



جامعة بجاية
Tasdawit n'Bgayet
Université de Béjaïa

République Algérienne Démocratique et Populaire.
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.
Université Abderrahmane Mira de Bejaia.
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Alimentaires

Mémoire

Présenté par M^{me} BOUDRAA née KANIN Ghania

En vue de l'obtention du diplôme de

Magister

Filière : Sciences Alimentaires

Option : Alimentation et Technologie Alimentaire

Thème

Activité antioxydante d'extraits de *Melia azedarach*

Devant le jury composé de :

M ^{lle} LOUAILECHE Hayette	Professeur	Univ. de Béjaïa	Présidente
M ^r ZAIDI Farid	Professeur	Univ. de Béjaïa	Directeur de mémoire
M ^{me} AIT-BRAHAM Lila	M.C.A	Univ. de Béjaïa	Examinatrice
M ^r KATI Djamel Edine	M.C.A	Univ. de Béjaïa	Examineur

2014/2015

Remerciements

« La connaissance est la seule chose qui s'accroît lorsqu'on la partage ».

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur ZAIDI Farid. Merci d'avoir accepté de diriger cette thèse au sein du laboratoire « Alimentation et Technologie Alimentaire ». Merci pour votre encadrement sans faille tout au long de ces deux années.

L'honorable jury composé du Professeur LOUAILECHE H. présidente, de AIT-BRAHAM L. et Docteur KATI D.J., examinateurs.

Je les remercie d'avoir accepté d'examiner ce travail qui est l'aboutissement d'un grand défi personnel et que j'espère pourra répondre à des ambitions expérimentales et scientifiques.

A toute l'équipe du laboratoire Nutrition et Alimentation pour leur accompagnement et collaboration.

Ma gratitude va également à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dont ; la direction et le personnel de l'INRA de Oued Ghir

La direction et le personnel de l'ONAB unité d'El kseur

La direction et le personnel de cevital.

Dédicace

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

- ❖ A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.*
- ❖ Amon cher père qui ma appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements.*
- ❖ A mon très cher mari Nouredine qui m'a toujours soutenu dans mes choix, et qui a été présent chaque fois que cela a était nécessaire.*
- ❖ A mes très chères sœurs et frères*
- ❖ A ma belle famille : beau père, belle mère, mes beaux frères et mes belles sœurs.*
- ❖ A mes amies du laboratoire*

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Introduction 1

Synthèse bibliographique

CHAPITRE I : Composés phénoliques

1. Généralités.....	3
2. Biosynthèse.....	4
3. Classes des polyphénols.....	5
3.1. Flavonoïdes.....	6
3.2. Anthocyanosides.....	9
3.3. Tannins.....	9
3.4. Phénols simples et les acides phénoliques.....	10
3.5. Coumarines.....	10
3.6. Quinones.....	11
3.7. Stilbènes.....	11
3.8. Lignanes.....	11
4. Propriétés biologiques des polyphénols.....	11

CHAPITRE II : Radicaux libres et pouvoir antioxydant

1. Généralités.....	14
2. Différents types des radicaux libres.....	14
3. Origine de production des ERO.....	14
4. Dommages oxydatifs des radicaux libres.....	15
5. Moyens de défense contre les radicaux libres.....	15
5.1. Prévention à plein temps.....	15
5.2. Détoxification active suite à une attaque oxydante.....	15

5.2.1. Superoxyde dismutase (SOD)	16
5.2.2. Catalase	16
5.2.3. Glutathion peroxydase.....	16
5.3. Détoxification passive	16
5.3.1. Vitamine E (tocophérol).....	17
5.3.2. Vitamine C (acide ascorbique).....	17
5.3.3. Caroténoïdes.....	17
5.3.4. Acide lipoïque	17
5.3.5. Albumine	18
5.3.6. Composés phénoliques	18
6. Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes <i>in vitro</i>	18

Chapitre III: Propriétés biologiques de *Melia azedarach*

1. Propriétés botaniques	20
1.1. Généralités.....	20
1.2. 1.2 Nomenclature et classification	20
1.2.1 Classification botanique	20
1.2.2 Nomenclature	21
1.2.3 Etymologie	21
1.3. Origine et répartition géographique	22
1.4. Caractéristiques morphologiques	22
2. Composition chimique	24
2.1. Composition physico-chimiques globales.....	24
2.2. Composition en composés phénoliques	24
2.3. Composition en d'autres métabolites secondaires	26
3. Intérêts et propriétés biologiques	27
3.1. Utilisations traditionnelles.....	27
3.2. Utilisations pharmaceutiques	29
3.3. Potentiel antibactérien	30
3.4. Potentiel antifongique	31
3.5. Potentiel Insecticide	32
3.6. Potentiel antioxydant	34

Partie expérimentale**Chapitre I : Matériel et méthodes**

1. Préparation du matériel biologique végétal.....	36
2. Composition chimique globale.....	36
2.1. Détermination de Matière sèche.....	37
2.2. Teneur en cendres et en Matières Organique	37
2.3. Dosage de la cellulose bute	37
2.4. La teneur en protéine brute.....	37
2.5. Détermination de la matière grasse	38
3. Extraction et dosage des sucres totaux	39
4. Détermination de la teneur en caroténoïdes	40
5. Extraction et dosage des composés phénoliques.....	40
5.1. Extraction des composés phénoliques.....	41
5.2. Dosage des composés phénoliques	42
5.2.1. Dosage des polyphénols totaux	42
5.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	43
5.2.3. Dosage des tanins condensés.....	44
5.2.4. Mise en évidence de la présence d'autres métabolites secondaires dans les extraits.....	45
6. Etude des étapes de l'activité antioxydante.....	45
6.1. Réduction du fer : FRAP (<i>Ferric reducing antioxidant power</i>).....	45
6.2. Piégeage du radical libre DPPH'	46
6.3. Chélation du fer ferreux	47
6.4. Test du blanchiment du β -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique.....	48
6.4. Test de Thiocyanate Ferrique (FTC).....	49
7. Analyse statistique.....	50

Chapitre II. Résultats et discussion

1. Composition chimique globale.....	51
2. Teneur en composés phénoliques.....	51
2.1. Les phénols totaux solubles.....	51
2.2. Flavonoïdes	52
2.3. Teneur en tanins condensés.....	53

2.4. Teneur en tanins hydrolysable.....	54
2.5. Résultats du Screening chimique	55
3. Activités antioxydants	57
3.1. Réduction du fer : FRAP (<i>Ferric reducing antioxidant power</i>).....	57
3.2. Piégeage du radical libre DPPH'	60
3.3. Chélation du fer ferreux	62
3.4. Test du blanchiment du β -carotène	64
3.5. Test de Thiocyanate Ferrique (FTC).....	65
Chapitre III. Discussion générale.	67
Conclusion.....	72
Références bibliographiques	75

Liste des abréviations

ABS : Absorbance

AT : Acide Tannique

BHA : Hydroxyanisole Butylé

BSA : Bovine Sérum Albumine

C4H : cinnmate 4-hydroxylase

DPPH :2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

ED : Extrait Aqueux

EDTA: Ethylene diamine tetraacetic

Eq AA : Equivalent de l'Acide Ascorbique

EqAG : Equivalent Acide Galique

EqAT : Equivalent Acide Tannique

EqCAT : Equivalent Catéchine

EqQ : Equivalent quercétine

EtOH 30% : Extrait éthanologique 30%

EtOH 50% : Extrait éthanologique 50%

EtOH 70% : Extrait éthanologique 70%

IC50 : Concentration inhibitrice de 50%

MS : Matière Sèche

PAL : phénylalanine ammonia-lyase

PTS : Phénols Totaux Solubles

SNC: Thiocyanate d'ammonium

SOD : Super oxyde dismutase

TCA : Acide Trichloracétique

Liste des figures

Liste des figures

Figure 1 : Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie de shikimate.	5
Figure 2 : Structure du 2-phényle chromane.....	7
Figure 3 : Structure générale des flavonoïdes.	7
Figure 4 : Structures des squelettes de base des flavonoïdes	8
Figure 5 : Structure des anthocyanosides.....	9
Figure 6 : Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B)	9
Figure 7 : Structure de l'acide lipoïque et l'acide dihydrolipoïque.....	17
Figure 8 : Melia azedarach ; (A) la tige, (B) feuilles, (C) fleurs et (D) fruits.....	23
Figure 9 . Structures chimiques des composés 1–6.....	26
Figure 10 : Photographie des feuilles sèches (A) et des feuilles après broyage (B)	36
Figure 11 : Extraction de la matière grasse par soxhlet	38
Figure 12 : Protocole d'extraction des polyphénols.....	41
Figure 13 : Mécanisme de réaction du chlorure d'aluminium avec les flavonoïdes	43
Figure 14 : Réduction d'un donneur d'hydrogène (antioxydant) avec le radical DPPH'	46
Figure 15 : Composition chimique globale.....	51
Figure 16 : Teneurs en phénols totaux solubles	52
Figure 17 : Teneur en flavonoïdes des extraits bruts	53
Figure 18 : Teneur en tanins condensés	54
Figure 19 : Teneur en tanins Hydrolysables.....	55
Figure 20 : photos de mise en évidence des alcaloïdes dans les extraits	56
Figure 21 : photos de mise en évidence des saponines dans les extraits.....	56
Figure 22 : photos de mise en évidence des terpenoïdes dans les extraits.....	59
Figure 23 : Comparaison du pouvoir réduction du fer (FRAP) des extraits bruts	58
Figure 24 : Effet de la concentration extraits et standards sur le pouvoir réducteur du fer	59
Figure 25 : Activité antiradicalaire du DPPH des extraits bruts	60
Figure 26 : Effet de la concentration des extraits et standards sur l'activité antiradicalaire du DPPH	61
Figure 27 : Pouvoir chélation du fer ferreux	62
Figure 28 : Effet de la concentration des extraits et standards sur le pouvoir de chélation de fer ferreux	63
Figure 29 : Inhibition de blanchiment du b-carotène des extraits bruts.....	64

Liste des figures

Figure 30: Cinétique de blanchiment de β -carotène en fonction du temps.....	65
Figure 31: Cinétique d'inhibition de peroxydation de l'acide linoléique	65

Liste des tableaux

Tableau I : Structure des squelettes des polyphénols	6
Tableau II : La classification de <i>Melia azedarach</i>	20
Tableau III: Quelques noms vernaculaires pour <i>Melia azedarach</i>	21
Tableau IV: Analyses chimiques (mean \pm SD) des feuilles de <i>Melia azedarach</i> selon l'étape de maturité.....	24
Tableau V: L'analyse par HPLC des extraits ethanologiques (50%) et aqueux des feuilles de <i>Melia azedarach</i> en mg/g MS	25
Tableau VI : Analyses phytochimiques d'extrait à l'éthanol de <i>Melia azedarach</i>	27
Tableau VII: Remèdes folkloriques et utilisations traditionnelles de <i>Melia azedarach</i>	28
Tableau VIII: Activités pharmaceutiques de <i>Melia azedarach</i>	30
Tableau IX : L'activité antibactérienne de feuilles de <i>Melia azedarach</i> par l'essai de diffusion sur disque.....	31
Tableau X: Potentialité pesticide de <i>Melia azedarach</i>	33
Tableau XI: Effet d'extrait ethanologique de <i>Melia azedarach</i> sur l'effort oxydant chez les rats (mean \pm SEM, n=6).....	34
Tableau XII: l'activité antioxydant de différents extraits de <i>Melia Azadirachta</i>	35
Tableau XIII: Résultats de criblage phytochimiques de <i>Melia azedarach</i>	56
Tableau XVI: Concentration IC50 de pouvoir réducteur des extraits bruts	59
Tableau XVII: Concentration IC50 de l'activité antiradicalaire d'extraits bruts	61
Tableau XVIII: les valeurs d'IC 50 des extraits bruts du pouvoir de chélation de fer.....	63

INTRODUCTION GENERALE

Introduction

L'étude de la chimie des plantes médicinales est toujours d'une actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives. Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes (**Bahorun et al., 1996**).

Les polyphénols sont en effet doués de multiples vertus thérapeutiques, ils jouent un rôle très important, principalement, dans la lutte contre les cancers, les maladies cardiovasculaires et la peroxydation lipidique. Expliquant de ce fait leur grande utilisation dans la fabrication des médicaments. Ils interviennent aussi dans la protection des plantes contre les différentes attaques microbiennes (surtout fongiques) risquant de causer la perte d'une grande quantité de végétation (**Bruneton, 1999**).

Arbre à feuilles caduques et originaire du Nord-ouest de l'Inde, *Melia azedarach* (communément appelé margousier ou « lilas de Perse »), a été introduit dans plusieurs pays d'Asie, et d'Amérique (du Nord, et Amérique latine) et s'est adapté aux régions du Moyen-Orient et d'Afrique du Nord. Ses propriétés exploitées par la médecine traditionnelle chinoise (MTC) depuis 350 avant JC (**Ji et al., 2009**) ont connu un net regain d'intérêt depuis le début du vingtième siècle, lors des grandes invasions acridiennes (Palestine en 1915, Inde en 1926 et Algérie entre 1888-1894) durant lesquelles l'arbre était épargné par les criquets (**Hajaniaina, 1996**). Ce dernier rapporte que la recherche de matières actives à partir de feuilles de *M. azedarach* a permis d'extraire et isoler une substance amère appelée meliatine. Depuis, d'autres constituants chimiques sont révélés et isolés tels que le polyketide antibactérien citrinine des fruits, les phénylpropanoïdes amides de l'écorce de racine, l'azedarachine, les triterpénoïdes et les composés phénoliques.

Melia azedarach est reconnu comme une importante source de nombreux composés bioactifs caractérisés par leurs multifonctions exploitées aussi bien en médecine (anti-cancéreux, anti-oxydants, anti-microbiens, anti-inflammatoires et immunosuppresseurs) que dans la protection phytosanitaire pour leurs activités insecticides, anti-appétants, régulation de la croissance et la capacité de prévention des maladies (**Maciel et al., 2006; Alouani et al., 2009**).

L'objectif de ce travail est de déterminer les teneurs en composés phénoliques et composants antioxydants des feuilles de *M. azedarach* poussant à Béjaia. L'activité antioxydant est évaluée au moyen de divers tests (la réduction du fer, le piégeage du radical libre DPPH, chélation de fer ferreux, test du blanchiment du β -carotène et le test de thiocyanate Ferrique). Diverses recherches dans le monde mettent l'accent sur le potentiel antioxydant de diverses plantes dont *Melia azedarach*. Le principal objectif de ces investigations réside dans l'utilisation de substances naturelles pour la protection contre le stress oxydatif.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur les composés phénoliques

Les polyphénols ou composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement (**Bruneton, 1993**). A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolés et identifiés (**Mompon *et al.*, 1998**). Selon leurs caractéristiques structurales, ils se répartissent en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (**Hennebelle *et al.*, 2004**). Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 Da (**Harbone, 1993**).

Ils sont divisés en plusieurs catégories : anthocyanes, coumarines, lignanes, flavonoïdes, tannins, quinones, acides phénols, xanthones et autres phloroglucinols où les flavonoïdes représentent le groupe le plus commun et largement distribué (**Figure 1**). La grande diversité structurale des composés phénoliques rend difficile une présentation globale des méthodes qui permettent leur extraction et leur isolement, des processus mis en jeu au cours de leur biosynthèse, de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques (**Bruneton, 1993**).

Les polyphénols sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Les principales sources alimentaires sont les fruits et légumes, les boissons (vin rouge, thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs. Les fruits et légumes contribuent environ pour moitié à notre apport en polyphénols, les boissons telles que jus de fruits et surtout café, thé ou vin apportant le reste (**Middleton *et al.*, 2000**).

Les recherches des dix à quinze dernières années ont démontré que les composés phénoliques ne sont nullement des produits inertes du métabolisme. Ils subissent dans les tissus végétaux d'importantes variations quantitatives et qualitatives et interviennent dans de processus vitaux les plus divers. Le mode de leur action et sa signification physiologique ne sont pas encore toujours claires. Un rôle important est attribué aux phénols dans la résistance des plantes aux maladies, comme c'est le cas de la résistance du cotonnier à la maladie de flétrissement, la verticilliose. Le phénomène d'accumulation des substances phénoliques dans les tissus végétaux infectés ou dans les zones proximales est également observé à la suite de blessures causées par des facteurs mécaniques (**Brzowska *et al.*, 1973**) et dans le cas de carence en certains éléments minéraux comme l'azote et le soufre (**Loche, 1966**).

Des travaux plus anciens (**Nitsch et Nitsch, 1961; Alibert et al., 1977**) ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation organogène, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation. Les polyphénols sont aussi connus pour leurs effets protecteurs contre le rayonnement UV, l'effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs et pour leurs propriétés antifongiques et antibactériennes (**Heimeur et al., 2004**). Ils interviennent dans la qualité alimentaire des fruits en déterminant la saveur, nous citons : les flavanones sont responsables de l'amertume des *Cistus* et peuvent donner naissance par transformation chimique à des dihydrochalcones à saveur sucrée (**Dubois et al., 1977**), les anthocyanes, composés de couleur rouge à violet, participent à la coloration des fruits mûrs et les tannins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs.

A partir des années quatre-vingt, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt des polyphénols en particulier les flavonoïdes dont les propriétés antioxydantes sont très marquées.

2. Biosynthèse :

L'origine biosynthétique des composés phénoliques des végétaux est proche, tous dérivant de l'acide shikimique (**Figure 1**). Cette voie shikimate conduit à la formation des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acides benzoïques, acétophénones, lignanes et lignines, coumarines (**Bruneton, 1993**).

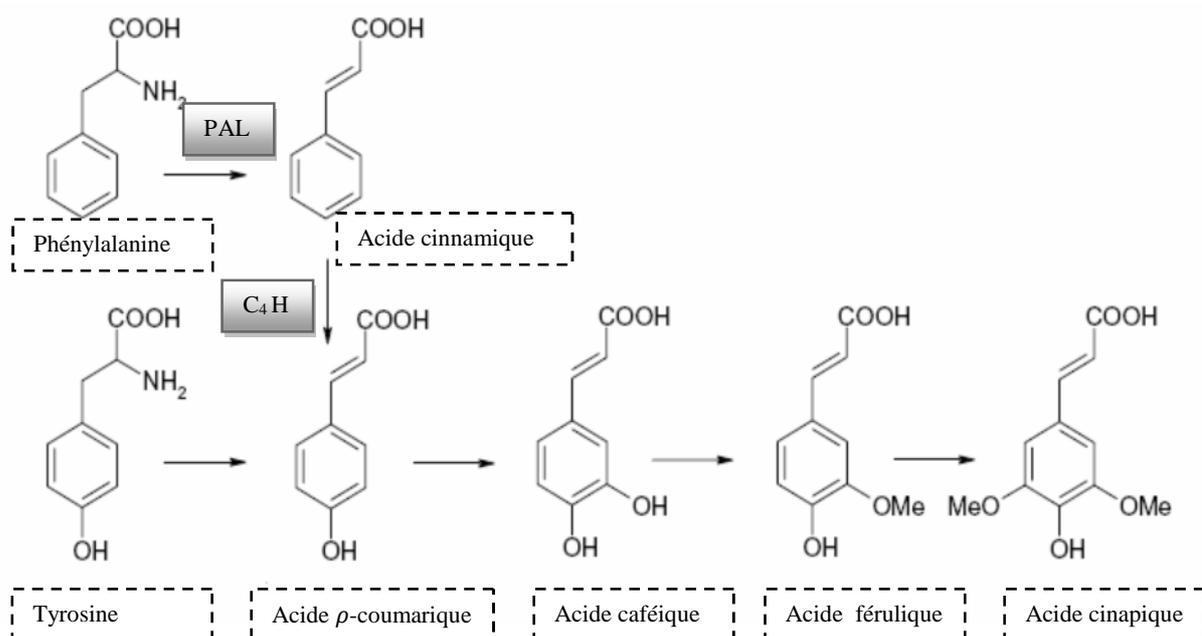


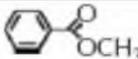
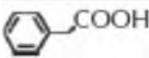
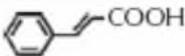
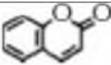
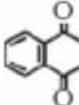
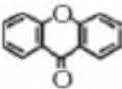
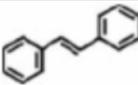
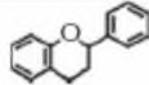
Figure 1 : Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie de shikimate (Crozier *et al.*, 2006).

PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; **C₄H** : cinnamate 4-hydroxylase.

3. Classes des polyphénols :

Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones (**Tableau I**). Ces molécules sont généralement trouvés conjugués aux sucres et les acides organiques.

Tableau I : Structure des squelettes des polyphénols (Crozier *et al.*, 2006).

Nombre d'atomes de carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C6-C1	Acides phénols	Acide gallique	
8	C6-C2	acétophénones	Gallacetophénone	
8	C6-C2	Acide phénylacétique	Acide <i>p</i> -Hydroxyphénylacétique	
9	C6-C3	Acides hydroxycinamiques	Acide <i>p</i> -coumarique	
9	C6-C3	Coumarines	Esculitine	
10	C6-C4	Naphthoquinones	Juglone	
13	C6-C1-C6	Xanthones	Mangiferine	
14	C6-C2-C6	Stilbènes	Resveratrol	
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes	Naringénine	

3.1. Flavonoïdes :

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont omniprésentes dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge et d'autres parties de la plante (Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006). Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques (Mukohata *et al.*, 1978), dans la régulation de gène et dans le métabolisme de croissance (Havsteen, 2002). Actuellement, environ de 4000 composés flavoniques sont connus (Edenharder et Grünhage, 2003) et ont tous le même squelette de base à quinze atomes de

carbones qui sont arrangés à une configuration C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane ce qui est synonyme avec la structure 2-phényle chromane (**Yao *et al.*, 2004**) (**Figures 2 et 3**).

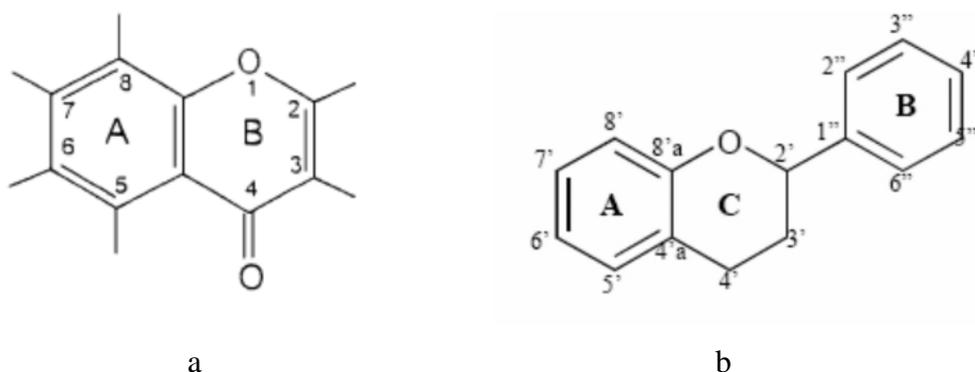


Figure 2 : Structure du 2-phényl chromane. **Figure 3 :** Structure générale des flavonoïdes.

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, de degré d'hydroxylation et de méthylation, de degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C c'est-à-dire la présence des doubles liaisons C2-C3, du groupe 3-O et la fonction 4-oxo (**Yao *et al.*, 2004 ; Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006**). En basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines, flavonoles, isoflavonoles, flavones, isoflavones, flavanes, isoflavanes, flavanols, isoflavanols, flavanones, isoflavanones et auronés (**Havsteen, 2002 ; Edenharder et Grünhage, 2003**) (**Figure 4**).

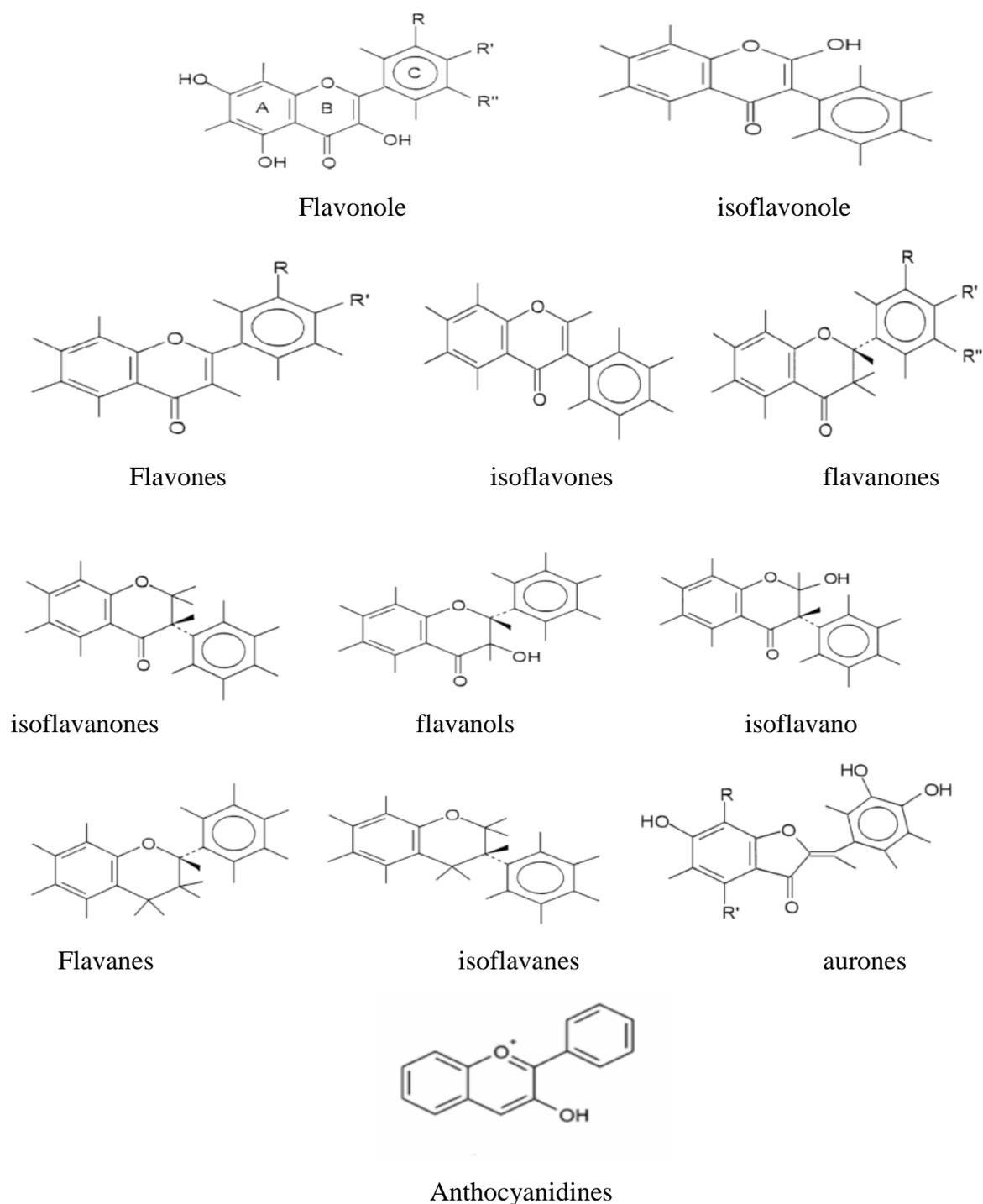


Figure 4 : Structures des squelettes de base des flavonoïdes (**Havsteen, 2002**)

3.2. Anthocyanosides :

Ce sont des pigments vacuolaires rouges, roses, mauves, pourpres, bleus ou violets de la plupart des fleurs et des fruits (**Bruneton, 1993**). Ils sont caractérisés par l'engagement de l'hydroxyle en position 3 dans une liaison hétérosidique (les anthocyanosides). Leurs génines (les anthocyanidols) sont des dérivés du cation 2-phényl-benzopyrylium plus communément

appelé cation flavylum. Ces pigments représentent des signaux visuels qui attirent les animaux pollinisateurs (insectes, oiseaux) (Brouillard et al., 1997 in Bahorum, 1997).

