

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

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



Réf :

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

MASTER

Thème

**Caractérisation et activité antioxydante des
composés actifs de l'extrait de *Crataegus
laciniata***

Présenté par :

Melle ABDELI Lyliya et Mr BENHAMIDECHE Ali

Soutenu le : 30/09/2021

Devant le jury composé de :

Mme METROUH-AMIR H.

MCA

Présidente

Mme CHAHER-BAZIZI N.

MCA

Promotrice

Mme BOUDJOU-MECHOUCHE S.

MCB

Examinatrice

Année Universitaire : 2020-2021



REMERCIEMENTS

Au nom d'Allah, le tout miséricordieux, le très miséricordieux

*Avant tout, louanges et remerciement à **Dieu** qui est le **premier** et le **dernier**, le **patent** et le **latent**, et il est de toute chose savant. Nous demandons à Dieu de nous enlever cette affliction dans laquelle nous vivons en ces temps car c'est lui qui dit : Certes, après la peine vient le soulagement.*

Arrivé au terme de la rédaction de ce mémoire, nous tenons particulièrement, à exprimer nos gratitude et nos remerciements à tous ceux qui, par leurs enseignements, leurs soutiens et leurs conseils, nous ont aidés à sa réalisation.

*Nous tenons surtout à adresser nos plus vifs remerciements à notre promotrice **Mme. CHAHER-BAZIZI N**, Enseignante à l'université **A. MIRA-Bejaia** qui nous a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, pour sa grande patience, pour sa disponibilité et ses conseils judicieux.*

*Comme nous tenons à remercier tout le personnel du laboratoire de Génétique et un remerciement spécial pour **Mr AISSAT GHILES** qui nous a aidés durant les expériences*

Nous exprimons nos remerciements aux membres de jury d'avoir accepté d'examiner notre travail et de faire partie du jury de cette soutenance. On les remercie également pour leur disponibilité et leur collaboration. Il s'agit de :

Mme AMIR la présidente du jury,

Mme BOUDJOU (membre examinateur)

DEDICACES

Je dédie ce travail a une personne très chère pour moi qui m'a élevé, aidé et motivé durant toute ma vie soit autant que personne ou étudiant, mais qui nous à quitter trop tôt malheureusement, finalement à dieu nous appartenons et à lui nous retournerons.

Ce travail est pour ma belle mère qu'Allah l'accueil dans son vaste paradis.

Sans oublié mon père et ma mère biologique pour leur soutien moral et financier.

Pour mon seul frère qui m'a aussi aidé à sa façon

Mes chaleureux dédicaces sont aussi destiné à :

Mes cousins et cousines spécialement ma cousine Mimah et mon cousin Amayes ;

Mon copain de chambre Mouhoub : Résidence 17 Octobre, chambre I202 ;

Ma binôme Lylia et à toute sa famille ;

Et à tous ceux qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre à réaliser ce travail

ALI

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail

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

A cette source de tendresse, de patience et de générosité

A ma mère Yamina !

A la plus attentionnée et sage des personnes, celle qui m'a toujours incité à donner sans attendre rien de personne, m'a appris à être forte malgré tout, et d'être la meilleure version de moi-même.

A ma précieuse grand-mère Zidane Zohra

A mes deux frères ILYAS et MOUNIR

A mon unique et rationnelle sœur JASMINE

A ma meilleure amie et confidente EMMA

A MON SUPPORTIF BINOME ALI

A tous mes amies, mes collègues et tous les étudiants de notre

Promotion 2020/2021

LYLIA

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION..... 1

CHAPITRE I RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

| | |
|---|----|
| I.1. Données générales sur <i>Crataegus laciniata</i> | 2 |
| I.1.1. Description botanique | 2 |
| I.1.2. Air de répartitions et exigences climatiques de <i>Crataegus laciniata</i> | 3 |
| I.1.3. Classification botanique | 3 |
| I.1.4. Etymologie et appellations | 3 |
| I.2. Composition en métabolites des espèces du genre <i>Crataegus</i> | 4 |
| I.2.1. Composés phénoliques | 4 |
| I.2.2. Terpénoïdes | 8 |
| I.2.4. Alcaloïdes | 9 |
| I.3. Effets pharmacologique et utilisations de la plante | 10 |
| I.3.1. Effets pharmacologique | 10 |
| I.3.2. Utilisations traditionnelles de <i>Crataegus laciniata</i> | 11 |
| I.3.3. Toxicité de la plante | 11 |
| I.4. Stress oxydant, radicaux libre et antioxydant | 12 |
| I.4.1. Stress oxydant | 12 |
| I.4.2. Radicaux libres | 13 |
| I.4.3. Antioxydants | 16 |

CHAPITRE II MATERIELS ET METHODES

| | |
|--|----|
| II.1. Espèce végétale | 17 |
| II.1.1 Récolte | 17 |
| II.2 Méthodes de préparations | 17 |
| II.2.1. Préparation de la matière végétale..... | 17 |
| II.2.2.Préparation de l'extrait..... | 17 |
| II.3. Dosage des phénols totaux, flavonoïdes, tannins condensés | 18 |
| II.3.1. Dosage des phénols totaux..... | 18 |
| II.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux..... | 18 |
| II.3.3. Dosage des proanthocyanidines ou tannins condensées | 19 |
| II.3.4. Activité Anti-radical DPPH•..... | 20 |

CHAPITRE III RESULTATS ET DISCUSSION

| | |
|--|----|
| III.1. Estimation quantitative de l'extrait | 21 |
| III.2. Teneurs en polyphénols, flavonoïdes, tannins condensés | 21 |
| III.3. Analyse spectrale | 22 |
| III.3.1 Interprétation spectrale | 26 |
| III.4. Activité antiradicalaire DPPH | 30 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 33 |
| Références bibliographiques | 34 |

Annexes

Glossaire

Liste des abréviations

- **ADN** : Acide désoxyribonucléique
- **Arg** : Arginine
- **CAT** : Catalase
- **Cm** : Centimètre
- **DHA** : Acide déhydroascorbique
- **DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
- **ERN** : Espèce Réactive de l'Azote
- **ERO** : Espèce Réactive de l'Oxygène
- **EEF** : Extrait éthanolique de fruit de *Crataegus laciniata*
- **EqAG** : Equivalent Acide Gallique
- **EqAT** : Equivalent Acide Tannique
- **EqQ** : Equivalent Quercétine
- **FB** : Formule brute
- **GPx** : Glutathion peroxydase
- **GSH** : Glutathion
- **GSSG** : Glutathion Disulfide
- **GST** : Glutathion S Transférase
- **H** : heure
- **IC₅₀** : Concentration inhibitrice 50 %
- **M** : Molécule
- **Min** : minutes
- **ml** : Millilitres
- **mM** : miliMolaire
- **MS** : Spectroscopie de masse
- **m/z** : rapport masse sur charge
- **NADPH** : Nicotinamide adénine di nucléotide Phosphate
- **nm** : nanomètre
- **NOS** : Nitrique Oxyde Synthase
- **PH** : Potentiel Hydrogène
- **PM** : Poids moléculaire
- **SOD** : Superoxyde dismutase

- **Vit** : Vitamine
- **µg** : Microgramme
- **µL** : Microlitre

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Image montrant les feuilles, fleurs, fruits et l'arbre de <i>crataegus laciniata</i> | 2 |
| Figure 2 : Deux grandes classes des polyphénols..... | 5 |
| Figure 3 : Structures de base des principaux flavonoïdes..... | 6 |
| Figure 4 : Structure des tanins hydrolysables | 7 |
| Figure 5 : Structure des tanins condensés. | 8 |
| Figure 6 : Différents isomères de la bêta-carotène. | 9 |
| Figure 7 : Schéma des effets thérapeutiques du genre <i>Crataegus</i> | 10 |
| Figure 8 : Exemple de sources et de l'effet des radicaux libres sur l'ADN..... | 12 |
| Figure 9 : Différentes cibles des espèces réactives de l'oxygène..... | 15 |
| Figure 10 : Schéma des deux classes d'antioxydants : Endogènes, exogènes et leurs effets sur les radicaux libres.. | 16 |
| Figure 11 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH..... | 20 |
| Figure 12 : Spectre de masse couplé à la chromatographie en phase liquide (en mode positif [M+H ⁺])..... | 23 |
| Figure 13 : Pourcentage d'inhibition de radical DPPH de l'EEF de <i>Crataegus laciniata</i> (1) et des autres standards qui sont 2 : la Acide caféique, 3 : Rutine, 4 : Catéchine, 5 : Quercétine, 6 : Acide tannique, 7 : Acide gallique, 8 : Myricétine | 31 |
| Figure 14 : Effet de différentes concentrations de l'extrait éthanolique des fruits de <i>C. laciniata</i> et des autres standards sur le radical DPPH (concentration 10, 25, 50,75 et 100µg/ml) | 32 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau I : Appellation et langue correspondante | 4 |
| Tableau II : Classes en métabolites des espèces du genre <i>Crataegus</i> | 4 |
| Tableau III : Caractéristiques de l'EEF dont la masse et le rendement. | 21 |
| Tableau IV : Résultats de dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et des tannins condensés de l'extrait éthanolique des fruits de <i>Crataegus laciniata</i> | 21 |
| Tableau V : Identification des 30 composés par référence aux deux modes ions (positif et négatif) et leurs données MSN..... | 23 |

INTRODUCTION

Introduction

Les plantes médicinales revêtissent une importance incommensurable et constituent de véritables pharmacies naturelles afin d'entretenir notre peau, protéger notre corps, prévenir nos maux voire les guérir même, elles sont une source inépuisable de panoplies de produits utilisés dans le traitement de plusieurs maladies telles que les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives et les cancers de tout acabit (Kœchlin-Ramonatxo, 2006).

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

Crataegus laciniata est une plante médicinale connue en Algérie, elle possède une forte activité antioxydante, en raison de la présence de différents composés bioactifs tels que les phénols, les flavonoïdes et les tannins (Wala, 2012).

En dépit de ces activités que peuvent véhiculer ces métabolites secondaires, le pouvoir médicinal de cette plante reste encore peu exploré surtout sur le plan pharmacotoxicologique (Melzer *et al.*, 1991).

Dans cette optique, nous avons entrepris une étude qui s'inscrit dans le cadre des travaux de laboratoire de biochimie appliquée de l'Université de Bejaia ,portant sur l'étude de la caractérisation et l'identification des composés actifs ainsi que l'étude du pouvoir antioxydant de l'extrait organique de fruit de *Crataegus laciniata*.

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

CHAPITRE I
SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Données générales sur *Crataegus laciniata*

I.1.1. Description botanique

Crataegus est le nom scientifique de l'aubépine appartenant à la famille « *Rosaceae* ». Cette dernière est constituée de 100 genres dont 200 espèces de *Crataegus* (Bouزيد, 2009).

Crataegus laciniata est l'une des espèces du genre *Crataegus*. C'est un arbuste volumineux, atteignant 7 m de haut, contenant des feuilles caduques, en forme d'œuf rhombique de 3 à 5 cm de long; bordures profondes, gris-vert en haut, poilue et gris-feutré en bas, des fleurs de couleur blanche et de 2 à 2,5 cm de largeur et des fruits de forme baie charnue, de couleur rougeâtre et de 1,5 à 2 cm de long (Bellakhdar, 1997 ; Bachiri et *al.*, 2015) (figure 1).



Figure 1 : Image montrant les feuilles, fleurs, fruits et l'arbre de *crataegus laciniata*. (Bachiri et *al.*, 2015)

I.1.2. Air de répartitions et exigences climatiques de *Crataegus laciniata*

Elle est commune dans toutes les zones tempérées de l'hémisphère nord y compris les régions de l'Amérique du sud, l'Est de l'Asie ainsi que les régions euro – méditerranéennes (Hamdaoui, 2018). Le continent africain est un des continents dotés d'une biodiversité la plus riche dans le monde. L'Algérie possède une richesse floristique considérable, ce potentiel de plante médicinale comporte des milliers d'espèces présentant divers intérêts et constituent un axe de recherche scientifique et plus particulièrement dans le domaine des substances naturelles (Aberkane, 2006).

Elle s'accommode à tous les terrains, mais elle préfère les sols calcaires et se satisfait des plus secs. Cette espèce préfère les emplacements ensoleillés, à terre légère qui ne contient pas beaucoup d'argile, elle peut se développer dans les sols acides, neutres et même alcalins (Hamdaoui, 2018).

I.1.3. Classification botanique

Selon Bouzid, 2009 la classification botanique est la suivante :

- **Règne** : *Planta* (Plante)
- **Sous-règne** : *Tracheobionta* (Plantes vasculaires)
- **Embranchement** : *Spermaphyta* (Spermaphytes)
- **Sous-embranchement** : Angiospermes.
- **Classe** : *Magnoliophyta* (Dicotylédones)
- **Sous classe** : Dialypétales
- **Ordre** : Rosales
- **Famille** : *Rosaceae* (Rosacées)
- **Genre** : *Crataegus*
- **Espèce** : *Crataegus laciniata*

I.1.4. Etymologie et appellations

Le nom botanique *Crataegus* a ses origines du grec : Kratos qui signifie la « dureté » ou la « force » du bois. Le genre *Crataegus* comprend plusieurs centaines d'espèces à travers le monde. Les différentes espèces s'hybrident facilement, ce qui rend difficile le dénombrement exact du nombre d'espèces (Hamdaoui, 2018).

Selon Bachir, 2015 l'appellation est la suivante :

Tableau I: Appellation et langue correspondante.

| Langue | Appellation |
|---------------|--------------------|
| Berbère | Admam |
| Arabe | Tabgha |
| Anglais | Hawthorn |
| Français | Aubépine |

I.2. Composition en métabolites des espèces du genre *Crataegus*

Plusieurs groupes de composés représentant les métabolites primaires et secondaires ont été reportée dans différentes parties des aubépines. Dans les fruits, les sucres sont les métabolites primaires les plus abondants (Urbonaviciute et *al.*, 2006) alors que les métabolites secondaires majeurs sont les composés phénoliques. Par rapport a ces derniers, les oligomères procyanidines et leurs glycosides sont les principaux composés majeurs, tandis que les flavonoïdes dominant dans les feuilles (Liu et *al.*, 2011).

Les deux classes sont représentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau II : Classes en métabolites des espèces du genre *Crataegus*

| Métabolites primaires | | Métabolites secondaires | |
|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Sucres | Autres métabolites primaires | Composés phénoliques | Autres métabolites secondaires |
| Polysaccharides | Amines | Tannins | Alcaloïdes |
| Glucose | cardiotoniques | (Hydrolysables et | Caroténoïdes |
| Saccharose | Triméthylamine | Condensés) | Terpénoïdes |
| Fructose | Phénylalanine | Flavonoïdes | |
| Xylose | Tyramine | Acides phénoliques | |
| sucres alcooliques | Acides | Acide ascorbique | |
| (sorbitol, myo- inositol) | tricarboxyliques | | |
| | Protéines | | |
| | Acides nucléiques | | |

I.2.1 Composés phénoliques

Les polyphénols sont des métabolites secondaires. Ils sont des molécules biologiques actives possédant un ou plusieurs cycles benzéniques portant un ou plusieurs fonctions hydroxyles.

