

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 Biologie Physico-Chimique*

MEMOIRE DE FIN DE CYCLE

En vu de l'obtention du diplôme d'étude supérieure en Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option ; Biochimie



Activités anti-oxydantes et anti-enzymatiques de
l'extrait éthanolique de *Rhamnus alaternus* L.

Réalisé par

- * M^{elle} CHALAL Akila
- * M^r TIGHERMINE Lyes

Devant le jury :

présidente : D^r KHATTAL B.
promoteur : M^r TACHERFIOUT M.
Examineur : M^r BOUGUEZZA Y.

Promotion 2011/2012

Remerciements

*Nous tenons à exprimer nos remerciements les plus sincères tout d'abord au « **Bon Dieu** » pour la patience et la santé qui nous ont été utiles tout au long de notre parcours*

*Notre profonde gratitude va à notre promoteur Mr **TACHERFIOU M.** pour l'honneur qu'il nous a fait de nous encadrer, pour ses précieux conseils, ses orientations et la confiance qu'il a mis en nous, et pour avoir suivi notre travail avec une extrême bienveillance.*

On tient également à exprimer nos sincères remerciements à :

- *Dr **KHETTAL B.** d'avoir accepté de présider le jury et de juger notre travail.*
- *Mr **BOUGUEZZA Y.** d'avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Nous exprimons nos sincères remerciements aussi à **M^{me} AMROUCHE W.** pour le temps et l'intention qu'elle nous consacré, Nos remerciements s'adressent également à **M^{me} AIT HABIB**, L'ensemble du personnel de laboratoire de l'animalerie en particulier **SAIDA**.*

En fin nous tenons à remercier tous nos ami (e) s et collègues pour leurs soutiens tout au long de l'élaboration de ce mémoire.

AKILA et LYÉS

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents et surtout à ma très chère mère qui m'a toujours encouragé tout au long de mes études, que dieu te protège.

A mes chers frères Atmane, Mouhand.

A mes chères sœurs Kahina (son mari Hakim et ces jolies filles Dida et maisa), sassa et les jolies jumelles Katia et Nawel, et ma belle sœur Lamia.

A toute ma famille

A tout mes amis (es) : Kahina, Samia, sabrina, Lila, lilia, Zina, Soussou, Rachida, Radia, Hamida, Warda, Wafia, Khadija, Naima, Kiki, Izem, et Nasar, ...etc.).

Akila

Dédicaces

J'adresse surtout, ma plus profonde gratitude et tout mon amour à ma mère, mon père et, qui ont su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances au cours de toutes mes années études, c'est avec émotion que je leurs exprime toute mon affection, mon admiration et mon profond respect.

A mon très chère frère : TAHAR pour son aide précieuse ; que le dieu le bénisse .

Ma très chère sœur : HAFIDA et ses deux enfants (HOUDA et BILLAL), son mari FARID, qui je souhaite une belle vie.

Ma petite sœur KAHINA à qui je souhaite la réussite dans ses études.

Mes très chère ami(e)s en particulier : NABILA, SABAH, ZOUBIR, SALAH, MENAD, YOUNES, AMINE, MEKHOLOUF, KARIM, RACHID et SOFIANE.

A tous mes collègues de la promotion

4^{eme} année D.E.S de biochimie.

Lyes.

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Feuilles, fruits et fleurs de <i>Rhamnus alaternus</i> .	2
2	Voies de biosynthèse des différentes classes de composés phénoliques.	8
3	Structure de base des flavonoïdes.	11
4	L'une des structures de base des tannins hydrolysables.	13
5	L'une des structures de base des tannins condensés.	13
6	Structure de l' α -glucosidase de <i>Sulfolobus sulfataricus</i> (Mal A)	16
7	Les structures des inhibiteurs de l' α -glucosidase	17
8	Structure du noyau Protohaematin IX	20
9	Les feuilles (fraîches et sèches) et poudre de <i>Rhamnus alaternus</i>	21
10	les composés phénoliques de <i>R. alaternus</i> après migration sur la CCM	29
11	Effet scavenger contre le radical DPPH de l'extrait éthanolique de <i>R. alaternus</i> à différente concentration	31
12	Effet scavenger contre le radical DPPH des standards (acide gallique et quercétine) à différentes concentrations	31
13	Activité scavenger de l'extrait éthanolique contre le radical ABTS en fonction de temps.	33
14	Pouvoir réducteur en fonction de la concentration de l'extrait	34
15	Inhibition de l'alpha glucosidase par l'extrait éthanolique de <i>R. alaternus</i> .	35
16	Inhibition de la peroxydase par les composés phénolique d' <i>R. alaternus</i>	36

Liste des tableaux

Tableau	Titre du tableau	Page
I	Classification botanique de <i>Rhamnus alaternus</i> .	03
II	Les noms vernaculaires de <i>R alaternus</i> .	03
III	principales classes des composés phénoliques.	09
IV	Principaux acides hydroxybenzoïques.	10
V	Principaux acides hydroxycinnamiques.	10
VI	Principaux types de coumarines.	10
VII	Structure de certains flavonoïdes.	12
VIII	Activités biologiques de quelques composés phénoliques.	14
IX	Les rapports frontaux des différentes fractions obtenues par CCM.	29

Liste des abréviations

Abs: Absorbance.

