (*Crataegus pubescens*) fruit. *LWT-food science and technology*. 40(2) : 278-284.

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.

Y

Yi ZB, Yan Y, Liang Y and Zeng B.(2008). *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus Cultivar and its main flavonoids. *LWT-Food science and technology*. 41: 597-603.

Yoo K M, Lee H C, Lee H, Moon B and Lee C Y.(2008).Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs . *Food chemistry*.106 : 929-936.

Younes M .(1981). Inhibitory action of some flavonoids on enhanced spontaneous lipid peroxidation following glutathione depletion. *Plant Medical* .43: 240-245.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Z

Zhang Z, Chang Q, Zhu M, Huang Y, Ho N W K and Chen Z .(2001). Characterization of antioxidants present in hawthorn fruits *.Journal of nutritional biochemistry* .**12** :144-152.

Annexes

ANNEXES

Annexe 1 : Le matériel et les produits utilisés pendant la partie pratique

1-Matériel

- ◆ Agitateur ;
- ◆ Bain marie ;
- ◆ Balance analytique ;
- ◆ Balance de précision ;
- ◆ Ballons ;
- ◆ Barre d'agitation magnétique ;
- ◆ Bavette ;
- ◆ Béchers ;
- ◆ Centrifugeuse.
- ◆ Cristalliseur ;
- ◆ Cuve en plastique ;
- ◆ Cuve en quartz ;
- ◆ Epanocheur ;
- ◆ EPREUVETTES ;
- ◆ Erlenmeyer ;
- ◆ Etuve (MEMMERT) ;
- ◆ Flacons ;
- ◆ Gants chirurgicaux ;
- ◆ Les fioles
- ◆ Micropipette 10-1000 μ l ;
- ◆ Papier absorbant ;
- ◆ Papier aluminium ;
- ◆ Parafilm
- ◆ pH mètre HANNA ;
- ◆ Pissette ;
- ◆ Rotavapeur ;
- ◆ Spatule ;
- ◆ Spectrophotomètre (spectro scan 50 UV-VIS spectrophotomètre
- ◆ Vortex (VELP scientifica).

ANNEXES

2. Produits

- ◆ Ethanol (Sigma) ;
- ◆ Méthanol (Biochem) ;
- ◆ Chloroforme (Biochem) ;
- ◆ L'eau distillée ;
- ◆ Réactif de Folin-Ciocalteu(Chim-oz) ;
- ◆ Carbonate de sodium (Biochem) ;
- ◆ Chlorure d'aluminium (Biochem) ;
- ◆ Tampon phosphate (PRS-Paureac);
- ◆ Ferricyanure de potassium (Biochem) ;
- ◆ Acide trichloracétique (Biochem) ;
- ◆ Chlorure ferrique (Biochem) ;
- ◆ Butylhydroxyanisol (Sigma) ;
- ◆ α -tocophérol (Sigma) ;
- ◆ 2-2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma);
- ◆ Ferrozine (Sigma) ;
- ◆ FeCl_2 (Biochem) ;
- ◆ Acide tannique (Biochem);
- ◆ Vanilline (Sigma) ;
- ◆ Acide sulfurique (Biochem) ;
- ◆ Acide linoléique (Sigma);
- ◆ β carotène (Sigma) ;
- ◆ Tween 20 (Sigma) ;
- ◆ Eau oxygénée (Biochem) ;
- ◆ Nicotinamide adénine di nucléotide de phenazine méthosulfate (Biochem).