Ces composés sont synthétisés par les plantes aussi bien au cours du développement normale que dans les conditions du stress. Chez la plante ils contribuent dans le développement, la reproduction, la croissance cellulaire, la différenciation, l'organogenèse, la floraison et la lignification. En outre la teneur des végétaux en polyphénols est très variable en fonction de nombreux paramètres génétiques, physiologiques et environnementaux (Rejeb, 2008).

Ils interviennent aussi sur la santé humaine en exerçant un effet antioxydant contre le vieillissement cellulaire (cosmétiques), un pouvoir anticancéreux, luttant contre les maladies cardiovasculaires et coronariennes (Delcambre, 2010).

Ces polyphénols regroupent plusieurs milliers de molécules réparties dans deux grandes sous familles : les non flavonoïdes et les flavonoïdes (Figure 02), qui regroupent à leur tour des sous-familles (Gawel, 1998 ; Sarni-Manchado et Cheyner, 2006).

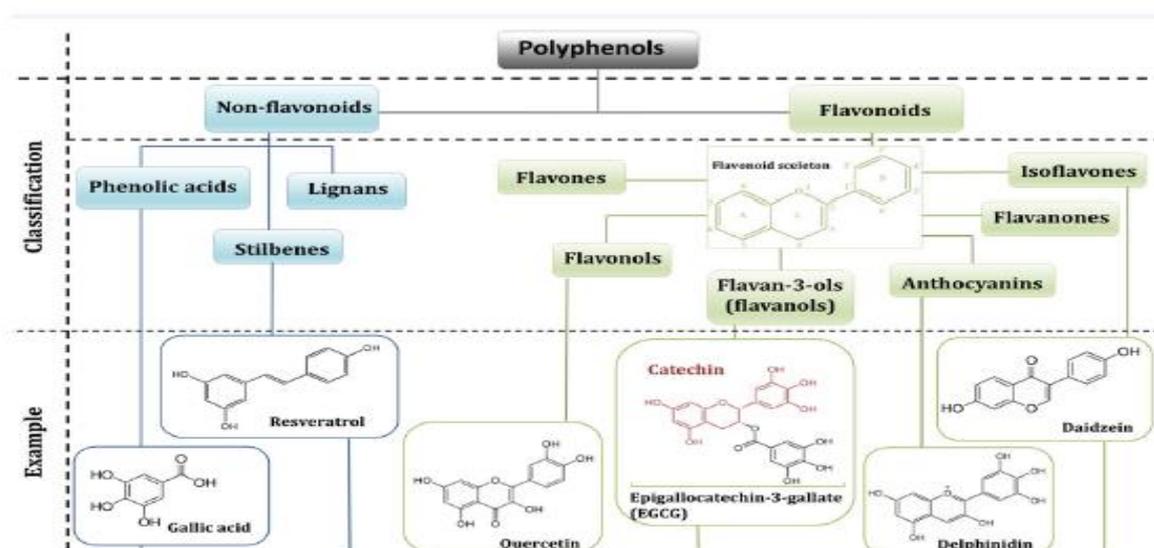


Figure 2 : les deux grandes classes des polyphénols (Sarni-Manchado et Cheyner, 2006).

a. Acides phénoliques

Les acides phénoliques se rencontrent dans les plantes sous forme libre comme glycosides et peuvent être intégrés dans des molécules plus grandes sous une forme ester, on cite par exemple : l'acide caféique, coumarique, ferulique, gallique et siringique.

En raison de la présence d'un nombre élevé de groupes hydroxyle et d'un fragment carboxyle, leurs propriétés antioxydantes sont très prononcées (Rice-Evans et *al.*, 1996 ; Sroka, 2005).

b. Flavonoïdes

Les flavonoïdes comprennent 15 atomes de carbone formant une structure C₆-C₃-C₆, soit deux noyaux aromatiques (benzo- γ -pyrone) reliés par un pont de 3 carbones. La structure en C₆-C₃-C₆ est le produit des deux voies de synthèse des composés phénoliques, le noyau B et le pont carboné constituant une unité phénylpropanoïde synthétisée à partir de la phénylalanine provenant de la voie de l'acide shikimique, alors que le noyau A vient de la condensation de 3 motifs acétates via la voie de l'acide malonique (Bruneton, 1999).

Au sens strict ils sont des composés dont la substitution par un noyau benzénique se fait en position 2. Les composés présentant une substitution en position 3 sont désignés par le terme isoflavonoïdes (figure 3) (Bruneton, 1999 ; Erlund, 2004).

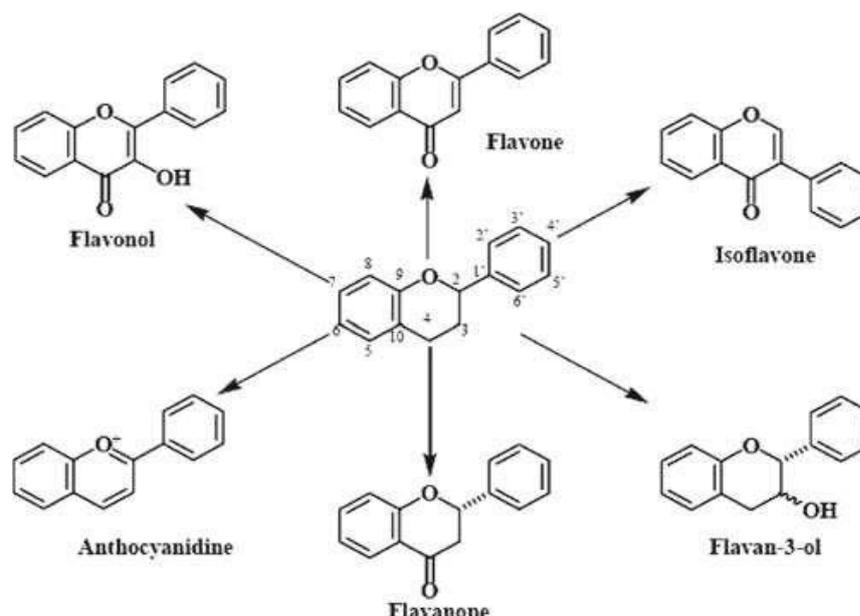


Figure 3 : Structures de base des principaux flavonoïdes (Chira et *al.*, 2008).

c. Tannins

Les tannins se répartissent dans toute les parties de la plante et qui diffèrent des flavonoïdes par leur poids moléculaire élevé (entre 500 et 3000) (Rejeb, 2008).

Elles sont des molécules fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments (Salah Eddine, 2014). Il existe deux catégories de tannins (Gori, 2014).

➤ **Tannins hydrolysables**

Ce sont des esters de glucose et d'acides phénols (figure 4) qui sont :

Soit d'acide gallique, pour le groupe de tannins galliques (gallotannins).

Soit d'acide ellagique, pour le groupe de tannins ellagiques (ellagitannins) (Azzi, 2016).

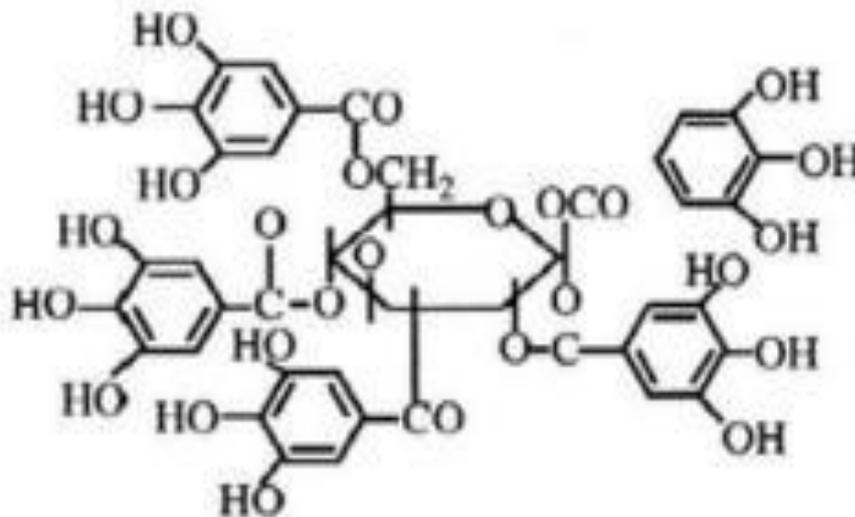


Figure 4 : Structure de tannins hydrolysables (Azzi, 2016).

➤ **Tannins condensés**

Les tannins condensés, appelés aussi proanthocyanidines, sont largement répandus dans l'alimentation humaine. Ces tannins sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide à chaud par rupture de la liaison inter monomérique (figure 5) (Gori, 2014).

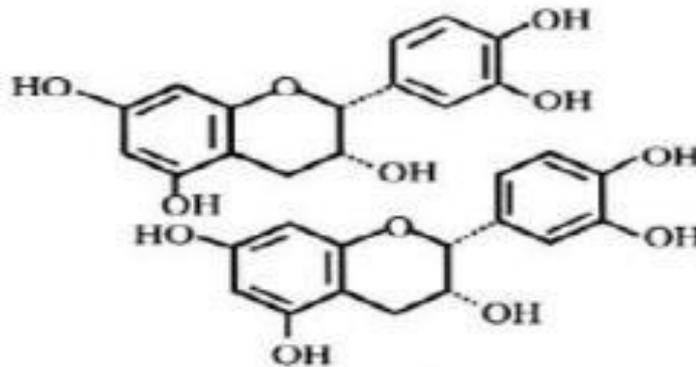


Figure 5 : Structure de tannins condensés (Azzi, 2016).

I.2.2. Terpénoïdes

Les terpénoïdes sont une classe importante de métabolites secondaires qui proviennent du même précurseur biosynthétique, l'acide mévalonique. Chaque classe de terpènes est issue du couplage « tête-à-queue » d'unités isopréniques. La première étape de leur biosynthèse commence toujours par condensation de deux dérivés phosphorylés de l'acide mévalonique, l'isopentényl pyrophosphate et le diméthyl-allyl-pyrophosphate (Bruneton, 1999).

a. Triterpènes

Les triterpènes « 4000 composés construits sur plus de squelettes différents » sont des composés en C₃₀ issus de la cyclisation du squalène. Ils sont très souvent hydroxylés et présentent une très forte unité structurale. L'unité structurale est également fortement marquée chez les stéroïdes : des composés aussi différents quant à leurs propriétés que les phytostérols, les saponosides, les ecdystéroïdes, les glucides cardiotoniques ou les alcalines stéroïdiques ont tous le même squelette de base (Bruneton, 1999).

b. Caroténoïdes

Ils sont synthétisés par les plantes et les micro-organismes photosynthétiques.

Six cents caroténoïdes sont actuellement identifiés, dont une soixantaine possède une activité provitaminique A, notamment, l'alpha, le bêta et le gamma-carotène ainsi que la cryptoxanthine.

La structure caroténoïde permet de nombreuses variations : isomérisations cis-trans, particularités chirales. Ainsi, le bêta-carotène existe dans les milieux naturels sous forme tout-trans, mais aussi 9-cis, 13-cis, 15-cis (figure 6). Ils peuvent subir des conversions sous l'action de la lumière (à laquelle les caroténoïdes sont très sensibles), de l'énergie chimique ou thermique, ou encore sous l'influence d'enzymes. Ils possèdent des propriétés antioxydantes et font partie du système de défense cellulaire contre les formes agressives de l'oxygène et les radicaux libres (Bertram, 1999).

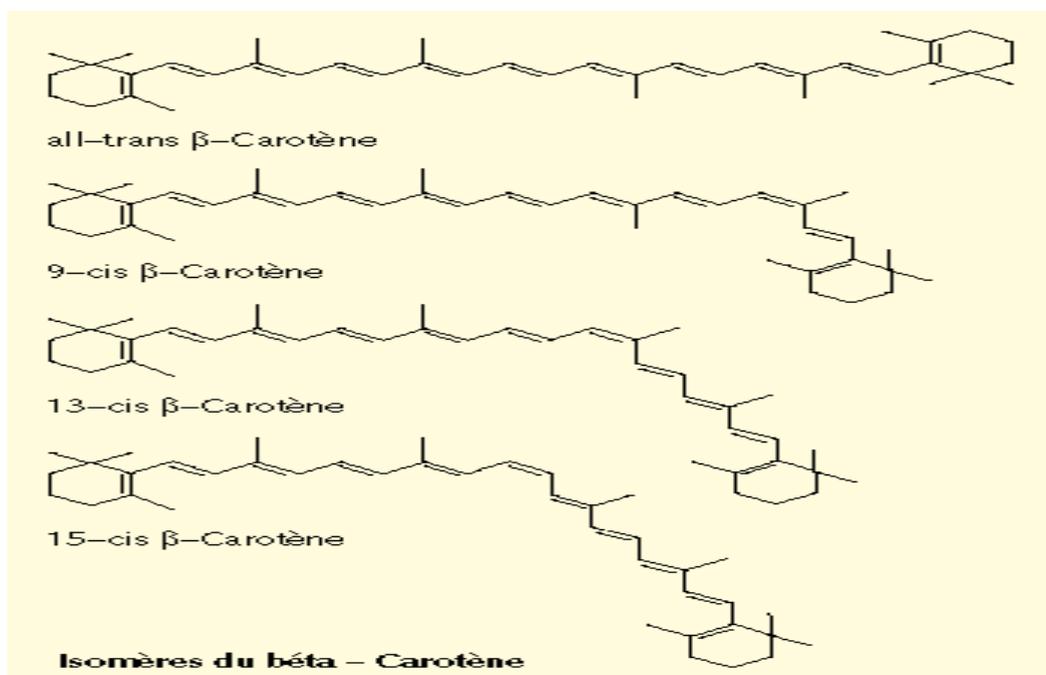


Figure 6 : Différents isomères du bêta-carotène (Bertram, 1999).

I.2.3. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés organiques naturels (le plus souvent d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, des structures moléculaires complexes plus ou moins basiques et douées de propriétés physiologiques prononcées même à faibles doses (Bruneton, 1999 ; Zenk et Juenger, 2007). Représentant un groupe fascinant de produits naturels, ils constituent un des plus grands groupes de métabolites secondaires avec près de 10 000 à 12 000 différentes structures (Roberts et Wink, 1999 ; Stöckigt et *al.*, 2002).

