

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



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.  
Département de Biologie Physico-Chimique.  
Filière : Sciences Biologiques.  
Spécialité : Biochimie Fondamentale.**

**Réf : .....**

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

**MASTER**

*Thème*

**Effets antioxydants de *Rhamnus  
alaternus L.***

Présenté par :

**M<sup>elle</sup> BOUKOUCHA Chahinaz & M<sup>elle</sup> SELLAH Fatiha.**

Soutenue le : **30/09/2021.**

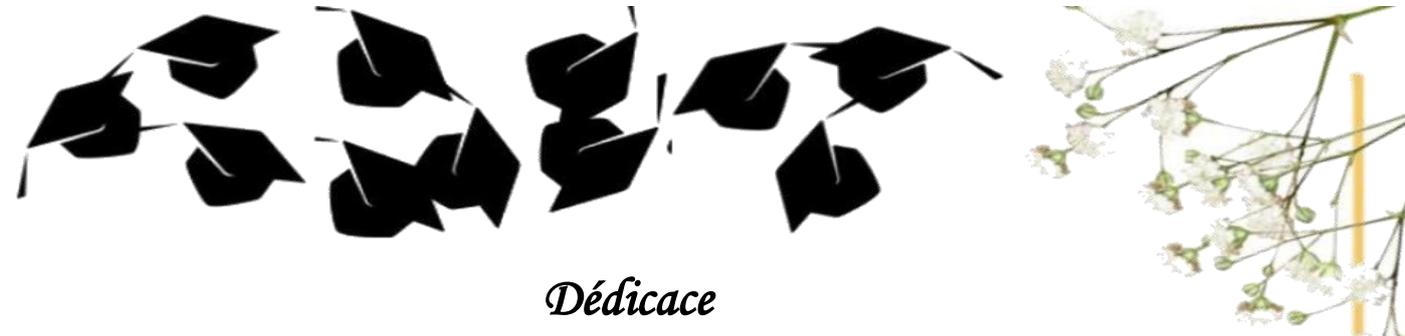
Devant le jury composé de :

**M<sup>r</sup> ZAIDI. H  
M<sup>me</sup> BAKDI. H  
M<sup>me</sup> SEBAIHI. S**

**MCB  
MAA  
MCB**

**Président  
Promotrice  
Examinatrice**

**Année universitaire : 2020 / 2021.**



## Dédicace

*À l'aide de dieu tout puissant, qu'a tracé le chemin de ma vie, qui m'a donné tout le courage et la puissance pour pouvoir réaliser ce bon travail qu'est entre vos mains ;  
Je dédie ce mémoire avec un cœur remplie de joie :*

*À ma chère Maman, tu représentes pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Merci d'avoir toujours été derrière moi et de m'avoir soutenue toutes ces années.*

*À mon cher père, aucune dédicace ne saurait exprimer l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour toi. Merci d'avoir été là pour moi.*

*MERCI pour vos conseils, vos encouragements et votre soutiens inconditionnels dans les moments importants de ma vie qui m'ont permis d'atteindre mes objectifs. Aucune dédicace ne saurait être assez expressive pour exprimer ma gratitude pour tous vos sacrifices pour moi. Vous avez toujours cru en moi et sans vous je ne serai pas là aujourd'hui ! J'espère que vous êtes fiers de moi, si je suis arrivée jusque-là c'est grâce à vous ! Merci pour tout, vous êtes des parents formidables.*

*À mes meilleures sœurs : Kizou et Douda ; À mon unique petit frère Namour ; que je leurs souhaite toute la réussite ;  
Je ne peux pas oublier de remercier chaleureusement mes grands-parents ; Que dieu leur prête la santé et la longue vie ;*

*À ma magnifique tante Sara qu'a été toujours là pour moi, que dieu lui accorde toute la santé ;*

*À mon meilleur khal du monde, Babi que je lui souhaite tout le bonheur ;*

*À khalil Farid, son épouse et ses enfants (Akzil, Amine, Bibi et Liline) ;*

*À ma tante Tatouh ; son époux et ses enfants (Maroua et Ishak) ;*

*À ma tante Fadou et son époux ;*

*À tous mes oncles et mes tentes ;*

*Cousins et cousines ;*

*À toute ma famille et mes proches ;*

*Je tiens à remercier aussi mes très chères amies : Dida, Afou, Chela, Ouissam, Danouche ; pour l'ambiance cordiale et pour tout moment agréable qu'on a passé ensemble. Je leurs souhaite que du bonheur et de la réussite. Et sans oublier : Ninis,*

*Mona, Sabrina, Ferial, Fifi, Bila, Ouassila, Hizia, Kahouch, Zineb...*

*À tous mes amis ; À toutes celles ou ceux que j'ai oubliée ;*

*À ma très chère binôme Fatiha avec laquelle que j'ai partagée tout moment à réaliser ce travail.*

*À sa famille et ses amies.*

*À tous ceux qui me connaissent.*

*À tous les étudiants de la promotion Biochimie Fondamentale 2020/2021.*

*Chahou*





## *Dédicace*

*A l'aide de DIEU tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie avec un profond amour :*

*A celle qui m'a arrosé de tendresse et l'espoir, à la mère des sentiments fragiles qui ma bénie par ses prières : ma mère.*

*A mon support dans ma vie, qui m'a appris, ma supporté et ma dirigé vers la gloire : mon père.*

*A ceux qui m'ont aidé et m'ont donné la joie et le bonheur, un grand merci à mes chère sœurs : Sohila, Hayat, Malia, Sara, Aya et Bouchra.*

*A mes Cher(e)s neveux : Fadi, Haithem, Maissa et Hiba.*

*A Tous mes chères amies et toute la promotion biochimie fondamentale Pour leur soutien et leur amitié aussi mes collègues pour leurs aide et l'ambiance Chaleureuse qui nous a réuni dans ce travail.*

*À Chahinaz chère amies avant d'être binôme qui a partagée avec moi les moments difficiles pour réaliser ce travail.*

*A tous mes amis(e)s : Lamia, Yasmine, Siham, Djaidia ...etc.*

**-Fatiha-**

## Remerciement

Tout avant, nous adressons nos remerciements les plus sincères en premier lieu au « Bon DIEU » le tout puissant de nous avoir guidé vers le chemin du savoir et de nous avoir donné le courage, la patience et la santé qui nous ont été utiles tout au long de notre parcours et de finir par réaliser ce travail.

Ce travail ne serait pas aussi riche sans l'aide de notre promotrice M<sup>me</sup> BAKDI Houria, on la remercie pour ses orientations, ses conseils. Nous la remercions d'ailleurs d'avoir accepté de nous encadrés.

Ce travail témoigne sa confiance et son soutien dans les moments les plus difficiles, qu'elle trouve ici l'expression de notre haute considération et notre profonde reconnaissance.

On tient également à exprimer nos sincères remerciements à :  
M<sup>r</sup> ZAIDI.H d'avoir accepté de présider le jury et de juger notre Travail.

M<sup>me</sup> SBAIHI.S d'avoir acceptée d'examiner notre travail.

Nos profonds remerciements vont à l'ensemble du personnel du Laboratoire de Biologie Physico-Chimique, à Saïda et Habiba ; merci pour votre disponibilité.

Toute notre gratitude pour tous les enseignants de la faculté des sciences de la nature et de la vie en particulier ceux du département de Biologie Physico-Chimique pour leurs encouragements et leurs bienveillances et nous ont comptés parmi leurs étudiants tout au long de notre formation à l'université de Abderrahmane MIRA de Bejaia

Enfin nous finirons par remercier tous ceux qui ont contribués de près ou de loin à la réalisation de ce projet.

*Chahinaz et Fatiha*



# *Sommaire*

# Sommaire

Dédicaces

Remerciement

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction ..... 1

## Synthèse bibliographique

### Chapitre I : Généralités sur *Rhamnus alaternus L*

I.1. Description botanique .....	2
I.2. Classification botanique .....	3
I.3. Les noms vernaculaires .....	4
I.4. Composition chimique et biochimique .....	4
I.5. Utilisation dans la médecine traditionnelle .....	5
I.6. Activités biologiques .....	5

### Chapitre II : Stress oxydatif et anti oxydants

II. Radicaux libres et stress oxydatif .....	7
II.1. Le stress oxydatif .....	7
II.1.1. Définition .....	7
II.1.2. Pathologies du stress oxydatif .....	8
II.2. Les radicaux libres .....	9
II.2.1. Définition d'un radical libre .....	9
II.2.2. Classification des radicaux libres .....	9
II.2.2.1. Les radicaux libres primaires .....	9
II.2.2.2. Les radicaux libres secondaires .....	11
II.2.3. Origine de radicaux libres .....	11
II.2.4. Les cibles biologiques des radicaux libres .....	11

II.2.4.1. Les composés lipidiques .....	12
II.2.4.2. Les composés protéiques .....	12
II.2.4.3. L'ADN .....	12
II.3. Les antioxydants .....	12
II.3.1. Le système de défense des antioxydants .....	13
II.3.1.1. Les antioxydants endogènes (enzymatiques) .....	13
II.3.1.2. Les antioxydants exogènes (non enzymatiques) .....	13
II.4. Balance Oxydants /Antioxydants et stress oxydatif .....	15

## *Partie expérimentale*

### **Chapitre III : Matériel et méthodes**

III. Matériel et méthodes .....	17
III.1. Matériel et réactifs chimiques utilisés .....	17
III.2. Matériel végétal .....	17
III.2.1. Récolte des feuilles .....	17
III.2.2. Préparation des échantillons .....	18
III.3. Extraction des composés phénoliques .....	18
III.3.1. Extraction à partir des feuilles de <i>Rhamnus alaternus L</i> .....	18
III.4. Fractionnement de l'extrait méthanolique .....	20
III.5. Dosages colorimétriques des composés phénoliques .....	21
III.5.1. Dosage des polyphénols totaux .....	21
III.5.2. Dosages des flavonoïdes .....	22
III.6. Activité antiradicalaire des extraits .....	23
III.6.1. Activité antiradicalaire au radical DPPH .....	23
III.6.2. Activité antiradicalaire au radical ABTS <sup>•+</sup> .....	24

### **Chapitre IV : Résultats et discussions**

IV.1. Rendement d'extraction .....	26
IV.2. Teneurs en composés phénoliques .....	26
IV.2.1. Teneur en polyphénols totaux .....	26
IV.2.2. Teneur en flavonoïdes .....	28
IV.3. Activité antioxydante et antiradicalaire .....	30

IV.3.1. Activité scavenging du radical DPPH.....	30
IV.3.2. Activité anti-ABTS <sup>•+</sup> .....	35
Conclusion et perspectives .....	40

## **Références bibliographiques**

### **Annexes**

### **Résumé**

# *Liste des tableaux*

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau I</b> : Classification botanique de <i>R. alaternus L</i> .....	3
<b>Tableau II</b> : Principales sources de production des radicaux libres .....	11
<b>Tableau III</b> : Matériel et réactifs utilisés .....	17
<b>Tableau IV</b> : Rendement des extraits des feuilles de <i>R. alaternus L</i> .....	26

# *Liste des figures*

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Photos de <i>Rhamnus alaternus L</i> .....	2
<b>Figure 2:</b> Structure chimique de quelques flavonoïdes aglycones de <i>R. alaternus L</i> .....	4
<b>Figure 3:</b> Structure chimique de quelques flavonoïdes glycosylés de <i>R. alaternus L</i> .....	4
<b>Figure 4:</b> Stress oxydatif et pathologies humaines .....	7
<b>Figure 5:</b> Coopération entre la vitamine C et E.....	14
<b>Figure 6:</b> Balance Oxydants /Antioxydants et stress oxydatif .....	16
<b>Figure 7:</b> Poudre de <i>Rhamnus alaternus L</i> .....	18
<b>Figure 8:</b> Macération de la poudre de <i>Rhamnus alaternus L</i> .....	18
<b>Figure 9:</b> Agitation magnétique du mélange de <i>Rhamnus alaternus L</i> .....	19
<b>Figure 10:</b> Etapes de la filtration du mélange de la <i>Rhamnus alaternus L</i> .....	19
<b>Figure 11:</b> Protocole de fractionnement de l'extrait méthanolique de <i>R. alaternus L</i> .....	20
<b>Figure 12:</b> Protocole expérimentale de dosage des flavonoïdes totaux .....	21
<b>Figure 13:</b> Protocole expérimental de dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu .....	22
<b>Figure 14 :</b> Protocole expérimentale de l'activité « scavenging » du DPPH <sup>•</sup> .....	23
<b>Figure 15:</b> Protocole expérimentale de l'activité antioxydante de l'ABTS <sup>+</sup> .....	25
<b>Figure 16:</b> Teneur en flavonoïdes des extraits de feuilles de <i>Rhamnus alaternus L</i> .....	27
<b>Figure 17:</b> Teneur en polyphénols totaux des extraits de feuilles de <i>R. alaternus L</i> .....	29
<b>Figure 18:</b> Courbe des pourcentages d'inhibition du radicale DPPH <sup>•</sup> de l'extrait EM en fonction de la concentration .....	31
<b>Figure 19:</b> Courbe des pourcentages d'inhibition du radicale DPPH <sup>•</sup> de l'extrait hexane en fonction de la concentration .....	31
<b>Figure 20:</b> Courbe des pourcentages d'inhibition du radicale DPPH <sup>•</sup> de l'extrait chloroforme en fonction de la concentration .....	31
<b>Figure 21:</b> Courbe des pourcentages d'inhibition du radicale DPPH <sup>•</sup> de l'extrait aqueux en fonction de la concentration .....	32
<b>Figure 22:</b> Courbe des pourcentages d'inhibition du radicale DPPH <sup>•</sup> de l'extrait acétate d'éthyl en fonction de la concentration .....	32

<b>Figure 23:</b> Histogramme représentant les IC <sub>50</sub> pour les différentes phases de <i>R. alaternus L</i> de l'activité antiradicalaire (test DPPH) .....	33
<b>Figure 24 :</b> Courbe des pourcentages d'inhibition du radicale ABTS <sup>·+</sup> de l'extrait méthanolique de <i>R. alaternus L</i> en fonction de la concentration .....	35
<b>Figure 25 :</b> Courbe des pourcentages d'inhibition du radicale ABTS <sup>·+</sup> de l'extrait hexane de <i>R. alaternus L</i> en fonction de la concentration .....	36
<b>Figure 26 :</b> Courbe des pourcentages d'inhibition du radicale ABTS <sup>·+</sup> de l'extrait chloroforme de <i>R. alaternus L</i> en fonction de la concentration .....	36
<b>Figure 27 :</b> Courbe des pourcentages d'inhibition du radicale ABTS <sup>·+</sup> de l'extrait aqueux de <i>R. alaternus L</i> en fonction de la concentration .....	37
<b>Figure 28 :</b> Courbe des pourcentages d'inhibition du radicale ABTS <sup>·+</sup> de l'extrait acétate d'ethyl de <i>R. alaternus L</i> en fonction de la concentration .....	37
<b>Figures 29:</b> Histogramme représentant les IC <sub>50</sub> pour les différentes phases de <i>R. alaternus L</i> (test d'ABTS) .....	39

# *Liste des abréviations*

## *Liste des abréviations*

**[C]** : Concentration.

**Abs** : Absorbance.

**ABTS** : Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).

**AC** : Phase acétate d'éthyle.

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AG** : Acide gallique.

**AlCl<sub>3</sub>** : Chlorure d'aluminium (III).

**Aq** : Phase aqueuse.

**C<sub>int</sub>** : Concentration intérieur.

**Chl** : Phase chloroforme.

**CI<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice 50%.

**ClO<sup>•</sup>** : Hypochlorite.

**Cu-SOD** : Superoxyde dismutase aux ions cuivre.

**DPPH** : 1,1 diphényle-2-picryl hydrazyle.

**EC-SOD** : Superoxyde dismutase extracellulaire.

**EM** : Phase de l'extrait méthanolique.

**EQ /mg** : Equivalents en mg de quercétine.

**ERN** : Espèce réactive de l'azote.

**ERO** : Espèce réactif de l'oxygène.

**Fe<sup>2+</sup>** : Ions ferreux.

**Fe<sup>3+</sup>** : Ions ferriques.

**Fe-SOD** : Superoxyde dismutase ferreux.

**H** : Phase hexane.

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

**H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>** : Acide phosphomolibdique.

**H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>** : Acide phosphotungstique.

**HOO<sup>•</sup>** : Radical hydroperoxyde.

**I %** : Pourcentage d'inhibition.

**K<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>** : Solution de persulfate de potassium.

**K<sub>3</sub>Fe(CN)** : Ferrocyanure de potassium.

**MDA** : Malondialdéhyde.

**MeOH** : Méthanol.

**mg EAG/g** : Equivalent milligramme d'acide gallique par gramme d'extrait sec.

**mg EQ /g** : Milligramme équivalent quercétine par gramme.

**Mg** : Magnésium.

**Mn** : Manganèse.

**Mn-SOD** : Superoxyde dismutase associée au manganèse.

**MO<sub>8</sub>O<sub>23</sub>** : Molybdène.

**Na** : Sodium.

**ND** : Non déterminé.

**NO•** : Radical oxyde nitrique.

**NO** : Monoxyde d'azote.

**O<sub>2</sub>** : Dioxygène.

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : Anion superoxyde.

**OH** : Groupement hydroxyl.

**OH•** : Radical hydroxyl.

**ONOO•** : Anion peroxydinitrite.

**ONOOH** : Nitroperoxyde.

**PH** : Potentiel d'hydrogène.

**PTS** : Phénols totaux soluble.

**Q** : quercétine.

***R. alaternus L*** : *Rhamnus alaternus L.*

**R<sup>2</sup>** : Coefficient de corrélation.

**RNS** : Espèces azotées réactives.

**RO•** : Radical alkoxyde.

**ROO•** : Radical peroxyde.

**ROOH** : Peroxyde organique.

**ROOH** : Hydroperoxyde.

**ROS** : Les espèces réactives de l'oxygène.

**SIDA** : Syndrome d'Immunodéficience Acquise.

**SM** : Solution mère.

**SODs** : Superoxydes dismutases.

**Trolox** : Acide 6- hydroxy-2, 5, 7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique.

**W<sub>8</sub>O<sub>23</sub>** : Bleu de tungstène.

**Zn** : zinc.

**Zn-SOD** : Superoxyde dismutase aux ions zinc.

# *Introduction*

## Introduction

Du fait de leurs abondances dans la nature et de leurs utilisations par les populations indigènes pour se soigner, certaines plantes se sont imposées dans le monde médicinal. Cependant, la médecine traditionnelle réunit l'ensemble des connaissances, compétences et pratiques basées sur les théories, croyances et expériences auxquelles différentes cultures ont recours pour entretenir la santé ainsi que pour prévenir, diagnostiquer, soulager ou soigner des maladies physiques et mentales (OMS, 2009).

*Rhamnus alaternus L* une des plantes les plus utilisées dans le bassin méditerranéen, à cause de ses bienfaits, notamment dans le traitement des complications hépatiques, contre la jaunisse et certaines affections dermatologiques (Ait Youssef, 2006).

La valeur thérapeutique de cette plante est due à ses métabolites secondaires, notamment les composés phénoliques qui constituent une richesse largement exploitée par les industries agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique (Nkhili, 2009).

Les flavonoïdes sont connus pour leurs propriétés antioxydantes, antibactériennes, antivirales, antiinflammatoires, antiprolifératives, régulatrices de systèmes enzymatiques ... etc. Ces activités ont très souvent un lien avec leur activité antioxydante et notamment leur capacité à piéger les radicaux libres, chélater les ions métalliques ou inhiber les enzymes responsables de la formation de radicaux.

Dans une situation physiopathologique, un déséquilibre du statu prooxydants/antioxydants surviendra ; état de stress oxydatif. Pour cette raison, on a choisi, dans la présente étude, la plante *Rhamnus alaternus L* comme une source d'antioxydants naturels.

L'objectif du présent travail est donc de démontrer la richesse en polyphénols et d'évaluer le pouvoir antioxydant des extraits des feuilles de *Rhamnus alaternus L*.

Le présent travail est structuré en deux parties :

- L'extraction et l'analyse phytochimique de différents composés phénoliques de la partie aérienne de la plante.
- Le deuxième volet est consacré à l'étude de l'activité antioxydante *in vitro* par l'utilisation de deux méthodes : activité scavenger du radicaux libres DPPH<sup>·</sup> et ABTS<sup>·+</sup>.

# *Synthèse bibliographique*

*Chapitre I : Généralités sur  
la Rhamnus alaternus L*

### I.1. Description botanique

Les Rhamnacées sont une famille cosmopolite d'arbres, arbustes, plantes grimpantes, qui sont constituées de 59 genres et environ 900 espèces, y compris *Rhamnus* qui comprend 110 espèces (Marzouk et al., 1999). Ce sont des espèces médicinales bien connues possédant diverses propriétés biologiques. *Rhamnus alaternus L* est un arbuste qui est distribué le long du bassin méditerranéen (Gulias et al., 2004). Elle se trouve dans les pays d'Afrique du nord : en Algérie, au Maroc et en Tunisie, et dans les fourrés du littoral méditerranéen ; en Algérie elle pousse dans les forêts, les rocailles et surtout dans les rochers des montagnes (Ait Youssef, 2006).

*R. alaternus L* a une longévité de 100 ans (Bas et al., 2009), de 2-6 m de hauteur (Tsahar, 2001). Les feuilles sont persistantes et natives, alternes, épaisses, de formes variées, lancéolées, luisantes et vertes dessus, plus pales dessous. Les fleurs petites, unisexuées, de couleurs jaunâtres, réunies en petites grappes latérales, qui appariassent à la fin d'hiver et au début du printemps. Cela produit des fruits sphériques, leurs surfaces sont d'abord rouges, puis devient noires à la maturité, qui mûrissent en fin de printemps et début de l'été. (Bayer et al., 1990 ; Rameau et Mansion, 2008 ; Bas et al., 2009 ; Miralles et al., 2010 ; El Aou-Ouad., 2015).



**Figure 1** : Photos de *Rhamnus alaternus L* (photos originales).

**I.2. Classification botanique**

*R. alaternus L* appartient à la classe des Magnoliopsida-Dicotylédones, à la famille des Rhamnaceae et au genre *Rhamnus*. La classification botanique complète de la plante est représentée dans le tableau ci-dessous :

**Tableau I : Classification botanique de *R. alaternus L* (Yi-ling et Pan-kai, 1982).**

<b>Taxon</b>	<b>Nom</b>
Domaine	Eukaryota- eucaryote
Règne	Plantae-Végétal
Sous règne	Viridiaeplantae- Plantes vertes
Règne	Magnoliophyta- plantes à fleurs
Sous phylum	Spermatophytina-plantes à graines
Infraphylum	Angiospermae-Angiosperme
Classe	Magnoliopsida-Dicotylédones
Sous classe	Rosida
Super ordre	Rhamnanae
Ordre	Rhamnales
Famille	Rhamnaceae
Genre	<i>Rhamnus</i>
Espèce	<i>Rhamnus alaternus L</i>

### I.3. Les noms vernaculaires

Le nom de genre *Rhamnus* provient du grec *rhamnos*, nom du Nerprun purgatif et le nom d'espèce *alaternus* est l'ancien nom latin de la plante. En arabe : Soitfaïr, Oud El-khir ou bien Safir. En Kabyle : Mélilés. En anglais : alaternus barrem pruvet. En Français : Nerprun, alaterne, sanguin blanc. (Rameaun et Mansion, 2008).

### I.4. Composition chimique et biochimique

*R. alaternus L* est caractérisée d'un point de vue phytochimique par l'abondance des substances phénoliques, particulièrement les tannins, anthraquinones comme l'émodin, chysophanol, alaternin et physcion qui sont les quatre anthraquinones aglycones isolés à partir des parties aériennes de *R. alaternus L* (Izhaki et al., 2002 ; Ben Ammar et al., 2007).

Des flavonoïdes aglycones, comme le kaempférol, la quercétine et l'apéginine (Figure 2) (Wojdylo et al., 2007), et des flavonoïdes glycosylés tel que le kaempférol-3-Obisorhamninoside (1), rhamnocitrin 3-Ob-isorhamninoside (2) et rhamnétine-3-Obisorhamninoside (3) (Figure 3) (Ben Ammar et al., 2009).