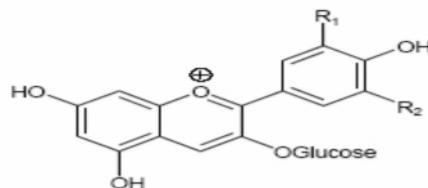


Figure 5 : Structure des anthocyanosides

3.3. Tannins

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présente, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (Haslam, 1996 ; Cowan, 1999). Les tannins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés 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 :

3.3.1. Tannins hydrolysables qui sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins soit l'acide ellagique dans le cas des tannins classiquement dénommés ellagitannins (Figure 6) (Bruneton, 1993 ; Cowan, 1999).

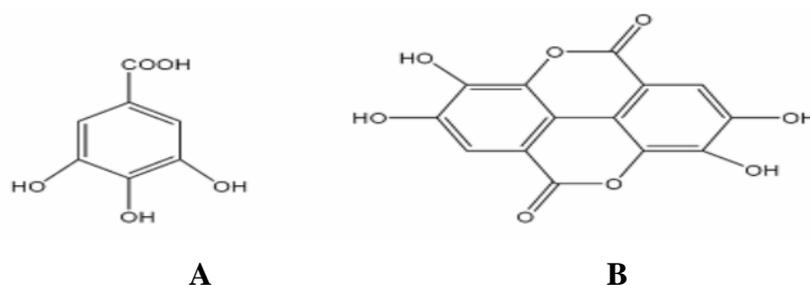


Figure 6 : Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B)

3.3.2. Tannins condensés ou tannins catechiques ou proanthocyanidols qui diffèrent fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. Les proanthocyanidols ont été isolés et identifiés dans tous les groupes végétaux, gymnospermes et fougères (Bruneton, 1999).

3.4. Phénols simples et les acides phénoliques

Le terme d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés des acides benzoïque et cinnamique.

3.4.1. Acide phénols dérivés de l'acide benzoïque : les acides phénols en C6-C1, dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinés à l'état d'esters ou d'hétérosides. L'acide gallique et son dimère (l'acide hexahydroxydiphénique) sont les éléments constitutifs des tannins hydrolysables. D'autres aldéhydes correspondants à ces acides, comme la vanilline, est très utilisé dans le secteur pharmaceutique (**Bruneton, 1993**).

3.4.2. Acide phénols dérivés de l'acide cinnamique : la plupart des acides phénols en C6-C3 (acides *p*-coumarique, caféique, férulique, sinapique) ont une distribution très large ; les autres (acides *o*-coumarique, *o*-férulique) sont peu fréquents (**Bruneton, 1993**). Les acides cinnamique et caféique sont des représentants communs du groupe de dérivés phénylpropaniques qui diffèrent par son degré d'hydroxylation et de méthylation (**Cowan, 1999**).

3.4.3. Phénols simples : tels que le catéchol, guaiacol, phloroglucinol... sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (Ericaceae, Rosaceae...). Les deux phénols hydroxylés, le catéchol avec deux groupes OH et le pyrogallol avec trois, ont été montré pour sa toxicité vis-à-vis des microorganismes (**Cowan, 1999**).

3.5. Coumarines :

Les coumarines qui sont aussi les dérivés de C6-C3, appartiennent au groupe des composés connus par des benzo- α -pyrone (**O'Kennedy et Thornes, 1997**) et toutes sont substituées en 7 par un hydroxyle. Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combiné avec des sucres. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique du foin (**Cowan, 1999**).

3.6. Quinones :

Ce sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques avec deux substitutions cétoniques. Elles sont caractérisées par un motif 1,4-dicéto cyclohexa-2,5-diéniq (para-quinones) ou, éventuellement, par un motif 1,2-dicéto cyclohexa-3,5-diéniq (ortho-quinones) (**Bruneton, 1993**). Elles sont ubiquitaires dans la nature, principalement dans le règne végétal et sont fortement réactifs (**Cowan, 1999**).

3.7. Stilbène :

Les membres de cette famille possèdent la structure C6-C2-C6 comme les flavonoïdes, ce sont des phytoalexines, composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux. Les sources principales des stilbènes sont les raisins, les vins, le soja et les arachides (**Crozier et al., 2006**).

3.8. Lignanes :

Ce sont des composés dont la formation implique la condensation d'unités phénylpropaniques (C6-C3). Leur distribution botanique est large, plusieurs centaines de composés ont été isolés dans environ soixante dix familles.

4. Propriétés biologiques des polyphénols :

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs divers propriétés physiologiques comme les activités antiallergique, anti-atherogénique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire (**Middleton et al., 2000 ; Ksouri et al., 2007**). Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes (**Nijveldt et al., 2001**).

Les effets bénéfiques **des polyphénols** intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire (**Leong et Shui, 2002**). D'après les études multiples attestant de l'impact positif de la consommation de polyphénols sur la santé et la prévention des maladies, les industriels commercialisent maintenant des aliments enrichis en polyphénols ou des suppléments alimentaires. De plus, leur activité antioxydante assure une meilleure conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidique. Dans l'industrie cosmétique, les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes dans la santé et la beauté de la peau. En phytothérapie, même si certaines indications sont communes à plusieurs classes (les

propriétés vasculoprotectrices, sont par exemple aussi bien attribuées aux flavonoïdes qu'aux anthocyanes, tanins et autres coumarines), chaque classe chimique semble être utilisée pour des bénéfices spécifiques (**Hennebelle et al., 2004**).

En ce qui concerne **les flavonoïdes**, ces composés peuvent empêcher les dommages oxydatifs par différents mécanismes d'actions : soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxyles et peroxydes (**Hodek et al., 2002**) ; soit par chélation des métaux (le fer et le cuivre) qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires ; soit l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres (**Van Acker et al., 1996 ; Benavente-Garcia et al., 1997**). Ils jouent un rôle très important dans le traitement du diabète (inhibant l'aldose réductase), de la goutte (inhibant la xanthine oxydase), des inflammations (inhibant la lipoxigénase, la phospholipase et la cyclooxygénase), des hépatites, des tumeurs, de l'hypertension (quercétine), des thromboses (flavonols), des allergies et des affections bactériennes et viraux (anti-HIV) (**Anderson et al., 1996 ; Cowan, 1999 ; Yao et al., 2004**). Mais, on attribue également aux flavonoïdes des propriétés neurosédatives, antispasmodiques, diurétiques, anti-oestrogènes (isoflavones), contre la sénescence cérébrale et ses conséquences telle l'altération de la mémoire et la confusion. D'autres part, les citroflavonoïdes (flavonoïdes provenant de divers *Citrus*) et le fragilité capillaire (insuffisance veino-lymphatique, crise hémorroïdaire) (**Hennebelle et al., 2004**).

Les anthocyanes sont également utilisés dans les troubles de la fragilité capillaire (vigne rouge, *Vitis vinifera* L.), mais aussi comme diurétiques, voire même antiseptiques urinaires. Leur plus grande spécificité reste cependant leur propriété d'améliorer la vision nocturne en facilitant la régénération du pourpre rétinien (myrtille, *Vaccinium myrtillus* L. ; cassis, *Ribes nigrum* L.) (**Hennebelle et al., 2004**). Présente comme des couleurs brillant dans les fruits et les légumes, les anthocyanidines ont montré leur effet inhibiteur de la croissance des lignées cellulaires humaines (**Zhang et al., 2005**).

Les tanins sont considérés comme des anti-nutriments grâce aux divers effets nuisibles à savoir la digestion réduite des aliments, la faible biodisponibilité des micronutriments et les dommages du foie (**Chung et al., 1998**). Ils sont dotés d'un certain pouvoir astringent, par lequel on explique leurs propriétés vasculoprotectrices, cicatrisantes et anti-diarrhéiques (chêne, *Quercus* spp.). Les proanthocyanidines dimères de l'aubépine (*Crataegus* spp.) seraient de bons sédatifs cardiaques (**Hennebelle et al., 2004**). Concernant le pouvoir antioxydant des tanins, cette propriété est très remarquable due à leurs noyaux phénols et la présence des groupes di- ou trihydroxyles sur le cycle B et les groupes méta 5, 7 dihydroxyles sur le cycle A. Les tanins catéchiques du thé vert : gallate d'épicatéchine,

gallate d'épigallocatechine et l'épicatéchine sont des puissants extracteurs des radicaux libres (**Rahman et al., 2006**), ils inhibent les ions Cu^{2+} qui catalysent l'oxydation des lipoprotéines dans les macrophages *in vitro* (**Yoshida et al., 1999**).

Les **coumarines** sont utilisées pour leurs propriétés vasculoprotectrices, neurosédatives, diurétiques, stomachiques et carminatives (**Hennebelle et al., 2004**). Ils ont la capacité de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes, et peroxydes. Ils préviennent également la peroxydation des lipides membranaires (**Anderson et al., 1996**).

Les **acides phénols et ces dérivés** sont considérés comme responsables de l'activité cholérétique de l'artichaut et les propriétés antipyrétiques et anti-inflammatoires des dérivés salicylés (**Hennebelle et al., 2004**). Les composés possédant les activités antioxydantes et antiradicalaires sont l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide chlorogénique (**Bossokpi, 2002**). Pour l'acide caféique, il se montre très efficace contre les virus, bactéries et champignons (**Cowan, 1999**). Alors, l'acide gallique a pour pouvoir de réduire la viabilité des cellules cancéreuse du poumon chez les souris *in vitro* et que la combinaison de cet acide avec les médicaments anticancéreux tels la cisplatine peut être un traitement efficace pour ce type de cancer (**Kawada et al., 2001 in Rangkadilok et al., 2007**). Il peut aussi prévenir les dommages oxydatifs d'ADN cellulaire à une faible concentration et exerce une forte activité antiproliférative tels que la quercétine sur les cellules humaines cancéreuses du colon et les cellules épithéliales du foie chez les rats normaux (**Lee et al., 2005**).

Certaines **quinones**, dérivant de l'antraquinone, sont des laxatifs stimulants. Elles sont rencontrées dans la bourdaine (*Rhamnus frangula* L.), les sénés (*Cassia* spp.) et les aloès (*Aloe* spp.). D'autres activités antidépressives (hypericin), anti-protozoaires, antivirales, antibactériennes, fongicides et antiallergiques ont été décrites et plusieurs molécules du groupe ont une toxicité non négligeable. (**Bruneton, 1993 ; Hennebelle et al., 2004**).

1. Généralités sur les radicaux libres et pouvoir antioxydant

Nos cellules et tissus peuvent être soumis à une grande variété d'agression physiques (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant, dû à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé, la production de radicaux dérivés de l'oxygène (**Walker et al., 1982**).

2. Différents types des radicaux libres

Un radical libre est une espèce caractérisée par une instabilité et /où un pouvoir oxydant fort, il se différencie par la présence d'un électron non apparié sur la couche électronique la plus externe. Parmi toutes les espèces réactives oxygénées (ERO), on distingue un ensemble restreint de ces composés qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appelons les **radicaux primaires** à savoir : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), le radical hydroxyle ($\cdot OH$), le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), le radical peroxyde (ROO^{\cdot}) et le radical alkoxyde (RO^{\cdot}).

Les autres radicaux libres, dits **radicaux secondaires** tels que l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le nitroperoxyde ($ONOOH$), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (**Favier, 2003**).

3. Origine de production des ERO :

Les radicaux libres nocifs sont produits dans l'organisme au cours du métabolisme normal. Cette production augmente en rapport avec l'élévation de la consommation d'oxygène (**Gauche et Hausswirth, 2006**). Plusieurs mécanismes et systèmes responsables de la production de radicaux libres ont été identifiés jusqu'à présent, parmi eux nous citons :

- des fuites d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie (**Aurausseau, 2002**) ;
- des processus inflammatoires produits par les cellules phagocytaires activées (**Milan, 2004 ; Van Antwerpen, 2006**) ;
- du système xanthine déshydrogénase/oxydase activé lors d'ischémie-reperfusion (**Lin et al., 2002 ; Valko et al., 2004 ; Valko et al., 2006**) ;
- d'exposition à des agressions de l'environnement, comme les agents infectieux, la pollution, les UV, la fumée de cigarette et le rayonnement (**Tamer, 2003**).

4. Dommages oxydatives des radicaux libres :

Les phénomènes radicalaires de base sont utiles au bon fonctionnement de l'organisme.

L'altération des composants cellulaires et des structures tissulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement et dépasse la quantité d'antioxydants disponibles. La conséquence de ce déséquilibre va entraîner une agression appelée « stress oxydatif » (**Rahman, 2002**). Tous les tissus et tous leurs composants peuvent être touchés : lipides, protéines, glucides et ADN (**Aurousseau, 2002 ; Valko et al., 2006**). Toutes ces altérations augmentent le risque de plusieurs maladies (**Aruoma, 1998**). Parmi les maladies, nous citons, l'Alzheimer (**Smith et al., 1996 ; Smith et al., 2004**), le Parkinson (**Bolton et al., 2000**), le Creutzfeldt Jacob et la méningo-céphalites (**Ali et al., 2008**), les maladies cardiovasculaires et déficience cardiaque (**Jha et al., 1995**), les oedèmes et vieillissement prématuré de la peau (**Georgetti et al., 2003**) et le cancer (**Ali et al., 2008**).

5. Moyens de défense contre les radicaux libres :

D'après **Halliwel (1994)**, un antioxydant est toute molécule endogène ou exogène présente en faible concentration qui est capable de prévenir, de retarder et de réduire l'ampleur de la destruction oxydante des biomolécules.

Les systèmes de lutte contre les ERO sont classés dans 3 catégories : la prévention à temps plein (la prévention passive), la détoxification active suite à une attaque oxydante et la détoxification passive (**Viroit, 2004**).

5.1. Prévention à plein temps :

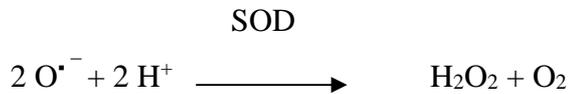
Ce type est un système qui agit en permanence pour but de prévenir la surproduction de radicaux libres de l'oxygène en inactivant les molécules endogènes (Fe, Cu) ou exogènes (quinone) susceptibles de les générer. Par exemple, la liaison de la transferrine (protéine chélatrice) avec deux atomes de fer ferrique par molécule à pH physiologique rend ce métal incapable d'être impliqué dans les mécanismes d'oxydoréduction générateurs de radicaux libres.

5.2. Détoxification active suite à une attaque oxydante :

Ce système de défense repose principalement sur 3 enzymes (**Valko et al., 2006**).

5.2.1. Super oxyde dismutase (SOD) :

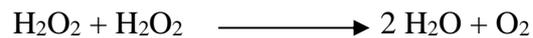
Super oxyde dismutase catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde hydrogène (H₂O₂) et en oxygène.



Chez l'être humain, il y a 3 isoformes des SOD à cofacteurs métallique (Cu, Zn-SOD, Mn-SOD) et sont localisés dans le cytoplasme et la mitochondrie (**Landis et Tower, 2005**).

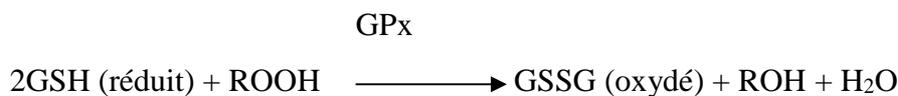
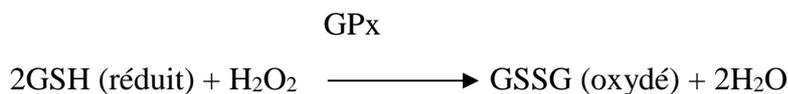
5.2.2. Catalase :

Cette enzyme est localisée essentiellement dans les peroxysomes (**Valko et al., 2006**). Elle permet de convertir deux molécules de H₂O₂ en H₂O et O₂.



5.2.3. Glutathion peroxydase:

Une enzyme à cofacteur de sélénium se localise dans le cytosol et la matrice mitochondriale. Elle a pour activité la dégradation des peroxydes organiques (ROOH) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (**Valko et al., 2006**).



5.3. Détoxification passive :

Elle permet la réduction des radicaux oxygénés qui ont pu passer les deux premières lignes de la défense. Elle incluse tous les antioxydants non enzymatiques capables de neutraliser seulement un radical libre par molécule tels que les vitamines C et E, les caroténoïdes, les composés phénoliques, les flavonoïdes, l'albumine, l'acide urique, les polyamines, l'acide lipoïque, etc.... (**Svoboda et Hampson, 1999 ; Valko et al., 2006**).

5.3.1. Vitamine E (tocophérol) :

Elle est considérée comme le principal antioxydant attaché à la membrane utilisé par la cellule pour inhiber la peroxydation lipidique (Pryor, 2000 ; Valko *et al.*, 2006). Durant la réaction antioxydante, le α -tocophérol est converti en radical α -tocophérol beaucoup plus stable en perdant un hydrogène arraché par une espèce radicalaire (radical peroxy).

5.3.2. Vitamine C (acide ascorbique) :

Ses propriétés antioxydantes sont attribuées à sa capacité d'être réduit en radical ascorbyle après la perte d'un électron ou d'un proton. Ce radical peut facilement s'oxyder en captant l'anion superoxyde et certaines espèces radicalaires (perhydroxyles et peroxyes) (Valko *et al.*, 2006, Van Antwerpen, 2006).

5.3.3. Caroténoïdes :

L'activité antioxydante de ces molécules repose principalement sur la présence de nombreuses doubles liaisons conjuguées au sein de leur structure (Mortensen *et al.*, 2001). Généralement, elles interagissent avec les radicaux libres (ROO^{\bullet} , R^{\bullet}) par 3 mécanismes, soit par l'abstraction d'hydrogène, transfert d'électron et addition du radical (El-Agamey *et al.*, 2004).

5.3.4. Acide lipoïque (acide 1,2-dithiolane-3-pentanoïque ; $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_2\text{S}_2$) :

Cet acide est aisément absorbé et converti rapidement dans de nombreux tissus à la forme réduite dithiol, l'acide dihydrolipoïque (Figure 7) (Smith *et al.*, 2004). Il joue un rôle important dans le piégeage des ERO, la régénération des antioxydants endogènes et exogènes tels que les vitamines C et E et le glutathion, la chélation des métaux Cu^{2+} et Fe^{2+} (Valko *et al.*, 2006).

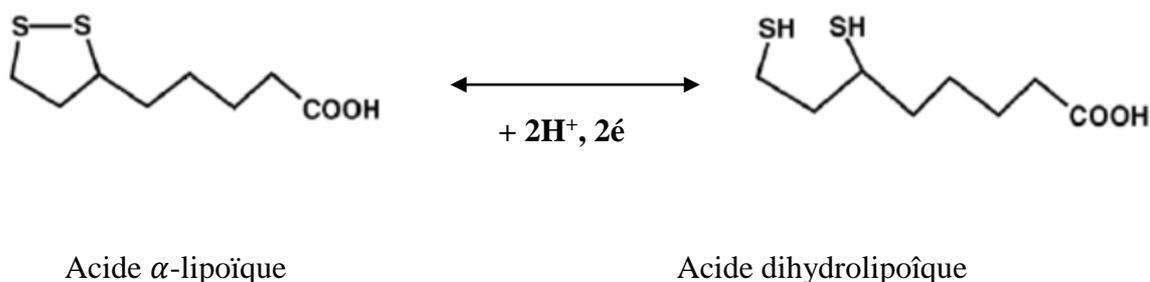


Figure 7 : Structure de l'acide lipoïque et l'acide dihydrolipoïque (Valko *et al.*, 2006)

5.3.5. Albumine :

Albumine se trouve en grande quantité dans le plasma qui possède une fonction thiol qui lui permet de jouer un rôle d'antioxydant puissant capable de fixer les différents métaux (Cu^{2+} , Fe^{3+} ...) et de prévenir leur effets oxydants (**Halliwell et Gutteridg, 1990**).

5.3.6. Composés phénoliques :

Ces substances sont très utilisées dans la médecine traditionnelle et moderne pour leurs activités antioxydantes (**Rice-Evans *et al.*, 1996 ; Kolesnikov et Gins, 2001**). Vue leurs propriétés redox élevées, les polyphénols agissent comme des agents réducteurs, donneur d'hydrogène en piégeant les radicaux libres et en chélatant les ions (**Rice-Evans *et al.*, 1995; Cook et Samman, 1996; Valko *et al.*, 2006**).

6. Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes *in vitro* :

Plusieurs méthodes sont disponibles pour mesurer l'activité antioxydante des aliments et les systèmes biologiques (**Ali *et al.*, 2008 ; Scherer et Godoy, 2009**). Elles peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes : soit par le transfert d'atome d'hydrogène, soit par le transfert d'un simple électron (**Sanchez-Moreno, 2002 ; Huang *et al.*, 2005**).

Les techniques du premier groupe sont employées pour évaluer la peroxydation lipidique en utilisant un substrat lipidique ou lipoprotéique. La quantification de cette propriété est exprimée par la mesure du degré d'inhibition de l'oxydation (**Sanchez-Moreno et Larrauri, 1998**).

Cependant, les méthodes du deuxième groupe sont celles qui interviennent dans la mesure de l'habilité du piégeage des radicaux libres. Elles comportent La réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), de l'acide hypochloreux (HOCl), de l'hydroxyle ($\cdot\text{OH}$), des anions superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$), du peroxyde (ROO^{\cdot}) et de l'oxyde nitrique (NO^{\cdot}) (**Sanchez-Moreno, 2002**).

Parmi ces techniques, nous citons :

- la méthode d'ORAC (Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène) (**Cao *et al.*, 1993**) ;
- la méthode d'ABTS (2,2-azinobis (3-éthyle-benzothiazoline-6-sulphonate) ou TEAC (Capacité antioxydante équivalente de Trolox) (**Miller *et al.*, 1993**) ;
- la méthode FRAP (Capacités réductrices ferriques d'antioxydants) (**Benzie et Strain, 1996**) ;
- la méthode du radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (**Brand-Williams *et al.*, 1995**) ;

- la méthode de DMPD (piégeage du radical cation N, N- dimethyl- ρ -phenylenediamine) (**Li et al., 1994**) ;
- la méthode TOSC (Capacité du piégeage des oxy-radicaux totaux) (**Winston et al., 1998**) ;
- la méthode TRAP (piégeage du radical pyroxyde) (**Wayner et al., 1985**) ;
- la méthode photochimiluminescence (PCL) (**Popov et al., 1987**) ;
- la méthode d'hémolyse (**Charfi, 1995**).

1. Propriétés botaniques

1.1. Généralités

Melia azedarach, connue sous le nom de chinaberry ou lilas de Perse est un arbre qui appartient à la famille des Méliacées, mondialement reconnue pour ses propriétés médicinales, insecticides et phytosanitaires (Huang et al., 1996; Alché et al., 2003; Al-Rubae 2009; Ntalli et al., 2010).

Cet arbre originaire du Nord-ouest d'Inde, a été introduit dans plusieurs pays de l'Asie, en Amérique du Nord, et en Amérique latine. Il a été utilisé en Jordanie comme plante ornementale pendant de nombreuses années. Il est abondant au Liban et d'autres pays méditerranéens ou il est principalement planté pour avoir de l'ombre (Jazzar et Hammad 2003).

Pour les indigènes indiens, il est connu depuis très longtemps, que les plantes de la famille des méliacées sont une bonne source de médicaments populaires. Ce fait a attiré l'attention de nombreux scientifiques à travers le monde pour étudier ces plantes et trouver un produit efficace et respectueux de l'environnement permettant de lutter contre les ravageurs et ou les maladies (Al-Rubae, 2009).

1.2 Nomenclature et classification

1.2.1 Classification botanique

La famille des Méliacées compte 51 genres et 550 espèces (Timbo, 2003). Selon (Azam et al., 2013), *Melia azedarach* est classé selon le tableau II.

Tableau II : La classification de *Melia azedarach* (Azam et al., 2013)

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Sapindales
Famille	Meliaceae
Genre	Melia
Espèce	<i>Melia azedarach</i>

1.2.2 Nomenclature

Melia azedarach, appelé « chinaberry » possède plusieurs noms vernaculaires (tableau III) selon les régions géographiques.

Tableau III: Quelques noms vernaculaires pour *Melia azedarach*

Situation géographique	Nom vernaculaires	Références
Angleterre	Persian lilac or China tree, Chinaberry, China tree	Rishi et Singh., 2003; Yogender et al., 2009; Lungu et al., 2011 ; Deepika Sharma et Yash Paul, 2013.
France	Fleurs lilas, Lilas des indes, Lilas de chine, Lilas de perse, Paraiso, Margoiser	
Amérique du sud US	Paraiso ou paradise Lila des Indes ou cèdre blanc	
Inde	Bakana Nimb, Bakain, Ramyaka	
Singapore	Lelaila, Aleli, Pasilla, Violeta,	
Malaisie	Mindi kechil, Persischer zedrachbaurn,	
Allemagne	Chiwesischer holunder, Poteronosterbaurn, Paradiesbaurn, Persischer fleider	
Brésil	Cinarnorno	
Chine	Ku /ian	
Argentine	Giant paradise	
Afrique de sud	syringa tree	

1.2.3 Etymologie

Faye en 2010 rapporte dans sa thèse que selon les arguments développés par **Watt (1889)**, les Perses étaient bien familiers d'un arbre : *Melia azedarach*, communément connu sous le nom de Chinaberry (Baie de Chine), mais appelé en perse "Azadirakhat" ; "Aza" signifie "amer" et "drakhat" signifie "arbre". Ainsi le nom de *Melia azedarach* (azadirakhat) devient en perse "l'arbre amer".

Selon **Al-Rubae (2009)**, le nom *Melia azedarach* ; *Melia*. Nom grec : manna ≡ frêne, se réfère à la ressemblance de ses feuilles avec celles du frêne. *Azedarach*, du persan : azad ≡ noble et darch ≡ arbre ; arbre noble

1.3. Origine et répartition géographique

Plusieurs données bibliographiques évoquent l'origine géographique de *Melia azedarach* (**Carpinella et al., 2003 ; Honglei et al., 2004 ; Senthil 2006; Al-Rubae 2009**). C'est une plante originaire de l'Asie tropicale, plus précisément du Nord-Ouest de l'Inde : Himalaya, Cachemire, etc. Mais elle pousse également dans les régions méditerranéennes,

européennes, dans toute l'Asie, l'Amérique du sud, l'Australie, en Afrique et dans les Mascareignes (**Hajaniaina, 1996 ; Huang et al., 1996 ; Al-Rubae 2009**). Cet arbre est très répandu en Argentine, utilisé pour le bois et à des fins ornementales (**Carpinella et al., 2003**).

Les travaux menés par **Hammad et al. (2001)** rapportent que *M. azedarach* se trouve dans presque toutes les régions climatiques chaudes. Elle est généralement propagée par des graines et des boutures, et peut également être multipliée in vitro à partir de différents explants de jeunes plants et plantes matures (**Marino et al., 2009**). En Afrique, l'arbre est planté comme plante ornementale et d'ombrage résistant à la sécheresse. Il est aussi largement distribué dans les régions arides du sud et de l'ouest des États-Unis, en Espagne, et dans la province de Lleida. Il est présent dans de nombreuses villes comme arbre d'ornement dans les jardins, les parcs et les rues (**Juan et al., 2000**).

De cette très large répartition géographique découle une vingtaine d'appellations à travers le monde.

1.4. Caractéristiques morphologiques

Melia azedarach, est une espèce d'arbre à feuilles caduques et persistantes, cultivées dans les différentes parties des sous-continentes indiens. Généralement, l'arbre mesure 8 à 15 m de hauteur, mais il peut atteindre jusqu'à 30 m et de 30 à 60 cm de diamètre. Il est aussi caractérisé par son tronc sombre très rameux, une écorce craquelée et blanche claire avec les cicatrices apparentes sur les feuilles, lui donnant son aspect noueux.