I.3. Effets pharmacologique et utilisations de la plante

I.3.1. Effets pharmacologique

Cette espèce a une longue histoire comme une plante médicinale utilisée pour traiter les calculs rénaux, les troubles digestifs, la dyspnée et les troubles cardiovasculaires en raison de sa capacité à réduire les facteurs de risque importants tels que l'inflammation, l'hypertension et la thrombose (Rigelsky et Sweet, 2002). La recherche documentaire montre qu'il existe des preuves substantielles de l'utilisation de *Crataegus* dans l'insuffisance cardiaque congestive chronique (Dahmer et Scott, 2010). Les fruits rouges sont riches en flavonoïdes et constituent la partie la plus employée dans la phytothérapie. Les flavonoïdes de *C. laciniata* détendent et dilatent les artères, en particulier les artères coronaires. Cela augmente le flux sanguin du muscle cardiaque et réduit les symptômes de l'angine et contractions du muscle cardiaque. Les flavonoïdes sont également fortement antioxydants, aidant à réduire la dégénérescence des vaisseaux sanguins (Pittler et al. 2003 ; Tabah et al., 2009). En général toutes les espèces du genre *Crataegus* ont les mêmes effets thérapeutiques (figure 7)

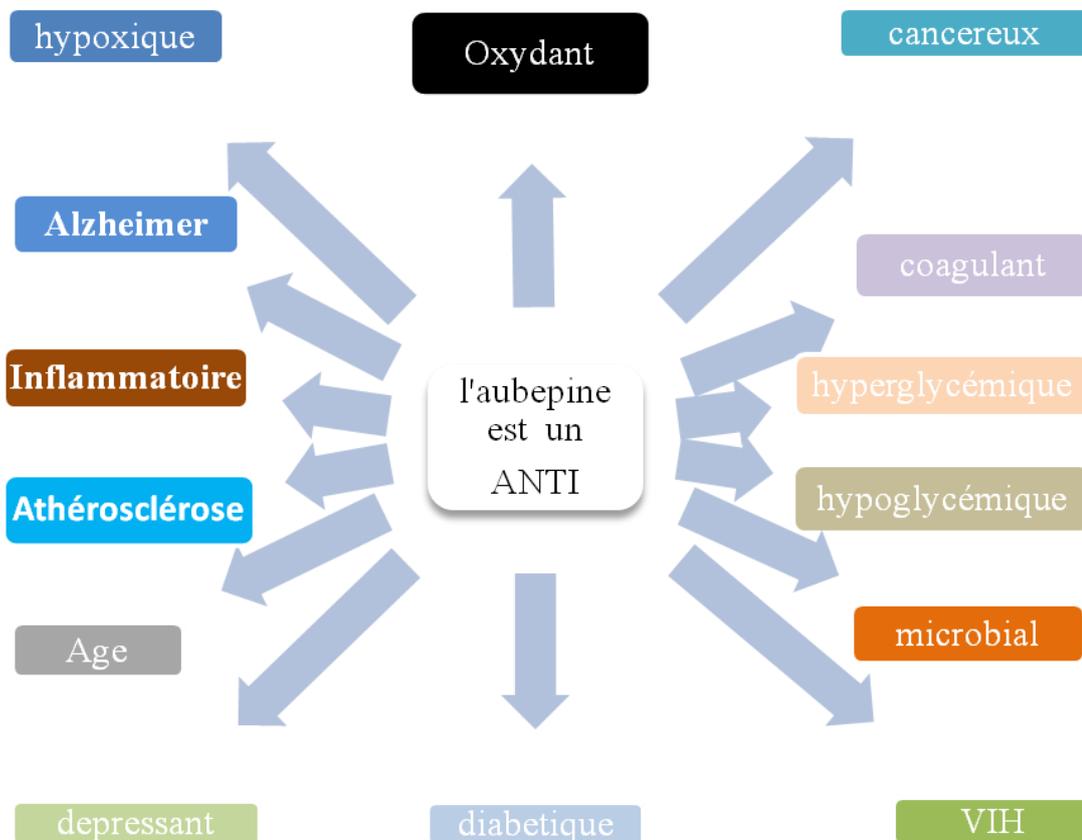


Figure 7 : Schéma de tous les effets thérapeutiques du genre *Crataegus*. (Amirhossein, 2020).

I.3.2. Utilisations traditionnelles de *Crataegus laciniata*

En Europe, l'utilisation de l'aubépine remonte à l'époque De Dioscoride au premier siècle. Son utilisation pour le traitement des maladies cardiaques a été commencée à la fin de 1800. Avec le temps ces fruits, feuilles et fleurs ou leurs combinaisons ont été traditionnellement utilisés comme astringent, antispasmodique, cardiotonique, diurétique, hypotensif et comme agent anti-athérosclérotique. L'herbe est utilisée pour traiter divers problèmes cardiaques y compris l'insuffisance cardiaque, l'angine de poitrine, l'hypertension, légère altération du rythme cardiaque et l'athérosclérose.

Dans la médecine traditionnelle chinoise, les fruits de l'aubépine sont utilisés pour stimuler la digestion et la fonction de l'estomac, l'amélioration de la circulation sanguine et l'élimination de la stase des sangs. Ainsi, ils sont utilisés dans les prescriptions pour traiter l'indigestion avec distension épigastrique, diarrhée; aménorrhée; hypertension; et l'hyperlipidémie (Hamdaoui, 2018).

En Algérie et au Maroc la fleur de *Crataegus laciniata* est employée en usage interne sous forme d'infusé comme remède contre les palpitations et les diarrhées. Par contre le fruit en Algérie est employé dans le massif des Aurès comme aliment de misère et au Maroc et dans le Moyen Atlas, les fruits mûrs sont consommés par les bergers.

En Tunisie, la fleur est employée sous forme de décocté dans le traitement de l'angine ; elle est réputée utile pour supprimer les douleurs post-partum, tandis que la feuille est employée en usage interne sous forme de décocté comme remède recommandé aux diabétiques. Les fruits de quelques espèces *Crataegus* étaient employés dans l'alimentation humaine malgré sa faible saveur et le manque de suc. Leurs fruits étaient récoltés et consommés crus, surtout en année de disette (Mohand, 2006).

I.4. Toxicité de la plante

L'espèce *Crataegus laciniata* est une plante à action lente et doit être utilisée au minimum 4 à 8 semaines pour en bénéficier pleinement. Le dosage dépend du type de préparation et la partie de la plante utilisé. Les doses testées dans les études cliniques européennes ont varié de 160 à 900 mg par jour de *C. laciniata* normalisé pour contenir 2,2% de flavonoïdes ou 18,75% de proanthocyanidines oligomères. Dans les deux premières semaines de la supplémentation de *C. laciniata*, des effets positifs seront observés. *C. laciniata* est sûre et ses effets secondaires sont minimaux lorsqu'elle est consommée en posologie recommandée (Kim et al., 2000).

I.5. Stress oxydant, radicaux libres et antioxydants

I.5.1. Stress oxydant

De manière générale, le stress oxydant se définit comme étant le résultat d'un déséquilibre de la balance entre les espèces oxydantes et les systèmes de défense (antioxydants), avec comme conséquence, l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule.

Dans les conditions physiologiques, l'oxygène produit des espèces réactives de l'oxygène (ERO) particulièrement toxiques pour l'intégrité cellulaire, c'est notamment le cas au niveau des mitochondries d'une cellule. Cependant, les ERO ne sont pas des espèces sélectives, elles ne sont pas capables de faire la différence entre l'agresseur et l'agressé (Hybertson, 2011).

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

Il est important de noter que le stress oxydant peut être également la conséquence de l'effet de facteurs environnementaux. En effet, la vie moderne confronte notre organisme à des facteurs provoquant une surproduction de ERO tels que la pollution, l'absorption d'alcool ou de médicaments, l'exposition au soleil ou encore le tabagisme. Un exemple de sources et de l'effet des radicaux libres sur l'ADN est montré dans la figure ci-dessous (Afonso et al., 2007).

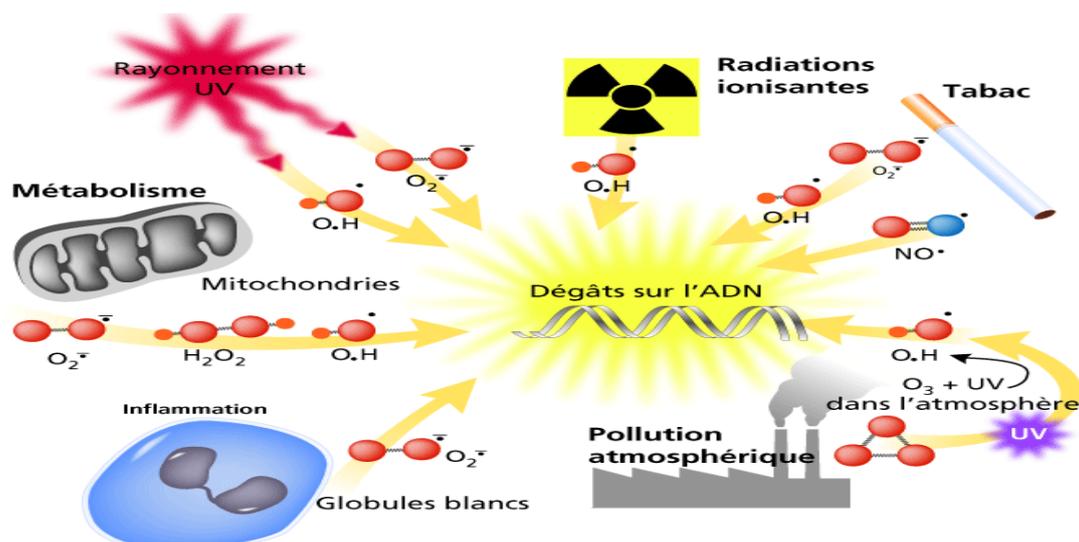


Figure 8 : Exemple de sources et de l'effet des radicaux libres sur l'ADN (Afonso et al., 2007)

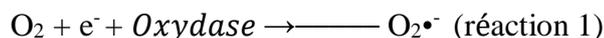
I.5.2. Radicaux libres

Un radical libre est un atome ou une molécule qui porte sur sa couche électronique périphérique un ou plusieurs électrons non appariés, c'est-à-dire non couplés à un électron de spin opposé. Cela entraîne une très haute réactivité chimique avec les éléments voisins (Rochette, 2008 ; Leverve, 2009).

Parmi les principaux radicaux libres:

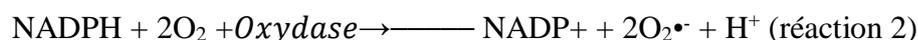
- **L'anion superoxyde : $O_2^{\bullet-}$**

L'anion superoxyde est généré par différents systèmes enzymatiques notamment des oxydases (e.g. NADPH oxydase dans la membrane lipidique et cytochrome oxydase dans la chaîne respiratoire mitochondriale). Cette réaction se fait grâce au transfert d'un électron du cofacteur enzymatique à l'oxygène.

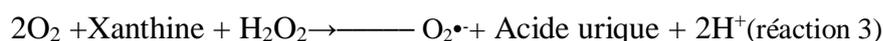


La durée de vie du radical $O_2^{\bullet-}$ ainsi créé est très courte du fait de sa forte réactivité. Il va ainsi interagir rapidement avec son environnement direct (molécules de solvant). L'anion superoxyde est un souvent désigné comme une des espèces permettant la production de nombreuses autres espèces réactives de l'oxygène.

Dans la membrane plasmique se trouve une enzyme, la NADPH oxydase. Elle permet de catalyser la réduction de l'oxygène en utilisant le NADPH comme donneur d'électrons. Cette réduction aboutit à la production de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ (Souza et *al.*, 2001)



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



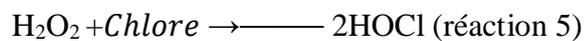
- **Le peroxyde d'hydrogène : H_2O_2**

La double protonation de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ peut se passer dans des conditions favorables en milieu acide. Cette réaction est catalysée par le superoxyde dismutase (SOD) aboutissant à la formation de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 :



Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 n'est pas un radical libre, et présente donc une plus grande stabilité par rapport aux les radicaux libres.

Toutefois il est considéré comme une espèce réactive d'oxygène car il intervient comme intermédiaire de synthèse d'autres radicaux libres. Ses propriétés physico-chimiques lui permettent de traverser la membrane lipidique, il joue donc un rôle important comme vecteur et diffuseur du stress oxydant. Le peroxyde d'hydrogène peut réagir dans les milieux intracellulaires avec des anions de chlore aboutissant ainsi à la formation d'acide hypochloreux :



Cet acide peut réagir avec les groupements amines de certains composés biologiques (e.g. protéines, lipides, ADN), entraînant leur dénaturation.

▪ Le radical hydroxyle : $\bullet OH$

Le radical hydroxyle est très toxique, il provient de la réaction très lente entre $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 :



Le radical hydroxyle peut également provenir de la réduction du peroxyde d'hydrogène par un métal de transition comme par exemple l'ion ferreux. Cette réaction est appelée la réaction de Fenton :



Il s'agit du radical le plus réactif des ERO et le plus toxique, sa durée de vie étant extrêmement courte de l'ordre de 10^{-9} s. Le radical hydroxyle réagit de manière non spécifique avec son environnement (comme l'ADN ou les protéines), il intervient donc comme un initiateur de la peroxydation lipidique ayant comme résultat la dégradation de la membrane lipidique. (Gutteridge et Halliwell., 1993).

▪ Les radicaux alkyles R•, alkoxydes RO• et peroxydes ROO•

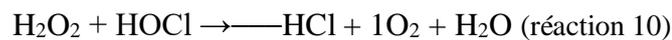
L'oxydation de la membrane cellulaire par le radical hydroxyle conduit à la formation de radicaux peroxydes ROO•. La dégradation de ces derniers suivant la réaction de Fenton conduit à la formation de radicaux alkoxydes hautement réactifs.



▪ L'oxygène singlet : $^1\text{O}_2$

Forme «excitée» de l'oxygène moléculaire, est souvent assimilé à un radical libre en raison de sa forte réactivité (Milane, 2004).

L'acide hypochloreux peut également réagir avec le peroxyde d'hydrogène aboutissant à la formation de dioxygène singlet activé $^1\text{O}_2$:



En effet, les conséquences engendrées par les radicaux libres se traduisent en dommages oxydatifs de l'ensemble des constituants cellulaires. Ce que nous montre la figure 9.

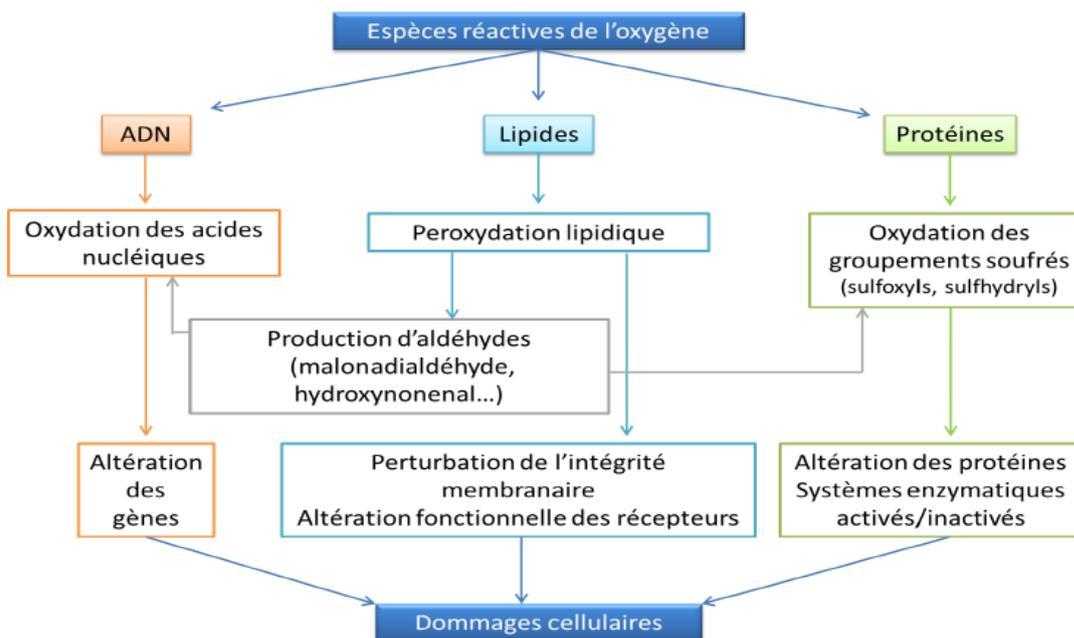


Figure 9 : Différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène (Poisson, 2013).

