

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



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

**Réf :.....**

**Mémoire de Fin de Cycle**  
**En vue de l'obtention du diplôme**  
**MASTER**  
**Spécialité : Biochimie Appliquée**  
***Thème***

**Etude de l'interaction entre l'extrait de plante  
médicinale *Fraxinus angustifolia* et la protéine  
BSA**

**Présenté par : MEHENNI Saouba & MOKRAOUI Imane**

**Soutenu le : 26 Juin 2018 à 09h00**

**Devant le jury composé de :**

<b>Mme BAZIZI- CHAHER. N</b>	<b>MCB</b>	<b>Encadreur</b>
<b>Mr BOUADAM.S</b>	<b>MAA</b>	<b>Examineur</b>
<b>Mme BENSALEM. S</b>	<b>MCB</b>	<b>Présidente</b>

**Année universitaire : 2017/2018**

## *Remerciements*

*Au terme de ce travail nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage et la patience de mener à fin ce mémoire.*

*On tient à exprimer nos chaleureux remerciements à notre promotrice Mme Bazizi-Chaher Nassima de nous avoir fait l'honneur de nous encadrer et accompagner dans la réalisation de ce travail, pour sa présence, ses conseils, ses orientations, sa gentillesse et sa confiance, veuillez trouver ici l'expression de nos sincères considérations.*

*Nous adressons également nos remerciements aux membres de jury d'avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Nous exprimons aussi toute notre sympathie pour l'ensemble du personnel et toute l'équipe du laboratoire de biophysique et de génégénétique.*

*A l'enseignant Dr. SAOU Abdelhamid, du département d'hydraulique, pour son soutien et ses conseils.*

*On tient à exprimer nos sincères remerciements à tous les enseignants qui nous ont formé pendant ce parcours universitaire*

*En fin, on remercie toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail par un soutien moral ou matériel*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail, tout d'abord et spécialement à ma chère mère «Memou ouiza», Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je te porte, ni la profonde gratitude que je témoigne pour tous les efforts que tu n'as jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être.*

*A mon très agréable père « laid », qui s'est tant sacrifié pour moi, qui s'est toujours donné du mal pour assurer mon bien être.*

*J'espère que je suis à la hauteur de ce que vous attendez de moi.*

*A ma deuxième mère « ma grande mère» que dieu vous accorde santé, bonheur et longue vie.*

*A ma sœur unique «Asma», mes frère «Mohammed Amine», «Zine Eddine» et notre petit ange «Abd Erraouf », vous m'aviez toujours aidé et ces quelques lignes sont insuffisantes pour exprimer mon profond amour et ma reconnaissance que dieu vous aide à réaliser vos vœux les plus chers.*

*A mes chers ancêtres et leurs femmes, mes tantes et leurs maries, A mes chers cousins et cousines et à tous les membres de la famille Mokraoui, Memou, Harimi petits et grands, puisse Dieu nous garder toujours unis.*

*A quelqu'un de si exceptionnel, mon soutien moral et source d'encouragement pour ta présence au continu et tes conseils, je tiens à te dire merci infiniment que dieu te comble de bonheur.*

*A celle dont j'ai eu l'honneur de partager le cursus universitaire «Saouba» merci pour ta patience ton grand cœur et ta volonté.*

*A celles qui j'ai trouvé la joie, à ma plus chère amie «kahina», «Assia», «Ahlem», «Rabia», «Zineb», «Hizia», , «warda», «wissem», «Ibtissem» et «Assia» en souvenir de notre sincère amitié et des moments agréables, je vous dédie ce travail et je vous souhaite tout le bonheur, et à tous mes amis.*

*A mes adorables collègues avec qui j'ai partagé le travail au laboratoire merci infiniment «Kenza», «Sihem», «abd el hafid», «Nadia» et «Lydia» pour vos aides, charités, générosité et leurs gentillesse. Merci pour votre énergie, votre soutien et pour le partage de connaissances.*

*A tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail*

*A toutes la promotion de biochimie appliquée*

*Imane*

## Dédicaces

*Je dédie ce travail*

*A ma très chère mère qui m'accompagné depuis que j'étais petite, qui nous a quittée et j'espère que dieu l'accueille dans son vaste paradis, qui aurait été fière de moi.*

*A mon très agréable père «**Layachi**», qui s'est tant sacrifié pour moi, qui s'est toujours donné du mal pour assurer mon bien être. J'espère que je suis à la hauteur de ce que vous attendez de moi.*

*A ma chère grand-mère «**Hadda** » qui m'accompagné par ses prières, sa douceur, puisse Dieu lui prêter long vie et bcp de santé et de bonheur.*

*A mon cher oncle «**Ahmed**» je suis très reconnaissante et je ne te remercierai jamais assez pour ton amabilité, ta générosité, ton aide précieuse.*

*Ames très chères sœurs «**Rbiha** et **Samia** » Mes chères frères «**Nasro**, **Zahire**, **Adel**, **Fouad**, **Zaken**, **Khaled** » aucune Dédicace ne serait exprimer l'affection et l'amour que j'éprouve envers vous .*

*A mes nièces «**Amira**, **Hawa**, **Rimas**, **Dina**, **Liza**, **Rinad**, **Ghofrane** » » aucune dédicace ne serait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous , votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur*

*A mes belles sœurs «**Houria**, **Lynda**, **samia**, **fadila**, **houda** »*

*A mes chers ancêtres particulièrement «**mbarak**», mes tantes et leurs maries, A mes chers cousins et cousines et à tous les membres de la famille Mehenni ,boumaaza petits et grands, puisse Dieu nous garder toujours unis.*

*A ma très chère amie et binome **Imane** et à toutes sa famille*

*A mes adorables collègues avec qui j'ai partagé le travail au laboratoire merci infiniment «**Kenza**», «**Sihem**», «**abd el hafid**», «**Nadia**» et «**Lydia**» pour vos aides, charités, générosité et leurs gentilleses.*

*A mes amies et collègues «**Zahira**, **Ibtissam**, **Assia**, **Hizia**, **Zineb**, **Ahlem**, **Rabia** » en souvenir de notre sincère amitié et des moments agréables, je vous dédie ce travail et je vous souhaite tout le bonheur.*

*A toute la promotion Biochimie appliquée et toute l'équipe du laboratoire*

saouba

## **Liste des abréviations**

SAB : Sérum Albumine Bovin

SAH : Sérum Albumine Humain

EAG : Equivalent acide gallique

EAT : Equivalent acide tannique

EQ : Equivalent quercétine

U V. Visible : ultra violet visible

DO : Densité optique

$\rho$ : Masse volumique

pH : potentiel d'hydrogène

## Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Photographie de l'arbre de <i>Fraxinus angustifolia</i> .	2
02	Représentation de la structure du BSA indiquant les domaines et les accepteurs.	8
03	Mécanismes monodentellé et multidentellé.	9
04	modèle de précipitation des protéines par les composés phénoliques.	9
05	Différents types de liaisons impliquées dans l'interaction polyphénols-protéines.	10
06	Effet des carbohydrates sur l'interaction tanins protéine.	13
07	Photographie des feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i> .	15
08	Photographies de feuilles sèches et de poudre de <i>F. angustifolia</i> .	16
09	Etape de dosage des polyphénols totaux.	17
10	Etape de dosage des flavonoïdes.	18
11	Etape de dosage des tannins.	19
12	Protocole expérimental de l'effet de la concentration des extraits de plante sur l'interaction extrait de plante –protéine.	20
13	Protocole expérimental de l'effet de concentration de NaCl.	21
14	Protocole expérimental de l'effet de concentration du glucose.	22
15	Protocole expérimental de l'effet de pH.	22
16	Teneur en différents composés phénolique de <i>F.angustifolia</i> .	24
17	Variation de la DO en fonction des concentrations de l'extrait de <i>Fraxinus angustifolia</i> .	26
18	Variation de la densité optique en fonction de la force ionique de l'extrait de <i>Fraxinus angustifolia</i> .	27
19	Variation de densité optique en fonction de la concentration du sucre de l'extrait de <i>Fraxinus angustifolia</i> .	28
20	Variation de l'absorbance du complexe extrait de plante-BSA dans un tampon phosphate à différents pH.	29

## Liste des tableaux

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Noms vernaculaires de <i>Fraxinus angustifolia</i> .	<b>3</b>
<b>II</b>	Principales classes des composés phénoliques.	<b>4</b>
<b>III</b>	Composition Atomique de la BSA.	<b>6</b>
<b>IV</b>	Composition en acides aminés de la BSA.	<b>7</b>
<b>V</b>	Listes des produits chimiques et les appareils utilisés.	<b>14</b>

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	

## Sommaire

Introduction .....	1
--------------------	---

### *I-Synthèse Bibliographique*

<b>I.1.</b> Description botanique de la plante <i>Fraxinus angustifolia</i> .....	3
<b>I.1.2.</b> Habitat .....	4
<b>I.1.3.</b> Noms vernaculaires .....	4
<b>I.1.4.</b> Taxonomie de <i>Fraxinus</i> .....	4
<b>I.1.5.</b> Les composants phytochimiques .....	5
<b>I.1.6.</b> Propriétés et Intérêt pharmacologique .....	6
<b>I.2.</b> Généralités sur les protéines globulaires .....	6
<b>I.2.1.</b> Compositions et propriétés physico-chimiques de sérum albumine bovin .....	6
<b>I.2.2.</b> La structure de BSA.....	8
<b>I.3.</b> Interactions polyphénols protéines .....	9
<b>I.3.1.</b> Principe de complexation et de précipitation .....	9
<b>I.3.2.</b> Nature de l'interaction .....	10
<b>I.3.3.</b> Les paramètres influençant l'interaction entre les polyphénols et protéines .....	11
<b>I.3.3.1.</b> Les Paramètres intrinsèques .....	11
<b>I.3.3.2.</b> Les paramètres extrinsèques .....	12

### *II-Matériel et méthodes*

<b>II.1.</b> Appareillage et produits chimiques.....	15
<b>II.2.</b> Matériel végétal .....	16
<b>II.2.1.</b> Récolte.....	16
<b>II.2.2.</b> Préparation des extraits à partir des feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i> .....	16
<b>II.2.3.</b> Extraction éthanolique .....	17
<b>II.3.</b> Analyse quantitative des composés phénoliques.....	18
<b>II.3.1.</b> Dosage des phénols totaux .....	18

<b>II.3.2.</b> Dosage des flavonoïdes .....	19
<b>II.3.3.</b> Dosage des tannins .....	19
<b>II.4.</b> Etude de l'interaction polyphénols - protéines (BSA) .....	20
<b>II.4.1.</b> Effet de la concentration de l'extrait de plante .....	21
<b>II.4.2.</b> Effet de la force ionique .....	21
<b>II.4.3.</b> Effet de concentration du sucre .....	22
<b>II.4.4.</b> Effet de pH .....	23

### *III-Résultats et discussion*

<b>III.1.</b> Etude phytochimique .....	24
<b>III.1.1.</b> Dosage des phénols totaux .....	24
<b>III.1.2.</b> Dosage des flavonoïdes .....	25
<b>III.1.3.</b> Dosage des tannins .....	25
<b>III.2.</b> Interaction polyphénols-BSA .....	26
<b>III.2.1.</b> Effet de la concentration de l'extrait .....	26
<b>III.2.2.</b> Effet de la force ionique sur l'interaction polyphénols-protéines .....	27
<b>III.2.3.</b> Effet de concentration du sucre sur l'interaction polyphénols - protéines .....	28
<b>III.2.4.</b> Effet de pH.....	29
Conclusion.....	32
Références bibliographiques .....	33
Annexes	

## Introduction

Depuis des milliers d'années, les plantes trouvées dans la nature, ont été utilisées pour traiter et soigner diverses maladies (**Sanago, 2006**).

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) environ 65 à 80% de la population a recours à la médecine traditionnelle et aux plantes médicinales pour satisfaire en soins de santé parce que les plantes ont pu démontrer une réelle efficacité et en raison du manque des médicaments essentiels et les couts élevés de ces dernier expliquent le recours aux pratique de la médecine traditionnelle (**MA et al., 1997**).

Les plantes contiennent des métabolites secondaires essentiels à la vie de la plante, qui vont faire des interactions avec les protéines, ces derniers faisant intervenir différent types de liaisons qui dépendent de nombreux facteurs liées au milieu réactionnel et jouent un rôle dans le traitement de certains produits alimentaires (**Sarni-Manchadou et Cheynier, 2006**).

Récemment les interactions covalentes entre protéines et l'acide caféique ont été exploitées pour améliorer la formation du réseau de gel de la gélatine, en leur donnant une meilleure résistance mécanique et une plus haute stabilité thermique (**Strauss et Gibson, 2004**).

Dans cette étude on s'intéresse au sérum albumine bovin qui est une protéine possède l'habileté à se complexer avec les polyphénols, souvent utilisée comme protéine modèle pour la complexation du concept d'interaction des protéines avec les polyphénols, elle détire plusieurs fonctions biologiques (transport de molécules bioactives et permet le maintien de la pression oncotique), sa conformation globulaire possèdent une séquence très similaire au sérum albumine humaine (HSA) ce qui la rend une protéine de choix (**Carvalho et al, 2004**).

Une attention particulière a été donnée ces dernières années à l'utilisation des polyphénols pour leur fixation sur des macromolécules, essentiellement les protéines, qui peuvent amener à la formation des complexes solubles et insolubles, ces composés phénoliques jouent un rôle important dans la croissance et la reproduction, fournissant une protection contre les agents pathogènes et les prédateurs, ils sont répartis presque dans tous les aliments d'origine végétale, dans les fruits, légumes et les boissons (**Hertog et al., 1993 ; Bravo, 1998 ; Papadoupoulo et Frazier, 2004**). De ce fait, quelles sont les mécanismes régissant l'étude de l'interaction avec les paramètres qui l'influence ?

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est d'étudier les interactions entre la BSA et les composés phénoliques de *Fraxinus angustifolia*. Le travail est reparti en trois chapitres initiés par une recherche bibliographique où nous rapportant une description botanique de la plante

étudie, son habitat, sa taxonomie, les composants phytochimiques, leurs propriétés, leur intérêt pharmacologique, composition, propriétés physicochimique du sérum albumine bovin, sa structure, interactions polyphénols protéines, nature d'interaction et les différents paramètres influençant cette dernière.