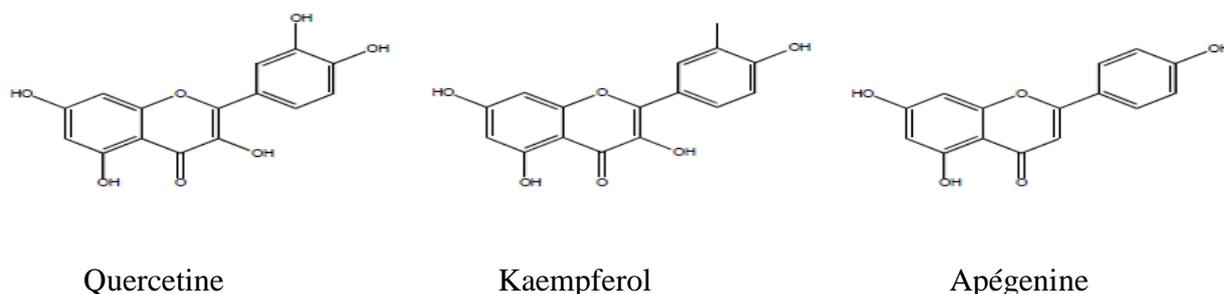


Figure 2 : Structure chimique de quelques flavonoïdes aglycones de *R. alaternus L* (Wojdylo et al., 2007).

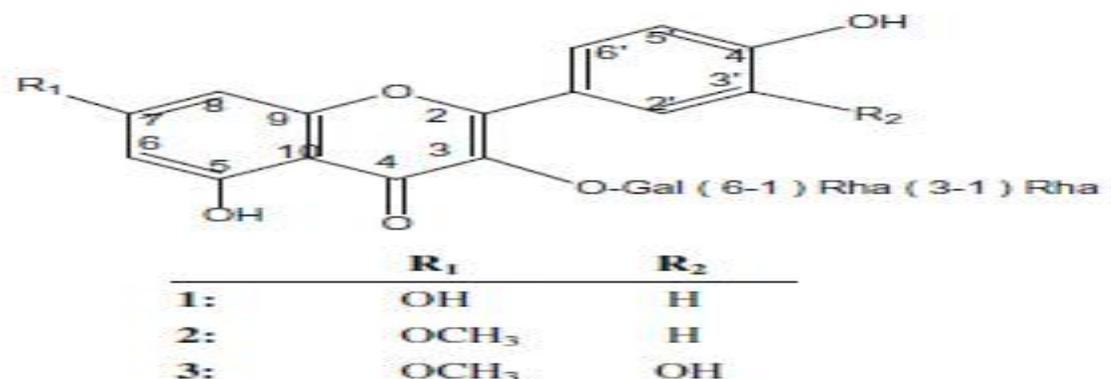


Figure 3 : Structure chimique de quelques flavonoïdes glycosylés de *R. alaternus L* (Ben Ammar et al., 2009).

La pulpe de *R. alaternus L* est composée principalement d'eau (68 %), de minéraux (Fe, Zn, Mn, K, Na, Ca<sup>+2</sup>, Mg, P, Cu) dont le plus abondant est le K (12,90 %), de lipides, protéines et de fibres (cellulose, hémicellulose et lignine). Les fruits relativement volumineux de *R. alaternus L* contiennent plus d'eau et de Phosphore, les fruits de taille intermédiaire contiennent plus de lipides, Magnésium et de Calcium et les fruits plus petits contiennent plus de protéines, Potassium et zinc. Des données prouvent que la pulpe de fruit contient toujours moins d'émodin que les feuilles (**Izhaki et al., 2002**).

### I.5. Utilisation dans la médecine traditionnelle

*R. alaternus L* est l'une des espèces utilisées généralement dans le programme de reboisement dans la méditerranée, en raison de sa capacité de survivre dans les environnements xériques (**Gulias et al., 2004**). Les tiges et les feuilles de *R. alaternus L* étaient utilisées en Algérie dans le constantinois, contre la jaunisse et les troubles hépatiques provoqués par le paludisme. Le bois ou l'écorce de *R. alaternus L* est employé dans l'Est du Maroc, en décocté et dans un bouillon de viande pour traiter des affections hépatiques. Le fruit était utilisé en Algérie comme purgatif doux ; au Maroc- dans le Haut Atlas et le Moyen Atlas, il est toujours employé comme laxatif (**Ait Youssef, 2006**).

Le fruit de *R. alaternus L* représente aussi une source importante d'eau et d'éléments nutritifs (**Izhaki et al., 2002 ; Gulias et al., 2004**). Ses feuilles émettent des petites quantités de l'isoprène (2-méthyl-1,3-butadiène) qui affectent l'oxydation de l'atmosphère en nettoyant les radicaux OH, et peut indirectement influencer sur l'accumulation du méthane atmosphérique, et surtout protège les feuilles contre la photooxydation en réagissant avec O<sup>-2</sup> produit lors de la photosynthèse (**Affek et Yakir, 2002**).

### I.6. Activités biologiques

#### I.6.1. Activité antioxydante

Certains extraits de *R. alaternus L*, ont un potentiel d'activité antioxydante liée à la composition de la plante en flavonoïdes et polyphénols (**Ben ammar, et al., 2008 Bhourri et al., 2012**). Les flavonoïdes neutralisent les radicaux libres, en se liant directement à ces derniers.

Les flavonoïdes de *R. alaternus L* sont de bon chélateurs de métaux qui jouent un rôle important dans le métabolisme de l'oxygène et l'apparition des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la réduction du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par génération de quantité importante de radicaux libres hydroxyles (**Aschok, 2001**). Les travaux de **Yen (1995)** et **Kelly (2002)** ont démontré que les flavonoïdes, sont de bons donneurs d'électrons et d'hydrogène ce qui leur confère la capacité

de terminer la chaîne de formation des radicaux, en convertissant les radicaux libres et les ERO en produits stables.

### I.6.2. Activité antimicrobienne

L'extrait méthanolique de *R. alaternus L* exerce une activité antimicrobienne contre une large gamme des microorganismes, particulièrement les bactéries résistantes aux multiples antibiotiques (**Percival, 2004**). L'extrait méthanolique de *R. alaternus L* inhibe la croissance des bactéries Gram<sup>+</sup> représentées par *Staphylococcus aureus* et Gram<sup>-</sup> représentées par *Escherichia coli* et sur une levure *Candida albicans* (**Mashhadian et Rakhshandeh, 2005**).

### I.6.3. Activité antimutagène

L'effort oxydant provoqué par des espèces réactives de l'oxygène induit l'oxydation des biomolécules menant aux dommages cellulaires (**Ben Ammar et al., 2008**). L'extrait organique de *R. alaternus L* a une propriété antimutagène qui se traduit par l'inhibition des agents mutagènes (Aflatoxine B1) probablement à son abondance en flavonoïdes et en tannins (**Ben Ammar et al., 2005 ; Ben Ammar et al., 2007**).

### I.6.4. Activité anti-inflammatoire

Des études ont montré que les extraits organiques de *R. alaternus L* possèdent des activités anti-inflammatoires, ces activités sont corrélées avec la composition en polyphénols surtout en flavonoïdes, tannins et anthraquinones tel que l'émodin, cette propriété est due principalement à l'activité de ce métabolite à piéger des radicaux libres (**Ben Ammar et al., 2005**).

L'espèce *R. alaternus L* comme une bonne source d'anthraglucosides. L'écorce des racines ou des tiges (rameaux) sont riches en dérivés anthracéniques. Les feuilles en sont également riches et les fruits en contiennent probablement aussi. Cette richesse rend parfaitement compte des propriétés laxatives et surtout purgatives de toutes les parties utilisées (**Ait Youssef, 2006**).

L'émodine produit sur la surface des feuilles à plusieurs activités biologiques. Il peut protéger la plante contre les effets nocifs de la lumière UV, il représente aussi des effets purgatifs chez l'homme, et des effets d'allélopathie, antibactériens et antifongiques (**Izhaki et al., 2002**). Cette plante est efficace dans le traitement des complications hépatiques et certaines affections dermatologiques (**Ben Ammar et al., 2009**). D'autres indications sont rapportées comme le traitement des brûlures, d'odontalgie et pour le soin oculaire (**Ben Ammar et al., 2008**).

*Chapitre II: Stress  
oxydatif et antioxydants*

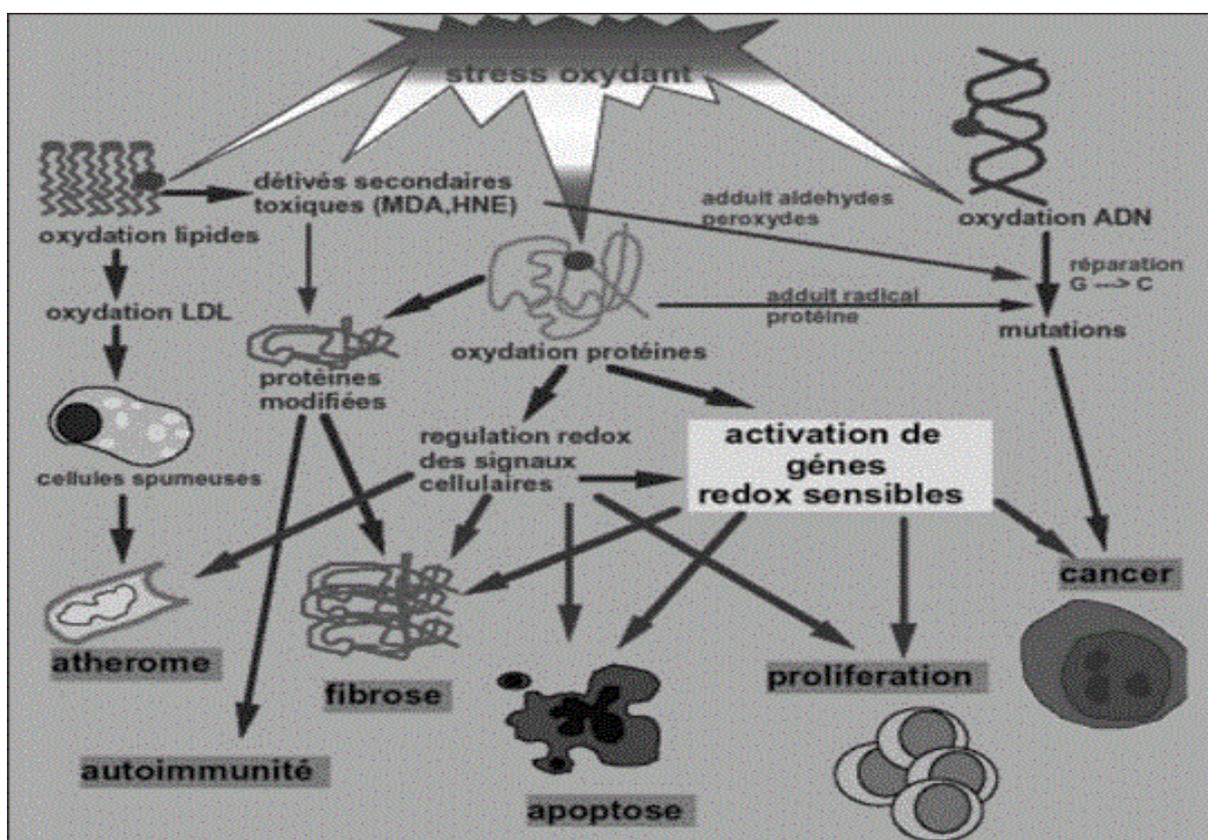
---

## Radicaux libres et stress oxydatif

### II.1. Le stress oxydatif

#### II.1.1. Définition

La production d'espèces réactives de l'oxygène est utile mais peut être néfaste pour l'organisme lors d'une production excessive et en absence de mécanismes de défense. C'est ce que l'on appelle le stress oxydatif (**Belaïch et al., 2016**). On peut dire donc que le stress oxydatif est la principale cause initiale de plusieurs maladies. C'est le facteur potentialisant l'apparition des maladies plurifactorielles telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Bidie, 2010**). La plupart des maladies induites par le stress oxydatif apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydants et augmente la multiplication mitochondriale de radicaux (**Sohal et al., 2002**).



**Figure 4** : Stress oxydatif et pathologies humaines (**Favier, 2006**).

Il existe 4 aspects nécessaires à la caractérisation d'un état de stress oxydatif dans la cellule (**Power et Jackson (2008)**) :

- Formation de molécules réactives, oxydantes.
- Dommages oxydants aux composants macromoléculaires de la cellule supprimée.
- Diminution des espèces antioxydants.

### II.1.2. Pathologies liées au stress oxydatif

Dans de nombreux articles précédents, ont été montré que le stress oxydatif est impliqué dans le développement de plus de 200 pathophysiologies (**Pincemail *et al.*, 2003**) allant de l'athérosclérose au cancer en passant par le diabète, le SIDA ou toutes les maladies à caractère inflammatoire (arthrite rhumatoïde, endotoxémie, ...)

- Ischémie- reperfusion ; (**Granger *et al.*, 1981 ; Talbott *et al.*, 1995**).
- Diabète ;(**Paolisso *et al.*, 1993 ; Knoepfel *et al.*, 1994 ;**).
- Athérosclérose ; (**Steinberg, 1993 ; Berliner et Heinecke, 1996**).
- Maladies intestinales inflammatoires ; (**Lesgards *et al.*, 2002**).
- Arthrite ;(**Mc Cord, 1974**).
- Maladies neurodégénératives Maladie de Parkinson et d'Alzheimer ; (**Jenner Olanow,1996 ; Zafrilla *et al.*, 2007**).
- Cancer ; (**Ames et Shigenaga, 1996 ; Pincemail *et al.*, 1999**).
- Maladies du système immunitaire ; (**Lesgards *et al.*, 2002**).
- Allergies ; (**Schmidt *et al.*, 1990 ; Picardo *et al.*, 1992**).
- Déséquilibre dans le statut redox.

Un intérêt croissant existant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres grâce à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme ou l'ischémie, et à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire, il est donc très important de pouvoir définir avec précision l'état de défense des individus contre l'agression des radicaux libres. Compte tenu de l'ensemble des composés chimiques et des systèmes enzymatiques intervenant dans le mécanisme de défense antiradicalaire (**Guinebert *et al.*, 2005**).

## II.2. Radicaux libres

### II.2.1. Définition d'un radical libre

Un radical libre est défini comme atome ou 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. (**Leverve, 2009**). Les radicaux libres primaires sont dérivent directement de l'oxygène. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires (radical peroxy  $\text{ROO}^{\bullet}$ , radical alkoxy  $\text{RO}^{\bullet}$ ), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (**Novelli, 1997**).

Les radicaux libres sont indispensables à la vie car ils participent à de nombreuses fonctions physiologiques lors de la croissance ou de la défense de l'organisme.

En effet, ils participent au (**Favier (2003)**) :

- Fonctionnement de certaines enzymes.
- Transduction de signaux cellulaires.
- Défense immunitaire contre les agents pathogènes.
- Apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire.
- Fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes.

### II.2.2. Classification des radicaux libres

#### II.2.2.1. Les radicaux libres primaires

Les radicaux libres primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) et le radical hydroxyle ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) ou de l'azote tel le monoxyde d'azote ( $\text{NO}^{\bullet}$ ). D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces réactives de l'oxygène comme l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ou le nitroperoxyde ( $\text{ONOOH}$ ) ne sont pas des radicaux libres mais sont réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux (**Favier, 2003**).

#### ✓ Le radical oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ )

L'oxygène singulet est formé à partir de l'oxygène sous l'influence de rayonnement UV (**Barouki, 2006**).



✓ **Anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ )**

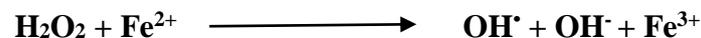
Le dioxygène est capable de capter un électron en présence de rayonnements, de métaux ou d'enzymes de type oxydases ou mitochondriales, il est capable de capter un électron pour donner le radical superoxyde, qui est un radical modérément réactif (**Barouki, 2006**).

✓ **Peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )**

Le peroxyde d'hydrogène est formé à partir de l'anion superoxyde par la voie des superoxydes dismutases (SODs) (**Rochette, 2008**).

✓ **Le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ )**

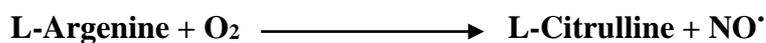
Le radical hydroxyle est formé à partir de l'eau oxygénée  $H_2O_2$  en présence de métaux, en particulier le fer  $Fe^{2+}$  par la réaction de Fenton (**Barouki, 2006**).



Le radical hydroxyle est extrêmement réactif et va oxyder très rapidement les molécules voisines formant parfois d'autres radicaux libres.

✓ **L'oxyde nitrique ( $NO^{\cdot}$ )**

L'oxyde nitrique est produit à partir de L-Argénine sous l'action de NO synthase (**Bonnefont-Rousselot et al., 2002**).

✓ **Anion peroxynitrite ( $ONOO^{\cdot}$ )**

L'anion peroxynitrite est une espèce oxydante importante, car sa réactivité est assez proche de celle de radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ), la plus réactives des espèces réactive d'oxygène, il est formé à partir de  $NO^{\cdot}$  et  $O_2^{\cdot-}$  (**Vamecq et al., 2004**).



### II.2.2.2. Les radicaux libres secondaires

Les radicaux libres secondaires ne sont pas formés spontanément : ils sont formés par l'action d'un radical primaire sur un composant cellulaire. Exemple le radical peroxyde (ROO·) qui est formé après que le radical O<sub>2</sub>· ou OH· ait agi sur un acide gras insaturé de la membrane cellulaire. Ces radicaux libres secondaires sont très dangereux puisqu'une fois formés, ils sont capables de créer une réaction en chaîne (**Lacan, 2001**).

### II.2.3. Origine de radicaux libres

L'agression de différents agents de l'organisme humain a donné naissance à des radicaux libres (**Hadi, 2004**) ; tels que les rayonnements UV, les polluants, les produits chimiques (**Hadi, 2004 ; Kumar et al., 2008**) l'ingestion d'alcool (**Hadi, 2004**), mais également produit naturellement par l'organisme au cours de processus biologiques comme la repense immunitaire, la respiration mitochondriale (**Edeas, 2005**), au niveau de certains organites cellulaires tel que le peroxyosome et par diverses oxydase cellulaires (**Hadi, 2004**) selon Pastre ils sont résumé dans le tableau ci-dessous :

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

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

### II.2.4. Les cibles biologiques des radicaux libres

Les cibles principales sont l'ADN et les lipides membranaires et de manière moins importante les protéines et les glucides (**Lenzi, 2011**).

### II.2.4.1. Les composés lipidiques

Les acides gras polyinsaturés ainsi que les phospholipides membranaires sont les cibles privilégiées des attaques oxydatives. Les membranes sont plus particulièrement visées par le radical hydroxyle capable d'arracher un atome d'hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Cette réaction est appelée la peroxydation lipidique dont le radical peroxyde peut, quant à lui, libérer différents aldéhydes toxiques comme le malondialdéhyde (MDA) (**Kruidenier et al., 2002 ; Valko et al. 2006**).

### II.2.4.2. Les composés protéiques

Les dommages oxydatifs induits sur les protéines par les radicaux libres peuvent conduire à des modifications structurales (dimérisation, fragmentation, modification des acides aminés) et ou fonctionnelles (perte de l'activité enzymatique, altération du processus de protéolyse). Les acides aminés les plus sensibles à leur action sont le tryptophane, la tyrosine, la phénylalanine, la méthionine et la cystéine. Ainsi le stress oxydatif peut avoir un effet sur la fonction propre d'une protéine mais peut également avoir des répercussions sur l'ensemble de la régulation cellulaire (**Kruidenier et al. 2002**).

### II.2.4.3. L'ADN

Les radicaux libres peuvent induire des effets mutagènes, l'arrêt des réplifications des ADN nucléaires et mitochondriaux, l'arrêt de l'induction de la transcription ou de la transduction des voies de signalisation. Ils agissent en provoquant des altérations de bases, des pontages ADN protéines ou des ruptures de brins (**Hadi, 2004 ; Valko et al., 2006**). Les cassures observées sont dues aux radicaux OH<sup>•</sup> issus de la réaction de Fenton en présence de fer ferreux chélate à certains acides aminés ou aux groupes phosphates de l'ADN.

## II.3. Les antioxydants

Les antioxydants sont définis par **HALLIWELL** comme « toute substance qui en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé retarde ou inhibe l'oxydation de ce substrat », ils interviennent en protégeant les cellules des dommages oxydatifs induits par les radicaux libres (**Pastre et Priymenko, 2007**). Les antioxydants piègent les radicaux libres en inhibant les réactions à l'intérieur des cellules provoquées par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les espèces azotées réactives (RNS) (**Benbrook, 2005**). L'organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule (**Favier, 2003**).

### II.3.1. Le système de défense des antioxydants

#### II.3.1.1. Les antioxydants endogènes (enzymatiques)

##### II.3.1.1.1. La catalase

La catalase est présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (**Piquet et Hébuterne, 2007**).



##### II.3.1.1.2. Les superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases accélèrent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, il existe plusieurs isoenzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) (**Piquet et Hébuterne, 2007**).

Les SODs contiennent soit du manganèse (Mn-SOD), soit du cuivre et du zinc

(Cu/Zn-SOD), et qui sont restreintes à des compartiments cellulaires différents (**Ré et al.**

**2005**). Il existe trois types de SOD : la SOD 1 ou Cu/Zn-SOD, est cytosolique ; la SOD 2 où Mn-SOD est mitochondriale ; la SOD 3, qui comme la SOD1 comporte du cuivre et du zinc, est extracellulaire et est donc aussi appelée EC-SOD (**Afonso et al. 2007**).

##### II.3.1.1.3. La glutathion peroxydase

Une enzyme à cofacteur de sélénium se localise dans le cytosol et la matrice mitochondriale. Elle a pour activité la dégradation des peroxydes organiques (ROOH) et du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (**Valko et al. 2006**).

#### II.3.1.2. Les antioxydants exogènes (non enzymatiques)

##### II.3.1.2.1. Les oligo-éléments

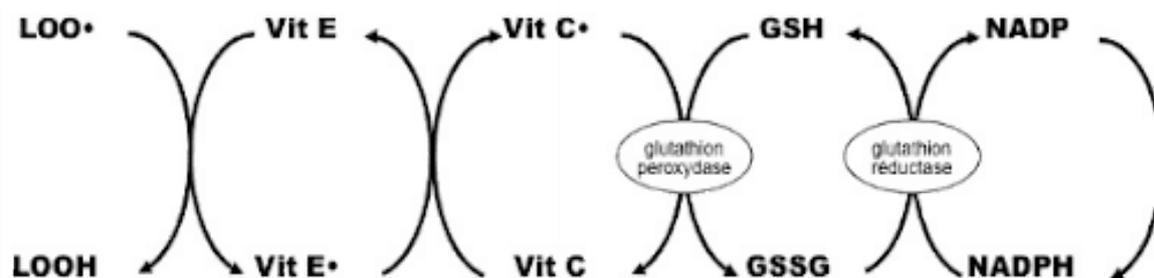
Les oligo-éléments interviennent comme cofacteurs d'enzymes indispensables dans la lutte contre les radicaux libres. Parmi eux on cite : le zinc, le sélénium et le manganèse (**Pastre, 2005**).

##### II.3.1.2.2. La vitamine E

La vitamine E est considérée comme le principal antioxydant attaché à la membrane et utilisé par la cellule pour inhiber la peroxydation lipidique durant la réaction antioxydant (**Valko et al. 2006**).

### II.3.1.2.3. La vitamine C

La vitamine C est l'antioxydant hydrosoluble majeur, elle réagit rapidement avec l'anion superoxyde et l'oxygène singulet, ou encore avec le peroxyde d'hydrogène. Elle est indispensable par sa capacité à réduire d'autres antioxydants oxydés comme la vitamine E ou les caroténoïdes (Pourrut, 2008).



Cycles réactionnels de régénération des antioxydants.

Figure 5 : La coopération entre la vitamine C et E.

### II.3.1.2.4. Les composés phénoliques :

Vue les propriétés redox de composés phénoliques, les polyphénols agissent comme des agents réducteurs, donneur d'hydrogène en piégeant les radicaux libres et en chélatent les ions (Valko *et al.* 2006).

#### II.3.1.2.4.1. Les tanins

Les tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides (Diallo, 2005).

#### II.3.1.2.4.2. Les coumarines

Les coumarines sont capables de piéger les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes, importants dans la prévention de la peroxydation des lipides membranaires et ils ont une activité antiperoxydante (Diallo, 2005).

#### II.3.1.2.4.3. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments végétaux lipophiles formant une famille de plus de 600 molécules notamment le lycopène et le  $\beta$ -carotène, précurseurs de la vitamine A (Marc *et al.* 2004).