CHAPITRE II
MATERIELS ET
METHODES

II.1. Espèce végétale

L'espèce végétale utilisée dans cette étude est : fruit de la plante *Crataegus laciniata*.

II.1.1 Récolte

Les échantillons de *Crataegus laciniata* ont été récoltés en été de l'année 2019 à Djurdjura

II.2 Méthodes de préparations

II.2.1. Préparation de la matière végétale

L'identification de la plante *Crataegus laciniata* a été faite au niveau du laboratoire de Botanique de la faculté des sciences de la nature et de la vie, de l'université de Bejaia. Après l'identification de la plante ; elle a été bien nettoyée, puis un lavage avec de l'eau afin de se débarrasser de toutes poussière dont on a obtenu des échantillons qui ont été séchés à l'aire libre pendant 15 jours afin d'éliminer toute trace d'humidité, des produits sont obtenus et sont réduits en poudre avec un broyeur électrique. L'extrait obtenu est tamisé afin d'obtenir une poudre fine et homogène.

II.2.2. Préparation de l'extrait

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

La poudre de *Crataegus laciniata* dont la partie fruit (80g) a été macérée dans l'éthanol (96%) pendant 24 heures d'agitation dans un ballon, à un rapport de 1gramme de poudre pour 4ml d'éthanol. Après les 24H, une décantation a été réalisée en mettant la solution dans une éprouvette pendant une nuit. Après avoir récupéré le surnageant, ce dernier a subi une élimination totale de toute trace d'éthanol à l'aide d'un rotavapeur à 40°C. L'extrait éthanolique obtenu a subi une chromatographie séparative en utilisant la résine de type XAD16 amberlite afin de se débarrasser des sucres que contenait l'extrait éthanolique.

La pesée de l'extrait a été prise après la stabilisation du poids sec.

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

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

P₁ : poids d'extrait après évaporation ; **P₂** : poids du cristalliseur vide ; **E** : poids du l'échantillon initial ;
R : rendement d'extraction

II.3. Dosage des phénols totaux, flavonoïdes, tannins condensés

II.3.1. Dosage des phénols totaux

La teneur totale en polyphénols a été mesurée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu (Singleton, 1999). Son principe est basé sur l'oxydation de tous les composés phénoliques existant dans l'extrait à tester par le réactif qui est un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Lors de l'oxydation des phénols, il est réduit en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) (Ribéreau-Gayon, 1968).

Le contenu en polyphénols totaux est exprimé en concentration équivalente d'un polyphénol standard choisi selon l'extrait végétal à doser (acide phénolique majoritaire, souvent acide gallique ou chlorogénique).

➤ **Le mode opératoire :**

Placer 20 μ L de standard (acide gallique), blanc ou échantillon (l'extrait sec est dilué dans du MeOH/H₂O (50/50) à 1 mg.ml sur lequel a été effectué une dilution de 1/4) selon les puits, puis ajouter 100 μ L de Folin-Ciocalteu dilué 10X. Attendre 2 à 3 min, ensuite on ajoute 80 μ L de Carbonate de Sodium Na₂CO₃ (Peser 750 mg pour 10 mL H₂O ou bien 7,5 g dans 100 mL H₂O, dont la concentration est de 75 g.L⁻¹). Incuber 1 h à température ambiante (ou 5 min à 40°C) à l'obscurité. Enfin, lire l'absorbance à 735 nm.

NB : 10 mL est la quantité nécessaire et suffisante pour 1 plaque de 96 puits.

Les résultats de la teneur des polyphénols présente dans l'extrait de *Crataegus laciniata* en μ g équivalent d'acide gallique en mL⁻¹ par gramme d'extrait sont exprimés à partir de la courbe d'étalonnage (annexe 3).

II.3.3. Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage total des flavonoïdes a été déterminé selon la procédure décrite par MAKSIMOVIĆ, (2005). Dépendant du réactif AlCl₃ pour doser les flavonoïdes d'extrait végétal. Le principe de cette méthode est basée sur la capacité des flavonoïdes à former un complexe avec le chlorure d'aluminium résultant l'apparition d'une solution de couleur jaunâtre dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes contenue dans l'extrait.

➤ Mode opératoire :

Placer 125 μL de standard (Quercétine), blanc ou échantillon selon les puits (l'extrait sec est dilué dans du MeOH/H₂O (50/50) à 1 mg.mL⁻¹). Ensuite, ajouter 75 μL de réactif chlorure d'aluminium (133mg (AlCl₃ 6H₂O) + 400mg Acétate de sodium). Puis, incubé 10 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Enfin, lire l'absorbance à normalement à 430 nm.

Les résultats de la teneur des polyphénols présente dans l'extrait de *Crataegus laciniata* sont exprimés en μg équivalent quercetine mL⁻¹ par gramme d'extrait dans la courbe d'étalonnage (annexe 3).

II.3.4. Dosage des proanthocyanidines ou tannins condensés

Les tannins condensés sont dosés par la méthode de la vanilline en milieu acide décrite par Swain et Hillis (1959). Le principe de cette méthode est basé sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des proanthocyanidines en présence d'acide, pour produire un complexe de couleur rouge .

➤ Mode opératoire :

Le mélange réactionnel contient 1ml de la solution d'extrait (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et 2ml du réactif de la vanilline (1g de la poudre de vanilline dans 100ml de l'acide sulfurique à 70%). Après l'incubation à 50°C pendant 20 minutes, l'absorbance a été mesurée à 500 nm. Les résultats ont été exprimés en milligramme de l'acide tannique par gramme de la matière sèche à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe 3).

II.3.1. Activité Anti-radical DPPH•

La molécule DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), de couleur violette intense, elle est considérée comme étant un radical libre instable.

Son principe est basé sur la liaison du radical libre sur des substances antioxydantes (AH) (perd sa coloration native), qui lui transfèrent des électrons ou des protons, et la forme réduite du DPPH• (réaction 11), confère à la solution une couleur jaune (voir la figure 11).

Le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration découle de la nature, la concentration et la puissance des principes actifs.



AH : antioxydants

DPPH: Couleur violet

DPPH-H : incolore

➤ **Mode opératoire :**

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

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

A₀ : l'absorbance de la solution du contrôle (contient seulement le DPPH)

A₁ : l'absorbance du DPPH et l'extrait

A_s : l'absorbance de l'extrait sans DPPH.

Les standards qui ont été utilisés sont : l'acide caféique, rutine, catéchine, quercetine, acide tannique, acide gallique et la myricétine

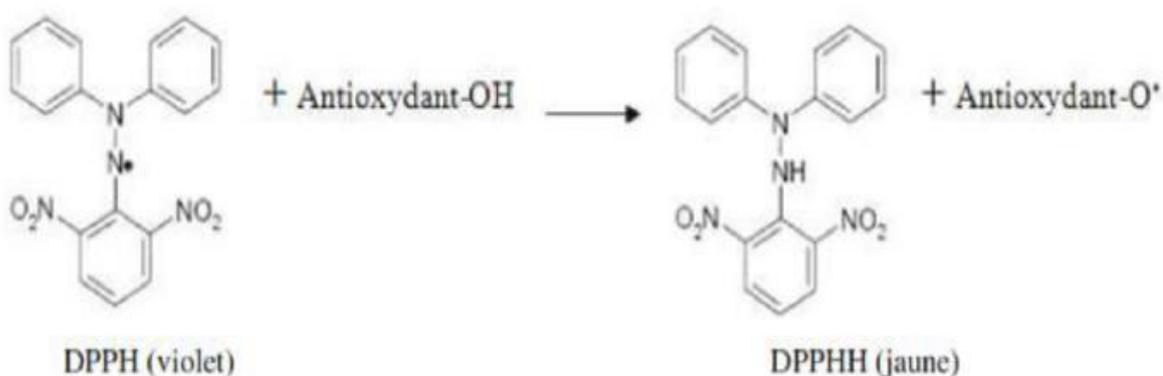


Figure 11 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (Congo et al., 2012).

CHAPITRE III
RESULTATS ET
DISCUSSION

III.1. Estimation quantitative de l'extrait

Il faut savoir avant d'entamer l'estimation quantitative qu'il existe des facteurs physico-chimiques qui peuvent influencer sur ce dernier, tel que le PH du milieu, la granulométrie de la poudre végétale, la température et le rapport solide-liquide (Shahidi et Nazck, 2006 ; Falleh et *al.*, 2008).

De ce fait, la technique que nous avons utilisé a été choisit à l'égard de ces facteurs (comme les conditions de séchage à température ambiante, abrité de la lumière pour assurer une élimination de l'eau afin de préserver la composition chimique de l'extrait), visant à l'extraction des composés actifs dans le fruit de *C. laciniata*.

Le rendement et la masse de l'extrait sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau III : Caractéristiques de l'extrait éthanolique de fruit de *Crataegus laciniata* dont la masse et le rendement.

| Extrait | Masse (g) | Rendement (%) |
|------------------------------|-----------|---------------|
| Extrait éthanolique de fruit | 6,48 | 10,02 |

D'après le tableau, on a eu une masse de 6,48g avec un rendement (10,02%) qui représente un bon pourcentage.

III.2. Teneur en phénols totaux, flavonoïdes, tannins condensés

L'extrait éthanolique du fruit de cette espèce peut contenir des centaines de composés. La teneur en 3 composés qui sont les polyphénols, les flavonoïdes et les tannins condensés dans notre extrait est représentés en moyenne plus au moins écarte type dans le tableau ci-dessous :

Tableau IV : Résultats de dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et des tannins condensés de l'extrait éthanolique des fruits de *Cratægus laciniata*.

| Dosage Extrait | Polyphénols mg EqAG/g d'extrait | Flavonoïdes mg EqQ /g d'extrait | Tanins condensés mg EqAT/g d'extrait |
|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--|
| Extrait éthanolique fruit (EEF) | 449,66±6,30 | 155,69±1,27 | 170,73±0,06 |

EqAG : Equivalent acide gallique ; **EqQ** : Equivalent quercetine ; **EqAT** : Equivalent acide tannique.

D'après le tableau III, l'EEF de *C. laciniata* est riche en polyphénols ($449,66 \pm 6,30$ mg EqAG/g d'extrait). Toutefois, les résultats de la teneur en composés phénoliques n'indiquent pas les valeurs exactes, puisque malgré sa grande sensibilité, la méthode de Folin-Ciocalteu peut présenter des problèmes d'interférence. En effet le réactif Folin-Ciocalteu peut réagir avec les acides aminés (tyrosine, tryptophane), les sucres réducteurs comme le glucose et le fructose (Boizot et Charpentier, 2006).

Les taux en polyphénols sont suivis par les proanthocyanidines ($170,73 \pm 0,06$ mg Eq AT/g d'extrait) une valeur supérieur à celle des flavonoïdes. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Loubna (2018) ($313,46 \pm 6,89$ mg EAT/g extrait une valeur supérieure à celle obtenue dans notre étude), qui ont montré la richesse des espèces du genre *Crataegus* en proanthocyanidines. Ceci est logique étant donné que les tannins condensés représentent des composés majoritaires dans les plantes de genre *Crataegus*. (Kumar et al., 2012).

Le taux des flavonoïdes avec $155,69 \pm 1,27$ mg EqQ/g d'extrait. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Loubna (2018), (qui sont $406,87 \pm 7,97$ mg EqAG/g d'extrait pour les polyphénols dont $22,03 \pm 1,4$ mg EqQ/g d'extrait pour les flavonoïdes) de fruit de *Crataegus oxyacantha* l'espèce appartenant à la famille des rosacés. Aussi, on constate que cette valeur est nettement inférieure à celle obtenue dans notre étude.

Plusieurs facteurs peuvent perturber le dosage des composés phénoliques. Des études récentes ont montré que les facteurs extrinsèques comme la géographie et le climat, les facteurs génétiques, mais aussi le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (Aganga et al., 2001).

III.3. Analyse spectrale

A l'aide de la technique de la spectroscopie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide à haute performance, 30 composés ont été identifiés à partir de l'extrait éthanolique des fruits de *Crataegus laciniata*. L'analyse spectrale (figure 12) de ce dernier à une absorbance de 280nm (détection des pics de bases, moléculaires et des fragments correspondants) en mode ions positif ($[M+H]^+$) et en mode ions négatif ($[M-H]^-$). Leurs temps de rétention (t_R (min)), masse moléculaire (m/z), données MS/MS ou MSN et le composant correspondant sont présentés dans le tableau IV.