Cet arbre se reconnaît facilement par son feuillage léger, en buisson d'un beau vert, contrastant avec le tronc. La densité du feuillage à l'extrémité des rameaux est due à sa disposition en spires serrées (Fig. B). Les feuilles sont caduques surtout au moment de la maturation des fruits. La floraison a lieu au mois de septembre-novembre (avant la saison des pluies), et la fructification, de novembre à mars (**Hajaniaina, 1996**). L'installation est caractérisée par la présence d'une cime étalée, vert, dense et sombre. Son écorce est sombre, de couleur brune, relativement lisse, et fissurée. Les feuilles sont alternes, des dépliantes sont à court traquées et mince, chauve, vert foncé et relativement pâle. Les fleurs (Fig8-C) sont blanches avec rayures pourpres et sont caractérisées par la présence d'un parfum typique. Fruits ou baies sont jaunes, ronds, lisses et charnus. Les fruits secs contiennent 4 à 5 graines (Fig8-D) (**Ramya et al., 2009**).

La maturation a lieu à partir du mois de février jusqu'au mois de mai. Les fruits mûrs peuvent rester longtemps sur l'arbre. Ils sont globuleux comme de petites boucles ocre portées par des grappes pendantes (Fig 8-D). Ce fruit est une drupe jaune suspendue sur l'arbre tout l'hiver en devenant de plus en plus ridée et presque blanche. Le noyau de la drupe est blanc et

strié dans le sens de la longueur, il contient quatre petites graines ressemblant à des grains de riz noir. Les graines de *Melia* contiennent approximativement 40 % d'huile (Schmutterer, 1995).



(A) Tige de *Melia azedarach*



(B) Feuilles de *Melia azedarach*



(C) Fleurs de *Melia azedarach*



(D) Fruits de *Melia azedarach*

Figure 8 : les photos de *Melia azedarach* ; (A) la tige, (B) feuilles, (C) fleurs et (D) fruits (Deepika Sharma et Yash Paul, 2013)

2. Composition chimique

2.1. Composition physico-chimiques globales

D'après Chiffelle *et al.* (2009), le contenu des feuilles en cendres, protéines et en fibres crues n'ont pas montré des différences dans les étapes du développement. Il y avait une diminution du contenu de lipide près de 60% du stade juvénile à l'étape mûre (**tableau IV**).

Tableau IV: Analyses chimiques (moyen \pm écarte type) des feuilles de *Melia azedarach* selon l'étape de maturité (Chiffelle et al., 2009).

Analyses (%)	Feuille	
	Juvenile	Mûre
Cendres	13.14 \pm 0.02	11.92 \pm 0.47
Protéines	6.60 \pm 0.32	6.10 \pm 0.28
Lipides	2.80 \pm 0.08	1.08 \pm 0.10
Fibres crues	10.94 \pm 0.33	10.33 \pm 0.39
NNE	66.52 \pm 0.75	70.57 \pm 1.24

NNE: extractif de non- nitrogène.

2.2. Teneurs en composés phénoliques

Daprs Aoudia et al. (2013), l'HPLC a été employée pour déterminer les composants d'extraits éthanoliques (50%) et aqueux de feuilles de *Melia azedarach*. L'analyse a indiqué la présence de 34 composés polyphénoliques comportant 16 composés non identifiés, 7 dérivés acide chlorogénique, 2 dérivés quercétine, 3 dérivés acide p-coumarique et 2 dérivés kaempferol-conjuguée. Trois composés de ce dernier non identifié et un quercétine-conjugué n'ont pas été détectés dans les extraits à l'éthanol 50% et aqueux des feuilles respectivement. Les résultats récapitulés (tableau V) ont montré que les différences significatives en composition entre les extraits de feuilles à l'éthanol (50%) et aqueux, et des différences mineures entre des extraits dégraissés et non dégraissés.

Tableau V: L'analyse par HPLC des extraits ethanologiques (50%) et aqueux des feuilles de *Melia azedarach* en mg/g MS (Aoudia et al., 2013)

Concentration des composées mg/g de MS	ETOH (extrait éthanologique)		H ₂ O (extrait aqueux)	
	Non dégraissé	Dégraissé	Non dégraissé	Dégraissé
Acide chlorogénique-C	2.67	3.38	5.56	4.98
Acide p-Coumarique-C	0.52	0.59	0.92	0.79
Gentisique-C	0.06	0.03	0.07	0.06
Kaempferol-C	2.37	2.63	1.85	1.77
Quercétine-C	12.09	13.31	7.02	7.37
Acide chlorogénique	0.27	0.45	0.30	0.35
Kaempferol-3-O-β-rutinoside	1.61	1.77	1.10	1.07
Quercétin- 3-O- β-D-glucoside	0.23	0.24	0.11	0.11
Rutine	9.11	9.90	4.67	5.17

C-représente les conjugués (ou le groupe de polyphénol)

La composition chimique de *M. azedarach* est complexe. Sa composition chimique principale est un mélange de 3 à 4 principaux composés apparentés et plus de 20 autres présents en plus petites quantités mais complètement utilisables. Ces composés sont principalement les triterpènes avec la plus efficace : « limonoïdes », abondantes dans son huile. Au moins, neuf limonoïdes sont efficaces dans l'inhibition de la croissance des insectes, en particulier, une partie de la plupart des variétés mortelle nocive pour la santé humaine et l'agriculture. Parmi ces limonoïdes, l'azadirachtin a été trouvé pour être l'ingrédient principal pour combattre les insectes et les parasites, efficace à 90%. Il repousse et perturbe le cycle de la vie, mais ne tue pas immédiatement, mais est néanmoins l'un des plus efficace pour la croissance et de dissuasion d'alimentation jamais examinés. Meliantriol est un autre inhibiteur d'alimentation qui empêche les dommages causés par les Criquets, et il a donc été traditionnellement utilisé pour la protection des cultures. Aussi nimbin et nimbidin se trouvent dans neem, ils ont des propriétés anti-virales et anti-fongiques, utiles pour les humains et les animaux. Gédunine, un limonoïde mineur, est efficace dans le traitement du paludisme en infusion de ses feuilles (Mugnai, 2009).

2.3. Composition en d'autres métabolites secondaires

Ahmed *et al.* (2008) ont rapporté le criblage phytochimiques préliminaire des extraits de feuilles éthanoliques de *Melia azedarach*, a montré la présence d'alcaloïdes, les saponines, etc... (tableau VII).

Deux nouveaux triterpénoïdes et un nouveau stérol avec six autres constituants déjà connus ont été isolés des feuilles et des branchettes de *Melia azedarach*. Leurs structures chimiques ont été élucidées à partir de l'analyse à RMN (Zhang *et al.*, 2014).

Alché *et al.* (2003) ont rapporté l'isolement d'un limonoïde à partir d'extrait de feuilles de *Melia azedarach* qui est le 1-cinnamoyl-3,11-dihydroxymeliacarpine.

Selon Wu *et al.* (2009) l'extrait éthanolique des feuilles de *Melia azedarach* chinoise a été successivement soumis à la chromatographie sur colonne au-dessus de gel de silice, MCI-gel-Sephadex LH-20, et HPLC semipréparative pour avoir les moyens de six stéroïdes (figure 9). Comparer leurs données avec spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire, aussi bien que leurs propriétés physiques, avec ceux rapporté dans la littérature, les stéroïdes connues ont été identifiées comme 5-stigmastène-3 β ,7 α , 20-triol (4) et 5-stigmastène-3 β ,7 α -diol (Zhao *et al.*, 2005) et 2 α , 3 α , 16 β -trihydroxy-5 α -pregnane 20 R-méthacrylate (6) (Nakatani *et al.*, 1985).

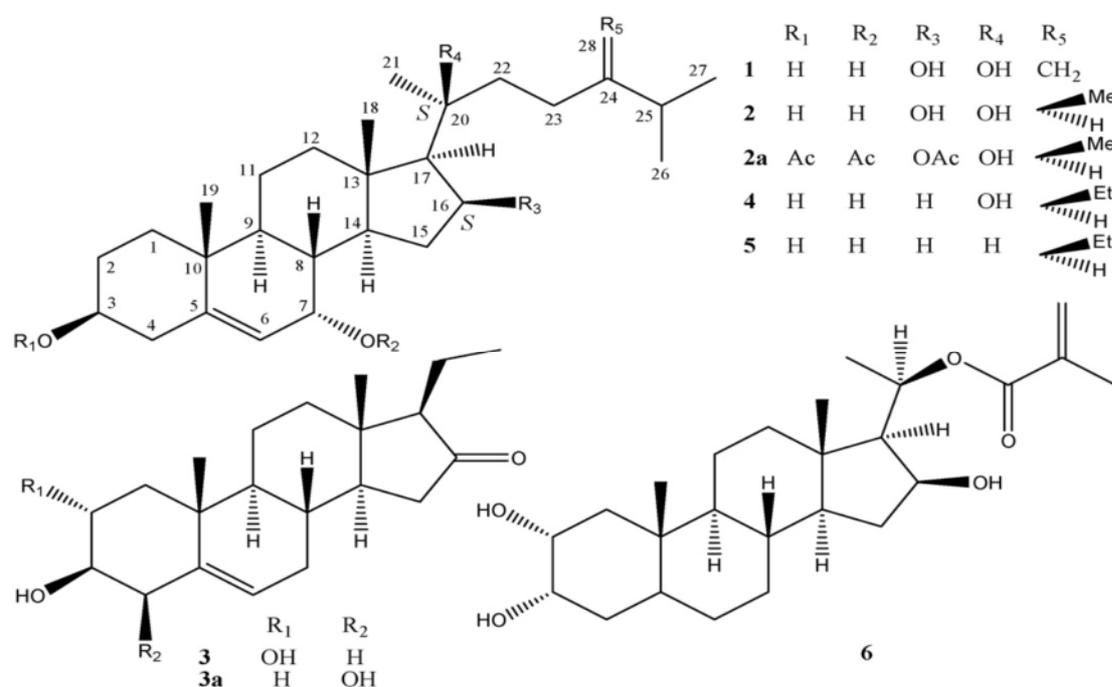


Figure 9. Structures chimiques des composés 1 –6

Tableau VI : Analyses phytochimiques d'extrait à l'éthanol de *Melia azedarach* (**Ahmed et al., 2008**).

Phytochimiques tests	Résultats
Alcaloïdes	+
Stéroïdes	+
Saponines	+
Terpènes	+

+ = indique la présence de composé

3. Intérêts et propriétés biologiques

3.1. Utilisations traditionnelles

Melia azedarach (faux neem) est connu depuis des siècles pour ses nombreuses vertus curatives. Baptisé parfois arbre aux merveilles ou arbre pharmacie du village, le faux neem contient de nombreuses substances ayant des activités anti-inflammatoires, antibactériennes ou immunostimulantes (**Allamed et al., 2001**). Plusieurs écrits font référence aux effets bénéfiques de ses fruits, de ses graines, de son huile, de ses feuilles, de ses racines ou de son écorce. Chacun d'eux est utilisé depuis des siècles par la médecine ayurvédique pour traiter divers problèmes de santé (**Chopra et al., 1952**). Divers utilisations traditionnelles de *Melia azedarach* sont mentionnées dans le **Tableau VII**.

Tableau VII: Remèdes folkloriques et utilisations traditionnelles de *Melia azedarach* (Azam et al., 2013)

Parties utilisées	Utilisations	Méthode	Références
Feuille	Lèpre, scrofule, antihelminthique, antilithique, diurétique, deobstruent, résolutif, insecticide, brûlures, malaria (paludisme), gingivite, pyrexie, variole de poulet, variole et les verrues, éliminent des toxines, épurent le sang et empêchent des dommages provoqués par les radicaux libres, enroulements de moustique.	Extrait frais	Ramya et al. (2009) Mugnai (2009) Rastogi et Mehrotra (1991) Rastogi et Mehrotra (1993) Rastogi (1998)
Racine	Résolvent, deobstruent, antiseptiques, les maladies antimicrobiennes et inflammatoires.		
Graine	Rhumatisme, antihelminthique, antileprotique, antipoison, enroulements de moustique.		
Huile de graines	Antiseptique pour des blessures et des ulcères, rhumatisme et maladies de la peau telles que la teigne tonsurante et gale, fièvre de malaria et lèpre, antibactérien, dépression du système nerveux central, analgésique doux, aromathérapie.		
Fruit	Insecticide, diabète, purgative, antihémorroïde et antihelminthique.	La poudre en poussière	Khan et al. (2002)
Bois et écorce	Insecticide	Extrait brut	Ismail et al. (2010)
Écorce de tige	Anticancéreux, antispasmodique, antiviral, blennorragie, fatigue, toux, fièvre, perte d'appétit, infestations des vers, blessure, vomissement, maladies de peau.		
Fleur	Toux, astringent, antihelminthique.		
Jeune Branche	Les maladies des dents	Brossage	

3.2. Utilisations pharmaceutiques

Selon **Ben Ghnaya et al. (2013)**, *Melia azedarach* est une plante médicinale, présentant essentiellement un intérêt pharmaceutique. Elle contient plusieurs substances qui sont naturellement insecticides (**Hadjiakhoondi et al., 2006**). L'extrait méthanolique est anti-pyrétique, analgésique, anti-inflammatoire, avec une capacité à inhiber l'agrégation des plaquettes (**Subapirya et Nagini, 2005**). L'extrait aqueux est modérément anti-infectieux, anti-inflammatoire et anti-ulcéreux gastrique, l'extrait hydroalcoolique serait modérément diurétique (**Silva et al., 2007**) et les feuilles auraient une action spermicide (**Priscila et al., 2009**).

L'huile de *Melia azedarach* possède également des propriétés purgative, anti-helminthique, anti-parasitaire externe (pou), anti-mycosique et anti-diabétique (**Silva et al., 2007**). Elle contiendrait des composés anti-viraux (certains actifs sur le virus du sida) et antipaludéens (**Subapirya et Nagini, 2005**). L'extrait hydroalcoolique ainsi que l'huile de faux neem présentent également des activités antifongiques et antibactériennes. Particulièrement, les extraits de feuilles et l'huile de faux neem ont montré leur efficacité contre certains champignons qui infectent l'organisme humain.

Selon **Azam et al. (2013)**, les études expérimentales et cliniques prouvent qu'elle possède des propriétés anti-oxydantes, anti-microbiennes, anti-inflammatoires, cardio-protecteurs, analgésiques, anti-cancéreuses, anti-ulcères, antipyrétiques, anti-plasmodiales et contraceptives masculines propriétés et bien d'autres activités qui sont résumés dans le **tableau VIII**.

Tableau VIII : Activités pharmaceutiques de *Melia azedarach* (Al-rubae, 2009)

Activités médicinales	Organisme ou maladie	Extraits	Références
Antibactérienne	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Shigella flexeneri</i> , <i>Plesimonas shigellidis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	F	Abdul Viqar et al. (2008)
Antivirale	Fièvre aphteuse Herpes simplex, (VSV), (HSV)(VSV), (HSV1) Herpes Oculaire simplex, (HSV1)	F F F F	Wachsman et al. (2008) Wachsman et al. (1982) Alche et al. (2002) Pifarri et al. (2002)
Antiprotozoaire	<i>Trichomonas vaginalis</i>	G,F	Lee et al. (2007)
Antinephrolihiasis	Ethylene glycol-Induced Nephrolthiasis	F,G	Christina et al. (2006)
Antiulcéreuse	Ulcer d'estomac chez les rats	F,G	Oursi et al. (1984)
Anti helminthique	<i>Haemonchus contortus</i>	F,G	Maciel et al. (2006) Akhtar et al. (2008)

F= Feuille, G= Graine

3.3. Potentiel antibactérien

Selon **Chebaibi et al. (2007)**, l'émergence de microorganismes pathogènes multirésistants, due à l'usage abusif et inapproprié d'antibiotiques, pose actuellement un problème de santé publique particulièrement préoccupant. En effet, la résistance des bactéries aux antibiotiques rend quelque fois le traitement thérapeutique inefficace, et met le praticien dans des situations délicates, surtout lorsque la vie du malade est en jeu. La solution de ce problème s'avère donc urgente et impose la recherche de nouveaux agents antimicrobiens. Le recours aux plantes médicinales aux propriétés antimicrobiennes constitue alors une des plus intéressantes pistes à explorer, parmi ses plantes on trouve *Melia azedarach*.

D'après **Saleem et al. (2008)**, des extraits méthanoliques de fleur de *Melia azedarach* ont été préparés et employés sous forme d'une crème pour traiter les infections bactériennes de la peau chez les enfants, et les résultats ont prouvé que cette crème était un traitement

sensiblement efficace dans plusieurs cas. Les extraits de fleurs de *Melia* ont montré leur potentiel en traitant des lapins souffrant d'une infection dermique produite par *Staphylococcus aureus*. Les effets curatifs de la crème préparée ont été trouvés comparables à la néomycine connue comme médicament (Saleem et al., 2002).

Asadujjaman et al. (2013) ont décrit que l'extrait éthanolique de feuilles de *Melia azedarach* a montré une activité antibactérienne contre toutes les souches bactériennes testées avec des zones d'inhibitions qui s'étendant de 8,40 mm à 10,39 mm et 11,56 mm à 15,87 mm pour 250 µg / disque et 500 µg/disque de l'extrait respectivement (Tableau IX). Cette activité peut être due à la présence des alcaloïdes, flavonoïdes, glycosides, saponines et tannins trouvées dans l'extrait éthanolique des feuilles.

Tableau IX : L'activité antibactérienne de feuilles de *Melia azedarach* par l'essai de diffusion sur disque

Souche bactérienne	Type de bactérie	de diamètre de la zone d'inhibition (mm)			
		Blanc	A	B	C
<i>Escherichia coli</i>	Gram (-)	-	24,65	10,39	15,87
<i>Salmonella typhi</i>	Gram (-)	-	23,30	8,54	12,15
<i>Shigella dysenteriae</i>	Gram (-)	-	22,12	8,40	11,56
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram (+)	-	22,15	9,45	14,05
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Gram (+)	-	24,34	9,21	12,55

A: Ciprofloxacin (5 µg/disque), B: Extrait (250 µg/disque), C: Extrait (500 µg/disque)

3.4. Potentiel antifongique

Carpinella et al. (2003) ont montré que les extraits hexaniques et éthanoliques du fruit, amandes et des feuilles sénescents de *M. azedarach*, expriment une activité fongistatique contre *Aspergillus flavus*, *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionales*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium verticillioides*, et *Sclerotinia sclerotiorum*. Que ce soit l'extrait hexanique des feuilles ou l'extrait éthanolique d'amande tous les deux s'avèrent très efficace sur toutes les souches fongiques testées avec des valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI) qui s'étendent de 0,5 à 25 mg/ml et 0,5 à 5 mg/ml.

3.5. Potentiel Insecticide

Les énormes potentialités de *Melia azedarach* pour le contrôle et la lutte contre les insectes ravageurs ne sont devenues claires que récemment, en particulier en réponse au problème posé par la bioaccumulation et la toxicité des pesticides de synthèse utilisés pour l'agriculture. Les plantes de la famille des Méliacées ont suscité beaucoup d'intérêts pour l'exploration de leur activité insecticide (**Timbo, 2003**). Elles sont connues pour contenir une variété de composés, lesquels ont montré des propriétés insecticides, anti-appétantes, anti-nutritionnelles, de régulation de la croissance, et de modification du développement (**D'Ambrosio et Guerriero, 2002; AL-Rubae, 2009**).

L'activité d'insecticide du *Melia l'azedarach* est dû aux triterpénoïdes biologiquement actifs avec un effet antiappétante, c.-à-d., ils empêchent l'alimentation des insectes de phytophage en produisant la mort et la malformations des générations suivantes (**Vergara et al., 1997; Carpinella et al., 2003**).

Beaucoup des triterpénoïdes present dans les plantes appartenant à la famille des Méliacées sont décrits pour montrer une activité insecticide. **Bohnenstengal et al. (1999)** rapportent l'isolation de trois meliacarpine dérivées des feuilles de *Melia azedarach*, l'activité des dérivés ont été examinés sur les larves de parasite d'insecte polyphagique de *Spodoptera littoralis* en l'incorporant dans leur régime artificiel dans un essai biologique d'alimentation chronique. Les résultats ont indiqué l'activité insecticide comparable au lipopesticide d'azadarachtine qui a été trouvé dans l'arbre de neem bien connu. L'extrait brut ethanologique de graine de *Melia azedarach* Bazilian a montré les deux activités inhibition phagocytaire et anti-mue d'insectes de *Rhodnius prolixus* vecteurs de la maladie de chagas.

Selon **AL-Rubae (2009)**, l'analyse phytochimique d'extraits ethanologiques de *Melia azedarach*, a révélé la présence de triterpénoïdes et stéroïdes respectivement, et les deux, graines et feuilles ont également présenté des alcaloïdes et des tannins condensés. Ces composés sont capables d'inhiber le développement ou l'alimentation des insectes et ils montrent aussi une activité ovicide. Divers effets pesticides sont résumés dans le **tableau X** suivant.

Tableau X: Potentialité pesticide de *Melia azedarach* (Al-rubae, 2009)

Activités pesticides	Les ravageurs ciblés	Extraits	Références
Larvicide et Anti ponte	<i>Aedes aegypti</i>	Fr, Fr	Carolina <i>et al.</i> (2008) ; Carolina <i>et al.</i> (2004) ; Coria <i>et al.</i> (2008) ; Correges (1994) ; Omena (2007) ; Wondscheer, <i>et al.</i> (2004).
Larvicide, Pubicidal, Anti ponte, Dissuasion de morsure	<i>Anopheles stephensi</i>	G	Nathan <i>et al.</i> (2006)
Larvicide	<i>Spodoptera littoralis</i>	F	Bohnenstengel <i>et al.</i> (1999)
Inhibition phagocytaire, Anti-mue	<i>Rhodinis prolixus</i>	G	Kelecom <i>et al.</i> (1996)
Larvicide Anti ponte, anti embryogénèse	<i>Boophilus microplus</i>	Fr	Borges <i>et al.</i> (2003), Williams (1993), Mansingh <i>et Williams</i> (1998).
Pédiculicide et ovicide	<i>Pediculus humanus capitis</i>	Fr	Caprinella <i>et al.</i> (2003-2007)
Biopesticide	<i>Bamisia tabaci</i>	Fr,F	Abou-Fakhr <i>et al.</i> (2001), Falectos <i>et al.</i> (1993), Kraus <i>et al.</i> (1987)
Anticholinesterase	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Fr	Breuer <i>et al.</i> (2003)
Larvicide	<i>Busseola fuscala</i>	G, F	Gebre <i>et Azerfegne</i> (1999)
Anti ponte, Anti éclosion	<i>Erias vitella</i>	G	Gajmer <i>et al.</i> (2001)
Antiappétante	<i>Pseudaletia unipunctata</i> <i>Trachiaplusia ni</i> <i>Spodoptera eridania</i>	G G Fr	Akhtar <i>et al.</i> (2008) Carpinella <i>et al.</i> (2002)
Anti ponte, Antiappétante	<i>Orseolia oryzae</i> <i>Mythimna separata</i>	G G	Chiu <i>et al.</i> (1984)
Antiappétant	<i>Plutella xylostells</i>	Fr	Charlestone <i>et al.</i> (2005)
Biopesticide	<i>Panonychus citri</i> <i>Aleurocanthus spiniferus</i>	G G	Chiu (1989)
Rodenticide	Albino rat	G F	Roop <i>et al.</i> (2005), Keshri <i>et al.</i> (2003), Keshri <i>et al.</i> (2004)
Fongicide	<i>Aspergillus flavus</i> <i>fusarium monitiform</i> <i>Microsporium cans</i> <i>Diaporthe phseolorum</i> <i>Schlertina sclertiorum</i>	G	Carpinella <i>et al.</i> (1999-2003-2005)

F= Feuille, Fr= Fruit, G= Graine

3.6. Potentiel antioxydant

D'après **Ahmed et al. (2008)**, l'activité antioxydante de *Melia azedarach* a été étudiée chez les rats avec les dommages érythrocytes induit par éthanol. L'administration chronique de l'éthanol (20% w/v, 2 g/kg quotidiennement pendant quatre semaines) a augmenté le niveau de la peroxydation de lipide (LPO), diminué l'activité de la superoxyde dismutase (SOD), de la catalase et réduit la teneur du glutathion (GSH) (**tableau XI**). Le traitement concourant des rats administrés d'éthanol avec l'extrait alcoolique des feuilles de *Melia azedarach* a une activité antioxydante in vivo efficace et son l'effet était comparé à celui des vitamines E et C. L'extrait à base de cette plante peut être aussi employé pour protéger le tissu contre le stress oxydatif induit par les drogues ou médicaments.

Tableau XI: Effet d'extrait éthanolique de *Melia azedarach* sur l'effort oxydant chez les rats (**Ahmed et al., 2008**)

Traitements	Peroxydation de lipide nm DA /g HB	Glutathion μ m conjugué DTNB/ g HB	Superoxyde dismutase unité/mg protéine	Catalase unité/mg protéine
Témoin	70.1 \pm 1.29	4.42 \pm 0.17	29.34 \pm 1.36	287.17 \pm 3.57
Ethanol	169.93 \pm 1.49	2.51 \pm 0.19	16.41 \pm 0.54	191 \pm 2.50
Ethanol + <i>Melia azedarach</i>	70.51 \pm 2.72	4.32 \pm 0.53	19.53 \pm 2.44	233.68 \pm 2.82
Ethanol + Vitamine E et C	98.19 \pm 2.63	4.48 \pm 0.26	20.02 \pm 1.39	251.95 \pm 2.69
<i>Melia azedarach</i>	63.20 \pm 2.83	4.68 \pm 0.27	29.63 \pm 1.07	279.42 \pm 1.11
Vitamines E et C	68.97 \pm 3.29	4.76 \pm 0.22	30.89 \pm 0.81	279.28 \pm 2.35

Nahak et Sahu (2010) ont rapporté que les composés phénoliques possèdent des activités antioxydantes remarquables qui sont présents tout à fait couramment dans la famille des plantes Meliaceae. Selon leurs résultats l'activité antioxydante des extraits d'*Azadirachta indica* et de *Melia azedarach* augmentent avec l'augmentation de la teneur en polyphénols de l'extrait et que l'extrait éthanolique de feuilles de *Melia azedarach* a révélé l'activité antioxydante la plus élevée de piégeage des radicaux libre par le DPPH avec 68,23 \pm 0,03 %

suivi de son extrait aqueux à $64,34 \pm 0,04$ % et extrait méthanolique à $64,34 \pm 0,05$ % (tableauXII).

Tableau XII: l'activité antioxydant de différents extraits de *Melia azedarach* (Nahak et Sahu, 2010)

Concentration des extraits (mg/ml)	Activité antioxydante (%) Extrait aqueux		Activité antioxydante (%) Extrait méthanolique		Activité antioxydante (%) Extrait éthanolique	
	Azadirachta	Melia	Azadirachta	Melia	Azadirachta	Melia
0,02	45.24 ± 0.04	53.69 ± 0.0 3	34.11 ± 0.04	55.29 ± 0.0 3	44.10 ± 0.01	52.94 ± 0.0 5
0,04	44.18 ± 0.03	55.75 ± 0.0 5	35.84 ± 0.06	47.05 ± 0.0 3	47.05 ± 0.03	64.11 ± 0.0 3
0,06	47.48 ± 0.02	60.43 ± 0.0 3	39.43 ± 0.06	48.20 ± 0.0 6	48.20 ± 0.06	64.70 ± 0.0 4
0,08	48.47 ± 0.05	63.14 ± 0.0 4	40.00 ± 0.10	50.02 ± 0.1 3	50.02 ± 0.13	66.47 ± 0.0 3
0,1	49.48 ± 0.03	64.34 ± 0.0 4	41.17 ± 0.04	50.48 ± 0.0 3	50.48 ± 0.03	68.23 ± 0.0 3

PARTIE EXPERIMENTALE

1. Préparation du matériel biologique végétal

- **Récolte et séchage**

Nous avons travaillé sur les feuilles de *Melia azedarach* récolté au mois de juillet 2011 au niveau de la résidence de Targa Ouzemmour et séché préalablement (**figure10-A**).