#### II.3.1.2.4.4. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydatif : par capture directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition comme le fer, le cuivre ou par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène comme la xanthine oxydase (**Lahouel et al. 2006**).

#### II.4. Balance Oxydants /Antioxydants et stress oxydatif

Les ROS ont des rôles physiologiques très importants en agissant, à faibles concentrations, sur la régulation des réponses biologiques, la transduction du signal et autres voies de signalisation (**Favier, 2003**).

Dans l'ensemble de nos tissus sains, les défenses antioxydants sont capables de faire face et détruire les radicaux produits en excès. On dit que la balance Oxydants /Antioxydants est en équilibre. Mais dans certaines situations, en raison d'une surproduction radicalaire (tabac, alcool, pollution, ...etc) ou d'une diminution des capacités antioxydants (insuffisance d'apports des micronutriments antioxydants, inactivation enzymatiques) un déséquilibre entre la production des radicaux libres et le système de défense est à l'origine d'un état redox altéré de la cellule appelé stress oxydatif (**Sohal et al. 2002**). Pour enrayer le stress oxydatif, il faut donc aider la cellule et l'organisme par l'apport d'antioxydants secondaires (vitamine C, E, caroténoïdes, polyphénols) (**Kohen et Nyska, 2002**).

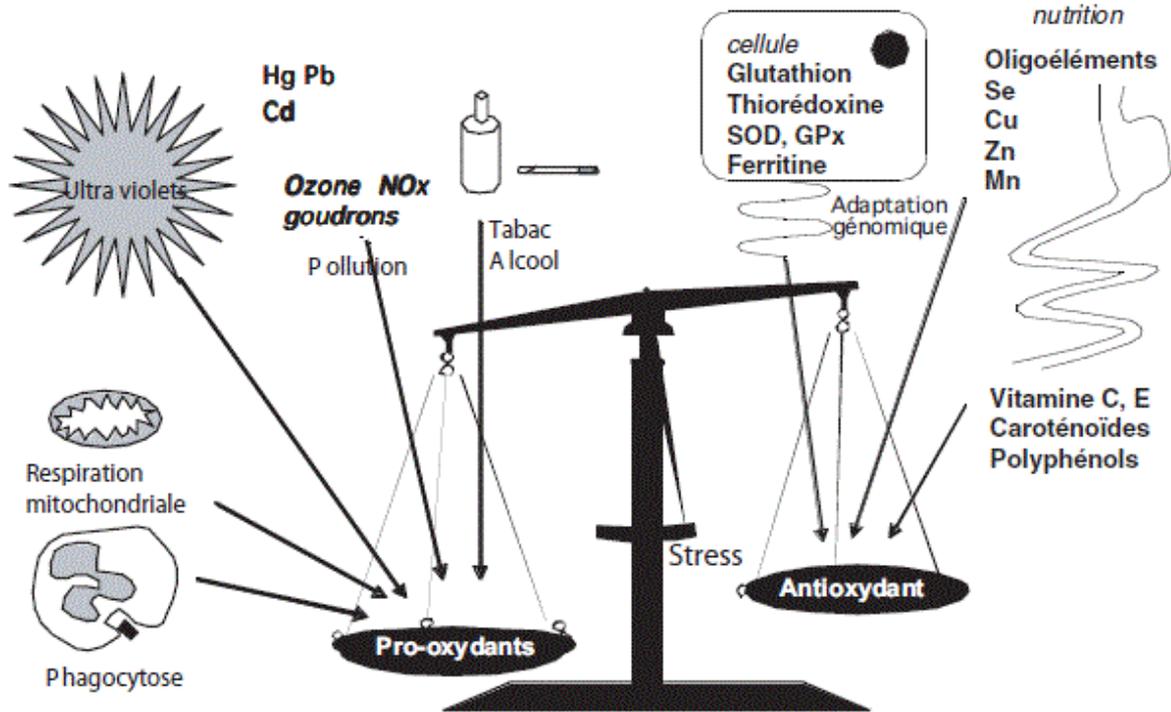


Figure 6 : Balance Oxydants /Antioxydants et stress oxydatif (Favier,200).

*Partie expérimentale*

# *Chapitre III : Matériel et méthodes*

### III. Matériel et méthodes

#### III.1. Matériel et réactifs chimiques utilisés

Durant la réalisation du travail pratique, un matériel expérimental de laboratoire biologique et des produits chimiques ont été utilisés :

**Tableau III** : Matériel et réactifs utilisés.

Matériel	Réactifs chimiques
- Agitateur.	- Acétate d'éthyle.
- Balance professionnelles de précision (BP310P).	- Carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).
- Consommables (Bavettes, gants médicaux, parafilm, papier aluminium, papier absorbant ...etc).	- Chloroforme.
- Etuve (BINDER).	- Chlorure d'Aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ).
- Hotte d'aspiration chimique.	- DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl).
- Micropipettes (de 10 $\mu\text{l}$ , 50 $\mu\text{l}$ , 200 $\mu\text{l}$ , 1000 $\mu\text{l}$ ).	- Eau distillé.
- Moulin à café.	- Hexane.
- Plaque magnétique (MULTISTIRRER).	- Méthanol.
- Réfrigérateur.	- Persulfate de potassium ( $\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$ ).
- Spectrophotomètre UV-VIS (Spectroscan 50v).	- Poudre d'ABTS.
- Verrerie graduée (tubes, béchers, erlenmeyers, pissettes ...etc).	- Réactif Folin-Ciocalteu (FC).
- Vortex (VELP).	

#### III.2. Matériel végétal

Cette étude a été réalisée sur les feuilles de *R. alaternus L* ;

##### III.2.1. Récolte des feuilles

Les feuilles de *R. alaternus L* utilisés proviennent du Nord d'Algérie exactement de la wilaya de Bejaïa dans la région de Toudja, récoltées début Mai 2021.

### III.2.2. Préparation des échantillons

Après récolte, les feuilles de *R. alaternus L* ont été rincées et séchées à l'air libre dans un endroit sec pendant 20 jours. Un broyage fin des feuilles séchées est pratiqué à l'aide d'un moulin à café. La poudre finale obtenue est conservée dans un bocal en verre fermé hermétiquement est stocké à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation.



Figure 7 : Poudre de *R. alaternus L*.

### III.3. Extraction des composés phénoliques

#### III.3.1. Extraction à partir des feuilles de *Rhamnus alaternus L*

L'extraction est réalisée selon la méthode décrite par **Hossain et al., 2013** avec quelques modifications. La quantité de méthanol doit être appropriée à la quantité de matière végétale à extraire. L'extraction est effectuée par épuisement du matériel végétal. 113,5 g de la poudre des feuilles de *R. alaternus L* sont macérés dans 450 ml de méthanol.



Figure 8 : Macération de la poudre de *R. alaternus L*.

Le mélange est maintenu sous agitation magnétique pendant 48 heures à température ambiante.



**Figure 9 :** Agitation magnétique du mélange de *R. alaternus L.*

Après macération, la solution obtenue a été filtrée plusieurs fois (sur une bande à gaze, coton et sur papier wattman N°03) et le filtrat est récupéré (filtrat 1). La même opération a été répétée avec 300 ml de méthanol, afin d'avoir une extraction exhaustive pour une deuxième macération et le filtrat 2 est récupéré.



**Figure 10 :** Étapes de la filtration du mélange de la *R. alaternus L.*

Les deux filtrats ont été mélangés. Le mélange a été soumis à une évaporation sous une hotte à vapeur à température ambiante jusqu'à ce que le poids de l'extrait reste constant, le taux de l'extraction est calculé selon la formule suivantes :

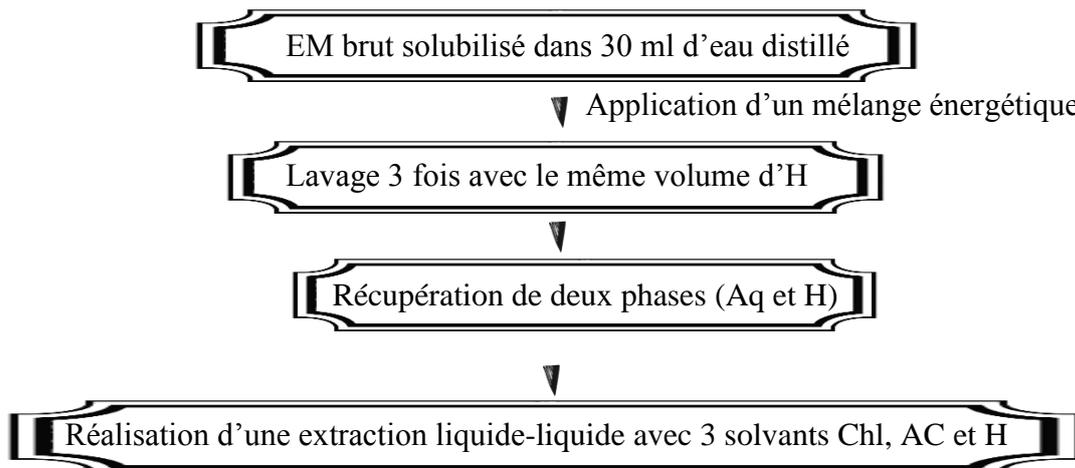
$$\text{Taux d'extraction} = [(P - P_0) / \text{poids de poudre}] \times 100.$$

Où :

**P<sub>0</sub>** : poids vide de la boîte de pétri.

**P** : poids après évaporation du solvant.

## III.4. Fractionnement de l'extrait méthanolique



**Figure 11** : Protocole de fractionnement de l'extrait méthanolique de *R. alaternus L.*

### III.5. Dosages colorimétriques des composés phénoliques

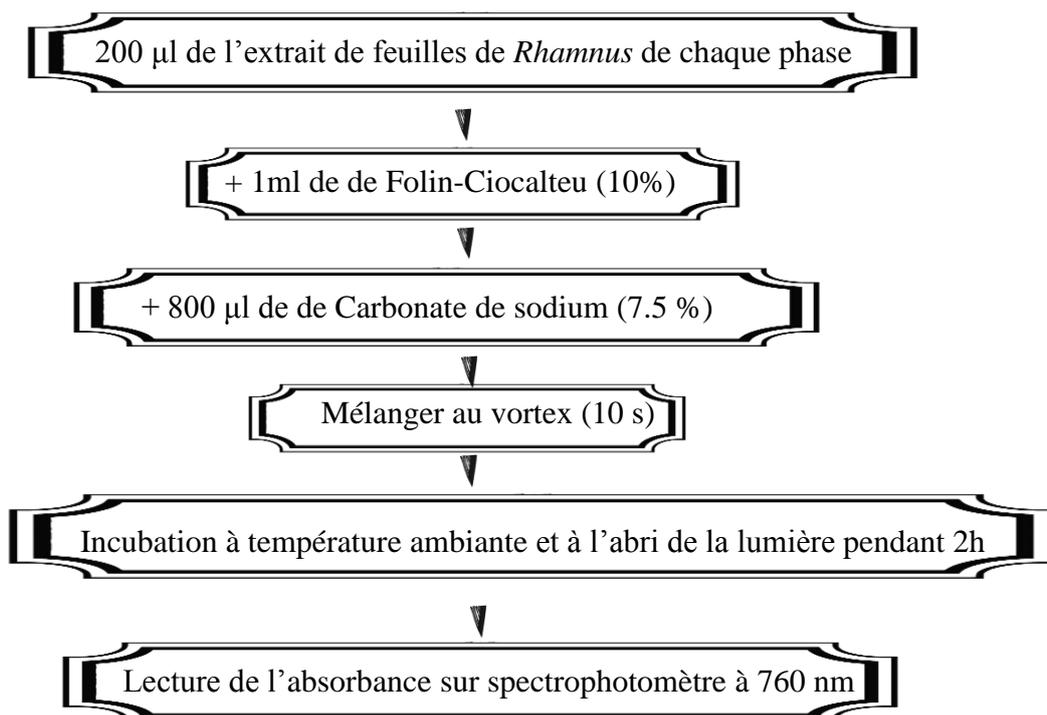
#### III.5.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999).

- **Principe**

Cette méthode de quantification des polyphénols totaux exploite la propriété du réactif de Folin-Ciocalteu, composé d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et phosphomolibdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), de couleur jaune réduit par les polyphénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $MO_8O_{23}$ ). Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1982).

- **Mode opératoire**



**Figure 12 :** Protocole expérimental de dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin- Ciocalteu (Yap *et al.*,2009).

Toutes les mesures sont réalisées en triplicata.

Les concentrations des polyphénols totaux contenus dans les extraits de *R. alaternus L* sont calculées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard. La quantité des polyphénols totaux a été exprimée en milligramme équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

### III.5.2. Dosages des flavonoïdes

- **Principe**

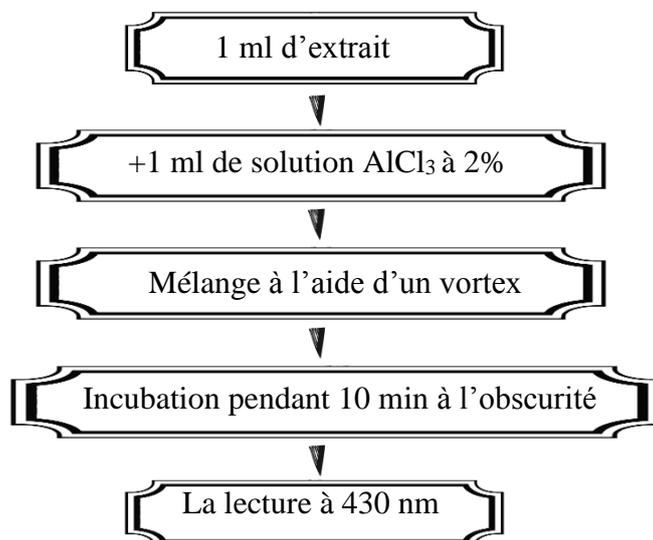
Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium.

Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (Fer et Aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (**Ribereau-Gayon, 1968**).

- **Protocole expérimentale**

L'évaluation quantitative des flavonoïdes totaux dans les différentes fractions est réalisée selon la méthode du trichlorure d'aluminium (**Bahorun et al., 1996**).

Les concentrations des flavonoïdes contenus dans les extraits de *R. alaternus L* ont été calculées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine comme standard, les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercétine/g d'extrait.



**Figure 13 :** Protocole expérimental de dosage des flavonoïdes totaux par la méthode de (**Bahorun et al., 1996**).

Toutes les opérations sont réalisées en triple.

### III.6. Activité antiradicalaire des extraits

#### III.6.1. Activité antiradicalaire au radical DPPH

- **Principe**

Le test au 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle (DPPH $\cdot$ ), permet de mesurer le pouvoir réducteur des substances antioxydantes contenues dans un extrait.

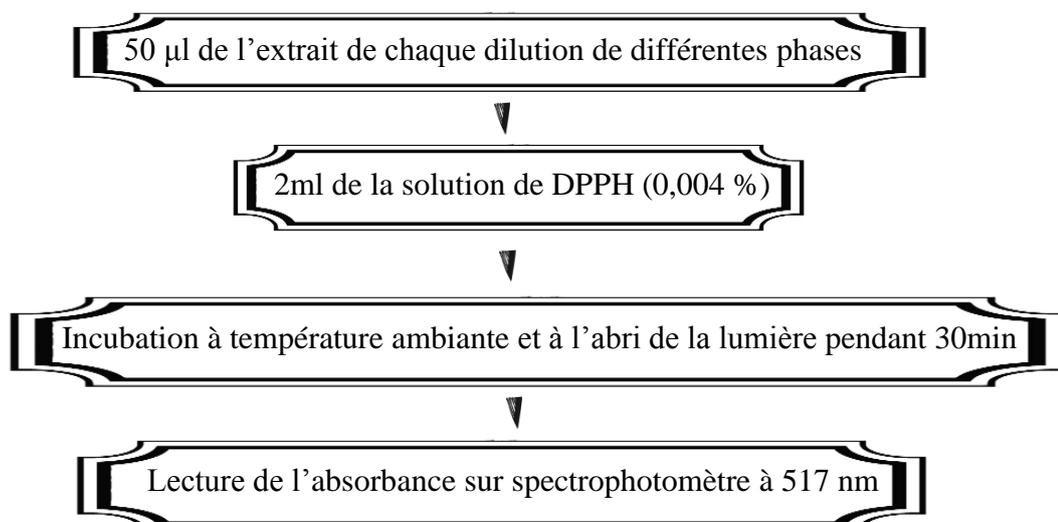
Le DPPH est un radical libre de couleur violette qui devient jaune quand il est réduit par un donneur de proton H $^+$ .



Où AH est un composé capable de céder un H $^+$  au radical DPPH. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances antiradicalaire (Molyneux, 2004).

- **Protocole expérimental**

Le protocole expérimental utilisé est celui de **Brand-Williams et al. (1995)** avec quelques modifications.



**Figure 14 :** Protocole expérimental de l'activité « scavenging » du DPPH $\cdot$  (**Brand-Williams et al.,1995**).

La quercétine a été utilisée comme standard à différentes concentrations et l'activité antiradicalaire de chaque extrait a été estimée en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante : **Pourcentage d'inhibition du radical DPPH** =  $[(A_C - A_E / A_C)] \times 100$

**A<sub>C</sub>** : Absorbance du contrôle (solution du DPPH).

**A<sub>E</sub>** : Absorbance de l'échantillon.

### III.6.2. Activité antiradicalaire au radical ABTS<sup>+</sup>

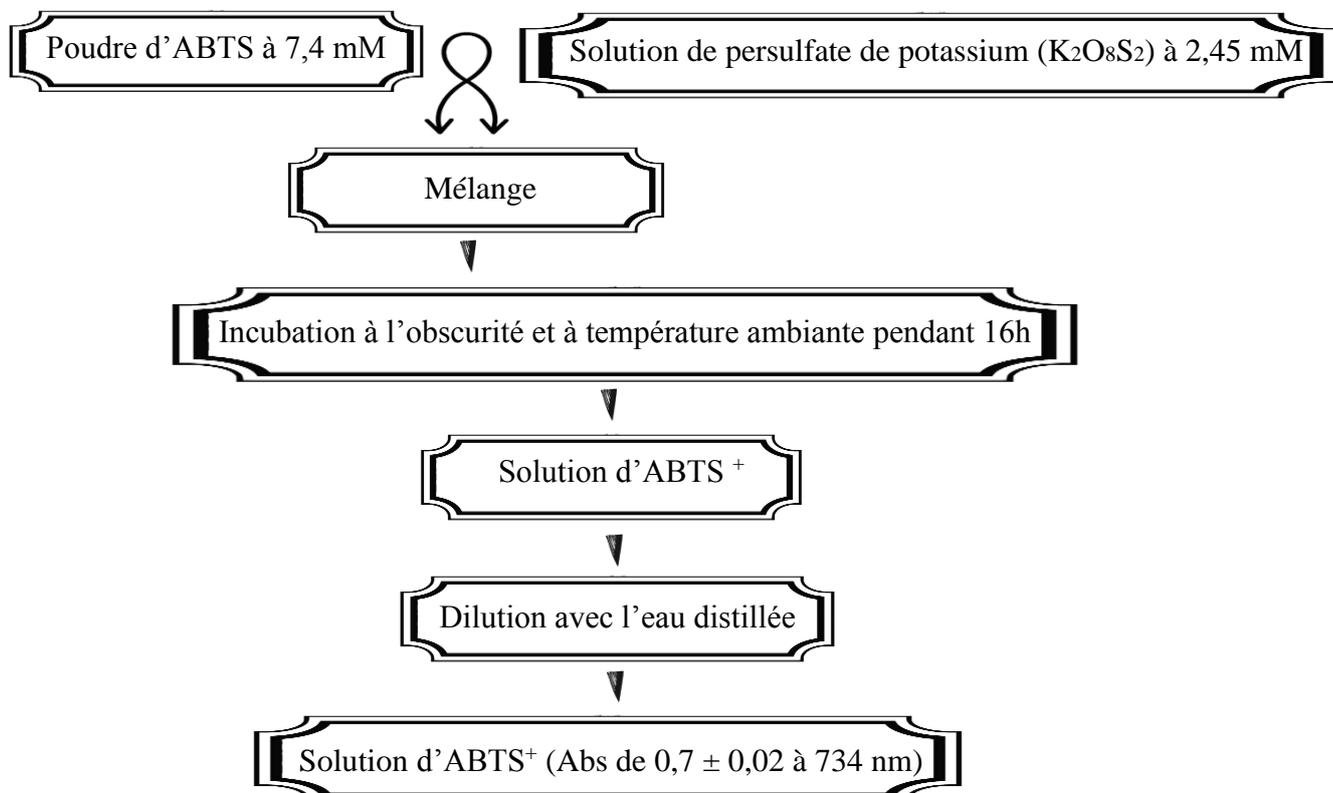
- **Principe**

Ce test est basé sur le mécanisme d'oxydoréduction de l'ABTS. L'activité antioxydante totale d'une molécule est déduite de sa capacité à inhiber le radical ABTS<sup>+</sup>, obtenu à partir de l'oxydation d'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) avec le persulfate de potassium qui est alors réduit en présence des antioxydants sous une forme stable comparativement à un antioxydant de référence : le Trolox (acide 6-hydroxy-2, 5, 7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique) un cation ABTS<sup>+</sup> est produit directement par oxydation d'ABTS avec le persulfate de potassium qui est alors réduit en présence des antioxydants sous une forme stable (**Re et al.,1999**).

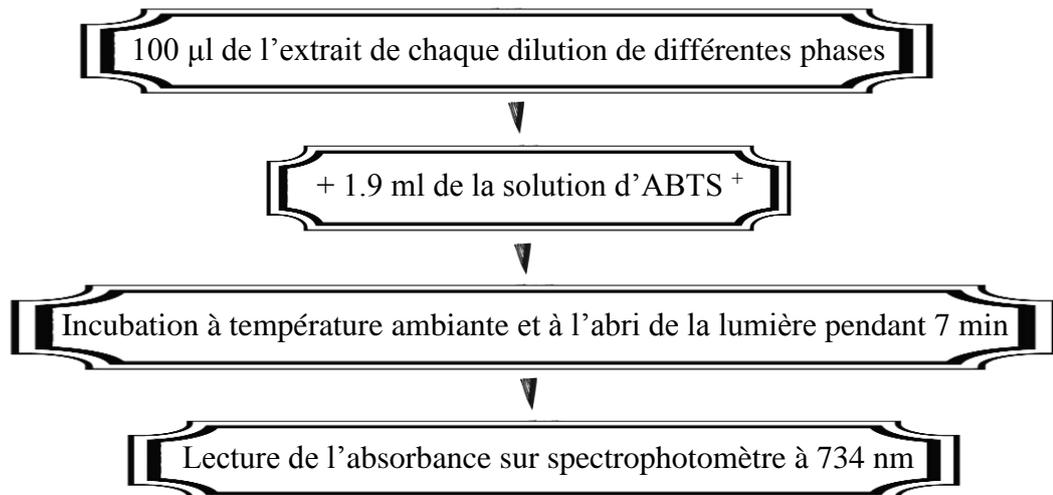
- **Mode opératoire**

Le protocole utilisé pour mesurer l'activité antiradicalaire au radical ABTS<sup>+</sup> est celui décrit par (**Re et al., 1999**).

➤ **Préparation de réactifs**



➤ **Application du test**



**Figure 15 :** Protocole expérimental de l'activité antioxydante de l'ABTS<sup>+</sup> (Mighri et al., 2010).

Trois essais ont été effectués pour chaque concentration de produit testé.

Le Trolox a été utilisé comme standard à différentes concentrations. Le pourcentage de l'activité scavenging du radical ABTS<sup>+</sup> des différents extraits est calculé comme suit :

$$\text{Pourcentage d'inhibition du radical ABTS}^+ = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

**A<sub>0</sub>** : absorbance du contrôle.

**A<sub>1</sub>** : absorbance du l'extrait + ABTS<sup>+</sup>.

# *Chapitre IV : Résultats et discussions*

## IV. Résultats et discussions

### IV.1. Rendement d'extraction

**Tableau IV :** Rendement des extraits des feuilles de *R. alaternus L.*

Extraits	Taux d'extraction (%)
Méthanolique	11,34
Aqueux	3,56
Hexane	1,42
Acétate d'éthyle	ND
Chloroforme	0,25

Le calcul de rendement de différents extraits de la partie aérienne de *R. alaternus L* a révélé que l'extrait méthanolique présente le rendement le plus élevé (11,34%) suivi par l'extrait aqueux (3,96%) puis celui de l'hexane (1,42 %). Enfin, le rendement le plus faible (0,25%) est obtenu par la fraction chloroforme. La solubilité des composés phénoliques est généralement gouvernée par le type de solvant utilisé, par l'interaction de ces composés avec d'autres constituants en formant des complexes insolubles (Galvez et al., 2005). En conséquence, le méthanol est très recommandé et fréquemment utilisé pour l'extraction des composés phénoliques (Mahmoudi et al., 2013).