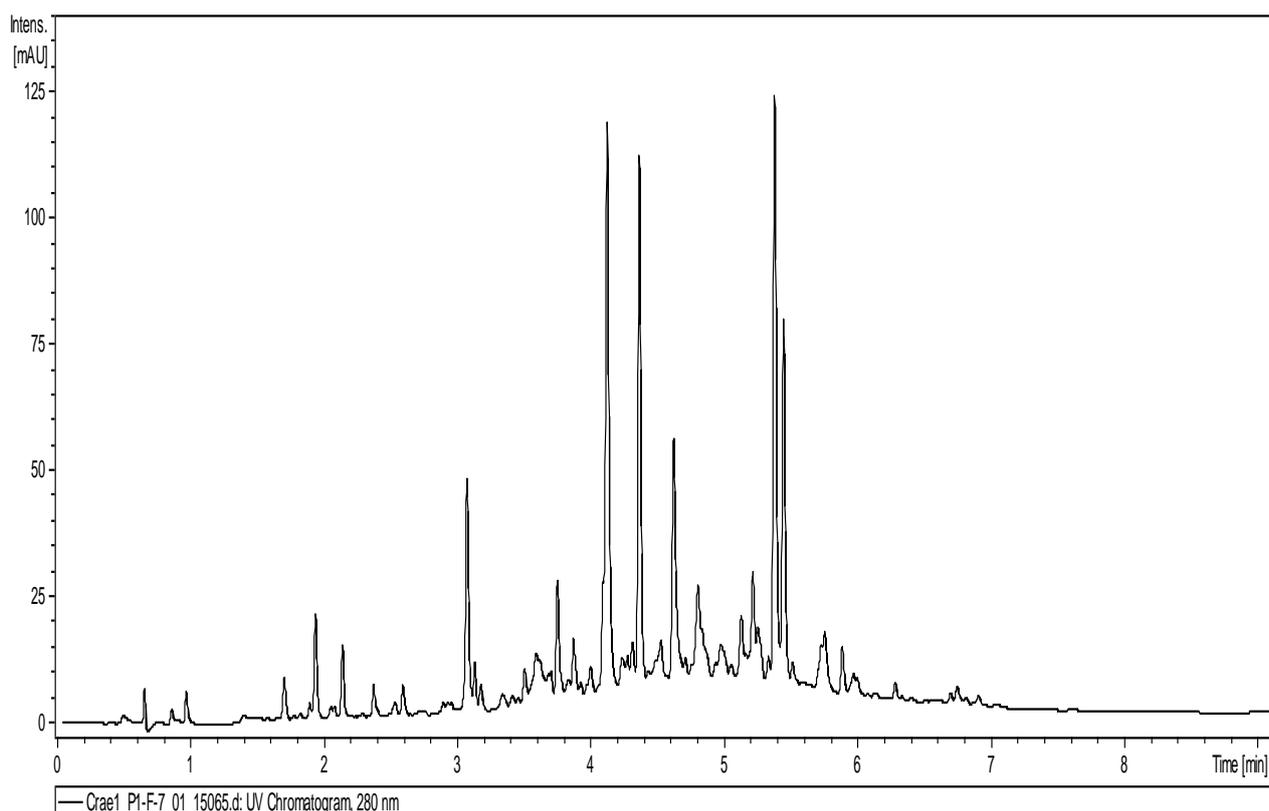


Figure 12 : Spectre de masse couplé à la chromatographie en phase liquide (en mode positif $[M+H]^+$).

Tableau V : Identification des 30 composés par référence aux deux modes ions (positif et négatif) et leurs données MSN.

| Pic | t_R (min) | m/z | | | | Identification |
|-----|----------------|-----------|----------------------------|-----------|--------------------|--|
| | | $[M+H]^+$ | MS/MS ⁺ /MSN | $[M-H]^-$ | MS/MS ⁻ | |
| 1 | 0,7 | 272 | 110 | 270 | 269/135/270 | 2',3, 4,4'-Tetrahydrochalcone ou butein (Antal et <i>al.</i> , 2010) |
| 2 | 1,0 | 332 | 314/108/136 | 331 | Non détecté | 5-hydroxyhomolycorine (fait partie des alcaloïdes) (Guillin , 2016) |
| 3 | 1,7 | 399 | 381 | 397 | 357 | Allocolchicine (fait partie des alcaloïdes) (Kuo-Hsiung Lee, 1993) |
| 4 | 2,0 | 317 | 297/185 | 315 | 315 | Myricetine (Ma, Y.L et <i>al.</i> , 1997) |
| 5 | 2,1 | 341 | 323/179/137 | 340 | 119/133/219 | Caffeoyl-O-hexoside (Ridha Ben Said, 2017) |

III. Résultats et discussion

| | | | | | | |
|-----------|-----|-----|-------------------------------------|-----|--------------------------|---|
| 6 | 2,4 | 355 | MSN 337/269/ 139 | 353 | 191/173/1 79/192 | Caffeoylquinic acid (Chlorogenic acid) (Egypt et Chem, 2021) |
| 7 | 2,6 | 355 | 337/192/ 373 | 353 | 191 /173/1 79 | Trans-Chlorogenic acid (Yu Lin, 2015) |
| 8 | 3,1 | 355 | 163 | 353 | 191/179 | Neochlorogenic acid (Fabiana, 2011) |
| 9 | 3,5 | 579 | MSN 449/287 | 577 | 289 /407 | Proanthocyanidin A1 (Danijela , 2020) |
| 10 | 3,6 | 449 | 287 | 447 | 447/284 | Cyanidin-3-O-galactoside (Jin Hwan Lee et <i>al.</i> , 2009) |
| 11 | 3,7 | 355 | 163/135 | 353 | 191/172/1 79 | Chlorogenic acid (Yu Lin, 2015) |
| 12 | 3,8 | 355 | MSN : 289/163 | 353 | 191/173/1 79 | Chlorogenic acid (Catherine et McNamara, 2004) |
| 13 | 3,9 | 441 | 279/412/ 310 | 340 | 121/227/3 48/310 | Caffeic acid derivative (Hale Gamze, 2018) |
| 14 | 4,0 | 579 | 579 :427/ 410/289/ | 577 | 289/407/1 25 | Procyanidin B3 (Fl via et Resende, 2011) |
| 15 | 4,1 | 579 | 561 /453/439 /427/409 /291 | 577 | MSN : 451/425/4 07 | Procyanidin B1 (Junxi et May, 2021)(Chao-Min Wang, 2011) |
| 16 | 4,2 | 579 | 409/427/ 291/453/ 247 | 577 | 289/407 | Epicatechin-(4-Beta->8)- Catechin ou Proanthocyanidin A2 (Fl via et Resende, 2011) |
| 17 | 4,3 | 433 | MSN : 415/327 | 431 | 311/413 | Flavonoid C-glycosides (isovitexin) (Mullen et <i>al.</i> , 2010) |
| 18 | 4,4 | 291 | 123/139/ 165 | 289 | 289/245/1 09/203 | (-)-Epicatechin (Mraihi et <i>al.</i> , 2015) |
| 19 | 4,5 | 476 | 476 :459/ 371 | 474 | 314/315 | Petunidin 3-glucoside ou galactoside (Tuty, 2020) |
| 20 | 4,6 | 476 | 459/415 | 474 | 314 | Petunidin 3-glucoside ou galactoside (Tuty, 2020) |
| 21 | 4,8 | 521 | 503/459/ | 519 | 519 | Petunidin 3-(6"- |

III. Résultats et discussion

| | | | | | | |
|----|-----|-----|---|-----|-----------------------------|--|
| | | | 353 | | | acetylglucoside) (Junxi et May, 2021) |
| 22 | 5,0 | 565 | 547 | 563 | 546 | Canthaxanthin (fait partie des caroténoïdes) (Hurtmut , 1984; Amy et Lafountain, 2013) |
| 23 | 5,1 | 579 | 561/492/ 433/411/ 379/337/ 291/245 | 577 | 591/453 | Procyanidin dimer ou Proanthocyanidin (Elizabeth, 2003) |
| 24 | 5,2 | 611 | MSN : 611 :465/ 303/633 | 609 | 463/301 | Quercetin 3-O-rutinoside (Félix, 2019) |
| 25 | 5,3 | 611 | MSN : 611/303 | 609 | MSN : 609 :301 | Rutine ou hesperidin (Loubna, 2018) |
| 26 | 5,4 | 465 | 303 MSN : 465/303 | 463 | 301 MSN : 463/301 | Delphinidin 3-glucoside (Li-Li, 2014) |
| 27 | 5,5 | 579 | 561/453/ 427/409/ 291 | 577 | 559/463/4 51/425/40 7 | Procyanidin dimer (Elizabeth, 2003) |
| 28 | 5.6 | 579 | 426/288/ 363/531/ 560 | 577 | 737 : 611/: 463/301 | Procyanidin dimer (Elizabeth, 2003) |
| 29 | 5,7 | 551 | 303 | 549 | 503/423/3 39/285/23 9 | Kaempferol-coumaroyl-glucoside (Navindra et Seeram, 2005) |
| 30 | 5,9 | 449 | 449/287 MSN : 449/287/ 317 | 447 | MSN : 447 | Methoxykaempferol-pentoside (Pengzhan Liu et al., 2011) ou cyanidin-3-O-glucoside (Jin Hwan Lee et al., 2009) |

III.3.1. Interprétation spectrale

Dans un premier temps, les composés ont été détectés en mode ions positif. Ce mode permis de préciser le pic moléculaire qui est généralement le pic plus lourd ou presque le plus lourd. D'après l'analyse de tous les spectres le pic moléculaire est visible dans tous les cas, ce qui a permis de déterminer facilement la masse moléculaire ou une masse qui est proche. En mode positif, des espèces principalement protonées $[M+H]^+$ ainsi que des ions déchargés ont été observés.

Dans un second temps, les composés ont été détectés en mode négatif (Observation des espèces déprotonées) $[M-H]^+$ afin d'obtenir des informations complémentaires à ceux du mode positif.

Dans un temps de rétention ($t_R=0,7$ min), le pic 1 dont l'ion moléculaire à $272m/z$ $[M+H]^+$ avec un seul ion fragment abondant à $110m/z$ (MS/MS⁺) dû à la perte de $C_{10}H_{22}$ et une molécule H_2O $[M+H-C_{10}H_{22}-H_2O]^+$, été détecté comme étant 2',3,4,4'-tetrahydroxychalcone ou appelé aussi butein ($272,25g/mol$) ($C_{15}H_{12}O_5$ comme formule brute) qui est un simple dérivé de la chalcone, est présente dans de nombreux genres non apparentées et dans des plantes médicinales (Antal et al., 2010), mode négatif à $270m/z$ $[M-H]^-$ avec 3 ions fragments à $269 m/z$ $[M-H-H]^-$, $135m/z$ $[M-H-C_7H_{14}O-OH]^-$ (MS/MS⁻) et le dernier fragment qui représente la molécule entière mais déprotonée ($270m/z$).

En t_R de 1 min (pic 2) le pic moléculaire est à $332m/z$ $[M+H]^+$ avec l'apparition de 3 pics fragments à $314m/z$ qui est le plus intense (pic de base) dû à la perte d'un élément d'oxygène $[M+H-O]^-$ puis, $108m/z$ $[M+H-C_3H_7-Glucose]^+$ et $136m/z$ $[M+H-CH_4-Glucose]^+$ se suivent, été identifié comme 5-hydroxyhomolycorine ($C_{18}H_{21}NO_5$) avec une masse moléculaire de $313,4g/mol$ (partie des alcaloïdes) (Guillin, 2016), cette molécule n'a pas été détecté en mode négatif.

Le pic 3 correspondant au t_R 1,7min après avoir été analysé montre que le pic le plus lourds est à $399m/z$ $[M+H]^+$ dont un seul pic fragment existant à $381m/z$ $[M+H-O_{18}]^+$ (MS/MS⁺) et par rapport au mode négatif à $397m/z$ avec un fragment à $357m/z$ $[M-H-2H_2O]^-$. Ces données ont été identifiées étant allocolchicine ($399,4g/mol$) ($C_{22}H_{25}NO_6$) (fait partie des alcaloïdes) (Lee, 1993).

Le pic 4 observé à 2 min apparu avec un ion moléculaire à $317m/z$ en mode positif contenant des fragments à $297m/z$ $[M+H-H_2O]^+$ et à $185m/z$ $[M+H-C_7H_{12}O_2]^+$, en mode

négalif à 315m/z plus l'apparition des fragments à 315m/z représentant la molécule déprotonée, identifié comme myricétine ($C_{15}H_{10}O_8$) dont le poids est de 318,23g/mol (Ma et *al.*, 1997).

En temps t_R 2,1min (pic 5) dont on a observé le pic parent en $[M+H]^+$ à 341m/z avec des fragments à 137m/z $[M+H-C_9H_{18}O-3H_2O]^+$ (pic de base), à 323m/z $[M+H-O]^+$ et à 179m/z dû au clivage de la fraction hexoside (162 Da). En mode négatif des signaux abondants de $[M-H]^-$ ont été détectés à 339m/z contenant fragments à 119m/z $[M-H-2H_2O-Glucose]^-$, 133m/z et à 219m/z $[M-H-C_8H_7O_2]^-$. Ces données démontrent que le composé est Caffeoyle-O-hexoside (1-O-Caffeoyleglucose) avec une masse de 342,30g/mol ($C_{15}H_{18}O_9$) (Ben Said., 2017).

Les pics 6, 7, 8, 11 et 12 observés à 2,4min, 2,6min, 3,1min, 3,7min, et 3,8min, respectivement en mode positif, ont données le même pic moléculaire qui est à 355m/z et des fragments similaires à de 163 et 337 m/z qui correspondaient à [caffeoyle] $^+$ et $[M+H-H_2O]^+$ (Sakushima et *al.*, 1985), pour les pics 6 et 7 identifiées comme Caffeoylequinic acid (Chlorogenic acid avec un PM de 354,31g/mol) ($C_{16}H_{18}O_9$) (Egypt et Chem, 2021) et Trans-Chlorogenic acid (Yu Lin, 2015) par ordre. Un seul fragment abondant aussi dans les autres pics 8, 11 et 12 à 163m/z identifiées comme neochlorogenic acid (Antognoni, 2011), Trans-Chlorogenic acid (Yu Lin, 2015) et Chlorogenic acid (McNamara, 2004) respectivement. Par rapport au mode $[M-H]^-$ tous les pics (6, 7, 8, 11, 12) sont détectés à 353m/z avec 3 ions fragments à 191m/z étant acide quinique, à 173m/z étant acide quinique avec perte d'une molécule H_2O et à 179m/z comme acide caféique.

En temps t_R de 3,5min, 4min, 4,1min, 4,2min, 5,1min, 5,5min et enfin 5,6min correspondants aux pics 9, 14, 15, 16, 23, 27 et 28 ont un ion moléculaire à 579m/z qui donne des fragments similaires d'alder rétro-diels 409 et 427m/z et un fragment de monomère 291 m/z dû au clivage interflavanique de la liaison. Même si on a les paramètres en mode négatif mais ceux du positif suffiront de détecter les composés comme des dimères procyanidines avec un poids moléculaire de 576,5g/mol ($C_{30}H_{24}O_{12}$). Cette approche consistant à comparer les spectres MSN et à distinguer le type (A ou B) et l'isomère (1, 2, 3...7) (Fraser et *al.*, 2012). Par exemple en t_R de 3,5min (pic 9) à partir des ions fragments l'un à 289m/z et l'autre à 407m/z, le composé a été confirmé comme étant proanthocyanidine type A isomère 1 (Danijela, 2020), en t_R 4,0min avec deux fragments confirmatifs à 453m/z et à 561m/z que le composé est belle et bien le procyanidine type B isomère 1 (Junxi et May 2021).

Le pic 10 observé en t_R 3,6min identifié comme cyanidin-3-O-galactoside avec une masse moléculaire de 449,4g/mol ($C_{21}H_{21}O_{11}^+$) (Lee et *al.*, 2009), et cela en ce référant au mode positif dont le pic parent est à 449m/z avec un seul fragment à 287m/z qui correspond au cyanidine aglycone (Senna, 2010), et au mode négatif dont le pic le plus intense est à 447m/z et un ion fragment à 284m/z $[M-H-C_9H_{18}O-OH]^-$, qui est le cyanidine aglycone $[M-H]^-$.

Le pic 13 en t_R de 3,9min, le pic le plus lourd à été déterminé à 441 m/z $[M+H]^+$ contenant des ions fragments à 279 m/z, à 412 m/z et à 310 m/z. Il y a peu d'informations sur ces données mais en se référant au mode négatif $[M-H]^-$ à 439m/s avec des ions fragments à 121, 227, 348 et 310m/z. Ce composé n'a pas été identifié exactement, mais il a été identifié comme un dérivé de l'acide caféique.