La partie pratique est subdivisée en deux chapitres ; le premier est consacré au matériel et méthodes qui comprennent une analyse quantitative des composés phénoliques incluant le dosage des polyphénols, flavonoïdes et les tannins. Ainsi une étude des différents facteurs qui ont un effet sur l'interaction. Le deuxième est consacré aux résultats et discussions qui illustrent les résultats obtenus ainsi que leurs interprétations à la lumière de la littérature.

Enfin, une conclusion générale qui portera sur une lecture attentive des différents résultats obtenus.

### I.1. Description botanique de la plante *Fraxinus angustifolia*

*Fraxinus angustifolia* est un arbre qui peut atteindre les 20 mètres de hauteur et peut vivre jusqu'à 200 ans à écorce de couleur grise et lisse présentant des fissures longitudinales (**Figure 01**) (**Rameau et Dumé, 1989 ; Gerard, 2006**).

Par contre les rameaux et les feuilles sont opposés et chacune des feuilles est en forme caduque comportant 5 à 13 folioles qui sont dentées en forme de scie. Les bourgeons sont brunâtres et les inflorescences sont en grappes allongées de 5 à 7 cm, les fruits sont des samares à aile allongée ; contenant une seule graine ovale (**Rameau et Dumé, 1989**).

*Fraxinus* est une espèce héliophile et thermophile du même nom frêne oxyphylle, son domaine d'adaptation est en zone humide. Elle apprécie mieux les sols basiques répondant à un pH basique à neutre. (**Rameau et al., 1989**).



**Figure 01** : Photographie originale de l'arbre de *Fraxinus angustifolia*.

### I.1.2. Habitat

Les frênes oxyphylles sont des plantes ligneuses des régions tempérées et tropicales ; qui sont présentes en région méditerranéenne, dans le sud de l'Europe, le nord de l'Afrique (Nord de l'Algérie et du Maroc) et dans l'ouest de l'Asie (jusqu'à l'ouest de l'Iran). On les retrouve au bord des rivières, la vallée de la Loire, du Rhône et de ses affluents (Rameau *et al.*, 1989 ; Kostova et Lossifova, 2007 ; Wallander, 2008).

### I.1.3. Noms vernaculaires

Les noms vernaculaires de *Fraxinus angustifolia* sont énumérés dans le tableau I.

**Tableau I** : Noms vernaculaires de *Fraxinus angustifolia* (Rameau et Dumé, 1989).

Le nom vernaculaire kabyle	Aslen, Thaslent.
Le nom vernaculaire arabe	Derdar
Le nom vernaculaire anglais	Narrow leaved ash, Southem ash.
le nom vernaculaire français	Frêne oxyphylle, Frêne à feuille étroites
appellation scientifique	<i>Fraxinus angustifolia</i> .

### I.1.4. Taxonomie de *Fraxinus*

On compte plus de 65 espèces de genre *Fraxinus* dans le monde (Wallander, 2008) dont *Fraxinus angustifolia* a été placée dans la position taxonomique suivante :

Règne : Végétal

Embranchement : Spermaphytes

Sous Embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Oléales

Famille : Oléacées

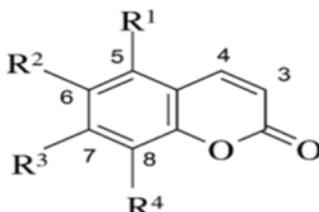
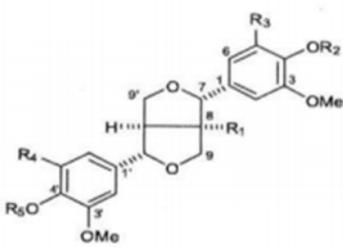
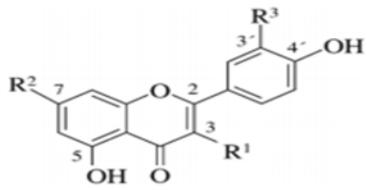
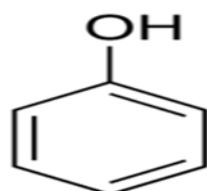
Genre : *Fraxinus*

Espèce : *Fraxinus angustifolia*

### I.1.5. Les composants phytochimiques

Le genre de *Fraxinus* est caractérisé par la présence des composés phénoliques biologiquement actifs. Parmi eux, on trouve : les coumarines, lignans, flavonoïdes et phénol simple (tableau II).

**Tableau II** : Principales classes des composés phénoliques (kostova et Lossifova, 2007).

Classe	Structure	Exemple
Coumarines		Esculine Esculetin Fraxitine
Lignans		Pinoresinole Pinoresinol O-B-D Glucopyranoside
Flavonoïdes		Rutine quercétine
Phénols simples		Catéchol

### I.1.6. Propriétés et Intérêt pharmacologique

Les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpènes présents dans la plante ont un intérêt multiple dans différents domaines ; à savoir l'alimentation, cosmétologique, dermatopharmaceutique. Ces composés phénoliques, contiennent des métabolites primaires

(possèdent un rôle très important dans la croissance et le développement de la plante) et des métabolites secondaires (sont indispensables à l'adaptation de la plante avec son environnement) (**Sarni-manchdo, 2006**).

Depuis longtemps, les frênes sont utilisées pour le traitement de la fièvre, le rhumatisme, la goutte, l'œdème, les calculs, la constipation ainsi le traitement des ulcères et des plaies ; elles sont caractérisées par une croissance rapide avec un bois dur, ceux qui les considèrent d'une grande valeur (**Gruenwald et al., 2007**).

Des études scientifiques ont révélé que les composés phénoliques sont utilisées aussi en médecine moderne comme antioxydant, anti-inflammatoire et diurétique (**Atmani et al., 2009 ; GIFA, 2012**). De nombreuses propriétés pharmacologiques ont été démontrées par plusieurs auteurs ; que les frênes sont également laxatives ; sudorifiques et toniques et jouent également un rôle dans la protection de certaines maladies chez l'homme telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires (**Baba-aissa, 2011**).

## **I.2. Généralités sur les protéines globulaires**

L'albumine dont le nom provient du latin albus qui signifie blanc ; est la protéine la plus abondante dans le plasma de l'homme et d'autre mammifère tels que la BSA et l'albumine de rat. Elle est synthétisée dans le foie et contrôlée par le système endocrinien essentiellement par l'insuline et par le cortisol et les hormones thyroïdiennes (**Hiyarama et al., 1990**).

### **I.2.1. Compositions et propriétés physico-chimiques de Sérum Albumine Bovine**

La BSA est une glycoprotéine qui possède un poids moléculaire très important d'environ 66 Kda. Elle est très abondante dans le plasma bovin et possède une structure presque sphérique, sa masse volumique ( $\rho$ ) dépend très peu du pH. A pH 2 ;  $\rho=1,406\text{g/cm}^3$  et dans les solutions aqueuses neutres ;  $\rho=1,36\text{g/cm}^3$  (**Gekko et Kamiyana, 2003**).

La composition atomique de la BSA est représentée dans le tableau III, sa constitution en acides aminés a été publiée pour la première fois par **Brown en 1975** ; qui a trouvé que la BSA possède 582 acide aminés et en **1990** ; **Hirayama et al** ont trouvé que cette dernière possède 607 acide aminés (Tableau IV).

**Tableau III** : Composition Atomique de la BSA.

Nombre d'atome	C	N	O	S
<b>Brown et al (1975)</b>	2926	779	879	39
<b>Hirayama et al (1990)</b>	3030	841	974	40

**Tableau IV** : Composition en acides aminés de la BSA (**Hirayama et al., 1990** ; **Brown, 1975**).

Acide aminé	Nombre de résidus	
Acides aspartique	41	41
Arginine	23	26
Asparagine	13	14
Acide glutamique	59	58
Glutamine	20	21
Histidine	17	16
Lysine	59	58
Sérine	28	32
Thréonine	34	34
Alanine	46	48
Isoleucine	14	15
Méthionine	04	05
Phénylalanine	27	30
Tryptophane	02	03
Tyrosine	19	36
Valine	36	38
Cystéine	35	35
Glycine	16	17
Proline	28	28
Total	582	604

La BSA a une forte solubilité et faible viscosité dans l'eau ceci dû à son caractère acide et à sa charge totale élevée ; qui est d'environ 185 ions par molécules à pH 7. Elle forme des complexes insolubles avec les polyphénols essentiellement avec les tanins et les flavonoïdes (**Freitas et al., 2003**).

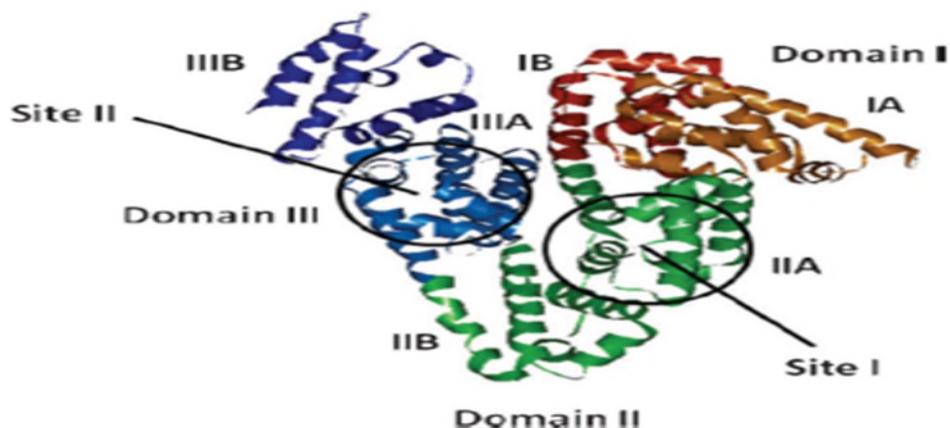
La BSA est souvent utilisée comme une protéine modèle dans nombreux domaine de recherche à savoir ; la médecine, la biologie moléculaire, l'environnement et l'agroalimentaire.

Le pourcentage de similitude entre le BSA et la HSA est de 76%. Les chercheurs supposent que les deux protéines possèdent une structure tridimensionnelle très proche .A ce sujet ; des études récentes indiquent que la principale différence entre eux réside dans le fait que la HSA a un seul résidu tryptophane dans la position 214, alors que la BSA possède deux l'une se trouve dans la position 134 du premier domaine et l'autre dans la position 212 du deuxième domaine (**Huang et al., 2004** ).

### I.2.2. Structure de la BSA

La molécule de BSA est constituée de trois domaines pratiquement homologues (I, II, III) ; chaque domaine est consécutivement le produit de deux sous-domaines (IA, IB ....), divisé en neuf boucle (L1-L9) et liés par dix-sept liaisons disulfure ; les boucles de chaque domaine se compose d'un ordre de série : grand-petit-grand ; formant un triplet (**Figure 02**) (**Papadopoulou, 2005**).

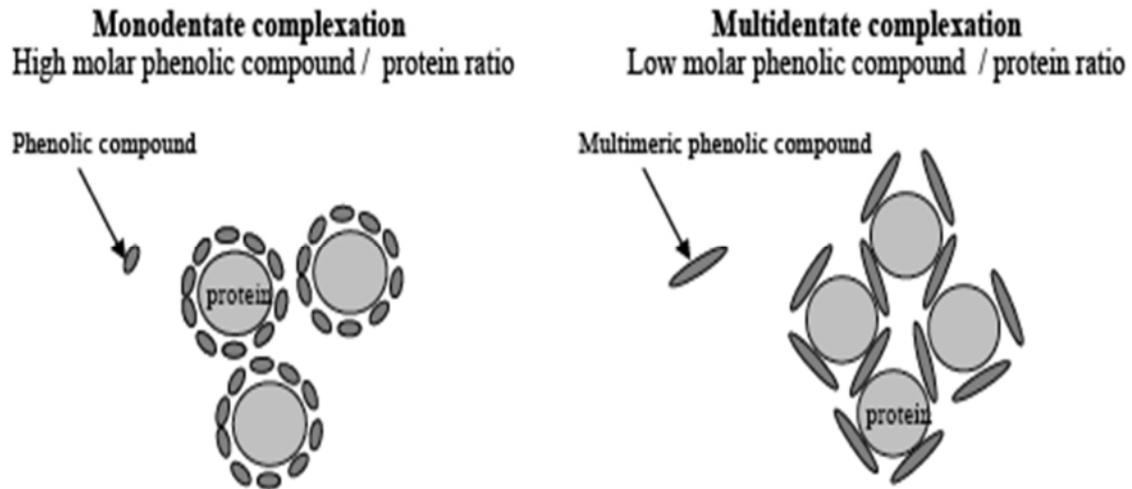
L'analyse de la structure cristalline de la BSA indique que l'attache spécifique des ligands par la protéine provient de la présence des accepteurs sélectifs de ligand nommés : site I et II situé dans les subdomain IIA et IIIA (**Chuang, 2006** ).



**Figure 02** : Représentation de la structure du BSA indiquant les domaines et les accepteurs (**Patra et al., 2012**).

### I.3. Interactions polyphénols protéines

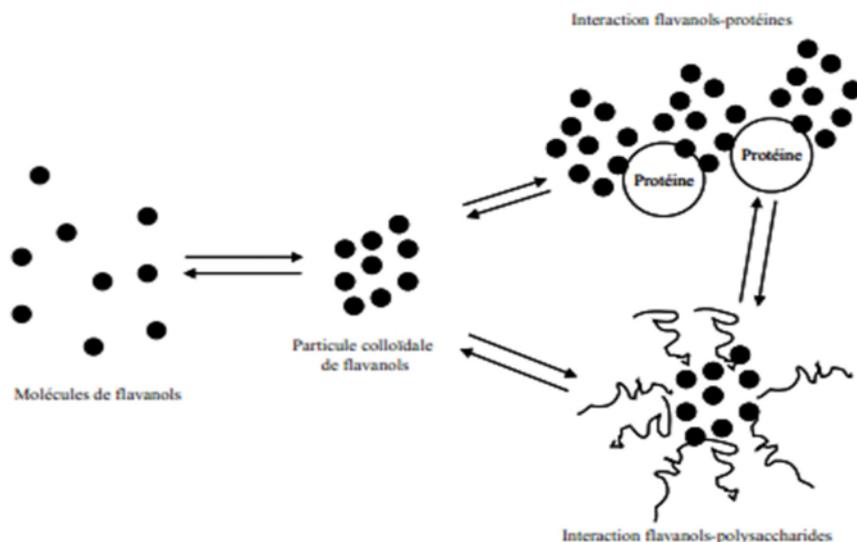
Les polyphénols peuvent interagir entre eux et avec d'autres types de molécules telles que les protéines, cela dépend des caractéristiques physico-chimiques et structurales, selon deux mécanismes : monodenté et multidenté (**Figure 03**). Ces caractéristiques lui confèrent des intérêts très importants dans l'industrie pharmaceutique et agroalimentaire (**Haslam, 1989**).



