

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Abderrahmane MIRA de Bejaia  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de la biologie physico-chimique

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Option : biochimie appliquée

Thème

**Les flavonoïdes d'*Ajuga iva* et de *Rhamnus alaternus* : Etude  
de leur effet antioxydant et sur l'alpha glucosidase**



Présenté par : MESSAOUDI Khoukha

Jury :

Promoteur : M<sup>me</sup> Amrouche Née SOBHI Widad M.A.A

Président : D<sup>f</sup> KHETTAL Bachra M.C.B

Examineurs: M<sup>f</sup> Tacherfiout Mustapha M.A.B

M<sup>f</sup> Bouguezza Yacine M.A.B

Promotion: 2011-2012

## *Remerciements*

*Tous mes remerciements ainsi que de la profonde foi sont portés au premier lieu à dieu, qui m'a donné la force et le courage afin de réaliser ce travail*

*Mes remerciements les plus vifs sont destinés à ma promotrice M<sup>me</sup> Amrouche. Née Sobhi W pour son bon encadrement, ses orientations et ses conseils ainsi que pour sa disponibilité. Je la remercie pour sa bienveillance, sa curiosité et son dynamisme qui ont été pour moi une source de motivation*

*Un grand merci au D<sup>r</sup> Khettal. B de m'avoir fait l'honneur de présider le jury après m'avoir enseigné le module d'enzymologie à ma troisième année universitaire*

*Un profond merci à M<sup>r</sup> Tacherfiout. M enseignant au département de BPC, ainsi qu'examineur dans le jury pour m'avoir aidé et orienté lors de la réalisation de ce projet, pour ses conseils et son dévouement*

*Je remercie M<sup>r</sup> Bougueza. Y, examinateur dans le jury pour son bon sens et sa persévérance*

*Toute ma gratitude pour tous les enseignants de la faculté des sciences de la vie et de la nature en particuliers ceux du département de Biologie Physico-Chimique pour leurs encouragements et leurs bienveillances pendant mon cursus*

*Je remercie solennellement mes amis, mes camarades ainsi que tous ceux qui ont pu aider de près ou de loin à la réalisation de ce projet*

## Dédicaces

*Je dédie ce projet à mes chers parents qui m'ont soutenu tout au long de ma vie, je les remercie pour tout l'amour et la patience dont ils ont fait preuve, pour leurs encouragements et leur soutien, je leur dois ainsi qu'à dieu toutes mes années d'études.*

*Je dédie aussi ce travail à mon mari qui m'a aidé dans la récolte de l'Ajuga iva, je le remercie pour son aide précieuse, son soutien et son amour.*

*Je n'oublie pas mon cher frère ainsi que mes adorables petites sœurs, pour leurs encouragements et leur soutien*

## Sommaire

Liste des figures.....	I
Liste des tableaux.....	II
Introduction.....	1

## Recherche bibliographique

I-Généralités sur <i>Ajuga iva</i> et <i>Rhamnus alaternus</i> .....	2
I-1 <i>Ajuga iva</i> .....	2
I-1-1 Présentation d' <i>Ajuga iva</i> .....	2
I-1-2 Habitat.....	2
I-1-3 Classement d' <i>Ajuga iva</i> .....	3
I-1-4 Toxicité.....	3
I-1-5 Métabolites secondaires d' <i>Ajuga iva</i> .....	4
I-1-6 les flavonoïdes d' <i>Ajuga iva</i> .....	4
I-2 <i>Rhamnus alaternus</i> .....	6
I-2-1 Présentation de <i>Rhamnus alaternus</i> .....	6
I-2-2 Habitat et répartition.....	7
I-2-3 Classification botanique.....	7
I-2-4 Métabolites secondaires.....	7
I-2-5 Les flavonoïdes de <i>Rhamnus alaternus</i> .....	7
II- Propriétés pharmacologiques des deux plantes.....	9
II- 1 Propriétés antioxydantes d' <i>Ajuga iva</i> .....	10
II- 2 Propriétés antioxydantes de <i>Rhamnus alaternus</i> .....	11
II- 3 Activité antidiabétique d' <i>Ajuga iva</i> .....	11
III- Généralités sur les enzymes.....	13

III- 1 La peroxydase.....	13
III-1-1 Généralités.....	13
III- 1-2 Classification de la peroxydase.....	13
III-1- 3 Structure de la peroxydase.....	13
III-1-4 Suivi de l'activité peroxydase.....	15
III-1- 5 Rôles de la peroxydase.....	15
III-2 L'alpha glucosidase.....	16
III-2- 1 Généralités.....	16
III- 2-2 Classification des alphas glucosidases.....	16
III- 2-3 Structure de l'alpha glucosidase.....	17
III-2- 4 Réaction hydrolysée.....	18
III-2- 5 L'acarbose inhibiteur de l'alpha glucosidase.....	18

## Matériel et méthodes

1 Matériel végétal.....	20
1-2 Préparation de la plante.....	20
1-2-1 Séchage.....	20
1-2-2 broyage.....	20
1-3 Extraction et identification des flavonoïdes.....	21
2 Chromatographie sur couche mince.....	22
2-1 Principe.....	22
2-2 CCM sur gel de silice.....	22
2-3 Extraits.....	22
3 Dosage des flavonoïdes.....	23
3-1 Principe.....	23

3-2 Mode opératoire.....	23
4 Activités anti radicalaire et antioxydante.....	24
4-1 Détermination de l'activité scavenger du radical DPPH.....	24
4-1-1 Le principe.....	24
4-1-2 Mode opératoire.....	24
4-2 Test d'ABTS.....	25
4-2-1 Le principe.....	25
4-2-2 Mode opératoire.....	25
4-3 Le pouvoir réducteur.....	26
4-3-1 Principe de la méthode.....	26
4-3-2 Mode opératoire.....	27
5 Test de l'alpha glucosidase.....	28
5-1 Principe de la méthode.....	28
5-2 Mode opératoire.....	28
5-2-1 Présentation des solutions.....	28
5-2-2 Procédé expérimental.....	28
6 Test de l'activité anti-Peroxydase.....	29
6-1 Extraction de l'enzyme.....	29
6-2 Principe.....	29
6-3 Mode opératoire.....	30
6-3-1 Préparation des solutions.....	30
6-3-2 Déroulement du test.....	30

## Résultats et discussion

1- Extraction et identification des flavonoïdes.....	31
--	----

<b>2- Chromatographie sur couche mince.....</b>	<b>32</b>
<b>3- Dosage des flavonoïdes.....</b>	<b>34</b>
<b>4- Evaluation du pouvoir anti-radicalaire des flavonoïdes.....</b>	<b>35</b>
<b>4-1 Activité anti-DPPH<sup>•+</sup> .....</b>	<b>35</b>
<b>4-2 Activité anti-ABTS<sup>•+</sup> .....</b>	<b>37</b>
<b>4-3 Pouvoir réducteur.....</b>	<b>39</b>
<b>4-4 Test de la peroxydase.....</b>	<b>40</b>
<b>4-5 Test de l'alpha glucosidase.....</b>	<b>42</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>43</b>

**Références bibliographiques**

**Annexe**

**Résumé**

Liste des figures :

Numéro de figure	Titre de la figure	Page
1	<i>Ajuga iva</i> , (a) : fleurs, feuilles ; (b) : plante complète.	2
2	Les différentes structures des flavonoïdes isolés à partir d' <i>Ajuga iva</i> (Bondi et al., 2000).	5
3	<i>Rhamnus alaternus</i> feuilles et fleurs.	6
4	Structure des 3 flavonoïdes étudiés par Ben Ammar et al., 2009	8
5	Structure de la peroxydase (Conesa et al., 2002)	14
6	Structure en rubans résolue de l'alpha glucosidase de levure. (a) homologie de la structure de l'alpha glucosidase modelée, (b) avec les résidus catalytiques conservés (Bharatham et al, 2008)	17
7	Représentation en 2D du complexe protéine (site actif) - acarbose (Bharatham et al, 2008)	19
8	Sites d'action de l'acarbose au niveau de l'alpha glucosidase (Bharatham et al, 2008).	19
9	Parties aériennes d' <i>Ajuga iva</i> et feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> séchées	20
10	poudres des deux plantes	20

11	Formation et piégeage du radical ABTS <sup>•+</sup> par un antioxydant donneur de H <sup>•</sup> (Marc et <i>al.</i> , 2004)	25
12	Principe du test de l'alpha glucosidase.	28
13	Réaction de la peroxydase transformant le gaïacol en tétragaïacol	29
14	Rendement en flavonoïdes présents dans les extraits aqueux et organiques des deux plantes.	31
15	Profil de ccm d' <i>Ajuga iva</i> et <i>Rhamnus alaternus</i> (1) : phase aqueuse d' <i>Ajuga iva</i> , (2) : phase organique d' <i>Ajuga iva</i> , (3) : phase aqueuse <i>Rhamnus alaternus</i> , (4) : phase organique <i>Rhamnus alaternus</i> .	32
16	Activité scavenger du DPPH <sup>•+</sup> des flavonoïdes polaires et apolaires de <i>Rhamnus alaternus</i> à différentes concentrations.	35
17	Activité scavenger du radical DPPH <sup>•+</sup> de la quercétine.	36
18	Mesure des absorbances lors de l'incubation des extraits avec l'ABTS <sup>•+</sup> pendant 7 minutes.	38
19	Pourcentage d'inhibition de l'ABTS des deux phases aqueuses d' <i>Ajuga iva</i> et de <i>Rhamnus alaternus</i> .	38
20	Pourcentages de pouvoirs réducteurs des phases organiques d' <i>Ajuga iva</i> et de <i>Rhamnus alaternus</i>	39
21	Pourcentages de pouvoirs réducteurs des phases aqueuses d' <i>Ajuga iva</i> et de <i>Rhamnus alaternus</i> .	39

<b>22</b>	<b>Taux d'inhibition de l'activité enzymatique de la peroxydase par les différents extraits des deux plantes à différentes concentrations.</b>	<b>40</b>
<b>23</b>	<b>Schéma proposé pour le piégeage du substrat de la peroxydase ; le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, par le cycle redox des flavonoïdes dans les feuilles de raisin (Perez et <i>al.</i>, 2002).</b>	<b>41</b>
<b>24</b>	<b>Inhibition de l'alpha glucosidase par les phases organiques des deux plantes à des concentrations de 0.125mg/ml et de 0.1mg/ml pendant 60 secondes.</b>	<b>42</b>
<b>25</b>	<b>Pourcentages d'inhibition des phases organiques des deux plantes à deux concentrations différentes de 0.1mg/ml et de 0.125mg/ml.</b>	<b>43</b>
<b>26</b>	<b>Pourcentages d'inhibition de l'activité de l'alpha glucosidase par la phase aqueuse d'<i>Ajuga iva</i></b>	<b>43</b>
<b>27</b>	<b>Taux d'inhibition de l'activité enzymatique de l'alpha glucosidase par la phase aqueuse de <i>Rhamnus alaternus</i></b>	<b>44</b>

Liste des tableaux :

Numéro de tableau	Titre du tableau	Page
1	Classement d' <i>Ajuga iva</i> (Ghedira et al., 1991; Halimi, 2004).	3
2	Classification botanique et phylogénétique de <i>Rhamnus alaternus</i> (Yi-ling C et Pan-Kai C, 1982).	7
3	Différentes activités d' <i>Ajuga iva</i> et <i>Rhamnus alaternus</i>	9
4	Activités biologiques de certaines peroxydases (Van De Velde et al., 2001)	15
5	Séquences consensus de la famille 13 des GH (Kimura, 2000).	17
6	Résultats de la CCM pour les deux phases aqueuse et organique d' <i>Ajuga iva</i> .	33
7	Résultats de la CCM pour les deux phases de <i>Rhamnus alaternus</i> .	33
8	Les proportions en flavonoïdes des deux plantes en mg EQ /100g d'extrait	35
9	Les différentes IC <sub>50</sub> de la quercétine, la phase aqueuse et la phase organique de <i>Rhamnus alaternus</i>	36
10	les IC <sub>50</sub> des différents extraits des deux plantes contre la peroxydase.	41

## Introduction

« Les plantes semblent avoir été semées avec profusion sur la terre, comme les étoiles dans le ciel, pour inviter l'homme par l'attrait du plaisir et de la curiosité à l'étude de la nature »

**Jean jacques ROUSSEAU**

*Ajuga iva* et *Rhamnus alaternus* sont des plantes endémique du Maghreb et du bassin méditerranéen. Leur utilisation en médecine traditionnelle remonte à des temps lointains. Elles sont connues et utilisées dans le traitement de plusieurs maux tels l'hypertension artérielle, les infections diverses, le diabète, rhumatisme et inflammations, les maux de tête et de dents ...etc.

La science moderne a mis l'accent sur ces propriétés. Parmi celles qui nous interpellent, les effets antioxydant et hypoglycémiant.

Comme toutes plantes médicinales, *Ajuga iva* et *Rhamnus alaternus* renferme une grande variété de composés dits « secondaires », notamment des flavonoïdes. Ces composés sont, dans la plus part des cas, responsables d'une grande partie des propriétés pharmacologiques de la plante.

L'objectif de la présente étude est donc, d'étudier l'effet des flavonoïdes des deux plantes sur les propriétés qui nous intéressent : antioxydante et hypoglycémiant via l'inhibition d'une des enzymes clé de la pathologie du Diabète : l'alpha glucosidase.

Le présent document est organisé en deux grandes parties : une synthèse bibliographique, qui rappelle les connaissances actuelles sur *Ajuga iva* et *Rhamnus alaternus*, ainsi que sur leurs propriétés pharmacologiques.

Dans cette partie, nous rappellerons aussi quelques données fondamentales des deux enzymes utilisées ; la peroxydase et l'alpha amylase.

Dans la deuxième partie, nous présenterons les différentes étapes de la démarche expérimentale et nous terminerons avec la présentation et la discussion des différents résultats obtenus.

# **Recherche bibliographique**

# Chapitre I

## I- Généralités sur *Ajuga iva* et *Rhamnus alaternus*

### I-1 *Ajuga iva*

#### I-1-1 Présentation d'*Ajuga iva*

C'est une plante herbacée de petite taille, de 5 à 20 cm de hauteur. Elle est vivace avec multiplication dite végétative qui est presque toujours plus rapide que la production par les graines (Halimi, 2004). Les tiges sont étalées, rameuses, la base est ligneuse. Les feuilles sont denses, très serrées ; elles sont sessiles : leur forme est étroite, linéaire et lancéolée (5 à 20 fois plus longues que larges) ; La période de floraison est entre Mai et Juin (Batanouny et al., 1999; Halimi, 2004). Elles sont entières, plus au moins crénelées ou finement dentelées au sommet. L'inflorescence consiste en des fleurs solitaires ou groupées par 2 ou encore par 4 qui apparaissent à l'aisselle des feuilles. La fleur est plus petite que les feuilles, de petite taille, rose ou blanche, parfois jaunâtre ou pourpre. Les fruits sont des nucules réticulés, (Ait Youssef, 2006).



(a)

(b)

**Figure1** : *Ajuga iva*, (a) : fleurs, feuilles ; (b) : plante complète.

#### I-1-2 Habitat

Elle est présente dans toute l'aire méditerranéenne ; dans l'ensemble des pays du Maghreb, dans certains pays du Moyen-Orient, et dans certains pays d'Europe du sud. Elle pousse surtout sur les pelouses sèches ou sur les vieux murs (ZAFAR et al., 2009).

En Algérie l'espèce est très commune dans tout le Tell et très rare dans le reste du pays ; elle pousse surtout dans les herbages et pelouses montagnardes, (**Ait Youssef, 2006**).

### **I-1-3 Classement d'*Ajuga iva***

Le tableau suivant résume le classement d'*Ajuga iva*

**Tableau I** : Classement d'*Ajuga iva* (**Ghedira et al., 1991; Halimi, 2004**).

Règne	plantae
Embranchement :	Spermaphytes
S/Embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Ordre :	Lamiales/ tubiflorae
Famille :	Lamiacée
Genre :	<i>Ajuga</i>
Espèce :	<i>Ajuga iva</i> (L) Schreb
Nom français :	Bugle, Ivette
Nom vernaculaire :	Chendgora.

Les noms communs sont : en Arabe: Chendgoura, en Berber: Taftelba, en Français: Ivette, Petit if, Bugle, en Anglais: Herb ivy, Musky bugle

La dérivation du nom: *Ajuga*, du latin "Jugum": joug. Avec le suffixe "a": sans joug, du fait que la corolle est dépourvue de lèvre supérieure. *iva*, est un ancien nom féminin latin qui est utilisé pour la première fois pour cette plante (**Ghedira et al., 1991; Halimi, 2004**).

### **I-1-4 Toxicité**

Les études réalisées n'ont révélé aucune toxicité d'*Ajuga iva*. Aucune létalité n'a été observée chez les souris traitées. La consommation de l'ivette par des personnes normales ; n'aboutit pas à la réduction de leurs glycémies, alors qu'elle a un effet hypoglycémiant chez les personnes diabétiques (**El Hilaly et al., 2004**). Par voie orale, la DL<sub>50</sub> est supérieure à 14g/kg PC tandis que celle de la voie intrapéritonéale est d'environ 3.6g/kg PC. Quant au traitement chronique (jusqu'à 600 mg/Kg PC) n'occasionne aucun effet néfaste sur les paramètres biochimiques et hématologiques. L'analyse histologiques des organes vitaux

reflète des structures anatomo-morphologiques normales (**El Hilaly et al., 2007**), les DL50 montrent que les flavonoïdes d'*Ajuga iva* ne sont pas toxiques du fait de leurs valeurs élevées (3600 mg/kg pour les souris et 4800 mg/kg pour les rats) (**Bennaghmouch et al., 2001**).