En temps de rétention à 4,3min (pic 17), le pic moléculaire a été détecté à 433m/z avec deux fragments, l'un à 415m/z dû à la perte d'atome d'oxygène et l'autre à 327m/z $[M+H-106]^-$ et cela en mode positif. En mode négatif le pic parent a été détecté à 431m/z $[M-H]^-$ avec deux ions fragments abondants à 311m/z $[M-H-12O]^-$ et à 413m/z $[M-H-O]^-$. Ce composé est donc le Flavonoid C-glycosides (isovitexin) avec un PM de 432,4g/mol (Mullen et *al.*, 2010).

Le pic 18 (4,4min) dont le pic moléculaire été à 291m/z $[M+H]^+$ et des fragments, le plus intense à 123m/z par le clivage entre C_2-C_3 et $O-C_2$ de l'anneau de pyrane puis, 139m/z qui résulte de la séparation d'alder retro-diels du composé et le dernier à 165m/z qui résulte du clivage entre C_4-C_5 et $O-C_2$ de l'anneau de pyrane. En mode négatif le pic parent a été détecté à 289m/z avec 3 fragments (245m/z, 109m/z, 203m/z). Donc le composé est sûrement (-)-Epicatechin avec un PM de 290,27g/mol (Mraïhi et *al.*, 2015).

En temps t_R 4,5min et 5,6 (pic 19 et 20, en ordre), l'ion moléculaire a été détecté à 476m/z en mode positif, similaires dans le premier fragment à 459m/z $[M+H-O]^+$ et ce différent dans le deuxième dont le pic 19, l'ion fragment est à 371m/z et le pic 20 à 415m/z. Ces paramètres correspondent au petunidin 3-glucoside ou galactoside (PM = 479,4g/mol) (Tuty, 2020). En mode négatif l'ion moléculaire a été apparu à 475m/z pour les deux pics avec les mêmes ions fragments à 314m/z $[M-H-C_{10}H_{23}]^+$ et 315m/z $[M-H-C_9H_{18}O]^-$.

Le pic 21 en t_R de 4,8min l'ion moléculaire apparu à 521m/z $[M+H]^+$ dont 3 fragments à 503m/z $[M+H-O]^+$, 459m/z $[M+H-C_2H_2O_2]^+$ et à 353m/z $[M+H-C_{10}H_{22}-H_2O]^+$, en mode

négalif le pic le plus intense à 519m/z avec un fragment détecté qui fait référence à la molécule entière. Ce composé été détecté comme petunidin 3-(6"-acetylglucoside) (PM = 521,4g/mol et FB : C₂₄H₂₅O₁₃⁺) (May, 2021).

Le pic 22 observé à t_R égale à 5min identifié entant que canthaxanthin (PM = 564,8g/mol et FB :C₄₀H₅₂O₂) (fait partie des caroténoïdes) (Hurtmut, 1984; Lafountain, 2013) d'après les données du mode positif dont le pic moléculaire a été détecté à 565m/z avec un seul ion fragment à 547m/z [M+H-O]⁺ et du mode négatif à 564m/z avec un fragment à 546m/z [M-H-18]⁻.

Les pics 24, 25 observé, respectivement à 5,2min et 5,3min ont le même pic moléculaire qui a été détecté à 611m/z [M+H]⁺, un fragment identique à 303m/z et un autre fragment de plus pour le pic 24 à 465m/z (le pic de base) ce qui aide à l'identifié entant que quercetin 3-O-rutinoside (PM = 610,5g/mol et FB : C₂₇H₃₀O₁₆) (Félix , 2019) et le pic 25 étant rutine (loubna, 2018). De meme pour le mode négatif, le pic parent pour les deux à 609m/z, un fragment similaire à 301m/z et un fragment confirmatif à 463m/z pour le pic 24.

Le pic 26 observé à 5,4min, le pic parent à 465m/z deux fragment à 465m/z [M+H]⁺ qui présente la molécule entière, et à 303m/z z [M+H-C₁₀H₂₂-H₂O]⁺. En mode négatif aussi le pic le plus intense à 463m/z et des fragments à 463m/z qui présente la molécule et à 301m/z z [M-H-C₁₀H₂₂-H₂O]⁻. Cette molécule été identifiée comme Delphinidin 3-glucoside avec un PM de 465,4g/mol et un formule brute C₂₁H₂₁O₁₂⁺ (Li-Li, 2014).

Le pic 29 observé à 5,7min (t_R), il n y a pas beaucoup d'informations mais 2 molécules ont été détectées par rapport aux deux modes positif et négatif. Le pic le plus intense été détecté à 551m/z avec un seul fragment à 303m/z et cela en mode positif et ces paramètres sont identifiés comme Delphinidin 3-(6"-malonylglucoside).

En mode négatif le pic parent été détecté à 549m/z avec des ions fragments à 503, 423, 339, 285 et à 236m/z. Le composé été identifié comme étant Kaempferol-coumaroyl-glucoside avec un poids moléculaire de 594g/mol (C₃₀H₂₆O₁₃) (Seeram, 2005).

Le dernier pic (pic 30) en temps de rétention à 5,9min dont le pic moléculaire été détecté à 449m/z avec des fragments à 449m/z [M+H]⁺ qui présente la molécule entière, à 287m/z [M+H-C₁₀H₂₂-H₂O]⁺ et à 317m/z en mode négatif le pic le plus intense à 447m/z avec un fragment qui présente la molécule en mode [M-H]⁻.Ce composé été identifié étant

methoxykaempferol-pentoside ($C_{20}H_{18}O_{12}$ et $PM = 450,3g/mol$) (Liu et *al.*, 2011) ou cyanidin-3-O-glucoside ($C_{21}H_{21}O_{11}^+$) dont le PM est de $449,4g/mol$ (Lee et *al.*, 2009).

Sur la base de l'identification des 30 composés, une vérification de la source de ces derniers a été effectuée. On peut résumer que la majorité des composés font parties des polyphénols dont on a les proanthocyanidines (les plus répons), puis les anthocyanines, les acides phénoliques comme l'acide chlorogénique qui est d'après l'identification le plus abondant des acides, puis l'acide caféique, l'acide coumarique,...et en dernier lieu les flavonoides. On a remarqué aussi qu'il y a des polyphénols qui sont associés à des sucres simples malgré leurs éliminations dans la mise en préparation de l'extrait. Par cela on a considéré les sucres comme les composés les plus abondants dans le fruit de *Crataegus laciniata*. la minorité des molécules identifiées font partie des alcaloïdes et caroténoïdes qui font partie des métabolites secondaire. Ces résultats obtenus sont confirmé par le profil du spectre UV-Visible (Annexe 4) qui montre l'absorption des composés à des longueurs d'ondes spécifique aux composés phénoliques.

III.4. Activité antiradicalaire DPPH

Les résultats obtenus (figure13), révèlent que, l'extrait du *Crataegus laciniata* possède une bonne activité antiradicalaire avec un taux d'inhibition de $91,13\pm 0,006\%$ en comparant avec les différentes molécules pures utilisées dans ce test. La rutine a exhibé le plus grand effet antioxydant ($98,89\pm 0,005\%$) suivi de l'acide caféique ($98,21\pm 0,001\%$), de l'acide tannique ($95,05\pm 0,013\%$), de la quercétine ($95,02\pm 0,007\%$), de l'acide gallique ($94,22\pm 0,013\%$), de la catéchine ($93,94\pm 0,010\%$) et en dernier de la myricétine ($90,64\pm 0,027\%$) à une concentration de $100\ \mu g/ml$. L'analyse statistique a montré une différence significative ($p\leq 0,05$).

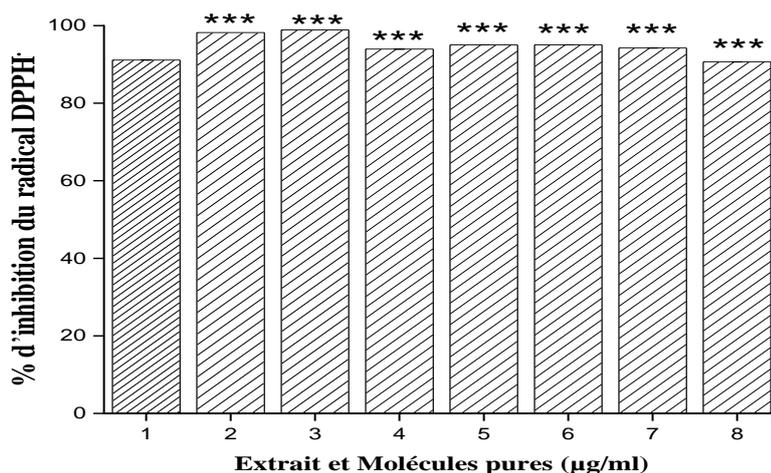


Figure 13 : Pourcentage d'inhibition de radical DPPH de l'EEF de *Crataegus laciniata* (1) et des autres standards à une concentration de 100µg/ml qui sont ; 2 : la Acide caféique, 3 : Rutine, 4 : Catéchine, 5 : Quercétine, 6 : Acide tannique, 7 : Acide gallique, 8 : Myricétine.

L'activité anti-radicalaire de l'extrait éthanolique et des composés purs a également été testée à différentes concentrations (Figure 15) afin de calculer leurs concentrations minimales inhibitrices à 50% du radical DPPH• (IC₅₀).

L'IC₅₀ la plus faible présente l'activité la plus forte, la molécule est capable de piéger les radicaux, en particulier les radicaux peroxydé qui sont les propagateurs d'auto-oxydation des molécules lipidiques et rompre ainsi la réaction en chaîne des radicaux libres. Ces IC₅₀ sont déterminées graphiquement (Figure 14).

L'IC₅₀ de l'extrait éthanolique du fruit de *C. laciniata* est de l'ordre de (13,17±0,01 µg/ml), comparé statistiquement avec des standards, 5,25 ±0,01 µg/ml pour l'acide caféique , 5,51 ±0,02 µg/ml pour la rutine, 5,60 ±0,03 µg/ml pour la quercétine , 5,84 ±0,02 µg/ml pour la catéchine, 6,60 ±0,03 µg/ml pour l'acide gallique , 11,40 ±0,02 µg/ml pour l'acide tannique et 74,53 ±0,02 µg/ml pour la myricétine. La différence est significative (p≤0,05). D'après ces résultats, l'EEF de *C. laciniata* révèle une importante activité radicalaire en comparaison surtout avec la myricétine et l'acide tannique.

La forte activité de l'EEF peut être attribuée à sa richesse en composés phénoliques, flavonoïdes et tannins condensés.

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

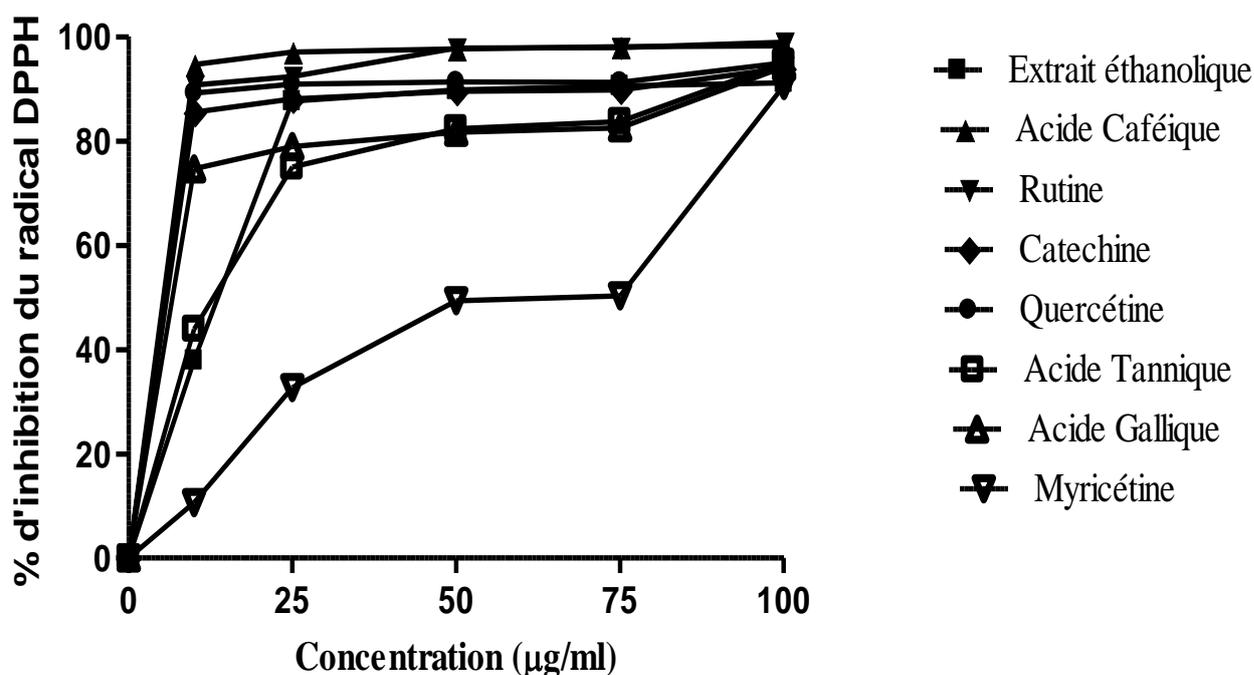


Figure 14 : Effet de différentes concentrations de l'extrait éthanolique des fruits de *C. laciniata* et des autres standards sur le radical DPPH (concentration 10, 25, 50, 75 et 100 µg/ml).

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

CONCLUSION

Conclusion et perspectives

Le présent travail a été porté sur l'étude de l'extrait organique (extrait éthanolique) de la partie fruit de *Crataegus laciniata* (aubépine), de caractériser la composition chimique en utilisant des méthodes colorimétriques et la méthode de la spectroscopie de masse. En parallèle une évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée.

L'évaluation du contenu des polyphénols a confirmé la richesse de l'EEF en proanthocyanidines. Quant aux flavonoïdes, les résultats obtenus indiquent des taux inférieurs à ceux obtenus dans les tannins condensés. Ces résultats sont confirmés par l'analyse spectrale qui a montré la caractérisation de 30 composés dont la majorité est de classe proanthocyanidines, cette analyse est appuyée par le spectre UV visible.

L'étude de l'activité antioxydante a montré un bon pouvoir antiradicalaire dont le pourcentage d'inhibition qui dépasse les 90% ce qui est confirmé par la valeur d'CI50 (13,17 μ g/ml) en comparaison avec des standards connus pour leurs haute activité antioxydante.

Au terme de la présente étude, la plante constitue une bonne source d'antioxydants naturels grâce à sa richesse en composés phénoliques, ce qui peut expliquer les explorations de cette plante en phytothérapie dans le traitement de nombreuses affectations liées au stress oxydant.