- **Broyage et tamisage**

Les feuilles ont été broyées à l'aide d'un moulin à café électrique pour obtenir une poudre dont la taille des particules est inférieure à 0,5 mm (**figure10-B**).



Figure 10 : Photographie des feuilles sèches (A) et des feuilles après broyage (B)

2. Composition chimique globale

La composition chimique globale est réalisée selon le schéma de Weende. La détermination des teneurs en Matière Minérale (MM) et la teneur en protéine brute a été déterminée par la méthode de Kjeldahl (quantité d'azote*6,25), en Cellulose Brute (CB) et en Matière grasse (MG) est effectuée selon les méthodes classiques (AOAC, 1975).

Les Sucres totaux sont déterminés selon la méthode de (Dubois, 1956). Pour les teneurs en caroténoïdes sont évaluées par la méthode de Sass-Kiss et al. (2005).

2.1. Teneur en matière minérale

La matière minérale d'un échantillon est le résidu obtenu après incinération de la matière organique de l'échantillon dans un four à $550\text{ °C} \pm 15\text{ °C}$ pendant 04 heures

2.2. Dosage de la cellulose brute

La teneur en cellulose brute est déterminée par la méthode de **Weende (1809)**. Les matières cellulosiques constituent le résidu organique obtenu après deux hydrolyses successives, l'une en milieu acide et l'autre en milieu alcalin.

2.3. La teneur en protéine brute (Kjeldahl, 1883)

Le principe de la méthode Kjeldahl consiste à transformer cet azote organique en azote minéral (minéralisation), puis à déplacer l'ammoniac du sel d'ammonium obtenu (distillation) pour le neutraliser par une solution acide de titre connu (dosage).

❖ Mode opératoire

On introduit dans un matras de minéralisation 0,5 g de poudre fine de feuille de *mélia azedarach* obtenue et une pincée de catalyseur (le sélénium, le sulfate de cuivre et du potassium), puis on ajoute 20 ml d'acide sulfurique pur ; on applique un chauffage progressif : d'abord une attaque à froide pendant 15 min jusqu'à l'apparition de vapeur blanche d'anhydride sulfurique, puis le chauffage est rendu plus énergique, attaque à chaud pendant 4 à 5 heures sous une hotte qui aspire les vapeurs sulfureuses résultant de la décomposition partielle de l'acide sulfurique; le chauffage est maintenu jusqu'à l'obtention d'un filtrat limpide ou verdâtre. Après refroidissement, le minéralisât est transvasé dans une fiole où le volume est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée.

La distillation est réalisée dans un distillateur automatique (Gerhardt) où l'ajout de 20 ml de lessive de soude à 40% dans le matras et 20 ml de solution d'acide borique (25%) contenant l'indicateur coloré (mélange de bleu de méthylène et de rouge de méthyle). L'ammoniac est alors titré par l'acide sulfurique 0,02N. Un témoin est réalisé dans les mêmes conditions sans échantillon.

❖ Expression des résultats

Les résultats sont exprimés selon les formules suivantes :

$$N(\%) = \frac{(M \times C(\text{H}_2\text{SO}_4) \times V(\text{H}_2\text{SO}_4))}{PE} \times 100$$

$$P(\%) = N(\%) \times 6,25$$

Soit :

M : masse molaire de l'azote (g/mol)

C_{H₂SO₄} : Concentration d'acide sulfurique (mole/l)

V_{H₂SO₄} : Volume H₂SO₄ versé pour titrer l'échantillon (ml)

PE : Prise d'essai (g)

2.4. Détermination de la matière grasse**❖ Principe**

Quand le ballon est chauffé (figure 11), les vapeurs du solvant passent par le tube adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'extracteur, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant. Le condensât s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube-siphon, ce qui provoque le retour du liquide dans le ballon, accompagné des substances extraites. Le cycle reprend et le solvant contenu dans le ballon s'enrichit progressivement en composés solubles. Comme seul le solvant peut s'évaporer de nouveau, la matière grasse s'accumule dans le ballon jusqu'à ce que l'extraction soit complète.



Figure 11 : Extraction de la matière grasse par soxhlet.

❖ Mode opératoire

La matière grasse contenue dans les feuilles de *Melia Azedarach* est extraite à partir de 30g de poudre en utilisant la méthode de Soxhlet, le solvant utilisé est l'hexane. Après la distillation le pourcentage des lipides est exprimé en poids de la matière sèche.

❖ Expression des résultats

Le rendement d'extraction correspondant au taux de matière grasse obtenue est calculé selon la formule suivante :

$$MG (\%) = - \frac{(P_1 - P_2)}{P_3} \times 100$$

Soit :

P₁ : Poids du ballon vide (g).

P₂ : Poids du ballon avec l'huile extraite (g).

P₃ : Poids de la prise d'essai (g).

3. Extraction et dosage des sucres totaux**3.1. Extraction des sucres totaux**

L'extraction des sucres est faite par une triple extraction selon la technique décrite par **Chow et Landhausser (2004)**.

- Peser précisément environ 50 mg de la poudre non délipidée et mettre dans un tube à essai de 15 ml.
- Ajouter 5 ml de l'éthanol 80 % (ETOH 80%) froid et bien mélanger (vortex).
- Mettre les tubes au bain-marie 95° /10 min.
- Refroidir dans la glace.
- Centrifuger 10 min à 2500 tours.
- Récolter délicatement le surnageant dans un second tube de 15 ml.
- Verser à nouveau 5 ml d'ETOH 80 % sur le culot du premier tube. Bien mélanger (vortex) et chauffer à nouveau au bain-marie 95° /10 min.
- Récolter le surnageant et mettre dans le second tube.
- Refaire une troisième extraction.
- Mesurer le volume du surnageant recueilli et l'utiliser pour le dosage des sucres solubles.

3.2. Dosage des sucres totaux

Les sucres totaux sont mesurés par le test au phénol (Dubois et al., 1956).

En présence de l'acide sulfurique concentré, les oses sont déshydratés en composés de la famille de dérivés furfuriques. Ces produits se condensent avec le phénol pour donner des complexes jaune-orangés. L'apparition de ces complexes est suivie en mesurant l'augmentation de la densité optique à 490 nm.

❖ Mode opératoire

1 ml d'extrait est introduit dans un tube, auquel sont ajoutés 1 ml de solution de phénol (5%, p/v) et 5 ml d'acide sulfurique (98 %). Après agitation, les tubes sont maintenus pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité puis l'absorbance est lue à 490 nm, la coloration est stable pendant 3 à 4 heures.

La teneur en sucre est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage (Annexe I) obtenue avec le glucose utilisé comme standard. Les résultats sont exprimés en g équivalent de glucose /100g de matière sèche (g Eq Glucose /100g MS).

4. Détermination de la teneur en caroténoïdes

Les caroténoïdes sont extraits par la méthode de Sass-Kiss et al. (2005). 20 ml du mélange hexane/acétone/éthanol (2 : 1 : 1) sont ajoutés à 0,5 g de poudre des feuilles de *Melia azedarach*. Après agitation pendant 30 min, la phase supérieure est récupérée. 10 ml d'hexane sont ajoutés pour une deuxième extraction. Le mélange des deux phases est utilisé pour le dosage des caroténoïdes totaux par spectrophotométrie à 450 nm.

Les concentrations des caroténoïdes sont estimées en se référant à la courbe d'étalonnage utilisant le β -carotène et les résultats sont exprimés en g/100g de matière sèche (Annexe I).

5. Extraction et dosage des composés phénoliques

Cette partie a pour but de mettre en évidence la présence des polyphénols dans l'extrait brut des feuilles de *Melia azedarach* et pour éviter les interférences possibles des matières grasses dans le dosage des composés phénoliques et compte tenu de nos conditions expérimentales, nous avons travaillé sur des échantillons délipidés aux préalables.

5.1. Extraction des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques est faite par macération selon la méthode d'Oomah *et al.* (2010) par l'eau distillée et l'éthanol à différentes concentrations 30%, 50% et 70%.

❖ Principe

Quand une matrice est en contact avec un solvant, les composants solubles dans le matériel migrent vers le solvant ; Ainsi, l'extraction est due au transfert de matière du principe actif de la matrice vers le solvant, selon un gradient de concentration (Handa *et al.*, 2008).

❖ Mode opératoire

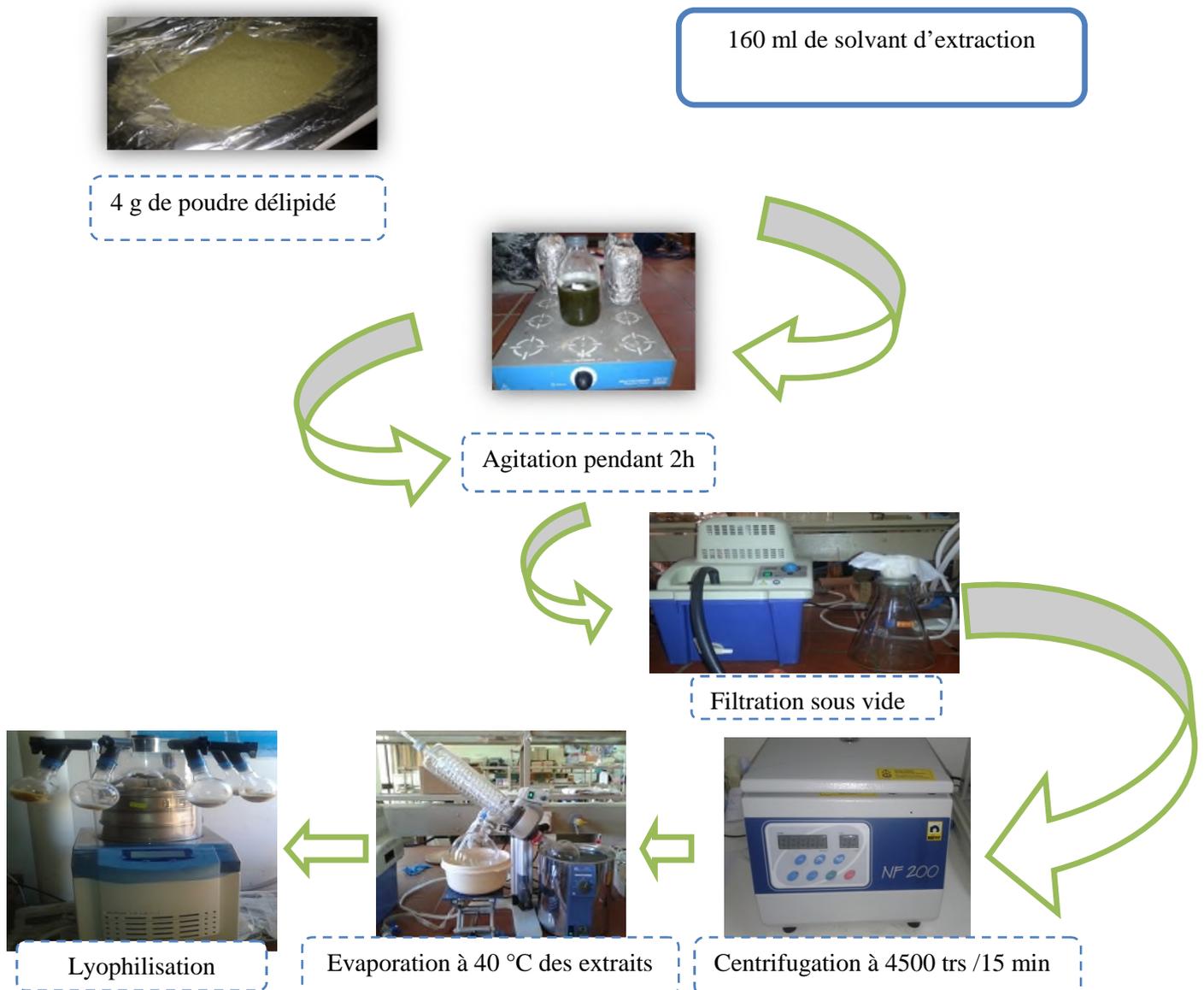


Figure 12: Protocole d'extraction des polyphénols (Oomah *et al.*, 2010)

Les extraits lyophilisés sont pesés et conservés à sec jusqu'à utilisation et le rendement d'extraction de chaque extrait est calculé par la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = \left[\frac{\text{Pf}}{\text{Pi}} \right] * 100$$

Pf : Poids de l'extrait après lyophilisation(g).

Pi: Poids de l'échantillon initial(g).

5.2. Dosage des composés phénoliques

Pour quantifier les différentes fractions phénoliques divers méthodes sont utilisées. Nous avons utilisé la méthode rapportée par **Skерget et al. (2005)** pour déterminer les teneurs en phénols solubles totaux. Pour les flavonoïdes nous avons utilisé la méthode décrite par **Lamaison et Carnet (1990)** citée par **Bahri-Sahloul (2009)**. Pour les tanins hydrolysables et condensés les techniques utilisées respectivement sont : **Mole et waterman (1987)** et **Price et al. (1978)**.

5.2.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en composés phénoliques est estimée selon la méthode de **Skерget et al. (2005)**.

❖ Principe

Le réactif Folin-Ciocalteu's est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{32}). La coloration bleue est proportionnelle au taux de composés phénoliques présents dans le milieu donne un maximum d'absorption à 760 nm (**Ribéreau-Gayon et al., 1982**).

❖ Mode opératoire

500 μl d'extrait sont mélangés avec 2,5 ml du réactif de Folin Ciocalteu. Après 5 min, 2 ml de carbonate de sodium (75 g/l) sont ajoutés. Le mélange est incubé à 50 °C pendant 5 min ; après refroidissement l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 760 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions.

Les concentrations en composés phénoliques sont déterminées par référence à une courbe d'étalonnage obtenue avec de l'acide gallique utilisé comme standard (annexe I). Les

résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par g de matière sèche (mg Eq AG/g MS).

5.2.2. Dosage des flavonoïdes

Le contenu en flavonoïdes des différents extraits est estimé par la méthode de **Lamaison et carnet (1990)** cité par **Bahri-Sahloul (2009)**.

❖ Principe

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyl (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO en position 4, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium (fig.13). Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium) (**Boulekbache, 2005**). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

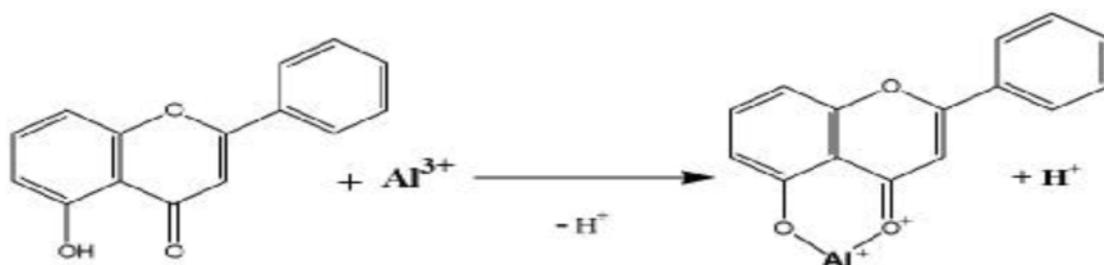


Figure 13: Mécanisme de réaction du chlorure d'aluminium avec les flavonoïdes (**Ribereau-Gayon, 1968**).

❖ Mode opératoire

2 ml de chlorure d'aluminium ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$) à 2% sont ajoutés à 2 ml d'extrait. Le mélange est homogénéisé et incubé à température ambiante pendant 10 min à l'abri de la lumière. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à 430 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions.

La teneur en flavonoïdes est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage obtenue avec de la Quercétine utilisée comme standard (annexe I). Les résultats sont exprimés en mg équivalent de Quercétine par g de matière sèche (mg Eq Q/g MS).

5.2.3. Dosage des tanins condensés

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en milieu acide (**Price *et al.*, 1978**). Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré mesuré à 500 nm. La réactivité de la vanilline avec les tanins n'implique que la première unité du polymère. Les quantités des tannins sont estimées en utilisant la méthode de vanilline décrite par **Julkunen-Titto (1985)**.

❖ Mode opératoire

Un volume de 50 µl de l'extrait brut est ajouté à 1500 µl de la solution vanilline/méthanol (4%, m/v) puis mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 750 µl de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) est additionné. Le mélange obtenu est laissé réagir à la température ambiante pendant 20 min. L'absorbance est mesurée à 550 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre Jenway 6504 UV/VIS.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant de la catéchine comme contrôle positif.

Les résultats de la plante étudiée sont exprimés en milligramme (mg) équivalent de la catéchine par gramme de la matière végétale sèche (mg EC/g de MS).

5.2.4. Dosage des tanins hydrolysables

❖ Principe

Les tanins hydrolysables réagissent avec le chlorure ferrique et donnent une coloration bleue mesurée par spectrophotométrie (**Mamadou, 2002**).

❖ Mode opératoire

3.5 ml du chlorure ferrique (FeCl_3 à 0.01M dans l'acide chlorhydrique à 0.001M) sont ajoutés à 1ml d'extrait. Après homogénéisation, l'absorbance est mesurée à 660 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions.

La teneur en tannins hydrolysables est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage obtenue avec de l'acide tannique (annexe I). Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide tannique/g de matière sèche (mg Eq AT/g MS).

5.2.4. Mise en évidence de la présence d'autres métabolites secondaires dans les extraits

- La détection des saponines est réalisée au moyen du test de **Yadav et Agarwala (2011)**. A 1ml d'extrait, sont ajoutés 3ml d'eau distillée. Après agitation pendant 2min la formation d'une mousse persistante indique la présence des saponines.
- La présence d'Alcaloïdes est révélée par la méthode d'**Amana (2007)**. Quelques gouttes du réactif de Bouchardat sont ajoutées à 2ml d'extrait. La formation d'un précipité brun-noir, brun-terne ou jaune-brun indique la présence de ces métabolites dans le milieu.
- La méthode d'**Aziman et al. (2012)** permet de mettre en évidence la présence de terpénoïdes. A 2.5 ml d'extrait est ajouté 1ml de chloroforme. Après homogénéisation, 1.5 ml d' H_2SO_4 concentré sont ajoutés au mélange. La formation d'une couleur brun-rouge à l'interface indique la présence de ces composés.

6. Etude de l'activité antioxydante

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* de nos extraits des composés phénoliques a été réalisée par cinq techniques chimiques à savoir : la réduction du fer, le piégeage du radical libre DPPH, chélation de fer ferreux, test du blanchiment du β -carotène et le test de Thiocyanate Ferrique.

6.1. Réduction du fer : FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*)

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}). En effet le Fe^{3+} participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm (**Oyaizu, 1986**). Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Hubert, 2006**).

❖ Mode opératoire

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode préconisée par **Oyaizu (1986)**. En effet, 1 ml de l'extrait à différentes concentrations (0,005 à 1,604 mg/ml) est mélangé avec 2,5 ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50 °C pendant 20 min ensuite, 2.5ml d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction et les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. Un aliquote (2,5

ml) de surnageant est combinée avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution aqueuse de FeCl_3 à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre). Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

Le blanc contient tous les réactifs à l'exception de l'extrait à tester qui est remplacé par un volume égal de méthanol (solvant de reconstitution). Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats sont rapportés à une gamme étalon (Annexe I) et exprimés en mg équivalent de l'acide ascorbique/ g de lyophilisat (mg Eq AA/ g lyophilisat).

La concentration (IC50) en extrait brut permettant d'avoir une ABS de 0,5 (**Jabri-Karoui et al., 2012**) est déterminée en traçant une courbe des absorbances (ABS) en fonction de la concentration par le biais du logiciel graph pad.

6.2. Piégeage du radical libre DPPH[•]

Le DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH est réduit et change de couleur en virant au jaune (Figure 14). Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (**Parejo et al., 2002**).

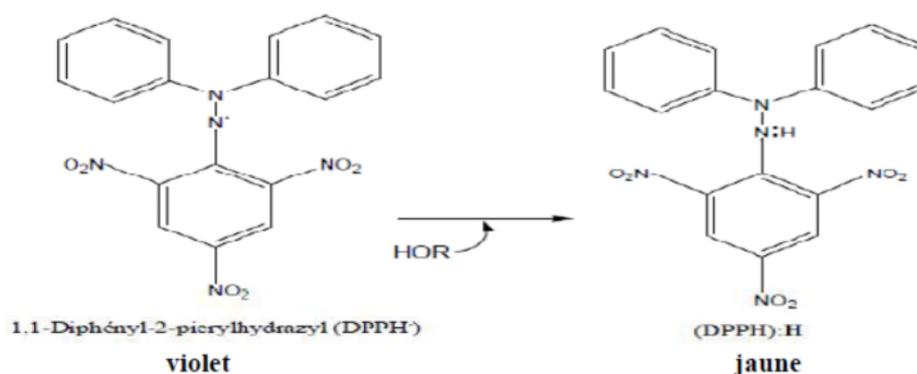


Figure 14: Réduction d'un donneur d'hydrogène (antioxydant) avec le radical DPPH[•]

❖ Mode opératoire

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par **Benhammou et al. (2007)**.

Un volume de 50 µl de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 1,950 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025 g/l) fraîchement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1950 ml d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Un témoin positif avec l'acide ascorbique et BHT est réalisé dans les mêmes conditions. La capacité antioxydante de nos échantillons a été exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH' par la formule suivante :

$$I \% = (Ac - At / Ac) * 100$$

Ac : absorbance du contrôle ;

At : absorbance du test effectué.

Le contrôle contient tous les réactifs à l'exception de l'extrait à tester qui est remplacé par un volume égal de méthanol. Le blanc contient tous les réactifs à l'exception du DPPH et de l'extrait à tester qui sont remplacés par un volume égal de méthanol.

IC50 ou concentration inhibitrice de 50 %, est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH'. Les IC50 sont déterminées en traçant la courbe des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées par le biais du logiciel graph pad.

6.3. Chélation du fer ferreux

❖ Principe

Le principe de ce test est la complexation des ions ferreux avec un composé ligand : 3-(2-pyridyl)-5, 6-diphényl-1, 2, 4 triazine-4',4''-disulfonate de sodium (ferrozine). Le complexe ferrozine-fer II de couleur violette présente un maximum d'absorption à 562 nm selon la méthode citée par **Le et al. (2007)**.

❖ Mode opératoire

A 50µl de FeCl₂ (2 mM) sont ajoutées 100µl d'extrait. La réaction est initiée avec 100µl de ferrozine (5mM) et 2,75ml d'eau distillée. Le mélange est homogénéisé et incubé pendant 10min à température ambiante et l'absorbance est lue à 562 nm.

Un témoin positif avec l'EDTA est réalisé de la même manière. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$I \% = (Ac - At / Ac) * 100$$

Ac : absorbance du contrôle ;

At : absorbance du test effectué.

L'EDTA est utilisé comme chélateur de référence à des intervalles de concentration de (0,06-1 mg /ml). Pour déterminer l'IC₅₀ par le biais du logiciel graph pad de l'EDTA et de ces extraits, nous avons utilisé des concentrations différentes.

6.4. Test du blanchiment du β-carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique**❖ Principe**

Dans ce test, la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β-carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique (**Prakash et al., 2011**).

❖ Mode opératoire

Préparation de l'émulsion du β-carotène : Une quantité de 5 mg de β-carotène est dissoute dans 10 ml de chloroforme. 1 ml de ce mélange est ajouté à un mélange de 200µl Tween 40 et 25 µl d'acide linoléique. Cette solution est évaporée à 40°C jusqu'à la disparition du chloroforme. 100 ml de l'eau distillée sont ajoutés au mélange précédent et la solution résultante est agitée vigoureusement.

Dans des tubes à essai, 2,5 ml de l'émulsion β-carotène/acide linoléique est additionnée à 350 µl des solutions méthanoliques de l'extrait ou de l'antioxydant de synthèse BHT. Après homogénéisation, l'absorbance est mesurée immédiatement à 470 nm, ce qui correspond à t=0min.

La cinétique de décoloration est suivie à 470 nm à des intervalles de temps réguliers (30 min) pendant 2 heures à 50° C.

6.4. Test de Thiocyanate Ferrique (FTC)

❖ Principe

L'analyse d'activité antioxydante en utilisant le thiocyanate ferrique a été exécuté selon le procédé rapporté **Lee et al. (2004)**.

La méthode de FTC est employée, pour déterminer la quantité de peroxyde formée lors de l'oxydation des lipides. Durant l'oxydation de l'acide linoléique il ya formation de peroxyde dans l'émulsion où le fer ferreux (Fe^{2+}) est oxydé en fer ferrique (Fe^{3+}). Ce dernier forme un complexe avec le thiocyanate d'ammonium (SNC^-) pour donner le thiocyanate ferrique $\text{Fe}(\text{SNC})^{2+}$, de couleur rouge brique qui possède une absorbance maximale à 500 nm (**Below et al., 1958**).



❖ Mode opératoire

Le mélange réactionnel contenant respectivement 0,12 ml d'extraits ou de contrôles positifs, 2,88 ml d'acide linoléique (2,52 % dans l'éthanol absolu) et 9 ml de tampon phosphate (pH 7,4) est incubé dans des tubes à essais bouché à l'étuve 40°C pendant 72 heure. Un aliquote (0,1 ml) ont été pris du mélange chaque 24 heure, puis dilué avec 9,7 ml d'éthanol 75%, suivis par 0,1 ml de thiocyanate d'ammonium à 30% après 3 min exactement avoir ajouté 0,1 ml de FeCl_2 (0,02 M dans 3,5% HCl). L'absorbance de la couleur rouge à été mesurée à 500 nm. Le rapport de cette absorbance à l'absorbance d'un blanc sans extrait à été pris comme mesure de la capacité d'empêcher la peroxydation des lipides ce qui est une alternative pour la mesure d'activité antioxydant.

Par ailleurs, le contrôle contient tous les réactifs à l'exception de l'extrait à tester qui est remplacé par un volume égal de méthanol. Le blanc contient tous les réactifs à l'exception de l'acide linoléique et de l'échantillon à tester qui est remplacés par un volume égal de l'éthanol pur et du méthanol respectivement.

Contrôle : Une solution de contrôle (BHA) a été préparée et un contrôle négatif a été également préparé contenant tous les réactifs à l'exception des composés phénoliques totaux ou l'agent antioxydant.

7. Analyse statistique

Toutes les déterminations sont menées en triples. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart type avec Excel de Microsoft Office 2007.

Les résultats sont traités par l'analyse un facteur de la variance (ANOVA) suivie d'une comparaison multiple des moyennes grâce au logiciel statistica version 5.5.

Les concentrations IC₅₀ des activités antioxydantes sont déterminées par le biais de logiciel Graphe Pad version 5.0.

1. Composition chimique globale

La figure 15 résume la composition chimique globale des poudres de feuilles séchées de *Melia azedarach*. Elle renferme 8,68% de cellulose brute, 9,79 g Eq Glucose /100g de sucres totaux, 20.62 % de protéine totale brute et 3,14 % de lipides. La teneur en minéraux s'élève à 11,96 % de la MS. Les caroténoïdes sont présents à hauteur de 0,27 g Eq β -carotène/100g MS.