ANNEXES

Annexe N°2

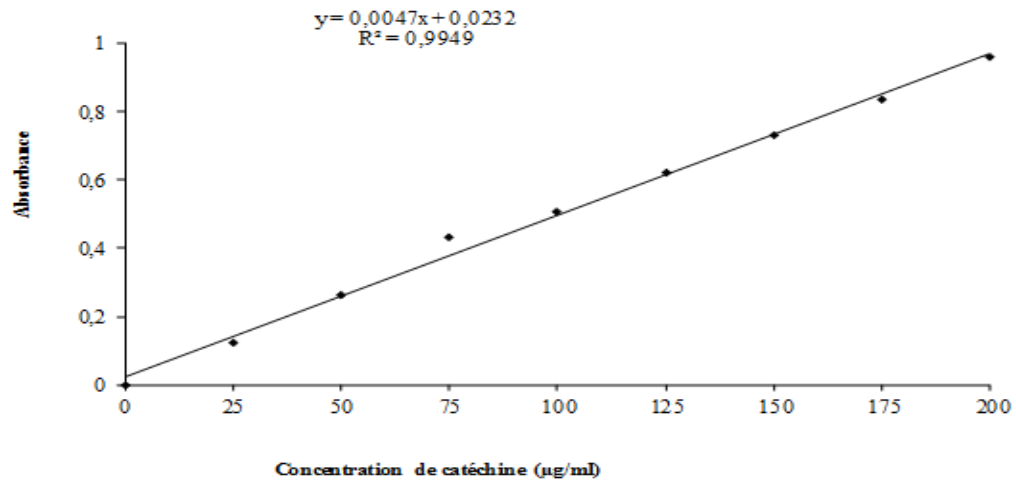


Figure 1 : Coube d'etalonnage avec la catéchine pour le dosage des phénols totaux. (Chaher *et al.*, 2016)

Annexe N°3

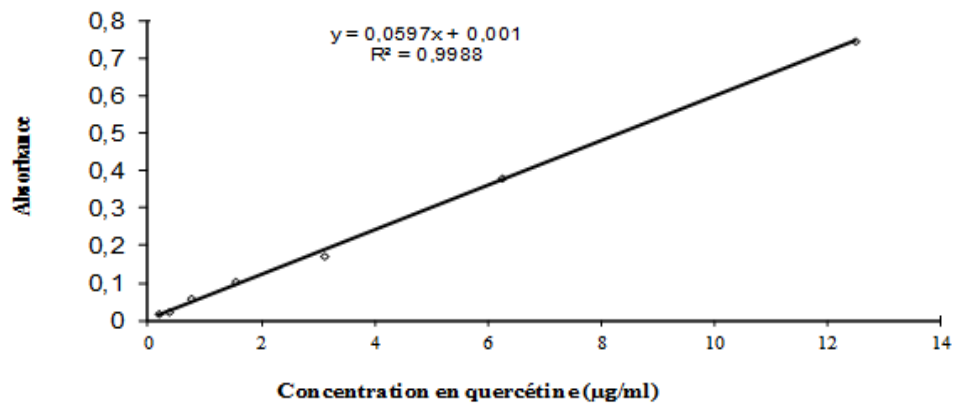
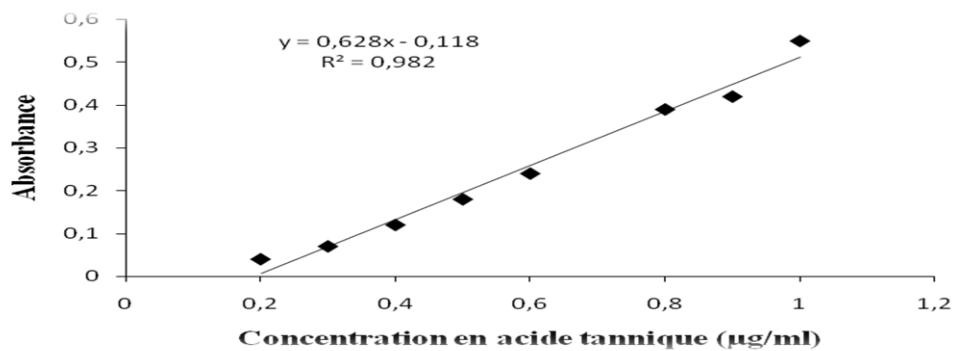


Figure 2 : Courbe d'étalonnage avec la quercétine pour le dosage des flavonoïdes. (Chaher *et al.*, 2016)

Annexe N°4



ANNEXES

Figure 3 : Courbe d'etalonnage avec l'acide tanique pour le dosage des tannins condensés.