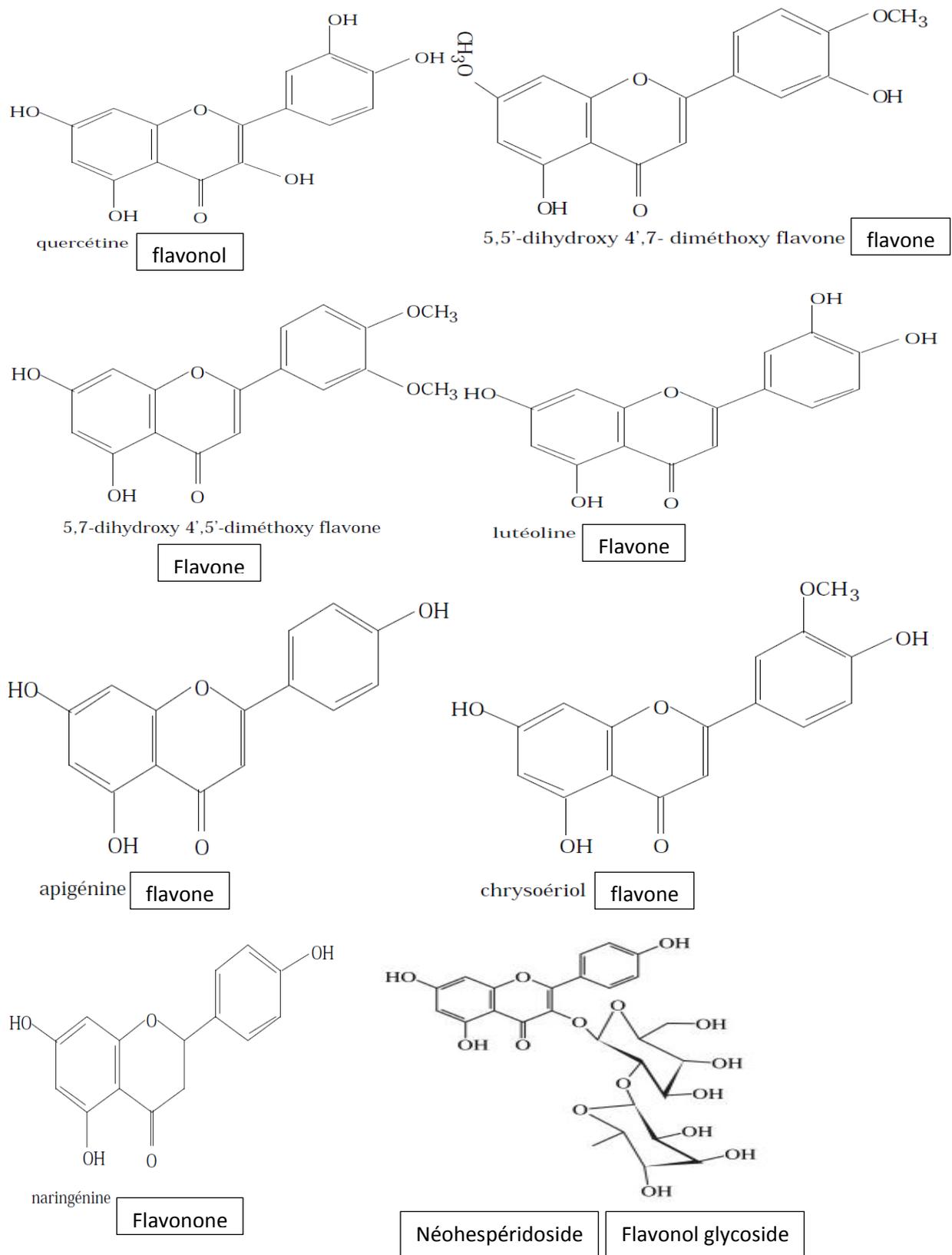
#### **I-1-5 Métabolites secondaires d'*Ajuga iva***

La plupart des plantes contiennent les composés polyphénoliques (**Rice-Evans et al., 1997**). Les flavonoïdes, les tannins, tri terpènes et les huiles essentielles se trouvent en grande quantité dans l'*Ajuga iva* (**El Hilaly et al., 2004**). Elle contient aussi les anthocyanes, les acides phénoliques, les néo-clérodane diterpénoides comme l'ajugarine et d'autres substances (**Halimi, 2004 et Coll et al., 2008**). Les études ont montrés que l'ivette contient le 24,28-dehydromakisterone A ainsi que les phytoecdystéroïdes (ajugasterone C, cyasterone, cyasterone diglycerides, 24,25-dehydrocyasterone, 24-dehydroprecyasterone, ecdysone, ecdysterone, 23-hydroxycyasterone, 20-hydroxyecdysone, makisterone A, 22-oxo-cyasterone, polypodine B). Elle contient aussi le 2-deoxy-20-hydroxyecdysone, et le 14,15-dihydroajugapitine et Withanolides (**Wessner et al., 1992 ; Bondi et al., 2000**).

**Ben Jannet et al. (1999)** ont isolés les ivaïdes A, B et C d'*Ajuga iva*. Les cicatrisants (externes), les diterpénoides *neo*-clérodane diterpénoides (14,15-dihydroajugapitin, Ivain I, II, III & IV), les iridoïdes (harpagide, 8-*O*-acetylharpagide), Ivaïdes A (1,3- di-(R)- $\beta$ -hydroxy-glycérine glycérol), des saponosides, diacylglycerides, l'acide palmitique et l'acide myristique sont aussi des composés chimiques que les chercheurs les trouvent dans l'*Ajuga iva*, elle est très riche en fer (**Ben Jannet et al., 2000**). La figure suivante montre les structures des différents flavonoïdes d'*Ajuga iva*.

#### **I-1-6 les flavonoïdes d'*Ajuga iva***

La quercétine (flavonol), la lutéoline, la chrysoériol, la 5,5'-dihydroxy 4',7-diméthoxy flavone, la 5,7-dihydroxy 4',5'- diméthoxy flavone, l'apigénine (flavones), la naringénine (flavanone) et le néohespéridoside sont les flavonoïdes isolés à partir de *Ajuga iva* (**Ghedira et al., 1991 ; Bennaghmouch et al., 2002**).



**Figure 2 :** Les différentes structures des flavonoïdes isolés à partir d'*Ajuga iva* (Bondi et al., 2000).

## I-2 *Rhamnus alaternus*

### I-2-1 Présentation de *Rhamnus alaternus*

*Rhamnus alaternus* (Rhamnacée), localement connue sous le nom de « Imlis » en Algérie, utilisée en phytothérapie, a une taille qui varie de 1 à 5m formant un buisson épais d'un vert assez brillant. Sa croissance est lente mais sa longévité peut atteindre 100ans (**Bas et al., 2009**).

Ses feuilles sont alternes, ovales, courtement pétiolées, épaisses et coriaces. Les fleurs sont jaunâtres, petites et unisexuées groupées en bouquets. Elles ont cinq sépales qui sont dressées dans les fleurs femelles et rabattus dans les fleurs males, les pétales sont absents (**Stocker et al., 2004**).

Le fruit est une baie que l'on qualifie de drupe. Il est petit, globuleux, de la grosseur d'un petit pois. Sa surface est d'abord rouge, puis devient noire à maturité ; ce fruit présente une pulpe de couleur brunâtre et renferme de 2 à 4 noyaux. Son odeur est nulle mais sa saveur est sucrée et acidulée. La récolte du fruit s'effectue en automne (**Ait Youssef, 2006**).



**Figure 3 :** *Rhamnus alaternus* feuilles et fleurs.

### I-2-2 Habitat et répartition

*Rhamnus alaternus* se développe de façon spontanée sur les coteaux calcaires à une altitude qui varie de 0 à 1000 m. Elle a une répartition méditerranéenne. On la trouve dans les pays d'Afrique du nord, et sur le littoral de l'Europe méridionale (Aronne et al., 1995)

### I-2-3 Classification botanique

Le tableau ci-dessous nous montre la classification de *Rhamnus alaternus*.

**Tableau II** : Classification botanique et phylogénétique de *Rhamnus alaternus* (Yi-ling C et Pan-Kai C, 1982).

<b>Règne</b>	<b>plantae</b>
<b>Division</b>	<b>Magnoliophyta</b>
<b>Classe</b>	<b>Magnoliopsida</b>
<b>Ordre</b>	<b>Rhamnales</b>
<b>Famille</b>	<b>Rhamnaceae</b>
<b>Genre</b>	<b>Rhamnus</b>
<b>Nom binominal</b>	<b>Rhamnus alaternus</b>
<b>Ordre</b>	<b>Rosales</b>
<b>Famille</b>	<b>Rhamnaceae</b>

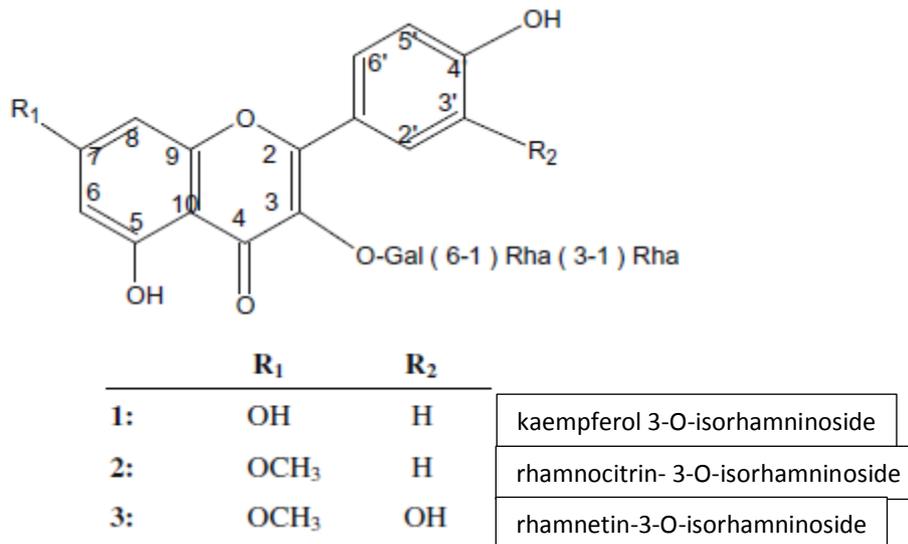
### I-2-4 Métabolites secondaires

*Rhamnus alaternus* est une bonne source d'anthraglucosides. L'écorce des racines ou des tiges sont riches en dérivés anthracéniques, chrysophanol, émodyne, physcione et alaternine (anthraquinines aglycones), ainsi que les feuilles et les fleurs probablement (Ben Ammar et al., 2007). La richesse en ces composés explique les propriétés laxatives et surtout purgatives de toutes les parties utilisées (Ait Youssef, 2006).

### I-2-5 Les flavonoïdes de *Rhamnus alaternus*

*Rhamnus alaternus* contient, alaternine, quercétine, kaempférol (Ben Ammar et al., 2008), kaempferol 3-O-isorhamninoside(1), rhamnocitrin- 3-O-isorhamninoside (2) et rhamnetin-3-O-isorhamninoside (3). Ce dernier, montre une activité antiradicalaire forte pour le DPPH et l'anion superoxide, c'est un inhibiteur de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induit lors de la peroxydation lipidique. Le

premier flavonoïde (kaempferol 3-O-isorhamninoside) montre une plus grande activité inhibitrice de la xanthine oxydase. Les flavonols triglycosides présentent des activités antimutagénique, antigénotoxique, avec l'absence d'un effet génotoxique (**Bhourri et al., 2012 ; Ben Ammar et al., 2009**). La figure suivante présente la structure des trois flavonoides isolés par **Ben Ammar et ses collaborateurs (2009)**.



**Figure 4 :** Structure des 3 flavonoïdes étudiés par **Ben Ammar et al., 2009**

# Chapitre II

## II- Propriétés pharmacologiques des deux plantes

*Ajuga iva* et *Rhamnus alaternus* sont bien connues dans les pays du Maghreb pour leurs usages en phytothérapies, plusieurs maladies infectieuses ou autres, peuvent être soignées grâce à leurs utilisations. Parmi ces pathologies, on note les infections et les désordres intestinaux, les maladies cardiovasculaires, les troubles hépatique, la jaunisse...etc (**Ait Youssef, 2006**)

Le tableau suivant résume les propriétés pharmacologiques d'*Ajuga iva* et de *Rhamnus alaternus*.

**Tableau III :** Différentes activités d'*Ajuga iva* et *Rhamnus alaternus*

Activité	Quelques informations	références
Antiparasitaire	sur la croissance des larves <i>Spodoptera frugiperda</i> et <i>Spodoptera littoralis</i> dans (extrait éthanolique d' <i>Ajuga iva</i> ) grâce aux deux composés suivants : diterpénoides ivaines IV et 14,15-dihydroajugapitin	<b>Bondm et al., 2000</b>
anti hypertensive; vasodilatatrice	Les extraits d' <i>Ajuga iva</i> possèdent plusieurs composés à effet vasodilatateur, ils inhibent les contractions provoquées par la noradrénaline.	<b>El-Hilaly et al., 2004</b>
Anti- hypercholestérolémie	des iridoïdes extraites de l'extrait aqueux d' <i>Ajuga iva</i> agissent efficacement sur l'efflux du cholestérol des tissus périphériques vers le foie en augmentant l'activité de la LCAT et atténuent l'hypercholestérolémie	<b>Bouderbala et al., 2008</b>
Anti hypolipidémiant et antioxydant	L'extrait aqueux d' <i>Ajuga iva</i> possède un effet hypolipidémiant et antioxydant, il exerce une action contre la peroxydation lipidique des tissus chez les rats diabétiques.	<b>Hamden et al., 2008</b>
Pouvoir sédatif	L'extrait flavonoïdiques d' <i>Ajuga iva</i> provoque un temps d'endormissement plus long que celui observé lors du traitement de souris et des rats par du Tranxene (référence)	<b>Bennaghmouch et al., 2001</b>
Hypo	L'injection intraveineuse continue de	<b>El-Hilaly et al., 2007</b>

triglycéridémique	l'extrait aqueux lyophilisé d' <i>Ajuga iva</i> diminue rapidement les triglycérides sanguins.	
antifongique	l'action antifongique de l'extrait méthanolique d' <i>Ajuga iva</i> sur <i>Aspergillusflavus</i> (92,5%) et <i>Fusarium oxysporum</i> (70,5%)	<b>BOUGANDOURA, 2011</b>
Activités	Quelques informations	Références
Anti radicalaire et anti-mutagénique	Les différents extraits de <i>Rhamnus alaternus</i> contiennent des quantités importantes en flavonoïdes et tannins ce qui peut leur conférer l'action antimutagénique et anti radicalaire	<b>Ben Ammar et al., 2005</b>

*Rhamnus alaternus* utilisée traditionnellement pour traiter les ictères, comme diurétique, laxatif, hypotensive ainsi que pour traiter les maladies hépatiques et les complications dermatologiques (**Boukef, 2001**).

## II- 1 Propriétés antioxydantes d'*Ajuga iva*

**Chenni et ses collaborateurs (2007)** ont démontré que l'extrait aqueux d'*Ajuga iva* diminue les dégâts provoqués par le stress oxydatif chez les rats traités par des doses élevées de cholestérol. Dans le même axe, **Bouderbala et ses collaborateurs (2008)** ont montré que l'extrait aqueux lyophilisé d'*Ajuga iva* peut réduire le stress oxydant et diminue la peroxydation lipidique chez des rats hypercholestérolémiques. Et comme les flavonoïdes et les iridoïdes ont été isolés de cette plante (**Ghedira et al., 1991**), il a été suggéré que la défense antioxydante chez les rats hypercholestérolémiques traités par *Ajuga iva* pourrait être due à ces composés.

*Ajuga iva* stimule l'activité des enzymes antioxydantes, grâce aux flavonoïdes et terpenoïdes (**Taleb-Senouci et al., 2009**).

Les iridoïdes d'*Ajuga iva* augmentent l'activité des enzymes antioxydantes dans les globules rouges des rats nourrit d'une alimentation riche en cholestérol (**Bouderbala et al., 2010**).

## II- 2 Propriétés antioxydantes de *Rhamnus alaternus*

Certains extraits de *Rhamnus alaternus* ont un potentiel d'activité antioxydante liée à la composition de la plante en flavonoïdes et phénols (**Ben Ammar, et al., 2008. Bhourri et al., 2012**).

Le kaempferol 3-O-isorhamninoside possède des activités anti radicalaires contre l'ABTS et le O<sub>2</sub><sup>-</sup>, comme il induit l'activation de systèmes de réparation de l'ADN (**Hayder et al., 2008**) ces mêmes auteurs (**Hayder et al., 2008**) ont démontré encore que ce composé module non seulement l'expression des enzymes antioxydantes mais aussi celles des enzymes réparatrices de l'ADN.

**Kooststra (1994)** a proposé que les flavonoïdes neutralisent les radicaux libres, en se liant directement à ces derniers. **Edenharder et ses collaborateurs (1997)** ont montré que les flavonoïdes ne permettent pas la fixation des mono oxygénases au niveau des cytochromes p-450 membranaires et ainsi diminuent l'apparition du radical O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

Les flavonoïdes de *Rhamnus alaternus* sont de bons chélateurs de métaux qui jouent un rôle important dans le métabolisme de l'oxygène et l'apparition des ERO et la réduction du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la génération de quantités importantes de radicaux hydroxyles (**Ashok, 2001**).

Les équipiers de **Kelly (2002) et Yen (1995)** ont démontré que les flavonoïdes sont de bons donneurs d'électrons et d'hydrogène ce qui leurs confère la capacité de terminer la chaîne de formation des radicaux en convertissant les radicaux libres et les ERO en produits stables.

Il a été suggéré que certains 7- hydroxy flavonoïdes sont de potentiels inhibiteurs de la XOD car ils substituent 2 ou 6-OH du site actif de l'enzyme. La substitution des OH joue un rôle crucial dans l'activité scavenger des radicaux libres (**Ben Ammar et al., 2009**)

Les oligomères flavonoïques totaux ont une habilité à accroître l'expression des gènes des enzymes antioxydantes comme la SOD1, ainsi que le système de control thiorédoxine (**Ben Ammar et al., 2007**).

## II- 3 Activité antidiabétique d'*Ajuga iva*

L'administration intraveineuse d'un extrait d'*Ajuga iva* chez des rats diabétiques provoque un effet hypoglycémiant et hypolipidémique comparable à l'effet d'une molécules insuline-like (**EL-HILALY et al., 2007**).

La phase aqueuse d'*Ajuga iva* comprend en majeure partie des flavonoïdes (**Meiselman et al., 1976**). Ces derniers composés seraient responsables de l'effet hypoglycémiant d'*Ajuga iva* (**El Hilaly et al., 2002**).

**El Hilaly et Lyoussi (2002)** ont démontré que l'extrait aqueux lyophilisé d'*Ajuga iva* a un effet hypoglycémiant sur des rats diabétiques. Des extraits d'*Ajuga iva* ont d'importants effets hypolipidémiques et ainsi inverse la dyslipidémie associée aux diabètes type 1 et 2 (**El-Hilaly et al., 2006**).