Ac: Acide

ABTS: 2, 2'azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonate)

AlCl₃: Chlorure d'aluminium

CCM: Chromatographie sur couche mince

cm : Centimètre

°C: Degré celcius

DPPH: Radical 2, 2-diphényl-1-picrylhdrazyl

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DO : Densité optique

EQ: Equivalent de la Quercétine

EAG: Equivalent d'acide gallique

H₂O₂: peroxyde d'hydrogène

IC₅₀: Concentration inhibitrice à 50%

mg: Milligramme

ml: Millilitre

mn: Minutes

nm: Nanomètre

pH: Potentiel d'hydrogène

pNPG: *p*-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside

R_f : Rapport frontal

UV : Ultra-violet

µg : Microgramme

µl : Microlitre

Sommaire

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Synthèse bibliographique

Chapitre I : *Rhamnus alaternus*

I-1-*Rhamnus alaternus*

I-1-1-Description botanique 2

I-1-2-Description de l'habitat 2

I-1-3- Classification botanique 3

I-1-4-Les noms vernaculaires 3

I-1-5-Composition chimique et biochimique 4

I-1-6-Utilisation dans la médecine traditionnelle 4

I-1-6-Activités biologique 5

I-1-6-1-Activité antioxydante 5

I-1-6-2-Activité antimutagène 5

I-1-6-3-Activité anti-inflammatoire 6

I-1-6-4-Activité anti-enzymatique 6

Chapitre II : les composés phénoliques

I-2-Les Composés phénoliques

I-2-1-Généralités 7

I-2-2-Biosynthèse des composés phénoliques.....	7
I-2-2-1-Voie de l'acide shikimique	7
I-2-2-2-Voie de l'acétate	8
I-2-3-Classification des composés phénoliques	9
I-2-3-1-Les acides phénoliques	9
I-2-3-2-Les flavonoïdes	11
I-2-3-3-Les tannins	11
I-2-4-Propriétés des composés phénoliques	13
I-2-4-1-Propriétés physicochimiques	13
I-2-4-2-Propriétés biologique	14
I-2-4-3-Activité antioxydante des composés phénoliques	14

Chapitre III : α -glucosidase et peroxydase

I-3-1-L' α glucosidase (EC 3.2.1.20)

I-3-1-1-Généralités	16
I-3-1-2-Classification	16
I-3-1-3-Les inhibiteurs de l' α -glucosidase	17
I-3-1-4-Mécanismes d'action de α -glucosidase	17

I-3-2-peroxydase

I-3-2-1- Définition de peroxydase	18
I-3-2-2- classification de peroxydase	18
I-3-2-3-Aspect structural de peroxydase	19
I-3-2-4-Les rôles de peroxydase.....	20

Matériel et méthodes

II-1-Matériel et méthodes

II-1-Préparation du matériel végétal	21
II-2-Extraction	21
II-3-Caractérisation partielle par chromatographie sur couche mince (CCM).....	22
II-4-Dosage des polyphénols.....	23
II-5-Dosage des flavonoïdes.....	23
II-5- Evaluation de l'activité anti-radicalaire et antioxydant	24
II-5-1-Evaluation de l'activité anti-radicalaire contre le radical DPPH.....	24
II-5-2-Détermination de l'activité scavenger du radical ABTS	24
II-5-3-Pouvoir réducteur	25
II-6-Evaluation de l'activité anti-enzymatique.....	26
II-6-1- Activité anti α -glucosidase	26
II-6-2-Activité anti peroxydase	26

Résultats et discussion

II-2-Résultats et discussion

II-2-1-Taux d'extraction.....	28
II-2-2-Caractérisation partielle par CCM de l'extrait éthanolique de <i>R. alaternus</i>	28
II-2-3-Dosage des polyphénols totaux	29
II-2-4-Dosage des flavonoïdes	30

II-2-5- Evaluation de l'activité anti-radicalaire et antioxydante	30
II-2-5-1- Evaluation de l'activité anti-radicalaire contre le radical DPPH	30
II-2-5-2- Evaluation de l'activité anti-radicalaire contre le radical ABTS	32
II-2-5-3-Pouvoir réducteur	33
II-2-6-Evaluation de l'activité anti-enzymatique	34
II-2-6-1- Activité anti α -glucosidase	34
II-2-6-2-Activité anti peroxydase	36
Conclusion	37

Références bibliographiques

Glossaire

Annexes

Introduction

Introduction

Depuis l'antiquité, les plantes médicinales sont considérées comme une source majeure des produits utilisée en thérapeutique. De nos jours, le traitement par les plantes est reconnu pour sa facilité d'utilisation et son efficacité, et a tendance de plus en plus à se développer pour rechercher des molécules actives d'origines naturelles à causes des effets indésirables des produits chimique synthétiques.