Annexe 5

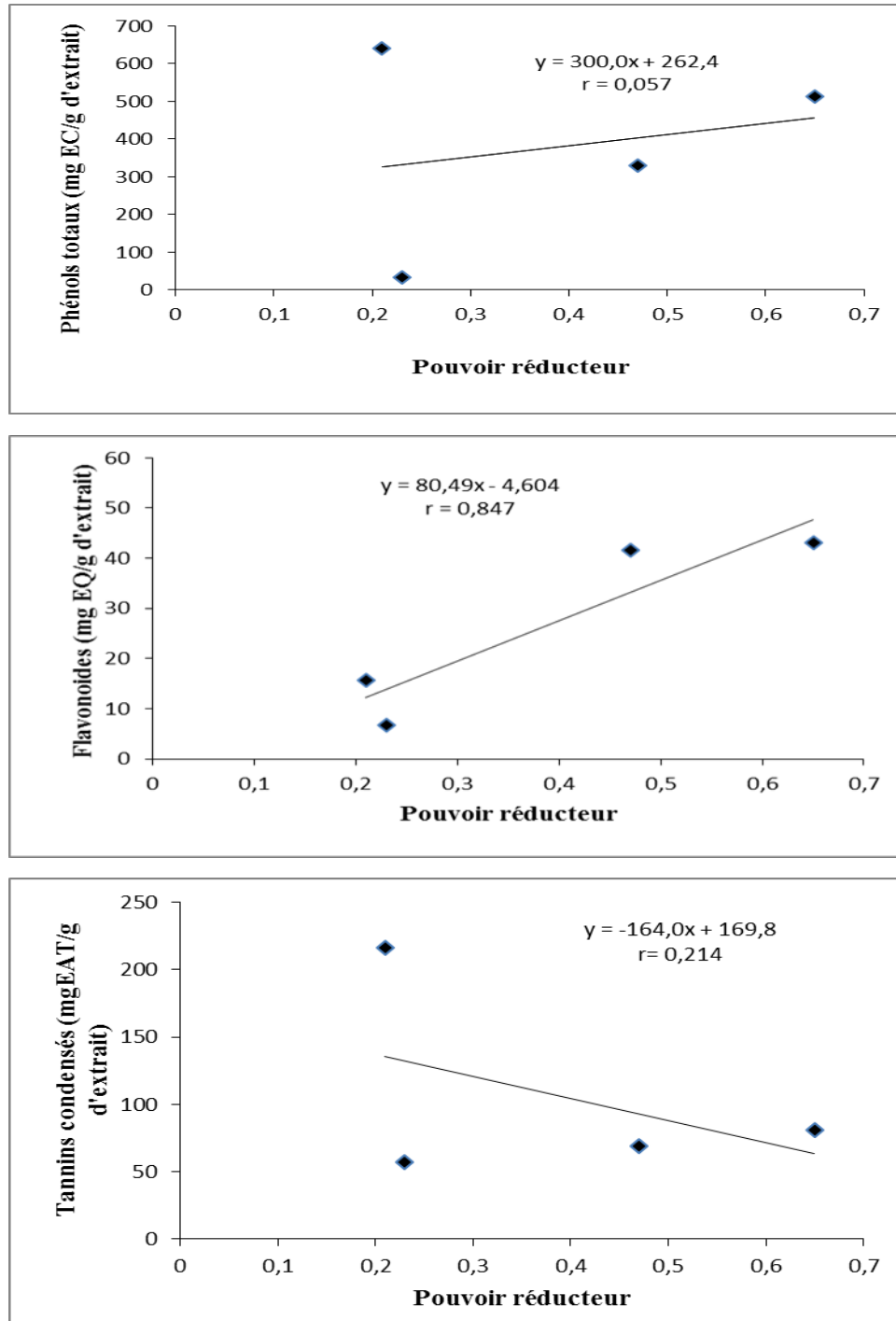
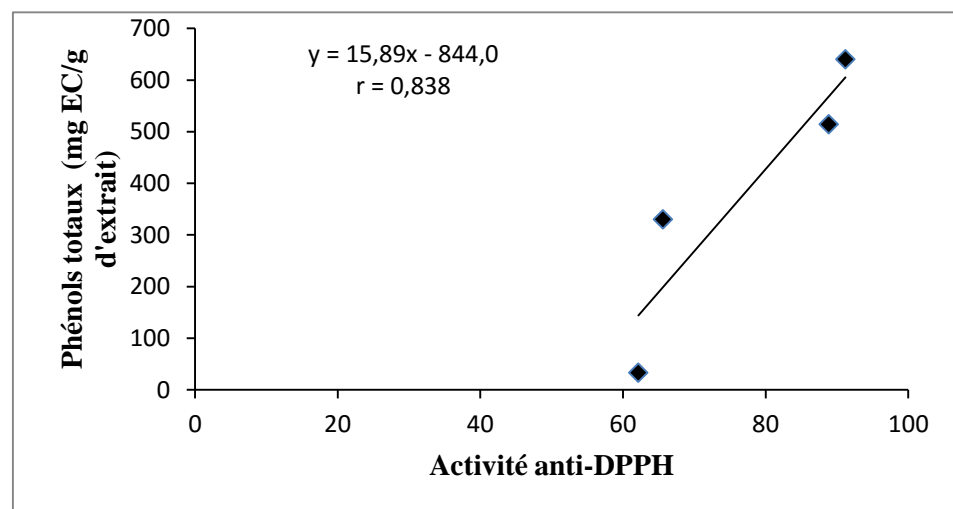