**Figure 03** : Mécanismes monodenté et multidenté proposés par **Haslam, (1989)**.

#### I.3.1. Principe de complexation et de précipitation

- Les premières recherches réalisées sur les interactions protéines- polyphénols sont fondées sur la connaissance des types d'association lors de la précipitation des protéines par les polyphénols qui ont un intérêt biologique multiple.
- Les polyphénols sont dotés d'un caractère interactionnel avec quelques protéines comme le cas des flavonoïdes qui possèdent une affinité de liaison importante et qui engendre la formation d'un complexe insoluble qui s'effectue selon un processus de reconnaissance et qui se traduit par le phénomène de précipitation (**Figure 04**) (**Haslam, 1998**).

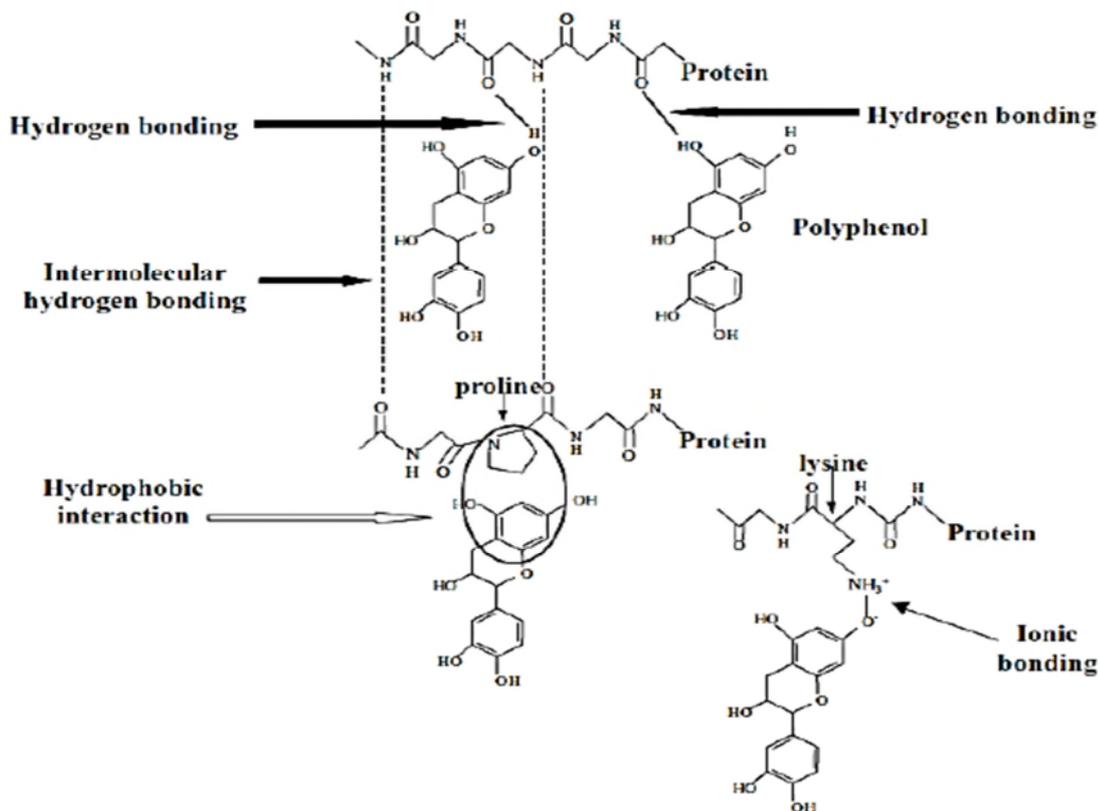


**Figure 04** : Modèle de précipitation des protéines par les composés phénoliques (Simon, 2003).

### I.3.2. Nature de l'interaction

Les principaux mécanismes d'interaction entre les polyphénols et les protéines sont en nombre de trois ; sont représentés dans la figure 05.

- **Les interactions hydrophobes** : les deux molécules protéines et polyphénols s'orientent l'une par rapport à l'autre grâce aux liaisons hydrophobes qui peuvent se produire entre le noyau aromatique des polyphénols et les acide aminés ; ce qui expliquerait la dépendance de la capacité et de flexibilité conformationnelle des polyphénols (Jöbstl et al., 2004).
- **Les liaisons hydrogènes** : se forment entre les groupements phénoliques (hydroxyles) et les groupements polaires de la protéine (azote /oxygène) (Prigent, 2005).
- **Les liaisons ioniques** : peuvent être formé entre les ions phénolates et les cations protéiques, elles ont un intérêt moins importants par rapport aux autres liaisons (Simon, 2003).



**Figure 05 :** Les différents types de liaisons impliquées dans l'interaction polyphénols-protéines (Le Bourvellec et Renard, 2012).

### I.3.3. Les paramètres influençant l'interaction entre les polyphénols et protéines

L'affinité des polyphénols avec les protéines pour former des complexes est influencée par plusieurs facteurs qu'on peut les classés on :

1. Les critères intrinsèques : liés à la nature de la protéine et polyphénols (Freitas, 2001).
2. Les critères extrinsèques : liés aux conditions réactionnelles (PH, force ionique, solvant...) (Freitas, 2001 ; Simon, 2003).

#### I.3.3.1. Les Paramètres intrinsèques

L'association des protéines aux polyphénols peut être influencée par :

- La taille : une protéine trop longue peut se replier masquant les sites de fixation et limiter la reconnaissance de quelques sites d'interaction, et d'augmenter le nombre des sites potentiels tous dépend de la concentration (Ribureau Gayon, 1968).
- La conformation.

- La composition en acides aminés.
- L'affinité des composés phénoliques pour les protéines augmente avec le degré de polymérisation des polyphénols (**Freitas et Mateus, 2001**).
- Plus les polyphénols sont liés fortement à la protéine ; plus l'interaction est importante.
- La probabilité de présence de nombre important de sites de liaison est liée à la taille des polymères ; donc elle devient élevée pour une taille plus importante (**Hagerman, 1998**).
- L'importance de la taille est limitée par la solubilité des polyphénols (**Freitas et Nuvo, 2001**).

### I.3.3.2. Les paramètres extrinsèques

#### ➤ Effet du poids moléculaires et du rapport molaire polyphénols- protéines

L'augmentation du degré de polymérisation c'est-à-dire la taille des polyphénols entraîne la formation d'un complexe avec les protéines ; ce qui engendre une précipitation rapide de la protéine (**Freitas et Mateus, 2001 ; Papadopoulou et Frazier, 2004**).

Plusieurs études ont démontré que les protéines et les polyphénols possèdent respectivement un certain nombre d'extrémités qui leurs permet la liaison entre eux. En effet, la quantité et la taille des complexes sont influencées par les concentrations des protéines et des polyphénols et par le rapport entre les deux (**Freitas et al., 2003 ; Siebert, 2006**).

En présence de faibles concentrations en protéines ; les polyphénols se complexant et forment une monocouche à la surface de la protéine à un seul site moins hydrophile par rapport à la protéine elle-même. A des fortes concentrations en protéine ; les polyphénols se complexant avec les protéines et forment des liaisons intermoléculaires tout en augmentant l'hydrophobie du complexe qui sera précipité (**camille, 2001**).

#### ➤ Effet du pH

Le pH est l'un des paramètres les plus importants lors de l'étude d'interaction entre les polyphénols et les protéines. En 2003 ; **Freitas et al**, suggèrent que les meilleurs interactions se retrouvent aux environs du pH isoélectrique où les forces de répulsion électrostatiques sont minimisées et par conséquent, une meilleure précipitation.

En 1996 ; **Naczk et al**, ont confirme que le pH, va provoquer une précipitation qui dépend à la fois du type de protéines présent dans le mélange réactionnel et la disponibilité des groupements phénoliques non ionisés.

### ➤ Effet de la température

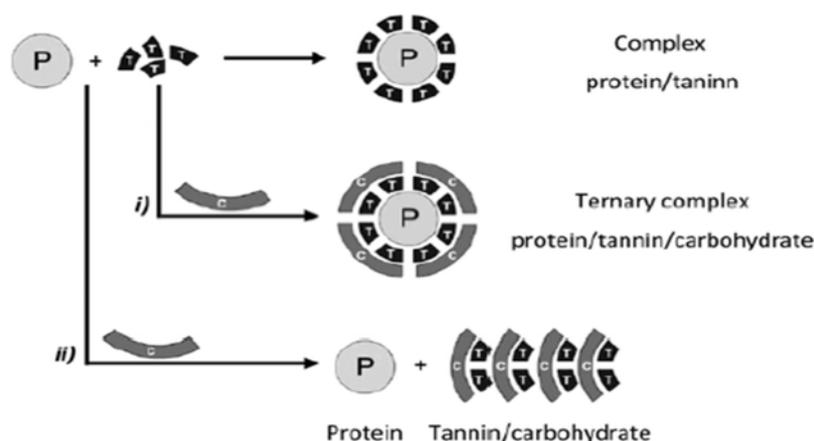
L'augmentation de la température peut causer l'augmentation des interactions hydrophobes et la diminution des liaisons hydrogènes (Siebert, 2006).

### ➤ Effet du carbohydate

Plusieurs études ont démontré que les polysaccharides sont capables d'interférer d'une manière compétitive avec les protéines lors de l'interaction avec les polyphénols (Simon, 2003 ; Mateus et al., 2004).

Les polysaccharides ont la capacité d'entrer en compétition avec les polyphénols grâce à des liaisons hydrogènes ou hydrophobes (Freitas et Mateus, 2001 ; Mateus et al., 2004).

Certains polysaccharides caractérisés par leurs capacités à développer une structure secondaire en solution aqueuse, Cela permet d'encapsuler les polyphénols grâce à des cavités hydrophobes. Ils améliorent la solubilité des complexes polyphénols-protéines et diminuant la quantité d'agrégats insolubles (Figure 06) (Haslam et al., 1998).



**Figure 06 :** Effet des carbohydrates sur l'interaction tanins protéine (Mateus et al., 2004).

### ➤ Effet de la force ionique

La force ionique du milieu réactionnel est l'un des facteurs influençant l'interaction polyphénols-protéines.

D'une part ; la présence de sels dans le milieu réactionnel provoque la diminution de taux d'agrégats ainsi formés, d'autre part, l'augmentation de la concentration des sels permet d'augmenter le taux des ions inorganiques et la réduction des répulsions électrostatiques (Simon, 2003).

Les facteurs influençant l'interaction polyphénols-protéines sont multiples, on peut encore citer :

- L'adjonction du solvant qui favorise la solubilité du complexe (**Oh et al ., 1980**).
- La présence des ions organiques et non organiques qui favorise la précipitation du complexe. (**Simon, 2003**).
- La nature des sels en solution aqueuse a une influence sur la quantité de BSA adsorbée (**Poleunis et al., 2002**).

## II.1. Appareillage et produits chimiques

Plusieurs matériel et produits chimiques ont été utilisés durant la période d'expérimentation, ils sont répertoriés dans le tableau V.

**Tableau V:** Listes des produits chimiques et les appareils utilisés.

produit chimiques	Appareils et matériels divers
-Carbonate de sodium ( $\text{NaCO}_3$ )	-Vortex
-Chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ )	-plaques magnétiques agitatrice
-Folin Ciocalteu	-Balance analytique de précision
-Méthanol	(RADWAG)
-Acide acétiques	-Centrifugeuse(SIGMA)
-Acide gallique	-pH mètre (HANNA)
-Acide tannique	-Spectrophotomètre automatisé
-Ethanol	(SPECORD 50, Analytikema)
-Quercitrine	-Agitateur électromagnétique(VELP)
-catéchine	-Etuve
-Sérum albumine bovine (BSA)	-Sonicateur de marque (VELP)
-Trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ )	-Réfrigérateur 4c°
-Triéthanolamine (TEA)	-Bain marie (MAMMERT)
-Chlorure de sodium ( $\text{NaCl}$ )	-Micropipettes
-Hydrogène phosphate de sodium ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	-tubes à essais
-Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	-Erlenmayer
-Chlorure d'hydrogène ( $\text{HCl}$ )	-Spatule
-Hydroxyle de sodium( $\text{NaOH}$ )	-Bécher
-Chlorure de sodium ( $\text{NaCl}$ )	-Cuve
-Di-hydrogène phosphate de sodium ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	-Barreau magnétique
-Glucose	-entonnoir
-Les solvants et les acides sont de marque Biochem, Prolab	-gants
-Les réactifs sont majoritairement de marque Sigma	

## II.2. Matériel végétal

### II.2.1. Récolte

Les feuilles de *Fraxinus angustifolia* utilisée dans cette étude ont été récoltées dans la forêt d'Akfadou, région de Chemini située 70 km à l'ouest de la ville de Bejaia, en juillet 2016, dans un endroit naturel loin de toute forme de perturbation.

Les feuilles de cet arbre sont montrées dans la figure 07.



**Figure 07** : Photographie originale des feuilles de *Fraxinus angustifolia*.

### II.2.2. Préparation des extraits à partir des feuilles de *Fraxinus angustifolia*

Les feuilles ont été séchées à une température ambiante dans un endroit aéré et ombragé (**Figure 08**), puis broyée par un broyeur électrique. Le broyat obtenu a été tamisé électriquement pour obtenir une poudre fine et homogène de diamètre inférieur à 63 $\mu$ m. Cette poudre à été conservée à l'abri de la lumière et de l'humidité.



**Figure 08** : Photographies originale de feuilles sèches et de poudre de *F. angustifolia*

### **II.2.3. Extraction éthanolique**

Dans ce travail l'extraction éthanolique a été réalisée par épuisement selon la procédure décrite par **Atmani et al., (2009)**. Elle consiste en une macération de la poudre fine obtenue dans l'éthanol avec un rapport de 1:4 (m:v) à température ambiante, à l'abri de la lumière et sous agitation pendant 24 h.