Les métabolites secondaires de l'extrait aqueux d'*Ajuga iva* (flavonoïdes et terpénoides) sont responsables de la correction des hyperglycémies postprandiales et les dyslipidémies chez des rats dont le diabète est induit, ainsi le traitement avec l'*Ajuga iva* prévient ou aide à réduire les complications liées au diabète (**Taleb-Senouci et al., 2009**).

L'inhibition de certaines enzymes clés de la digestion comme la lipase pancréatique, l'isomaltase, l'alpha glucosidase et l'alpha amylase par des inhibiteurs de sources naturelles (plantes médicinales) réduit la libération du D-glucose dans le sang et or l'hyperglycémie postprandiale est réduite elle-même (**Soo-Jin Heo et al., 2009. YE Xiao-Ping et al., 2010. Qi You et al., 2012. Young-Jun Shim et al., 2003**)

# Chapitre III

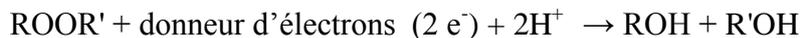
### III- 1 La peroxydase

Du fait de l'utilisation de la peroxydase et de l'alpha glucosidase lors de l'étude expérimentale, ces enzymes sont présentées dans ce qui suit :

#### III-1-1 Généralités

La peroxydase ([EC1.11.1.17](#)) est une [enzyme](#) de type [oxydase](#), elle existe chez presque tous les êtres vivants : chez les microorganismes, chez les plantes et chez les animaux (**Castillo et al., 2002**)

La famille des peroxydases humaines inclue, la myeloperoxydase, la peroxydase éosinophile, la peroxydase utérine, la lactoperoxydase, la peroxydase salivaire, peroxydase thyroïdienne (**O'Brien, 2000**). Les peroxydases sont des enzymes qui contiennent un hème feriprotoporphyrique IX, qui oxydent une variété de molécules xénobiotiques grâce au peroxyde d'hydrogène. La réaction catalysée par les peroxydases est :



La Peroxydase utilise le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme donneur d'électrons pour oxyder un composé AH<sub>2</sub> en donnant 2 particules d'eau ainsi un composé oxydé (**Perez et al., 2002**)

#### III- 2 Classification de la peroxydase

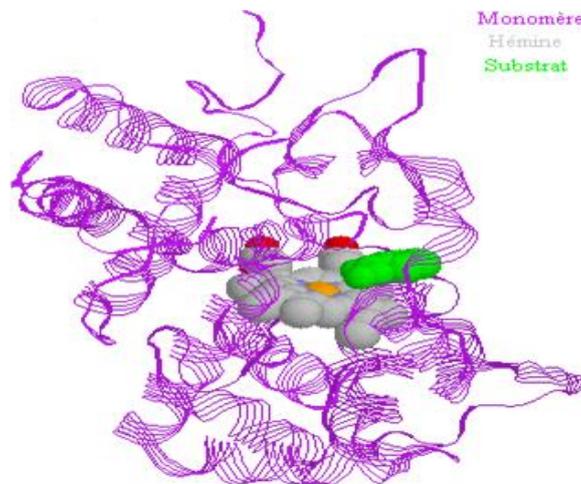
Les peroxydases peuvent être classées le type de leurs sites actifs en 3 groupes : les peroxydases héminiques, les peroxydases vanadium (atome de vanadate) et les peroxydases non métalliques (**Van De Velde et al., 2001**) . Alors qu'en se basant sur leurs séquences en acides aminés, trois familles de peroxydases ont été proposées : classe I ; peroxydases procaryotiques, peroxydases de levure (cytochrome C) et la peroxydase ascorbique, classe II ; les peroxydases fongiques sécrétoires et classe III ; les peroxydases végétales sécrétoires qui comporte du Ca<sup>2+</sup> dans son hème et des ponts disulfures (**O'Brien, 2000**)

#### III-1- 2 Structure de la peroxydase

L'enzyme partage avec bien d'autres protéines une structure chimique appelée hème contenant du fer ionisé et parfois une cystéine ou sélénocystéine qui réalisent une réaction d'oxydo-réduction. Elle utilise notamment le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) comme substrat,

mais d'autres composés. Le fonctionnement de cette protéine héminique est le plus souvent lié à la chimie de l'oxygène et de ses dérivés. (Conesa et al., 2002)

Les peroxydases végétales, fongiques et de levure possèdent environ 300 aa et dont l'hème se lie avec des liaisons non covalentes, alors que celles des mammifères sont plus larges et comprennent entre 576 et 738 aa et dont l'hème se lie avec des liaisons covalentes, cette enzyme est codée sur le chromosome humain 17 (O'Brien, 2000). L'enzyme est composée de 5 hélices et son groupement prosthétique est constitué par la protohématine IX qui est une porphyrine (4 noyaux pyrroles en cercle) liée à un atome de fer sous forme ferrique (O'Brien, 2000). Cette structure enzymatique comporte au niveau de son site actif la triade catalytique : Ser-His-Asp (Van De Velde et al., 2001)



**Figure 5** : Structure de la peroxydase du raifort (Conesa et al., 2002)

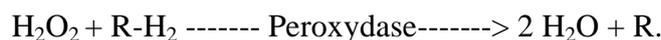
Le tableau suivant résume les activités biologiques de certaines peroxydases de différentes sources.

**Tableau IV : Activités biologiques de certaines peroxydases (Van De Velde et al., 2001)**

Peroxydase	EC No.	Source	Fonction biologique
Chloroperoxydase	1.11.1.10	Caldariomyces fumago	Biosynthèse de caldariomycine
Cytochrome C peroxydase	1.11.1.5	Saccharomyces cerevisiae	Réduction de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et oxydation du cytochrome C
Peroxydase du raifort	1.11.1.7	Racines d'Armoracia rusticana	Biosynthèse d'hormones végétales
Lactoperoxydase	1.11.1.7	Lait bovin	Antimicrobien
Peroxydase de la lignine		Phanerochaete chrysosporium	Dégradation de la lignine
Myeloperoxydase	1.11.1.7	Leucocytes humaines	Antimicrobien

### III-1- 3 Suivi de l'activité peroxydase

Le gaïacol substrat de synthèse de l'enzyme mélangé à de l'eau oxygénée diluée montre la présence de peroxydase donnant une couleur brun-rose. La réaction colorée en présence de peroxydase selon l'équation chimique suivante :



Donneur d'hydrogène + (gaïacol, incolore)  $\longrightarrow$  Donneur oxydé (coloré)  
(Sakharov et al., 2001)

### III-1-4 Rôles de la peroxydase

Les peroxydases des mammifères jouent un rôle important dans la synthèse des hormones thyroïdiennes ainsi que dans la défense contre les agents pathogènes car elle se localise dans presque toutes les cellules immunitaires de l'organisme (O'Brien, 2000)

Les peroxydases végétales jouent un rôle dans le métabolisme de l'auxine, hormone responsable de la croissance et développement de la plante, comme elles jouent un rôle essentiel dans la défense extracellulaire contre les agents pathogènes et le stress, dans la biosynthèse et la dégradation de la lignine. Elles sont, également, responsables de l'oxydation intracellulaire des réducteurs toxiques. Elles sont induites par le stress, l'attaque par des agents pathogène et les UV. (Mohsina et Khalil-ur-Rehman, 2009)

### III-2 L'alpha glucosidase

Afin d'éclaircir l'étude expérimentale exposée dans ce manuscrit, l'alpha glucosidase sera présentée dans ce qui suit :

### **III-2-1 Généralités**

Alpha glucosidase [EC 3.2.1.20 ; alpha-D-glucoside glucohydrolase] est une exo-carbohydrolase responsable de l'hydrolyse du glycogène. L'enzyme est codée par les gènes GAA du chromosome 17q25 synthétisée en précurseur de 110 kDa qui devient une enzyme lysosomale mature de 76 kDa. (Yoshimizu *et al.*, 2008).

### **III-2-2 Classification des alphas glucosidases :**

Ces enzymes ont différentes spécificités de substrats qui permettent de les classer dans deux familles d'alpha glucosidases (familles I et II) et en trois types (I, II et III) respectivement en fonction de leur structure primaire et leur spécificité de substrat (Chiba, 1988, 1997 ; Kimura *et coll.*, 2004). Les enzymes qui appartiennent à la famille I hydrolysent mieux les substrats hétérogènes comme les aryl-alpha-D-glucosides et le saccharose par rapport au maltose (type I). Les enzymes appartenant à la famille II sont très actives en présence des substrats homogènes et sont groupés par convention dans les types II et III.

Les alphas glucosidases de types II et III sont très proches les unes des autres par rapport à la spécificité de substrat, mais celles de type III sont les seules capables de bien hydrolyser les alphas glucanes comme l'amidon soluble, le glycogène ainsi que les malto-oligosaccharides (Chiba, 1997 ; Frandsen *et Svensson*, 1998).

Les alphas glucosidases des familles I et II correspondent respectivement aux familles 13 et 31 des GH (Henrissat, 1991 ; Henrissat *et Davies*, 1995). Différents types d'alphas glucosidases sont isolées des tissus animaux, des plantes et des microorganismes (Chiba, 1988). Les enzymes de la famille 13 des GH ont également plusieurs régions bien définies dont les séquences en amino-acides sont hautement conservées. La recherche d'homologies de séquences a notamment permis de révéler dans les séquences des alphas glucosidases de cette famille, les quatre séquences consensus (**Tableau V**) de la famille des alphas amylases (Kimura, 2000).

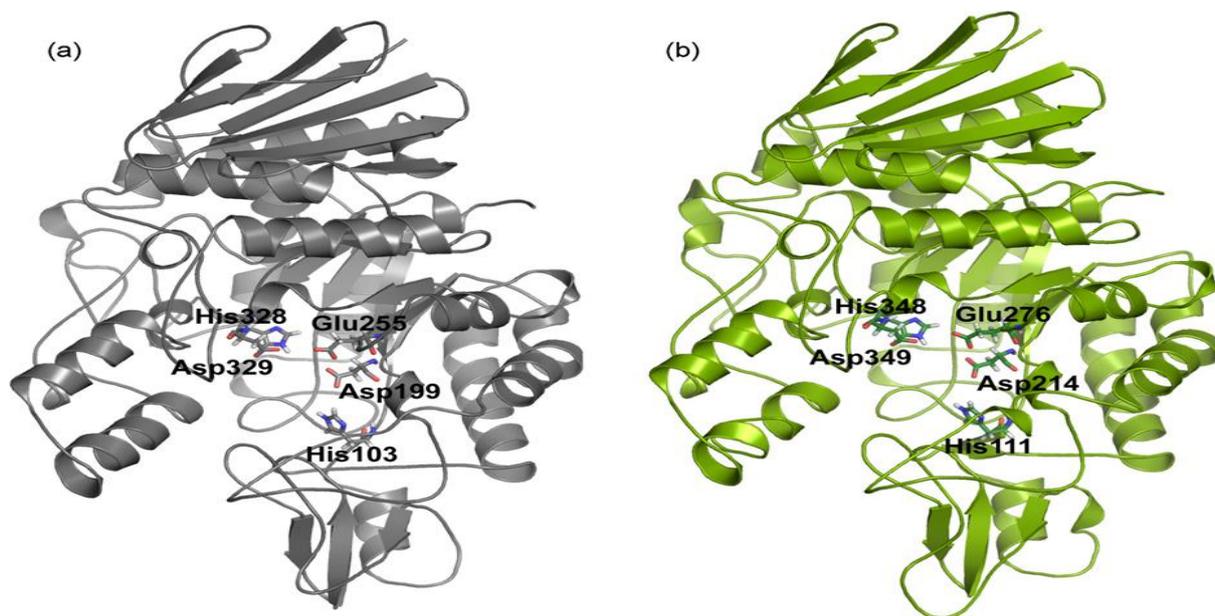
Le tableau suivant montre les différentes séquences consensus de la famille 13 des alphas glucosidases.

**Tableau V** : Séquences consensus de la famille 13 des GH (Kimura, 2000).

Enzyme	Région I	Région II	Région III	Région IV
<i>S. cerevisiae</i>	106_DLVI NH	210_GFR I DTAGL	276_EVAH	344_Y I ENHD
<i>B. sp</i> (SAM 1606)	113_DLVA NH	210_GFRMDV INA	271_ETGG	340_YWTNHD
HBGase I	116_DLVP NH	225_GFR I DAVPH	298_EAFS	355_VMG NHD
HBGase II	118_DFVP NH	218_GFR I DA INH	291_EAYT	348_VS GNHD
HBGase III	119_DFVP NH	219_GFRV DALPY	286_EAYT	343_VP GNHD
<i>A. amylase</i> ( <i>A. oryzae</i> )	117_DVVANH	202_GLR I DTVKH	230_EVLD	292_FV ENHD

### III-2 -3 Structure de l'alpha glucosidase

Les alphas glucosidases de la famille I ont les mêmes caractéristiques que toutes les autres enzymes de la famille 13 des GH ou famille des alphas amylases. Cette famille d'enzymes renferme environ 30 activités différentes. Elles sont caractérisées par un mécanisme de réaction avec rétention, une structure multimodulaire avec un domaine catalytique en forme de tonneau (b/a)8, quatre séquences consensus et la triade catalytique (1 Glu et 2 Asp.) Comprenant un résidu donneur de proton (Glu) et un nucléophile (le premier Asp.) (McGregor et coll., 2001).



**Figure 6** : Structure en rubans résolue de l'alpha glucosidase de levure. (a) homologie de la structure de l'alpha glucosidase modelée, (b) avec les résidus catalytiques conservés (Bharatham et al, 2008)

### **III-2-4 Réaction hydrolysée**

Elle catalyse l'hydrolyse des liaisons alpha glucosidiques  $\alpha$ .1-4 et  $\alpha$ . 1-6 à l'extrémité non réductrice terminale de son substrat ainsi que la réaction de trans-glucosylation pour synthétiser des composés alpha glucosylés et des glucooligosaccharides de différentes tailles et liaisons osidiques (**Chiba, 1979 ; Kato et coll., 2002 ; Kobayashi et coll., 2003**)

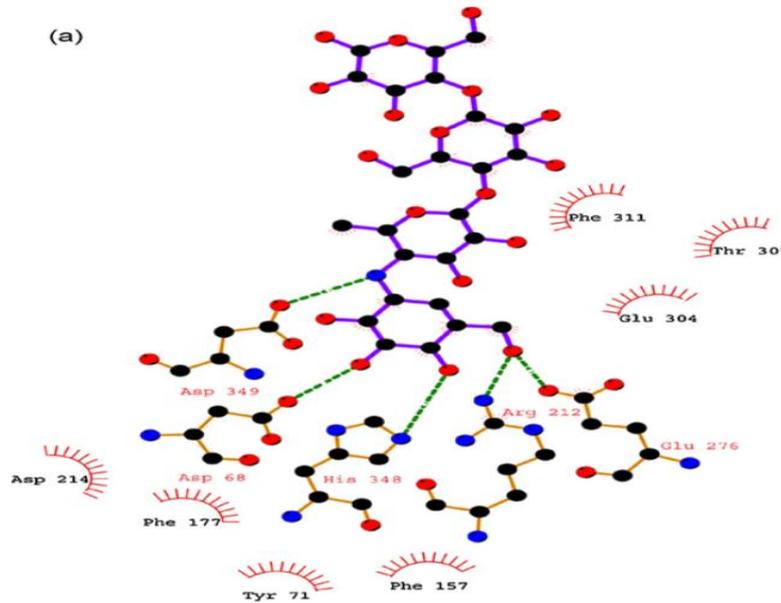
### **III-2-5 L'acarbose inhibiteur de l'alpha glucosidase**

Les agents hypoglycémisants oraux (OHA) inhibent compétitivement et réversiblement les enzymes de l'intestin grêle. Ces enzymes étant responsables de l'hydrolyse des oligosaccharides et les disaccharides en monosaccharides souhaitables pour l'absorption intestinale (**Bharatham et al, 2008**)

L'acarbose (Glucor®), le miglitol (Diastabol®) et le voglibose sont des dérivés de sucres utilisés en médecine pour traiter l'hyperglycémie postprandiale, le HIV et les maladies liées, les dérivés des chalcones sulfonamides sont des inhibiteurs de l'alpha glucosidase de nature non sucrés récemment découverts et les dérivés des imminocyclitols inhibiteurs potentiels avec des activités expérimentales dans l'ordre des micromolaires (**Bharatham et al, 2008**)

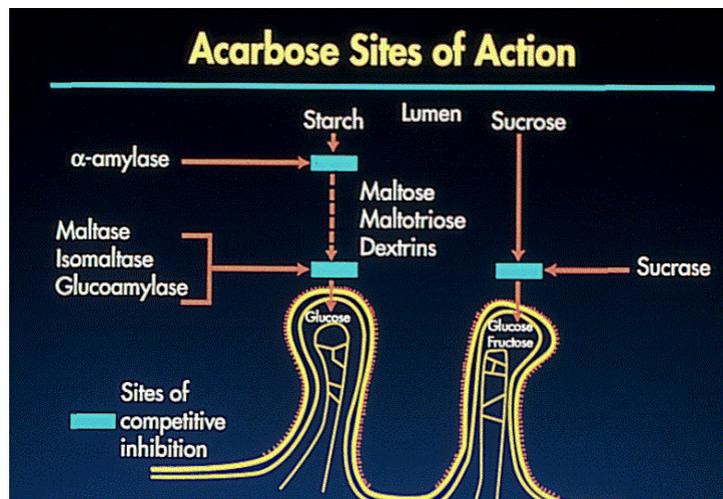
L'acarbose (Prandase®) est un pseudotétracosaccharide qui diffère des oligosaccharides de notre alimentation par l'attachement d'un groupe aminoglucidique sur le groupe  $\alpha$ -D-glucopyranose. Cette molécule se lie sur la bordure des microvillosités de l'intestin grêle ce qui provoque un ralentissement de l'absorption des sucres (**Shim et al., 2003**).