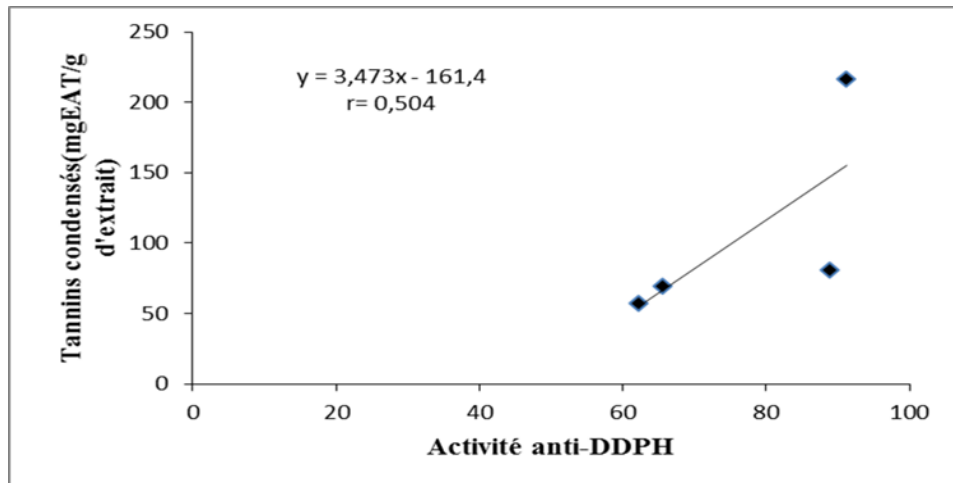
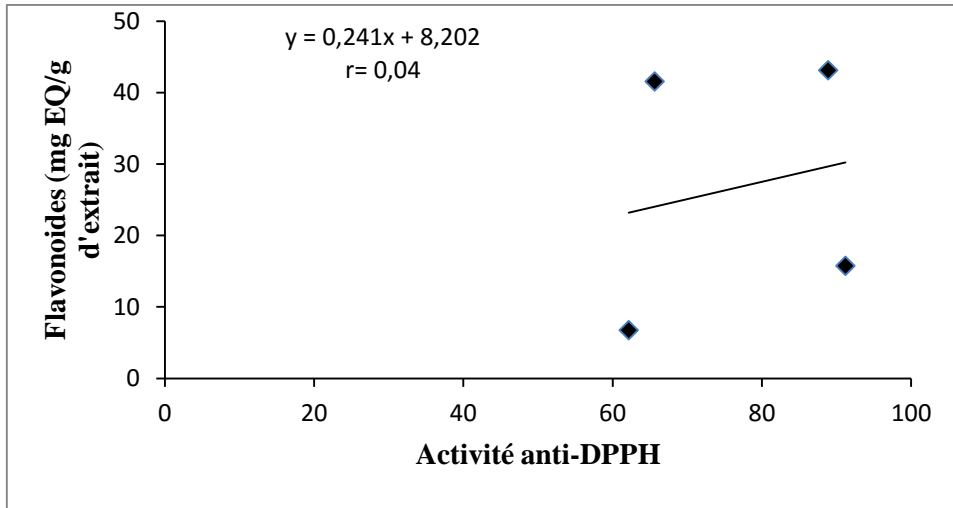