Les métabolites secondaires qui constituent ces plantes sont responsables de leurs effets. Il s'agit : des composés phénoliques qui ont un effet inhibiteur sur les enzymes, des alcaloïdes, des huiles essentielles. Ces composés possèdent une capacité anti-oxydante très importante et peuvent contribuer à une diminution du stress oxydatif (**Koyama et al., 1999**).

Rhamnus alaternus est une des plantes les plus utilisée dans le bassin méditerranéen, à cause de ses bienfaits ; notamment dans le traitement des complications hépatique, contre la jaunisse et certaines affections dermatologiques (**Ait Youssef, 2006**). Cette plante est riche en différents composés phénoliques tels que les flavonoïdes. Ils seraient responsables de plusieurs de ses effets pharmacologiques.

Dans ce cadre, l'objectif de la présente étude est premièrement, d'avoir un extrait brut des feuilles de *Rhamnus alaternus*, de déterminer le taux des composés phénoliques ainsi que celui des flavonoïdes. Deuxièmement, d'étudier, les propriétés anti-oxydantes des composés phénoliques d'*Rhamnus alaternus* et de tester leurs effets sur les enzymes tels que, l' α -glucosidase et la peroxydase.

En effet le manuscrit est reparti en deux parties, en premier lieu, la synthèse bibliographique qui est devisée en trois chapitres. Le premier est consacré à une description de la plante de *Rhamnus alaternus*, le deuxième est un aperçu général sur les composés phénoliques et enfin le troisième est un rappel sur l' α -glucosidase et peroxydase. La deuxième partie est l'étude expérimentale, elles devisée en deux chapitre. Le premier est la description des matériels et méthodes utilisée dans la réalisation de ce travail. Tandis que le deuxième chapitre est une description des résultats obtenu et un essai de leur d'interprétation.

Partie bibliographique

Chapitre I : Rhamnus alaternus

I-1-*Rhamnus alaternus***I-1-1-Description botanique**

Rhamnus alaternus (Rhamnaceae) est un arbuste éternel et dioïque d'origine méditerranéenne (**Bas et al ., 2009**), de 2-6 mètres de hauteur, ayant des tiges droites (**Izhaki et al., 2002 ; Hemmami et al.,2006 ; Bas et al ., 2009**). Les feuilles sont alternes, persistantes, coriaces, luisantes sur leur face supérieure, de forme ovale et lancéolée, leur nervures sont parallèles au bord du limbe. Elles sont lâchement et irrégulièrement dentées sur leurs bords. L'inflorescence est en petit grappe qui réfléchie si elle comporte les fleurs mâles, ou dressée si elle comporte les fleurs femelles. La fleur est généralement dioïque et unisexuée, petite et de couleur jaunâtre (**Ait Youssef, 2006**). Cette floraison se produit entre février et avril. (Figure 1) (**Izhaki et al ., 2002**).

Elle produit des fruits charnus, drupe mûr, sa surface est d'abord rouge, puis devient noire à la maturité, chaque fruit a 2-5 graines, ayant une forme triangulaire de 2,5mm de largeur 4,6 mm de longueur et d'un poids environ 9mg (**Bas et al., 2009**). La maturation s'effectue entre avril et août (**Aronne et Wilcock, 1995 ; Bas et al., 2005**).



Figure 1 : Feuilles, fruits et fleurs de *Rhamnus alaternus* (**Aronne et wilcock, 1995**).

I-1-2-Description de l'habitat

Rhamnus alaternus est un arbuste qui est distribué le long du bassin méditerranéen comme l'Asie et Europe (**Gulias et al ., 2004**). Elle se trouve dans les pays d'Afrique du nord : en Algérie, au Maroc ou elle serait commune en Tunisie, et dans les fourrés du littoral méditerranéen ; en Algérie elle pousse dans les forêts, les rocailles et surtout dans les rochers des montagnes (**Ait Youssef, 2006**).

I-1-3- Classification botanique

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

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

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

I-1-4-Les noms vernaculaires

Les noms vernaculaires de *Rhamnus alaternus* sont indiqués dans le **tableau II**

Tableau II : Les noms vernaculaires de *R alaternus* (Ait Youssef, 2006).

La langue	Nom
Arabe	Oud el -khir
Français	Alterne, nerprun alaterne
Berbère	Melilése

I-1-5-Composition chimique et biochimique

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

Elle contient aussi des flavonoïdes glycosylés tel que kaempferol 3-O-B-isorhamninoside, rhamnocitrin 3-O-B-isorhamninoside et rhamnetin-3-O-B-isorhamninoside (Ban Ammar et al., 2009) , et des flavonoïdes aglycones comme le kaempferol, quercétine et l'apigénine (Ben Ammar et al ., 2008 ; Ben Ammar et al ., 2009) .Elle est aussi riche en flavones hétérosides (Stocker et al ., 2004) et coumarines (Ben Ammar et al ., 2005).

La pulpe de *R. alaternus* est composée principalement d'eau (68%), de minéraux (Fe, Zn, Mn, K, Na, Ca, Mg, P, Cu) dont le plus abondant est le K (12.90%), de lipides, protéines et de fibres (cellulose, hemicellulose et lignine). Les fruits relativement volumineux de *Rhamnus alaternus* contiennent plus d'eau et de Phosphore, les fruits de taille intermédiaire contiennent plus de lipides, Magnésium et de Calcium et les fruits plus petits contiennent plus de protéines, Potassium et zinc. Des données prouvent que la pulpe de fruit contient toujours moins d'emodin que les feuilles (Izhaki et al ., 2002).