La fixation de l'acarbose entraîne une diminution du pic de production d'insuline secondaire à une concentration de glucose postprandial. Son pic sanguin est atteint au bout d'une heure et sa durée d'action est de 2 heures. L'acarbose est habituellement utilisé en combinaison avec l'insuline chez les diabétiques de type II (**Alice et al., 2004**)



**Figure 7** : Représentation en 2D du complexe protéine (site actif) - acarbose (**Bharatham et al, 2008**)

L'inhibition de l'alpha glucosidase par l'acarbose a fait l'objet de plusieurs études. **Bharatham et ses collaborateurs (2008)** ont démontré qu'en comparant la conformation déposée de l'acarbose et la structure cristalline de la 4-alpha-glucanotransferase de *Thermotoga maritima* (PDBID:1LWJ) par alignement de leurs structures respectives, la structure de l'acarbose interagit similairement avec les résidus du site actif correspondants incluant les liaisons hydrogènes entre ses groupements amines et l'Asp 278.



**Figure 8** : Sites d'action de l'acarbose au niveau de l'alpha glucosidase (**Bharatham et al, 2008**).

# **Matériel et méthodes**

## Matériel et méthodes

### 1- Matériel végétal

Notre étude est portée sur *Ajuga iva*, (récoltée à Kendira) et *Rhamnus alaternus*, (récoltée à Taghzouit) à Bejaia en mars 2012. Seules les parties aériennes d'*Ajuga iva* et les feuilles de *Rhamnus alaternus* ont été utilisées lors de la présente étude.

#### 1-2 Préparation de la plante

##### 1-2-1 Séchage

*Ajuga iva* (parties aériennes) et *Rhamnus alaternus* (feuilles), ont été cueillis, puis lavés dans le but d'éliminer toutes traces de poussières et d'impuretés. *Ajuga iva* et *Rhamnus alaternus* sont séchées à l'étuve à 40°C pendant 10 jours.



**Figure 9** : Parties aériennes d'*Ajuga iva* et feuilles de *Rhamnus alaternus* séchées

##### 1-2-2 Broyage

Une fois séchées, les plantes ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique, jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. La poudre obtenue sera conservée à température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité.



**Figure10** : Poudres des deux plantes

### 1-3 Extraction et identification des flavonoïdes

La méthode de **Markham (1982)** était suivie pour l'extraction des flavonoïdes avec quelques modifications, en utilisant des solvants organiques à polarité croissante. 20 gr de chaque poudre ont été mélangés à 200ml du méthanol/eau distillée (85/15%) : les deux mélanges sont soumis à une agitation magnétique pendant une nuit à 4°C, puis on les a laissé reposer quelques heures au réfrigérateur. Les surnageant des deux échantillons ont été par la suite récupérées par filtration, ce filtrat nommé filtrat 1 pour chaque plante et ont été conservés à 4°C. Les culots des solutions précédentes ont été mélangées à 150ml de méthanol/eau distillée (85/15%) et ont été remis à une deuxième agitation magnétique pendant une nuit, après repos, une deuxième filtration a été réalisée et les obtenus ont été mélangés aux premiers. Une dernière extraction a été effectuée pour les deux culots de la deuxième étape. Ces derniers ont été mélangés avec 1 litre de méthanol 50% et on a récupéré les derniers filtrats qui ont été mélangés aux précédents. Les mélanges ont été filtré une dernière fois sur papier filtre et débarrassés des cires, des lipides et de la chlorophylle par trois lavages successifs avec de l'hexane. Les deux phases (aqueuse et organique) obtenues des deux mélanges ont été séparées après décantation. Les phases organiques ont subi une évaporation à l'étuve à 40°C pendant une journée pour obtenir les extraits bruts. Les phases aqueuses sont reprises avec de l'eau chaude et épuisés avec de l'éther éthylique. Cette étape nous permet d'avoir les extraits flavonoïdiques totaux. Elles sont lyophilisées et conservées jusqu'au moment d'utilisation.

Les composés isolés ont été analysés par chromatographie sur couche mince (plaques commerciales pré-coulées (HPTLC gel de silice 60 F 254). Le taux d'extraction est calculé selon la formule suivante :

$$R(\%) = M / M_0 \times 100$$

**R (%)** : Rendement exprimé en %.

**M**: Masse en gramme de l'extrait sec résultant

**M<sub>0</sub>** : Masse en gramme du matériel végétal à traiter

## **2 Chromatographie sur couche mince**

### **2-1 Principe**

Cette méthode se repose sur la séparation des différents constituants d'un extrait selon leur force de migration dans la phase mobile (**Ekoumou 2003, Debete 2005**), qui est en général un mélange de solvants adaptés au type de séparation recherchée (**Ferrari, 2002**), et leur affinité vis-à-vis de la phase stationnaire qui peut être un gel de polyamide ou de silice. Elle nous permette d'avoir les empreintes du contenu flavonoïdiques des extraits. La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple dont le principe est basé sur le phénomène d'adsorption. Elle est utilisée dans la séparation et l'identification des molécules pures, les extraits (mélange complexes de métabolites) et les échantillons biologiques.

Trois microlitres de chaque extrait sont déposés à des points précis, à 1cm du bord inférieur de la plaque de gel de silice (10x10 cm).

### **2-2 CCM sur gel de silice**

**Phase stationnaire :** HPTLC gel de silice 60 F 254. Merck. KGaA. Lot : 013 333 609.

**Phase mobile :** Toluène/ Butanone/ Méthanol (4/3/2 ; v/v) (**Bennaghmouch et al., 2002**)

**2-3 Extraits :** phases aqueuses et phases organiques des extraits flavonoïdiques d'*Ajuga iva* et de *Rhamnus alaternus*.

Les échantillons sont solubilisés dans du méthanol et déposés sur la plaque. Une fois la migration des échantillons terminée, les plaques sont séchées à l'étuve (40°C pendant 5 minutes). La visualisation des spots (taches) a été réalisée sous lampe UV à deux longueurs d'ondes différentes (253 et 360 nm).

### **3 Dosage des flavonoïdes**

#### **3-1 Principe**

Les méthodes de dosage des flavonoïdes sont le plus souvent colorimétriques ; elles reposent sur la capacité de ces composés à former des complexes chromogènes avec le trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>), qui donne à la solution une coloration jaunâtre dont le pic d'absorption est à la longueur d'onde 410 nm (**Bahorun et al., 1996**)

#### **3-2 Mode opératoire**

Des solutions mères à 1mg/ml pour les phases aqueuses et 0.5mg/ml pour les phases organiques des deux plantes *Ajuga iva* et *Rhamnus alaternus* ont été préparés, ces solutions ont été ajoutées à 1ml de AlCl<sub>3</sub> à 2% et complété par de l'éthanol 99% pour avoir un volume totale de 2ml. Les solutions sont mélangées à l'aide d'un vortex et mis en incubation durant 15 minutes à l'obscurité. Les différentes absorbances sont mesurées à 410nm.

La courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions que les extraits avec la quercétine préparée à 1mg/ml et diluée pour avoir les différentes concentrations suivantes : 0, 5, 10, 15, 20, 25µg/ml.

Le blanc est préparé de la même façon sauf que l'extrait est remplacé par le méthanol.

La concentration des flavonoïdes dans l'extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligrammes équivalents de quercétine par grammes du poids d'extrait (mg EQ / g d'extrait).

## 4 Activités anti radicalaire et antioxydante

### 4-1 Détermination de l'activité scavenger du radical DPPH

#### 4-1-1 Le principe

Pour évaluer l'activité antioxydante, nous avons utilisé la méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) selon le protocole décrit par **Sanchez-Moreno et al., (1998)**. Dans ce test les antioxydants réduisent le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphénylpicrylhydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons.

La réaction se résume ainsi :



#### 4-1-2 Mode opératoire

L'évaluation de l'activité radicalaire des antioxydants (les flavonoïdes) sur le radical DPPH\* (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), a été estimée selon la méthode de **Athamena et al., 2010** avec quelques variations.

16mg /ml d'extrait des deux phases aqueuse et organique de *Rhamnus alaternus* dilués à différentes concentrations (0, 80, 100, 200, 300, 400µg/ml) ont été ajoutées à 975 µl de solution méthanolique de DPPH à 5mM complété avec du méthanol à 99% jusqu'à atteindre un volume totale de 1ml. Le tout a été mélangé et incubé pendant 30min à l'obscurité et à température ambiante. Les différentes absorbances ont été lues à 517 nm. L'absorbance du témoin est de 0.078.

Un standard a été réalisée en utilisant une série de dilutions de la quercétine (0, 25, 50, 75, 100µg/ml).

Le pourcentage de l'activité scavenger du radical DPPH a été calculé comme suivant :

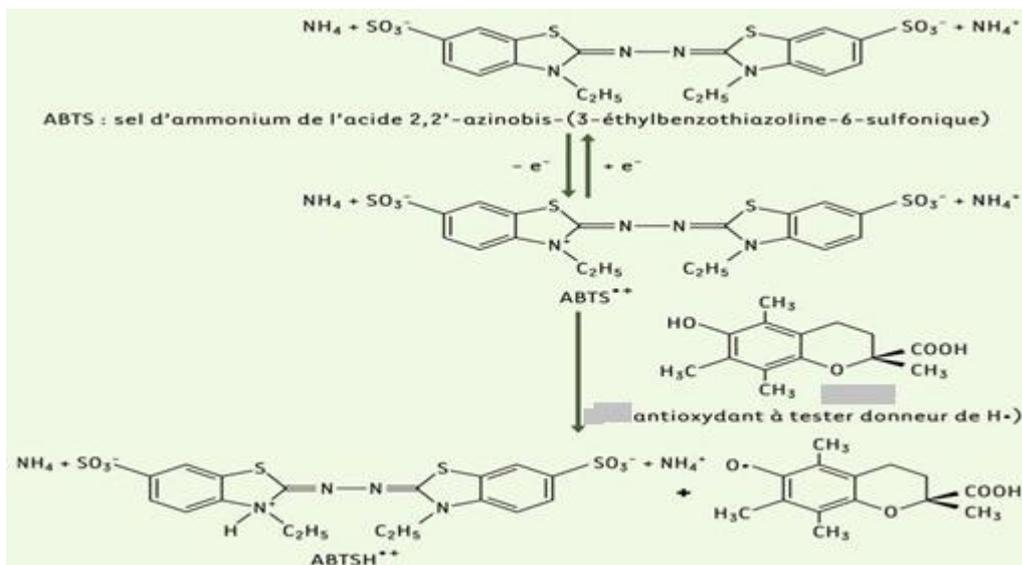
$$\% \text{ d'activité scavenging du DPPH} = \{A_0 - (A_1 - A_2)/A_0\} \times 100$$

Telle que **A0** : l'absorbance de la solution contrôle (contient uniquement le DPPH), **A1** : l'absorbance du standard + DPPH, **A2** : l'absorbance du standard sans DPPH, tous les tests se réalisent 3 fois et les résultats sont exprimés par la moyenne plus ou moins l'écart type.

## 4-2 Test d'ABTS

### 4-2-1 Le principe

Dans la méthode TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), l'activité antioxydante totale d'une molécule est déduite de sa capacité à inhiber le radical  $ABTS^{•+}$ , obtenu à partir de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) comparativement à un antioxydant de référence : le Trolox<sup>®</sup> (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique). Le radical  $ABTS^{•+}$ , en contact avec un donneur de  $H^•$  conduit à l' $ABTS^+$  et à la décoloration à 734 nm de la solution. Le radical  $ABTS^{•+}$  (absorbant à 734 nm) est formé par arrachement d'un électron  $e^-$  à un atome d'azote de l'ABTS. En présence d'antioxydant donneur de  $H^•$ , l'atome d'azote concerné piège un  $H^•$ , conduisant à l' $ABTS^+$ , ce qui entraîne la décoloration de la solution (Marc et al., 2004)



**Figure 11** : Formation et piégeage du radical  $ABTS^{•+}$  par un antioxydant donneur de  $H^•$  (Marc et al., 2004)

### 4-2-2 Mode opératoire

L' $ABTS^{•+}$  a été préparé en solubilisant la poudre à 7mM dans un tampon de persulfate de potassium à 2.45 mM. La préparation a été incubée à température ambiante et à l'obscurité

pendant 16h. Lors de son utilisation ; la solution sera diluée dans de l'eau distillée jusqu'à obtention d'une absorbance de  $0.7 \pm 0.02$  à 734nm. (Pitchaon, 2011).

20 µl de chacun des extraits à une concentration de 1mg/ml seront ajoutées à 2ml de la solution ABTS<sup>+</sup> diluée et la DO a été mesurée à 734nm.

Le standard utilisée dans ce test est le trolox qui est un antioxydant synthétique solubilisé dans du tampon phosphate à 2.5 mM. La solution a été diluée pour obtenir une gamme de concentrations : 2.5, 2, 1.5, 1, 0.5mg/ml. L'absorbance du témoin pure est de 0.701

Les absorbances ont été mesurées chaque minute après incubation. À la septième minute, l'absorbance a été utilisée afin de calculer le pourcentage d'activité scavenger du radical ABTS<sup>+</sup> des extraits des deux plantes. L'absorbance du standard est 0.715. La formule suivante montre la méthode de calcul du pourcentage d'inhibition :

$$\text{PI (radical ABTS}^{+\cdot}) = (\text{As} - \text{A1}) / \text{A0} \times 100$$

PI : pourcentage d'inhibition de radical ABTS<sup>+</sup>.

As : Absorbance du blanc (contenant seulement l'ABTS<sup>+</sup>).

A1 : Absorbance de la solution de l'ABTS<sup>+</sup> contenant l'extrait de la plante.

A0 : Absorbance du solvant de suspension dans la solution de l'ABTS<sup>+</sup>.

### 4-3 Le pouvoir réducteur

#### 4-3-1 Principe de la méthode

Le principe de cette méthode consiste en la réduction de l'ion ferrique fe<sup>3+</sup> en l'ion ferreux fe<sup>2+</sup> en la présence de molécules antioxydantes donatrices d'électrons, le fe<sup>2+</sup> produit est mesuré à 700nm, il y'aura formation d'une couleur perle bleu de Prusse (Moktan et al., 2008)

L'absorbance augmente au fur et à mesure que le pouvoir réducteur augmente, Le FeCl<sub>3</sub> est le déclencheur (le substrat).

#### **4-3-2 Mode opératoire**

Les solutions mères 1mg/ml pour les phases aqueuses et 3mg/ml pour les phases organiques ont été diluées à des concentrations allant de 20 à 800µg/ml solubilisés dans 200µl de tampon phosphate à 0.2M et pH 6.5 et ajoutées à 200µl de ferricyanure de potassium (0.1%), les solutions ont été incubées à 50°C pendant 20 minutes.

Après incubation, 250µL de (acide trichlorure acétique 5g/50ml) ont été additionnés aux solutions précédentes. Le tout centrifugé à 3000g pendant 10 minutes. 500 µl d'eau distillée puis 20 µl de FeCl<sub>3</sub> (0.1g/100ml) ont été ajoutées.

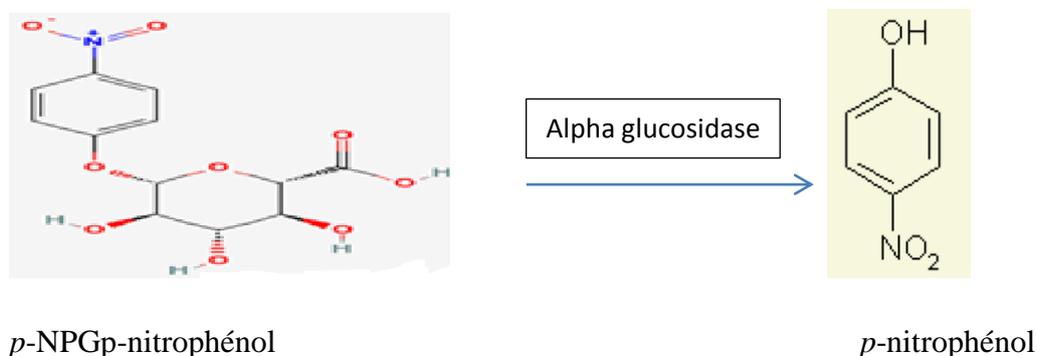
Les solutions ont été incubées à 37°C pendant 10 minutes et la lecture des absorbances a été effectuée à 700 nm

Le blanc a été fait en remplaçant l'extrait par une solution de 10% de DMSO, (diméthyl sulfoxyde) et préparé dans les mêmes conditions.

## 5 Test de l'alpha glucosidase

### 5-1 Principe de la méthode

La méthode est basée sur la mesure par spectrophotométrie de l'hydrolyse du *p*-nitrophényl-alpha-D-glucopyranoside (*p*-NPG) en *p*-nitrophénol, résultat de la réaction catalysée par l'alpha glucosidase.



**Figure12** : Principe du test de l'alpha glucosidase.

### 5-2 Mode opératoire

#### 5-2-1 Présentation des solutions

Les solutions de l'alpha-D-glucosidase (maltase de levure), EC : 3.2.1.20, et son substrat *p*-NPG (4-Nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside, Sigma), ont été préparés selon la méthode de **Kim et ses collaborateurs (2005)** avec quelques modifications.