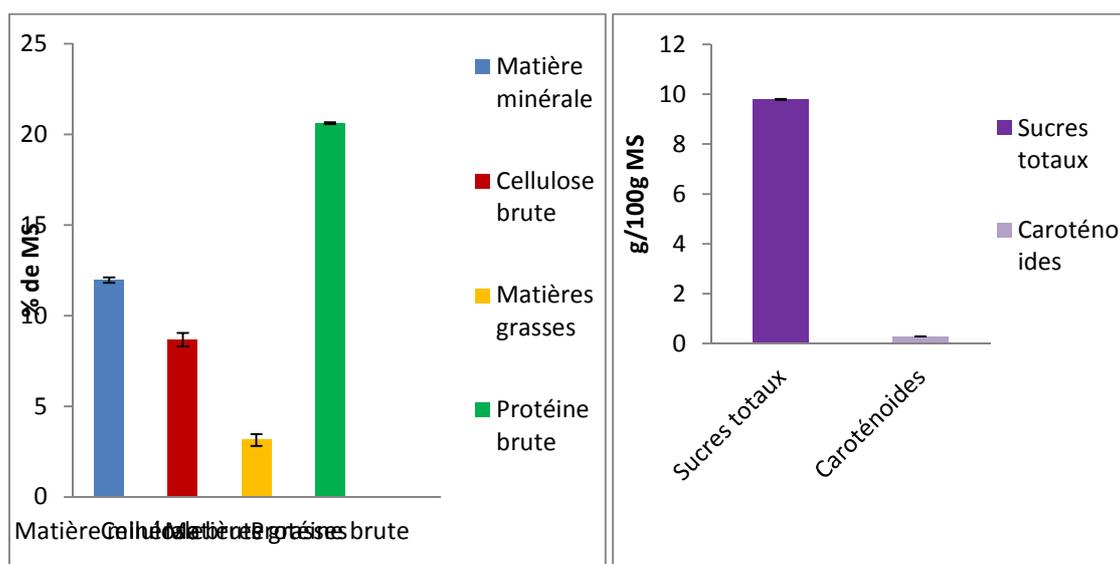


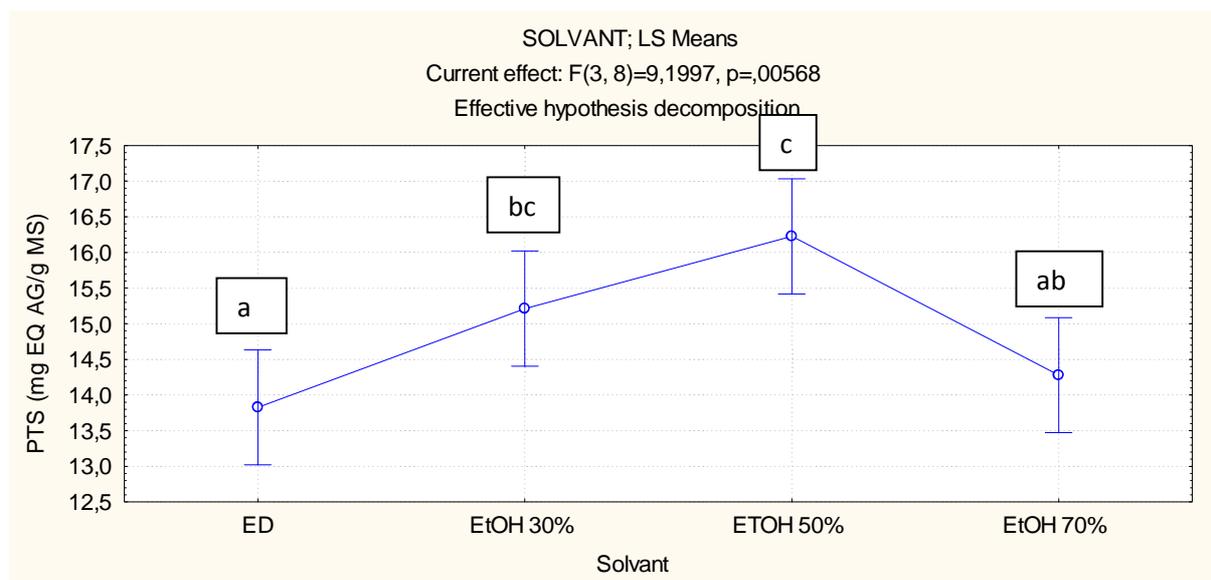
Figure 15: Composition chimique globale des feuilles de *Melia azedarach*

2. Teneurs en composés phénoliques

Pour l'obtention des différents extraits de la poudre des feuilles étudiées, nous avons réalisé des extractions avec de l'eau distillée (ED), éthanol 30% (EtOH 30%), éthanol 50% (EtOH 50%) et éthanol 70% (EtOH 70%) par la méthode de **Oomah et al. (2010)**.

2.1. Les phénols totaux solubles

Les différents résultats des teneurs en phénols totaux solubles (PTS), rapporté par la figure 16, nous montrent une variabilité de teneurs entre les extraits. Ces teneurs varient de 13,82 mg Eq AG/ g de MS (extrait aqueux) à 16,22 mg Eq AG/ g MS (extrait à l'éthanol 50%).



Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$)

Figure 16: Teneurs en phénols totaux solubles des extraits de feuilles en fonction des solvants

La substitution partielle de l'eau par de l'éthanol s'accompagne d'une augmentation des teneurs en phénols totaux solubles (3,28% à 17,35%). L'amplitude des augmentations dépend du taux de substitution ; les taux de substitution de 30% et 50% induisent une augmentation de 10,03 et 17,35% respectivement des PTS alors que pour l'éthanol 70%, l'augmentation n'est que de 3,28%.

2.2. Flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes (figure 17) varient d'un extrait à l'autre. Elles varient de 0,33 à 1,90 mg Eq de Q/g MS. L'analyse de la variance montre un effet significatif du facteur solvant ($P < 0,05$).

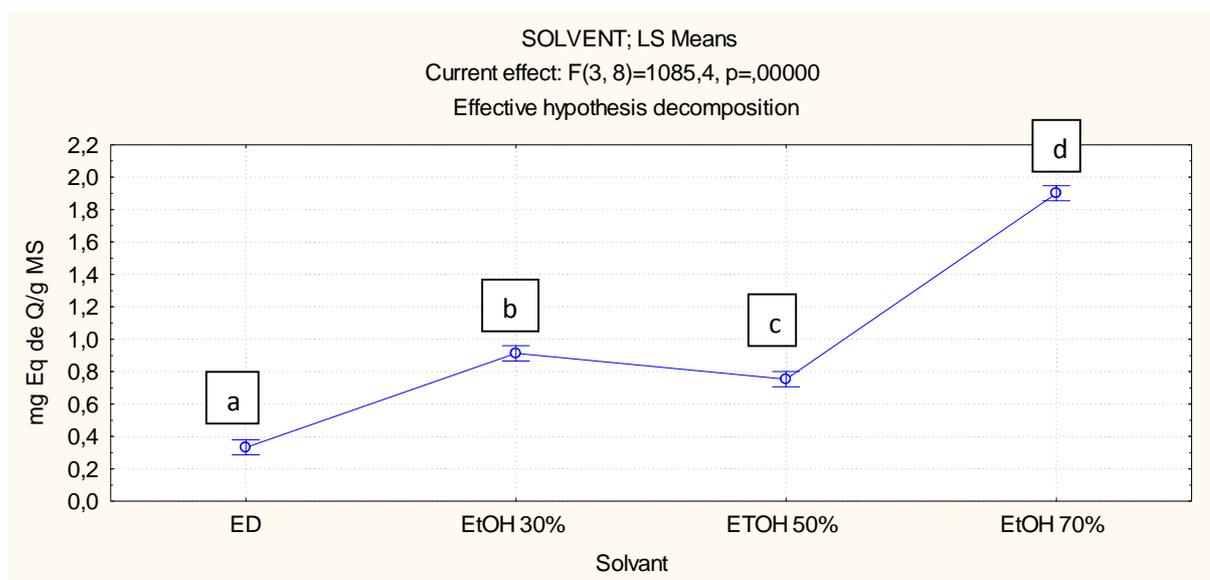


Figure 17: Teneur en flavonoïdes des extraits bruts des feuilles

Les plus faibles teneurs sont notés pour l'extrait aqueux (0,33 mg Eq Q/g MS). L'incorporation d'éthanol à l'eau s'accompagne d'une élévation des teneurs en flavonoïdes ; elles sont multipliées par 1,26 (éthanol 50%), 1,74 (éthanol 30%) et 4,72 (éthanol 70%).

2.3. Teneur en tanins condensés

Les résultats présentés dans la figure 18 montrent une variation des teneurs en tanins condensés en fonction du solvant utilisé. L'analyse statistique de la variance révèle un effet significatif ($p < 0,05$) du facteur solvant. Ces teneurs varient de 4,72 mg Eq vanilline/g de MS (extrait aqueux) à 12,42 mg de vanilline/g de MS (extrait éthanolique).

Nos résultats montrent que c'est l'éthanol 70% qui solubilise le plus les tanins condensés

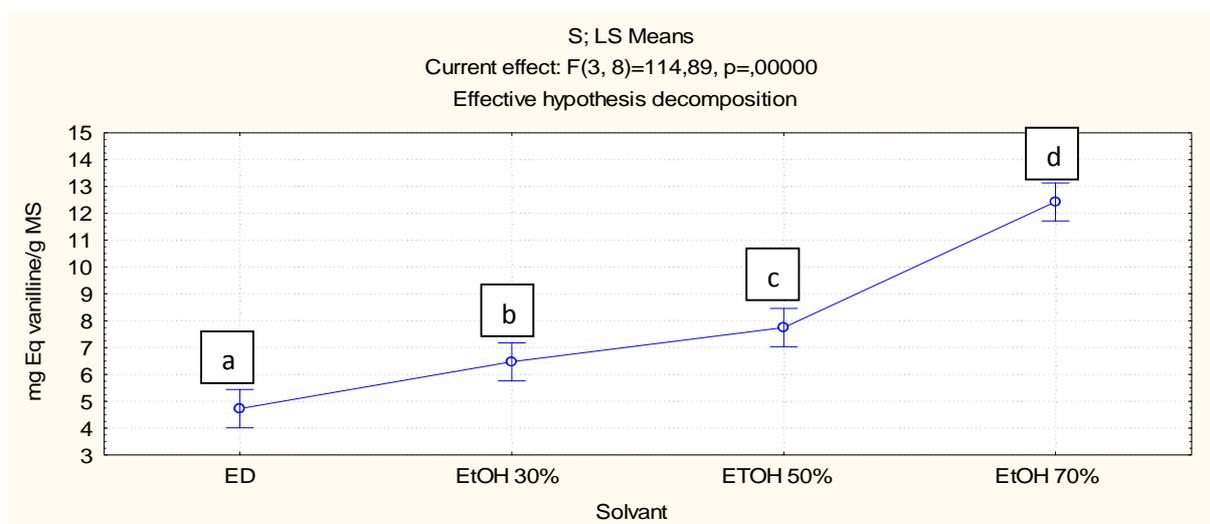


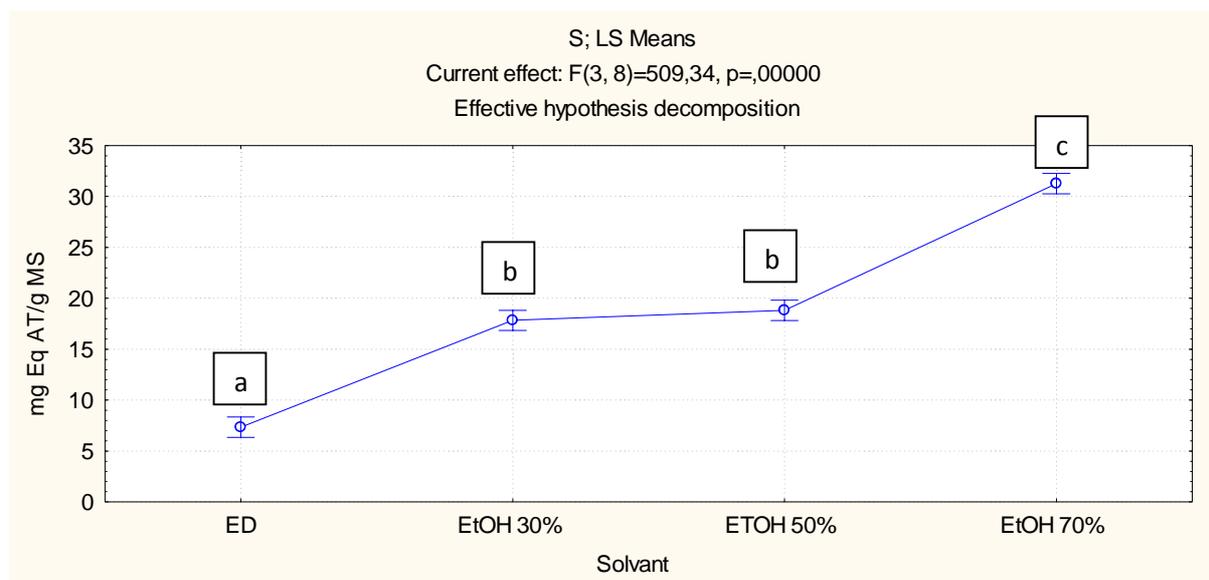
Figure 18: Teneur en tanins condensés des extraits bruts de feuilles

La solubilisation des tanins condensés est d'autant plus marquée que la teneur en éthanol du solvant est élevée. Par rapport à l'extrait aqueux, les augmentations de solubilité des tanins condensés varient de 36,82% (éthanol 30%), 63,87% (éthanol 50%) et 325,53 % (éthanol 70%).

2.4. Teneur en tanins hydrolysables

La figure 19 montre les teneurs en tanins hydrolysable des feuilles de *Melia azedarach* qui varient de 7,34 mg Eq AT/ g MS à 31,26 mg Eq AT/ g MS.

L'analyse statistique de la variance montre un effet significatif ($p < 0,05$) du facteur solvant sur la teneur en tanins hydrolysable.



Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$)

Figure 19: Teneur en tanins Hydrolysables des extraits bruts de feuille

Nous résultats montrent que l'éthanol 70% solubilise mieux les tanins hydrolysables : 31,260 mg Eq AT/ g MS. Par rapport à l'eau distillée, les améliorations induites par la présence de l'éthanol dans le solvant varient de 142,7% (éthanol 30%), 156,18% (éthanol 50%) et 325,53% (éthanol 70%).

2.5. Résultats du Screening chimique

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires dans les extraits de feuilles de *Melia azedarach* (tableau XIII). La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation, de turbidité et un changement de couleur spécifique. Les résultats du criblage phytochimiques qualitatifs montrent la présence d'alcaloïdes, de terpenoïdes et stéroïdes.

D'après **Zhang et al. (2014)** ont confirmé la mise en évidence de deux nouveaux triterpénoïdes et un nouvel stérol, avec six constituants connus, ont été isolés à partir des extraits de feuilles et des branchettes de *Melia azedarach*. Leurs structures chimiques ont été élucidées à partir de l'analyse à RMN.

Tableau XIII: Résultats de la présence d'autres métabolites secondaires dans les extraits bruts de *Melia azedarach*

Extraits	Alcaloïdes	Saponines	Terpenoïdes
EtOH 30%	+	+	+
EtOH 50%	+	+	+
EtOH 70%	+	+	+
ED	+	+	+

+ = présence de composé

La présence (figure 20) d'un précipité brun-noir, brun terne ou jaune-brun indique la présence d'alcaloïdes.

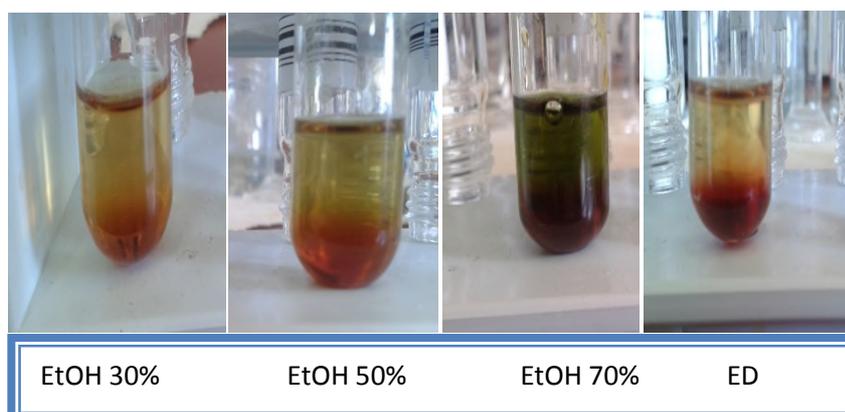


Figure 20: photos de mise en évidence des alcaloïdes dans les extraits

L'apparition de la mousse (figure 21) traduit la présence de saponines.

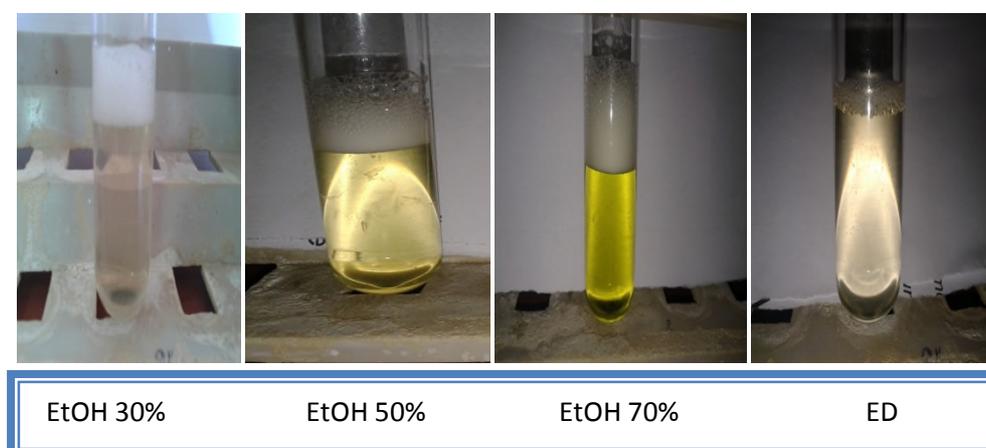


Figure 21: photos de mise en évidence des saponines dans les extraits.

La formation d'une couleur brun-rouge à l'interface indique la présence de ces composés.

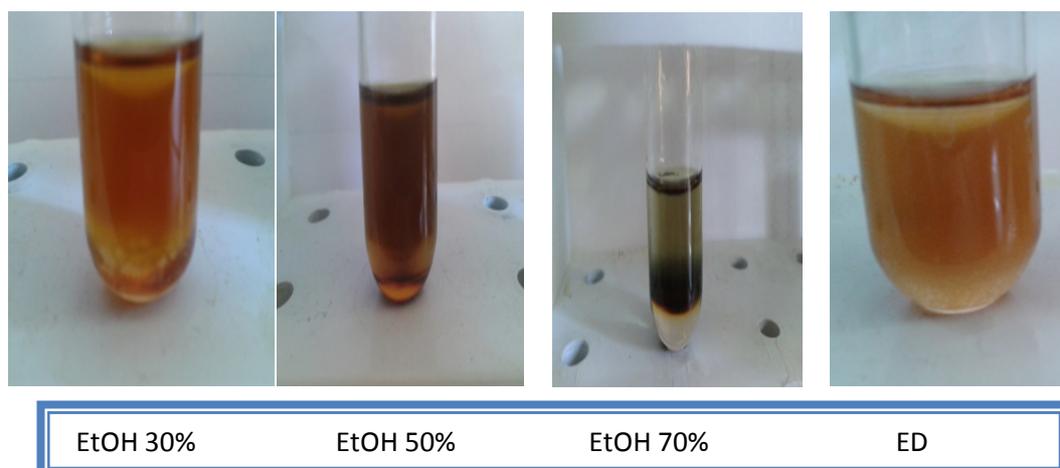


Figure 22: photos de mise en évidence des terpénoides dans les extraits

3. Activités antioxydantes

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits de plante a été réalisée par cinq méthodes (réduction du fer, piégeage du radical libre DPPH°, chélation du fer, blanchiment du β -carotène et test de thiocyanate ferrique).

3.1. Réduction du fer : FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*)

Cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} . La puissance de réduction est l'un des mécanismes antioxydants (**Karagozler *et al*, 2008**).

Nos données analytiques (figure 23) montrent que les extraits issus des feuilles ne manifestent pas le même pouvoir réducteur ($p < 0,05$).

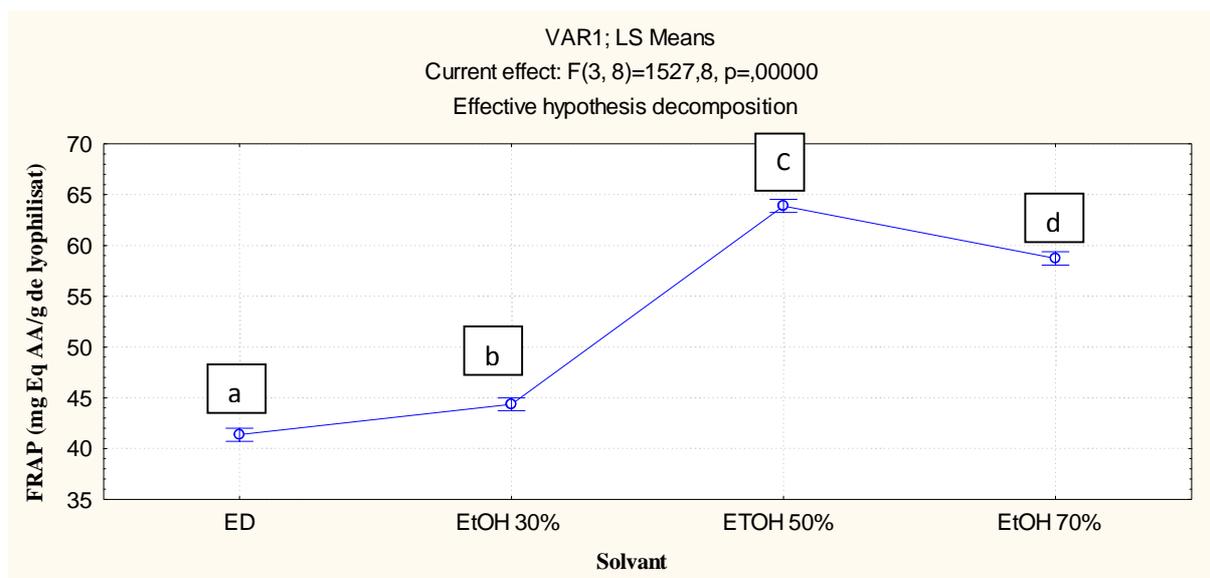


Figure 23: Comparaison de pouvoir réduction du fer (FRAP) des extraits bruts

Comparativement à l'extrait aqueux, le pouvoir réducteur des extraits est augmenté par la présence de l'éthanol dans le solvant. Nous avons enregistré des augmentations de 7,23% (éthanol 30%) et 54,44% (éthanol 50%) contre 41,97% pour l'éthanol 70%.

Nos données analytiques (Figure 24) montrent que tous les extraits testés manifestent un pouvoir réducteur inférieur à celui de l'acide ascorbique pris comme témoin. Ce sont les extraits éthanolique 50% et éthanolique 70% qui manifestent une augmentation brusque de pouvoir réduction du fer ferreux avec l'élévation de la concentration de l'extrait. Nous notons par contre une augmentation progressive du pouvoir réducteur pour l'extrait aqueux et éthanolique 30%.

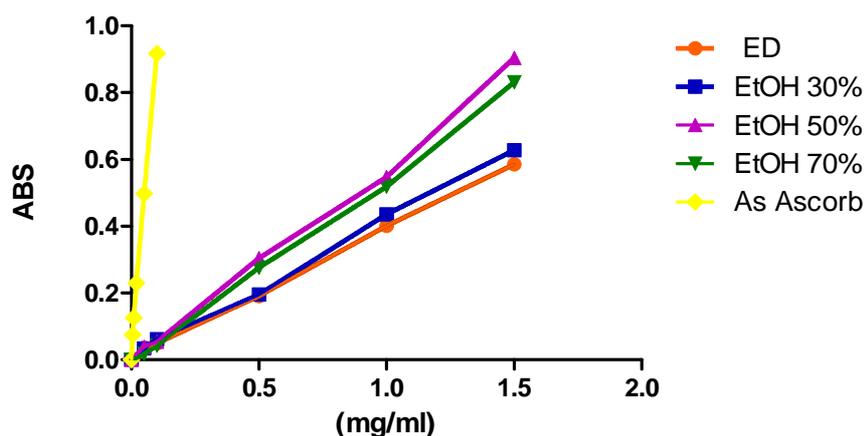


Figure 24: Effet de la concentration des extraits et standards sur le pouvoir réducteur du fer

ED : extrait aqueux ; **EtOH 30%** : extrait éthanolique 30% ; **EtOH 50%** : extrait éthanolique 50% ; **EtOH 70%** : extrait éthanolique 70% ; **AS Ascorb** : acide ascorbique.

La capacité à réduire le fer de 50 % des extraits varie 0,90 mg/ml à 1,26 mg/ml (**tableau XVI**) et nettement supérieur à celles de l'acide ascorbique (0,05 mg/ml).

La concentration IC₅₀ la plus faible des extraits est relevée pour l'extrait éthanolique 50% (0,90 mg/ml) et la plus élevée est enregistrée pour l'extrait aqueux (1,26 mg/ml).

Le classement des IC₅₀ des différents extraits testés s'établit comme suit :

Acide ascorbique > EtOH 50% > EtOH 70% > EtOH 30% > Eau.

Tableau XVI: Concentration IC₅₀ de pouvoir réducteur des extraits bruts

Extraits/Standard	IC ₅₀ (mg/ml)
Aqueux	1,269
EtOH 30%	1,168
EtOH 50%	0,903
EtOH 70%	0,961
Acide ascorbique	0,050

Nos résultats montrent que le pouvoir réducteur est corrélé significativement ($p < 0,05$) à la teneur en tanins hydrolysables ($R = 0,668$) et tanins condensés ($R = 0,662$).

3.2. Piégeage du radical libre DPPH'

Les résultats de l'activité antiradicalaire des extraits bruts et standards sont présentés dans la figure 25. La réduction du radical libre DPPH' par les extraits dépend du solvant d'extraction utilisé ($p < 0,05$).

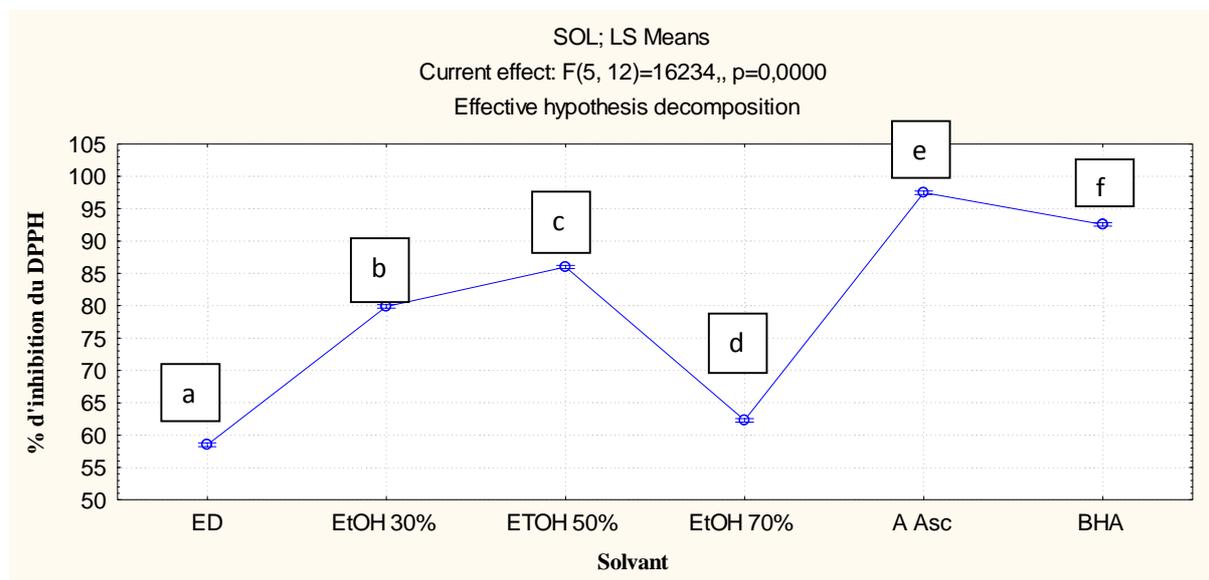


Figure 25: Activité antiradicalaire du DPPH des extraits bruts

Nos résultats expérimentaux montrent que l'activité antiradicalaire de l'acide ascorbique (97,46) et de la BHA (97,56 mg/ml) utilisés à une concentration de 0,5 mg/ml est supérieur à celle de nos extraits.