I-1-6-Utilisation dans la médecine traditionnelle

R. alaternus est l'une des espèces utilisées généralement dans le programme de reboisement dans la méditerranée, en raison de sa capacité de survivre dans les environnements xériques (Gulias et al ., 2004) .

Les tiges et les feuilles de *Rhamnus alaternus* L étaient utilisées en Algérie- dans le constantinois, contre la jaunisse et les troubles hépatiques provoqué par le paludisme. Le bois ou l'écorce de *Rhamnus alaternus* L est employé dans l'est du Maroc, en décocté et dans un bouillon de viande pour traiter des affections hépatiques. Le fruit était utilisé en Algérie comme purgatif doux ; au Maroc- dans le Haut Atlas et le Moyen Atlas, il est toujours employé comme laxatif (Ait Youssef, 2006). Le fruit de *R. alaternus* représente aussi une source important d'eau d'éléments nutritifs (Izhaki et al., 2002 ; Gulias et al., 2004). Ses feuilles émettent des petites quantités de l'isoprène (2-méthyl-1,3-butadiene) qui affectent

l'oxydation de l'atmosphère en nettoyant les radicaux OH, et peut indirectement influencer sur l'accumulation du méthane atmosphérique, et surtout protège les feuilles contre la photooxydation en réagissant avec O₂ produit lors de la photosynthèse (**Affek et Yakir, 2002**).

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

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

I-1-6-Activités biologique

I-1-6-1-Activité antioxydante

Des études in vitro ont démontré le potentiel antioxydant des flavonoïdes isolés à partir des feuilles de *Rhamnus alaternus* tel que les propriétés de piégeage des radicaux libres (DPPH), l'inhibition de la peroxydation des lipides et la chélation des cations divalents ainsi les espèces réactives de l'oxygène (**Ben Ammar et al., 2008 ; Ben Ammar et al., 2009**)

I-1-6-2-Activité antimutagène

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

I-1-6-3-Activité anti-inflammatoire

Des études ont montré que les extraits organiques de *R. alaternus* possèdent des activités anti-inflammatoires. Ces activités sont corrélées avec la composition en polyphénols surtout en flavonoïdes, tannins et les anthraquinones tels que l'émodin, cette propriété est due principalement à leurs activités de piégeage des radicaux libre (**Ben Ammar et al., 2005**).

I-1-6-4-Activité anti-enzymatique

Des études in vitro ont montré que les extraits organiques de *R alaternus* inhibent significativement l'activité des carboxyl estérases, enzymes largement distribuées dans les tissus animaux, essentiellement impliqués dans le catabolisme du nombreux xénobiotiques, tels que des carboxylesters, des thio-esters et des amides aromatiques. Cette propriété inhibitrice est attribuée aux flavonoïdes qui exercent une activité non compétitive (**Stocker et al ., 2004**).

Chapitre II : Les composés phénoliques

I-2-Les Composés phénoliques

I-2-1-Généralités

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires d'origine végétale, qui constituent l'un des groupes les plus abondants des métabolites naturels. L'élément structural de base est un noyau benzénique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthyle, ester, sucre...). Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits. Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins. **(Boizot et charpentier, 2006 ; Vattemet et al., 2005)**. Ce sont des molécules bioactives présentant un grand intérêt scientifique en raison de leurs multiples activités biologiques **(Falleh et al., 2008)**. Ils constituent une partie essentielle de l'alimentation humaine, et sont d'un intérêt considérable en raison de leurs propriétés antioxydantes **(Balasundrem et al., 2006)**. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel **(Macheix et al., 2005)**.

I-2-2-Biosynthèse des composés phénoliques

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromagenèse **(Bruneton, 1999)** :

I-2-2-1-Voie de l'acide shikimique

Les deux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) sont à l'origine de la formation de la plupart des molécules phénoliques chez les végétaux **(Figure 2)**. Ils sont formés, à partir de sucres simples issus du métabolisme primaire, par la voie bien connue de l'acide shikimique, conduisant à la formation de phénylalanine qui, par désamination, donne le précurseur immédiat des phénols, l'acide cinnamique **(Sarni-Manchado et Cheynier, 2006)**. L'acide cinnamique est rapidement transformé en acide p-coumarique par l'addition d'un radical hydroxyle. La tyrosine est également désaminée en acide p-coumarique **(Hopkins, 1995)**.

I-2-2-2-Voie de l'acétate

C'est une voie à part de l'acétate qui conduit à des poly-B-cétoesters de longueur variable. Les polyacétates qui engendrent, par cyclisation, des composés souvent polycyclique : chromones, isocoumarines, xanthones, quinones... etc. La pluralité structurale des composés phénolique est due à cette double origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité très fréquente, d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration de composés d'origine mixte (flavonoïdes *Iato sensu*, stilbène, pyrones...etc) (Bruneton, 1999).