La solution enzymatique a été préparé en la solubilisant dans du tampon phosphate (0.1M, pH=6.9) à une concentration de 65 $\mu$ g/ml. Le substrat, *p*-NPG a été solubilisé dans du tampon phosphate (0.1M, pH= 6.9) à une concentration de 1.9mg/ml. Les extraits ont été préparés dans une solution tampon phosphate 10% DMSO (10% DMSO, 90% tampon phosphate) pour les phases organiques afin d'obtenir une série de concentration (3mg/ml, 1.5mg/ml, 1mg/ml, 0.75mg/ml). Les extraits aqueux ont été préparés dans du tampon phosphate (0.1M, pH = 6.9) afin d'obtenir la même gamme de concentrations que les extraits précédents

#### 5-2-2 Procédé expérimental

Différentes concentrations des extraits aqueux et organiques des deux plantes (3mg/ml, 1.5mg/ml, 1mg/ml, 0.75mg/ml) ont été préparés. Un volume de 250 $\mu$ l de chaque tube a été prélevé et ajouté à 1ml de la solution d'enzyme dans d'autres tubes à essais et les

concentrations seront dans cet ordre : 0.5, 0.25, 0.125, 0.062mg/ml. Le mélange d'enzyme et d'extrait ont été ensuite homogénéisés et incubés à 37°C pendant 10min. Après incubation, un volume de 250ul de substrat a été ajouté au mélange précédent. L'absorbance a été mesurée à 405 nm par spectrophotomètre immédiatement après l'addition du substrat et a été suivis pendant 5 minutes.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = (\text{DO control} - \text{DO échantillon}) / \text{DO control} \times 100$$

## 6 Test de l'activité anti-Peroxydase

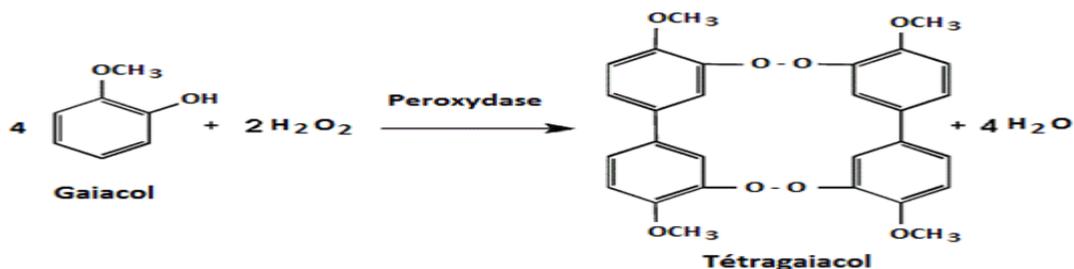
### 6-1 Extraction de l'enzyme

L'extraction de la peroxydase a été effectuée à partir de têtes de choux, lavés et nettoyés, coupés et homogénéisés à l'aide d'un mixeur réglé à haute vitesse pendant 3 minutes. Au fur et à mesure de l'homogénéisation, 30 ml d'eau distillée ont été ajoutés, les étapes ont été faites à basse température 4°C.

L'homogénéisât a été ensuite filtré sur papier filtre et centrifugé à 10000g pour 15 minutes à 4°C, le surnageant contenant la peroxydase diluée à 25%(25 ml de l'extrait + 75ml d'eau distillée) a été stocké à - 20°C jusqu'à utilisation (**ponce et al., 2004**)

### 6-2 Principe

La méthode repose sur la mesure de l'activité de la peroxydase en présence de son substrat. La réaction donne une couleur brun-rose à la longueur d'onde de 470nm et on notera une augmentation dans le temps de l'absorbance, selon la réaction suivante :



**Figure 13** : Réaction de la peroxydase transformant le gaïacol en tétragaïacol

### 6-3 Mode opératoire

### **6-3-1 Préparation des solutions**

La solution des substrats a été effectuée en mélangeant 5 ml de gâïacol 1%, 5ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0.3% et 50ml de tampon phosphate (pH 6.5, 0.01M)

### **6-3-2 Déroulement du test**

Différents tubes à essais ont été préparés en mettant 1.4ml de la solution substrats mélangée à 100 µl de la solution d'extrait à différentes concentration de (6mg/ml, 3mg/ml, 1.5mg/ml, 0.75mg/ml), après la mesure de la DO à 470nm, 20µl de la solution d'enzyme a été ajoutée. La DO a été mesuré une deuxième fois à 470 nm immédiatement après l'ajout de la solution enzymatique. Le blanc a été préparé en remplaçant la solution d'enzyme par 20µl de tampon phosphate.

Le calcul du pourcentage de l'inhibition de la réaction enzymatique a été réalisé par calcul de la  $\Delta DO/\Delta t$  pour chaque extrait et de l'activité enzymatique sans extrait, et selon l'équation suivante :

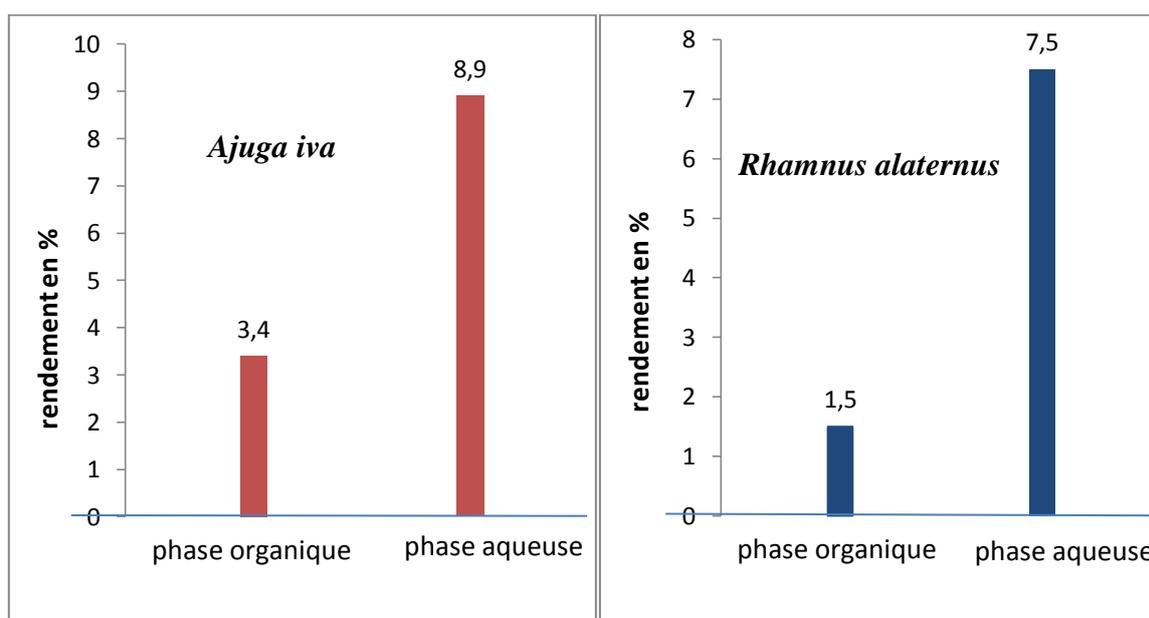
$$\% \text{ d'inhibition} = (\text{Control} - \text{échantillon} / \text{control}) \times 100$$

# **Résultats et discussions**

## Résultats et discussion

### 1- Extraction et identification des flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes par la méthode d'épuisement par les solvants organiques à partir de la poudre de parties aérienne et feuilles (flavonoïdes) des deux plantes respectivement ; *Ajuga iva* et *Rhamnus alaternus*, montre que les flavonoïdes polaires (extraits aqueux) donnent les rendements d'extraction les plus élevés (8.9%) et (7.5%) par rapport aux extraits organiques (flavonoïdes apolaires) (3.4%) et (1.5%) respectivement (Markham *et al.*, 2003). Les rendements d'extraction sont présentés sur les figures suivantes.



**Figure 14 :** Rendement en flavonoïdes présents dans les extraits aqueux et organiques des deux plantes.

On remarque que les phases aqueuse et organique d'*Ajuga iva* ont les rendements d'extraction en flavonoïdes les plus élevés (phase aqueuse 8.9%, phase organique 3.4%) par rapport aux deux phases de *Rhamnus alaternus*. Ceci indique qu'*Ajuga iva* est plus riche en flavonoïdes que *Rhamnus alaternus* (phase aqueuse 7.5% et phase organique 1.5%).

Plusieurs études ont démontré que les taux en flavonoïdes dans la phase aqueuse d'*Ajuga iva* est de  $7.80 \pm 0.52\%$  (ADJADJ, 2009). Bouguendoura (2011) a démontré que le taux en flavonoïdes des phases organique et aqueuse d'*Ajuga iva* sont de 6.43% et 25% respectivement. Ces recherches nous ont permis de comparer nos résultats et d'indiquer que par rapport à l'étude d'ADJADJ (2009), la phase aqueuse d'*Ajuga iva* de cette présente étude

montre un rendement légèrement important alors que les résultats de **Bouguandoura (2011)** sont largement plus importants que ceux de la présente étude.

Ceci peut être dû au temps de récolte qui s'est effectué pendant l'hiver pour la présente étude alors que pour l'étude de **Bouguandoura (2011)**, la récolte s'est effectuée au printemps

## 2- Chromatographie sur couche mince

Le système d'élution : Toluène/ Butanone/ Méthanol (4/3/2 ; v/v) pour les différents extraits des deux plantes *Ajuga iva* et *Rhamnus alaternus* a permis d'avoir le chromatogramme suivant :



**Figure 15** : Profil de ccm d'*Ajuga iva* et *Rhamnus alaternus* (1) : phase aqueuse d'*Ajuga iva*, (2) : phase organique d'*Ajuga iva*, (3) : phase aqueuse *Rhamnus alaternus*, (4) : phase organique *Rhamnus alaternus*.

Les rapports frontaux ont été calculés de la manière suivante :

$$RF = \frac{\text{Distance parcourue par la substance}}{\text{Distance parcourue par le front du solvant}}$$

La ccm a permis de séparer des flavonoïdes des extraits aqueux et organiques des plantes étudiées. Les spots présentent la même coloration violette sauf pour la quercétine (jaune) et des Rf différents. Ces taches ont été visualisés sous lampe UV à la longueur d'onde 365 nm. Le tableau ci-dessous résume les différentes données obtenues à partir du profil de ccm. Une tentative d'identification des flavonoides correspondants à chaque spot a été réalisée en comparant les Rf obtenus à ceux cités dans la bibliographie et dans lesquelles la méthode d'extraction et les conditions de ccm sont identiques à celles utilisées lors de la présente étude.

**Tableau VI** : Résultats de la CCM pour les deux phases aqueuse et organique d'*Ajuga iva*.

Spots	RF	Nom de chaque molécule (Bennaghmouch et al., 2002)
Tache 1 (phase aqueuse)	0.18	-
Tache 2 (phase aqueuse)	0.35	Quecétine
Tache 3 (phase aqueuse)	0.5	-
Tache 4 (phase aqueuse)	0.54	-
Tache 5 (phase aqueuse)	0.58	5,7-dihydroxy 4',5'-diméthoxy flavone
Tache 6 (phase aqueuse)	0.83	naringénine
Tache 7 (phase aqueuse)	0.9	-
Tache 8 (phase aqueuse)	0.95	-
Tache 1 (phase organique)	0.83	naringénine
Tache 2 (phase organique)	0.85	-
Tache 3 (phase organique)	0.89	-
Tache 4 (phase organique)	0.95	-

**Tableau VII** : Résultats de la CCM pour les deux phases de *Rhamnus alaternus*.

Les différents spots	RF	Nom de chaque molécule (Bennaghmouch et al., 2002)
Tache 1 (phase aqueuse)	0.33	Quercétine
Tache 2 (phase aqueuse)	0.47	-
Tache 3 (phase aqueuse)	0.59	5,7-dihydroxy 4',5'-diméthoxy flavone
Tache 4 (phase aqueuse)	0.66	-

Tache 5 (phase aqueuse)	0.81	Apigénine
Tache 6 (phase aqueuse)	0.86	-
Tache 7 (phase organique)	0.91	-
Tache 1 (phase organique)	0.67	-
Tache 2 (phase organique)	0.83	Naringénine
Tache 3 (phase organique)	0.89	-
Tache 4 (phase organique)	0.94	-

Ces résultats indiquent que les deux plantes sont relativement riches en composés flavonoïdiques, notamment *Ajuga iva*, ce qui est en accord avec des études déjà publiées (**Bennaghmouch et al., 2002, Ben Ammar et al., 2008**) Les phases aqueuses d'*Ajuga iva* et de *Rhamnus alaternus* renferment le nombre le plus élevé en composés flavonoïdiques (8 spots pour *Ajuga iva* et 7 spots pour *Rhamnus alaternus*) comparées aux phases organiques des deux plantes.

### 3- Dosage des flavonoïdes

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

A partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine, les concentrations ont été calculées et exprimées en mg EQ / g d'extrait (Annexe). Les proportions en flavonoïdes des deux phases aqueuses d'*Ajuga iva* et de *Rhamnus alaternus* sont de  $48.59 \pm 6.23$  mg EQ/ g E et de  $7.28 \pm 0.33$  mg EQ / g E respectivement et des deux phases organiques qui sont de  $88.96 \pm 7.46$  mg EQ / g E et de  $146 \pm 20.81$  mg EQ/ g E. la concentration en flavonoïdes dans les phases organiques des deux plantes pourrait être due à la méthode d'extraction utilisée qui a permis une bonne séparation et purification des flavonoïdes apolaires grâce à l'utilisation des solvants adéquats. La faible teneur des phases aqueuses en flavonoïdes polaires, pourrait être expliquée par la présence d'autres molécules (à part les flavonoïdes) ce qui explique les rendements élevés de ces deux phases. Le tableau suivant résume les taux en flavonoïdes des différentes phases des deux plantes en mg EQ/ 100g d'extrait.

**Tableau VIII** : Les proportions en flavonoïdes des deux plantes en mg EQ /100g d'extrait

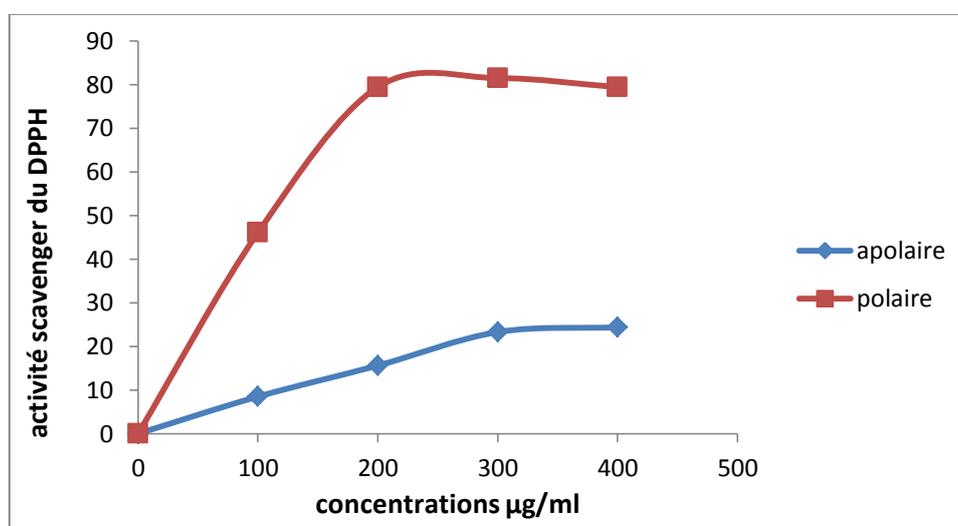
Les phases	Aqueuse d' <i>Ajuga iva</i>	Aqueuse de <i>Rhamnus alaternus</i>	Organique d' <i>Ajuga iva</i>	Organique de <i>Rhamnus alaternus</i>
Les proportions en flavonoïdes (mg EQ/100g d'extrait)	432.45	54.6	302.46	219

**Ben Ammar et ses collaborateurs (2007)** ont démontré que *Rhamnus alaternus* contient  $423 \pm 19$  d'oligomères flavonoïdiques totaux alors que son extrait méthanolique ne contient que  $283 \pm 11$  de flavonoïdes en mg EQ. Les résultats obtenus lors de la présente étude sont légèrement inférieures à celle de (**Ben Ammar et al., 2007**).

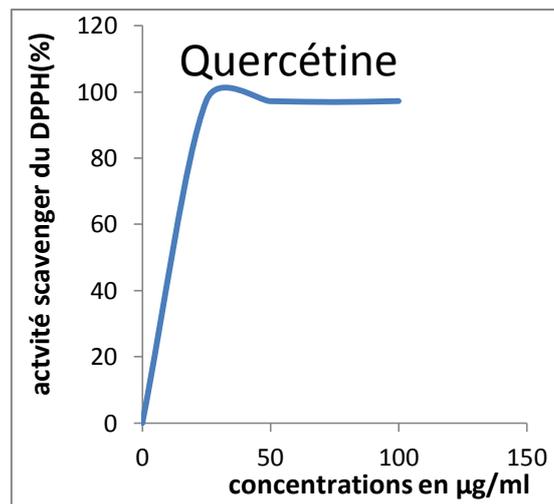
#### 4- Evaluation du pouvoir anti-radicalaire des flavonoïdes

##### 4-1 Activité anti-DPPH<sup>+</sup>

L'activité anti-radicalaire *in vitro* des flavonoïdes de *Rhamnus alaternus* et de la quercétine ont été évaluées par la mesure du taux de DPPH<sup>+</sup> après l'addition des extraits de *Rhamnus alaternus* et de la quercétine à différentes concentrations. Les résultats sont présentés sur les figures suivantes :



**Figure 16** : Activité scavenger du DPPH<sup>+</sup> des flavonoïdes polaires et apolaires de *Rhamnus alaternus* à différentes concentrations.



**Figure 17 :** Activité scavenger du radical DPPH<sup>+</sup> de la quercétine.

Les IC<sub>50</sub> sont calculés et les résultats sont présentés sur le tableau suivant :

**Tableau IX :** Les différentes IC<sub>50</sub> de la quercétine, la phase aqueuse et la phase organique de *Rhamnus alaternus*

Echantillon	quercétine	Flavonoïdes polaires	Flavonoïdes apolaires
IC <sub>50</sub> µg/ml	10.29	150	> 400µg/ml

L'effet anti radicalaire des extraits de flavonoïdes est dose dépendant. Le pouvoir antioxydant des flavonoïdes polaires de *Rhamnus alaternus* vis à vis du DPPH<sup>+</sup>, le plus élevé (81, 48 %) a été observé à une concentration de 0.3 mg /ml, alors que l'effet le plus faible est de 46.085% pour une concentration de 0.1mg/ml. L'IC<sub>50</sub> de la phase aqueuse de *Rhamnus alaternus* est estimé à de 150µg/ml.

La faible quantité de l'extrait organique de *Rhamnus alaternus* a empêché la finalisation de l'étude de son activité sur le radical DPPH<sup>+</sup>. Cependant les résultats dont on dispose nous a permis d'estimer son IC<sub>50</sub> à 800µg/ml approximativement.