### IV.2. Teneur en composés phénoliques

#### IV.2.1. Teneur en polyphénols totaux

Les polyphénols sont des molécules bioactives très recherchées car ils sont réputés pour leurs excellentes propriétés biologiques (antioxydantes, antimicrobiennes, etc...) (Singleton et al., 1999).

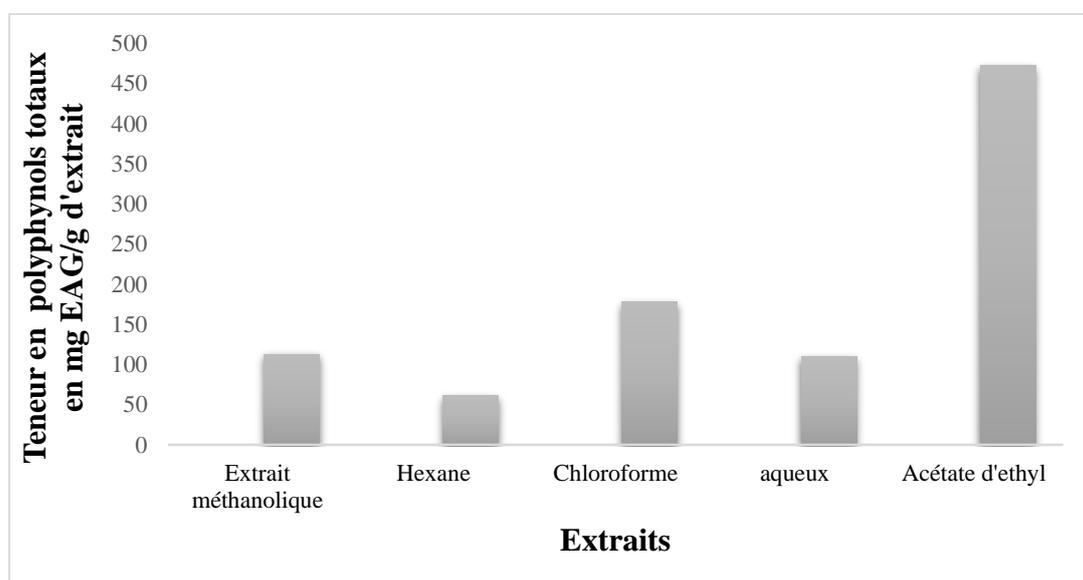
La détermination de la teneur en polyphénols totaux des différentes phases a été réalisée selon la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

Au cours du dosage des polyphénols, après l'addition du réactif de Folin-Ciocalteu, une couleur bleue est apparue, ce qui confirme la présence des polyphénols dans les phases de *R. alaternus L.*

La quantité des polyphénols correspondante de chaque phase a été rapportée en équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait.

La courbe d'étalonnage (**Annexe 2**), montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations, le taux en composés phénoliques dans les différents extraits a été exprimé en mg EAG/g d'extrait est déterminé par l'équation  $y = 0,0109x - 0,0541$  sachant que  $R^2 = 0,9896$ . La quantité en polyphénols totaux des 05 fractions des feuilles de *R. alaternus L*, sont représentées dans la **Figure 16**.

Les concentrations obtenues sont exprimées en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (mg EAG/g) présentées dans l'histogramme suivant :



**Figure 16 :** Teneur en polyphénols totaux des extraits de feuilles de *R. alaternus L*.

D'après les résultats obtenus, les polyphénols sont présents dans les cinq fractions de l'extrait méthanolique avec des teneurs variables d'un extrait à un autre, et l'extrait acétate d'éthyle qui a donné la teneur la plus élevée (471,95 mg EAG/ g d'extrait), suivi par les trois extraits : chloroforme, méthanolique et aqueux avec des concentrations de l'ordre de 177,95 ; 113,1 et 109,9 mg EAG/g d'extrait, respectivement.

Enfin l'extrait hexane a donné la plus faible teneur en polyphénol qui est de l'ordre de 61,1mg EAG/g d'extrait.

Ces résultats révèlent l'effet important du type de solvant sur le taux d'extraction des composés phénoliques. Cette différence en polyphénols totaux dans les cinq fractions peut être expliquée par plusieurs paramètres, tels que la nature des composés phénoliques et leurs degrés de solubilité dans les solvants utilisés (Naczak et Shahidi, 2004).

Comparant aux résultats obtenus par Ben Ammar et ses collaborateurs, (2007), la teneur en polyphénols de l'extrait acétate d'éthyle est de 250 mg EAG/g d'extrait, qui est relativement inférieur à celle trouvée dans cette étude. Cette absence de similitude peut être expliquée tout d'abord par la méthode d'extraction et le solvant utilisé, ainsi l'origine, la période de la récolte et aux facteurs environnementaux.

#### IV.2.2. Teneur en flavonoïdes

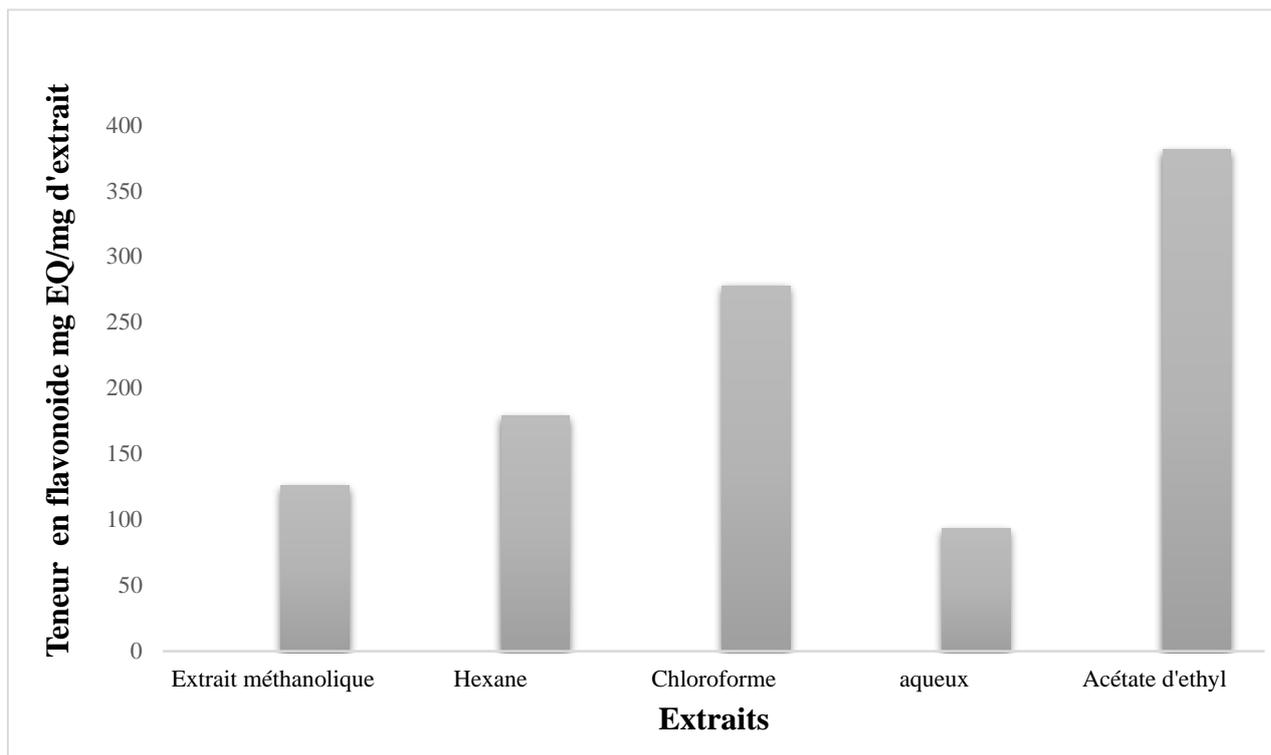
L'interaction des flavonoïdes avec de nombreux radicaux a été employée dans plusieurs études afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. A cause de leurs faibles potentiels redox (Jovanovic, 1994).

Lors du dosage des flavonoïdes, après l'addition d' $\text{AlCl}_3$  et après incubation une couleur jaunâtre est obtenue dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de l'extrait de la plante, ce qui confirme la présence des flavonoïdes dans l'extrait des feuilles de *R. alaternus L.*

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode colorimétrique décrite par (Bahorun et al., 1996).

Le taux des flavonoïdes des cinq extraits ont été obtenus à partir de la courbe d'étalonnage réalisé par la quercétine (Annexe 1), suite à une équation de type :  $y = 0,00299 x + 0,00359$  avec  $R^2 = 0,9986$ .

Les concentrations obtenues sont exprimées en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (mg EQ /g) présentées dans l'histogramme suivant (Figure 17) :



**Figure 17 :** Teneur en flavonoïdes des extraits de feuilles de *R. alaternus L.*

D'après les résultats obtenus, les proportions des flavonoïdes varient d'un extrait à un autre, la teneur la plus élevée est notée par l'extrait acétate d'éthyle (380,95 mg EQ/g d'extrait), suivie de celle d'extrait chloroformique, hexane et extrait méthanolique avec des teneurs respectivement de l'ordre de 277,85 ; 179,2 et 125,85 mg EQ/g d'extrait respectivement. En fin l'extrait aqueux a donné la plus faible teneur en flavonoïdes qui est de l'ordre 93 mg EQ/g d'extrait.

**Ben Ammar et ses collaborateurs, (2007)**, ont démontrés que l'extrait Acétate d'éthyle des feuilles de *R. alaternus L* de Tunisie contient environ  $338 \pm 34$  mg EQ/g d'extrait. Ce Résultat est un peu inférieur à la teneur obtenue dans le présent travail. Cette différence peut être due au solvant d'extraction utilisé, la modification apportée dans le protocole, à la différence des conditions expérimentales telles que les appareils utilisés.

### IV.3. Activité antioxydante et antiradicalaire

Les deux types de tests que nous avons utilisés pour évaluer l'activité antioxydante de nos extraits de *R. alaternus L* sont : le radical DPPH et le test ABTS.

#### IV.3. Pouvoir antiradicalaire

##### IV.3.1. Activité scavenging du radical DPPH

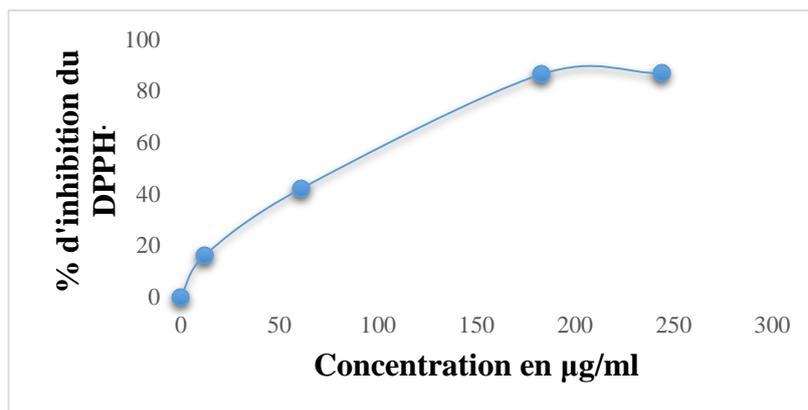
Le radical DPPH $\cdot$  est généralement l'un des composés le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radical et la simplicité de l'analyse (**Bozin et al.,2008**).

Cette technique est basée sur l'utilisation des radicaux très stables de DPPH et très utile et efficace à température ambiante en milieu méthanolique, qui permet une bonne solubilisation de la plupart des antioxydants pour titrer le groupement oxydable des composés naturels ou synthétiques utilisés comme antioxydants (**Laguerre et al., 2007**).

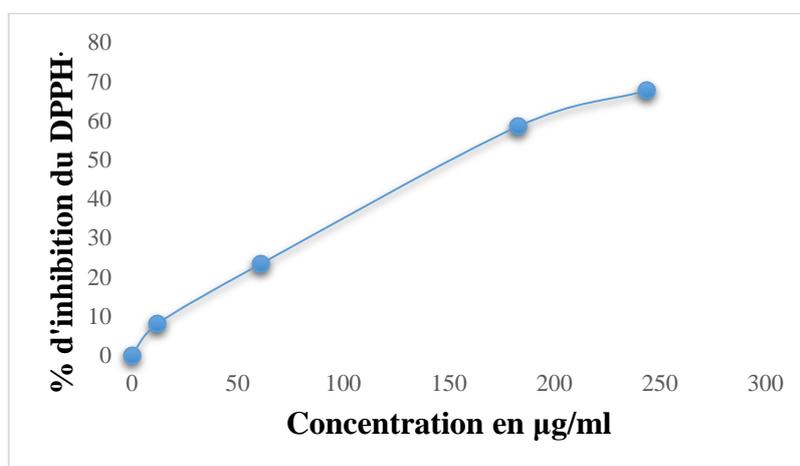
L'activité antioxydante des différents extraits de *R. alaternus L* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée au spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune. Cette décoloration se fait lorsque l'électron célibataire s'apparie. Dans ce test, le substrat est un radical stable qui, en réagissant avec une molécule antioxydante, se transforme en DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) avec perte de son absorbance caractéristique à 517 nm, sachant que cette transformation est proportionnelle à la concentration et à l'efficacité de l'antioxydant. La capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti-radicalaires présents dans les extraits phénoliques (**Majhenic et al., 2007**).

D'après le test au DPPH, quand la concentration des polyphénols augmentent dans le milieu réactionnel, le pourcentage d'inhibition augmente proportionnellement jusqu'à arriver à un plateau qui correspond à l'inhibition presque totale du DPPH $\cdot$  présent dans ce milieu (**Majhenic et al., 2007**).

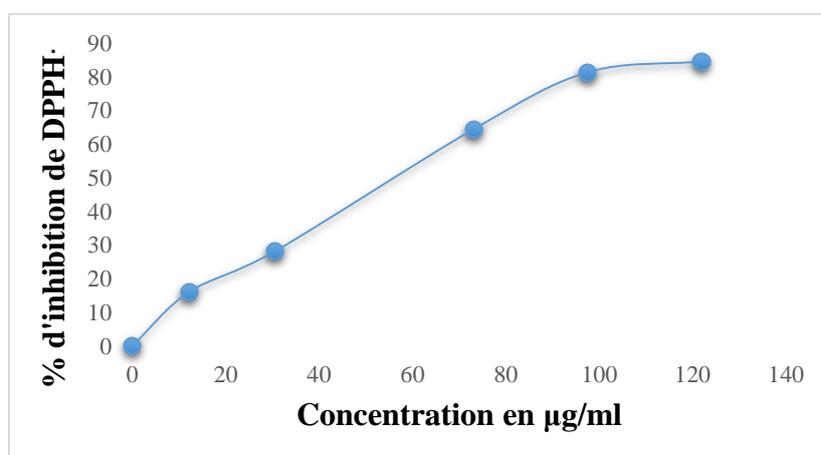
Les graphes ci-dessous représentent la variation du pourcentage du pouvoir inhibiteur en fonction de la concentration de chaque extrait. D'après les résultats représentés dans les (**Figures : 18, 19, 20, 21 et 22**), il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration pour les différents extraits de la plante.



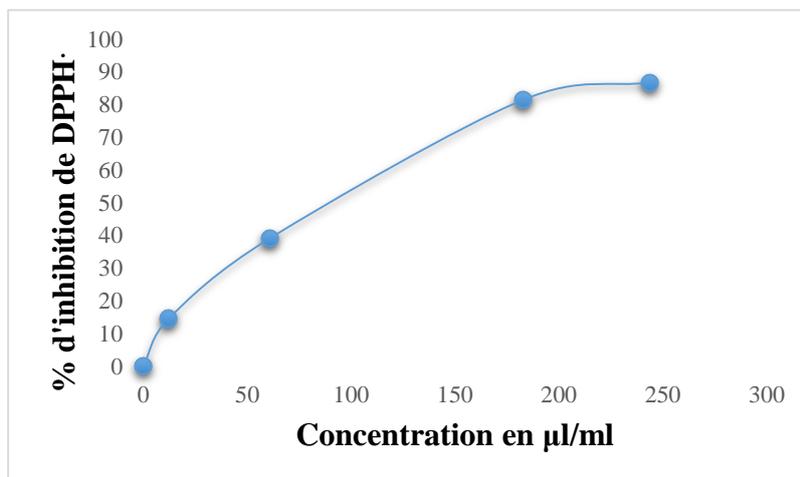
**Figure 18 :** Courbe des pourcentages d'inhibition du radicale DPPH· de l'extrait EM en fonction de la concentration (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD).



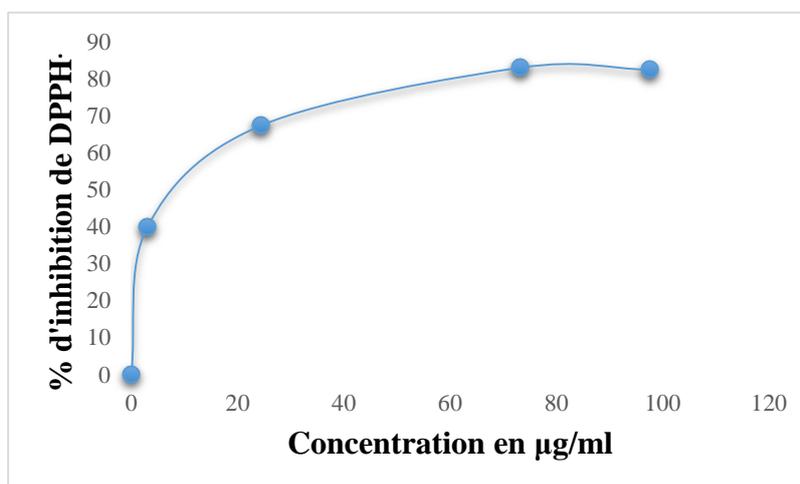
**Figure 19 :** Courbe des pourcentages d'inhibition du radicale DPPH· de l'extrait hexane en fonction de la concentration (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD).



**Figure 20 :** Courbe des pourcentages d'inhibition du radicale DPPH· de l'extrait chloroforme en fonction de la concentration (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD).



**Figure 21 :** Courbe des pourcentages d'inhibition du radical DPPH· de l'extrait aqueux en fonction de la concentration (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD).



**Figure 22 :** Courbe des pourcentages d'inhibition du radical DPPH· de l'extrait acétate d'éthyle en fonction de la concentration (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD).

D'après les courbes ci-dessus, nous avons enregistré que la capacité de l'extrait à piéger le radical DPPH augmente avec l'augmentation des concentrations.

L'extrait méthanolique, hexane et aqueux de *R. alaternus L* ont exhibés une forte activité antiradicalaire à 243,90 µg /ml, avec des pourcentages d'inhibitions de 86,97% ; et 67,71% et 86,83% respectivement, Cependant la phase chloroforme a exhibée une forte activité antiradicalaire à 121,95µg/ml avec un pourcentage d'inhibition de 84,54%, et pour la phase acétate d'éthyle, elle présente sa forte activité antiradicalaire à 97,56 µg /ml avec un pourcentage d'inhibition de 82,44%.

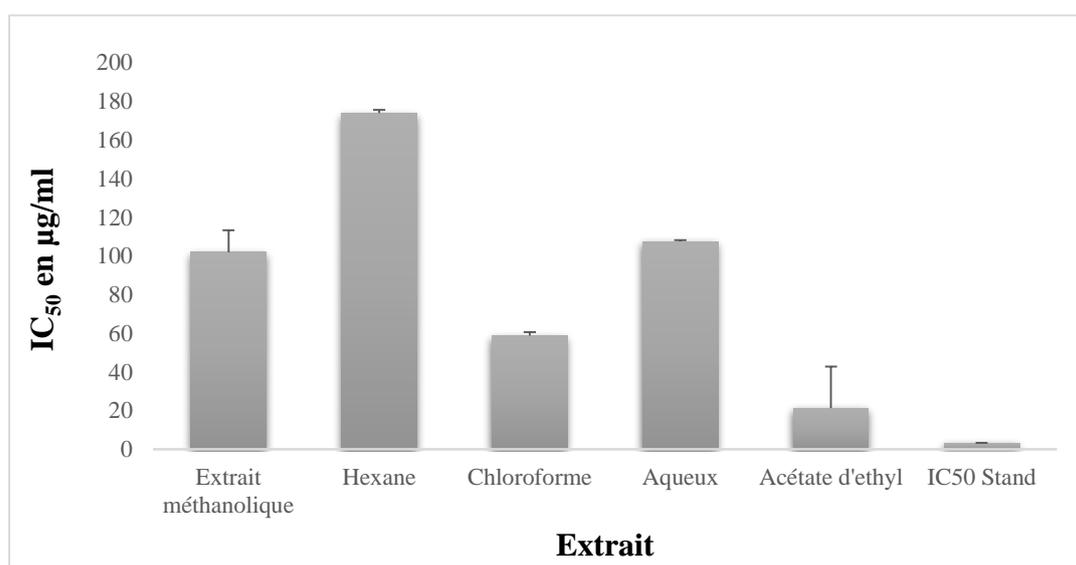
À une concentration 12,19 µg/ml, l'extrait méthanolique présente le plus grand pourcentage d'inhibition 16,27% suivi par le chloroforme avec un pourcentage d'inhibition de 16,10 %,

L'extrait aqueux 14,54 % et en fin l'hexane qui présente le plus petit pourcentage d'inhibition de 8,53%.

La capacité antioxydante des différents extraits a été déterminée à partir de l'IC<sub>50</sub>, ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats (Abdulmajed *et al.*, 2005 ; Ranga *et al.*, 2009 ; Ahmad *et al.*, 2012), il définit la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radicale DPPH· plus la valeur de l'IC<sub>50</sub> est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant (Hebi et Eddouks, 2016).

Nous avons déterminé pour chaque extrait l'IC<sub>50</sub>.

Les valeurs des IC<sub>50</sub> sont représentées dans la figure suivante (Figure : 23) :



**Figure 23 :** Histogramme représentant les IC<sub>50</sub> pour les différentes phases de *R. alaternus L* de l'activité antiradicalaire (test DPPH) (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD).

L'extrait acétate d'éthyle présentent l'activité la plus proche du standard de la quercétine (IC<sub>50</sub> = 3,4 ± 0,01 µg/ml) avec une valeur d'IC<sub>50</sub> de 21,35 ± 21,62 suivi par l'extrait chloroforme qui est moins actifs que la phase précédente avec une valeur d'IC<sub>50</sub> = 58,88 ± 1,70 suivis par les trois extrait méthanolique, aqueux et hexane présente l'activité la plus faible avec une IC<sub>50</sub> = 101,96 ± 11,36 ; IC<sub>50</sub> = 107,53 ± 0,62 et ± 173,99 ± 1,55 µg/ml respectivement.

D'après ces résultats, il semble que tous les extraits de *R. alaternus L* ont une activité antioxydante envers le radicale DPPH·. Cette activité est liée à la présence des composés phénoliques dans ses extraits.

Une étude menée par Ben ammar *et al.* (2008) sur les feuilles de la même espèce de plante de la Tunisie a montré une IC<sub>50</sub> de 19 µg/ml, lorsque l'extraction a été menée par le

méthanol suivie par une extraction dans le butanol saturé en eau. Cette valeur loin à celle trouvée avec nos extraits (Extrait méthanolique et chloroforme).

Dans une autre étude menée par **Boussahel et al., (2013)** sur la même espèce de plante ; une  $IC_{50} = 0,398 \pm 0,007(398 \pm 7)$  et  $0,082 \pm 0,0006$  mg/ml ( $82 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$ ) a été démontrée pour l'extrait méthanolique et aqueux respectivement. Ce résultat est nettement supérieur à celle trouvée avec nos extraits pour l'extrait méthanolique et inférieur pour l'extrait aqueux.

Cette différence entre ces résultats pourrait s'expliquer par la nature des composés phénoliques contenus dans l'extrait qui est influencé par la période de récolte, sachant que nos échantillons ont été récoltés au mois de Mai. Elle pourrait s'expliquer aussi par la différence des conditions climatiques et celles du sol où la plante est cultivée, mais essentiellement par la polarité des solvants utilisés et la quantité des composés phénoliques contenants dans nos extraits.