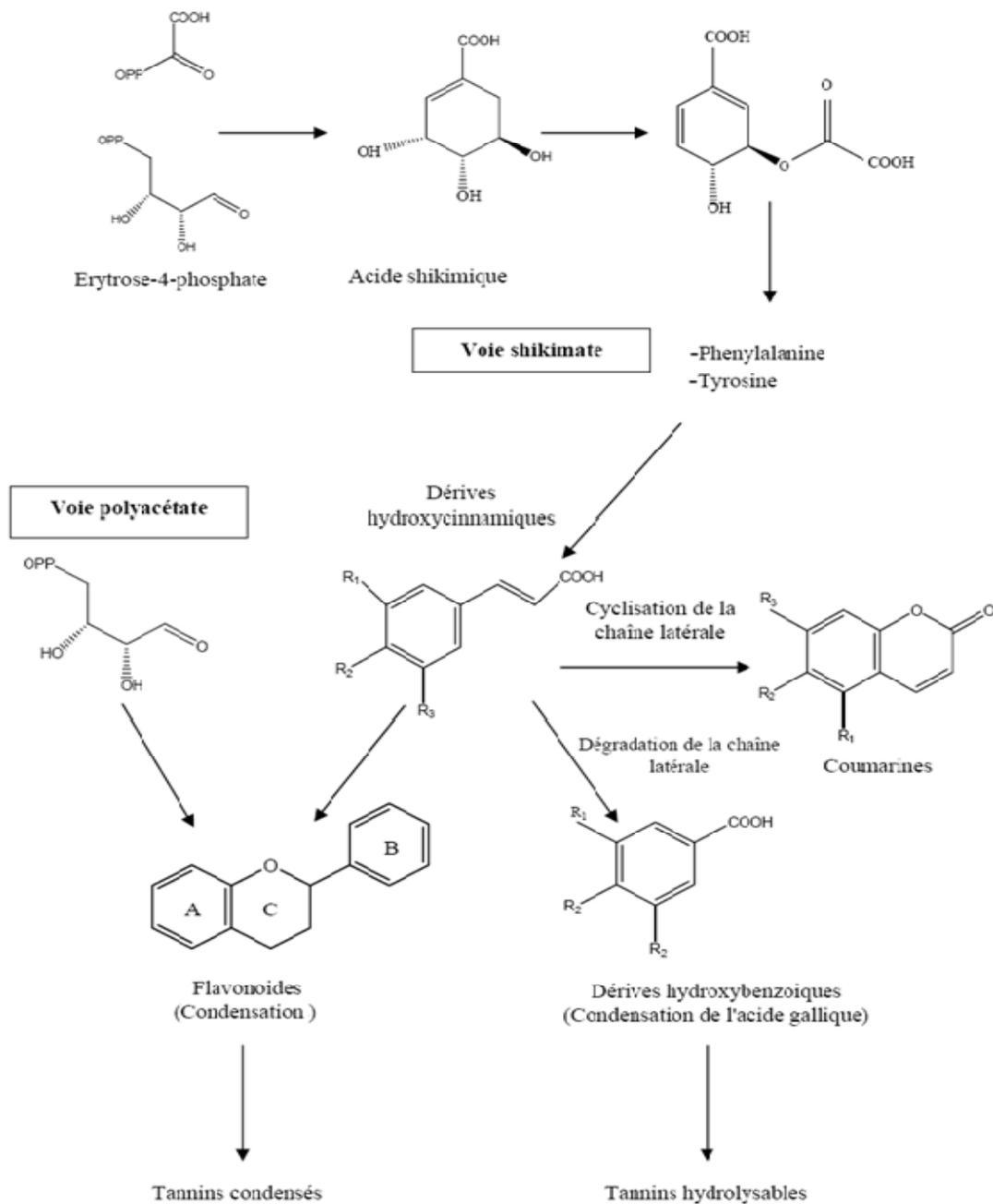


Figure 2 : Voies de biosynthèse des différentes classes de composés phénoliques (Boukerouis, 2008)

I-2-3-Classification des composés phénoliques

Selon **Sarni-Manchado et Cheynier (2006)**, les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes, ils se différencient d'abord par la complexité du squelette de base, par le degré de modification de ce squelette, et par les liaisons possible de ces molécules de base avec d'autres molécules. Les principales classes de composés phénoliques sont représentées dans le **tableau III**

Tableau III : principales classes de composés phénolique (**Sarni- Manchado et Cheynier, 2006**)

Squelette carboné	Classe	Exemple
C ₆	Phénols simples	Catéchol
C ₆ -C ₁	Acide hydroxybenzoïque	<i>p</i> -hydroxybenzoïque
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamique Coumarines	Acide caféique Scopolétin
C ₆ -C ₄	Naphttoquinones	Juglone
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resvérat
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes, Iso flavonoïde	Qurecétine, cyanidine Daidzéine
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignines	Pinorésinol
(C ₆ -C ₃) n	Lignines	–
(C ₆ -C ₃ -C ₆) n	Tanins condensés	–

I-2-3-1-Les acides phénoliques

Les acides phénoliques appartiennent à deux groupes : les acides hydroxy-benzoïques et les acides hydroxy-cinnamique (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

a) Les acides hydroxybenzoïques : Sont des dérivés de l'acide benzoïque, ont une structure générale de base de type (C₆-C₁), existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides. Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans le **tableau IV**.

b) Les acides hydroxycinnamiques : Dérivent de l'acide cinnamique, ont une structure générale de base de type (C₆-C₃), existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques, les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique conduisent à

une réactivité chimique importante de ces molécules. **Le tableau V** représente les principaux acides hydroxycinnamiques.

c) **Les coumarines** : Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale. (**tableau VI**).