Après une décantation pendant 12h, le surnageant a été récupéré et une deuxième extraction identique sur le culot a été réalisée par une procédure d'extraction par épuisement. Les surnageants obtenus ont été homogénéisés et centrifugés pendant 10 min.

Le solvant a été éliminé de la solution extraite par évaporation sous pression réduite dans un rota vapeur, permettant ainsi d'obtenir l'extrait éthanolique sec. L'extrait a été stocké à 4°C jusqu'à son utilisation.

## II.3. Analyse quantitative des composés phénoliques

### II.3.1. Dosage des phénols totaux

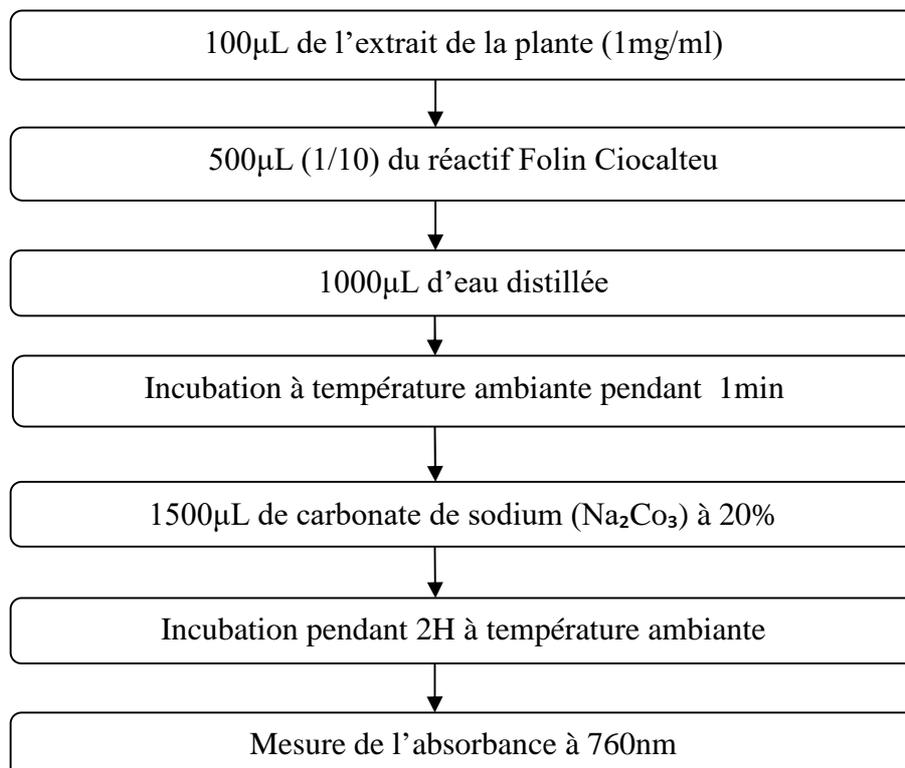
Le dosage a été effectuée en utilisant la méthode de **Djeridane et al, 2005**, à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Visible.

#### ➤ Principe

Les composés phénoliques totaux ont été estimés selon la méthode colorimétrique basée sur le réactif de Folin- Ciocalteu (**Figure 09**), ce réactif consiste en une solution de couleur jaune qui est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et l'acide phosphomolybdique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ). Lors de l'oxydation des polyphénols ; il est réduit en un mélange de l'oxydes bleus de tungstène et molybdène (**Ribéreau-Gayon et al., 1982**).

La réaction d'oxydation se traduit par la formation d'un complexe de couleur bleu qui absorbe à une longueur d'onde de 760 nm ; dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans l'extrait végétale.

L'enchaînement du processus opératoire est le suivant :



**Figure 09** : Etape de dosage des phénols totaux (**Djeridane et al, 2005**).

Le taux des polyphénols des extraits de *Fraxinus angustifolia* est exprimé en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait) ; il a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire ( $y = ax + b$ ).

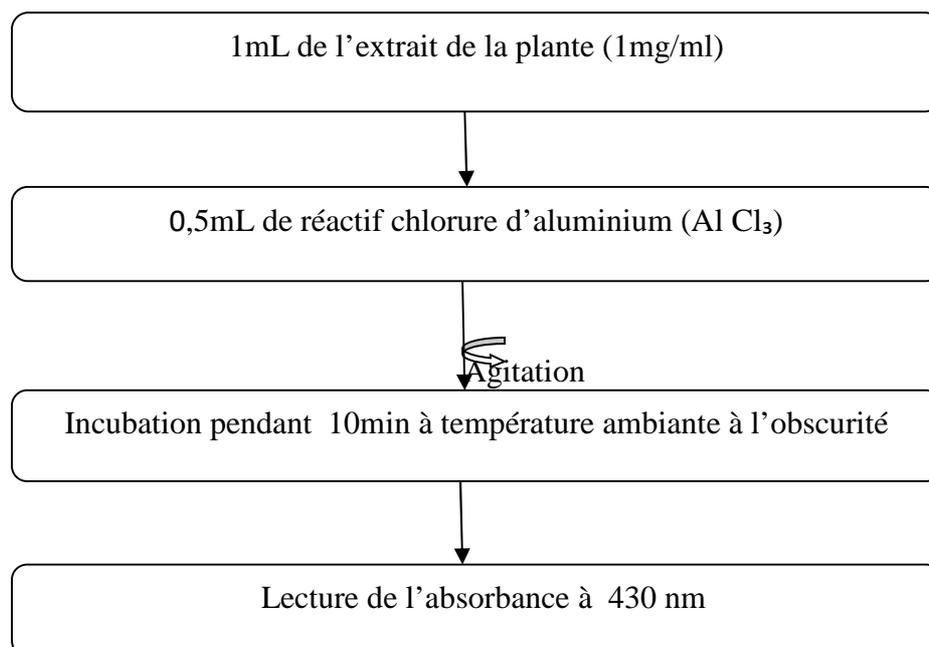
### II.3.2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été réalisée par une méthode adaptée par **Maksimovich et al, (2005)**.

#### ➤ Principe

La teneur en flavonoïdes est déterminée par la méthode du trichlorure d'aluminium (**Figure 10**). Elle est basée sur la formation d'un complexe flavonoïde-aluminium qui donne une coloration jaunâtre mesurable à une longueur d'onde de 430 nm. Ceci est dû probablement au fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux oxygènes de la molécule phénolique et qui agit comme donneur d'électrons (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

Le protocole suivi pour le dosage des flavonoïdes est le suivant :



**Figure 10** : Etape de dosage des flavonoïdes (**Maksimovich et al., 2005**).

La teneur en flavonoïdes dans notre échantillon est exprimée en milligramme (mg) équivalent quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait). Elle est calculée par référence à une courbe d'étalonnage linéaire.

### II.3.3. Dosage des tannins

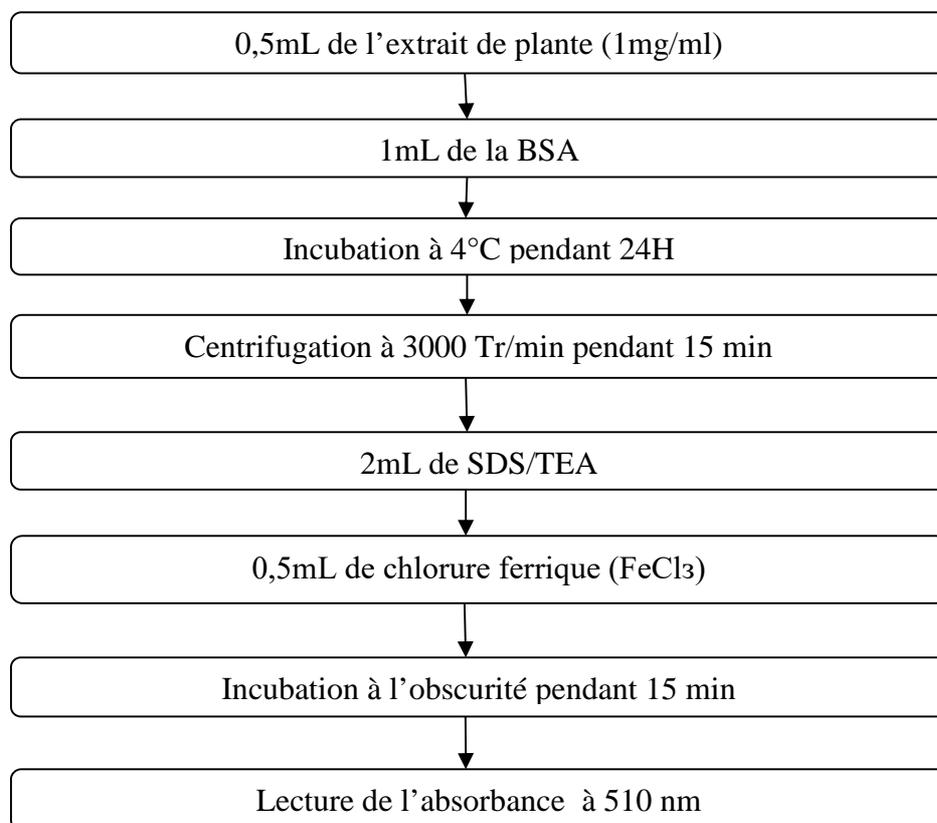
Le dosage des tannins a été estimé selon la méthode développée par **Hagerman et Butler (1978)**, ce dosage a été effectué en se basant sur deux propriétés :

- Les tannins sont connus par leur pouvoir ; qui est la précipitation des protéines en fonction des facteurs présents dans le milieu réactionnel (**Paris et Hurabeille, 1981**).
- La BSA a été utilisée dans le dosage des tannins en milieu acide pour un objectif principal ; qui est la séparation des tannins des autres polyphénols présents dans l'extrait (**Paris et Butler, 1981**).

➤ **Principe**

En milieu alcalin (SDS/TEA) ; les tannins réagissent avec le Chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) pour former des chélates de couleur violette (**Paris et Hurabeille, 1981**).

L'estimation quantitative des tannins a été réalisée suivant le protocole décrit dans la figure11 :



**Figure 11** : Etape de dosage des tannins (**Hagerman et butler, 1978**).

Les concentrations des tannins sont exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide tannique par gramme d'extrait (mg EAT/g d'extrait) ; elle est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage.

#### **II.4. Etude de l'interaction polyphénols - protéines (BSA)**

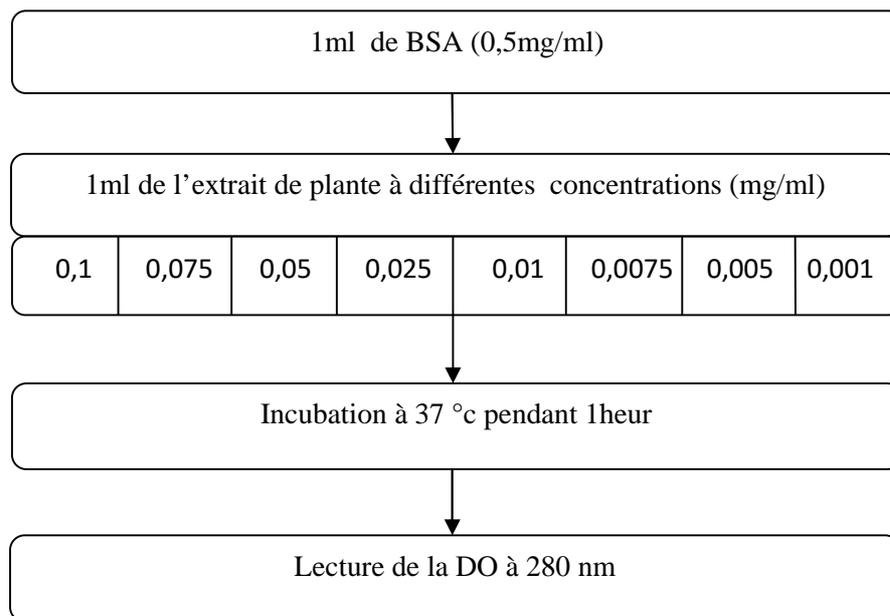
L'association entre les polyphénols et les protéines se traduit par la formation d'un complexe polyphénols-protéines et ce grâce à l'affinité de liaisons des polyphénols

(Naczck, 2006). Selon Freitas *et al*, (2001), les interactions polyphénols-protéines sont visualisables par l'aspect turbide de la solution. La densité optique de la solution est mesurée par le spectrophotomètre.

Pour étudier ce phénomène, une protéine modèle BSA a été utilisée comme référence. Le mécanisme réactionnel polyphénols-protéines dépend de plusieurs facteurs ; à savoir l'effet de la concentration d'extrait de plante, l'effet de la concentration de BSA, l'effet de la force ionique, l'effet du sucre et l'effet de pH. Ces différents facteurs sont testés pour évaluer cette présente étude.

#### II.4.1. Effet de la concentration de l'extrait de la plante

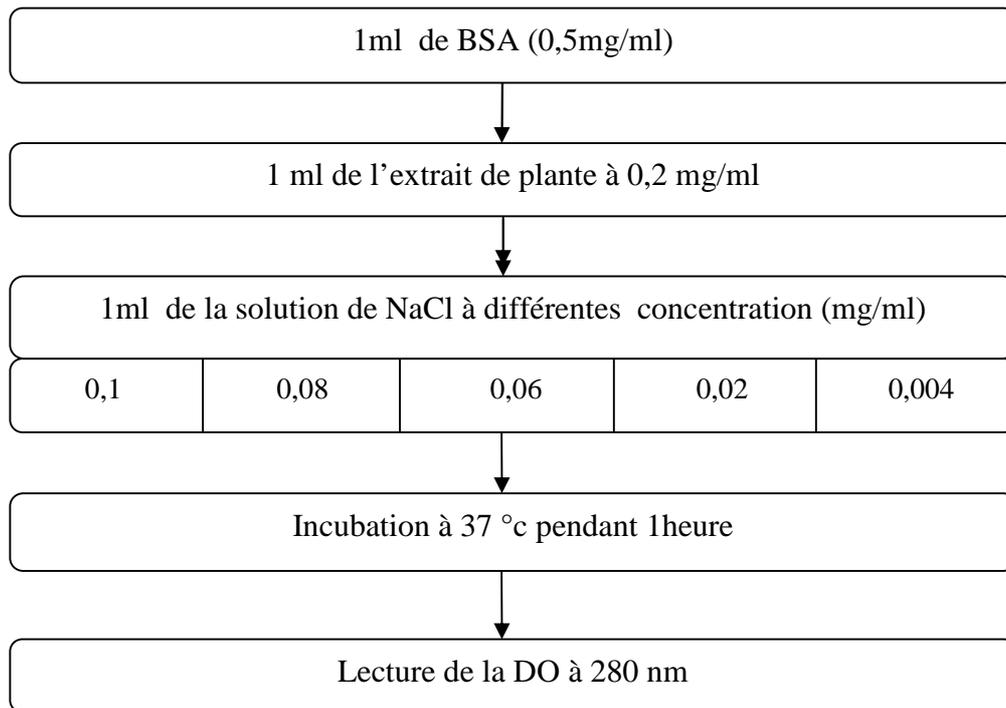
La méthode décrite par Naczck *et al*, (1996) a été utilisée avec quelques modifications, pour étudier l'influence de la concentration de l'extrait de plante sur la formation du complexe polyphénols-protéines (**Figure 12**). Cette méthode repose sur la mesure de la turbidité d'une solution contenant la BSA et l'extrait de *Fraxinus angustifolia*.