Il est évident que la forte activité des extraits bruts est attribuée à leur richesse en composés phénoliques (**Sousa et al., 2008 ; Bougandoura et Bendimerad, 2012 ; Boumerfeg et al., 2012 ; Bentabet et al., 2014**) qui possèdent la plus forte teneur en molécules dosées (polyphénols et flavonoïdes).

La polarité des solvants change la capacité de dissoudre un groupe choisi de composé antioxydant ce qui influe l'évaluation de l'activité antioxydante (**Hayouni et al., 2007**).

L'effet scavenger des extraits vis-à-vis du radical DPPH<sup>\*</sup> est exprimé par la concentration Inhibitrice de 50 % ( $IC_{50}$ ) qui correspond à la concentration nécessaire pour inhiber ou réduire 50% de DPPH<sup>\*</sup>. Une valeur faible d' $IC_{50}$  indique une activité antioxydante forte (**Molyneux, 2004**). Pour chaque extrait, la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical libre DPPH est déterminée.

(**Athamena et al., 2010**) démontrent que les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur chimie structurale idéale. Les autres composés phénoliques mineurs ne devraient pas être négligés, parce que la synergie entre les différents produits chimiques devrait être prise en considération dans l'activité biologique.

Diverses études ont déterminé expérimentalement les capacités des extraits naturels à piéger les radicaux libres. Cette activité dépend d'un certain nombre de paramètres : la dose, la structure, les substituant et le degré de polymérisation de la molécule (**Kitagawa et al., 1992**).

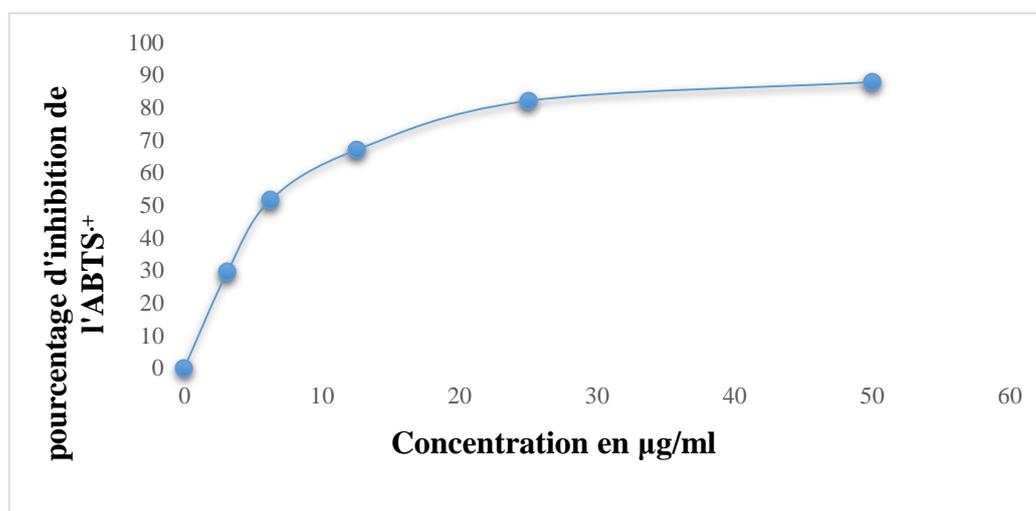
Le potentiel antioxydant des polyphénols est désormais munis d'un grand intérêt dû à son effet chimio protecteur contre les maladies dégénératives telles que les maladies neurologiques et cardiovasculaires ainsi qu'à son effet inhibiteur de la peroxydation lipidique des denrées alimentaires (**Bubonja-Sonje et al., 2011**).

#### IV.3.2. Activité anti-ABTS<sup>•+</sup>

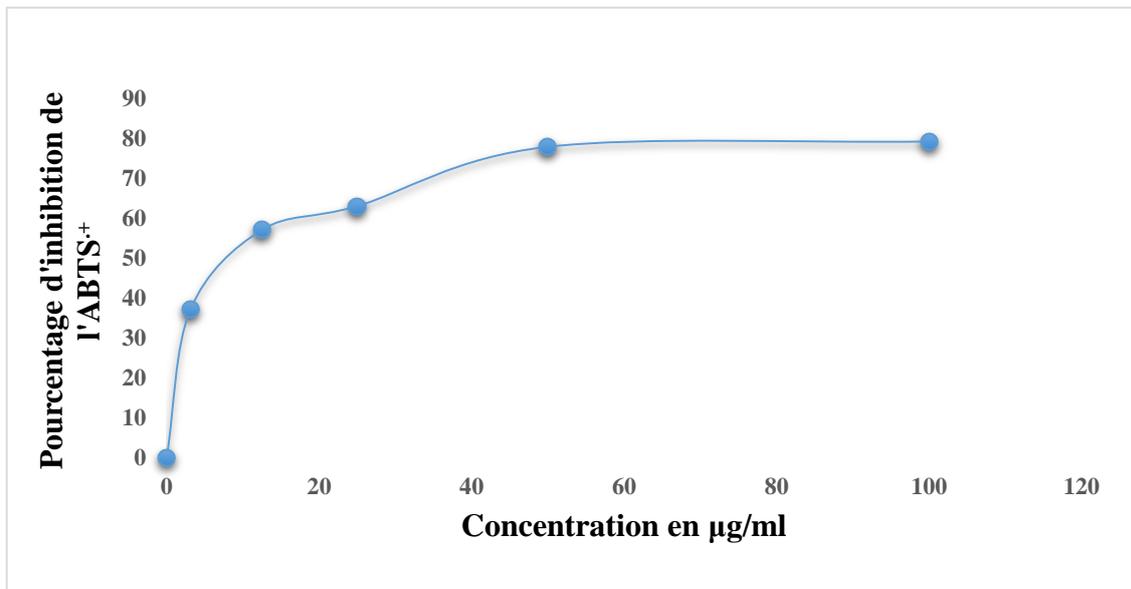
L'ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acide) est un radical libre et stable capable de réagir avec des antioxydants (donneur d'hydrogène ou d'électron), Selon **Re et al. (1999)**, la méthode de piégeage du radical ABTS est une excellente méthode pour déterminer l'activité antioxydante pour une large diversité de substances, comme antioxydants donneurs d'hydrogène ou piègeurs de radicaux en phase aqueuse.

L'activité antiradicalaire est considérée comme étant la capacité des composés testés à diminuer directement la couleur du radical ABTS. Le contacte avec un donneur d'électron du radical ABTS<sup>•+</sup> conduit à l'ABTS<sup>+</sup> et à la décoloration de la solution du bleu foncé en bleu vert (**Lien et al. 1999**).

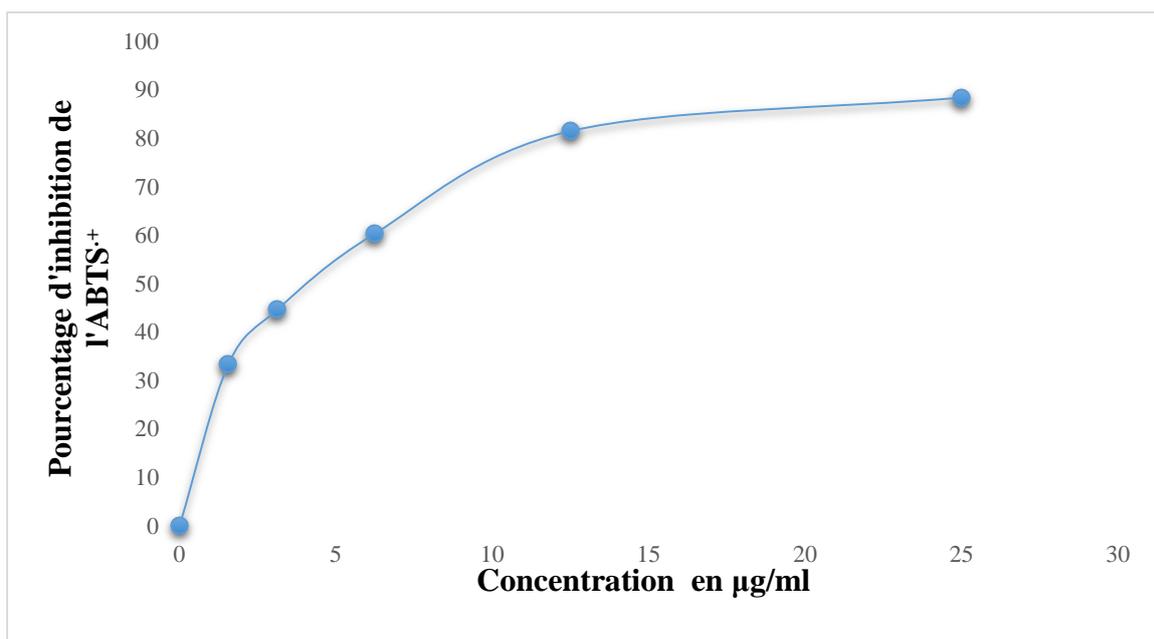
Les pourcentages d'inhibitions du radical cationique ABTS<sup>•+</sup> par les extraits des feuilles de *R. alaternus L* ont été étudiés et exprimés dans les figures suivantes :



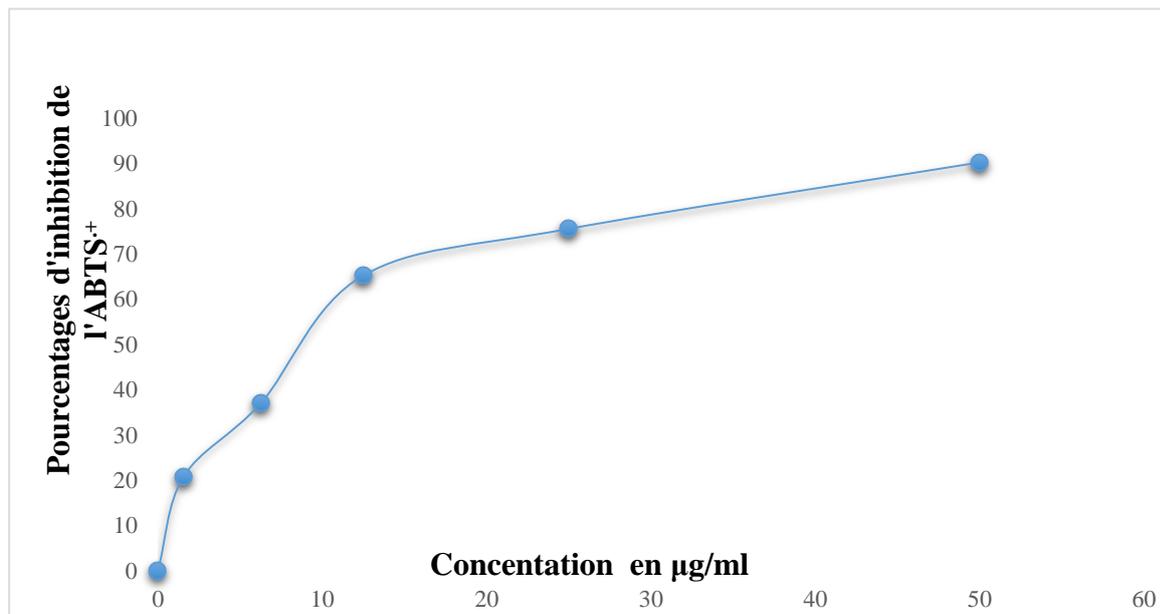
**Figure 24 :** Courbe des pourcentages d'inhibition du radical ABTS<sup>•+</sup> de l'extrait méthanolique de *R. alaternus L* en fonction de la concentration (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD).



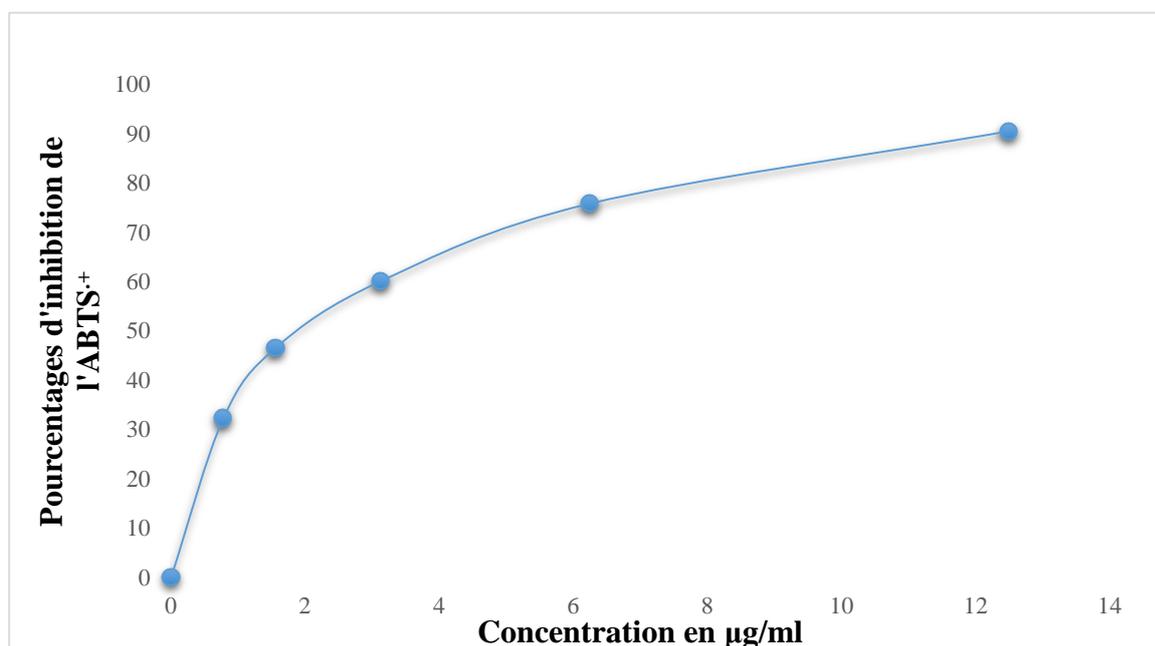
**Figure 25 :** Courbe des pourcentages d'inhibition du radicale ABTS $\cdot^+$  de l'extrait hexane de *R. alaternus L* en fonction de la concentration (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD).



**Figure 26 :** Courbe des pourcentages d'inhibition du radicale ABTS $\cdot^+$  de l'extrait chloroforme de *R. alaternus L* en fonction de la concentration (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD).



**Figure 27 :** Courbe des pourcentages d'inhibition du radicale  $ABTS\cdot^+$  de l'extrait aqueux de *R. alaternus L* en fonction de la concentration (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD).



**Figure 28 :** Courbe des pourcentages d'inhibition du radicale  $ABTS\cdot^+$  de l'extrait acétate d'éthyl de *R. alaternus L* en fonction de la concentration (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD).

D'après les courbe ci-dessus, la capacité de l'extrait à piéger le radical ABTS augmente avec la concentration.

L'extrait acétate d'éthyle de *R. alaternus L* a exhibé une forte activité antiradicalaire à 12,5 µg/ml avec un pourcentage d'inhibition de 90,53%, Cependant la phase chloroforme a exhibée une forte activité antiradicalaire à 25 µg/ml avec un pourcentage d'inhibition de 88,45%, et pour la phase hexane, elle présente sa forte activité antiradicalaire à 100 µg/ml avec un pourcentage d'inhibition de 79,26%, pour les deux phases méthanolique et aqueux de *R. alaternus L* sont exhibées une forte activité antiradicalaire à 50 µg/ml avec des pourcentages d'inhibition de 87,88% et 90,29% respectivement.

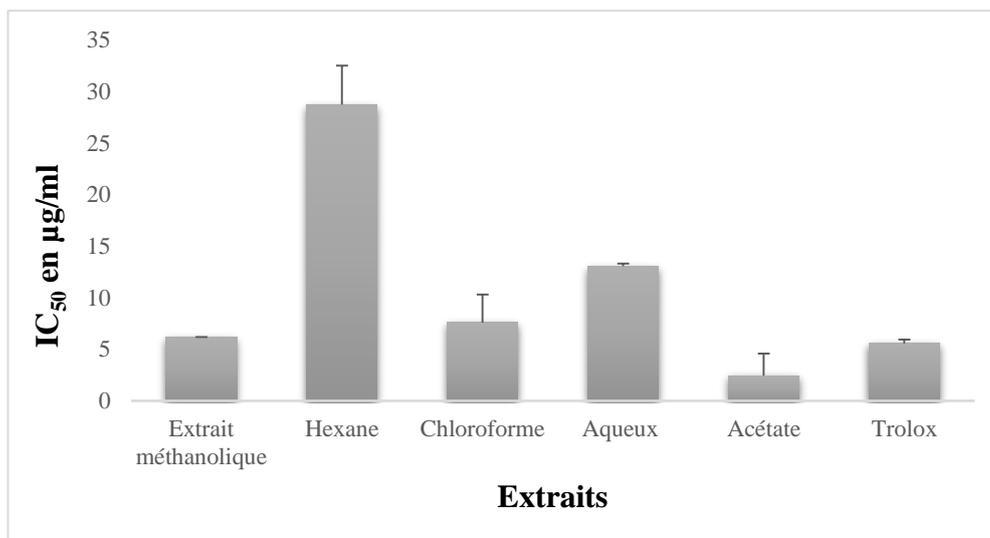
À une concentration de 12,5 µg/ml l'acétate d'éthyle présent le plus grand pourcentage d'inhibition 90,53% suivi par le chloroforme avec un pourcentage d'inhibition de 81,53%, l'extrait méthanolique et aqueux 66,99% et 65, 29% respectivement, en fin l'hexane qui présent le plus petit pourcentage d'inhibition de 57,10%.

Donc l'extrait acétate d'éthyle possède une activité antioxydante puissante contrairement à la phase hexane avec une activité antioxydante faible, la différence dans l'activité des extraits de la même espèce peut être due à la différence de teneur en composés phénoliques, au profil chimique de ces substances bioactives (**Ferradji, 2011**).

- **Détermination d'IC<sub>50</sub>**

L'efficacité antiradicalaire exercée par les extraits de *R. alaternus L* est exprimée en IC<sub>50</sub> (concentration inhibitrice à 50%). Concentration d'extrait capable de neutraliser (réduit) 50% du radical libre (ABTS<sup>+</sup>). Plus l'IC<sub>50</sub> est faible plus l'antioxydant est puissant. En utilisant ce paramètre pour une meilleure comparaison entre les fractions utilisées ainsi que le standard utilisé (Trolox 5,57±0,17 µg/ml).

Les IC<sub>50</sub> sont présentées dans l'histogramme suivant :



**Figures 29 :** Histogramme représentant les IC<sub>50</sub> pour les différentes phases de *R. alaternus L* (test d'ABTS) (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD).

L'extrait acétate d'éthyle qui a révélé une IC<sub>50</sub> la plus faible 2,46 ± 0,36 µg/ml inférieure à celle du Trolox ceci pourrait justifier que ce dernier est le plus active suivi par l'extrait méthanolique 6,18 ± 3,79 µg/ml (supérieure à celle du Trolox). Puis l'extrait du chloroforme avec une IC<sub>50</sub> de 7,60 ± 0,24 µg/ml.

L'extrait aqueux avec une IC<sub>50</sub> de 13,09 ± 4,07 µg/ml (supérieure au Trolox),

La capacité antioxydante de l'ABTS la plus faible est noté chez les extraits hexane avec une IC<sub>50</sub> de 28,73 ± 2,73 µg/ml inférieure à celle de Trolox la différence dans l'activité des extraits de la même espèce peut être due à la différence de teneur en composés phénolique, au profil chimique de ces substances bioactives (**Ferradji, 2011**).

Mais il faut prendre en considération que les composés phénoliques répondant différemment ; selon le nombre et la qualité des groupes (**Amamri et Cheikh, 2016**).

Dans la présente étude l'extrait Acétate d'éthyl et l'extrait méthanolique manifestent par la plus importante teneur en polyphénols totaux ainsi qu'au flavonoïdes, avec une activité antioxydante élevée. Il convient de dire que la qualité de ces molécules serait beaucoup plus intéressante puisqu'elle détermine l'ampleur de leurs propriétés biologiques (**Bettaieb et al., 2016**).

D'après les résultats obtenus pour les deux radicale ABTS et DPPH la phase acétate d'éthyle exhibe l'activité antioxydante la plus puissante avec des valeurs d'IC<sub>50</sub>=2,46±0,38 µg/ml et IC<sub>50</sub>=21,35±21,45 µg/ml respectivement contrairement à la phase hexane qui exhibe l'activité antioxydante la plus faible avec des valeurs d'IC<sub>50</sub>=28,73±2,73 µg/ml et IC<sub>50</sub>=173,99±11,35 µg/ml respectivement.

*Conclusion et perspectives*

## Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et composés naturels bioactifs en utilisant leurs extraits en thérapeutique traditionnelle. L'objectif de ce travail consiste à la caractérisation phytochimique des feuilles de *Rhamnus alaternus L* et la détermination de l'activité antioxydante.

Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique (qualitatives) ainsi qu'au dosage des polyphénols et des flavonoïdes, le pouvoir antioxydant de différents extraits de *Rhamnus alaternus L* à testés.

Le fractionnement de l'extrait hydrométhanolique par des solvants à polarité croissante nous a permis d'obtenir Cinq sous fractions ; fraction méthanolique (EM), fraction d'hexane (H), fraction chloroformique (Chl), fraction d'acétate éthyle (AC) et la fraction aqueuse (Aq). Le dosage des composés phénoliques des extraits de *R. alaternus L* a montré que l'extrait AC est le plus riche en polyphénols et en flavonoïdes (471,95 mg EAG/g d'extrait, 380,95 mg EQ/g d'extrait) respectivement.

L'activité antiradicalaire de nos extraits a été encore démontrée par leurs effets scavenger sur le radical DPPH et le radical ABTS. L'extrait AC est le plus actif des extraits de *R. alaternus L* avec une valeur d'IC<sub>50</sub> de 21,36 mg/ml au test de DPPH et d'IC<sub>50</sub> de 2,46 mg/ml au test d'ABTS.

Cette étude confirme scientifiquement l'usage traditionnel de la plante *R. alaternus L* et révèle son intérêt dans le domaine de biopharmacologie.

- Il est intéressant, pour la suite, d'identifier les principes actifs responsables des activités biologiques, avec détermination des conditions optimales pour l'extraction de ces principes actifs.
- Il est souhaitable d'évaluer *in vitro* et *in vivo* l'activité antioxydante et autres activités biologiques à savoir : anti-inflammatoires, antimicrobiennes, anti-enzymatiques, antivirales, anti-cancéreuses, antidiabétiques, ...etc.
- En pharmacologie, cela permet la synthèse de nouveaux médicaments à base des plantes médicinales avec moins d'effets secondaires indésirables. Pour cette raison, il serait intéressant d'étudier la toxicité des extraits et des composés séparés et caractérisés.

# *Références bibliographiques*

## *References bibliographiques*

### A

- **Abdulmajed K., McGuigan C. & Heard C. M., (2005):** Topical delivery of retinyl ascorbate: 4. Comparative anti-oxidant activity towards DPPH. *Free Radic. Res* 39, 491-498.
- **Affek, H. P. et Yakir, D. (2002).** Protection by Isoprene against Singlet Oxygen in Leaves. *Plant Physiology*, 129 : 269-277.
- **Afonso, V., Champy, R., Mestrovic, D., Collin, P. and Lomri, A. (2007).** Reactive oxygen, species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Revue du rhumatisme*, 74 : 636-643.
- **Ahmad N., Fazal H., Abbasi B. H., Anwar S. & Basir A., (2012):** DPPH free radical scavenging activity and phenotypic difference in hepatoprotective plant (*Silybum marianum L.*). *Toxicol. Ind. Health*.
- **Ait Youssef M. (2006) :** les plantes médicinales de Kabylie ; *Edition Ibis press* PP :278-279.
- **Amamri, K., Cheikh, M. (2016).** Etudes phytochimiques et biologiques du Fenouil sauvage, diplôme de master. P 57.
- **Ames, B. N., Shigenaga, M. K. (1996).** DNA damage by endogenous oxidants and mitogenesis as causes of aging and cancer. In *Molecular Biology of Free Radical Scavengers System* (JG Scandalios, Ed), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY. 1-22.
- **Athamena S. Chalghem1 I. Kassah-Laouar A. Laroui S. Khebri S. (2010).** Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum L.* *Lebanese Science Journal*, Vol. 11, No. 1. pp. 69-81.

### B

- **Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, J.C. and Pinkas, M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arznei.Forschung*, 46: 1086-1089.
- **Barouki, R. (2006).** Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/ Sciences*, 22 : 266-272.