Figure 4 : corrélation entre le pouvoir réducteur, les polyphénols les flavonoïdes et les tannins condensés des extraits tige et feuille de *Crataegus laciniata*

ANNEXES

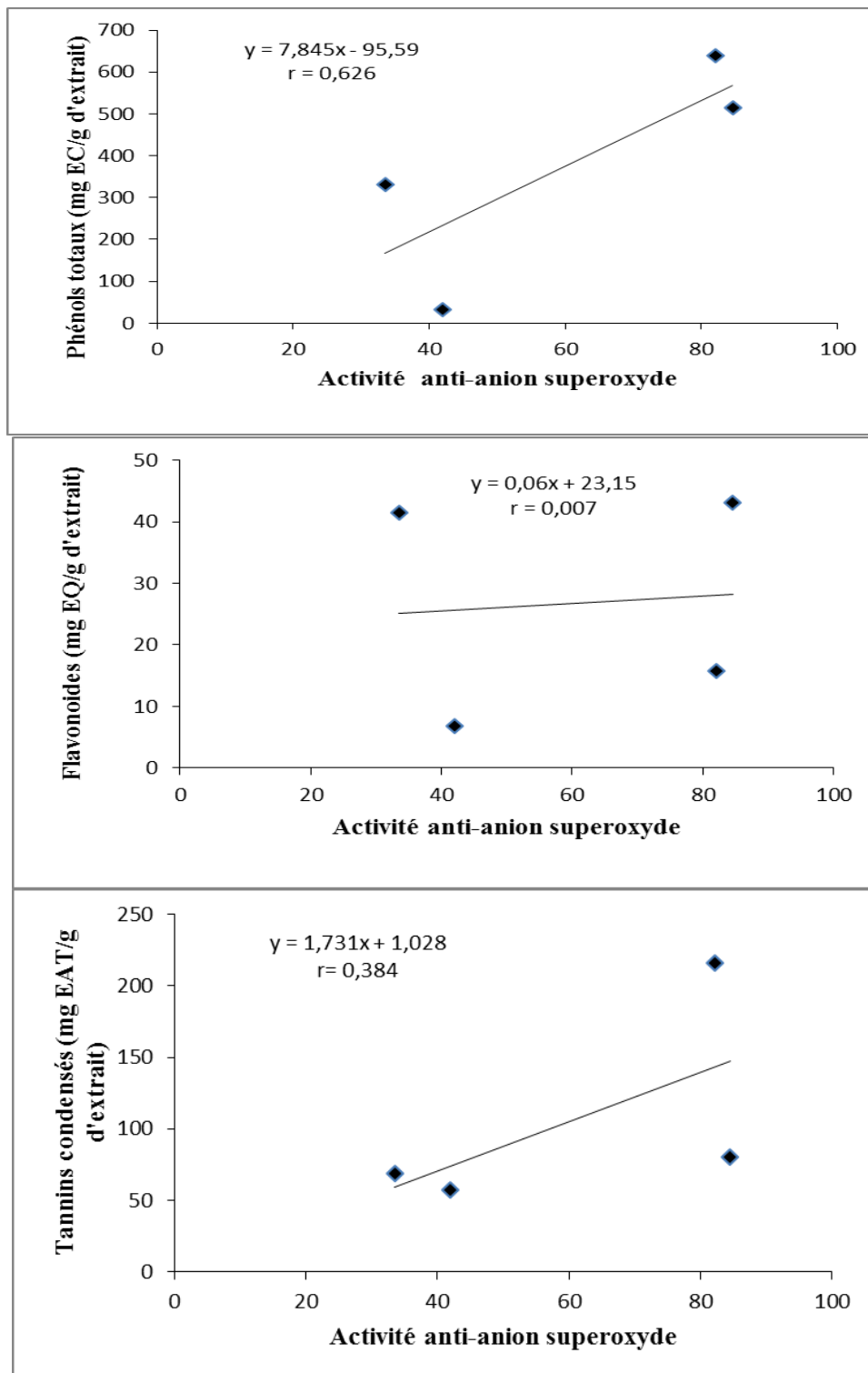
Annexe 6



ANNEXES

Figure 5 : Corrélation entre l'activité anti-DPPH, les polyphénols, les flavonoïdes et les tannins condensés des extraits tiges et feuilles du *Crataegus laciniata*