Tableau IV: Principaux acides hydroxybenzoïques (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**)

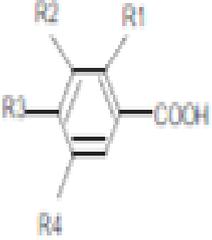
Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy Benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide Protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	H	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

Tableau V : Principaux acides hydroxycinnamiques (**Guignard, 2000**).

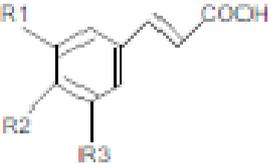
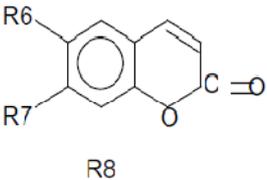
Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

Tableau VI : Principaux types de coumarines (**Macheix et al, 2005**).

Structure	R6	R7	R8	Acides phénoliques
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH3	OH	H	Scopolétol
	OCH3	OH	OH	Fraxétol
	H	OH	OH	Daphnétole

I-2-3-2-Les flavonoïdes

Les flavonoïdes (du latin flavus, jaune) sont des substances généralement colorées très répandues chez les végétaux. Plus de 4000 flavonoïdes (plusieurs milliers de molécules décrites) ont été répertoriés. Ils protègent les plantes terrestres des radiations ultraviolettes (**Guignard, 2000**). Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base $C_6-C_3-C_6$. Ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C_3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) (**Figure 04**) (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**). La structure des différents types de flavonoïdes varie par la nature de l'hétérocycle oxygéné (**Tableau VII**) (**Ribereau Gayon, 1968**).

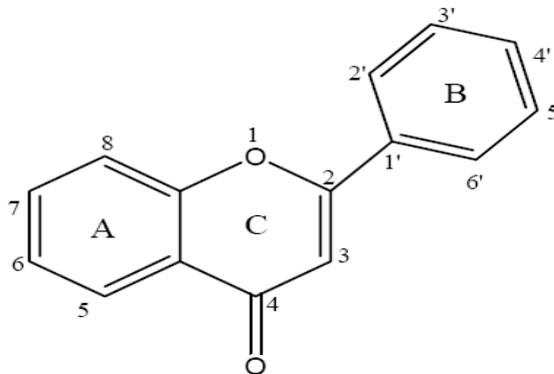


Figure03 : Structure de base des flavonoïdes (**Ribereau Gayon, 1968**).

I-2-3-3-Les tannins

Les tannins sont des composés phénolique hydrosolubles ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000Da, ils ont la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (**Bruneton, 1999**). Ils sont utilisés depuis l'antiquité par l'homme pour le traitement des peaux d'animaux (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

Les tannins sont classés en deux groupes principaux différents par leur structure : les tanins hydrolysables et les tanins condensés. (**Bruneton, 1999**).

Tableau VII : Structure de certains flavonoïdes (Bruneton, 1999).

Flavonoïdes	Structures	Exemples
Flavones		$R_1=R_2=H$ Apigénine
Flavonols		$R_1=OH, R_2=H$ Quercétine
Flavanols		$5=7=3'=4'=OH$ Catéchine
Flavanonols		Taxifoline
Anthocyanidines		$5=7=3'=4'=5'=OH$ Delphinidine
Isoflavones		Daidzéine $R_1=H$

a) *Les tannins hydrolysables* : Sont constitués par une molécule glucidiques sur laquelle est estérifiée de l'acide gallique ou un de dérivés (d'où le nom de tannins galliques ou pyrogalliques) ; ils sont facilement hydrolysés par voie chimique (alcaline ou acide) ou enzymatique. Les tannins se différencient en tannins galliques (ou gallotanins) qui donnent uniquement par hydrolyse, de l'acide gallique et des tannins ellagiques (ou ellagitanins), les plus nombreux, qui donnent, dans les même conditions à coté de l'acide gallique, différents

dérivés de l'acide gallique, parmi les quels l'acide ellagique est le plus important (**Figure 04**) (**Ribereau-Gayon, 1968**).