**Figure 12** : Protocole expérimental de l'effet de la concentration des extraits e plante sur l'interaction extrait de plante –BSA.

#### II.4.2. Effet de la force ionique

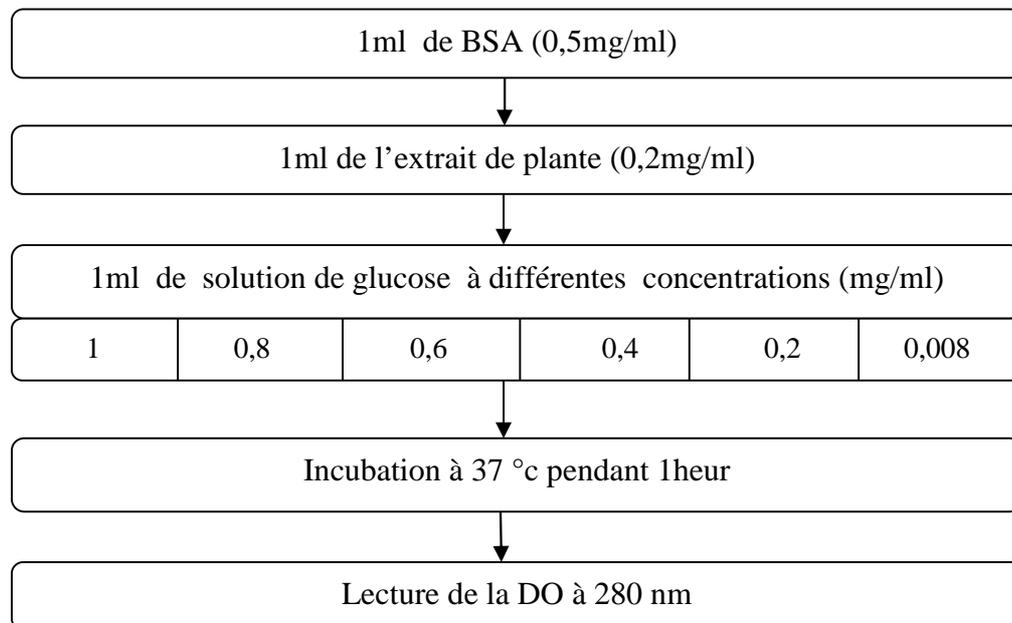
Le protocole de Freitas *et al*, (2003) modifié ; a été utilisé pour étudier l'effet du NaCl sur la formation du complexe extrait de plante- protéines (BSA). Pour ce faire, nous avons suivi les étapes énumérées dans la figure ci-après :



**Figure 13 :** Protocole expérimental de l'effet de concentration de NaCl.

#### II.4.3. Effet de concentration du sucre

Le protocole expérimental utilisé pour étudier l'influence de la concentration du sucre sur l'interaction extrait du plante protéines est celui décrit par **Freitas et al, (2003)** avec quelque modification. La figure 14 décrit les étapes suivies pour cette étude.

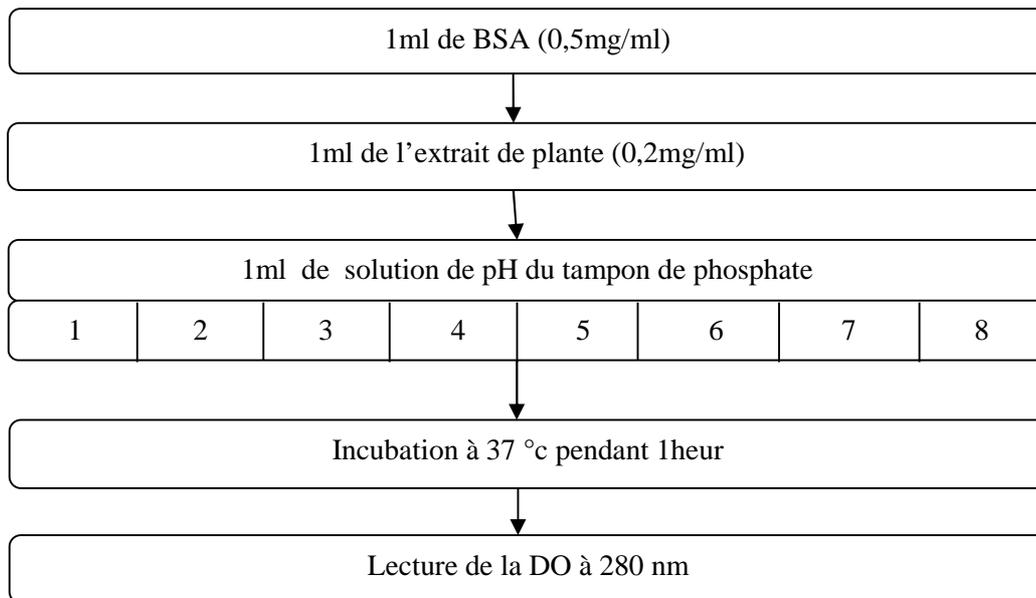


**Figure 14 :** Protocole expérimental de l'effet de concentration du glucose.

#### II.4.4. Effet de pH

A fin d'évaluer l'effet de pH sur la formation de complexe extrait de plante-protéine, la méthode de **Freitas et al, (2001)** ; a été utilisée avec quelque modification (**Figure 15**). La rutine est utilisée comme une molécule de référence pour l'étude réalisée sur les paramètres précédents (effet de la concentration de la rutine, la force ionique et le pH).

Le protocole de cette étude est résumé dans la figure ci-après



**Figure 15** : Protocole expérimental de l'effet de pH.

#### III.1.4. Analyse statistique

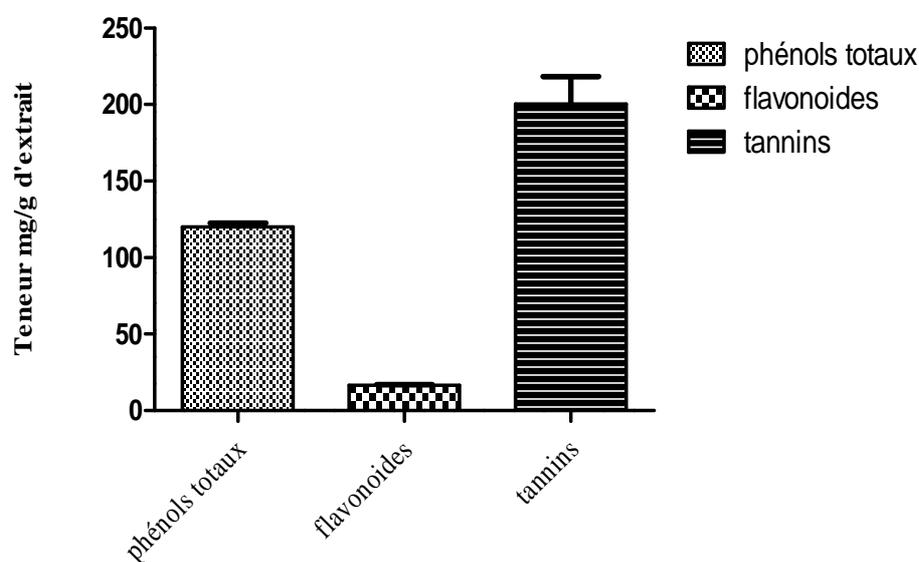
Les résultats de dosages ont été exprimés en moyenne  $\pm$  moyenne d'erreur standard. Les données expérimentales ont été analysées à l'aide du logiciel Graph pad prism 5.3. L'analyse des variances, ANOVA *one way* affirme que la teneur en composés phénoliques diffère d'un composé à un autre.

L'analyse statistique des résultats représentés sur l'histogramme ci-dessus présente une différence très hautement significative ( $***p < 0,05$ ) entre les flavonoïdes et les tannins, une différence très significative ( $##p < 0,05$ ) entre les polyphénols et les tannins, ces résultats sont ainsi considérés très significative ( $##p < 0,05$ ) comparativement aux flavonoïdes et les tannins.

### III.1. Etude phytochimique

L'analyse phytochimique réalisée a permis de mettre en évidence quantitativement la présence de quelques types de métabolites secondaires au niveau des feuilles de *F.angustifolia*.

La quantité des phénols totaux, flavonoïdes et tannins ont été déterminées graphiquement par des méthodes colorimétriques et exprimées par référence aux molécules standards, acide gallique, quercetine et l'acide tannique. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 16.



**Figure 16** : La teneur en phénols totaux, flavonoïdes et tannins dans l'extrait éthanolique des feuilles de *F.angustifolia*.

#### III.1.1. Dosage des phénols totaux

Les phénols totaux dosés dans notre échantillon par la méthode de **Djeridane et al, (2006)**, montre qu'en plus de sa faisabilité et sa sensibilité, cette méthode satisfait aux critères de reproductibilités, l'absorbance est étroitement corrélé à la concentration de l'acide gallique (annexe 1).

La détermination qualitative des phénols totaux, en se référant à la courbe d'étalonnage est de  $120,1 \pm 4,48$  mg EAG/g d'extrait (figure 16).

### III.1.2. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes constitue le groupe le plus hétérogène des composés phénolique, dont certaines classes sont soluble dans des solvant polaire tandis que d'autres sont solubles dans les solvant apolaire (Makris *et al.*, 2005).

Grace à la courbe d'étalonnage réalisée par la quercetine (annexe 2), la quantité des flavonoïdes dosés dans l'extrait des feuilles de *F.angustifolia* par le chlorure d'aluminium a été estimée à  $16,6 \pm 0,42$  mg EQ/g d'extrait (figure 16).

En plus, le genre *Fraxinus* est connu pour être une source riche en quercetine qui est dérivée de flavonols (Jostova et Lossifova, 2007).

### III.1.3. Dosage des tannins

La quantité des tannins contenue dans l'extrait de la plante est déduire à partir de la courbe standard (annexe 3), elle est de l'ordre  $200,26 \pm 25,34$  mg EAT/g d'extrait (figure 16).

Cette estimation en teneur de tannins a permet de déduire que les composés contenus dans l'extrait éthanolique de *F.angustifolia* ont une caractéristique de précipitation des protéines, dans cette étude, il s'agit du sérum albumine bovin.

Une autre étude menée par **Berboucha *et al.*, (2009)** sur la même plante présente une légère similitude dans le taux des composés phénoliques en les comparant avec les résultats obtenus actuellement, essentiellement les flavonoïdes, alors que pour les teneurs en phénols totaux et tannins, elles sont bien supérieures par rapport à la leur, ces différences peuvent être dues au reflet des facteurs climatiques, les périodes et les régions de la récolte.

Plusieurs auteurs rapportent que la teneur en polyphénols varie avec la variation de plusieurs paramètres tels que :

- la méthode d'extraction
- la situation géographique
- la granulométrie
- la température d'extraction.

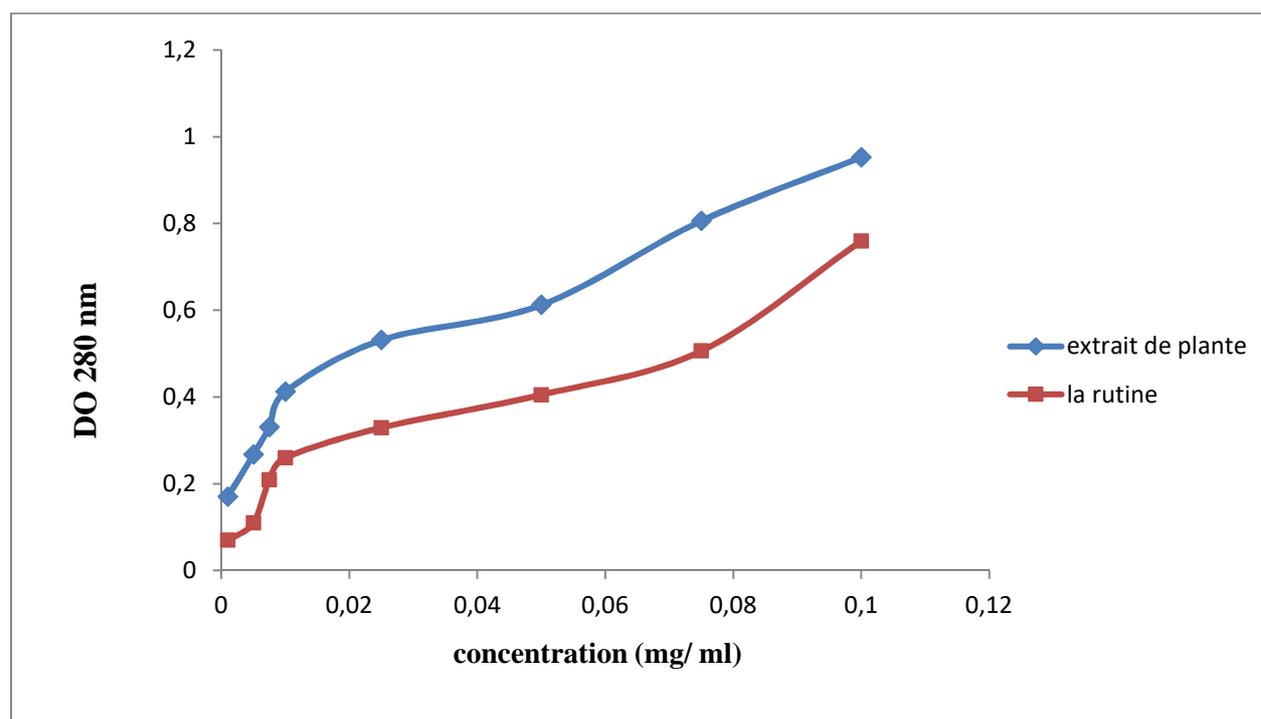
De plus la concentration en polyphénols dépend de la nature du solvant et la méthode d'extraction utilisée qui n'est pas la même. Cependant, il n'y a pas une procédure d'extraction complètement satisfaisante qui extrait tous les composés phénoliques ou une classe spécifique de ces substances à partir des extraits de plantes (Nacz *et Shahidi*, 2004).