En perspectives,

- Réaliser des études complémentaires dans le but d'identifier des composés phénoliques en général des phénols et tannins en particulier.
- Déterminer de nouvelles molécules bioactives ayant le potentiel de répondre aux problématiques relatives à la santé humaine et pourquoi pas des substituants aux médicaments synthétiques.
- Elargir le champ d'études et de recherches afin de mettre la piste sur d'autres activités biologiques autre que celle antioxydante.

REFERANCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

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

Amar L. (2018). Composition chimique et activités biologiques des extraits de. *Université Ferhat Abbas Sétif 1*. 56.

Amirhossein N. (2020). Hawthorn (Crataegus spp.): An Updated Overview on. *forests*. 2-4.

B

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

Bellakhdar J. (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle. *Edition Ibis Press*. 759-760.

BERTRAM J S. (1999). Carotenoids and gene regulation. *Nutrition Research*. 57 (6): 182-91.

Boizot N., Charpentier J P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques. 79-83.

Bouزيد W. (2009). Etude de l'Activité Biologique des Extraits. *UNIVERSITE -EL HADJ LAKHDER -BATNA*. 15 -18.

Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 3^{ème} édition. *Technique et Médicale Lavoisier, Paris*. 12-15.

C

Catherine E., McNamara N B. (2004). A New Glucosyl Feruloyl Quinic Acid as a Potential Marker for Roots and Rhizomes of Goldenseal, *Hydrastis canadensis*. *Journal of Natural Products*. 1818-1822.

Chao-Min W., Y-M., H-L., J-X., H-H. (2011). Structure Elucidation of Procyanidins Isolated from *Rhododendron formosanum* and Their Anti-Oxidative and Anti-Bacterial Activities. *Molecules*. 12787-12803.

Chira K., Suh J H., Saucier C., Teissèdre P L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*. 6 : 75–82.

Congo M. (2012). Etude des propriétés antiradicalaire et antiproliférative d'extraits de feuilles et de rameaux de *Salvadora Persica L.* (Salvadoraceae). *Thèse de pharmacie. Université d'Ouagadougou Burkina Faso*. 42.

D

D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., Masella R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*. 43: 348–361.

Danijela S. (2020). Phenolic profiles of leaves, Grapes and Wine of grapevine variety Vranac (*Vitis vinifera* L.) from montenegro. *Foods*. 13.

Davies J R. (2000). Hawthorn. *Element Books Limited, Bosten*. MA.

Delcamber A. (2010). Une approche moléculaire de l'astringence des vins: utilisation de sondes pour l'étude des interactions entre protéines de la salive et polyphénols. *l'université bordeau I* . 21.

Djenidi H. (2012). Etude du pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf.): essais de germination, extraction des polyphénols et activité antimicrobienne. *Université Mohamed KHEIDER. Biskra*. 13-33.

Dröge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*. 82 (1): 47-95.

E

Elizabeth T. (2003). Suppression of Estrogen Biosynthesis by Procyanidin Dimers in Red Win and Grape Seeds. *Cancer research*. 8517.

F

Fabiana A. (2011). Irbic acid, a dicaffeoylquinic acid derivative from *Centella asiatica* cell cultures. *Fitoterapia*. 950-954.

Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouroufi N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdely 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. *Open Journal of Obstetrics and Gynecology*. 108- 115.

Fl via O., Resende E R-F. (2011). Phenylpropanoid substituted flavan-3-ols from *Trichilia catigua* and their in vitro antioxidative activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2087-2093.

Fraser K., Harrison SJ., Lane GA., Otter DE., Hemar Y., Quek S-Y., Rasmussen S. (January 31, 2012). HPLC MS/MS profiling of proanthocyanidins in teas: a comparative study. *Journal of food composition and analysis*. 43-51.

G

Gawel R. (1998). Red wine astringency: A review. *Grape and Wine Research*. 4(2): 74-95.

Gori Z., Tebbale H. (2014). Impact de différents modes de conservation sur les caractéristiques biochimiques de quelques Plantes spontanées médicinales. *Université kasdi merbah, Ouargla*. 12-21.

H

Heim K E., Tagliaferro A R., Bobilya D J. (2002). Flavonoid antioxydants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Jornal of Nutritional Biochemistry*. 13(10): 572-584.

Hmid I. (2014) .Contribution a la valorisation alimentaire de la grenade marocaine. *Alimentation et Nutrition. Université d'Angers*. 35-170.

Hurtmut K A R. (1984). Hormone induced changes in carotenoid composition in Ricinus Cell Cultures. *Abteilung fur Allgemeine Botanik*. 52.

Hybertson BM., Gao B., Bose SK., McCord JM. (2011).Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. *Molecular Aspects of Medicine*. 32 (4-6): 234-46.

J

Koolman J., K-H. (2006). Biochimie 1^{er} edition. *Rohm Flammarion Paris*. 654-685.

JOHNSON F., GIULIVI C. (2005). Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(4-5): 340-352.

K

Kehrer JP. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology*. 23 (1): 21-48.

Kim S H., Kang K W., Kim K W. (2000). Procyanidins in *Crataegus* extract evoke Endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. *Life Sciences*. 67(2): 121-31.

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

L

Lenka C M H. (2009). Characterization of prenylflavonoids and hop bitter acids in various classes of czech beers and hop extracts using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Elsevier*. 7251.

LEVERVE X. (2009). Stress oxydant et antioxydants. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*. 44(5): 219-224.

Li-Li S W. (2014). Composition and Antioxidant Activity of the Anthocyanins of the Fruit of *Berberis heteropoda* Schrenk. *Molecules*. 19078-19096.

Liu P., Yang B., Kallio H. (2011a). "Phenolic Compounds in hawthorn (*Crataegus grayana*) fruits and leaves and changes during fruit ripening". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59 (20): 11141–11149.

M

MAKSIMOVIĆ Z., MALENČIĆ Đ., KOVAČEVIĆ N. (2005). Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource technology*. 873-877.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 79: 727–747.

Manasrah W S. (2012). In Vitro Propagation of *Crataegus aronia* L. and Secondary Metabolites Detection. *Deanship of Higher Studies and Scientific Research*. 1.

Melo E de A., Lima V., Maciel M I S., Caetano A da S., Leal F L L. (2006). Polyphenol, ascorbic acid and total carotenoid contents in common fruits and vegetables. *Brazilian Journal of Food Technology*. 9(2): 89–94.

Mohand AY. (2006). Plantes médicinales de Kabylie (préface du docteur Jean-Philippe Brette). *Ibis Press (Édition)*. 99.

Melzer R., Fricke U., Holz J. (1991). Vasoactive properties of procyanidins from *hypericum perforatum* L. in isolated porcine coronary arteries. *Arzneimittelforsch/Drog Research*. 41: 481-483.

Moukhtaria H. (2018). Valorisation biochimique et comportement germinatif de *Crataegus monogyna* Jacq. du mont de Tessala (Algérie occidentale). *UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES* . 6.

N

Na Liao M A. (2012-03-26). Extracts of *Lycoris aurea* Induce Apoptosis in Murine Sarcoma S180 Cells. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 3723-3735.

Nakashima H., Murakami T., Yamamoto N., Sakagami H., Tanuma S., Hatano T., Okuda T. (1992). Inhibition of human immunodeficiency viral replication by tannins and related compounds. *Antiviral Research*. 18: 91-103.

Navindra P., Seeram R L. (2005). Identification of phenolic compounds in strawberries liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. *ELSEVIER* . 7-10.

O

Orient-Weißdorn. (s.d.). *Crataegus laciniata* Ucria (=C. orientalis). *Bauschule meyer* . 1.

P

Pittler M H., Schmidt K., Ernst E. (2003). Hawthorn Extract for Treating Chronic Heart Failure: Meta-analysis of Randomized Trials. *American journal of medicin.* 114: 665-671.

Poisson C. (2014). Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique. *UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11.* 126.

R

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

ROCHETTE L. (2008). Stress oxydant et sepsis. *Réanimation.* 17(6): 1-4.

Roberts M F., Wink M. (1999). Alkaloids - Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications. *Book Reviews / Phytochemistry.* 52: 1177 – 1180.

S

Sarni-Manchado P., Cheynier V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire ed. P.T.D. *Lavoisier.* 398.

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

Singleton V L., Orthofer R M., Lamuela-Raventos R M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology.* 299 : 152–178.

Stahl A., Agneray J., Féraud G., Fruchert J C., Jardilier J C., Revol A., Sies G. (s. d). *Biochimie Clinique.* 188.

Swain T., Hillis W E . (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. *The quantitative analysis of the science of food and agriculture.* 10: 63-68.

T

Tigrine S M K. (2013). Activité antioxydante des extraits polyphénoliques de l'aubépine. *Université Abderrahmane MIRA de BEJAIA.* 29.

Tuty A D S. (2020). Anthocyanidin profile of syzygiumvoleana young leaves and fruits using triple quadrupole mass spectrometer: Identification of a new peonidin. *Biodiversitas*. 5893-5897.

U

Urbonaviciute A., Jakstas V., Kornygova O., Janulis V., Maruska A. (2006). Capillary electrophoretic analysis of flavonoids in single-styledhawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) ethanolic extracts. *Journal of Chromatography*. 1112: 339–344.

V

Valentina A., Sagaradzea E Y. (August 2019). Study of the variability of rutin, vitexin, hyperoside, quercetin in “Crataegifolium cum flore” of hawthorn (*Crataegus* L.) species from Russian flora. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* . 25-65.

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

W

Wainsten J. (2009). Le Larousse Médical. *Larousse*. 1041-1089.

Y

Yu Lin W X. (2015). Qualitative and quantitative analysis of phenolic acids, flavonoids and iridoid glycosides in Yinhua kanggan tablet by UPLC-QqQ-MS/MS. *Molecules*. 122-216.

ANNEXES

1. Matériels

- Agitateur ;
- Bain marie ;
- Balance analytique ;
- Balance de précision ;
- Ballons ;
- Barre d'agitation magnétique ;
- Bavette ;
- Béchers ;
- Centrifugeuse ;
- Chromatographie en phase liquide à haute performance ;
- Cristalliseur ;
- Cuve en plastique ;
- Cuve en quartz ;
- Epanchoir ;
- Eprouvette ;
- Erlenmeyer ;
- Etuve (MEMMERT) ;
- Flacons ;
- Gants chirurgicaux ;
- Les fioles ;
- Micropipette 10-1000µl ;
- Microplaques ;
- Papier absorbant ;
- Papier aluminium ;
- Para film ;
- pH mètre HANNA ;
- Pissette ;
- Rotavapeur ;
- Spatule ;
- Spectrophotomètre (spectro scan 50 UV-VIS spectrophotomètre ;
- Vortex (VELP scientifica).

2. Produits

- Ethanol ;
- Méthanol ;
- Chloroforme ;
- L'eau distillée ;
- Réactif de Folin-Ciocalteu;
- Carbonate de sodium ;
- Chlorure d'aluminium;
- Tampon phosphate ;
- Acide trichloracétique ;
- Acide sulfurique ;
- Vanilline ;
- Eau oxygénée ;
- Acétate de sodium.

3. Les courbes d'étalonnage

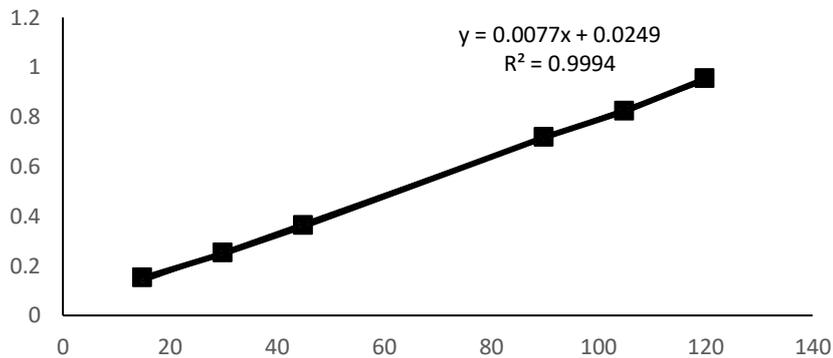


Figure 1 : Courbe d'étalonnage avec l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux (Chaher *et al.*, 2021).

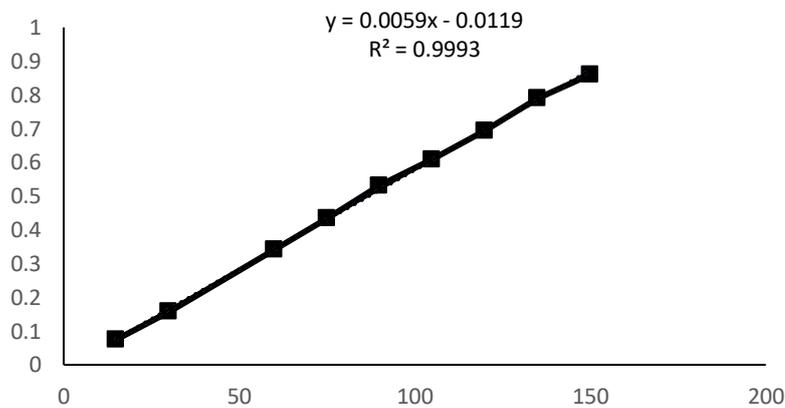


Figure 2 : Courbe d'étalonnage avec la quercétine pour le dosage des flavonoïdes (Chaher *et al.*, 2021).

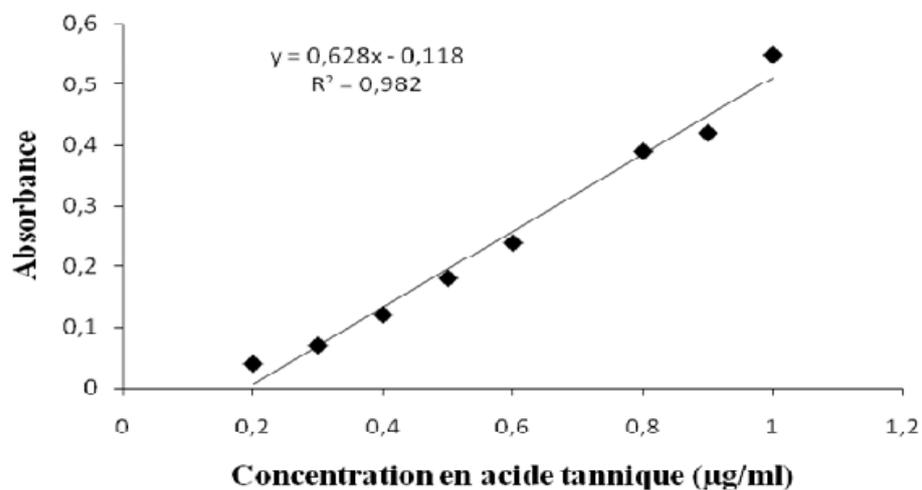


Figure 3 : Courbe d'étalonnage avec l'acide tannique pour le dosage des tanins condensés (Chaher *et al.*, 2021).