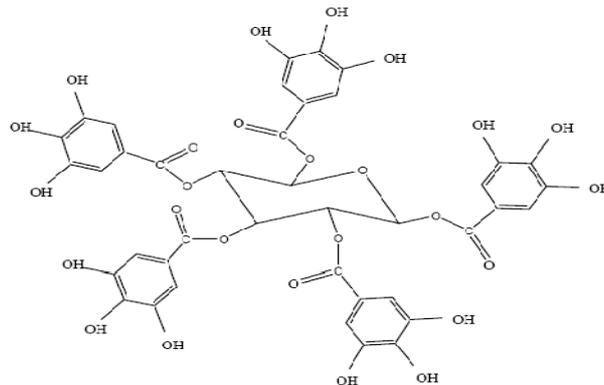


Figure 04: L'une des structures de base des tannins hydrolysables (**Haslam, 2007**)

b) Les tannins condensés : Sont des polymères de molécules élémentaires qui possèdent la structure générale des flavonoïdes et dont les plus importantes sont les flavanols-3 (catéchines) et les flavanediols-3-4 (leucoanthocyanidines) (**Ribereau-Gayon, 1968**). Ces molécules sont reliées par de liaisons fortes de type carbone-carbone, qui ne sont pas hydrolysables mais peuvent être oxydées par les acides forts libérant des anthocyanidines (**Hopkins, 1995**)

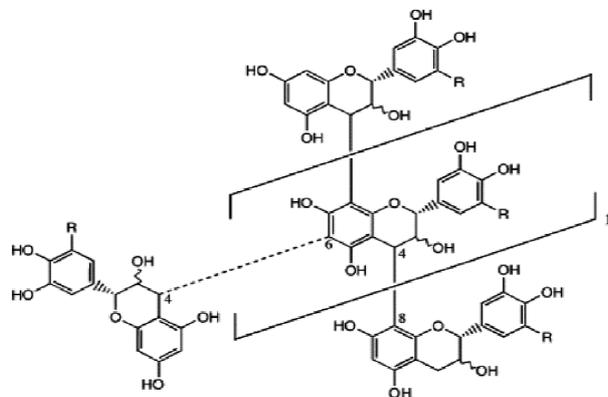


Figure 05 : La structure de base des tannins condensés (**Hopkins, 1995**).

I-2-4-Propriétés des composés phénoliques

I-2-4-1-Propriétés physicochimiques

La présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques hydroxylés chez tous les composés phénoliques est responsable de certaines propriétés communes utilisées pour les extraire à partir du matériel végétal. Les polyphénols sont généralement extraits, selon leur solubilité,

par les solvants polaires tels que l'éthanol, le méthanol, l'acétone et l'eau. Cependant, cette solubilité varie d'une classe de composés à une autre dépendant des substitutions (méthylation ou glycosylation) sur les groupements hydroxyles (Macheix *et al.*, 2005).

I-2-4-2-Propriétés biologique

Les polyphénols interviennent dans le contrôle de la croissance et le développement des plantes en interagissant avec les diverses hormones végétales de croissance. Ils permettent aux végétaux de se défendre contre les rayons ultraviolets. Certains d'entre eux jouent le rôle de phytoalexines comme les isoflavonols permettant de lutter contre les infections causées par les champignons ou par les bactéries (Makoi et Ndakidemi, 2007).

Les pigments non azotés sont impliqués dans le processus de pollinisation : ils attirent l'attention des insectes pollinisateurs, ou servent au contraire à dessiner les formes pour éloigner les prédateurs. D'autre sont des inhibiteurs d'enzymes et interviennent dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies. Les polyphénols sont également utilisés dans l'industrie agro-alimentaire comme additif, colorant, arôme ou agent de conservation (Bruneton, 1999). Plusieurs activités sont attribuées aux composés phénoliques. Le **tableau VIII** illustre les rôles attribués aux différentes classes de polyphénols

Tableau VIII : Activités biologiques de quelques composés phénoliques (Bruneton 1999 ; Hennebelle, 2006).

Composés phénoliques	Activité biologique
Ac. Phénols (Ac. caféique, Ac. calicylique)	Antibactérienne, antifongique et antioxydante
Tanins (Tanin gallique, Proanthocyanidine)	Effet stabilisant sur le collagène, antioxydant, anti diarrhéique, effet antiseptique, effet vasoconstricteur
Flavonoïdes (Lutéoléine, Catéchine, Hespéridine, Quercétine, Naringénine)	Antitumorale, anticarcinogène, anti-inflammatoire, antioxydante, antiallergique, antiulcéreuse, antivirale, antimicrobienne, hypotenseur diurétique
Coumarines (Dicoumarol)	Anticoagulant, antioxydant, protectrice vasculaire et anti-oedémateuse

I-2-4-3-Activité antioxydante des composés phénoliques

Les polyphénols sont bien connus pour leur activité antioxydante, ils sont en effet les antioxydants les plus abondants du régime alimentaire et jouent un rôle majeur en contrôlant les réactions d'oxydation *in vivo*, ils peuvent piéger les radicaux libres (l'effet scavenger) (**Manna et al., 1997**). Les antioxydants sont des substances qui retardent ou inhibent l'oxydation d'un substrat quand ils sont présents à une faible concentration comparée à celle du substrat (**Berger et Chiolero, 2001 ; Antolovich et al., 2002 ; Berger, 2006**).