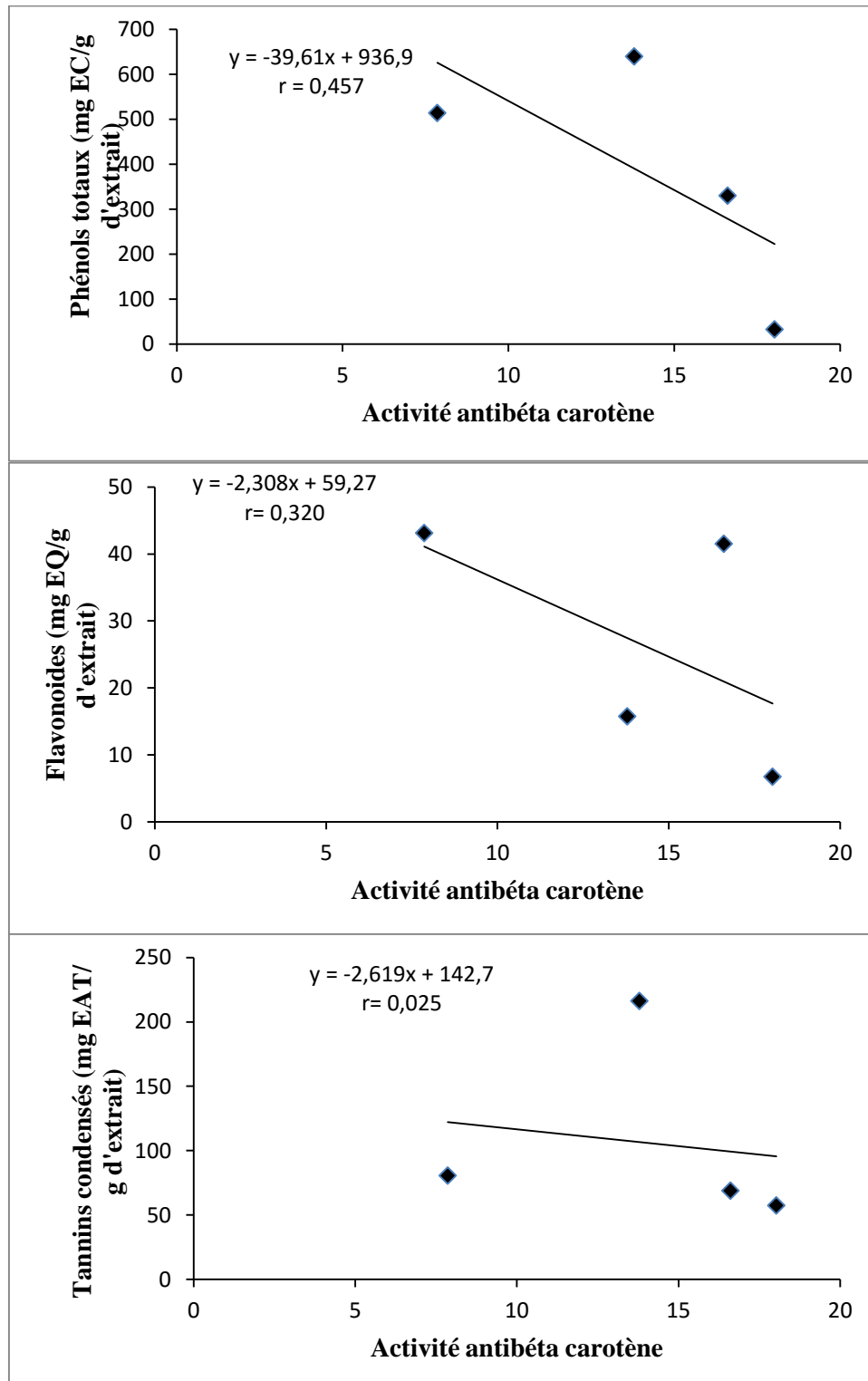
Annexe 7



ANNEXES

Figure 6 : Corrélation entre activité anti-anion superoxyde, les polyphénols, les flavonoïdes et les tannins condensés des extraits tiges et feuilles du *Crataegus laciniata*

Annexe 8



ANNEXES

Figure 7 : Corrélation entre l'activité anti-beta carotène, les polyphénols, les flavonoïdes et les tannins condensés des extraits tiges et feuilles du *Crataegus lacinia*