## III.2. Interaction polyphénols-BSA

### III.2.1. Effet de la concentration de l'extrait

A l'issue de la mise en contact de différentes concentrations d'extraits de plantes, avec la BSA, il y a eu formation d'un trouble dans les solutions.

Après la mesure de la densité optique par un spectrophotomètre, les résultats des absorbances correspondant à chaque dilution sont illustrés dans la figure 17.



**Figure 17** : Variation de la DO en fonction des concentrations de l'extrait de *Fraxinus angustifolia*.

D'après la figure 17, le suivi des interactions BSA-polyphénols est réalisé par mesure de la turbidité des solutions de mélange BSA et l'extrait de plante, cette turbidité s'accroît avec l'augmentation de la concentration de l'extrait. Les concentrations ainsi obtenues ne sont pas assez suffisantes pour atteindre un palier de saturation (Carvalho et al., 2004 ; Papadopoulou et Frazier, 2004).

Les résultats obtenus montrent une évolution de l'absorbance qui dépend fortement de la concentration de l'extrait. Simon, 2003 interprètes le phénomène par le fait que les protéines sont caractérisées par la présence des sites de fixation pour les polyphénols, où ces dernières à faible poids moléculaires vont se fixer sur les protéines induisant un changement de conformation de ces dernières. La modification dans la structure fait apparaître d'autres sites de fixation pour les polyphénols de haut poids moléculaire.

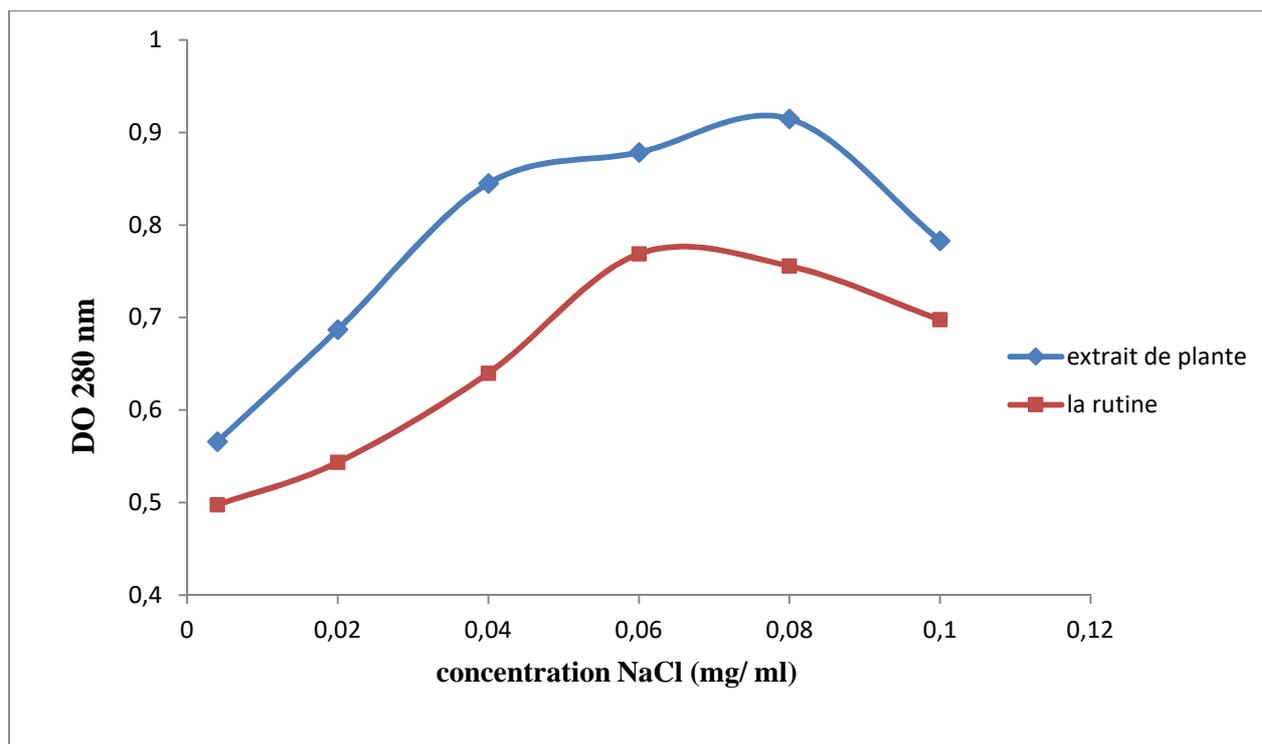
Les résultats de cette étude sont en accord avec les résultats entrepris par **Bennick, (2002)** et **Seibert, (2006)** ; qui ont montré que la densité optique des extraits évolue avec l'augmentation de leurs concentrations. Cette évolution se traduit par la formation des complexes polyphénols-protéines.

D'après les résultats illustrés dans la figure 17, il est clair que l'évolution de la DO est proportionnelle à la concentration de la rutine, on constate que ; plus la concentration augmente, plus la turbidité s'accroît, qui peut être en partie due à la présence de la rutine dans notre extrait.

### III.2.2. Effet de la force ionique sur l'interaction polyphénols-protéines

L'influence de la force ionique est effectuée par la mesure de la turbidité des solutions de NaCl contenant le mélange BSA et l'extrait de *Fraxinus angustifolia* par un spectrophotomètre.

Les résultats de l'effet de la force ionique sur la formation du complexe polyphénols-protéines sont représentés dans la figure ci-dessous :



**Figure 18** : Variation de la densité optique en fonction de la force ionique de l'extrait de *Fraxinus angustifolia*.

La figure 18 montre que la concentration de NaCl dans les solutions étudiées, influencent sur l'interaction polyphénols-protéines. L'absorbance du complexe polyphénols-protéines

augmente avec l'augmentation de la concentration des ions NaCl dans l'intervalle allant de 0,01 à 0,08 mg/ml et à partir de 0,08 mg/ml, l'absorbance diminue.

Les résultats obtenus (Figure 18) sont en accord à ceux montrés par, **Freitas et al, (2003)** ; qui ont démontrés que à des faibles concentrations de NaCl ; la densité optique est très faible ce qui implique que la force ionique ne présente presque pas un effet sur le complexe polyphénols-BSA et à des fortes concentrations de NaCl la charge globale de la protéine s'élève par les ions qui provoquent l'augmentation des répulsions électrostatiques entre les protéines ce qui, par voie de conséquence diminue la turbidité du complexe.

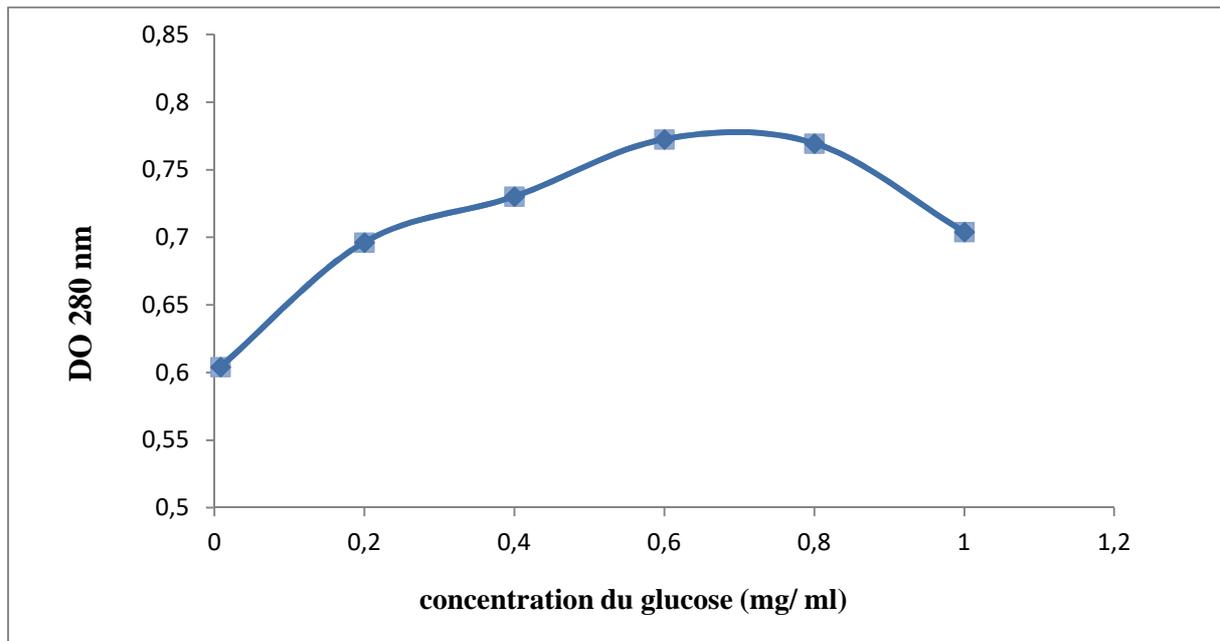
Ces résultats peuvent être expliqués par la solubilisation de la BSA dans le mélange. D'une part **Hagerman et al, (1998)**, ont conclu que l'interaction entre les polyphénols des extraits de *Fraxinus angustifolia* et la BSA dépend fortement des critères ioniques du milieu réactionnel.

D'autres études réalisées par **Freitas et al, (2003)**, ont démontré que ces ions peuvent se fixer directement sur la surface du complexe polyphénols-BSA formant une monocouche ionique et favorisent les interactions de type hydrophile, conduisant aussi à la solubilisation du complexe, ce qui explique la diminution de la densité optique. Il reste difficile de savoir si l'effet de la force ionique est lié à des modifications de conformation des protéines ou des polyphénols, voire à une modification des propriétés du solvant et tous ces mécanismes ont été mis en cause.

La Do augmente avec l'augmentation de la concentration de NaCl dans les solutions qui contient la rutine et ceci pour les quatre premières concentrations testées (0,01 ; 0,02 ; 0,04 ; 0,06 mg/ml), puis stabilise à partir de 0,06 mg/ml jusqu'à 0,08 mg/ml, puis elle diminue à partir de 0,08 mg/ml. Ces résultats peuvent être expliqués par la présence des flavonoïdes et plus particulièrement la rutine.

### **III.2.3. Effet de concentration du sucre sur l'interaction polyphénols – protéines**

L'influence du glucose sur la formation du complexe polyphénols-protéines est représentée dans la figure ci après :



**Figure 19 :** Variation de densité optique en fonction de la concentration du sucre dans l'extrait de *Fraxinus angustifolia*.

D'après les résultats illustrés dans la figure 19, la concentration de carbohydate (glucose) dans les solutions étudiées influence sur l'interaction des polyphénols présents dans l'extrait de *Fraxinus angustifolia* et la protéine (BSA).

L'absorbance du complexe polyphénols-protéines augmente avec l'augmentation de la concentration du sucre dans l'intervalle allant de 0,008 à 0,6 mg/ml ; qui atteint une valeur maximale comprise entre 0,6 et 0,8 mg/ml. Au-delà de ces concentrations, la turbidité diminue pendant que la quantité des complexes polyphénol-protéines diminue.

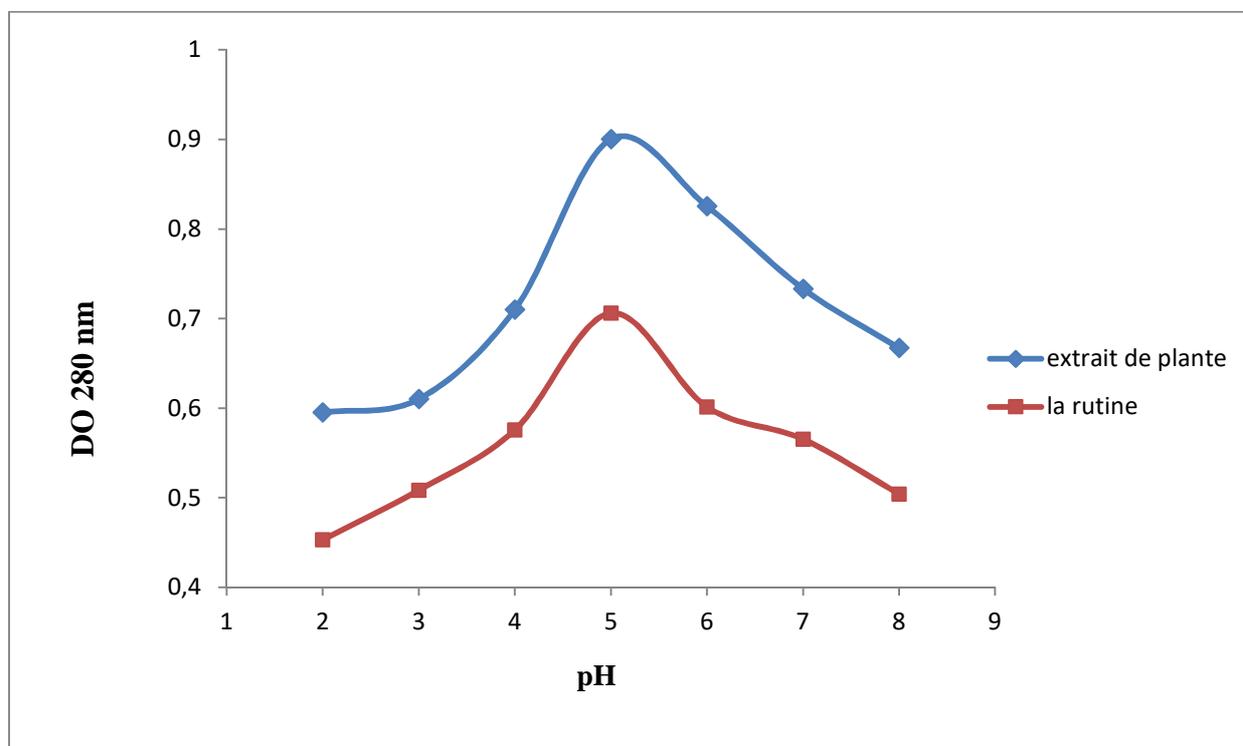
Selon **Freitas et al, (2003)** ; **Mateus et al, (2004)**, ont expliqués ce phénomène par le fait que les hydrates de carbone ont la capacité de perturber l'interaction polyphénols-protéines.