Plusieurs études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux libres (Jovanovic et al., 1994; Cotelle et al., 1996; Bors et al., 1997; Cos et al., 1998; Dugas at al., 2000). Les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants: la structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement

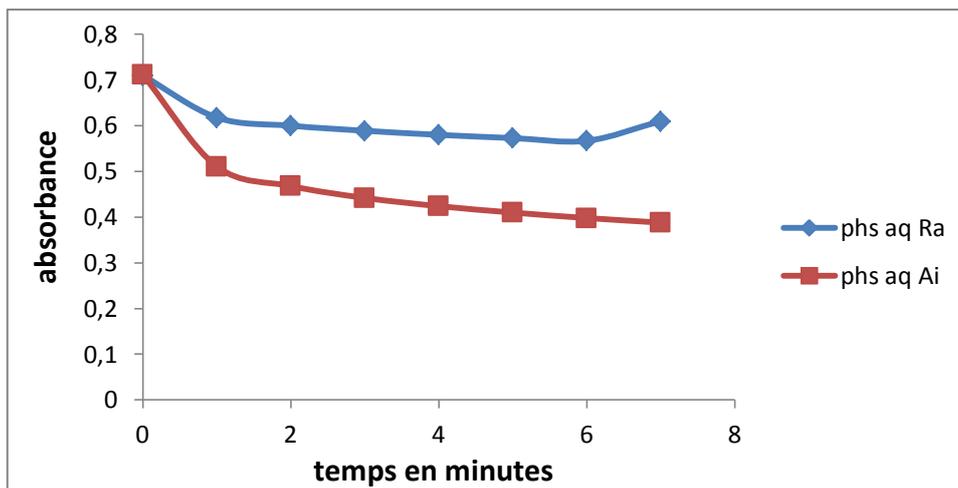
catéchol), la double liaison C2-C3 adjacente à la fonction 4-oxo et la présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3 (**Rice-Evans et al., 1996; Furuno et al., 2002**). La quercétine satisfait à tous ces critères et par conséquent, elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes (**Rice-Evans et al., 1996**).

Toutefois, les résultats montrent qu'aux concentrations comparables à celles de l'extrait aqueux ; les flavonoïdes de la phase organique (apolaire) ont un effet plus faible. En effet : à 100µg/ml, les composé réduisent de 8% environ le DPPH<sup>+</sup> contre ceux de la phase aqueuse (46.08% environ) et 400µg/ml. Les composés flavonoïdiques apolaires ne réduisent le DPPH<sup>+</sup> qu'à 24.38% contre 79.42% pour les flavonoïdes polaires. D'une part **Ben Ammar et ses collaborateurs (2009)** ont démontré que des composés de *Rhamnus alaternus*, le rhamnetin-3-O-isorhamnoside, rhamnocitrin-3-O-isorhamnoside et le kaempférol-3-O-isorhamnoside possèdent des IC<sub>50</sub> de l'ordre de 1.5µg/ml, 38µg/ml et 23µg/ml respectivement.

#### **4-2 Activité anti-ABTS<sup>+</sup>**

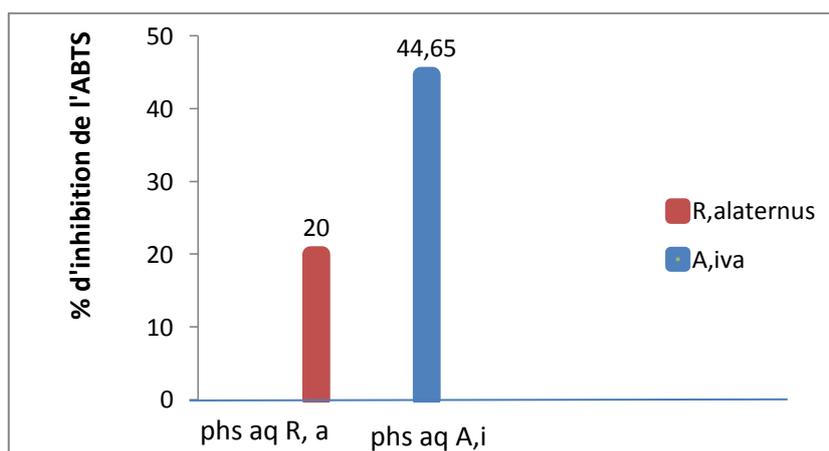
La mesure de l'absorbance à 734 nm a été effectuée après incubation pendant 7 minutes afin d'estimer la capacité de la molécule à tester à piéger le radical d'ABTS<sup>+</sup> et le transformer en ABTS<sup>+</sup> et à la décolorisation de la solution. Une courbe d'étalonnage, en utilisant le trolox a été réalisée et présentée sur la figure suivante. L'IC 50 du trolox a été estimé à la concentration de 1.5 mM, avec 50.77±1.11%.

L'effet des extraits flavonoïdiques des phases aqueuses de *Rhamnus alaternus* et d'*Ajuga iva* sont présentés sur la figure suivante :



**Figure 18 :** Mesure des absorbances lors de l'incubation des extraits avec l'ABTS<sup>•+</sup> pendant 7 minutes.

Les extraits aqueux d'*Ajuga iva* et de *Rhamnus alaternus* à la concentration de 10µg/ml ont des effets inhibiteurs différents, le pourcentage d'inhibition a été calculé et estimé à 20% pour *Rhamnus alaternus* et 44.65% pour *Ajuga iva*. Les flavonoïdes polaires d'*Ajuga iva* possèdent un effet inhibiteur du radical ABTS<sup>•+</sup> plus important que ceux de *Rhamnus alaternus*. Les pourcentages d'inhibition sont présentés sur la figure suivante.



**Figure 19 :** Pourcentage d'inhibition de l'ABTS des deux phases aqueuses d'*Ajuga iva* et de *Rhamnus alaternus*.

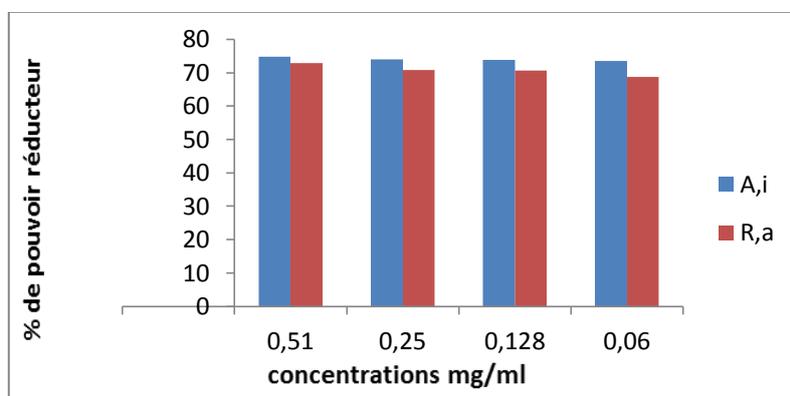
Rhamnocitrin-3-O-isorhamnoside et le kaempférol-3-O-isorhamnoside sont les deux composés flavonoïdiques de *Rhamnus alaternus* étudiées par **Bhour** et ses collaborateurs (2011) pour leurs effets anti-radicalaire de l'ABTS pour lesquels ils ont noté des pourcentages d'inhibition de 72% et 97% respectivement à la concentration de 0.2mg/ml. L'effet scavenger

des flavonoïdes sur les radicaux libres dépend de la présence des groupements OH libres, en particulier le 3-OH avec une configuration 3',4'-rthodihydroxy.

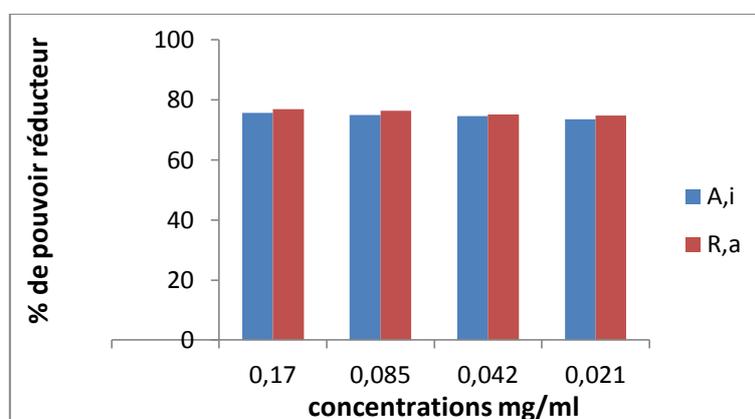
Leurs IC<sub>50</sub> sont de 0.15mg/ml et 0.12mg/ml successivement. La concentration à laquelle l'étude a été effectuée est 20 fois plus importante que celle utilisée lors de la présente étude ce qui pourrait expliquer les pourcentages élevés de 72% et 97%.

#### 4-3 Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur d'une molécule bien donnée peut être mesuré grâce à sa capacité à transférer un électron vers le Fe<sup>3+</sup>, ainsi ce dernier réduit en Fe<sup>2+</sup>, produit mesurable à la longueur d'onde de 700nm. L'étude du pouvoir réducteur des différents extraits montrent qu'ils ont des effets relativement proches. Ces résultats sont présentés sur les figures suivantes.



**Figure 20 :** Pourcentages de pouvoirs réducteurs des phases organiques d'*Ajuga iva* et de *Rhamnus alaternus*



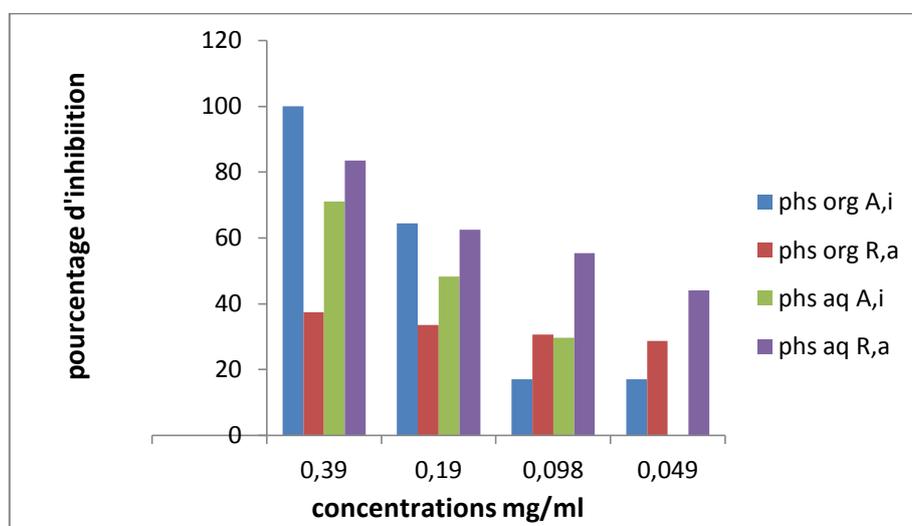
**Figure 21 :** Pourcentages de pouvoirs réducteurs des phases aqueuses d'*Ajuga iva* et de *Rhamnus alaternus*.

Une différence non significative a été observée entre les différents extraits ; à titre d'exemple, les flavonoïdes apolaires d'*Ajuga iva* ont un pouvoir réducteur de 74.77% par rapport aux flavonoïdes apolaires de *Rhamnus alaternus* qui montrent un pouvoir réducteur de 72.88%, ces deux résultats ont été obtenus avec les mêmes concentrations. Les phases aqueuses par contre montrent que les flavonoïdes polaires de *Rhamnus alaternus* ont un pouvoir réducteur pouvant atteindre 76.95%, alors que les flavonoïdes polaires d'*Ajuga iva* montrent un pouvoir réducteur de 75.65%, ces pourcentages sont dose dépendants.

Les flavonoïdes d'*Ajuga iva* et de *Rhamnus alaternus* sont de bons donneurs d'électrons. D'autres études à Tlemcen en Algérie, ont démontré que les phases : aqueuse et méthanolique d'*Ajuga iva* n'ont pas un pouvoir réducteur important (**Bouguendoura, 2011**). Le kaempférol-3-O-isorhamnoside et le rhamnocitrin-3-O-isorhamnoside ont aussi été étudiés pour leur pouvoir réducteur par **Bhouri et ses collaborateurs (2012)** qui ont démontré que ces composés possèdent à la concentration de 1mg/ml, des pouvoirs réducteurs de l'ordre de 330µg/ml et 368µg/ml équivalents de Trolox.

#### 4-4 Test de la peroxydase

Le test de la peroxydase effectué repose sur la mesure de l'activité enzymatique en présence de ses substrats (gaïacol et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) qu'elle catalyse afin de produire une molécule mesurable à 470nm (tétragaiacol). La figure suivante montre le taux d'inhibition de l'activité enzymatique de la peroxydase des différents extraits.



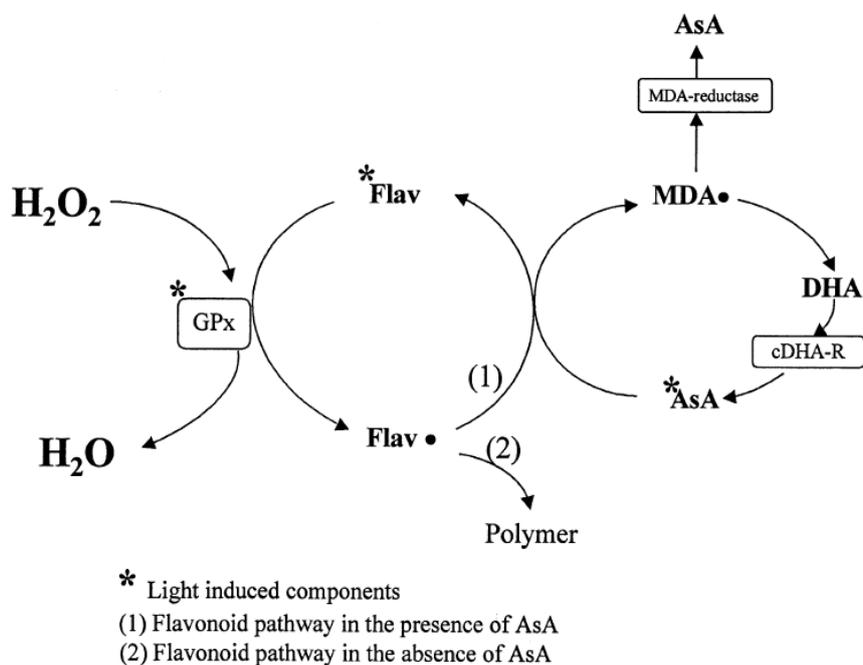
**Figure 22 :** Taux d'inhibition de l'activité enzymatique de la peroxydase par les différents extraits des deux plantes à différentes concentrations.

La phase organique d'*Ajuga iva* montre l'effet inhibiteur le plus important avec un pourcentage de 100% est obtenu à la concentration de 0.39mg/ml. Ces pourcentages d'inhibition 64.46%, 17.15%, 17.04%, sont obtenus aux concentrations de : 0.19mg/ml, 0.098mg/ml et 0.049 respectivement. La phase organique de *Rhamnus alaternus* inhibe au maximum à 37.5% à la concentration de 0.39mg/ml. Cet effet diminue jusqu'à avoir un plateau (30.63 et 28.67%) aux concentrations 0.098 et 0.049mg/ml.

**Tableau X :** les IC<sub>50</sub> des différents extraits des deux plantes contre la peroxydase.

Extrait	Aqueux A.iva	Organique A.iva	Aqueux R.ala	Organique R.ala
IC <sub>50</sub>	200µg/ml	150µg/ml	70µg/ml	/

Les flavonoïdes polaires d'*Ajuga iva* ont moins d'effet inhibiteur avec un pourcentage maximal de 71% à la concentration de 0.39mg/ml. La diminution de l'effet continue jusqu'à atteindre 0% à la concentration de 0.049mg/ml. Les flavonoïdes polaires de *Rhamnus alaternus* ont atteint un pourcentage d'inhibition de 83.57% pour la même concentration de 0.39mg/ml et 44.11% pour la concentration de 0.049mg/ml. Un mécanisme expliquant comment les flavonoïdes inhibent la peroxydase a été proposé par **Perez et ses collaborateurs (2002)** présenté dans la figure suivante :

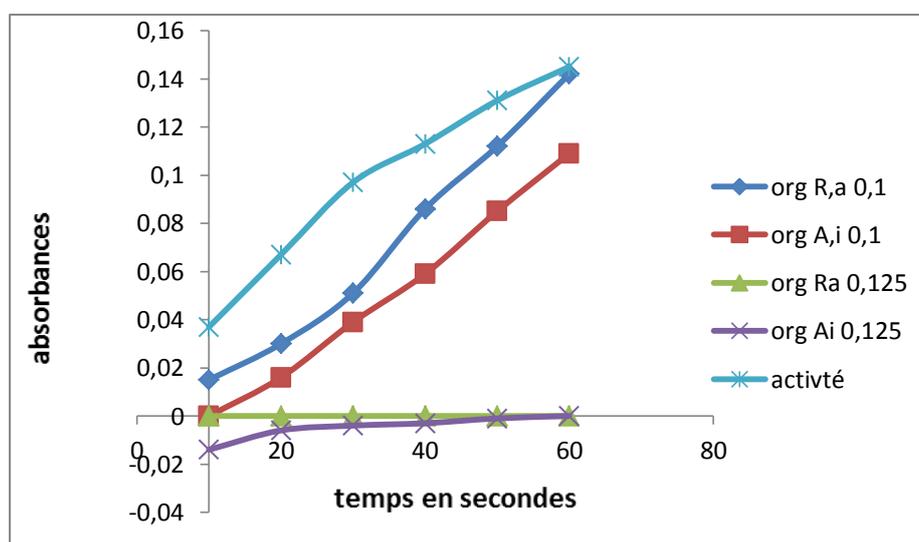


**Figure 23 :** Schéma proposé pour le piégeage du substrat de la peroxydase ; le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, par le cycle redox des flavonoïdes dans les feuilles de raisin (**Perez et al., 2002**).

La GP<sub>x</sub> est la peroxydase type gaïacol induite par les rayons ou lumière qui catalyse l'oxydation des flavonoïdes, qui quand ils sont en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> forment le radical flav<sup>•</sup> et H<sub>2</sub>O, la présence de l'acide ascorbique mène à la réduction des radicaux flavonoïdiques et à la formation de l'acide ascorbique oxydée MDA<sup>•</sup> (radical mono-di hydro-ascorbique), ce dernier peut régénérer l'acide ascorbique par l'action de la MDA réductase ou disproportionné en DHA (acide di-hydro ascorbique) qui peut être lui-même réduit en acide ascorbique par l'action de la cDHA-R (acide dehydro-ascorbique réductase cytosolique), en absence d'acide ascorbique, les radicaux flavonoïdiques réagissent entre eux produisant des polymères (Perez et al., 2002).