Annexe 9

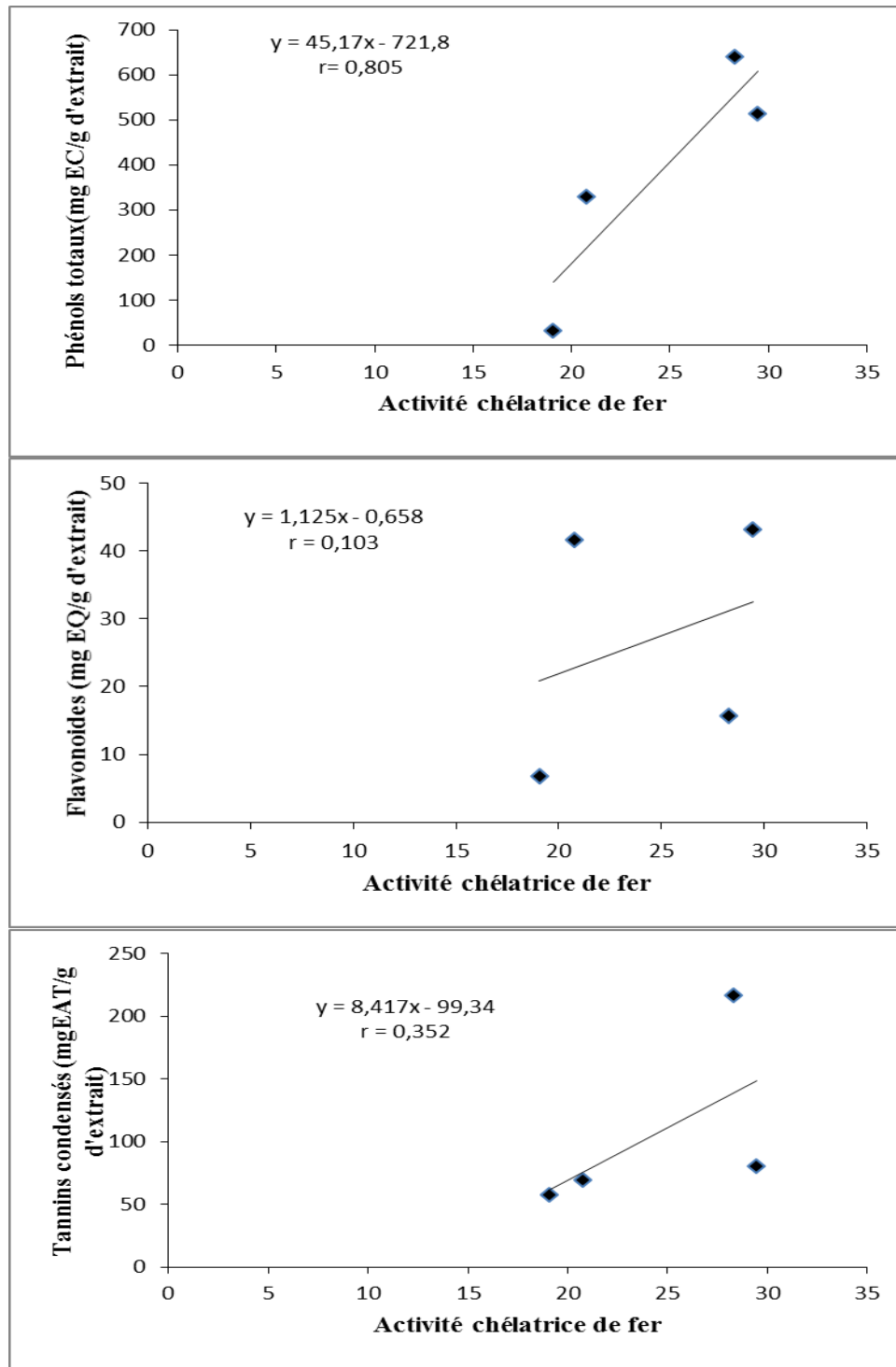


Figure 8 : Corrélation entre l'activité chélatrice de fer, les polyphénols, les flavonoïdes et les tannins condensés des extraits tiges et feuilles du *Crataegus laciniata*

ANNEXES

Glossaire

GLOSSAIRE

- ◆ **Anti-athérosclérotique** : contre les maladies dégénératives des artères, très répondeue, due à l'athérome et comportant un épaissement et durcissement de leur paroi gênant la circulation sanguine.
- ◆ **Antidiurétique** : substance diminuant la sécrétion d'urine.
- ◆ **Antioxydant** : Lutte contre le stress oxydatif, protège la cellule d'une oxydation par les radicaux libres et empêche l'altération des composés organiques.
- ◆ **Antispasmodique** : Fait baisser la tension et soulage les spasmes musculaires.
- ◆ **Anxiété** : c'est un trouble émotionnel qui se manifeste par un sentiment d'insécurité.
- ◆ **Arythmie** : c'est un trouble caractérisé par une irrégularité du rythme cardiaque .Elle peut être provoquée pas des troubles neurologiques ou d'autres problèmes de nature strictement cardiaque.
- ◆ **Astringent** : c'est une substance qui provoque la contraction des tissus et des vaisseaux sanguins et qui stimule la coagulation du sang.
- ◆ **Cardiotonique** : substance qui stimule l'activité du muscle cardiaque.
- ◆ **Chromogène** : substances incolores ou de bactéries qui, dans certaines conditions, peuvent former ou sécréter des produits colorés. Se dit de la phase du développement d'un film polychrome durant laquelle se forme l'image en couleurs ; se dit aussi du révélateur utilisé.
- ◆ **Feuillage caduc** : renouvellement des feuilles chaque année
- ◆ **Hypotenseur** : provoque une diminution de la tension artérielle.
- ◆ **Insuffisance cardiaque chronique** : incapacité du cœur à fournir un apport sanguin suffisant pour répondre aux besoins métaboliques de l'organisme, caractérisée par la diminution de la capacité cardiaque à l'effort.
- ◆ **L-gulonolactone oxydase** : c'est une enzyme qui produit de la Vitamine C mais elle n'est pas fonctionnelle chez les *Haplorrhiniy* compris les humains, chez les chauves – souris et chez les cobayes ; il catalyse la réaction de L-gulono-1,4-lactone avec le

GLOSSAIRE

l'oxygène a la L-oxo-3-gulonolactone et au peroxyde d'hydrogène .Il utilise FAD comme cofacteur .La L-oxo-hex-3-gulonolactone peut se transformer en acide ascorbique spontanément.