De plus ; la caractéristique structurale du glucose est à l'origine de son affinité pour lier les polyphénols et qu'elle est capable d'encapsuler ces derniers ce qui provoque leur complication avec les protéines ; empêchant de ce fait leur interaction avec la BSA et de ce fait, le glucose réduit la liaison entre les polyphénols et la BSA. Ces résultats peuvent être expliqués par la solubilisation de la BSA.

### III.2.4. Effet de pH

Le pH de la solution est l'un des paramètres les plus importants. Il contrôle le degré d'ionisation des groupements carboxyliques des résidus polysaccharidiques, mais aussi celui des groupements des chaînes latérales des protéines.

Les variations d'absorption du complexe extrait de plante-BSA en fonction de pH sont représentées dans la figure 20 :



**Figure 20** : Variation de l'absorbance du complexe extrait de plante-BSA dans un tampon phosphate à différents pH.

Ces résultats montrent que les interactions entre l'extrait de plante et la BSA sont dépendante avec le pH.

D'après la figure 20, l'absorbance de ce complexe formé, progresse avec l'augmentation du pH dans l'intervalle allant de 2 à 5 et elle présente une stabilité d'absorbance entre pH variant entre 2 et 3. A pH= 5 l'interaction de ce dernier est maximale et à partir de ce pH l'augmentation pourrait être expliquée par l'augmentation de l'absorbance de la BSA et qui pourrait être aussi attribuée à la formation des complexes.

A partir du pH= 5 à pH= 8 l'absorbance des complexes d'extrait de plante-BSA diminue. A pH allant de 2 à 5 ; le mécanisme qui se produit pourrait être expliqué par :

- L'augmentation de la turbidité grâce à la condensation directe des protéines par des liaisons covalentes.
- Les liaisons impliquées dans l'interaction dépendraient de la charge des polyphénols et des protéines.

Ces résultats sont en accord à ceux déterminés par **Hagerman et al, (1981)**, qui suggèrent que la BSA ; est une protéine globulaire qui se précipite à un pH allant de 3 à 5 et d'une manière générale les protéines présentent une solubilité minimum au pH isoélectrique provoqueraient la perte des charges des protéines résultant de la diminution de la répulsion électrostatique.

Les expériences effectuées par **Sakayima et al**, avec la BSA en solution tampon, indiquent que la BSA est adsorbée beaucoup plus favorablement aux pH acides qu'aux pH alcalins.

La DO de la rutine progresse avec l'augmentation du pH à partir de pH=2 jusqu'à pH=5, puis elle commence à diminuer.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec l'extrait de plante, de ce fait, on peut dire que la rutine présente dans notre extrait qui a contribué à la formation des complexes.

## Conclusion

*Fraxinus angustifolia* est l'une des plantes médicinales les plus utilisés à travers le monde. Les extraits des feuilles de cette plante sont largement utilisés dans la médecine traditionnelle.

Ce travail a été réalisé dans le but d'étudier l'interaction entre l'extrait des feuilles de *Fraxinus angustifolia* avec le sérum albumine bovin et de doser les composés phénoliques. D'après les résultats on peut suggérer que cette espèce peut constituer une source très importante des composés naturels à usage biologique, thérapeutique et pharmacologiques, intéressent pour soulager différentes maladies, pour cela, la réalisation d'autres études complémentaires seraient nécessaires d'être développés et approfondies en faisant appel à des méthodes quantitatives et qualitatives de ces métabolites bioactifs.

Les tests phytochimiques effectués sur l'extrait ont révélé la présence en quantités relativement importantes de métabolites secondaires d'intérêt biologiques et thérapeutiques : phénols totaux, flavonoïdes et tannins qui sont respectivement de 120,1 mg EAG/g d'extrait, 16,66 mg EQ/g d'extrait, 200,26mg EAT/g d'extrait, la détermination quantitative de ces différentes classes phénoliques est en partie confirmée, par une étude spectrale UV-Visible.

La plante possède une grande affinité de liaison pour la protéine (sérum albumine bovine), élucidée par le phénomène de précipitation dans le test de turbidité.

L'étude portée sur l'interaction polyphénols-BSA a révélé l'influence de la concentration de l'extrait, la force ionique, le PH et du sucre sur la densité optique.

La caractérisation de l'aspect thermodynamique des complexes polyphénols-protéines, de la nature des interactions ainsi que des types des liaisons impliquées dans ces interactions sont des investigations qui permettent une meilleure compréhension de ce phénomène.

L'étude interactionnelle permet de déterminer le site ou les sites de liaisons BSA-polyphénols et de mieux comprendre le mode d'action des composés phénoliques, sa mise en évidence par les méthodes RMN, spectroscopie infrarouge et fluorescence serait une approche complémentaire. Il est intéressant aussi de tester d'autres paramètres (la température, rapport molaire, acidité) et d'autres protéines (salivaire, alimentaires).

## Référence bibliographiques

**Atmani, D. ; Chaher, N. ; Berboucha, M. ; Ayouni, K. ; Lounis, H. ; Boudaoud, H and Debbache, N. (2009).** Antioxydant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, **2** : 303-309 p.

**Baba-Aissa, F. (2011).** Encyclopédie des Plantes Utiles. *El-Maarifa*: 157-158 p.

**Bennick, A. (2002).** Interaction of plant polyphenols with salivary protein, *Crit, Rev, Oral, Biol Med* , 184-196

**Berboucha, M. ; Ayouni, K. ; Atmani, D. ; Atmani, D and Benboubetra, M. (2009).** Kinetic study on the Inhibition of Xanthine Oxidase by Extracts from two Selected Algerian Plants Traditionally Used for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Journal of Medicinal Food*, **13(4)**: 1-9 p.

**Bravo, L. (1998).** Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, **56** :317-333 p.

**Brown, J.R. (1975).** Structure of Bovine Serum Albumin, *Federation Proceedings* , **34** : 591p.

**Camille, P. (2001).** Analyse de tanins inhibiteurs de la stibéne oxidase produite par *Botrytis cinerea* pers : Thèse doctorat, université de Neuchatel, 25 p.

**Carvalho, E. ; Mateus , N. ; Freitas, V.(2004).** Flow nephelometric analysis of protein-tannin interaction, *Analytica Chimica Acta*, **510** : 97-101 p.

**Djeridane, M.; Yousfi, M.; Nadjemi, B.; Boutassouna, D and Stocker-Pet Vidal.N. (2006).** antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compound. *food chemistry*, **97** : 654 -660 p.

**Freitas, V and Mateus, N. (2001).** Nephelometric study of salivary protein-tanin aggregation by nephelometry. *Food Chemistry*, **81**: 503-509 p.

**Freitas, V.; Mateus, N and Carvalho, E. (2003).** Study of carbohydrate influence on protein tannin aggregation by nephelometry. *Food chemistry*, **19** : 910-915 p.

**Freng, R.; Kolishi, Y and Bell, A. W. (1991).** High accuracy molecular weight determination and variation characterization of proteins by ionspray mass spectrometry. *Journal of the american society for mass spectrometry*, **2** : 387-401 p.

**Gekko, K.; Kimoto, A and Kamayama, T. (2003).** effects of Disulfide bonds on compactness of protein molecules revealed by volume, compressibility and expansibility changes during reduction. *biochemistry*, **42**: 13747-13753 p.

**Gerard, P. (2006).** Isolement reproducteur et dispersion en zone hybride forestière : l'exemple des frenes (*Fraxinus excelsior* L. et *F. angustifolia* Vahl). Thèse de Doctorat en Sciences Forestières. *Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et Forêts, Centre de : Paris*, 29-34 p.

**Giam, V. T., Chuang, M and Otagiri. (2006).** Stereo selective binding of human serum albumin. *Chirality*, **18** : 159-166 p.

**GIFA. (2012).** Guide Illustré de la Flore Algérienne: (IGAF) Illustrated Guide of the Algerian Flora. *Les presses de l'Imprimerie Moderne de l'Est, Paris*, **51**.

**Gruenwald, J.; Brendler, T and Jaenicke, C. (2007).** Ash ,*Fraxinus excelsior*.editors.*PDR forherbal medicines 4th edition. Thomoson*, 53-54 p.

**Hagerman, A.E et Bulter,L.G. (1978).** Protein precipitation method for the quantitative determination of tannin.*Journal agriculture and food chemistry*, **26(4)**: 809-812 p.

**Hagerman, A.E et Bulter, L.G. (1981).**The Specificity of Prothocyaidine-Protein Interaction *The Jouranal of Biological Chemistry*, **256(9)** : 4444-4497 p.

**Hagerman, A. E et Bulter, L. G. (1989).** Choosing appropriate methods and standard for assyig tannin. *Journal of chemical ecology*, **6** :1995-1810 p.

**Hagerman, A.; Riedl, K. M.; Jones, G. A.; Sovik, K. N.; Ritechard, N. T.; Hartzfeld, W and Riechel, T. L. (1998).** Heigh Molecular weight plant polyphenolics (Tannins) as Biological antioxidants. *Journal agricultural Food Chemistry*, **46**: 1887-1982 p.

**Haslam, E. (1989).** Plant polyphenols vegetale tannins revisted Philipson,J.D .,Ayres,DC. Baxter H.Eds ; *Cambridge university press. cambridge*, 230 p.

**Haslam, H. (1998).** Practical Polyphenolics ; From structure to molecular recongnition an physiological action. *Cambridge University press*, 169-336 p.

**Hertog, M. G. L.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B.; Kromhout, D. (1993).** Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutrition and Cancer, Phytochemistry*, **47**:1569 p.

**Hirayma, K.; Akashi, S.; Furuya, M and ken-ichi. (1990).** Rapid confirmation and revision of the primary structure of bouvin sérum albumin by ESIMS and frit- FAB LC/MS. *Biochemical and biophysical reseach communication*, **137**: 2639-646 p.

**Huang, B. X.; Kim, H. Y and Dass, C. (2004).** Probing Three-Dimentional Structure of bovine Serum Albumin by Chemical Cross-Linking and Mass Spectrometry. *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, **15** : 1237-1247 p.

**Jobstl, E.; O'Connell, J.; Fairclough, J. P. A and Williamson, M. P. ( 2004).** Molecular Model for Astringency Produced by Polyphénol/protein Interaction. *Biomacromolecules*, **5(3)**: 942-945 p.

**Kostova., I and Iossifova ,T. (2007).** Chemical components of Fraxinus species. *Filtoterapla*, **78** : 85-107 p.

- Le Bourvellec, C and Renard, C. M. (2012).** Interactions between Polyphenols and Macromolecules: Quantification Methods and Mechanisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **52(1-3)** : 213-248 p.
- MA, W. G.; Tan, R. X.; Fuzzati, N.; LI, Q. S.; Wolfender, J. L and Hostettmann, K. (1997).** Natural occurring and synthetic polyne glycosides. *Phytochemistry* , **45(2)** : 411- 415 p.
- Maksimovich, Z.; Malencie, N. D and Kovacevie, N. (2004).** Polypheno contents and antioxidant activity of Maydis stigma extracts. *Bioresource technology*, **96** : 873-877 p.
- Mateus, N.; Carvalho, E.; Luis, C and Freitas, V.(2004).** Influence of the tannin structure on the distruption effect of carbohydrate on proteins-tanni aggregates .*Analytica Chimica Acta*, **5(13)** : 135-140 p.
- Naczak, M.; Oickle, D.; Pink, D and Shahidi, F. (1996).** Protein precepitating capacity of crude canola tannins : effect of PH , tannin , and protein concentration. *Journal of Agriculture and Food chemistry*, **44** : 2144-2148 p.
- Naczk, M.; Shahidi, F.(2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography* . **1054**: 095-111 p.
- Naczk, M.; Grant, R and Zadernowsski, E. (2006).** Protein precipiting capacity of phenolics wild blueberry leaves and fruit. *Food chemistry*, **96** : 640-647 p.
- Nuno, M.; Pinto, R.; Rua, P and Freitas,V. (2004).** Influence of the addition of grape seed procyanidins to Port wines in the resulting reactivuity with human salivary protein .*Journal of Agriculture and Food chemistry*, **84**: 195-200 p.
- Oh, H. L.; Hoff, J. E.; Amstrong, G and Hoff, L. A .(1980)** . Hydrophobic interaction in tanin protein complexes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **28** : 394-398 p.
- Papadopoulou , A and Frzier, R. A. (2004).** Characterization of protein-polyphenol interaction. *Trends in food Science and Technology*, **15** : 186-190 p.
- Papadopoulou, R. J.; Green and Frazier, J. ( 2005).** Interaction of Flavonoids with Bovine Serum Albumin: A Fluorescence Quenching Study Agriculture. *Food Chemistry*, **53**: 158-163 p.
- Patra, S.; Santhosh, K.; Pabbathi, A and Samanta, A. (2012)** , Diffusion of organic dyes in bovine serum albumin solution studied by fluorecence correlation spectroscopy. *RSC Advances*, **2** : 6079-6086 p.
- Paris, M et Hurabeille, M. (1981).** Drogues à hétérosides. In *Abrégé de matière médicinale, pharmacognosie tome I. Edition : Maisson*, 103-112 p.
- Paris, M et Hurabeille, M. (1981).** *Abrégé de matière médicale, pharmacolognosie Edition : Maisson*, 210-215 p.

**Poleunis, C.; Rubio, C.; Compère, C and P, Bertrand. (2002).** "Role of Salts on the BSA Adsorption on Stainless Steel in Aqueous Solutions. II. Tof-SIMS Spectral and Chemical Mapping Study", *Surface and Interface Analysis*, **34** : 155-158 p.

**Prigent, S. (2005).** Interaction of phenolic compound with globular proteins and their effects on food-related functional properties. ISBN, **90**: 8504-2674p.

**Rameau, J. C et Dumé, G. (1989).** Flore forestière française : Tome 1. Plaines et collines. *Institut pour le développement forestier*, 457- 459 p.