4. Le spectre UV-visible

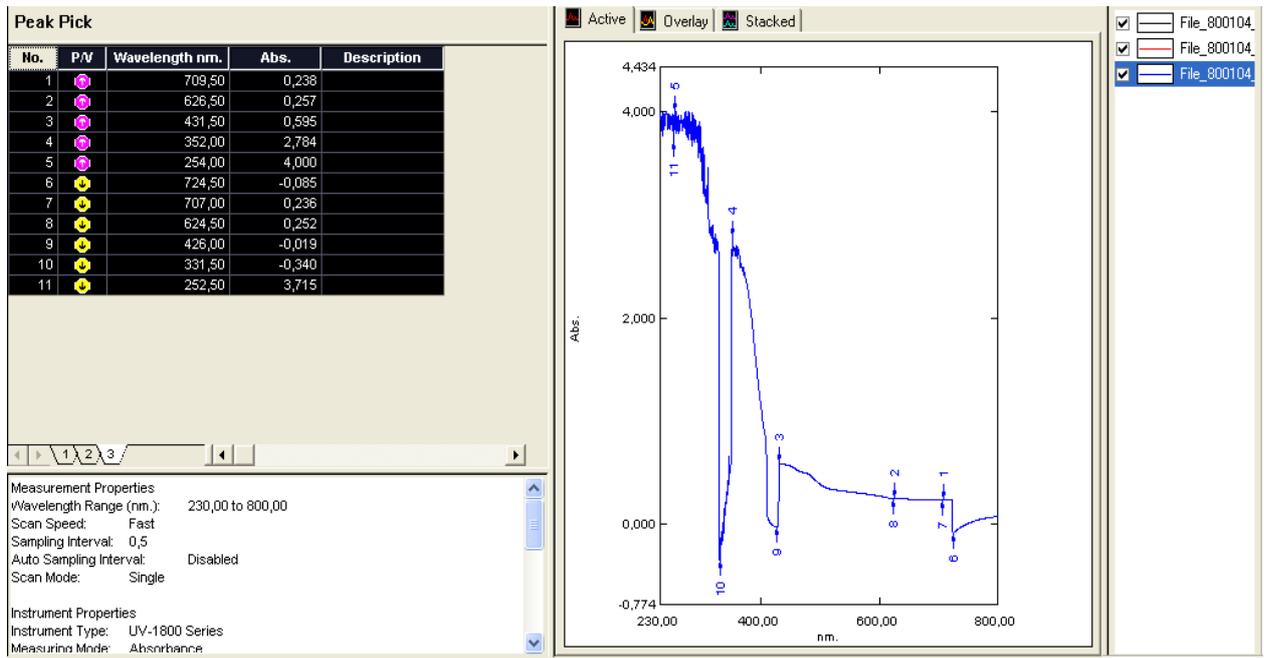


Figure 4 : Spectre UV-visible

5. Exemples de pics représentant les composés identifier

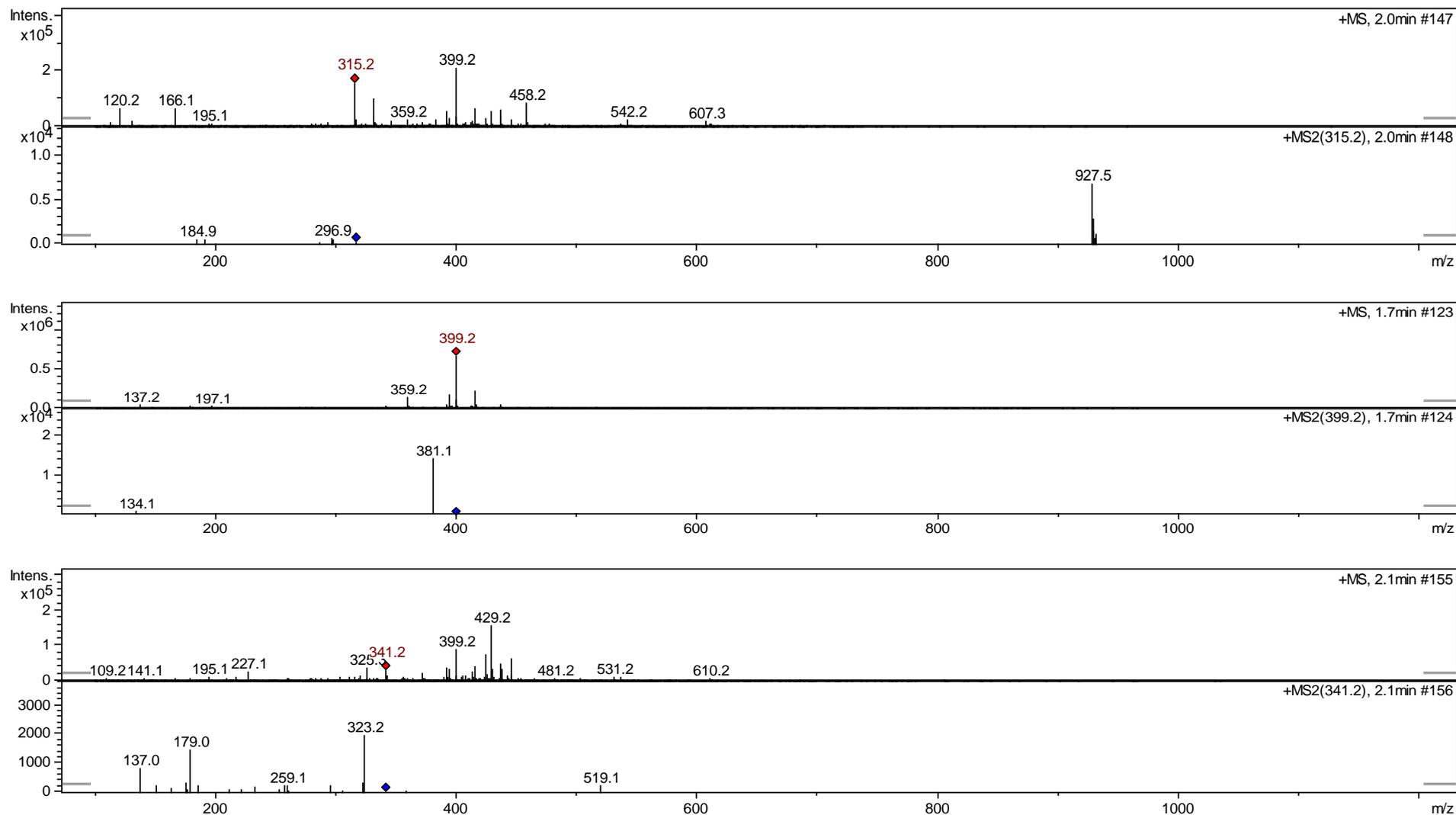


Figure 5 : Pics 3, 4 et 5 représentant des composés 3, 4 et 5 montrés dans le tableau IV

GLOSSAIRE

- **Aménorrhée** : Absence de menstruation

- **Angine de poitrine** : C'est la manifestation d'un déséquilibre entre les apports et les besoins du cœur en oxygène. Ce déséquilibre survient souvent à l'effort, lorsque les artères coronaires qui alimentent le cœur sont atteintes d'athérosclérose et que leur diamètre diminue

- **Anti- âge** : Destiné à lutter contre le vieillissement de la peau.

- **Anti-Athérosclérose** : La plante peut maintenir la pression artérielle et le cholestérol à un niveau optimal. Il peut ainsi contribuer à prévenir l'athérosclérose (durcissement et épaissement des parois des artères causées par des dépôts de lipides).

- **Anticoagulant** : Empêcher la formation de caillots sanguins.

- **Anti-Hypoxique** : Absence d'oxygène dans le milieu peut être compensée par l'apport d'oxygène depuis les parties de la plante. C'est à dire contre la diminution de l'oxygène dans les cellules de l'organisme.

- **Antispasmodique** : Fait baisser la tension et soulage les spasmes musculaires.

- **Antiulcéreuse** : Réduction de l'ulcère et la protection de la muqueuse gastrique des différentes lésions induites par plusieurs facteurs d'agression, tels que l'acide-éthanol, le stress et l'indométacine via plusieurs mécanismes.

- **Anti-VIH** : La plante possède des composés chimiques qui ont la capacité d'inhiber une enzyme nécessaire au VIH pour incorporer son code génétique dans l'ADN-transcriptase inverse (RT) d'une cellule.

- **Astringent** : C'est une substance qui provoque la contraction des tissus et des vaisseaux sanguins et qui stimule la coagulation du sang.

- **Cardiovasculaire** : Maladie qui constituent un ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins, qui comprend: les cardiopathies coronariennes (touchant les vaisseaux sanguins qui alimentent le muscle cardiaque) les maladies cérébro-vasculaires (touchant les vaisseaux sanguins qui alimentent le cerveau).

- **Chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP)** : Technique de séparation analytique et/ou préparatrice de molécules présentes dans un mélange. Cela permet d'adapter les méthodes chromatographiques usuelles (voir Colonne) sur un montage haute pression.

- **Distension épigastrique** : Une distension de la paroi abdominale n'est que le symptôme d'une pathologie sous-jacente (simple aérophagie ou aérocolie, occlusion ou sub-occlusion intestinale, ascite : présence de liquide dans l'abdomen qu'elle qu'en soit son origine, ...).

- **Diurétique** : Diminuer la pression dans les artères.

- **Floraison** : Processus biologique de développement des fleurs. Elle est contrôlée par l'environnement et les phytohormones.

- **Feuilles caduques** : Renouvellement des feuilles chaque année.

- **Hyperlipidémie** : Une dyslipidémie se définit par une élévation du cholestérol plasmatique, des triglycérides (TG) ou par un taux de cholestérol HDL bas, anomalies contribuant à l'apparition de l'athérosclérose. Les causes sont primitives (génétiques) ou secondaires.

- **Hypertension** : Elévation pathologique de la tension artérielle qui augmente significativement les risques d'infarctus du myocarde, d'accident vasculaire cérébral et d'insuffisance rénale, notamment.

- **Insuffisance cardiaque congestive chronique :** C'est une maladie dans laquelle le cœur perd sa capacité à pomper efficacement le sang dans tout le corps. La maladie affecte d'autres organes du corps, entraînant des difficultés respiratoires, une réduction de la fonction rénale et une accumulation de liquide dans les tissus corporels (edema) en raison d'une mauvaise circulation.

- **Lignification :** dans la vigne ce processus est appelé aoûtement. C'est la transformation anatomique des rameaux à la fin de l'été (août)

- **Neurodégénérative :** Une maladie correspond à une pathologie progressive qui affecte le cerveau ou plus globalement le système nerveux, entraînant la mort des cellules nerveuses. Les plus célèbres et les plus fréquentes sont la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson mais il en existe d'autres.

- **Organogenèse :** C'est la formation d'un organe à partir d'un méristème.

- **Thrombose :** La thrombose correspond à la présence anormale d'un thrombus (caillot de sang) qui entraîne une occlusion partielle ou totale soit d'une veine (thrombose veineuse ou "phlébite"), soit d'une artère (infarctus, AVC).

- **Oxydant :** Un corps simple, un ion ou un composé qui reçoit au moins un électron d'une autre espèce chimique lors d'une réaction d'oxydoréduction.

- **Phénols :** Ce sont des composés chimiques aromatiques portant une fonction hydroxyle -OH. Les dérivés portant plusieurs fonctions hydroxyle sont appelés des polyphénols.

- **Polyphénols :** Constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés, comme l'indique le nom, par la présence d'au moins deux groupes phénoliques

Résumé :

Un extrait éthanolique a été obtenu à partir du fruit de la plante de *Crataegus laciniata* suivant une méthode d'extraction sélective afin de caractériser et d'identifier les différents composés actifs de la plante et d'étudier son pouvoir antioxydant. Les résultats du dosage des polyphénols, tannins condensés et flavonoïdes de l'extrait éthanolique de *Crataegus laciniata* a montré la richesse cet extrait en cette classe de composés avec les valeurs $469,66 \pm 6,30$ mg EqAG/g d'extrait, $170,73 \pm 0,06$ mg EqAT/g d'extrait, $155,69 \pm 1,27$ mg EqQ/g d'extrait, respectivement. L'analyse des spectres obtenus à partir de la spectrométrie de masse a confirmé la richesse de cet extrait en composés de type flavonoïdes, tannins condensés et acides phénoliques. Cette analyse nous a permis aussi de caractérisé 30 molécules de l'extrait préalablement préparé à partir d'une chromatographie séparative en utilisant une résine de type XAD16 amberlite. Concernant l'évaluation de l'activité antioxydante, les résultats obtenus ont montré un bon pouvoir anti-DPPH qui dépasse les 90% et une valeur d'IC₅₀ = 13,17 µg/ml en comparaison avec les différents standards utilisés ($p \leq 0,05$).

Abstract:

An ethanolic extract was obtained from the fruit of the *Crataegus laciniata* plant using a selective extraction method in order to characterize and identify the different active compounds of the plant and to study its antioxidant power. The results of the assay of the polyphenols, condensed tannins and flavonoids of the ethanolic extract of *Crataegus laciniata* showed the richness of this extract in this class of compounds with the values 469.66 ± 6.30 mg EqAG / g of extract, $170, 73 \pm 0.06$ mg EqAT / g extract, 155.69 ± 1.27 mg EqQ / g extract, respectively. Analysis of the spectra obtained from mass spectrometry confirmed the richness of this extract in compounds such as flavonoids, condensed tannins and phenolic acids. This analysis also allowed us to characterize 30 molecules of the extract previously prepared from separation chromatography using an XAD16 amberlite resin. Concerning the evaluation of the antioxidant activity, the results obtained showed a good anti-DPPH power which exceeds 90% and an IC₅₀ value = 13.17 µg / ml in comparison with the different standards used ($p \leq 0,05$).

الملخص:

تم الحصول على مستخلص إيثانولي من ثمار نبات *Crataegus laciniata* باستخدام طريقة الاستخراج الانتقائي من أجل توصيف وتحديد المركبات النشطة المختلفة للنبات ودراسة قوتها المضادة للأكسدة. أظهرت نتائج اختبار البوليفينول والعفص المكثف والفلافونيدات للمستخلص الإيثانولي من كراتيجوس لاسينياتا ثراء هذا المستخلص في هذه الفئة من المركبات بقيمة 469.66 ± 6.30 مجم EqAG / جم من المستخلص ، 170 ، 0.06 ± 73 مجم من مستخلص EqAT / جم ، مستخلص 155.69 ± 1.27 مجم EqQ / جم ، على التوالي. أكد تحليل الأطياف التي تم الحصول عليها من مطياف الكتلة ثراء هذا المستخلص بمركبات مثل الفلافونويد والعفص المكثف والأحماض الفينولية. سمح لنا هذا التحليل أيضًا بتوصيف 30 جزيءًا من المستخلص الذي تم تحضيره مسبقًا من الفصل اللوني باستخدام راتينج أمبرلايت XAD16. فيما يتعلق بتقييم النشاط المضاد للأكسدة، أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها قوة مقاومة DPPH جيدة تتجاوز 90 ٪ وقيمة $IC_{50} = 13.17$ ميكروغرام / مل مقارنة بالمعايير المختلفة المستخدمة ($p \leq 0,05$).