- ◆ **Neurodégénérative** : une maladie correspond à une pathologie progressive qui affecte le cerveau ou plus globalement le système nerveux, entraînant la mort des cellules nerveuses. Les plus célèbres et les plus fréquentes sont la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson mais il en existe d'autres
- ◆ **Oxydant** : un corps simple, un ion ou un composé qui reçoit au moins un électron d'une autre espèce chimique lors d'une réaction d'oxydoréduction
- ◆ **Phénols** : Ce sont des composés chimiques aromatiques portant une fonction hydroxyle -OH. Les dérivés portant plusieurs fonctions hydroxyle sont appelés des polyphénols
- ◆ **Polyphénols** : constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés, comme l'indique le nom, par la présence d'au moins deux groupes phénoliques
- ◆ **Procyanidines** : sont des tanins condensés formés par des unités flavaniques de type catéchol et épicatechol.

Résumé

Quatre extraits ont été obtenus à partir des tiges et des feuilles de la plante de *Crataegus laciniata* selon une méthode d'extraction sélective afin d'étudier leurs propriétés antioxydantes. L'évaluation du pouvoir antiradicalaire (DPPH) a montré que l'extrait aqueux tige a une bonne activité antioxydante avec une valeur d'IC₅₀= 7,87 µg/ml. Quant à l'inhibition de la beta carotène, le meilleur pouvoir a été obtenu par l'extrait organique tige (IC₅₀= 355,07 µg/ml). Le pouvoir réducteur a montré que l'extrait aqueux feuilles possède le meilleur pouvoir (0,67 UA), aussi, la chélation du fer a révélé que l'extrait aqueux feuille est le meilleur chélateur du fer (IC₅₀ = 301,45 µg/ml). L'activité de piégeage de l'anion superoxyde a confirmé que l'extrait aqueux feuille a une forte activité antioxydante avec un IC₅₀= 31,92 µg/ml. L'analyse chimique a montré la richesse des extraits étudiés en phénols totaux, en tannins condensés et en flavonoïdes.

Les mots clés : *Crataegus laciniata*, Activité antioxydante, Polyphénols, Tannins, Flavonoïdes

Abstract

Four extracts were obtained from the stems and leaves of the *Crataegus laciniata* plant according to a selective extraction method in order to study their antioxidant properties. The evaluation of the antiradical power (DPPH) showed that the aqueous stem extract had a good antioxidant activity with an IC₅₀ value of 7.87 µg / ml. When inhibiting β carotene, the best potency was obtained by the organic extract stem (IC₅₀ = 355.07 µg / ml). The reducing power showed that the leaf aqueous extract had the best potency (0.67 AU), so iron chelation revealed that the leaf aqueous extract was the best iron chelator (IC₅₀ = 301.45 µg / ml). The superoxide anion scavenging activity confirmed that the leaf aqueous extract had a strong antioxidant activity with an IC₅₀ = 31.92 µg / ml. Chemical analysis showed that the richness of the extracts studied in total phenols, condensed tannins and flavonoids.

Key words: *Crataegus laciniata*, Antioxidant activity, Polyphenols, Tannins, Flavonoids.

ملخص

أربعة مقتطفات من سيقان و أوراق نبات *كراتايغوس لاسينياتا* (*Crataegus laciniata*) تم استخلاصها وفقا لطريقة استخراج انتقائية بهدف دراسة و تقييم نشاط المضادة للأكسدة. اظهر تقييم القدرة المضادة للجنور (DPPH) ان مستخلص سيقان المائي له نشاط مضاد جيد بقيمة IC₅₀=7.87 ميكرو غرام/مل. عند تثبيط β كاروتين تم الحصول على افضل فعالية من قبل سيقان العضوية بقيمة IC₅₀=355.07 ميكرو غرام/مل. اظهرت القدرة الارتجاعية ان مستخلص المائي الأوراق افضل فعالية (0.67UA) كشفت خلاص الحديد ان المستخلص المائي للأوراق كان افضل خالب للحديد ب (IC₅₀=301.45 ميكرو غرام/مل) اكد نشاط مسح أنيون الفائق ان المستخلص المائي للأوراق له نشاط قوي مضاد للأكسدة (IC₅₀=31.92 ميكرو غرام/مل) في الأخير اظهر التحليل الكيميائي ثراء المستخلصات التي تمت دراستها في الفينول الكلي، العفص المكثف و الفلافونويدات.

الكلمات المفتاحية: *كراتايغوس لاسينياتا* *C. laciniata* نشاط المضاد للأكسدة، بولنفينول، العفص المكثف، فلافونويد