#### 4-5 Test de l'alpha glucosidase

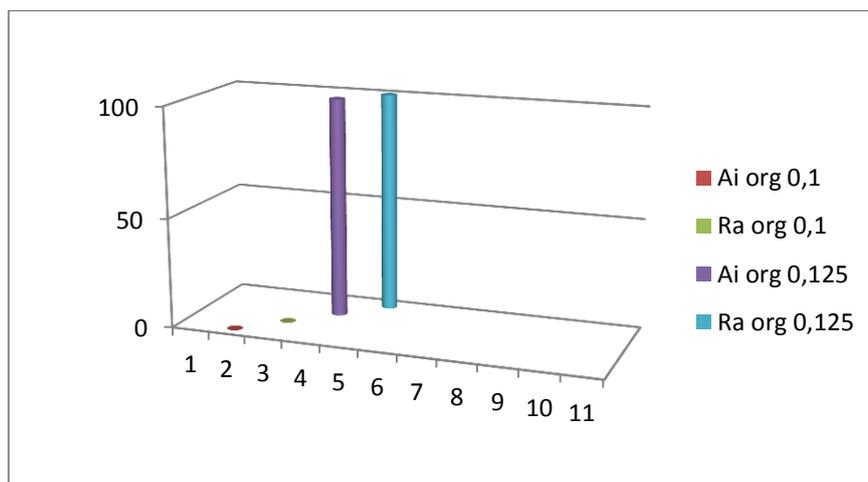
La mesure par spectrophotométrie de l'apparition du p-nitrophénol, produit de la catalyse du substrat synthétique de l'enzyme alpha glucosidase, le *p*-NPG, est le principe de la méthode étudiée. L'effet des différents extraits flavonoïdiques organiques d'*Ajuga iva* et de *Rhamnus alaternus* sont présentés sur la figure suivante :



**Figure 24 :** Inhibition de l'alpha glucosidase par les phases organiques des deux plantes à des concentrations de 0.125mg/ml et de 0.1mg/ml pendant 60 secondes.

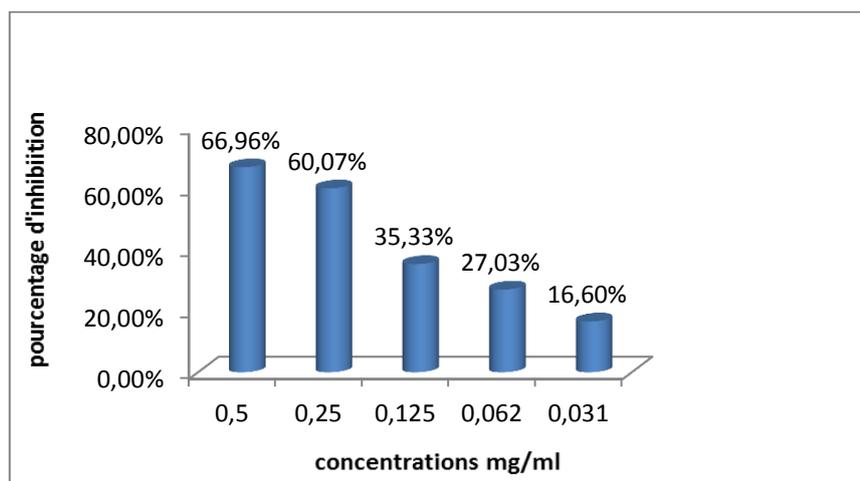
À des concentrations différentes de 0.1mg/ml et 0.125mg/ml, l'effet des flavonoïdes apolaires des deux plantes change. A la concentration de 0.1mg/ml, les phases organiques d'*Ajuga iva* de *Rhamnus alaternus* n'ont aucun effet sur l'alpha glucosidase. Pour des concentrations de 0.1mg/ml des flavonoïdes organiques des deux plantes étudiées n'ont aucun effet sur l'activité enzymatique. Ces courbes, en présence des flavonoïdes apolaires ont la

même allure que celle de l'enzyme, c'est-à-dire en absence de flavonoïdes. Par contre, à une concentration des mêmes flavonoïdes légèrement plus importante (0.125), la cinétique des réactions sont totalement différentes et la réaction enzymatique semble être complètement inhibée.



**Figure 25** : Pourcentages d'inhibition des phases organiques des deux plantes à deux concentrations différentes de 0.1mg/ml et de 0.125mg/ml.

De la même façon, l'étude de l'effet de l'extrait flavonoïdiques aqueux d'*Ajuga iva* a été réalisée et les taux d'inhibition sont présentés sur la figure suivante :

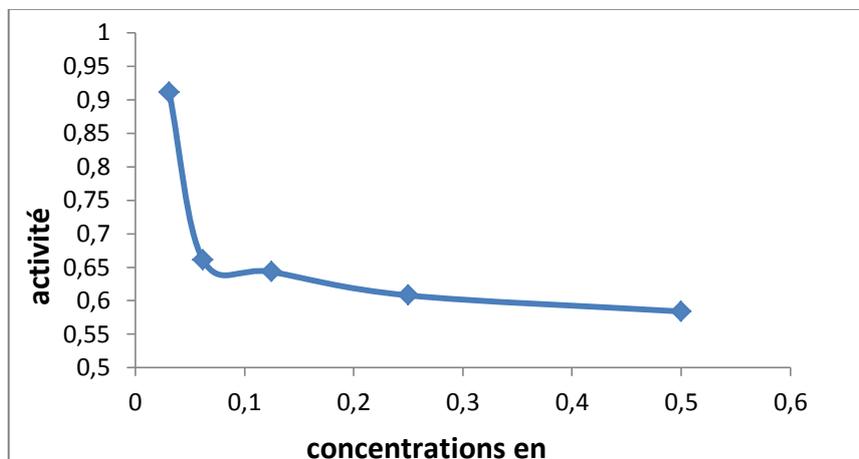


**Figure 26** : Pourcentages d'inhibition de l'activité de l'alpha glucosidase par la phase aqueuse d'*Ajuga iva*

L'étude de l'effet des flavonoïdes polaires d'*Ajuga iva* sur l'activité enzymatique de l'alpha glucosidase a montré qu'à la concentration de 0.5mg/ml, le pourcentage d'inhibition le plus élevé est de 66.96%, et le plus faible est de 16.6% à la concentration de 0.031mg/ml.

L'IC<sub>50</sub> de l'extrait flavonoïdiques aqueux d'*Ajuga iva* est estimé à 0.23mg/ml.

L'étude réalisée sur l'effet des flavonoïdes polaires de *Rhamnus alaternus* nous a permis de calculer les taux d'inhibitions résumés dans la figure suivante :



**Figure 27** : Activité enzymatique résiduelle de l'alpha glucosidase avec les flavonoïdes polaires de *Rhamnus alaternus*

Les flavonoïdes polaires de *Rhamnus alaternus* n'ont aucun effet inhibiteur de l'activité de l'alpha glucosidase. Il peut même s'agir d'un effet inverse, celui de l'activation enzymatique. Cet extrait relativement faible en flavonoïdes peut contenir des composés différents des flavonoïdes, qui sont connus pour leurs effets inhibiteurs des enzymes. Alors que les composés non flavonoïdiques peuvent agir avec l'enzyme en provoquant son activation.

Plusieurs études réalisées ont démontré que l'alpha glucosidase peut bien être inhibée par les flavonoïdes qui forment des complexes avec les protéines (**Heo et al., 2009**). Plusieurs flavonoïdes ; quercétine, myricétine, kaempférol, avicularine et hypérine présentent des effets inhibiteurs de l'activité de l'alpha glucosidase (**Wang et al., 2010**). Il a été suggéré par **Kim et ses collaborateurs (2010)** que les 3', 4', 7- trihydroxyflavone peuvent être responsables de l'inhibition de l'activité de l'alpha glucosidase. L'acide éllagique et a quercétine ainsi que leurs dérivés ont un fort pouvoir inhibiteur de l'activité enzymatique de l'alpha glucosidase (**You et al., 2012**).

Légende pour tous les graphes :

Phs = phase, A.i = *Ajuga iva*, R.a = *Rhamnus alaternus* , Org = organique , Aq = aqueuse

# Conclusion

## Conclusion

La présente étude s'est intéressée à l'extraction, identification et dosage des flavonoïdes, à partir des parties aériennes et feuilles de deux plantes (*Ajuga iva* et *Rhamnus alaternus*) connues pour leurs effets pharmacologiques diverses dans la phytothérapie au Maghreb. L'évaluation de leurs activités antioxydantes (pouvoir réducteur et anti-peroxydase), anti-radicalaires (anti- DPPH et anti- ABTS) ainsi que leur activités anti enzymatique (anti alpha glucosidase).

Les résultats montrent que les teneurs les plus élevées en flavonoïdes sont notées pour les extraits aqueux d'*Ajuga iva* et de *Rhamnus alaternus* (8.9% et 7.5% respectivement), tandis que les extraits organiques montrent des pourcentages de 3.4 et 1.5% respectivement.

Les résultats du dosage des flavonoïdes montrent que l'extraits aqueux (432.45 mg EQ/100g) et organique (302.46 mg EQ/100g) d'*Ajuga iva* sont les plus élevés par rapport aux extraits de *Rhamnus alaternus* qui possèdent des taux inférieurs de 54.6mg EQ/100g pour la phase aqueuse et 219mg EQ/100g pour la phase organique.

L'étude de l'activité anti-radicalaire du DPPH n'a été effectuée que pour la plante de *Rhamnus alaternus*, la phase aqueuse montre un pourcentage d'inhibition maximal de 81.48% à la concentration de 0.3mg/ml. Les IC<sub>50</sub> respectifs des phases aqueuse et organique de cette plante sont comme suit : 150µg/ml et 800µg/ml (estimée approximativement). L'ABTS a été inhibé à 20% par *Rhamnus alaternus* et 44.65% par *Ajuga iva* (seules les phases organiques ont été étudiées). Tous les extraits montrent un pouvoir réducteur important de l'ordre de 70%± 6.

La phase organique d'*Ajuga iva* montre 100% d'inhibition de la peroxydase à 0.39mg/ml tandis que sa phase aqueuse montre 71% d'inhibition. La phase aqueuse de *Rhamnus alaternus* montre un effet inhibiteur de la peroxydase de 83.57% alors que sa phase organique ne montre que 37.5% d'inhibition à la même concentration.

A la concentration de 0.125 mg/ml, les flavonoïdes polaires des deux plantes montrent un effet inhibiteur de 100% de l'activité enzymatique de l'alpha glucosidase, alors qu'à la concentration de 0.1mg/ml, l'activité enzymatique ne semble pas être affectée. La phase aqueuse d'*Ajuga iva* possède 66.96% d'inhibition de l'activité enzymatique de l'alpha glucosidase à 0.5mg/ml, l'IC<sub>50</sub> a été estimée à 0.23mg/ml, la phase aqueuse de *Rhamnus*

alaternus ne montre pas d'effet inhibiteur de l'alpha glucosidase mais semble avoir plutôt un effet inverse (activateur).

En perspectives, cette étude mérite d'être reprise pour mieux évaluer d'une part les propriétés anti-oxydante et hypoglycémiantes des deux plantes in vivo et d'une autre part , déterminer pour chaque composé, une fois séparé, son effet pharmacologique précis.

# **Références bibliographiques**

## Bibliographie

- ❖ **ADJADJ M. (2009)** : Propriétés antioxydantes et activité inhibitrice de la xanthine oxydase des extraits de la plantes médicinale *Ajuga iva* (L.) Schreber. Mémoire de magister de l'université de Mentouri, Constantine, Algérie.
- ❖ **Ait Youssef M. (2006)** : Plantes médicinales de Kabylie. *Edition Ibis Press*. ISBN: 978-9961-57-259-7 Paris. 18.
- ❖ **ALICE Y. Y. CHENG M. D. FRCPC ET ROBERT G. JOSSE MBBS FRCPC. (2004)**. Les inhibiteurs de l'absorption intestinale dans la prévention et le traitement du diabète de type 2. *Edition SNELL Communication Médicale Inc, Volume 4, numéro 7. 35(5):1073-8.*
- ❖ **Aronne G. Wilcock C. C. (1995)**: Reproductive lability in pre-dispersal biology of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae). *Protoplasma. 187*: 49-59.
- ❖ **Ashok K.T. (2001)**: Imbalance in antioxidant defence and human diseases: multiple approach of natural antioxidants therapy. *Current Science 81*: 9–10.
- ❖ **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*
- ❖ **Bahorun T. Gressier B. Trotin F. Brunete C. Dine T. Vasseur J. Gazin J.C. Pinkas M. Luycky M. and Gazin M. (1996)**. Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneim Forsh. Drug Res. 46*: 1086-1108
- ❖ **Bas J.M. Oliveras J. Gomez C. (2009)**. Myrmecochory and short-term seed fate in *Rhamnus alaternus*: Ant species and seed characteristics. *Acta Oecologica. 35*: 380–384.
- ❖ **Batanouny K.H., Abou Tabl S., Shabana M. and Soliman F. (1999)**. Wild medicinal plants in Egypt. *Academy of Scientific Research and Technology. International Union for Conservation (IUCN). Egypt.*
- ❖ **Bharatham K. Bharatham N. Ki Hun Park. Keun Woo Lee. (2008)**. Binding mode analyses and pharmacophore model development for sulfonamide chalcone derivatives, a new class of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Journal of Molecular Graphics and Modelling 26*: 1202–1212.

- ❖ **Bhourri W. Ben Sghaier M. Kilani S. Bouhlel I. Dijoux-Franca M. G. Ghedira K. Ghedira L. C. (2011).** Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): Kaempferol 3-O- $\beta$ -isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O- $\beta$ -isorhamninoside. *Food and Chemical Toxicology* **49** : 1167–1173.
  
- ❖ **Bhourri W. Boubaker J. Kilani S. Ghedira K. Chekir-Ghedira L. (2012).** Flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): Kaempferol 3-O- $\beta$ -isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O- $\beta$ -isorhamninoside protect against DNA damage in human lymphoblastoid cell and enhance antioxidant activity. *South African Journal of Botany* **80** : 57–62.
  
- ❖ **Ben Ammar R. Bouhlel I. Valenti K. Ben Sghaier M. Kilani S. Mariotte A. M. Dijoux-Franca M. G. Laporte F. Ghedira K. Chekir-Ghedira L. (2007).** Transcriptional response of genes involved in cell defense system in human cells stressed by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and pre-treated with (Tunisian) *Rhamnus alaternus* extracts: Combination with polyphenolic compounds and classic *in vitro* assays. *Chemico-Biological Interactions* **168** : 171–183.
  
- ❖ **Ben Ammar R. Ben Sghaiera M. Boubaker J. Bhourri W. Naffeti A. Skandrani I. Bouhlel I. Kilani S. Ghedira K. Chekir-Ghedira L. (2008).** Antioxidant activity and inhibition of aflatoxin B<sub>1</sub>-, nifuroxazide-, and sodium azide-induced mutagenicity by extracts from *Rhamnus alaternus* L. *Chemico-Biological Interactions* **174**: 1-10.
  
- ❖ **Ben Ammar R. Bhourri W. Ben Sghaier M. Boubaker J. Skandrani I. Neffati A. Bouhlel I. Kilani S. Mariotte A. M. Chekir-Ghedira L. Dijoux-Franca M. G. Ghedira K. (2009).** Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): A structure-activity relationship study. *Food Chemistry* **116**: 258-264.
  
- ❖ **Ben Jannet H. Al Mourabit A. Gateau-Olesker A. Marazano C. and Mighri Z. (1999).** Enantioselective synthesis of natural biologically active ivaide A: 1, 3-di-(R)- $\alpha$ -hydroxyglyceride glycerol. *Tetrahedron Asymmetry* **10**: 2381-2386.
  
- ❖ **Ben Jannet H., Harzallah-skhir F., Mighri Z., Simmonds M.S. and Blaney W.M. (2000).** Responses of *Spodoptera littoralis* larvae to Tunisian plant extracts and to neoclerodane diterpenoids isolated from *Ajuga pseudoiva* leaves. *Fitoterapia* **71**: 105-112.
  
- ❖ **Bennaghmouch L. Hajjaji N. Zellou A. Cherrah Y. (2001).** Etude pharmacologique d'*Ajuga iva*. Masson. Paris. *Ann Pharm FR.* **59** :284.
  
- ❖ **Bennaghmouch L. Hajjaji N. Gmira N. (2002).** Flavonoïdes d'*Ajuga iva* (L.) Schreb (Labiée). *Actes Inst. Agron. Vet. (Maroc).* Vol.22 (1) : 25-30.

- ❖ **Bondì M.L. Al-Hillo M.R.Y. Lamara K. Ladjel S. Bruno M. Piozzi F. and Simmonds M.S.J. (2000).** Occurrence of the antifeedant 14, 15-dihydroajugapitin in the aerial parts of *Ajuga iva* from Algeria. *Biochemical Systematics and Ecology* **28**: 1023-1025.
- ❖ **Bouderbala S. Lamri-Senhadji M. Prost J. Lacaille-Dubois M. A. Bouchenak M. (2008).** Changes in antioxidant defense status in hypercholesterolemic rats treated with *Ajuga iva*. *Phytomedicine* **15**: 453–461.
- ❖ **Bouderbala S. Prost J. Lacaille-Dubois M. A. Bouchenak M. (2010).** Iridoid extracts from *Ajuga iva* increase the antioxidant enzyme activities in red blood cells of rats fed a cholesterol-rich diet. *Nutrition Research* **30**: 358–365.
- ❖ **Bondm M.R. Al-Hillo Y. Lamara K. Ladjel S. Bruno M. Piozzi F. Simmonds M.S.J. (2000).** Occurrence of the antifeedant 14, 15-dihydroajugapitin in the aerial parts of *Ajuga iva* from Algeria. *Biochemical Systematics and Ecology*. **28**: 1023-1025.
- ❖ **Bors W. Michel C. and Stettmaeir K. (1997).** Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors*. **6**: 343-355.
- ❖ **BOUGANDOURA N. (2011).** Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits D'espèces végétales Saturejacalaminthasspnepta (nabta) et Ajugaiva L. (chendgoura) de l'ouest d'Algérie. Mémoire de magister de l'université de Abou Bakr Belkaid. Tlemcen. Algérie.
- ❖ **Boukef K. (2001).** Rhamnus alaternus, *Essaydali*. **81**: 34–35.
- ❖ **Castillo J. L. Alpeeva I. S. Chubar T. A. Galaev I.Y. Csoregi E. Sakharov I.Y. (2002).** Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Science*. **163**: 1011-1019.
- ❖ **Chenni A. Ait Yahia D. Boukortt F. O. Prost J. Lacaille-Dubois M. A. Bouchenak M. (2007).** Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue antioxidant status in rats fed a high-cholesterol diet. *Journal of Ethnopharmacology*. **109**: 207–213.
- ❖ **Chiba S. (1979).** Transglucosylation of  $\alpha$ -glucosidase. *J Jpn Soc Starch Sci*. **26**: 59-67.
- ❖ **Chiba S. (1988).** Amyloglycosidase. In: Handbook of Amylases and related enzymes (*The Amylase Research Society of Japan*, éd.). Pergamum Press, Oxford, U.K. pp. 104-116.