- **Bas, J-M., Oliveras, J. and Gomez, C. (2009):** Myrmecochory and short-term seed fate in *Rhamnus alaternus*: Ant species and seed characteristics. *Acta Oecologica*, 35: 380-384.
- **Bayer, E., Buttler, K.F., Finkensteller, X., Grau, J. (1990).** Flore méditerranéenne. Paris : delachaux et niestlé. 287p.
- **Beaudeau, J-L., Delattre, J., Therond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Legrand A., Peynet, J. (2006).** Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose Oxidativestress in the atherosclerotic process. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 21 : 144 -150.
- **Belaïch, r. and Boujraf, s. (2016).** Facteurs inflammatoires et stress oxydant chez les hémodialysés : effets et stratégies thérapeutiques. *Médecine des Maladies Métaboliques*, 10(1), pp.38-42.
- **Ben Ammar R., Ben Sghaier M., Boubaker J., bhoury W., Naffeti A., Skandrani I., Bouhlel I., Kilani S., Ghedira K. et Chekir-Ghedira L. (2008):** Antioxidant activity and inhibition of aflatoxin B1-, nifuroxazide-, and sodium azide-induced mutagenicity by extracts from *Rhamnus alaternus* L. *Chemico-Biological Interactions*, 174:1-10
- **Ben Ammar R., Kilani S., Bouhlel I., Ezzi L., Skandrani I., Boubaker J., Ben Sghaier M., Naffeti A., Mahmoud A., Chekir-Ghedira L. and Ghedira K. (2008):** Antiproliferative, Antioxidant, and Antimutagenic Activities of Flavonoid-Enriched Extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L.: Combination with the Phytochemical Composition. *Drug. Chem. Toxicol*, 31: 61-80.
- **Ben Ammar R., Kilani S., Bouhlel I., Skandrani I., Naffeti A., Boubaker J., Ben Sghaier M., Bhoury W., Mahmoud A., Chekir-Ghedira L. and Ghedira K (2007).** Antibacterial and cytotoxic activities of extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* (*Rhamnaceae*). *Ann. Microbiol*; 57: 453-460.
- **Ben ammar, R., Ben Sghaier, M., Bhoury, W., Boubaker, J., Bouhel I., Chekir-Ghedira, L., Dijoux –Franca, M.G, Ghedira, K., Kilani, S., Mariotte, A.M., Neffati, A., Skandrani, I. (2009).** Antioxidant and free radical-scavenging properties three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (*Rhamnaceae*): A structure-activity relationship study. *Food Chemistry*, 116: 258-264.
- **Ben ammar, R., Ben Sghaier, M., Bouhel, I., Chekir-Ghedira, L., Dijoux –Franca, M.G, Ghedira, K., Kilani, S., Laporte, F., Mariotte, A.M., Valenti, K. (2007).** Transcriptional response of genes involved in cell defense system in human cells stressed

- by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and pretreated with (Tunisian) *Rhamnus alaternus* extract: Combination with polphenolic compound and classic in vitro assays. *Cheemico\_biological Interaction*, 168: 17-183.
- **Ben ammar, R., Kilani, S., Abdelwahed, A., Hayder, N., Mahmoud, A., Chibani, J., Chekir-Guedira, L., Ghedira, K. (2005).** *In vitro* mutagenicity, antimutagenicity and free radical scavenging activities of *Rhamnus alaternus* L. (*Rhamnaceae*) Extracts. Pakistan. *Journal of biological sciences*, 8(3): 439-445.
  - **Benbrook, C.M. (2005).** Elevating antioxidant levels in food through organic farming and food processing. Ed. Organic Center. 81 p.
  - **BettaiebRebey, L., Sriti, J., Besbes, B., Makhaddmini Hammi, I., Hamrouni, A., Sllami, B., Marzouk, B. and Ksouri, R. (2016).** Effet de la prévenance et du solvant d'extraction sur la teneur en composés phénolique et les potentialités antioxydantes des grains de fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill), *Journal of New Sciences*. 27(4) :1478-1487.
  - **Bhourri W., Ben Sghaier M., Kilani S., Bouhleb I., Dijoux-Franca M-G., Ghedira K. & Chekir Ghedira L. (2011).** Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (*Rhamnaceae*): Kaempferol 3-O-β-isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O-β isorhamninoside. *Journal of Food and Chemical Toxicology* 49, 1167–1173.
  - **Bidie, A.P., N'guessan, B.B., Yapo, A.F., N'guessan, J.D., Djaman, A.J. (2011).** Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences & Nature*, 8 (1): 1-11.
  - **Bonnefont-Rousselot, D., Peynet, J., Beaudeau, J-L., Thérond, P., Legrand, A., Delattre, J. (2002).** Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose Oxidative stress, vascular function and atherosclerosis. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16 : 260–267.
  - **Bouhel, I., Chekir-Ghedira, L., Dijoux –Franca, M.G, Ghedira, K., Kilani, S., Laporte, F., Mariotte, A.M., Valenti, K. (2007).** Transcriptional repose of genes involved in cell defense system in human cells stressed by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and pretreated with (Tunisian) *Rhamnus alaternus* extract: Combination with polphenolic compound and classic in vitro assays. *Cheemico-biological Interaction*, 168: 17-183.

- **Boumerfeg, S., Baghiani, A., Messaoudi, D., Khennouf, S. and Arrar, L. (2012)** Antioxidant Properties and Xanthine Oxidase Inhibitory Effects of *Tamus communis* L. Root Extracts *Phytotherapy Research* 23, 283 - 288.
- **Boussahel S, Dahamna S, Giuseppe R, Siracusa L, Harzallah D., (2013):** Phytochemical Study and Antioxidant Activities of Leaves Extracts from *Rhamnus alaternus* L. *Pharmacognosy Communications* 3(1),46-53.
- **Bouzin, B., Dukic, N.M., Samojlic, I. Goran, A. and Igc, R.(2008).** Phenolic as antioxidant in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food chemistry*, 111:925-929.
- **Brand-Williams., W., Cuvelier.M. Berset, C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft-und-Technologie*, 28: 25-30.
- **Bubonja-Sonje M, Giacometti J, Abram M. (2011).** Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*, 127 : 1821–1827.

## D

- **Diallo A. (2005).** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* WILLD. (MYRTACEAE). Thèse de Doctorat en Pharmacie. Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de Bamako, Mali.

## E

- **Edeas M. (2005).** Citroflavonoides. *Phytothérapie*. 5 :210-211.
- **El Aou-Ouad, H., Florez-Sarasa, I., Ribas-Carbo, M., Flexxas, J., Medrano, H., Gulias, J. (2015).** Trade-offs between seedling growth, plant respiration and water-use efficiency in two Mediterranean shrubs *Rhamnus alaternus* and *Rhamnus ludovicisalvatoris*. *Photosynthèse*, 53(4): 537-546.

## F

- **Favier A. (2003).** Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Actualité chimique* 11, 108-115.
- **Favier, A. (2006).** Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann Pharm Fr*, 64 : 390-396.

- **FERRADJI Ayoub., SENATOR Abderrahmane. (2011) :** Activités antioxydante et anti-inflammatoire des extraits alcooliques et aqueux des feuilles et des baies Pistacia lentiscus.

§

- **Galvez C J, Martin-Cordero P, Houghton A M. (2005)** Antioxidant Activity of methanol extracts obtained from Plantago species. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1927-1933.
- **Giasson, B. I., Duda, J. E., Murry, I. V. J. (2000).** Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science.* 290: 985–989.
- **Granger, D. N. (1988).** Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia reperfusion injury. *Am.J. Physiol.* 255 : 1269–1275.
- **Granger, D.N., Rutili, G., Mc Cord, J. M. (1981).** Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology.* 81: 22–29.
- **Guinebert, E., Durand, P., Prost, M., Grinand, R. and Bernigault, R. (2005).** Mesure de la résistance aux radicaux libres. *Sixièmes Journées de la Recherche Avicole,* 554-558.
- **Gulias : Gulias, J., Traveset, A., Riera, N. et Mus, M. (2004).** Critical Stages in the Recruitment Process of *Rhamnus alaternus L.* *Annals of Botany,* 93: 723-731.

¶

- **HARRAR Abd El Nacer ; Dr. Belhattab Rachid (2011-2012) :** Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus L.* : 30-31.
- **Hayouni, E. A, Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, M., (2007).** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera L.* and *Juniperus phoenicea L.* fruit extracts. *Food Chem.* (In press).
- **Hebi, M., & Eddouks, M. (2016).** Evaluation de l'activité antioxydante de *Stevia rebaudiana*. *Phytothérapie,* 14, 17 – 22.
- **Hossain, M.A., AL-Mijizy, Z.H., Al- Rashdi, K.K., Weli, A.M., Al-Riyami, Q., (2013).** Effect of temperature and extraction process on antioxidant activity of various leaves crude extracts of *Thymus vulgaris*. *J. Coastal Life Med.* 1 (2), 118–122.

## I

- **Izhaki, I., Tsahar, E., Paluy, I., Friedman, J. (2002).** Within population variation and interrelationships between morphology, nutritional content, and secondary compounds of *Rhamnus alaternus* fruits. *New Phytologist*, 156: 217-223.

## J

- **Jenner et Olanow, 1996 ; Mc Cord, J. M. (1974).** Free radicals and inflammation protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science*. 185: 529–531.
- **Jenner, P., Olanow, C. W. (1996).** Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology*. 47 : 161–170.
- **Jovanovich, S.V.; Steenken, S.; Tosic, M.; Marjanovic, B.; Simic, M.G (1994).** Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 4846-4851.

## K

- **Kelly, E.H., Anthony, R.T., Dennis, J.B., (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-580.
- **Knoepfel, L., Steinkühler, C., Carri, M. T., Rotilio, G. (1994).** Role of zinc coordination and of the glutathion redox susceptibility of human transcription factor Sp1. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 201 : 971–87.
- **Kumar AS, Mazumder A, Vanitha J, Venkateshwaran K, Kamalakannan K, Sivakumar T. (2008).** Evaluation of antioxidant Activity, phenol and flavonoid contents of some selected Indian medicinal plants. *Pharmacognosy Magazine*.4:0973-1296.

## L

- **Lacan, B.D. (2001).** Oxydants/antioxydants : un équilibre important. Pp : 1-5.
- **Laguerre Met, J. Lecomte, P. Villeneuve (2007).** Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges 46 :244–282.

- **Lahouel M., Amedah S., Zellagui A., Touil A., Rhouati S., Benayache F., Leghouchi E., & Bousseboua, H. (2006).** The interaction of new plant flavonoids with rat liver mitochondria: relation between the anti and prooxydant effect and flavonoids concentration. *Journal of Thérapie* 61(4), 347-355.
- **Lesgards, J. F., Prost, M., Lehucher-Michel, M. P. (2002).** Le stress oxydatif et ses implications Myalgies international supplément scientifique (Marseille, France). Vol 2 (3) : 1631–1641.
- **Leverve, X. (2009).** Stress oxydant et antioxydants ? Cahiers de Nutrition et de Diététique, 44(5), pp.219-224.
- **Lien, E.J., Bui, H.H., Wang, R. (1999).** Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidant. *Free Radical Biology and Medecine*, 26: 285-294.
- **Ljubuncic P., Azaizeh H., Portnaya I., Coganc U., Said O., Saleh K.A., BomzonA. (2005):** Antioxidant activity and cytotoxicity of eight plants used in traditional Arabmedicine in Israel, *Journal of Ethnopharmacology* 99 :43–47.

### M

- **Madsen H.L. & G. Bertelse., (1995).** Spices as antioxidants. *Trends in Food Sci. Technol.*, 6, 271-277.
- **Mahmoudi S, Khali M, et Mahmoudi N. (2013)** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technologie B- Sciences Agronomiques et Biologiques*. 9 : 35-40.
- **Majhenic L., kerges M.S., Knez Z. (2007).** Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 104, 1258–1268.
- **Marc F., Davin A., Deglène-Benbrahim L., Ferrand C., Baccaunaud M. & Fritsch P. (2004).** Méthodes d'évaluation du potentiel antioxidant dans les aliments. *Journal of Medecines Sciences* 20, 458-464.
- **Marzouk, M.S., El-Toumy, S.A., Merfort I. and Nawwar, M.A. (1999).** Polyphenolic metabolites of *Rhamnus disperma*. *Phytochem*, 52: 943-946.
- **Mashhadian, N.V. et Rakhshandeh, Ch. (2005).** Antibacterial and antifungal effects of *Rhamnus alaternus* extracts against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*. *Pak J Med Sci*, 21: 47-52.

- **Mc Cord, 1974** **Mc Cord, J. M. (1974)**. Free radicals and inflammation protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science*. 185: 529–531.
- **Mighri H., Hajlaoui H., Akrouf A., Najjaa H., Neffati M. (2010)**: Antimicrobial and
- **Miralles, j., Martínez-Sánchez, J.J., Franco, J.A., Bnón, S. (2011)**. *Rhamnus alaternus* growth under four simulated shade environments: Morphological, anatomical and physiological responses. *Scientia Horticulturae*, 127 : 562-570.
- **Molyneux. P (2004)**. The use of the stable free radical diphenyl picryldrazyl (DPPH.) for estimating antioxidant activity Song klanakaran. *Journal of Sciences*.

N

- **Naczak, M. et Shahidi, F. (2004)**. Extraction and analysis of phenolic in food. *Journal of chromatography*, 1054: 9-111.
- **Nkhili E (2009)** Polyphénols de l'alimentation : extraction, interactions avec les ions du fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant. *Thèse de doctorat*. Université Cadi Ayyad – Marrakech.
- **Novelli G P. (1997)**. Role of free radicals in septic shock. *J. Physiol. Pharmacol.* 48: 517-527.

O

- OMS. Fact sheet on traditional medicine. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/> (2008).

P

- **Paolisso et al., 1993 ; Steinberg, D. (1993)**. Modified forms of low-density lipoprotein and atherosclerosis. *J. Intern. Med.* 233 : 227–232.
- **Paolisso, G., D'amore, A., Giugliano, D., Ceriello, A., Varrichio, M., D'onofrio, F. (1993)**. Pharmacologic doses of vitamin E improve insulin action in healthy subjects and non-insulindependent diabetic patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 57: 650–656.
- **Pastre J. & Priymenko N. (2007)**. Intérêt des antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Journal of Revue Médecine Vétérinaire* 1, 180–189.
- **Pastre JOC. (2005)**. Intérêt de la supplémentation en antioxydant dans l'alimentation des carnivores domestique. Université Paul-Sabatier de Toulouse. Thèse de doctorat.

- **Percival, S.L. (2004).** *Microbiology of waterborne diseases.* Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press. 480 p.
- **Picardo, M., Marchese, C., De Luca, C., Fuggioni, A., Schmdt, R. J., Santucci, B. (1992).** Paraphenylenediamine, a contact allergen, induces oxidative stress and ICAM-1 expression in human keratinocytes. *Br. J. Dermatol.* 126: 450–455.
- **Pincemail J., K. Bonjean., K. Cayeux & J.O. Defraigne., (2002).** Physiological action of antioxidant defences.
- **Pincemail, J., Lecomte, J., Collart, E., Castiaux, J. P., Defraigne, J. O. (2003).** Stress oxydant, antioxydants et exercice physique. *MEDECINE INTERNE.* 6 (5) : 1-3.
- **Piquet M.A. & Hébuterne X. (2007).** Nutrition en pathologie digestive. Ed. Doi.
- **Pourrut B. (2008).** Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat à l'Institut National Polytechnique de l'Université de Toulouse spécialité : Ecotoxicologie. France.
- **Powers S, Jackson M. (2008).** "Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production." *Physiol Rev.* 88 : 1243-1276.

### R

- **RAMEAU Jean-Claude, MANSION Dominique, DUMÉ Gérard, GAUBERVILLE Christian (2008).** Région méditerranéenne : Flore forestière française. (Coll. guide écologique illustré), Vol. 3.
- **Rameau, J.C., Mansion, D., Dume, G., Gauberville, C., Bardat, J., Bruno, E., Kelle, R. (2008).** *Flore forestiere francaise guide écologique illustré 3 régions méditerranéenne.* Ministre de l'agriculture et de la pêche Paris (France). 2426p.
- **Ranga et al., (2009):** New furanoflavonoids, intestinal alpha-glucosidase inhibitory and free-radical (DPPH) scavenging, activity from antihyperglycemic root extract of *Derris indica* (Lam.). *Bioorg. Med. Chem* 17, 5170-5175.
- **Ré, D.B., Nafia, I., Nieoullon, A., Kerkerian le Goff, L. et Hade-Aissouni, L. (2005).** Cerebral oxidative stress: are astrocytes vulnerable to low intracellular glutamate concentrations? Conséquences for neuronal viability. *Annales Francaise d'Anesthésie et Réanimation*, 24 : 502-509.
- **Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999).** Antioxydant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *FreeRadic Biol Med*, 26: 1231- 1237.

- **Ribereau-Gayon J, Peynaud m, Ribéreau-Gayon P and Sudraud P (1972).** Sciences et techniques du vin. Tome 1, analyse et contrôle des vins. Ed. Dunod, Paris, p. 671.
- **Ribéreau-Gayon P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Edition, Paris, pp 254.
- **Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Sudraud, P et Ribéreau Gayon, p. (1982).** Composés phénoliques, In Traite d'oenologie, sciences et technique du vin. Paris : Dunod.477-499.
- **Rochette, I. (2008).** Stress oxydant et sepsis. *Reanimation*, 17(6), pp.1-4.

## S

- **Schmidt, R. J., Khan, L., Chung, L. Y. (1990).** Are free radicals and not quinine the haptenic species derived from urushiols and other contact allergenic mono and dihydric alkylbenzenes? The significance of NADH, glutathione and redox cycling in the skin. *Arch. Dermatol. Res.* 282:56–64.
- **Singleton V. L., Orthoses R. and Lamuela-Raventos R. M (1999).** Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods Enzymol.*; 152-177.
- **Sofowera A., (2010) :** Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Karthala, Economie et Développement. Paris :384.
- **Sohal, R.S., Mockett, R.J. and Orr, W. C. (2002).** Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical Biol. Med*, 33: 575-586.
- **Sousa R., Rufino M., Gaspar M., Antunes C. & Guilhermino L. (2008).** Abiotic impacts on spatial and temporal distribution of *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in the River Minho Estuary, Portugal. *Aquat Conserv.*, 18, 98 – 110.
- **Steinberg, D. (1993).** Modified forms of low-density lipoprotein and atherosclerosis. *J. Intern. Med.* 233 : 227–232.
- **Stocker, P., Yousfi, M., Djerridane, O., Perrier, J., Amziani, R., El Boustani, S. et Moulin, A. (2004).** Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxyl esterase. *Biochimie*, 86: 919-925.

## T

- **Talbott et al., (1995) ;** *Technologies*.26 (2) :211-219.

- **Tsahar, (2001).** *The impact of the secondary metabolite emodin in Rhamnus alaternus. Fruits on Removal and Seed Fruit Predation.* MSc thesis: Tel Aviv University, Israel. *Tunisianaridzone. Clinical Review of Chimie* 13 :380-386.
- **Tyihák E., Móricz ÁM., G. Ott P. (2007),** Biodetection and Determination of Biological Activity of Natural Compounds in Thin Layer Chromatography in Photochemistry. CRC Press.

V

- **Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M. & Mazur M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Journal of Chemico-Biological Interactions* 160, 1–40.
- **Vamecq, J., Vallée, L., Storme, L., Gelé, P., Bordet, R. (2004).** Les acteurs immédiats du stress oxydatif : Key players in oxidative stress. *Pharmacologie*, 18(1): 16-23.

Y

- **Y. Kitagawa, Quarte. (1992):** rly Progress Report, Institute of Laser Engineering, Osaka University, Report No. ILE-QPR-91-39, (to be published).
- **Yap, CF., CW., Aida, WM., Chan, SW., Lee, CY. and Leong, YS. (2009).** Optimazation of extraction condition of total phenolic compounds from star fruit (*Averrhoacarambola L*) residues. *Sains malaysiana*, 38(4) :511-520.
- **Yen, G.C., Chen, H.Y. (1995).** Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 27-32. 584.
- **Yi-ling, C. et Pan-Kai, C. (1982).** *Rhamnaceae.* In: Chen Yi-ling, ed., *Fl. Reipubl. PopularisSin*, 48(1) : 1-169.

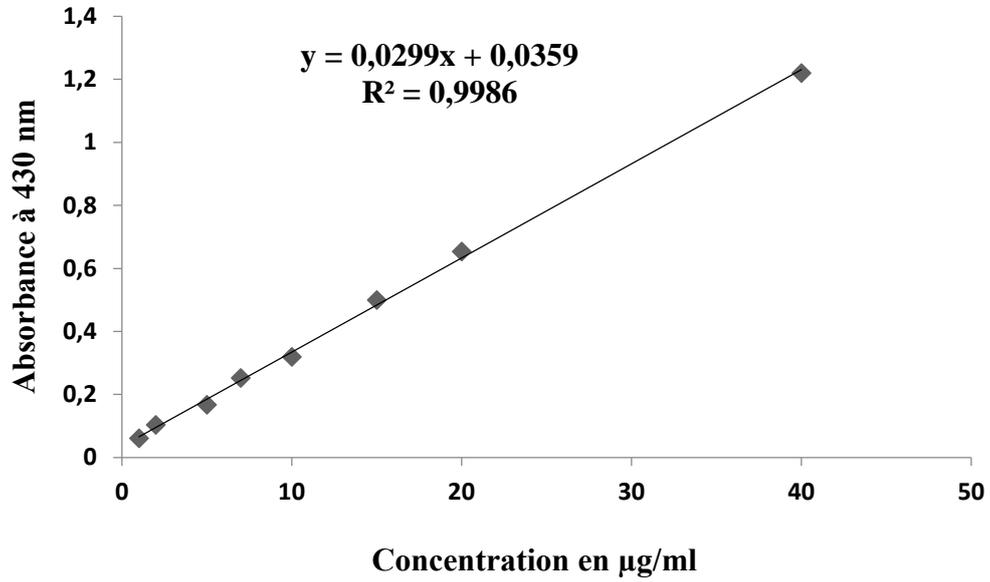
Z

- **Zafrilla, P., Mulero, J., Xandri, J. M., Santo, E., Caravaca, G., Morillas, J. M. (2007).** Stress Oxydatif Dans Différents Stades De La Maladie D'Alzheimer. *Maladie D'Alzheimer Et Déclin Cognitif* : 12 (14) : 131-137.