Les résultats de la figure 25 montrent que la valeur élevée est obtenue avec l'extrait éthanolique 50% (85,98%) suivi respectivement par l'extrait éthanolique 30% (79,9 %), l'extrait éthanolique 70% (62,29%) et l'extrait aqueux (58,59%).

La Figure 26 montre l'effet de la concentration des extraits sur le pouvoir antiradicalaire. Les extraits éthanolique 50, 70 et 30% manifestent dans une première phase une augmentation brusque du pourcentage d'inhibition du DPPH avec l'élévation des concentrations des extraits suivie d'une élévation progressive et faible aux forts concentrations (>10 mg/ml) dans le cas de l'extrait aqueux.

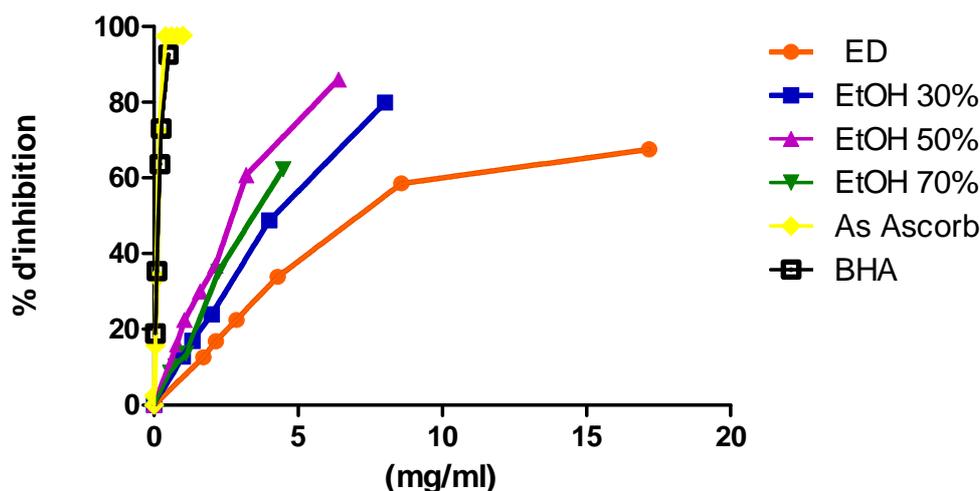


Figure 26: Effet de la concentration des extraits et des standards sur l'activité antiradicalaire du DPPH

ED : extrait aqueux ; **EtOH 30% :** extrait éthanolique 30% ; **EtOH 50% :** extrait éthanolique 50% ; **EtOH 70% :** extrait éthanolique 70% ; **AS Ascorb :** acide ascorbique ; **BHA :** Hydroxyanisole butylé.

Les antioxydants standards sont utilisés (acide ascorbique) et BHA ont montré une activité antiradicalaire très puissante avec des IC₅₀ faible de l'ordre de 0,14mg/ml et 0,15mg/ml respectivement (tableau XVII).

Tableau XVII: Concentration IC₅₀ de l'activité antiradicalaire des extraits bruts

Extraits/Standard	IC ₅₀ (mg/ml)
Aqueux	7,103
EtOH 30%	4,167
EtOH 50%	2,722
EtOH 70%	3,462
Acide ascorbique	0,143
BHA	0,152

Les quatre extraits utilisés seul l'extrait éthanolique 50 % présente la concentration la plus faible (2,72 mg/ml) donc un pouvoir antiradicalaire plus élevé. En effet l'activité antiradicalaire est inversement proportionnelle à la valeur IC₅₀.

Les polyphénols totaux solubles est corrélé significativement ($p < 0,05$) à l'activité antiradicalaire de DPPH ($R = 0,86$).

3.3. Chélation du fer ferreux

Le pouvoir chélation du fer des extraits testés varie de 49,24 % à 89,15 % et dépend du solvant d'extraction utilisé ($p < 0,05$). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 27.

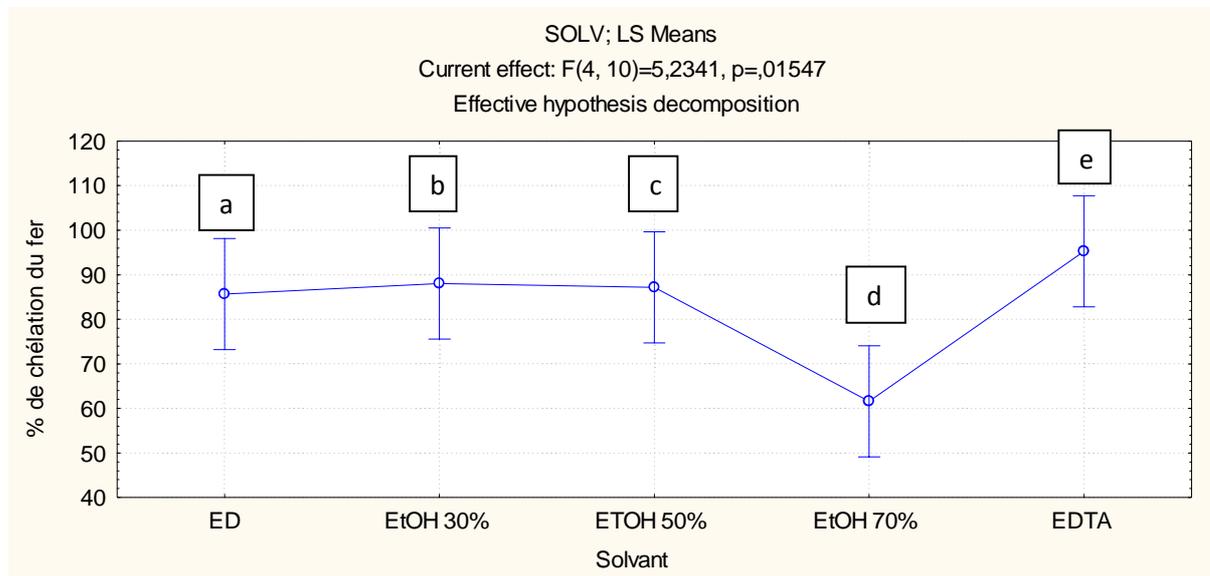


Figure 27: Pouvoir chélation du fer ferreux des extraits bruts

Nos données montrent que le pouvoir chélation de l'EDTA (1 mg/ml) est supérieur à celui de tous les extraits utilisés.

Nous notons que l'extrait éthanolique 70% a le plus faible pouvoir de chélation du fer; ce pouvoir diminue d'autant plus que l'éthanol est utilisé en plus forte concentration dans le solvant.

La Figure 28 montre l'effet de la concentration des extraits sur le pouvoir de chélation du fer, l'EDTA montre des pourcentages de chélation plus importants à faible concentration en comparaison à d'autres extraits. Nous constatons ainsi l'extrait aqueux manifeste une augmentation brusque du pourcentage de chélation du fer suivie d'un plateau. Les autres extraits affichent une augmentation plus modérée avec l'élévation des concentrations d'extraits.

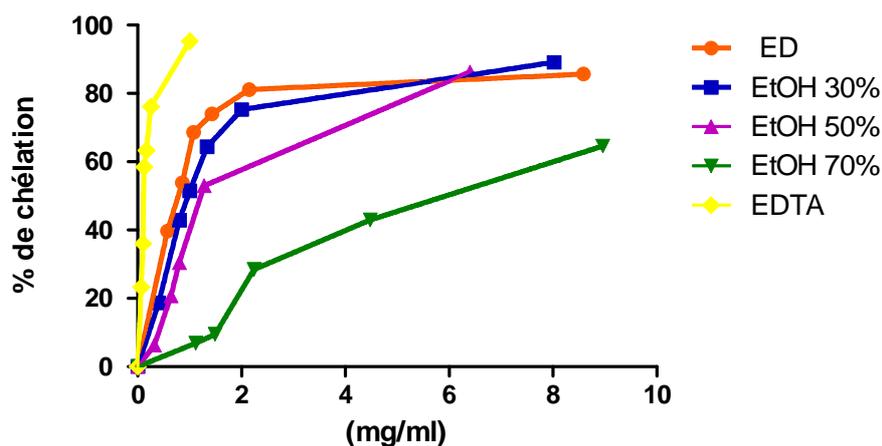


Figure 28: Effet de la concentration des extraits et standards sur le pouvoir de chélation de fer ferreux

ED : extrait aqueux ; **EtOH 30% :** extrait éthanolique 30% ; **EtOH 50% :** extrait éthanolique 50% ; **EtOH 70% :** extrait éthanolique 70% ; **BHA :** Hydroxyanisole Butylé

Les valeurs IC_{50} calculées nous a permis d'évaluer et de comparer l'efficacité des extraits (tableau XVIII).

Tableau XVIII: les valeurs d' IC_{50} des extraits bruts du pouvoir de chélation du fer

Extraits/Standard	IC_{50} (mg/ml)
Aqueux	0,781
EtOH 30%	0,968
EtOH 50%	1,217
EtOH 70%	5,935
EDTA	0,116

L'extrait aqueux nécessite la plus faible concentration (0,781 mg/ml) pour chélater 50% des métaux suivi de l'extrait éthanolique 30% (0,968 mg/ml).

L'EDTA est un bon chélateur des métaux qui révèle une puissante activité antioxydante avec une plus faible IC_{50} (0,116 mg/ml).

Les tanins hydrolysables, tanins condensés et les flavonoïdes sont corrélés négativement ($p < 0,05$) avec la chélation de fer ($R = -0,817$, $R = -0,9046$ et $R = -0,900$ respectivement).

3.4. Test du blanchiment du β -carotène

L'activité des différents extraits s'accompagne d'une inhibition de blanchiment de β -carotène de 34,84 à 68,17 %. Cette variation d'activité dépend ($P < 0,05$) de l'extrait utilisé (figure 29).

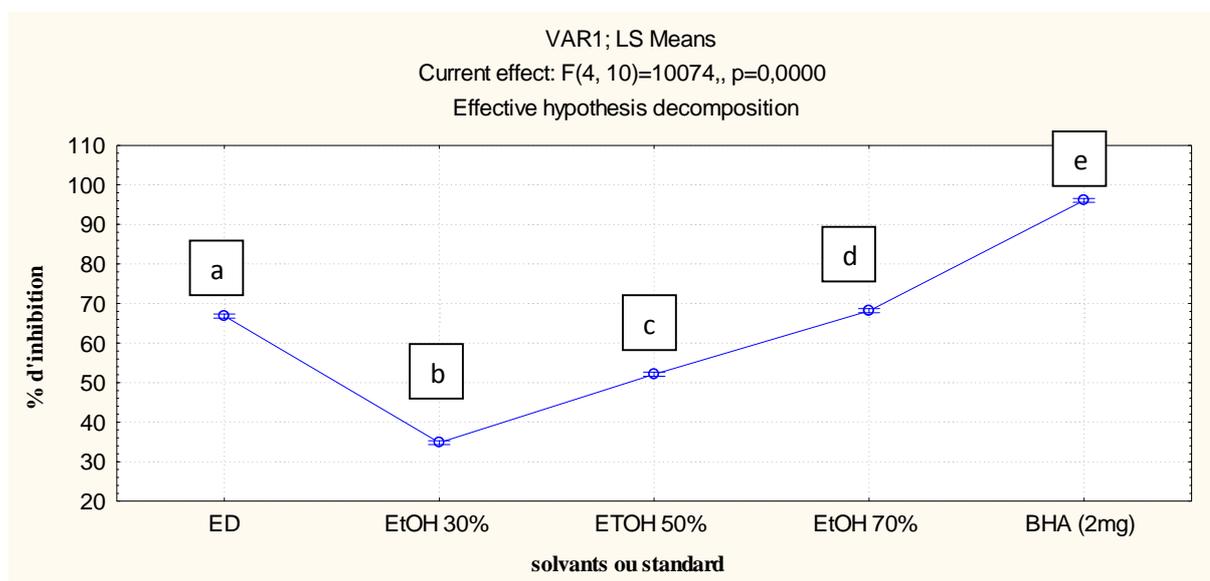


Figure 29: Inhibition de blanchiment du β -carotène des extraits bruts des feuilles

Dans nos conditions expérimentales, les différents extraits manifestent un potentiel ($P < 0,05$) inférieur à celui du standard (BHA) utilisé à la concentration de 2 mg/ml.

Comparé à l'eau distillée, nous notons que l'effet de l'éthanol dépend de son taux dans le solvant : diminution de l'activité (47,87% et 22%) respectivement pour l'éthanol 30% et 50% suivi d'une tendance à l'augmentation pour l'éthanol 70% (2%).

La figure 30 illustre l'évolution au cours du temps de l'inhibition du blanchiment de β -carotène en fonction de l'extrait utilisé.

Alors que le BHA (2mg/ml) maintient constant son activité, nos extraits manifestent tous une réduction variable de leur pouvoir inhibiteur (24,67 à 54,05%).

Les baisses d'activités enregistrées sont nettement plus marquées pour les extraits à l'éthanol 30% et 50% (54,05 et 40,40% respectivement), que les extraits aqueux et éthanolique 70% (26,78% et 24,67 %).

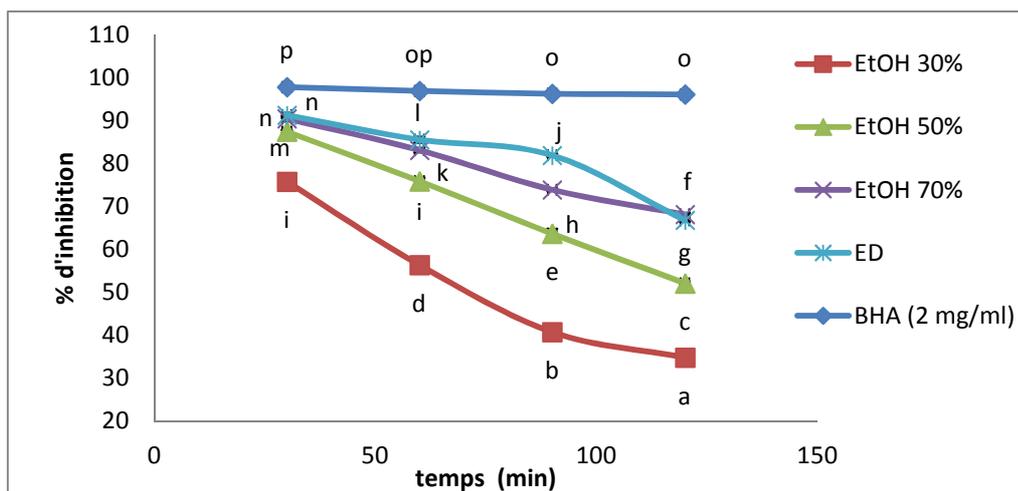


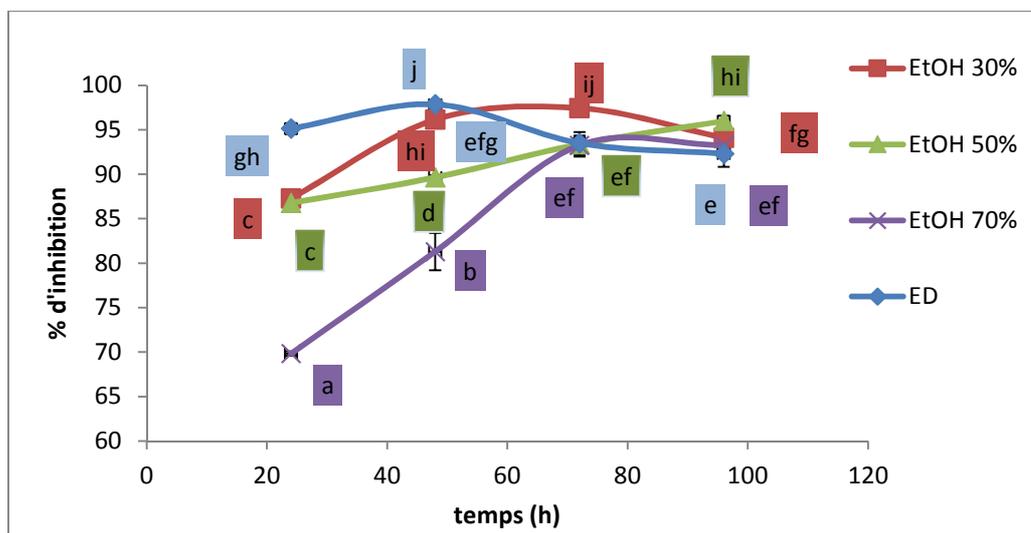
Figure 30: Cinétique de blanchiment de β-carotène des extraits bruts des feuilles

Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$)

Nos données analytiques n'ont pas mis en évidence de corrélation significative ($p > 0,05$) entre le blanchiment de β-carotène et la teneur en composés phénoliques.

3.5. Test de thiocyanate ferrique (FTC)

L'analyse des données résumées par la figure 31 illustre la variation d'activité des différents extraits.



Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$)

Figure 31 : cinétique d'inhibition de peroxydation de l'acide linoléique

Au bout de 24 heures d'incubation, l'extrait aqueux manifeste ($P < 0,05$) la plus forte activité (95,12%).

La substitution partielle de l'eau par de l'éthanol s'accompagne d'une inhibition de la peroxydation lipidique allant de 86,76% (éthanol 50%) à 69,82 (éthanol 70%). L'allongement du temps d'incubation s'accompagne d'une différence de comportement des extraits testés définis entre deux phases de durées inégales.

Dans une première phase d'une durée de 24 h, l'extrait aqueux enregistre une augmentation (2,87%) de l'inhibition de la peroxydation lipidique, qui atteint alors son optimum à 97,85%. Un déclin de l'activité (2,96%) est ensuite enregistré durant l'allongement de l'incubation (48h à 96h).

Les extraits à l'éthanol manifestant dans un premier temps une augmentation de leur activité (7,6 à 33,42%) qui attend son optimum à 72h d'incubation (93,15%, 93,36% et 97,43% respectivement pour l'éthanol 70, éthanol 50 et éthanol 30%).

De 72h à 96h d'incubation, nous notons que l'extrait éthanolique 30% affiche une régression d'activité de 3,43% alors que l'extrait éthanolique 50% et éthanolique 70% enregistre une augmentation de l'inhibition de la peroxydation de 2,80 et 0,1% respectivement.

Le thiocyanate ferrique (pendant 24 heures) est corrélé significativement à la teneur en polyphénols totaux solubles ($R = 0,79$).

Le thiocyanate ferrique (pendant 48 heures) est corrélé négativement aux teneurs en flavonoïdes ($R = - 0,88$), tanins hydrolysables ($R = - 0,88$) et les tanins condensés ($R = - 0,91$).

Une corrélation significative ($p < 0,05$) entre le thiocyanate ferrique (pendant 72 heures) et la teneur en phénols totaux solubles ($R = 0,77$).

Le thiocyanate ferrique (pendant 96 heures) est corrélé négativement aux teneurs en flavonoïdes ($R = - 0,66$), tanins hydrolysables ($R = - 0,70$) et les tanins condensés ($R = - 0,81$).

Discussion générale

La mise en évidence de la présence de divers classes de composés phénoliques (phénols totaux solubles, les flavonoïdes, tanins hydrolysables et tannins condensés) dans les extraits de *Melia azedarach*, est en accord avec les données de nombreux auteurs (**Chiffelle et al., 2009 ; Nahak et Sahu, 2010 ; Adil et al., 2012 ; Ahmed et al., 2012**).

Les teneurs en phénols totaux solubles (PTS) varient de 13,82 mg Eq AG/ g de MS (extrait aqueux) à 16,22 mg Eq AG/ g MS (extrait à l'éthanol 50%). Nos résultats sont inférieurs à ceux rapportés par **Adil et al. (2012)** pour des extraits méthanoliques 82,54 mg Eq AG/g. **Nahak et Sahu (2012)** rapportent des teneurs variant de 140 à 360 mg Eq catéchine/ g pour divers extraits de feuilles de *Melia azedarach*.

Les teneurs en flavonoïdes varient de 0,33 à 1,90 mg Eq de Q/g MS, restent faibles comparées aux données de **Adil et al. (2012)** : 16,99 à 20,75 mg Eq Q/g MS.

Pour les tanins condensés et hydrolysables les teneurs varient de 4,72 mg Eq vanilline/g de MS (extrait aqueux) à 12,42 mg de vanilline/g de MS (extrait éthanolique) et de 7,34 mg Eq AT/ g MS à 31,26 mg Eq AT/ g MS, respectivement.

La comparaison du contenu phénolique avec les données de la littérature est difficile tant divers facteurs peuvent intervenir et modifier significativement les teneurs en ces métabolites secondaires: Les conditions de séchage (**Couto et al., 2012**), d'extraction (en terme de méthode ,temps, température , granulométrie , solvant , nombre d'étapes d'extraction), l'expression des résultats, l'état et la provenance géographique (**Luthria, 2008; Kahouli, 2010; Rodriguez-Rojo et al., 2012**), le stade de maturité de la plante et les différentes maladies qui peuvent l'affecter (**Park et Cha, 2003**) , la durée de conservation (**Ozgüven et Tansi, 1998**) ainsi que la saison de collecte et le cultivar ne peuvent pas être exclus (**Luis et Johnson., 2005; Osinska., 2012; Zaouali et al., 2013**).

De telles différences peuvent être aussi attribuées au degré de polymérisation des composés phénoliques, à leur diversité structurale (**Naczk et Shahidi, 2006**), ou à leur implication dans d'autres structures moléculaires formant ainsi avec d'autres composants (glucides et protéines) des complexes insolubles (**Caecace et Mazza, 2002 et Falleh et al., 2008**).

Comme le soulignent différents auteurs (**Ryan et al., 2002; Escribano, 2003; Naczk et shahidi, 2006; Chethan et Malleshi, 2007; Alothman et al., 2009; Sulaiman et al., 2011; Ahmed, 2012**) l'extraction a pour but de faire diffuser dans la phase liquide les composés

phénoliques présents dans la matière végétale. L'efficacité de l'extraction des composés phénoliques à partir d'une matrice végétale est influencée par la polarité des solvants d'extractions et dépend du nombre de groupes hydroxyles inclus dans les structures de ces composés et de leur solubilité.

Dans nos conditions expérimentales, l'incorporation de l'éthanol à l'eau améliore la solubilité des composés phénoliques pour les feuilles. En effet, l'utilisation de solvant binaire s'accompagne d'une augmentation globale de l'extraction des PTS par rapport à l'eau distillée de 3,28% à 17,35% ; pour les flavonoïdes, elle varie de 126.80 à 472.28 % contre 36,82 à 162,75% pour les tanins condensés et 142,77 à 325,53 % pour les tanins hydrolysables. Cette différence de solubilité des composés dosés s'accorde avec les résultats de nombreux auteurs, ou les systèmes de solvants binaires sont plus efficaces dans l'extraction des composés phénoliques que le solvant organique pur (**Sabir et al., 1974 ; Nawaz et al., 2006; Turkmen et al., 2006; Kim et al., 2007; Yang et Zhang, 2008**).

L'addition de l'eau au système d'extraction améliore le rendement en composés phénoliques glycosyles et des phénols avec un degré de polymérisation plus élevé. D'autre part, l'augmentation de l'eau dans le système de solvant d'extraction (0-50 % éthanol) fait extraire en quantité importante les composés non phénoliques comme les glucides et les protéines, susceptibles de polymériser avec les composés phénoliques ce qui conduit à la formation des complexes colloïdaux qui ne sont pas détectés par le test utilisé (**Poncet-Legend, 2003**).

Aoudia et al. (2013) rapportent que l'activité des polyphénols dans les extraits dépend du type de composé phénolique mis en jeu, de taux d'hydroxylation et de conjugaison. L'extrait aqueux renferme des quantités plus élevées en composés conjugués (acide chlorogénique-C, et acide p-coumarique-C) que les extraits à l'éthanol. En revanche, l'extrait à l'éthanol (50 %) renferme des quantités significativement plus élevées en rutine, quercétine et en composés conjugués (kaempférol -3 -O- β - rutinoside, la quercétine -3 -O- β -D- glucoside) par rapport aux extraits à l'eau. La teneur en quercétine -3 -O- β -D- glucoside d'extraits à l'éthanol représente plus de deux fois celle des extraits aqueux.

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits de feuilles de *Melia azedarach* a été réalisée par cinq méthodes (réduction du fer, piégeage du radical libre DPPH°, chélation du fer, blanchiment du β -carotène et test de thiocyanate ferrique).

Les extraits bruts des feuilles de *M. azedarach* montrent une activité antiradicalaire du DPPH qui varie de 58,59 % (extrait aqueux) à 85,98% (extrait à l'éthanol 50%). **Nahak et Sahu (2010)**, **Ahmed et Rao (2013)** et **Adil et al. (2012)** rapportent des pourcentages d'inhibition du DPPH plus faibles (48.54 % à 71.42 %) comparés à nos résultats. Les valeurs de l'IC50 varient de 2,72 à 7,10 mg/ml ; la comparaison des IC50 entre les extraits montre que l'extrait éthanolique 50% (IC50 la plus faible) manifeste une activité antiradicalaire meilleure.

La haute activité de piégeage du DPPH d'extraits de *M. azedarach* peut être due aux groupes hydroxyles présents dans les composés phénoliques (**Ahmed et al., 2012 ; Samudram et al., 2009**).

Nos données montrent une bonne corrélation ($P < 0,05$) entre l'activité antiradicalaire et les teneurs en phénols totaux solubles ($r = 0,86$). Une corrélation fortement significative est obtenue par **Sultana et al. (2007)**, entre l'activité de piégeage du DPPH avec les phénols totaux ($r = 0,940$) chez une plante appartenant à la famille des méliacées (*Azadirachta indica*). Cette corrélation suggère une participation élevée des PTS dans la manifestation de cette activité.

Le pouvoir réducteur des extraits bruts de feuille ont montré que l'extrait aqueux (41,36 mg Eq AA/g de lyophilisat) expriment une activité antioxydante inférieure ($P < 0,05$) à celle des extraits éthanoliques qui varient de (44,35 à 63,88 mg Eq AA/g de lyophilisat). Une telle activité est rapportée par **Adil et al. (2012)** travaillent sur des extraits de feuille de *Melia azedarach* cultivé en Pakistan.

Nos données analytiques montrent que la capacité à réduire le fer de 50 % des extraits varie 0,90 mg/ml à 1,26 mg/ml. La comparaison des IC50 entre tous les extraits révèle que la plus faible concentration est obtenue avec l'extrait éthanolique 50% (0,90 mg/ml contre 1,26 mg/ml pour l'extrait aqueux).

Cette différence d'activité antioxydante des composés naturels selon **Larson (1988)** **Shahidi et Wanasundara (1992)**, dépend de la quantité de molécules spécifiques présentes dans la matrice, de facteur structural, tels que le nombre et les positions des groupements

hydroxyles dans la molécule et l'activité peut être renforcée par l'encombrement stérique (**Nakatani et al., 2000**).

Des corrélations moyennes sont relevées entre le pouvoir réducteur et les teneurs en PTS, flavonoïdes, tannins hydrolysables et tanins condensés ($r = 0,52, 0,49, 0,66$ et $0,66$ respectivement). Des corrélations plus faibles sont rapportées par **Sultana et al. (2007)**. Cette faible corrélation entre les flavonoïdes et puissance de réduction pourrait être attribuée au fait que la plupart des flavonoïdes sont sous forme glycosides et sont moins efficaces par rapport à leur formes d'aglycone (**Shahidi, 1997**).

Le pouvoir chélation du fer des extraits bruts donne des taux de chélation variant de 49,24 % (l'extrait à l'éthanol 70%) à 89,15 % (l'extrait à l'éthanol 30%) ; nous avons noté que la capacité des extraits phénoliques pour chélater le fer est inférieure à celle de l'EDTA utilisé à une concentration 1 mg/ml.

Nos données restent plus élevées comparativement à celle enregistrées par **Chimeray et al. (2009)** et **Orhan et al. (2012)**.

Les valeurs IC₅₀ des extraits calculées montrent que l'extrait aqueux donne la plus faible concentration (0,781 mg/ml) capable de chélater 50% des métaux ; l'extrait éthanolique 70% nécessite une concentration 7,6 fois plus élevée (5,93 mg/ml) pour chélater 50% des métaux.