- ❖ **Chiba S. (1997).** Molecular mechanism in alpha-glucosidase and glucoamylase. *Biosci Biotechnol Biochem.* **61**: 1233-1239.
- ❖ **Coll J. Yudelsy A. Tandon. (2008).** neo-Clerodane diterpenoids from *Ajuga*: structural elucidation and biological activity. *Phytochem Rev.* **7**: 25–49.
- ❖ **Conesa A. Peter J. P. Cees A. M. J. J. Hondel V. D. (2002).** Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *Journal of Biotechnology.* **93**: 143–158.
- ❖ **Cos P. Ying L. Calomme M. Hu J.P. Cimanga K. Van-Poel B. Pieters L. Vlietinck A.J. and Vanden Berghe D. (1998).** Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.* **61**: 71-76.
- ❖ **Cotelle N. Bernier J.L. Catteau J.P. Pommery J. Wallet J.C. and Gaydou E.M. (1996).** Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radic. Biol. Med.* **20**: 35-43.
- ❖ **Debete J. M. (2005).** Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* Vahl (Caesalpinaceae) utilisée dans le traitement des dermatoses au Tchad. Thèse de doctorat de l'université de Bamako.
- ❖ **Dugas A.J. Castaneda-Acosta J. Bonin G.C. Price K.L. Fischer N.H. and Winston G.W. (2000).** Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. *J Nat Prod.* **63**: 327-331.
- ❖ **Edenharder R. Rauscher R. Platt K.L. (1997).** The inhibition by flavonoids of 2 amino-3 methylimidazo[4, 5-f]quinoline metabolic activation to a mutagen: a structure–activity relationship study. *Mutat. Res. Fund. Mol. Mech. Mut.* **379**: 21–32.
- ❖ **Ekoumou C. (2003).** Etude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse de doctorat de l'université de Bamako.
- ❖ **El Hilaly J. Lyoussi B. (2002).** Hypoglycaemic effect of the lyophilised aqueous extract of *Ajuga iva* in normal and streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology.* **80**: 109–113.
- ❖ **El Hilaly J. Zafar H. Israili. Lyoussi B. (2004).** Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology.* **91** : 43–50.
- ❖ **El Hilaly J. Lyoussi B. Wibo M. and Morel N. (2004).** Vasorelaxant effect of the aqueous extract of *Ajuga iva* in rat aorta. *Journal of Ethnopharmacology.* **93**: 69-74.

- ❖ **El-Hilaly J. Tahraoui A. Zafar H. Israili. Lyoussi B. (2006).** Hypolipidemic effects of acute and sub-chronic administration of an aqueous extract of *Ajuga iva* L. whole plant in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **105** : 441–448.
- ❖ **El hillaly J. (2007).** Les propriétés pharmacologiques, ethnobotaniques et phytochimiques d'*Ajuga iva*. *UFR Physiologie-pharmacologie*. Fac des Sciences Dhar Mehraz, Fès.
- ❖ **Ferrari J. (2002).** Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles : *Gnidia involucrata* Steud. *Ex A. Rich.* Thèse de doctorat de l'université de Lausana.
- ❖ **Frandsen T. P. Svensson B. (1998).** Plant  $\alpha$ -glucosidases of the glucosidase family 31. Molecular properties, substrate specificity, reaction mechanism, and comparison with family members of different origin. *Plant Mol Biol*. **37**: 1-13.
- ❖ **Furuno K. Akasako T. and Sugihara N. (2002).** The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids. *Biol. Pharm. Bull.* **25**: 19–23.
- ❖ **Ghedira K. Chemli R. Richard B. Zeches M. and Le-Men-Olivier L. (1991).** Contribution à l'étude de la pharmacopée traditionnelle de Tunisie: étude des parties aériennes d'*Ajuga iva* (L.) Schreb. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*. **25** : 100-111.
- ❖ **Halimi A.K. (2004).** Les plantes médicinales en Algérie. 1ère édition. *BERTI Editions*, Alger. pp: 156-157.
- ❖ **Hamden K. Carreau S. Jamoussi K. Ayadi F. Garmazi F. Mezgenni N. Elfeki A. (2008).** Inhibitory effects of 1 $\alpha$ , 25dihydroxyvitamin D3 and *Ajuga iva* extract on oxidative stress, toxicity and hypo-fertility in diabetic rat testes. *J. Physiol. Biochem.* **64**(3): 231-239.
- ❖ **Hayder N. Bouhleb I. Skandrani I. Kadri M. Steiman R. Guiraud P. Mariotte A. M. Ghedira K. Dijoux-Franca M.G. Chekir-Ghedira L. (2008).** In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-o-galactoside and myricetin-3-o-rhamnoside from *Myrtus communis*: Modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray. *Toxicol. in vitro*. **22**: 567–581.
- ❖ **Henrissat B. (1991).** A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **280**: 309-316.

- ❖ **Henrissat B. Davies G. (1995).** Structural and sequence based classification of glycoside hydrolase. *Curr Opin Struct Biol.* **7**: 637-644.
- ❖ **Soo-Jin Heo. Ji-Young Hwang. Jung-In Choi. Ji-Sook Han. Hak-Ju Kim. You-Jin Jeon. (2009).** Diploretohydroxycarmalol isolated from *Ishige okamurae*, a brown algae, a potent  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *European Journal of Pharmacology.* **615**: 252–256.
- ❖ **Jovanovic S.V. Steenken S. Tosic M. Marjanovic B. and Simic M.G. (1994).** Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* **116**: 4846-4851.
- ❖ **Kato N. Suyama S. Shirokane M. Kato M. Kobayashi T. Tsukagoshi N. (2002)** Novel  $\alpha$ -glucosidase from *Aspergillus nidulans* with strong transglucosylation activity. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 1250-1256.
- ❖ **Kelly E.H. Anthony R.T. Dennis J.B. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* **13**: 572–584.
- ❖ **Kim Y.M. Jeong M.H. Wang WY. Lee H.I. (2005).** Inhibitory effect of pine extract on  $\alpha$  glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition.* **21**: 756-61.
- ❖ **Ju-Sung Kim. Jinfeng Yang and Myong-Jo Kim. (2011).**  $\alpha$  glucosidase inhibitory effect, anti-microbial activity and UPLC analysis of *Rhus verniciflua* under various extract conditions. *Journal of Medicinal Plants Research Vol. 5(5)* : pp. 778-783
- ❖ **Kimura A. (2000).** Molecular anatomy of  $\alpha$ -glucosidase. *Trends Glycosc Glycotech.* **68**: 373-380.
- ❖ **Kimura A. Lee J-H. Lee I-S. Lee H-S. Park K-H. Chiba S. Kim D. (2004).** Two potent competitive inhibitors discriminating  $\alpha$ -glucosidase family I from family II. *Carbohydr Res.* **339**: 1035-1040.
- ❖ **Kobayashi I. Tokuda M. Hashimoto H. Konda T. Nakano H. Kitahata S. (2003).** Purification and characterization of a new type of  $\alpha$ -glucosidase from *Paecilomyces lilacinus* that has transglucosylation activity to produce  $\alpha$  1-3 and  $\alpha$  1-2 linked oligosaccharides. *Biosci Biotechnol Biochem.* **67**: 29-35.
- ❖ **Kooststra M. (1994).** Protection from UV-B induced DNA damage by flavonoids. *Plant Mol. Biol.* **26**: 771–774.

- ❖ **Marc F. Davin A. Deglène-Benbrahim L. Ferrand C. Baccaunaud M. Fritsch P. (2004).** Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. SRMS: Société de la revue médecine/sciences et *Éditions EDK*. **20** (4) : p. 458-463.
- ❖ **MacGregor A. E. Janecek S. Svensson B. (2001).** Relationship of sequence and structure to specify in the  $\alpha$ -amylase family of enzymes. *Biochim Biophys Acta*. **1546**: 1-20.
- ❖ **Meiselman H. L. Halpern B. P. Dateo G. P. (1976).** Reduction of sweetness judgements by extracts from the leaves of *Ziziphus jujuba*. *Physiology and Behaviour* **17**: 313–317.
- ❖ **Mika A. Buck F. Lüthje S. (2008).** Membrane-bound class III peroxidases: Identification, biochemical properties and sequence analysis of isoenzymes purified from maize (*Zea mays* L.) roots. *JOURNAL OF PROTEOMICS* **71**: 412 – 424.
- ❖ **Moktan B. Saha J. Prabir K. Sarkar. (2008).** Antioxidant activities of soybean as affected by Bacillus-fermentation to kinema. *Food Research International*. **41**: 586–593.
- ❖ **Mohsina H. Khalil-ur-Rehman. (2009).** Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry*. **115**: 1177–1186.
- ❖ **J. O'Brien P. (2000).** Peroxidases. *Chemico-Biological Interactions*. **129**: 113–139.
- ❖ **Okuyama M. Tanimoto Y. Ito T. Anzai A. Mori H. Kimura A. Matsui H. Chiba S. (2005).** Purification and characterization of the hyper-glycosylated extracellular  $\alpha$ -glucosidase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Enzyme and Microbial Technology*. **37**: 472–480.
- ❖ **Francisco J. P. Daniel V. Nilo M. (2002).** Ascorbic acid and flavonoid-peroxidase reaction as a detoxifying system of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in grapevine leaves. *Phytochemistry*. **60**: 573–580.
- ❖ **Pitchaon M. (2011).** Antioxidant capacity of extracts and fractions from mango (*Mangifera indica* Linn.) seed kernels. *International Food Research Journal* **18**: 523-528.
- ❖ **Ponce A. G. Del Valle C. E. Roura S. I. (2004).** Natural essential oils as reducing agents of peroxydase activity in leafy vegetables. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* **37** : 199-204.
- ❖ **Rice-Evans C.A. Miller N.J. and Paganga G. (1997).** Antioxidant properties of phenolic compounds. *Plant Science*. **2**: 152-159.

- ❖ **Sakharov I. Y. Vesga M. K. B. Galaev I. Y. Sakharova I. V. Pletjushkina O. Y. (2001).** Peroxidase from leaves of royal palm tree *Roystonea regia*: purification and some properties. *Plant Science*. **161**: 853–860.
- ❖ **Sanchez-Moreno C. Larrauri J. A. & Saura-Calixto F. (1998).** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **76**: 270–276.
- ❖ **Sariri R. Jafarian V. Hassan Sajedi R. Khajeh K. (2006).** Inhibition of horseradish peroxidase by thiol type inhibitors: Mercaptoethanol and mercaptoacetic acid. *Journal of Molecular Liquids*. **128**: 175–177.
- ❖ **Young-Jun Shim. Ho-Kyung Doo. Se-Young Ahn. Yong-Suk Kim. Je-Kyung Seong. In-Sun Park. Bon-Hong Min. (2003).** Inhibitory effect of aqueous extract from the gall of *Rhus chinensis* on alpha-glucosidase activity and postprandial blood glucose. *Journal of Ethnopharmacology*. **85**: 283–287.
- ❖ **Stocker P. Yousfi M. Djerridane O. Perrier J. Amziani R. El Boustani S. Moulin A. (2004).** Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Biochimie*. **86**: 919–925.
- ❖ **Taleb-Senoucia D. Ghomaria H. Kroufa D. Bouderbala S. Prostb J. Lacaille-Duboisc M. A. Bouchenaka M. (2009).** Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*. **16**: 623–631.
- ❖ **Van de Velde F. Van Rantwijk F and Sheldon R. A. (2001).** Improving the catalytic performance of peroxidases in organic synthesis. *TRENDS in Biotechnology Vol.19* N°2. P.73-80.
- ❖ **Vianello A. Uncani M. Nagy G. and Fransesco M. (1997).** Guaiacol Peroxidase Associated to Soybean Root Plasma Membranes Oxidizes Ascorbate. *J Plant Physiol-Vol. 150*. pp. 573-577.
- ❖ **Hui Wang. Yang-Ji Dub. Hua-Can Song. (2010).**  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of guava leaves. *Food Chemistry*. **123**: 6–13.
- ❖ **Wessner M. Champion B. Girault J. P. Kaouadji N. Saidi B. and Lafont R. (1992).** Ecdysteroids from *Ajuga iva*. *Phytochemistry-Oxford*. **31**: 3785-3788.
- ❖ **YE Xiao-Ping. SONG Chun-Qing. YUAN Ping. MAO Ren-Gang. (2010).**  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -Amylase Inhibitory Activity of Common Constituents from

Traditional Chinese Medicine Used for Diabetes Mellitus. *Chinese Journal of Natural Medicines*. **8**(5): 0349–0352.

- ❖ **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.
- ❖ **Yi-ling C and Pan-Kai C. (1982)**. Rhamnaceae. In: Chen Yi-ling, ed., *Fl. Reipubl. Popularis Sin.* **48** (1): 1-169.
- ❖ **Yoshimizu M. Tajima Y. Matsuzawa F. Aikawa S. Iwamoto K. Kobayashi T. Edmunds T. Fujishima K. Tsuji D. Itoh K. Ikekita M. Kawashima I. Sugawara K. Ohyanagi N. Suzuki T. Togawa T. Ohno K. Sakuraba H. (2008)**. Binding parameters and thermodynamics of the interaction of imino sugars with a recombinant human acid  $\alpha$ -glucosidase (alglucosidase alfa): Insight into the complex formation mechanism. *Clinica Chimica Acta*. **391**: 68–73.
- ❖ **Qi You. Feng Chen. Xi Wang. Yueming Jiang. Songyi Lin. (2012)**. Anti-diabetic activities of phenolic compounds in muscadine against alpha-glucosidase and pancreatic lipase. *LWT - Food Science and Technology*. **46**: 164-168.
- ❖ **Zafar H. I. Lyoussi B. (2009)**. Ethnopharmacology of the plants of genus *Ajuga*. *Pak. J. Pharm. Sci.*, Vol.22, No.4, pp.425-462.

# **Annexe**

## Annexe

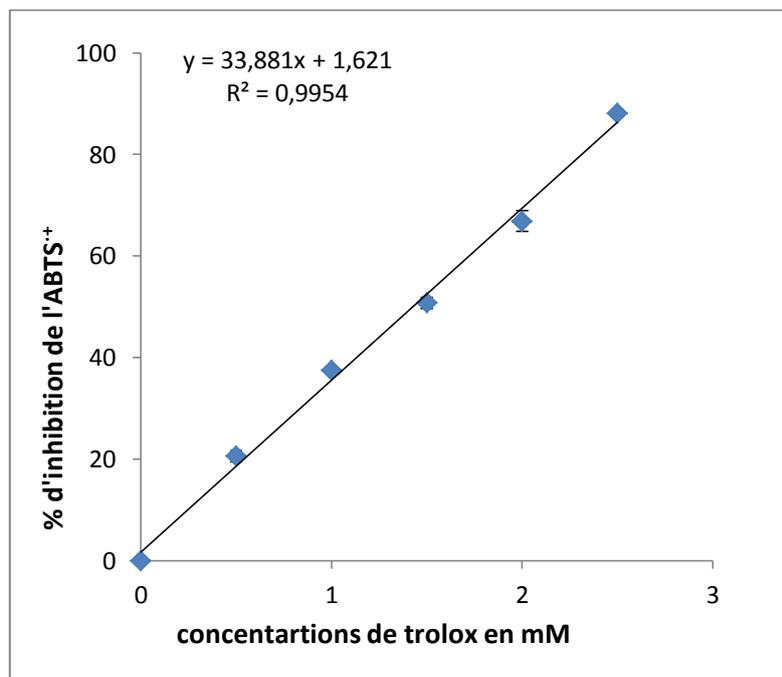


Figure : Activité anti-radicalaire du trolox pour l'ABTS à différentes concentrations.

## Résumé

Les plantes médicinales possèdent des vertus thérapeutiques dues en général aux métabolites secondaires qui les constituent. Ce projet résume l'étude des effets antioxydant, anti-radicalaire et sur l'alpha glucosidase des flavonoïdes polaires et apolaires de *Rhamnus alaternus* et *Ajuga iva*. L'alaterne possède un effet anti radicalaire du DPPH de 81.48% avec une IC<sub>50</sub> de 150µg/ml, de l'ABTS à 20% et 44.65% pour l'ivette, cette dernière inhibe à 100% la peroxydase tandis que l'alaterne atteint 83.57%. Le pouvoir réducteur des différents extraits est considérablement important. Un effet inhibiteur de 100% de l'alpha glucosidase par des concentrations de 0.125mg/ml en flavonoïdes apolaires des deux plantes a été observé contrairement aux flavonoïdes polaires de *Rhamnus alaternus* qui peuvent avoir un effet activateur.

**Mots clefs :** *Ajuga iva*, *Rhamnus alaternus*, flavonoïdes, pouvoir antioxydant, pouvoir anti radicalaire, DPPH, ABTS, pouvoir réducteur, peroxydase, alpha glucosidase.

## Summary

Medicinal plants have healing generally due to secondary metabolites that constitute them. This project summarizes the study of the effects antioxidant, antiradical and alpha glucosidase polar and nonpolar flavonoids from *Rhamnus alaternus* and *Ajuga iva*. The alaterne has an anti-radical DPPH of 81.48% with an IC<sub>50</sub> of 150µg/ml of the 20% ABTS and 44.65% for ivette, it inhibits the peroxidase to 100% while the alaterne reached 83.57%. The reducing power of various extracts is considerably important. An inhibitory effect of 100% alpha-glucosidase by concentrations of flavonoids 0.125mg/ml apolar of the two plants was observed in contrast to polar *Rhamnus alaternus* flavonoids that may have an activating effect.

**Keywords:** *Ajuga iva*, *Rhamnus alaternus*, flavonoids, antioxidant, antiradical power, DPPH, ABTS, reducing power, peroxidase, alpha glucosidase.