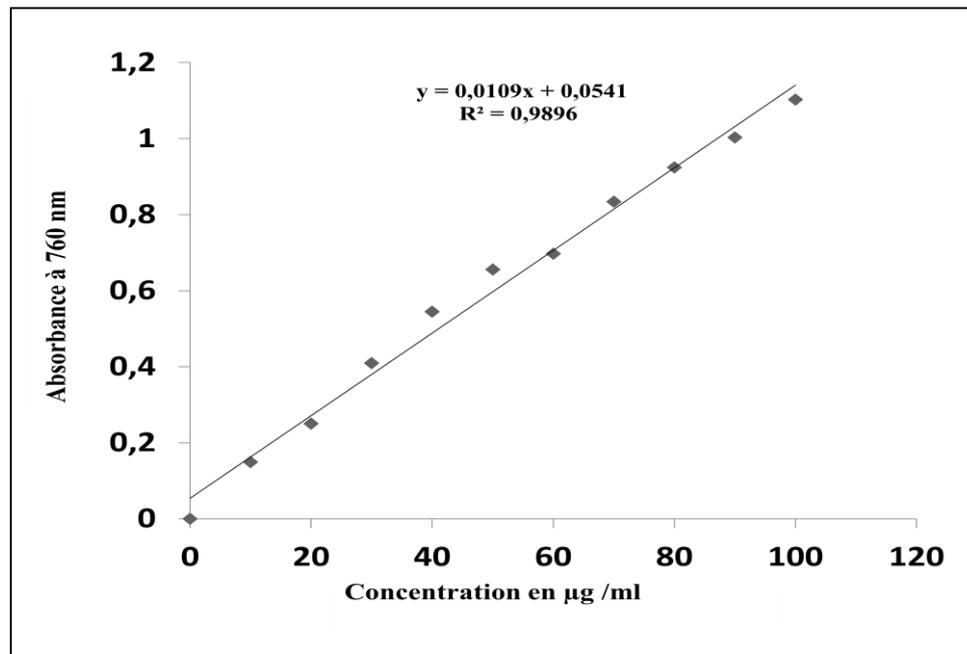
# *Annexes*

## Annexes

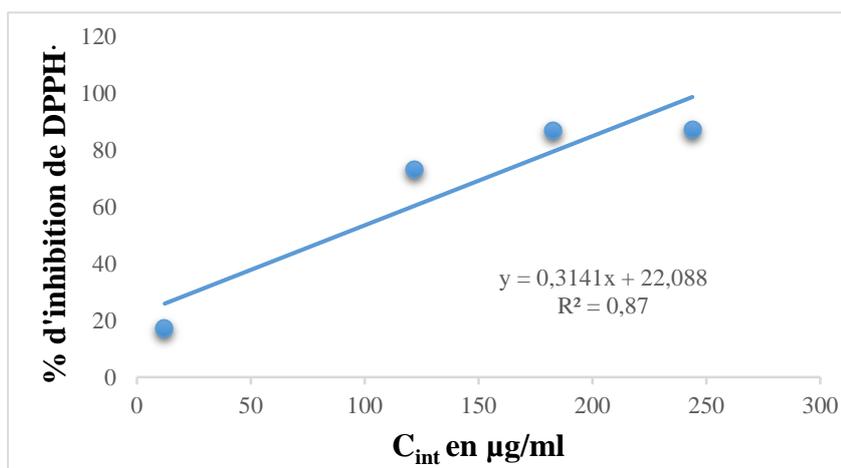
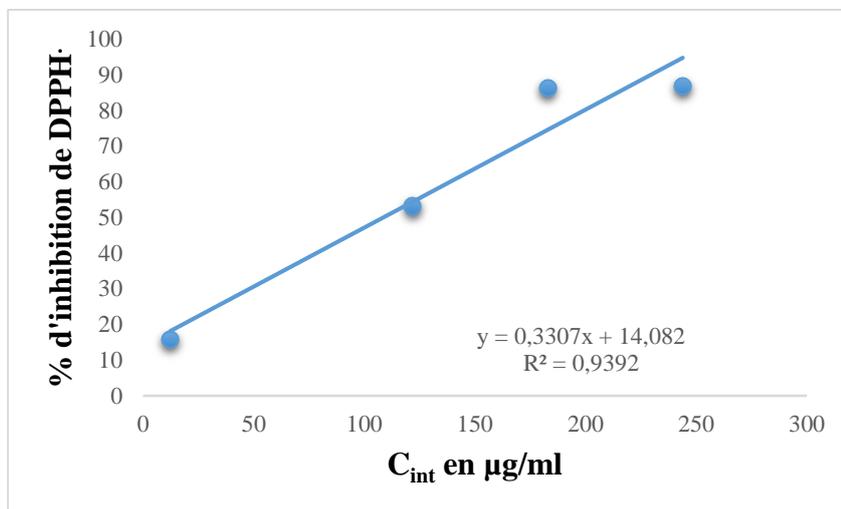
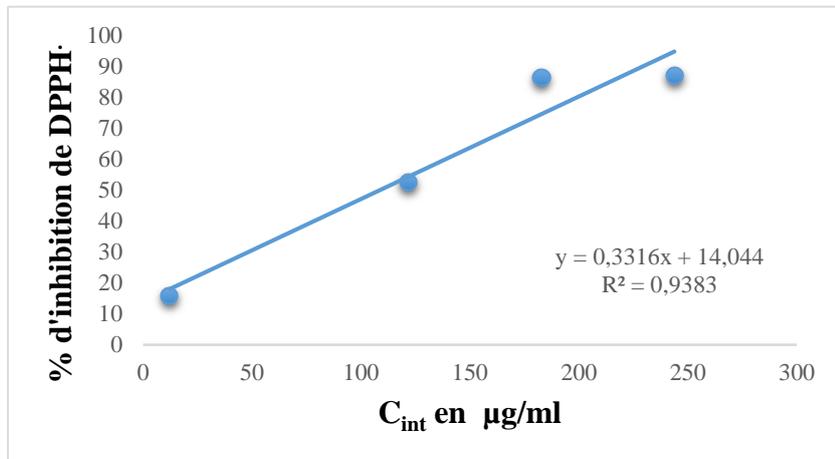
Annexe 1 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.



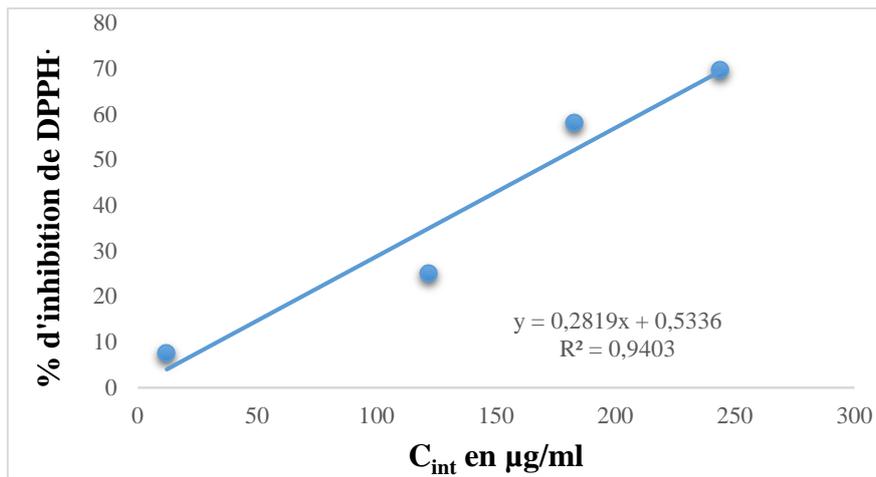
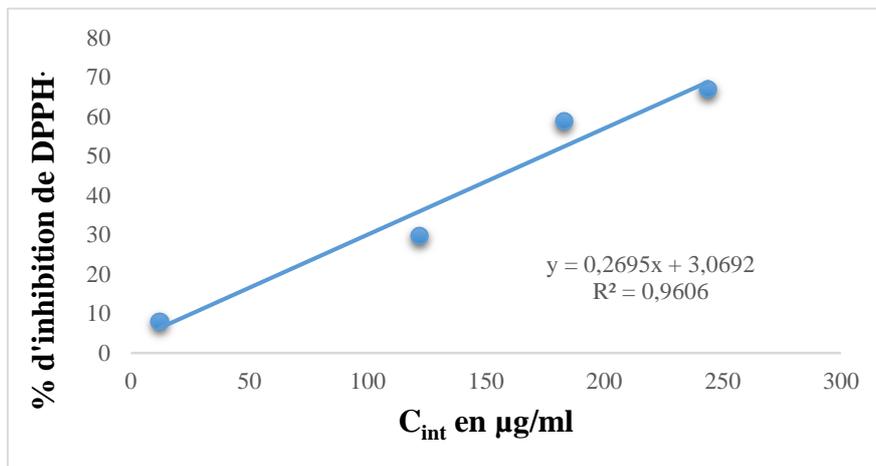
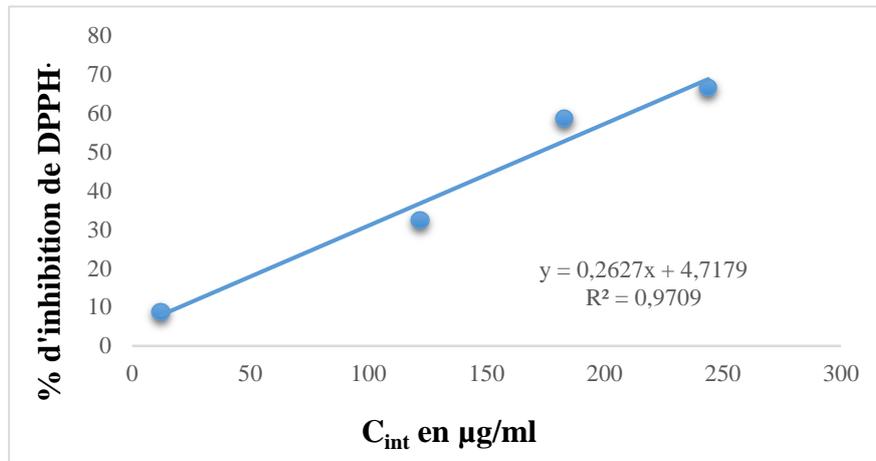
Annexe 2 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique



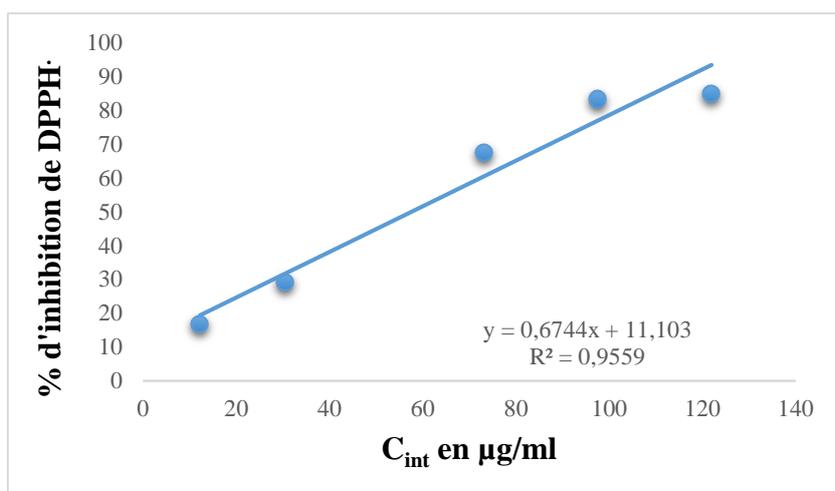
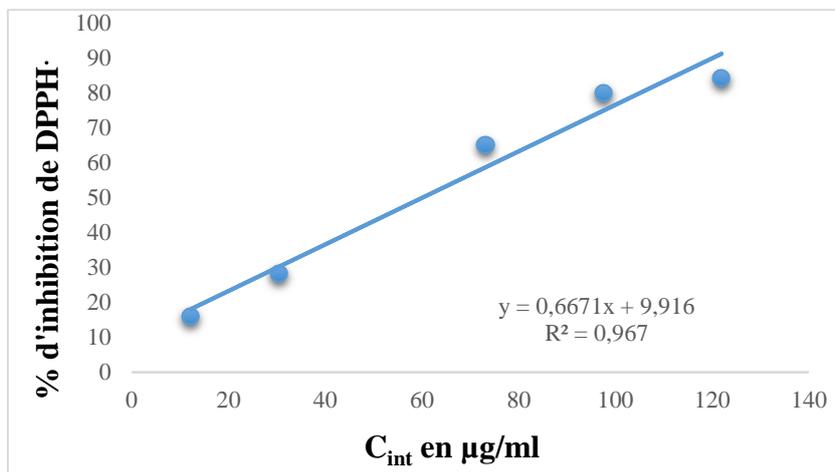
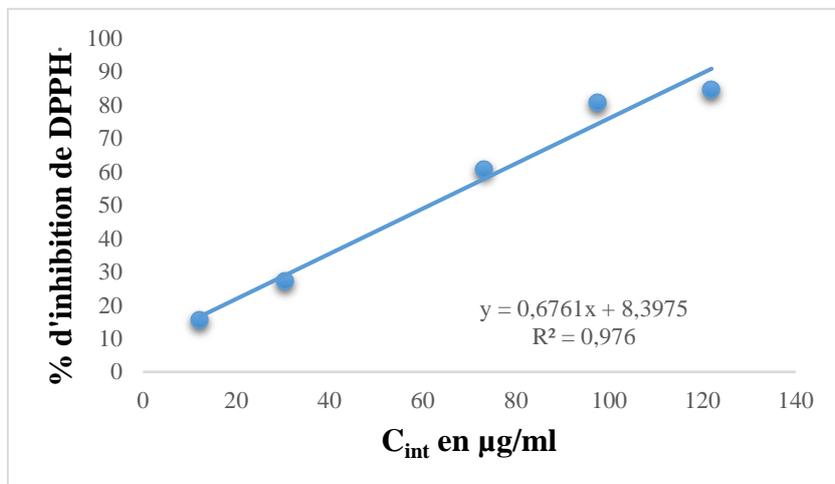
**Annexe 3 :** Variation de l'inhibition du DPPH· pour les trois essais en fonction de  $C_{int}$  de la phase EM de *R.alaternus L.*



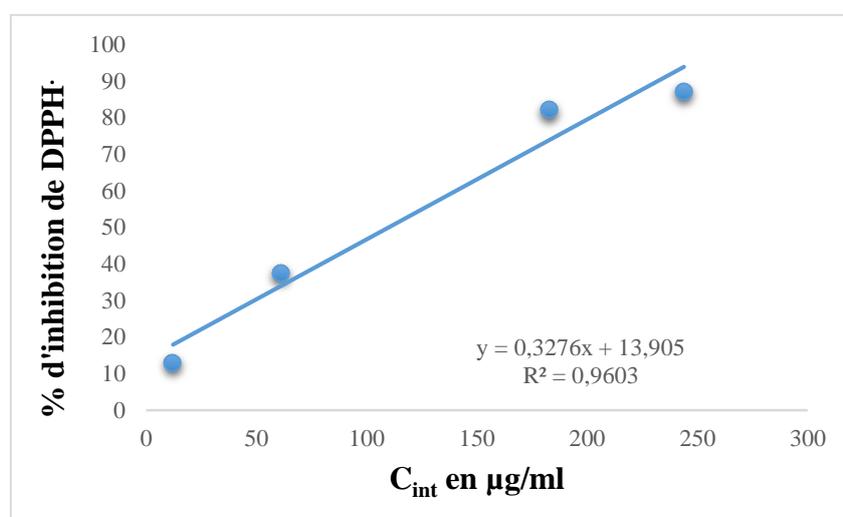
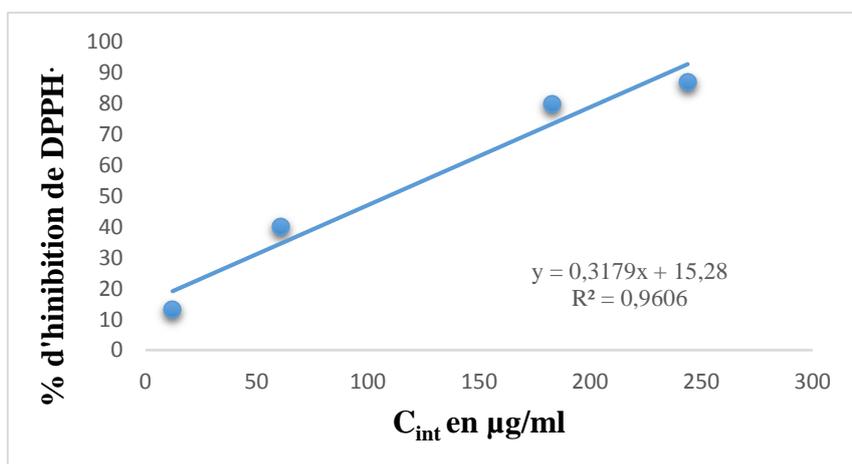
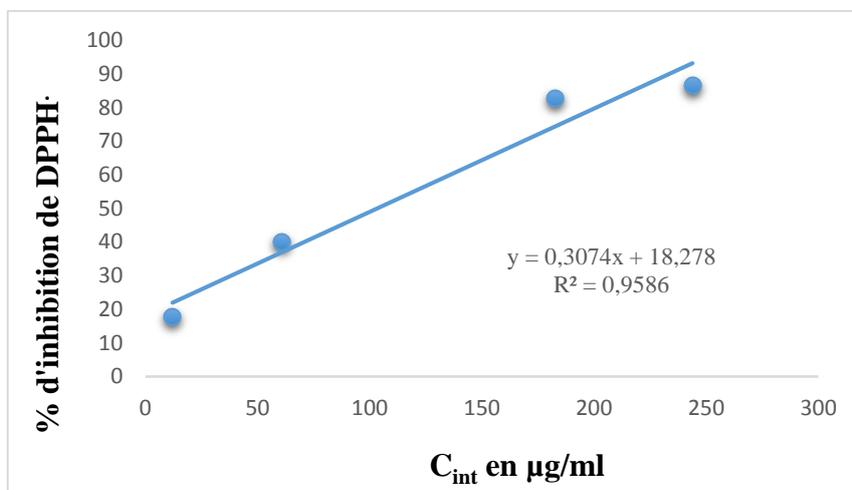
**Annexe 4 :** Variation de l'inhibition du DPPH· pour les trois essais en fonction de  $C_{int}$  de la phase H de *R.alaternus L.*



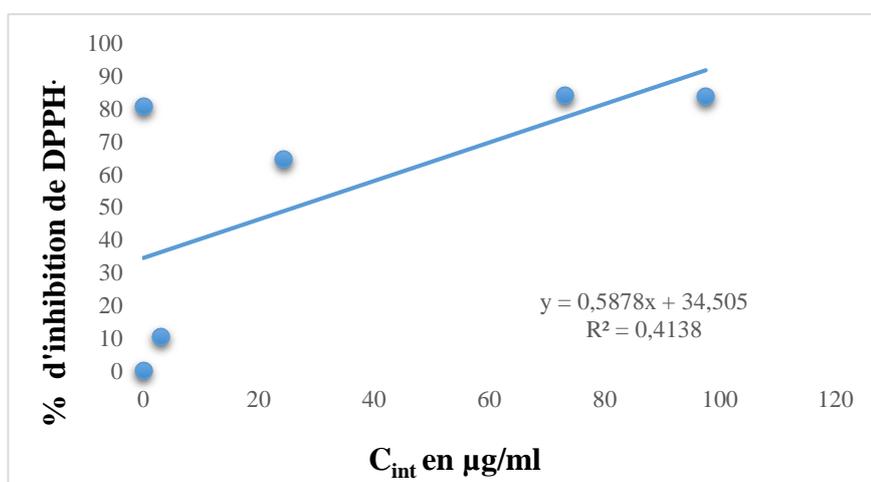
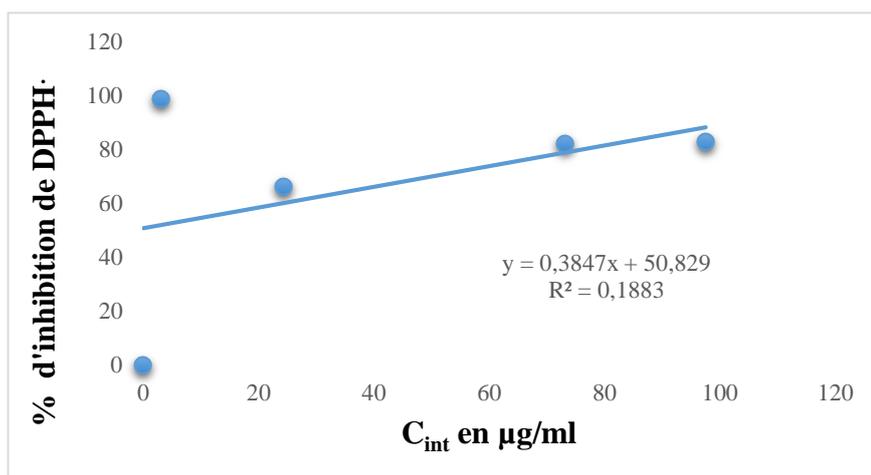
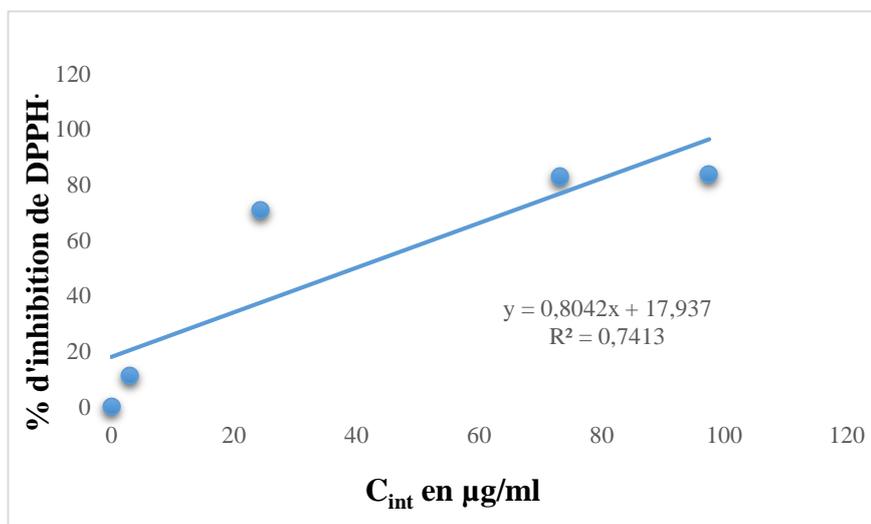
**Annexe 5 :** Variation de l'inhibition du DPPH· pour les trois essais en fonction de  $C_{int}$  de la phase Chl de *R.alaternus L.*



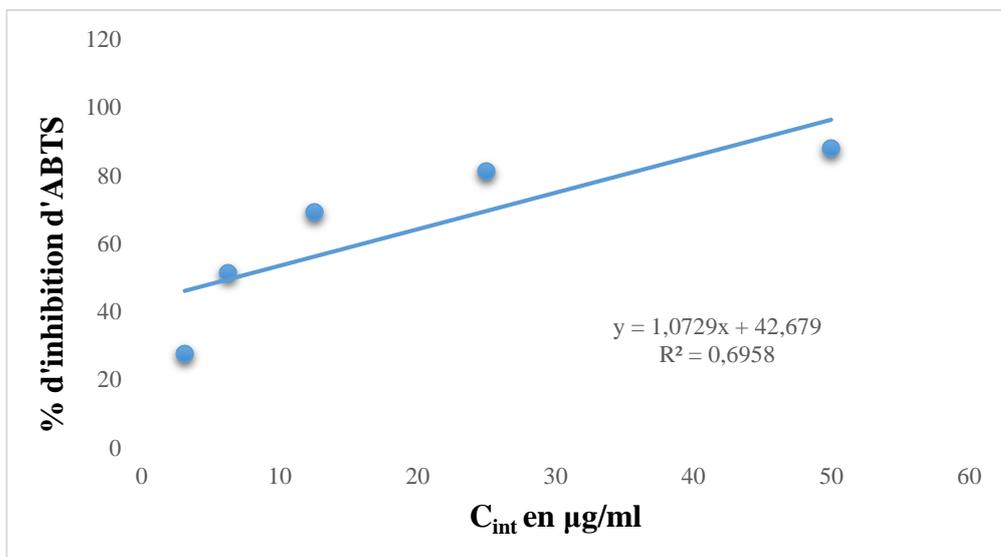
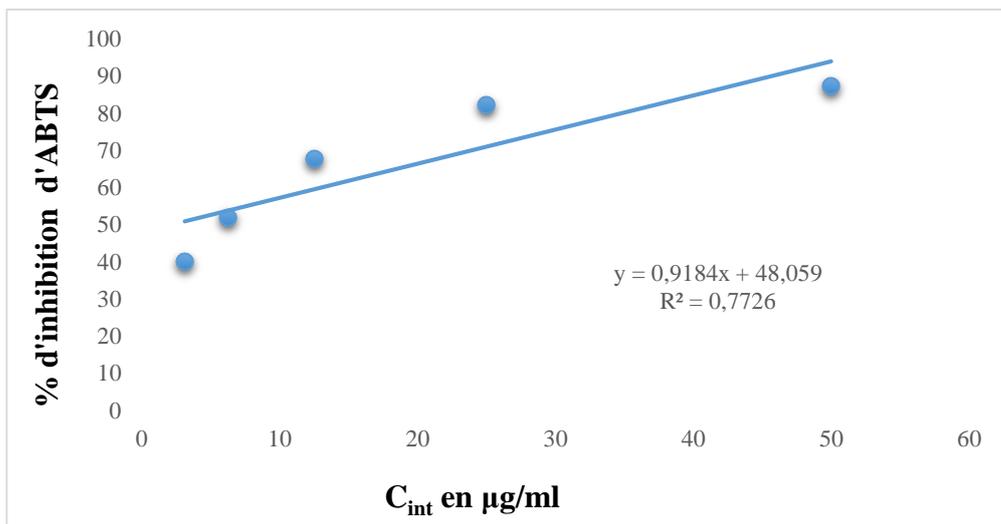
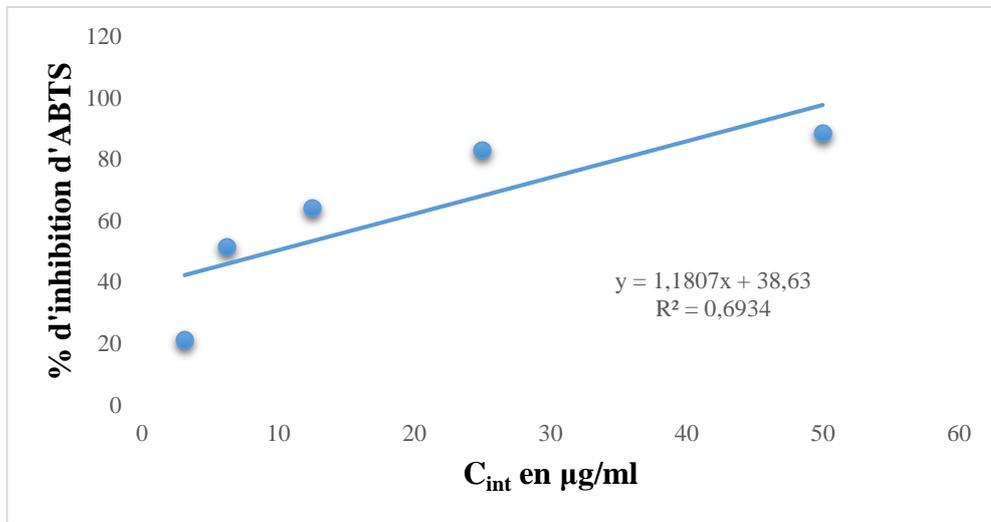
**Annexe 6 :** Variation de l'inhibition du DPPH· pour les trois essais en fonction de  $C_{int}$  de la phase Aq de *R.alaternus L.*