**Ribereau-Gayon. ; Peynaud, E. ; Sudraud, P et Ribereau-Gayon, P. (1982).** Composés phénoliques in « traité d'œnologie, sciences et techniques du vin » *Edition : Dunod*, 477-499 p.

**Ribèreau-Gayon, P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. *Edition: Dunod paris*, 173-201 p.

**Sakiyama. T.; Tomura, J.K.; Imamura and Nakanishi, K. (2004).** Adsorption characteristics of Bovine Serum Albumine and its peptide fragments on a stainless steel surface, *Colloides and Surface B:Biointerface*, **33**: 77-84 p.

**Sanago, R. (2006).** Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. *Université collection sciences et techniques agroalimentaires. Edition TEC et DOC, paris (France)* , 398 p.

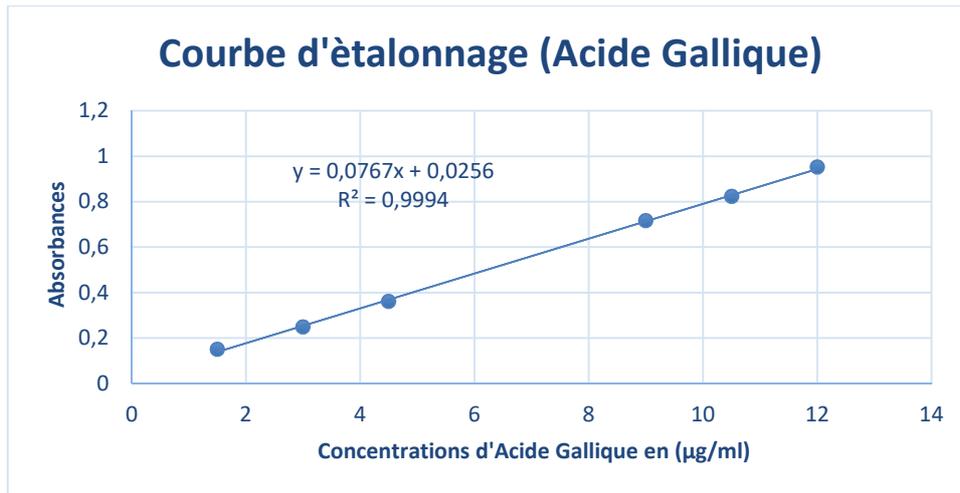
**Sarni-Manchado, P And veronique, C. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaires. *Paris : technique et Documentation*, 398 p.

**Siebret, K . J. (2006).** Haze formation in beverages. *food science and technology*, **39** : 987-994 p.

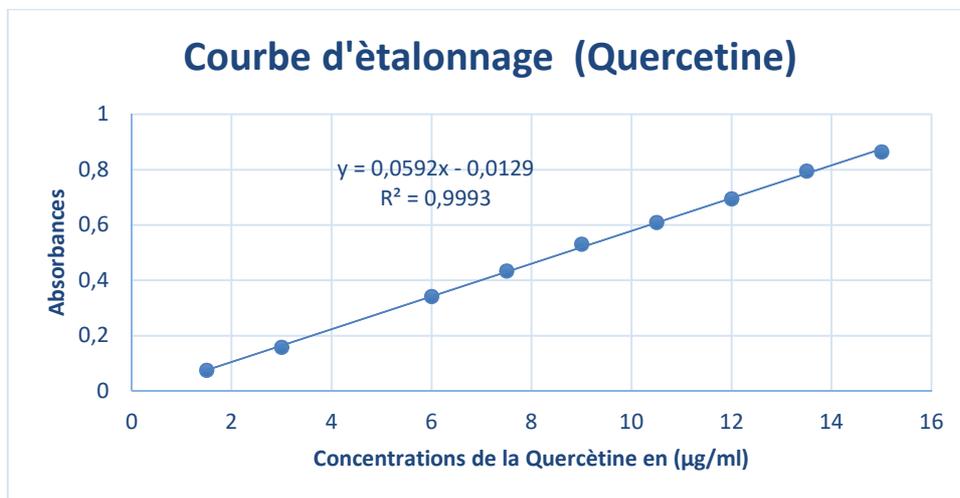
**Simon, C. (2003).** Structure et dynamique de protéines de la salive humaine en interaction avec les tanins du vin de bordeaux. *Thèse doctorat en science chimique*, 219 p.

**Strauss, G et Gibson. S. M. (2004).** Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based conacervates for use as food ingredients, *Food Hydrocolloids*, **18** : 81-89 p.

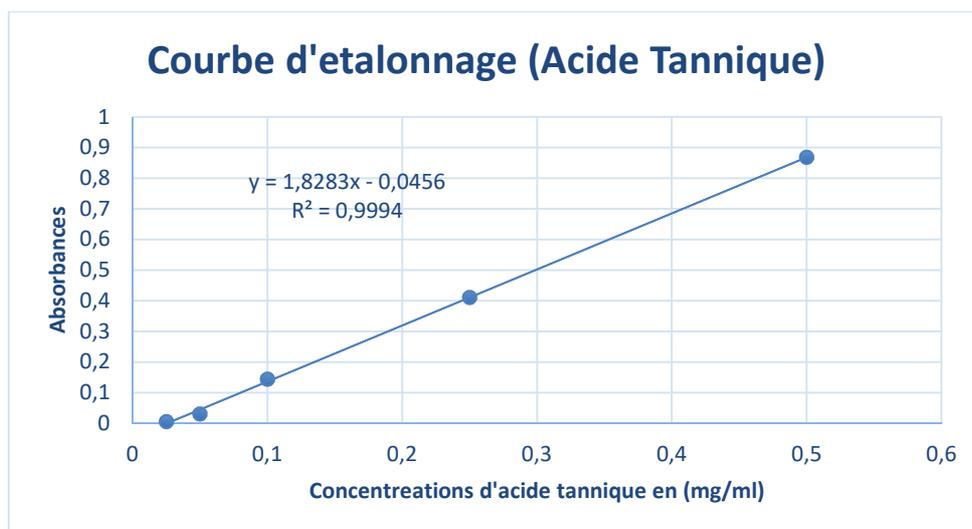
**Wallander, E. (2008).** Systematics of Fraxinus (Oleaceae) and evolution of dioecy. *Plant Journal systematics and Evolution*, **273** : 25-49 p.



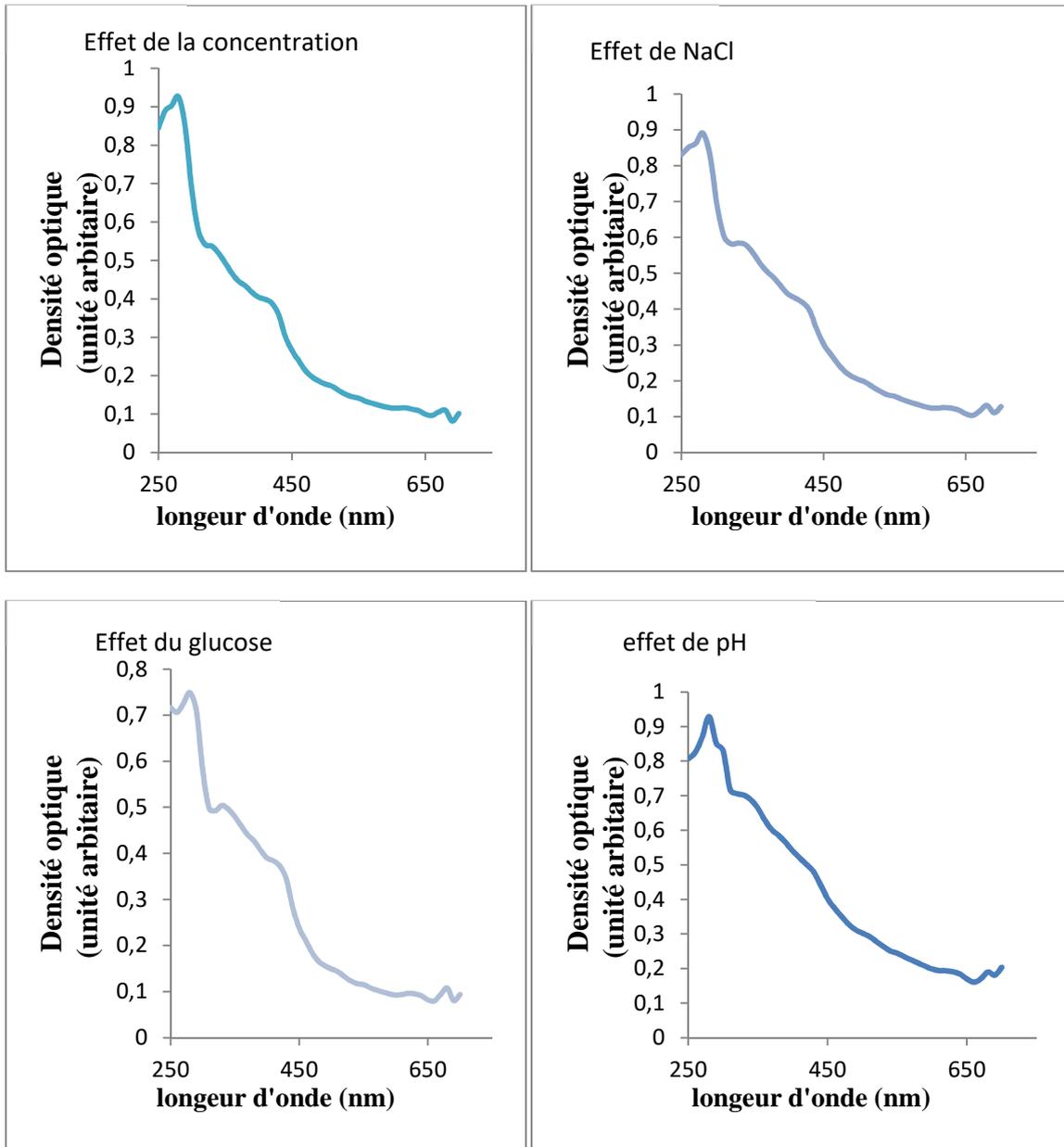
Annexe 1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique



Annexe 2 : Courbe d'étalonnage de Quercetine



Annexe 3 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique



**Annexe 4** : Spectre de balayage de la solution BSA et l'extrait de *Fraxinus angustifolia*, NaCl, glucose et du pH respectivement.

<b>Tampon A</b>	Le tampon A est préparé par une solution de 0,2M d'acide acétique avec 0,17M de NaCl, ajusté à pH 4,9.
<b>BSA</b>	Une solution de BSA a été préparée dans le tampon A à une concentration de 1mg/ml.
<b>SDS/TEA</b>	5% (v/v) de Triéthanolamine avec 1% (p/v) SDS (50ml Triéthanolamine, 10g de SDS ajusté à 1L d'eau distillée).
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Elle est préparée par la dissolution de 1,62g de FeCl <sub>3</sub> dans le HCl à 0,01M. puis la solution est filtrée.

## Résumé

*Fraxinus angustifolia* est une plante médicinale appartenant à la famille des Oléacées, elle est très répandue dans le bassin méditerranéen et largement utilisée comme anti-inflammatoire et antioxydant. Notre travail repose sur le dosage des composés phénoliques des extraits éthanoliques des feuilles de *F. angustifolia* et de tester leur interaction avec la sérum albumine bovine (BSA), L'analyse phytochimique a révélé la présence d'une teneur élevée en tannins et en phénols totaux, qui atteint  $200,26 \pm 25,34$  mg EAT/g d'extrait et  $120,1 \pm 4,48$  mg EAG/g d'extrait et une teneur moindre en flavonoïdes, elle est de l'ordre  $16,6 \pm 0,42$  mg EQ/g d'extrait, la formation du complexe polyphénols-BSA est fortement influencée par la concentration en extrait de plante (atteint 0,1 mg /g), ainsi que par la concentration en NaCl ( elle est de l'ordre 0,08 mg/g), mais aussi par la concentration du sucre et du pH (la Do maximum est a pH=5) .

**Mots clés :** *Fraxinus angustifolia*, BSA, dosage des polyphénols, étude d'interaction, Oléacées.

## Abstract

*Fraxinus angustifolia* is a medicinal plant belonging to the family of Oleaceae, it is widespread in the Mediterranean basin and widely used as anti-inflammatory and antioxidant. Our work is based on the determination of the phenolic compounds of the ethanolic extract of the leaves of *F. angustifolia*, as well as the interaction study between the plant extract with BSA, all depends on the parameters exist ifluen the reaction medium. Phytochemical analysis revealed the presence of hight tannin and total phenol that reached  $200,26 \pm 25,34$  mg EAT/g of extract and  $120,1 \pm 4,48$  mg EAG/g of extract and a lower level of flavonoides, she is around  $16,6 \pm 0,42$  mg EQ/g of extract, the formation of the polyphenol-BSA complex is strongly influenced by the concentration of plant extract(reaches 0,1 mg/ml), as well as by the concentration of NaCl (it is of the order 0,08 mg/g), but also by the concentration of sugar and pH (the maximum optical density is a pH=5).

**Keys words :** *Fraxinus angustifolia*, BSA, phenolic compound, interaction study, Oleaceae.

## ملخص

فراكسينوس انغوستيفوليا هي نبات طبي ينتمي إلى عائلة الاولياسي يتواجد بكثرة في حوض البحر الأبيض المتوسط حيث تستعمل كمضادات للالتهابات و الأكسدة. يعتمد عملنا على تحديد المركبات الفينولية للمستخلص الكحولي للأوراق و دراسة التفاعل مع مصّل الألبومين البقري. كشف التحليل الكيميائي النباتي عن وجود كمية كبيرة من العفص و الفينولات وكمية أقل من الفلافونويد التي تبلغ  $25.34 \pm 16.6$  mg EAT/g d'extrait و  $120.1 \pm 4.48$  mg EAG/g d'extrait وجود كمية كبيرة من العفص و الفينولات و تشكل المعقد عديد الفينولات مصّل الألبومين البقري الذي يتأثر بتركيز المستخلص الفينولي الذي يبلغ 0.1 والقوة الشاردية بالإضافة إلى تركيز السكر ودرجة الحموضة .  
**الكلمات المفتاحية :** فراكسينوس انغوستيفوليا. مصّل الألبومين البقري. المركبات الفينولية . دراسة التفاعل. اولياسي.