La capacité chélatrice des métaux par des composés phénoliques dépend de leur structure chimique, du nombre et de la localisation des groupements hydroxyles (**Santoso et al., 2004**).

En fait, certains dérivés des acides phénoliques ont été trouvés posséder un fort effet chélateur du fer (**Pitt et al., 1986**) et l'effet de chélation métallique des extraits de feuilles étudiés par **Orhan et al. (2012)** pourrait être liés à leurs acides phénoliques, l'analyse par HPLC des extraits montre que les acides protocatéchique et p-hydroxybenzoïque prédominent dans les extraits aqueux et l'acide caféique, synergique et p-coumarique dans l'extrait méthanolique de feuille.

Nous avons relevé que l'extrait aqueux a montré une capacité de chélation du fer sensiblement plus élevée que celle des extraits éthanoliques qui sont en accord avec les données de **Chimeray et al. (2009)**.

L'analyse statistique de corrélation entre l'activité chélatrice des extraits et leurs teneurs en flavonoïdes, tannins hydrolysables et condensés est négative ($r = -0,9, r = -0,9$ et $r =$

-0,81 respectivement). **Mezti et al. (2012)**, suggèrent que les composés phénoliques des extraits testés pourraient ne pas être les principaux chélateurs du fer. La présence de saponines dans les extraits aqueux participerait à l'expression du pouvoir chélateur de ces derniers (**Ashraf et al., 2013**).

Dans le test d'acide linoléique/ β -carotène, les taux d'inhibition par les extraits de feuilles (34.84 % à 67.84%) sont comparables aux données rapportées par **Adil et al. (2012)** de la même plante cultivé au Pakistan (33,87 à 52,11%), et **Ghimeray et al. (2009)** pour les extraits de feuille d'*Azadirachta indica* du Népal (45.07 % à 53,04%).

Nos résultats suggèrent que les composés phénoliques des extraits ne sont pas les seuls facteurs impliqués dans l'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique. Comme le suggèrent **Bourgou et al. (2008)** et **Falleh et al. (2008)** l'inhibition de la peroxydation lipidique enregistrée traduit une interaction synergique entre les antioxydants présents dans les extraits, cette hypothèse est corroborée par les résultats mis en évidence par la matrice de corrélation.

Nos données analytiques n'ont pas mis en évidence de corrélation significative ($p > 0,05$) entre le blanchiment de β -carotène et la teneur en composés phénoliques. L'absence de corrélation peut s'expliquer en partie par l'effet synergique qui devrait être obtenu avec une matrice complexe riche en composés phytochimiques en comparaison avec des substances pures, en raison de l'hétérogénéité dans les composés et leur contenu (**Bender et al., 2014**).

L'activité de blanchiment de β -carotène peut être due à la participation des autres métabolites secondaires identifiés dans les extraits tels que : caroténoïdes, stérol, terpénoïdes et alcaloïdes.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion

L'objectif de ce travail était de déterminer les composés phénoliques et composants antioxydants des feuilles de *M. azedarach* poussant en Algérie. L'activité antioxydant est évaluée au moyen de divers tests (réduction du fer, piégeage du radical libre DPPH, chélation du fer ferreux, test du blanchiment du β -carotène et le test de Thiocyanate Ferrique).

Nos données analytiques ont montré que tous les extraits des feuilles possèdent des sources appréciables en composés phénoliques et en d'autres métabolites secondaires (alcaloïdes, terpenoïdes et stéroïdes).

Les résultats obtenus nous ont révélé la teneur en phénols totaux solubles des extraits qui varie de 13,82 à 16,22 mg Eq AG/g MS ; pour les flavonoïdes de 0,33 à 1,9 mg Eq Q/g MS ; pour les tanins condensés et hydrolysables de 4,72 à 12,42 mg Eq vanilline/g MS et 7,34 à 31,26 mg Eq AT/g MS respectivement.

Dans la deuxième partie, nous nous sommes intéressés par l'étude des propriétés antioxydantes des extraits bruts des feuilles de *Melia azedarach* par cinq méthodes. En effet, Les extraits bruts éthanoliques des feuilles se caractérisent par un fort pouvoir réducteur du fer ; l'IC₅₀ varie de 0,90 à 1,16 mg/ml contre 1,26 mg/ml pour l'extrait aqueux, la concentration la plus faible est obtenu avec l'extrait éthanolique 50% qui correspond à un pouvoir plus élevé (63,88%). Pour le pouvoir antiradicalaire, cette valeur oscille entre 2,72 à 4,16 mg/ml pour les extraits à l'éthanol contre 7,10 mg/ml pour l'extrait aqueux avec un pourcentage d'inhibition le plus important qui est obtenu ainsi par l'extrait éthanolique 50% (85,98%). Pour le test de thiocyanate ferrique l'extrait éthanolique 50% montre une meilleure protection contre la peroxydation de l'acide linoléique au cours du temps avec une augmentation linéaire des pourcentages d'inhibitions de 86,76% (24 heures) à 95,98% (96 heures). Pour le pouvoir de chélation, l'IC₅₀ varie de 0,78 à 5,93 mg/ml contre 5,93 mg/ml pour l'extrait éthanolique 70% qui correspond à un pourcentage de chélation la plus faible (49,24%).

L'activité de blanchiment de β -carotène, l'extrait éthanolique 70% a révèlé une activité antioxydante plus importante de 68,17%. Cette activité n'est pas corrélée avec les

teneurs en composés phénoliques des extraits cela peut être expliqué par la présence de autres composés secondaires dans les extraits responsable de l'activité.

Perspectives :

- Identification et quantification des différents constituants phénoliques.
- Identification, quantification et caractérisation des constituants non phénoliques solubilisés par les solvants d'extraction.
- Utilisation *in vivo* des extraits et effets sur la qualité nutritionnelle.
- Utilisation *in vivo* des extraits et effets sur hygiénique et organoleptique des aliments.
- Evaluation du potentiel antimicrobien des extraits de feuilles.
- Déterminer la sécurité d'emploi des extraits des feuilles (toxicité).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

- Adil Munir, Bushra Sultana, Tanveer Babar, Asad Bashir, Muhammad Amjad et Qadeerul Hassan (2012).** Investigation on the Antioxidant Activity of Leaves, Fruit and Stem Bark of Dhraik (*Melia azedarach*). European Journal of Applied Sciences 4 (2): 47-51.
- Ahana N. (2005).** The medicinal value of *Azadirachta indica*. Hindu Press, India. antimicrobial activity of Garlic and Onion extracts. Pharmazie 38(11), 747-748. Antimicrobial Activity. Part 1. Fitoterapia pp 51, 231. Antimicrobial Activity. Part 2. Fitoterapia. Pp 51: 281.
- Ahmed M.F., Ahmed M.A., Thayyil H., Zameeruddin K., Ibrahim M. (2008).** Antioxidative activity of *Melia azedarach* Linn leaf extract. Iranian Journal. Pharmacology and Therapeutics.7, 31–34.
- Akhtar M., Iqba Z, Khan MN and Lateef M. (2000).** Anthelmintic activity of medicinal plants with particular reference to their use in animals in the Indo-Pakistan subcontinent. Small Ruminant Research.38, 99-107.
- Alché Laura E., Guillermo Assad Ferek, Meo Milena, Coto Celia E., et Maier Marta S. (2003).** An antiviral meliacarpin from leaves of *Melia azedarach* L. Zeitschrift Für Naturforschung. 58, 215-219.
- Ali S.S., Kasoju, N., Luthra A., Singh A., Sharanabasava H., Sahu, A., Bora U. (2008).** Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. Food Research International. 41, 1–15.
- Alibert G., Ranjeva, R., Boudet, M.A. (1977).** Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques. Physiology Vegetal. 15, 279-301.
- Allamed A., Abyameh MR, Shams M. (2001).** Effects of neem leaf extract on production of aflatoxins and activities of fatty acid synthetase, isocitrate dehydrogenase and glutathione S-transferase in *Aspergillus parasiticus*. Mycopathologica. 154, 79–84.
- Alouani, A., Rehim, N., Soltani, N. (2009).** Larvicidal activity of a neem tree extract (Azadiractin) against mosquito larvae in the republic of Algeria. Jordan Journal of Biological Sciences. 2 (1), 15-23.
- Amal Kumar Ghimeray, Cheng-Wu Jin, Bimal Kumar Ghimire et Dong Ha Cho. (2009).** Antioxidant activity and quantitative estimation of azadirachtin and nimbin in *Azadirachta Indica* A. Juss grown in foothills of Nepal. African Journal of Biotechnology Research. 8 (13), 3084-3091.
- Anderson C.M., Hallberg A., Hogberg T. (1996).** Advances in development of pharmaceutical antioxidants. Advance in Drug Research. 28, 65-180.

AOAC. (1975). Official Methods of Analysis.12 Edition .Association of official Analytical chemists.AOAC Washington,D.C .

Aoudia H., Oomah B.D., Zaidi F., Zaidi-Yahiaoui R., Drover J.C.G., et Harrison J.E. (2013). Phenolics, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Melia azedarach* extracts. International Journal of Applied Research in Natural Products. 6 (2), 19-29.

Arumugam P., Ramamurthy P., Santhiya S.T., et Ramesh A. (2006). Antioxidant activity measured in different solvent fractions obtained from *Mentha spicata* Linn.: An analysis by ABTS⁺ decolorization assay. Asia Pacific Journal Clinical Nutrition. 15 (1), 119-124.

Aruoma O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. Journal of American Oil Chemists's Society. 75, 199–212.

Asadujjaman Md., Abu Saed, Aslam Hossain Md., and Utpal Kumar Karmakar (2013). Assessment of bioactivities of ethanolic extract of *Melia azedarach* (Meliaceae) leaves. Journal of Coastal Life Medicine. 1(2), 118-122.

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

Aurousseau B. (2002). Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. Inra Productions Animales. 15 (1), 67-82.

Azam M. M, Mamun-Or-Rashid A. N. M, Towfique N. M, Sen M. K., et Nasrin. S. (2013). Pharmacological potentials of *Melia azedarach* L. A review. American Journal of BioScience. 1(2), 44-49.

-B-

Bahorun T. (1997). Substances naturelles actives : La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Agricultural and Food Research Council, Réduit, Mauritius. 83-94.

Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J. C. et Pinkas M. (1996).Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. Arzneimittel Forschung. 46, 1086-1089.

Bahri-sahloul R., Ammar S., Fredj R. B, Saguem S., Trotin F., et Skhiri F. (2009). Polyphénol contents and antioxidant activities of extracts from flowers of two *Crataegus azarolus* L. varieties. Pakistan journal of biological sciences. 12, 660-668.

- Bates R. G., et Robinson R. A. (1966).** Chemical physics of ionic solutions. Edition, John Wiley and Sons, New York. 211.
- Benavente-Garcia O., Castillo J., Marin F.R., Ortuno A., and Del Rio J.A. (1997).** Uses and properties of *Citrus* flavonoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45, 4505–4515.
- Benhammou N., Atik Bekkara F., Kadifkova P. (2007).** Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia atlantica* Desf, Advances in Food Sciences. 29(3), 155-161.
- Benzie I.F.F., et Strain J.J. (1996).** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. Analytical Biochemistry. 239,70-76.
- Bolton J. L., Trush M. A., Penning T. M., Dryhurst G., et Monks T. J. (2000).** Role of quinones in toxicology. Chemical Research in Toxicology. 13, 135.
- Bougatef A., Hajji M., Lassoued I., Triki-Ellouz Y., Nasri M. (2009).** Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. Food Chemistry. 114, 1198-1205.
- Boulekbache L. (2005).** Profil GC-MS des polyphénols d'une plante médicinale : *Eucalyptus globulus*. Thèse de Magister. Université de Bejaïa, 71p.
- Bozin B., Mimica-Duric N., Samojlik I., Goran A., Igetic R. (2008).** Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L. Alliaceae), Food Chemistry. 111, 925-929.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., et Berset C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Science and Technology. 28, 25–30.
- Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. médicales internationales Editions Technique et Documentation. 647-673.
- Bruneton, J. (1993).** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 2ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.
- Brzozowska J., Hanower P., Tanguy J. (1973).** Polyphenols des feuilles de cotonniers et influence sur leur composition d'un choc hydrique ou nutritionnel. Phytochemistry. 12, 2353-2357.

-C-

- Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. (2004).** Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life science. 74:2157-84.
- Cao G.H., Alessio H.M., et Cutler R.G. (1993).** Oxygen-Radical Absorbency Capacity Assay for antioxidants. Free Radical Biology and Medicine. 14, 303-311.

Carpinella C., Defago M., Valladares G., et Palacios S. (2003). Antifeedant and insecticide properties of a limonoid from *Melia azedarach* (Meliaceae) with potential use for pest management. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 369-74.

Castilla V, Barquero A.A., Mersich S.E., et Coto C.E. (1998). Antimicrobial Agents. *International Journal*. 10: 67.

Charfi D. (1995). Effet des eaux usées traitées sur les caractéristiques physico-chimiques du sol et sur la physiologie de quelques espèces végétales cultivées au périmètre d'ElHajeb (Sfax). Thèse en écologie végétale, Faculté des Sciences de Sfax.

Chiffelle Italo G., Huerta Amanda F., et Lizana Diego R. (2009). Physical and chemical characterization of *Melia Azedarach* L. fruit and leaf for use as botanical insecticide. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 69 (1), 38-45.

Chopra I.C., Gupta K.C., Nazir B.N. (1952). Preliminary study of antibacterial substances from *Melia azedarach*. *Indian Journal of Medical Research*. 40, 511-5.

ChungK., Wong T.Y., Wei C., Huang Y., Lin Y. (1998). Tannins and human health. *Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition*. 38, 421-464.

Cook N.C., Samman S. (1996). Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*.7(2), 66-76.

Cork S.J. et Krockenberger A.K. (1991). Methods and pitfalls of extracting condensed tannins and other phenolics from plants: insights from investigations on eucalyptus leaves. *Journal of Chemical Ecology*. 17 (1),123-134.

Couto R.O., Conceicao E.C., Chaul L.T., Oliveira E.M.S., Martins F.S., Bara M.T.F., Rezende K.R., Alves S.F., et Paula J.R. (2012). Spray-dried rosemary extracts: Physicochemical and antioxidant properties. *Food Chemistry*. 131, 99-105.

Cowan M.M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Research*. 12 (4), 564-582.

Crozier A., Clifford M.N., Ashihara H. (2006). Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Ed. Blackwell Publishing Ltd.

-D-

D'Ambrosio M., et Guerriero A. (2002), Degraded limonoids from *Melia azedarach* and biogenetic implications, *Phytochemistry*. 60, 419-424.

Dharani N., Rukunga G., Yenesew A., Mbora A., Mwaura L., Dawson I. et Jamnadass R. (2010). Common Antimalarial Trees and Shrubs of East Africa: Description of Species and a Guide to Cultivation and Conservation through Use. Dawson I (ed). The World Agroforestry Centre (ICRAF), Nairobi, Kenya.

Dubois G.E., Grosbay G.A., Saffron P. (1977). Non nutritive Sweeteners: Taste structure relationships with for some new simple dihydrochalcones. *Science*.195: 397-399.

-E-

Edenharder R., et Grünhage D. (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutation Research*. 540, 1–18.

El-Agamey A., Lowe G.M., McGarvey D.J. Mortensen V., Phillip D.M., Truscott T.G. (2004). Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 430 (1), 37–48.

Erdogan Orhan, E. Guner, N. Ozturk, F.S. Senol, S. Aslan Erdem, M. Kartal, B. Sener. (2012). Enzyme inhibitory and antioxidant activity of *Melia azedarach* L. naturalized in Anatolia and its phenolic acid and fatty acid composition. *Industrial Crops and Products* 37. 213–218.

-F-

Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. et Abdelly C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*. 331(5):372–379.

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

Faye Mamadou, (2010). Nouveau procédé de fractionnement de la graine de neem (*Azadirachta indica* A.juss) senegalais : production d'un bio-pesticide d'huile et de tourteau. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse, spécialité Sciences des Agroressources.

-G-

Garima Mishra, Sunil Jawla, Vikas Srivastava (2013). *Melia azedarach*: a review. *International Journal of Medicinal Chemistry and Analysis*. 3(2), 53-56.

Gauche E., et Hausswirth C. (2006). Stress oxydant, complémentation nutritionnelle en antioxydants et exercice. *Science and Motricité*. 58, 43-66.

Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V.M., Azzolini Ana E.C.S., et Fonseca Maria J.V. (2003). Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the Chemiluminescence Method. *American Association of pharmaceutical Scientists*. 5 (2), 1-5.

Ghimeray A.K., Jin C.W., Ghimire B.K., et Cho D.H. (2009). Antioxidant activity and quantitative estimation of azadirachtin and nimbin in *Azadirachta Indica* A. Juss grown in foothills of Nepal. *African Journal of Biotechnology*. 8(13), 3084-3091.

-H-

- Hadjiakhoondi A., Yatandoost H., et Khanan M. (2006).** Fatty acid composition and toxicity of *Melia azedarach* L. Fruit against Malaria Vector *Anopheles Stephensi*. Iran Journal of Pharmaceutical Sciences. 2(2), 97–102.
- Hajaniaina (1996).** Produits de l'arbre neem en lute antiacridienne : expériences à Madagascar.
- Hajaniaina OM. (1996).** Évaluation de l'efficacité de lutte traditionnelle contre les poux du riz par l'utilisation des plantes *Buddleja Mada-gascariensis* Lamark et *Fucraea gigantea*. Vent, ENS, université d'Antananarivo, p. 37.
- Halliwell B. (1994).** Free radicals, antioxidant and human disease: curiosity, cause or consequence. The Lancet, 344 (8924), 721-724.
- Halliwell B., et Gutteridge J. M. C. (1990).** Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods Enzymology.186, 1-85.
- Hammad E. M. A., Zournajian H., et Talhouk S. (2001).** Efficacy of extracts of *Melia azedarach* L. callus, leaves and fruits against adults of the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* (Hom., Aleyrodidae). Journal of Applied Entomology.125, 483-488.
- Harbone J.B. (1993).** Introduction to Ecological Biochemistry, 4th Ed; Academic Press: London.
- Haslam E. (1996).** Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. Journal of Natural Products. 59, 205-215.
- Heimeur N., Idrissi Hassani L.M., et Amine Serghini M. (2004).** Les polyphénols de *Pyrus mamorensis* (Rosaceae). Reviews in Biology and Biotechnology. 3 (1), 37-42.
- Hennebelle T., Sahpaz S., et Bailleul F. (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. Phytothérapie. 1, 3-6.
- Hennebelle T., Sahpaz S., Skaltsounis A.L., et Bailleul F. (2007).** Phenolic compounds and diterpenoids from *Marrubium peregrinum*. Biochemical Systematics and Ecology. 35,624-626.
- Hodek P., Trefil P., et Stiborova M. (2002).** Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. Chemico-Biological Interaction.139,1–21.
- Honglei Zhou., Atsuko Hamazaki., Jose Domingos Fontana., Hironobu Takahashi., Tomoyuki Esumi., Carolina Bueno Wandscheer., Hiroaki Tsujimoto., et Yoshiyasu Fukuyama (2004).** New ring C-*seco* limonoids from brazilian *Melia azedarach* and their cytotoxic activity. Journal of Natural Products. 67 (9), 1544-1547.

Huang D., Ou B., et Prior R.I. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.53, 1841-1856.

Huang Ruo Chun., Kenjiro Tadera., Fumio Yagi., Yuji Minami., Hiroaki Okamura., Tetsuo Iwagawa et Munehiro Nakatani (1996). Limonoids from *Melia Azedarach*. *Phytochemistry*. 43 (3), 581-583.

Hubert A.J. (2006). Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaine, Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse, école doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries, spécialité : qualité et sécurité des aliments, p 174.

-I-

Ismail M.Y.M., Assem N.M., et Zakriya M. (2010). Botanicals Promoting Oral and Dental Hygiene: A Review. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*.1, 202-206.

Italo Chiffelle G., Amanda Huerta F., et Diego Lizana R. (2009). Physical and chemical characterization of *Melia azedarach* L. of fruit and leaf for use as botanical insecticide. *Chilean journal of agricultural research*. 69 (1), 38-45.

-J-

Jabri-Karoui I., Bettaieb I., Masaada K., Hammami M., et Marzouk B. (2012). Research on the phenolic compounds and antioxidant activities of Tunisian *thymus capitatus*. *Journal of Functional Foods*.4, 661-669.

Jazzar Chantal et Efat Abou-Fakhr Hammad (2003). The efficacy of enhanced aqueous extracts of *Melia azedarach* leaves and fruits integrated with the *Camptotylus reuteri* releases against the sweetpotato whitefly nymphs. *Bulletin of Insectology*. 56 (2), 269-275.

Jha P., Flather M., Lonn E., Farkouh M., Yusuf S. (1995). The antioxidant vitamins and cardiovascular disease. A critical review of epidemiologic and clinical trial data. *Ann. International Medical*.123, 860.

Ji HF., Li XJ., et Zhang HY. (2009). Natural products and drug discovery: can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia. *EMBO Reports*, 10 (3), 194-200.

Juan Andreu., Albert Sans et Magi Riba (2000). Antifeedant activity of fruit and seed extracts of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on larvae of *Sesamia nonagrioides*. *Phytoparasitica*. 28 (4), 311-319.

Julkunen-Titto R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food chemistry*. 33, 213-217.

-K-

Kahouli I. (2010). Effet antioxydant d'extraits de plantes (*Laurus nobilis L.*, *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, *Oléa europea L.*) dans l'huile de canola chauffée. Thèse de Maître des sciences en génie-agroalimentaire. Université Laval Québec.

Kaneria M., Baravalia Y., Vaghasiya, Y., et Chanda S. (2009). Determination of antibacterial and antioxidant potential of some medicinal plants from Saurashtra Region, India. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 71, 406–412.

Karagozler A., Erdag B., et Calmaz Emek Y. (2008). Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*, *Food Chemistry*.111, 400-407.

Khan AV, Parveen G, Alam MM et Singh VK. (2002). Ethnomedicinal uses of Neem in rural areas of Uttar Pradesh, India. *Ethnomedicine and Pharmacognosy II, Recent Progress in Medicinal Plants*. Institution of Engineering and Technology Publishing.7, 319-326.

Khatoun S., Singh H., et Goel A. (2011). Use of HPTLC to establish the chemotype of a parasitic plant, *Dendrophthoe falcata* (Linn. f.) Etting. (Loranthaceae), growing on different substrates. *Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*. 24, 60-65.

Kim S. J., Murthy H. N., Hahn E. J., Lee H. L., et Paek K. Y. (2007). Parameters affecting the extraction of ginsenosides from the adventitious roots of ginseng (*Panax ginseng*, C.A. Meyer). *Separation and Purification Technology*.56 (3), 401-406.

Kolesnikov M.P., et Gins V.K. (2001). Phenolic substances in medicinal plants. *Applied Biochemistry Microbiology*.37 (4), 392-399.

Ksouri R., Megdiche W., Debez A., Falleh H., Grignon C., et Abdelly C. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry*.45, 244-249.

-L-

Lamaison JLC, et Carnet A. (1990). Teneurs en principaux flavonoids des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret D. C) en fonction de la vegetation. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 65, 315–320.

Landis G.N., et Tower J. (2005). Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mechanisms of Ageing Development*. 126: 365–379.

Larson R. A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*.27 (4), 969-978.

Lee K.W., Hur H.J., et Lee C.Y. (2005). Antiproliferative effects of dietary phenolic substances and hydrogen peroxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 1990-1995.

Leong L.P., et Shui G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*. 76, 69-75.

Li C., Oldham C.D., et May S.W.N. (1994). N-Dimethyl-1,4-phenylenediamine as an alternative reductant for peptidylglycine. Alpha-amidating mono-oxygenase catalysis. *Biochemical Journal*. 300, 31-36.

Linderschmidt R., Trylka A., Good M., et Witschi H. (1986). The effects of dietary butylated hydroxytoluene on liver and colon tumor development in mice. *Toxicology*. 387, 151-160.

Loche J. (1966). Contribution à l'étude des polyphénols de la plante de tabac (Seita, ed). Ann de la direction des études et de l'équipement, France, 3 : 15.

Luis J. C., et Johnson C. B. (2005). Seasonal variations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary extracts. Analysis of their *in vitro* antiradical activity. *Spanish Journal of Agricultural Research* . 3(1), 106-112.

Luthria D.L. (2008). Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. *Food Chemistry*. 107, 745-752.

Mitsuda H., Yasumodo K., Iwami F. (1996). Antioxidant action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyo to Shokuryo*. 19, 210-214.

-M-

Maciel, MV., Morais, SM., Bevilaqua, CML., Camurça-Vasconcelos, ALF., Costa, CTC., Castro, CMS. (2006). Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 140, 98-104.

Maisuthisakul P., Suttajit M., et Pongsawatmmit R. (2007). Assessment of phenolic content and free radical scavenging capacity of some that indigenous plants. *Food Chemistry*. 100, 1409-1418.

Marino Grazia., Gaggia Francesca., Filippo Saiano., Bruno Biavati et Bruno Marangoni. (2009). Elimination of *in vitro* bacterial contaminants in shoot cultures of 'MRS 2/5' plum hybrid by the use of *Melia azedarach* extracts. *European Journal of Plant Pathology*. 123, 195-205.

- Meziti A., Meziti V., Boudiaf K., Benboubetra M., et Bouriche H. (2012).** Polyphenolic Profile and Antioxidant Activities of *Nigella Sativa* Seed Extracts *In Vitro* and *In Vivo*. World Academy of Science. Engineering and Technology. 64 :24-32.
- Middleton E., Kandaswami C., et Theoharides T.C. (2000).** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological Reviews*.52, 673-839.
- Milane H. (2004).** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat en Sciences Domaine : Pharmacochimie, Université Louis Pasteur Strasbourg I.
- Miller N. J., Rice-Evans C., Davies M. J., Gopinathan V., et Milner A. (1993).** A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Sciences*. 84,407–412.
- Mohammad Sabir A., Frank Sosulski W., et Alexander Finlayson J. (1974).** Chlorogenic acid-protein interactions in sunflower. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.22 (4), 575- 578.
- Mohammed Fazil Ahmed et Srinivasa Rao. A. (2013).** Comparative *In vivo* antioxidant activities of selected medicinal plants. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 4 (3),5-10.
- Mohammed Fazil Ahmed, Srinivasa Rao A., Shaik Rasheed Ahemad et Mohammed Ibrahim. (2012)** Phytochemical studies and antioxidant activity of *Melia azedarach* leaves by DPPH scavenging. *International Journal of Pharmaceutical Applications*. 3(1), 271-276.
- Mohd. Fazil Ahmed, Mohd. Ashwaq Ahmed, Hameed Thayyil, Khaja Zameeruddin et Mohd. Ibrahim. (2008)** Antioxidative Activity of *Melia azedarach* Linn Leaf Extract. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*.7(1),31-34.
- Mompon B., Lemaire B., Mengal P., et Surbled M. (1998).** Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. Ed. INRA, Paris (les Colloques, N° 87).
- Mortensen A., Skibsted L.H., et Truscott T.G. (2001).** The interaction of dietary carotenoids with radical species, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 385 (1), 13–19.
- Mugnai E. (2009).** *Azadirachta indica*: Neem tree, the “village pharmacy”. ASAT- Associazione Scienze Agrarie Tropicali.
- Mukohata Y., Nakabayashi S., et Higashida M. (1978).** Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation. *Journals in Biochemistry*. 85: 215– 218.

-N-

Naczk M., et Shahidi F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography*.1054, 95-111.

Naczk M., et Shahidi F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 1523-1542.

Nahak G. et Sahu R. K. (2010). In vitro antioxidative acitivity of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* Leaves by DPPH scavenging assay. *Nature and Science*. 8(4), 22-28.

Nahak G. et Sahu RK. (2010). In vitro antioxidative acitivity of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* Leaves by DPPH scavenging assay. *Natural Sciences*. 8(4),22-28.