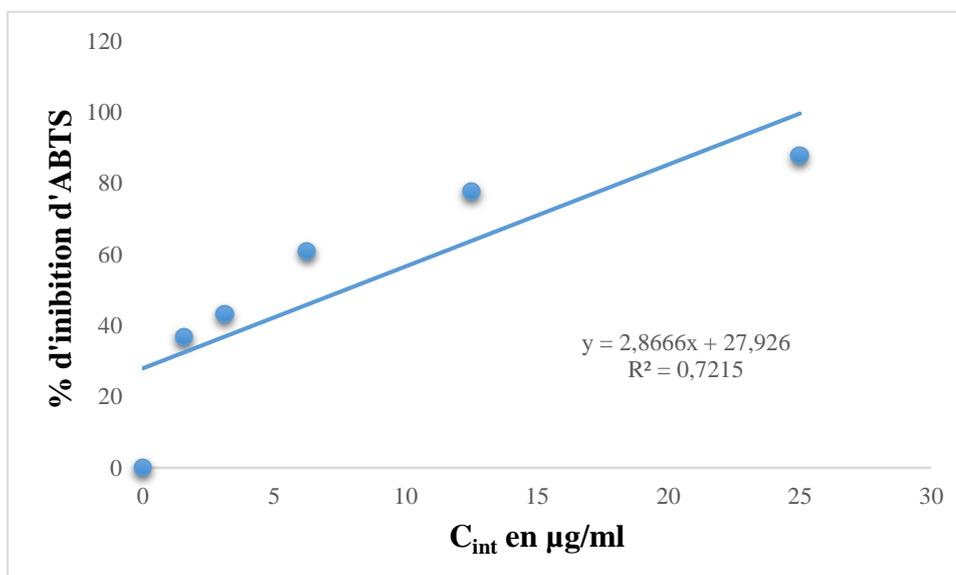
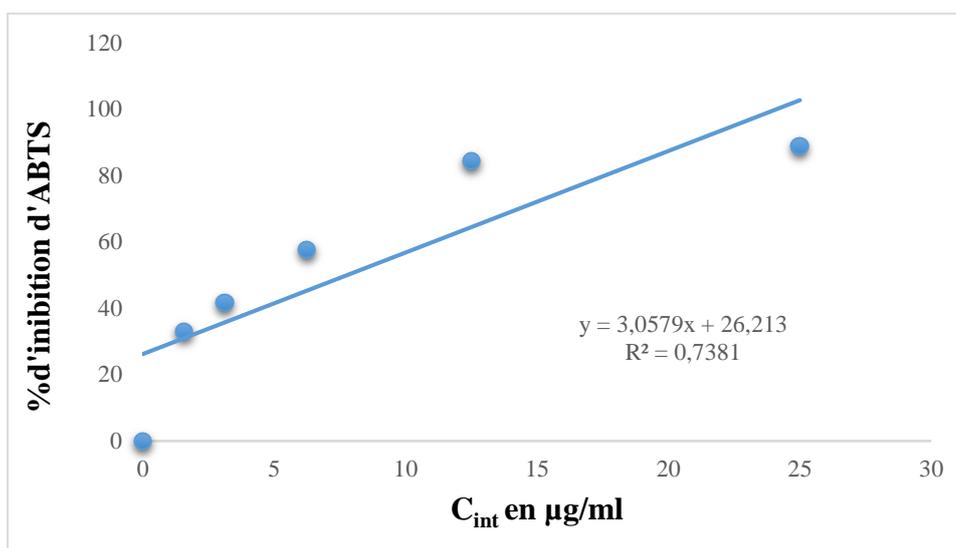
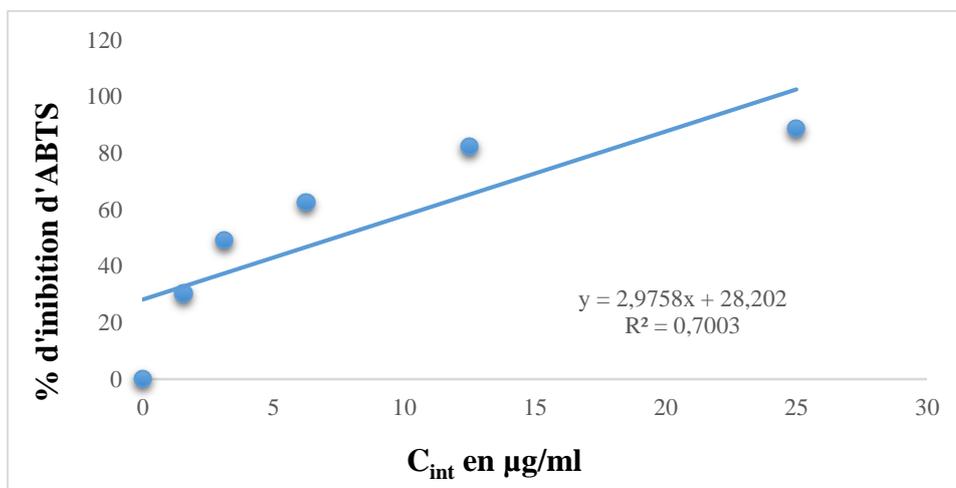
**Annexe 7 :** Variation de l'inhibition du DPPH· pour les trois essais en fonction de  $C_{int}$  de la phase AC de *R.alaternus L.*



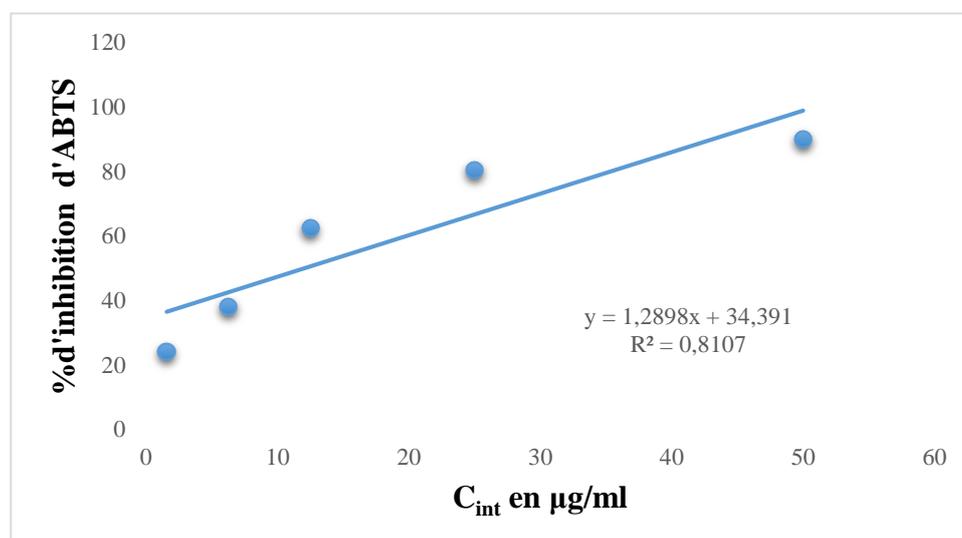
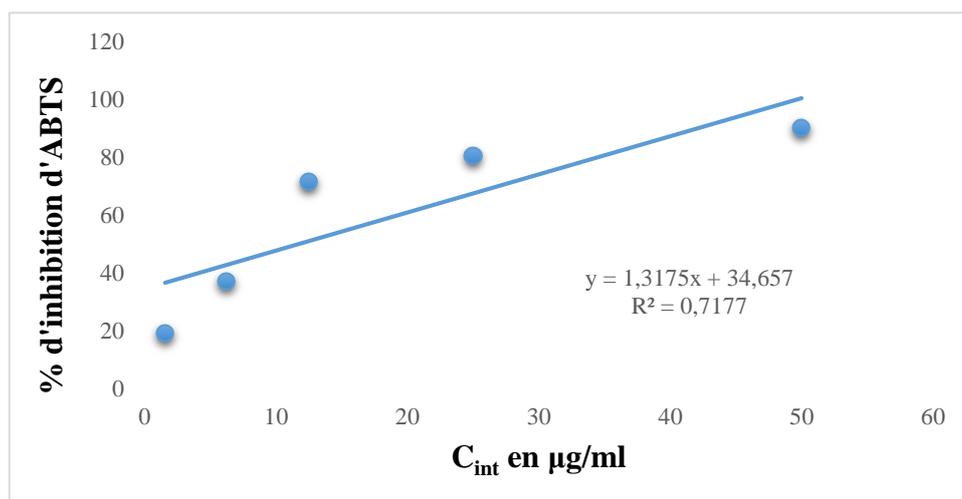
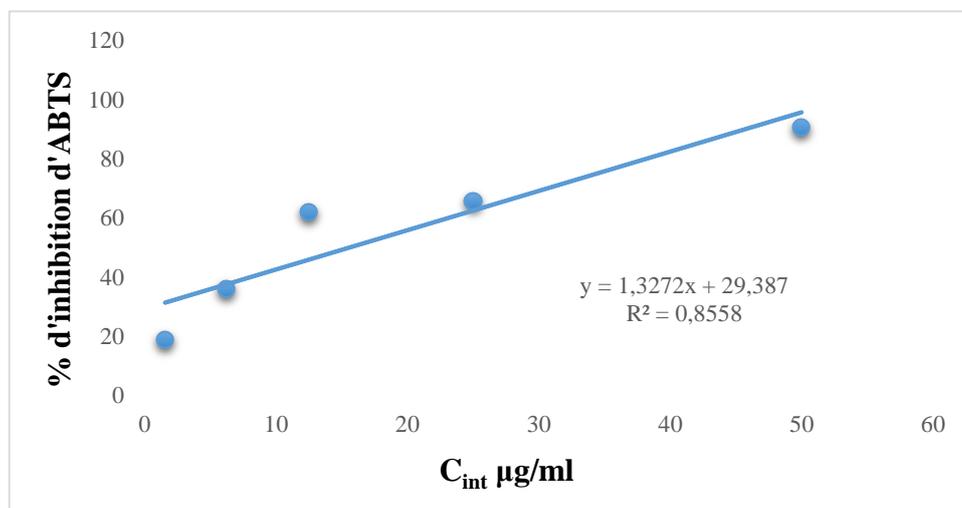
**Annexe 8 :** Variation de l'activité scavenging contre l'ABTS<sup>+</sup> pour les trois essais en fonction de C<sub>int</sub> de pour la phase EM de *R.alaternus L.*



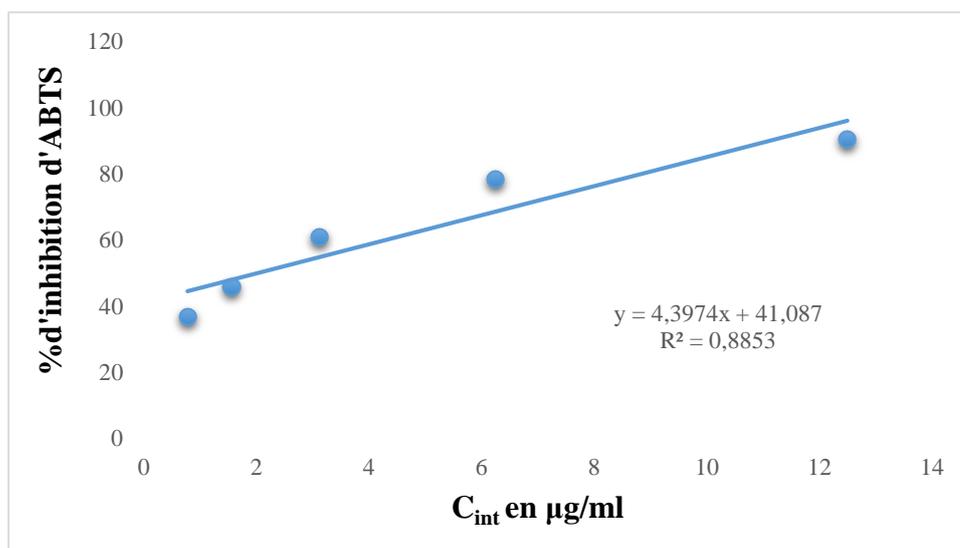
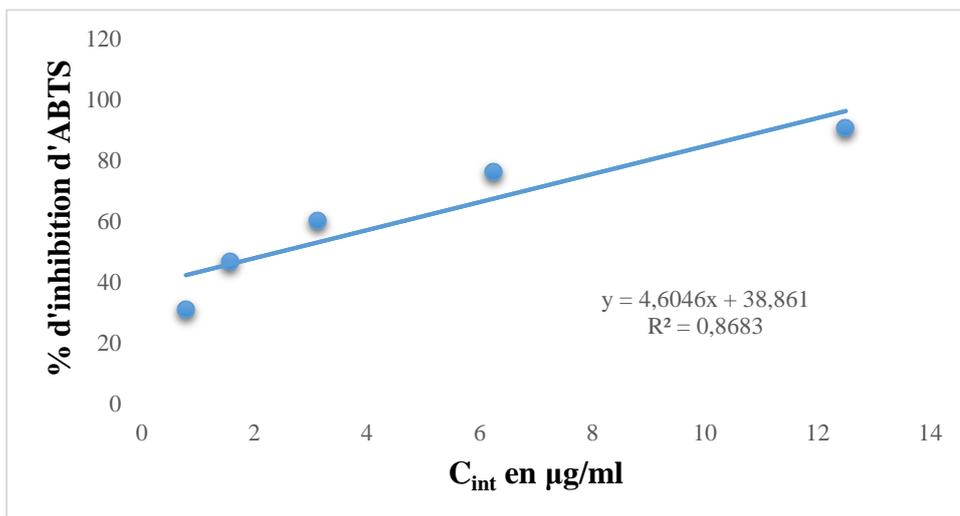
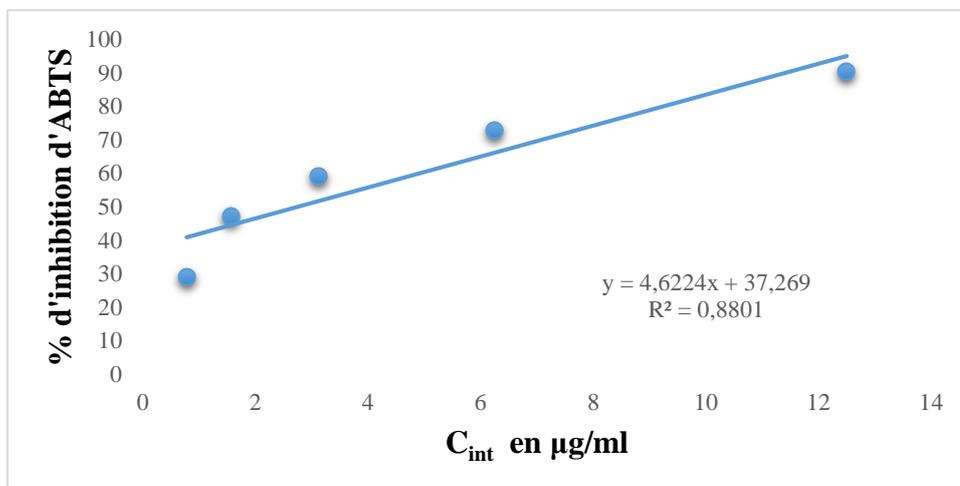
**Annexe 9 :** Variation de l'activité scavenging contre l'ABTS<sup>+</sup> pour les trois essais en fonction de C<sub>int</sub> de pour la phase Chl de *R.alaternus L.*



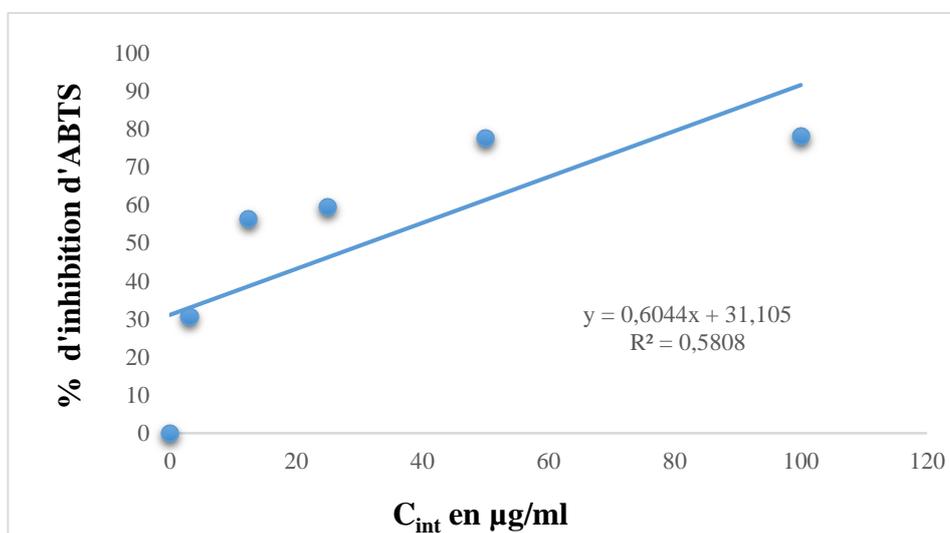
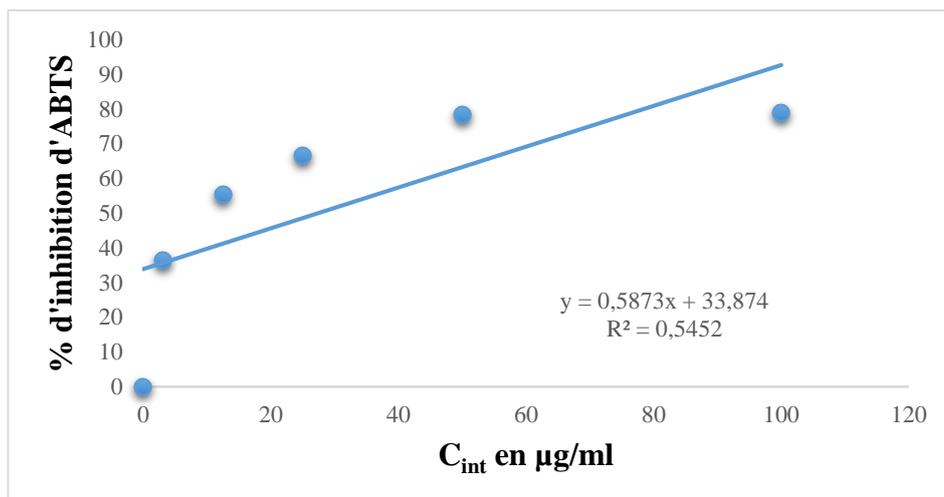
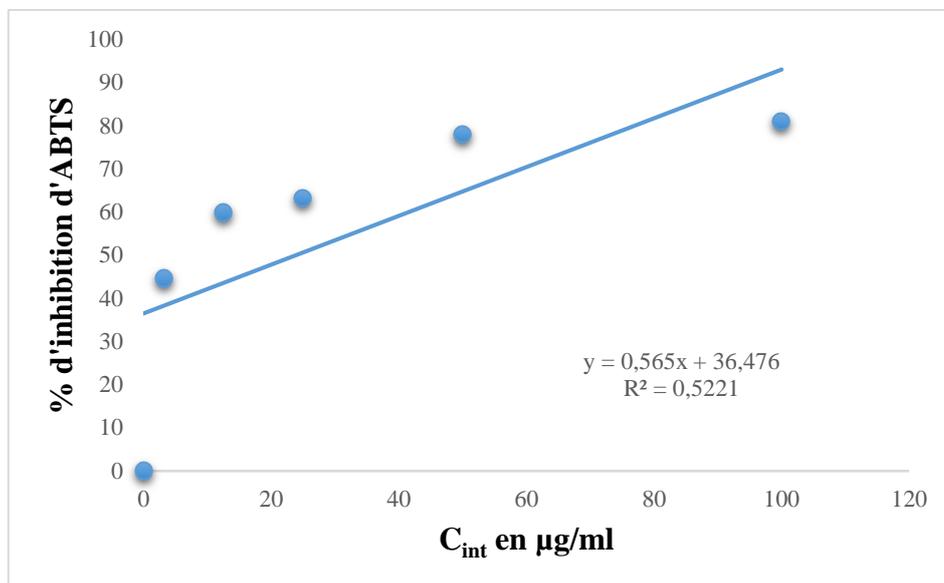
**Annexe 10 :** Variation de l'activité scavenging contre l'ABTS<sup>+</sup> pour les trois essais en fonction de C<sub>int</sub> de pour la phase Aq de *R.alaternus L.*



**Annexe 11 :** Variation de l'activité scavenging contre l'ABTS<sup>+</sup> pour les trois essais en fonction de C<sub>int</sub> de pour la phase AC de *R.alaternus L.*



**Annexe 12 :** Variation de l'activité scavenging contre l'ABTS<sup>+</sup> pour les trois essais en fonction de C<sub>int</sub> de pour la phase H de *R.alaternus L.*



## Résumé

*R. alaternus L* est un arbuste qui appartient à la famille des *Rhamnaceae* appelée localement « Mlilisse » utilisée en médecine traditionnelle reconnues par leurs vertus thérapeutiques. La partie aérienne de *R. alaternus L* a soumise une macération dans le méthanol. Elle présente un rendement de 11,34 %. Cinq extraits ont été préparés à partir des feuilles de cette plante : EM, H, Chl, Aq et AC. L'évaluation du contenu en polyphénols montre que les teneurs en ces composés varient entre 61,1 et 471,95 mg EAG/g d'extrait. Des teneurs maximales ont été détectées dans l'extrait acétate. De même pour les flavonoïdes varient entre 93 et 380,95 mg EQ/g d'extrait. L'étude quantitative a révélé que l'extrait AC de *R. alaternus L* présente une  $IC_{50}$  plus efficace avec  $21,36 \pm 21,45$  ;  $2,46 \pm 0,38$   $\mu\text{g/ml}$  respectivement vis à vis du radical DPPH. Pour le test d'ABTS. Les résultats de ces travaux nous ont permis d'affirmer que l'ensemble des extraits de la plante étudiée présente de très bonnes activités antioxydantes qui pourraient nous permettre de les recommander dans la biotechnologie.

**Mots clés :** *R. alaternus L*, activité antioxydante, Polyphénols, DPPH, ABTS.

## Abstract

*R. alaternus L* is a shrub which belongs to the *Rhamnaceae* family known locally as «Mlilisse» used in traditional medicine recognized for their therapeutic virtues. The aerial part of *R. alaternus L* underwent maceration in methanol. It has a yield of 11.34%. Five extracts were prepared from the leaves of this plant: EM, H, Chl, Aq and AC. The evaluation of the content of polyphenols shows that the contents of these compounds vary between 61,1 and 471,95 mg EAG/g of extract. Maximum levels were detected in the acetate extract. Likewise, for flavonoids vary between 93 and 380,95 mg EQ/g of extract. The quantitative study revealed that the AC extract of *R. alaternus L* exhibits a more effective  $IC_{50}$  with  $21,36 \pm 21,45$ ;  $2,46 \pm 0,38$   $\mu\text{g/ml}$  respectively against the DPPH radical. For the ABTS test. The results of this work have enabled us to confirm that all the extracts of the plant studied exhibit very good antioxidant activities which could allow us to recommend them in biotechnology.

**Key words:** *R. alaternus L*, antioxidant activity, Polyphenols, DPPH, ABTS.