Nakatani M., Takao H., Miura I., et Hase T. (1985). Azedarachol, a steroid ester antifeedant from *Melia azedarach* var. *japonica*. *Phytochemistry*. 24:1945–8.

Nawaz H., Shi J., Mittal G. S., et Kakuda Y. (2006). Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*. 48(2): 176-181.

Nijveldt R. J., Nood E., HoornD.E., Boelens P.G., Norren K., et Leeuwen P. (2001). Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutural*. 74, 418–425.

Nitsch J.P., et Nitsch C. (1961). Synergistes naturels des auxinex et des giberellines. *Bulletin de la Société de France*. 26, 2237-2240.

Ntalli N. G., Menkissoglu-Spiroudi U., et Giannakou I. (2010). Nematicidal activity of powder and extracts of *Melia azedarach* fruits against *Meloidogyne incognita*. *Ann. Applied. Biology*. 156, 309-317.

-O-

O’Kennedy R., et Thornes R.D. (1997). Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action. John Wiley et Sons. New York.

Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine, *Japanese Journal of Nutrition*. 44, 307-315.

Özgüven M., et Tansi S. (1998). Drug yield and essential oil of *Thymus vulgaris* L as in influenced by ecological and ontogenetical variation. *The Turkish Journal of Agriculture and forestry*.22, 537-542.

-P-

Paabo M., Bates R. G., et Robinson R. A. (1966). Dissociation of Acetic Acid-d3 in Aqueous Solution and Related Isotope Effects from 0 to 50°. *The Journal of Physical chemistry.* 70(2) 540-543.

Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Rosas-Romero A., Flerlage N., Burillo J., et Codina C. (2002). Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *Journal Agricultural and Food Chemistry.* 50, 6882–90.

Park H. J., and Cha H. C. (2003). Flavonoids from leaves and exocarps of the grape Kyoho. *Korean journal of biological society.* 7, 327-330.

Pitchaon M., Suttajit M., et Pongsawatmani R. (2007). Assessment of phenolic content and free radical scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry.* 100, 1409-18.

Pitt C.G., Bao Y., Thompson J., Wani M.C., Rosenkrantz H., et Metterville J. (1986). Esters and lactones of phenolic amino carboxylic acids: prodrugs for iron chelation. *Journal of Medicine and Chemistry.* 29, 1231–1237.

Pokorny J., Yanishlieva N., et Gordon M. (2001). Antioxidants in food, *Practical Applications*, Cambridge Woodhead publishing limited 2001; 72(5):145-71.

Popov I., Lewin G., et Baehr R. (1987). Photochemiluminescent detection of antiradical activity. I. Assay of superoxide dismutase. *Biomedica Biochimica Acta.* 46, 775–779.

Price M.L., Van scoyoc S., et Butler L.G. (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain, *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 26, 1214-1218.

Priscila D.A., Brandão M.G.L., et Elzíría A. (2009). Chromatographic evaluation and antimicrobial activity of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) leaves hydroalcoholic extracts. *Revista Bras Farmacognosia.* 19: 510–15.

Pryor W.A. (2000). Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials, *Free Radical Biology and Medicine.* 28: 141–164.

-R-

Rahman I., Biswas S.K., Kirkham P.A. (2006). Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical Pharmacology.* 72, 1439-1452.

Rahman I. (2002). Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic target. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 1(3), 291-315.

Rangkadilok N., Sitthimonchai S., Worasuttayangkurn L., Mahidol C., Ruchirawat M., et Satayavivad J. (2007). Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruits extract. *Food Chemical and Toxicology*. 45, 328-336.

Ramya S., Jepachanderamohan P.J., Alaguchamy N., Kalayanasundaram M., et Jayakumararaj R. (2009). *In Vitro* Antibacterial Prospective of Crude Leaf Extracts of *Melia azedarach* Linn. against Selected Bacterial Strains. *Ethnobotany Leaf*.13, 254-258

Rai N., Grover A., et Bhandari B.S. (2011). Antimicrobial Activity of Medicinal plants- *Azadirachta indica* A. Juss, *Allium cepa* L. and *Aloe vera* L. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*.3, 1059-1065.

Rastogi R.P., et Mehrotra B.N. (1991). Compendium of Indian Medicinal Plants. Vol. I. CSIR Publication, India. (1),1991-833.

Rastogi RP et Mehrotra BN. Compendium of Indian Medicinal Plants. Vol. III. CSIR Publication, India. (1) 831.

Rastogi R.P. (1998). Compendium of Indian Medicinal Plants. Vol. V. CSIR Publication, India. (1), 1060.

Ribéreau-Gayon P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Ed.Dunod, Paris.173 - 201.

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., et Pridham J.B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*. 22(4), 375-83.

Rice-Evans C.A., Miller N.J., et Paganga G. (1996). Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical of Biology and Medecine*. 20: 933–956.

Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., Sudraud P. et Ribéreau-Gayon P. (1982). Composés phénoliques. In «*Traité d’oenologie, sciences et technique du vin* ».Edition Dunod.477-499.

Rodriguez-Rojo S., Visentin A., Maestri D., et Cocero M.J . (2012) . Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents .*Journal of Food Engineering*. 109, 98–103

-S-

Santoso J., Yoshie-Stark Y., et Suzuki T. (2004). Anti-oxidant activity of methanolextracts from Indonesian seaweeds in an oil emulsion model. *Fisheries Science*.70(1), 183–188.

Samudram P., Vasuki R., Rajeshwari H., Geetha A., et Sathiya Moorthi P. (2009). Antioxidant and antihepatotoxic activities of ethanolic crude extract of *Melia azedarach* and *Piper longum*. *Journal of Medecine and Plant Research*. 3, 1078–1083.

- Saleem R., Rani R., Ahmed M., Sadaf F., Ahmad S.I., Zafar N., Khan S.S., Siddiqui B.S., Lubna, Ans ari F., Khan S.A., et Faizi S (2008).** Effect of a cream containing *Melia azedarach* flowers on skin diseases in children. *Phytomedicine*, 15(4), 231-236.
- Saleem R., Ahmed S.I., Faizi. S., et Siddiqui B.S. (2002).** Antibacterial effect of *Melia azedarach* on rabbits . *Phytotherapy Research*. 16(8),762-4.
- Sanchez-Moreno C. (2002).** Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Sciences and Technology International*. 8(3), 121-137.
- Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A., et Saura-Calixto F. (1998).** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of Sciences and Food Agricultural*.76, 270-276.
- Scalbert A. (1991).** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*.30, 3875-3883.
- Senthil S., et Nathan (2006).** Effects of *Melia azedarach* on nutritional physiology and enzyme activities of the rice leaf folder *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 84, 98–108.
- Shahidi F., Janitha P.K., et Wanasundara P. (1992).** Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 32, 67-102.
- Sharma P.C., Yelne M.B., et Dennis T.J. (2001).** Data base on Medicinal plants used in Ayurveda, (Documentation and Publication Division, Central Council for Research in Ayurveda and Siddha, New Delhi.389-406.
- Scherer R., et Godoy H.T. (2009).** Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method of *Food Chemistry*. 112, 654–658.
- Scherer R., et Godoy H.T. (2009).** Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method of *Food Chemistry*. 112, 654–658.
- Shisheng L., Jiangzhen D., et Shouxun Z. (2000).** Minor phenolic constituents of chinaberry-tree (*Melia azedarach*). *Chinese Traditional and Herbal Drugs*.31, 86-89.
- Schmutterer H. (1995).** The Neem tree. Ed, VCH Weinheim. 605–33.
- Shi-BiaoWu Yan-Ping J.i., Jing-Jing Zhu, Yun Zhao, Gang Xia, Ying-He Hu, Jin-Feng et Hu. (2009).** Steroids from the leaves of Chinese *Melia azedarach* and their cytotoxic effects on human cancer cell lines. journal homepage: www.elsevier.com/locate/steroids. 74,761–765.
- Siddiqui B.S., Afshan F., et Gulzar T. (2003).** Tetracyclic triterpenoids from the leaves of *Azadirachta indica* and their insecticidal activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 51, 415–17.

Smith A.R., Shenvi S.V., Widlansky M., Suh J.H., et Hagen T.M. (2004). Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Current Topics in Medicinal Chemistry*.11, 1135– 1146.

Smith M.A., Perry G., Richey P.L., Sayre L.M., Anderson V.E., et Beal M.F. (1996). Oxidative damage in Alzheimer's [letter]. *Nature*, 382: 120.

Subapirya R., et Nagini S. (2005). Medicinal properties of neem leaves: a review. *Current Medecine of Chemistry Anticancer Agents*. 5,149–56

Subapirya R., et Nagini S. (2005). Medicinal properties of neem leaves: a review. *Current Medecine of Chemistry Anticancer Agents*.5, 149–56

Sumitra Chanda V., et Mital Kaneria J. (2012) Optimization of Conditions for the Extraction of Antioxidants from Leaves of *Syzygium cumini L.* Using Different Solvents. *Food Analytic Methods* 5:332–338.

Svoboda K.P., et Hampson J.B. (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department.

-T-

Tamer Fouad M.D. (2003). Free radicals, Types, sources and damaging reactions, Internal

Timbo B. (2003). Etude phytochimique et des activités biologiques de *Trichilia Emetica Vahl (Meliaceae)*.Thèse doctorale. Université de Bamako. Faculté de Médecine, de Pharmacie Et d'Odonto-Stomatologie, 112.

Tsimogiannins D.I., Oreopoulou,V. (2006). The contribution of flavonoid C-ring on DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovative Food Science Emerging Technologies*.7, 140-146.

Medicine Articles. (<http://www.doctorslounge.com/primary/articles/>)

Turkmen N., Sari F., et Velioglu Y.S. (2006). Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food Chemistry*. 99 (4), 835-841.

-V-

Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., et Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*.160,1–40.

Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J., et Telser J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 266, 37–56.

Van Antwerpen P. (2006). Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système myeloperoxydase / peroxyde d'hydrogène /chlorure. Thèse de doctorat en Sciences Pharmaceutiques, Académie universitaire Wallonie-Bruxelles.

Van Acker S., van Balen G.P., van den Berg D.J., et van der Vijgh W.J.F. (1996). Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochemical Pharmacology*.56, 935– 943.

Vergara R., Escobar C. et Galeano P. (1997), Potencial insecticida de extractos de *Melia azedarach* L. (Meliaceae). Actividad biológica y efectos. *Revista Facultad Nacional Agronomia Medellín*.50, 186.

Viot S. (2004). Les petites protéines de stress et leur rôle dans la mort cellulaire. Etude de leur fonction chaperon à travers l'exemple de la mutation R120G de l' $\alpha\beta$ -cristalline. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard-Lyon 1.

-W-

Walker J.E.M., Saraste M.J., Runswick et Gay. N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha-and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Journal of the European Molecular Biology Organization*, abrégé en *EMBO*.1 (8), 945-51.

Wang T., Jónsdóttir R., et Ólafsdóttir G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry* 116: 240–248.

Watt J. (1889). Dictionary of economic plants of india. Superintendent, Government printing Press, India.

Wayner D.D.M., Burton G.W., Ingold K.U., et Locke S. (1985). Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Letters*.187, 33-37.

Wei-Ming Zhang, Jie-Qing Liu, Xing-Rong Peng, Luo-Sheng Wan, Zhi-Run Zhang, Zhong-Rong Li and Ming-Hua Qiu. (2014). Triterpenoids and Sterols from the Leaves and Twigs of *Melia azedarach*. *National Product and Bioproduct*.4:157–162

Winston G.W., Regoli F., Dugas A. J., Fong J.H., et Blanchard K. A. (1998). A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biology and Medicine*. 24, 480–493.

-Y-

Yang Y., et Zhang F. (2008). Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Ultrasonics Sonochemistry*.15(4), 308-313.

Yao L.H., Jiang Y.M., SHI J., Tomas-Barberan F.A., Datta N., Singanusong R., et Chen S.S. (2004). Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant Food for Human Nutrition*.59 ,113-122.

Yoshida H., Ishikawa T., Hosoi H., Suzukawa M., Ayaori M., et Hisada T. (1999). Inhibitory effect of tea flavonoids on the ability of cells to oxidize low density lipoprotein. *Biochem Pharmacol*, 58 : 1695–703.

-Z-

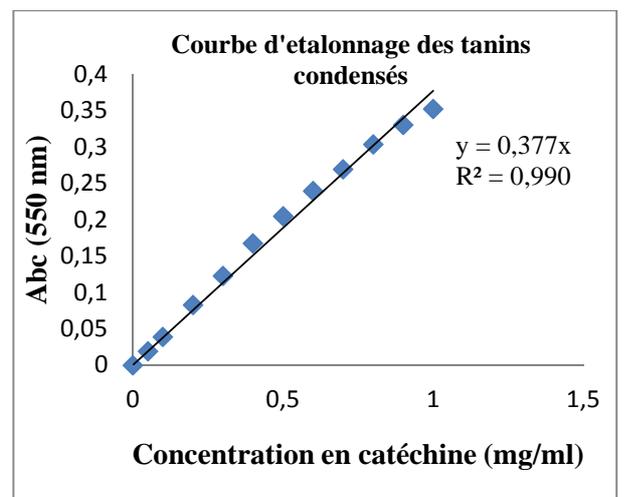
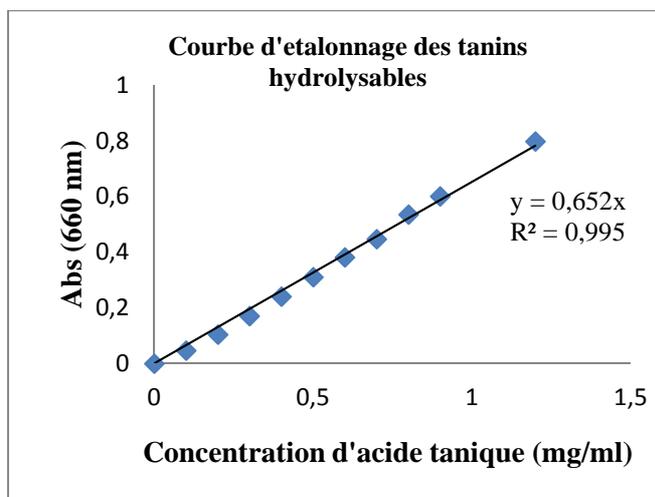
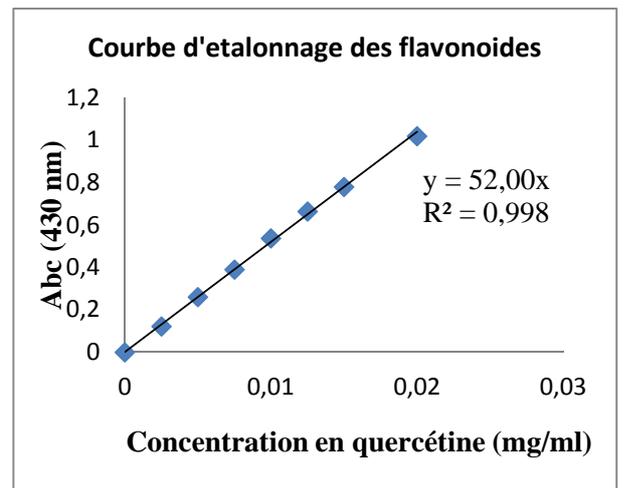
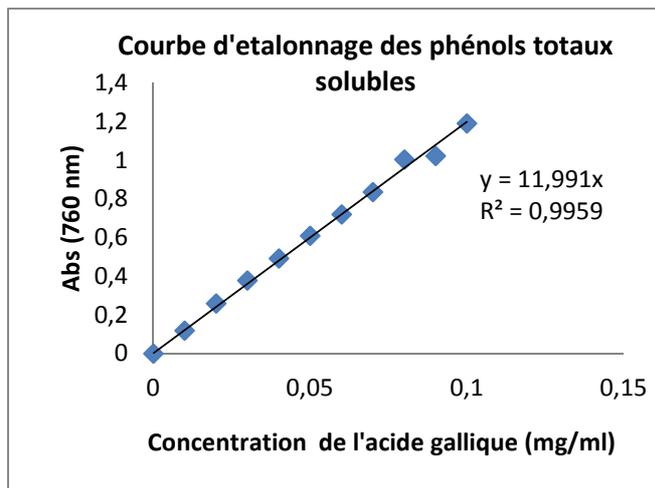
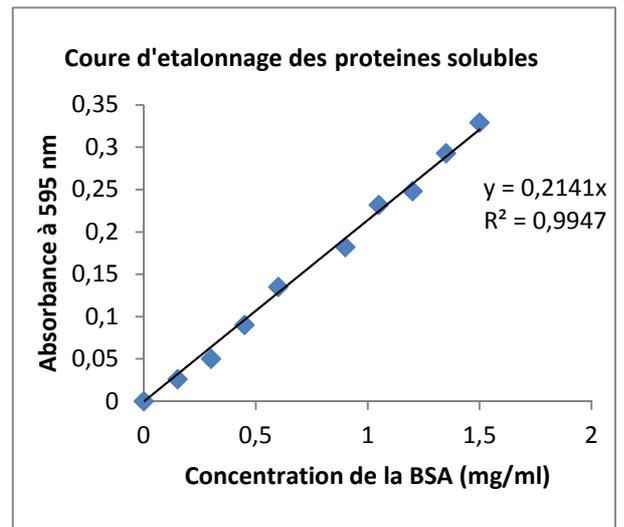
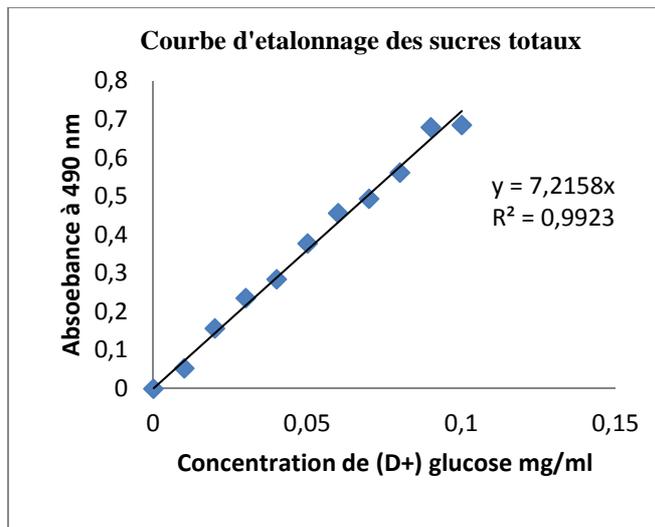
Zaouali Y., Chograni H., Trimech R., and Boussaid M. (2013). Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis L.* var. *typicus* Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity. *Industrial Crops and Products* .43, 412– 419.

Zhang Y., Vareed S.K., et Nair M.G. (2005). Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Sciences*.76, 1465-1472.

Zhao C.C., Shao J.H., Li X., Xu J., et Zhang P. (2005). Antimicrobial constituents from fruits of *Ailanthus altissima* SWINGLE. *Archives of Pharmacal Research*.28, 1147–51.

ANNEXES

Annexes I : Courbes d'étalonnage



Annexe II : préparation des solutions

Solution	Réactifs
Folin ciocalteau 1/10	10 ml de folin ciocalteau à +90ml d'eau distillée
Tampon Acétate (0,2 M acide acétique et 0,17M NaCl)	11.4 ml D'acide acétique +9.86 g NaCl +800ml eau distillé le pH est ajusté à 4.9 avec NaOH (4N) le volume est ajusté à 1L avec l'eau distillée.
HCl (0,001M)	0.085ml d'HCl 36% est ajusté à 1litre avec l'eau distillée.
Chlorure ferrique FeCl ₃ (0,01M dans HCl 0,01 M)	0,083 ml de HCL concentré dilué dans un 1 L d'eau distillée puis en dissout 1,62 g de FeCl ₃ dans cette solution
BSA	1mg de BSA dans 1ml du tampon acétate
Phénol 5% (p/v)	5 g de phénol sont dissout dans 100 ml d'eau distillée, la solution doit être incolore et limpide, stable à température ambiante.
Ferrozines 5mM	0,123g ferrozines dans 50 ml d'eau distillé
FeCl ₂ à 2mM	0,025g de FeCl ₂ .2H ₂ O dans 100ml d'eau distillé
Vanilline-Acide sulfurique (H ₂ SO ₄)	1g vanilline +2ml H ₂ SO ₄ dans 1000 ml de methanol
Solution DPPH (0,025 g/l)	0,025 g DPPH dans 1000 ml méthanol pur
Ferricyanure de potassium (K ₃ Fe(CN) ₆)1%	1g de K ₃ Fe(CN) ₆ dans 100mld'eau distillée
Acide trichloracétique(TCA) 10%	10g de TCA dans 100ml d'eau distillée.
Chlorure ferrique (FeCl ₃) à 0,1%	0.1g de FeCl ₃ dans 100 ml d'eau distillée.
Chlorure d'Aluminium (AlCl ₃ 2%, P/V)	2g AlCl ₃ .6H ₂ O dans 100ml de méthanol
Vanilline a 5.8 % (P/V)	5.8g de vanilline dans 100ml de méthanol
Réactif de Bouchardat	2g d'iode bisublimé (I ₂) + 2 g de KI dans 100ml d'eau distillée
Tampon phosphate (0,2M, pH 7)	0.68 g de KH ₂ PO ₂ dans 50 ml d'eau distillée. 0.87g de K ₂ HPO ₂ dans 50 ml d'eau distillée. la solution acide est ajuster avec la solution basique jusqu'à l'obtention d'un pH 7.
Carbonate de sodium (Na ₂ CO ₃) à 7.5%	7.5 g dans 100 ml de l'eau distillée
Réactif de Liebermann et Burchard	5 ml d'acétique anhydride +5 ml d'acide sulfurique concentré + et 50 ml d'éthanol

Annexes

	(Préparé à basse température et juste avant utilisation).
L'acide sulfurique à 1,25%	Pour préparer 1000 ml H ₂ SO ₄ 1,25% <ul style="list-style-type: none"> • On prélève un volume de 12,755 ml H₂SO₄ à 98% puis complété avec 987,244 ml d'eau distillée
d'hydroxyde de potassium (KOH) à 1,25%	Dissoudre 12,5 g de KOH dans 1000 ml d'eau distillée
Tampon phosphate (0,1 M, pH 6,5)	1.36 g de KH ₂ PO ₂ dans 100 ml d'eau distillée. 1.74 g de K ₂ HPO ₂ dans 100 ml d'eau distillée. la solution acide est ajuster avec la solution basique jusqu'à l'obtention d'un pH 7.
sulfate d'ammonium 80%	Peser 80 g de sulfate d'ammonium dans ?????
Réactif de Bradford	<ul style="list-style-type: none"> - 100 mg de poudre de bleu de coomassie G250 - 50 ml d'éthanol 96 % - 100 ml d'acide ortho-phosphorique à 85 % - Le mélange résultant est ajusté avec de l'eau distillée à un volume de 1000 ml
soude à 40%	40 g de NaOH dans 100 ml d'eau distillée
Acide sulfurique 0,02N	H ₂ SO ₄ (MM= 98,07g/mole, d= 1,84, %= 97 %)
vanilline/méthanol (4%, m/v)	4 g de vanilline dans 100 ml de méthanol

Résumé : Activité antioxydante d'extraits de *Melia azedarach*

Melia azedarach est une plante largement utilisée dans la pharmacopée, pour le traitement de diverses affections ou maladies de l'homme (eczéma et soulagement des attaques asthmatiques) et dans la protection phytosanitaire (traitement insecticide). Elle est utilisée en Algérie comme tonique et antipyrétique.

La première partie de cette étude concerne la caractérisation physico-chimique des poudres de feuilles, l'extraction et quantification des composés phénoliques et mise en évidence de la présence d'autres métabolites secondaires. La deuxième partie porte sur l'étude des activités antioxydantes.

Les résultats obtenus montrent la richesse des extraits en polyphénols avec des teneurs de 13,825 à 16,224 mg Eq AG/g MS ; la teneur élevée a été obtenue par l'éthanol (50%). Les tests de l'activité antioxydante montrent que tous les extraits présentent des propriétés antioxydantes à différents niveaux ; l'extrait éthanolique (50%) possède une meilleure capacité réductrice de tous les extraits (63,88%, IC50 = 0.903 mg/ml), une forte capacité de piégeage des radicaux DPPH° (85,98%, IC50 = 2.722 mg/ml) et une meilleure protection contre la peroxydation lipidique au cours du temps. L'extrait aqueux a révélé un pouvoir de chélation plus important (85,62%, IC50=0,781mg/ml). L'extrait éthanolique (70%) a exprimé une activité de blanchiment de β -carotène intéressante par rapport aux autres extraits (68,17%).

Les résultats montrent que tous les extraits possèdent des propriétés antioxydantes variables dues aux teneurs en composés phénoliques et à d'autres métabolites secondaires identifiés dans les extraits de feuilles de *Melia azedarach*.

Mots clés : *Melia azedarach*, composés phénoliques, métabolites secondaires, activité antioxydante.

Summary: Antioxidant activity of extracts of *Melia azedarach*

Melia azedarach is a plant widely used in the Pharmacopoeia, for the treatment of various conditions or diseases of humans (eczema and relief of asthmatic attacks) and plant protection (insecticide treatment). It is used in Algeria as tonic and fever reducer.

The first part of this study concerning the physico-chemical characterization of powders of leaves, the extraction and quantification of compounds phenolic and put in evidence for the presence of other secondary metabolites. The second part focuses on the study of the antioxidant activities.

Results show the richness of polyphenols that assayed extracts from 13,825 to 16,224 mg Eq AG/g DM; the high content was obtained by ethanol (50%). Antioxidant activity tests show that all extracts exhibit antioxidant properties at different levels; the ethanolic extract (50%) has a better reductive capacity of all extracts (63.88%, IC50 = 0.903 mg/ml), a strong capacity of DPPH° radical scavenging (85.98%, IC50 = 2.722 mg/ml) and better protection against lipid peroxidation during the time. The aqueous extract showed a greater chelating power (85.62%, IC50 = 0.781 mg/ml). The ethanolic extract (70%) expressed a bleaching activity of interesting β -carotene compared with other extracts (68.17%).

The results show that all extracts have varying antioxidant properties due to the levels of phenolic compounds and other secondary metabolites identified in extracts of leaves of *Melia azedarach*.

Key words: *Melia azedarach*, phenolic compounds, secondary metabolites, antioxidant activity.

ملخص :

Melia azedarach نبتة تستعمل كثيرا في ميدان الصيدلة و ذلك لعلاج التهابات مختلفة للإنسان (الأكزيما وتخفيف حالات مرض لربو) و في حماية النباتات

(كمبيدات الحشرات)

الجزء الاول من هذه الدراسة تتعلق بالتوصيف الفيزيائي و الكيميائي لمسحوق اوراق النبتة المعنية. استخلاص وتقدير المركبات الفينولية و الجزء الثاني ندرس فيه الانشطة المضادة للاكسدة.

النتائج تظهر غنى المستخلصات الفينولية بمقادير تتراوح من 13.82 الى 16.22 مغ ما يعادل AG/g للمادة الجافة تم الحصول على نسبة اعلى من قبل الايثانول 50%.

الاختبارات لمظلمات الاكسدة لمختلف المقادير مستخلص ايثانول 50% يحتوي على خاصية الارجاج لكل المستخلصات 63.88%, IC50=0.90350مغ/مل) قدرة كبيرة لتثبيت الجذور DPPH(85.98%, IC50=2.722مغ/مل و اكثر حماية ضد الاكسدة الدهنية مع مرور الوقت. المستخلص المائي اظهر قدرة تثبيت عالية(85.62%, IC50=0.781مغ/مل). المستخلص الايثانولي(70%) اظهر نشاط تبييض β كروتين مهمة بالنسبة للمستخلصات الاخرى ب(68.17%).

النتائج تظهر ان كل المستخلصات تحتوي على خصائص ضد الاكسدة متنوعة بسبب المستويات المختلفة للمركبات الفينولية و المركبات الثانوية المحددة في مستخلص ورق النبتة المعنية .

كلمات البحث: *Melia azedarach*, مركبات فنولية, مركبات ثانوية, نشاط ضد الاكسدة .