Les antioxydants sont des composés utilisés par les organismes aérobies pour se protéger contre le stress oxydatif produit par les radicaux libres et les espèces oxygénées réactives. Ils exercent leur action protectrice soit par suppression de la formation des radicaux libres ou par piégeage des radicaux libres (**Tamimi et al., 2002**). L'organisme dispose d'une large gamme d'antioxydants endogènes sous forme de systèmes enzymatiques ou non enzymatiques et divers facteurs nutritionnels, y compris certaines vitamines (**Berger et Chiolero, 2001**).

Chapitre III : α -glucosidase et peroxydase

I-3-1-L' α -glucosidase (EC 3.2.1.20)**I-3-1-1-Généralités**

Les α -glucosidase [α -D-glucoside glucohydrolase] sont des enzymes responsables de la digestion des glucides en monosaccharides dans le processus de l'absorption intestinale (**Shim et al., 2003**). Elles sont des exo-carbohydrolases qui catalysent l'hydrolyse des liaisons α -glucosidiques à l'extrémité non réductrice terminale de leur substrat ainsi que la réaction de transglucosylation pour synthétiser des composés α -glucosylés et des glucooligosaccharides de différentes tailles et liaisons osidiques (**Okuyama et al., 2005**). Ces enzymes ont différentes spécificités de substrats qui permettent de les classer dans deux familles d' α -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 ; Chiba, 1997 ; Kimura et al., 2004**).

I-3-1-2-Classification

La famille I : Elle hydrolyse mieux les substrats hétérogènes comme les aryl- α -D-glucosides et le saccharose par rapport au maltose (type I)

La famille II : Elles sont très actives en présence des substrats homogènes et sont groupées par convention dans les types II et III. Les α -glucosidases de types II et III sont très semblables par leur spécificité de substrat, mais celles de type III sont les seules capables de bien hydrolyser les α -glucanes comme l'amidon soluble, le glycogène ainsi que les malto-oligosaccharides (**Kimura et al., 2004**)

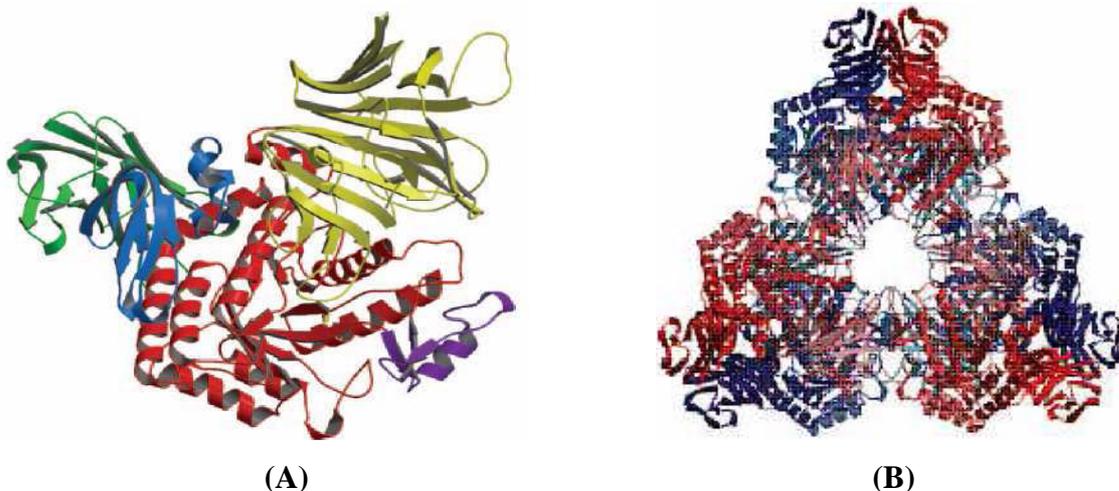


Figure 06 : Structure de l' α -glucosidase de *Sulfolobus sulfataricus* (Mal A) (A : monomère ; B : trimère de dimères) (**Ernst et coll., 2006**)

I-3-1-3-Les inhibiteurs de l' α -glucosidase

L'inhibition de cette enzyme ralentit la digestion des glucides et diminue leur absorption, aboutissant à une baisse des glycémies post- prandiales. Les principales molécules inhibitrices des α -glucosidase sont l'acarbose (Glucor®), le miglitol (Diastabol®) voglibose (**Figure 07**) qui sont utilisées comme médicaments dans le traitement de l'hyperglycémie post- prandial (**Shim et al., 2003**).

Les inhibiteurs de l' α -glucosidase sont des pseudotetrasaccharides d'origine bactérienne. Ces analogues structuraux des oligosaccharides inhibent de façon compétitive et réversible l' α -glucosidase de l'intestin grêle (**Bharatham, 2008**). Les inhibiteurs de l' α -glucosidase (IAG) ont été développés pour retarder l'absorption intestinale des glucides, comme l'acarbose qui est l'IAG le plus utilisé. Les IAG se lient compétitivement à la région de liaison des glucides des α -glucosidases, entrant ainsi en compétition avec les oligosaccharides et empêchant leur segmentation en monosaccharides absorbables (**Alice et al.,2004**), Donc, les inhibiteurs jouent le rôle de faux substrat retardant l'hydrolyse enzymatique des glucides complexes, et l'absorption du glucose après un repas (**Lysek et al ., 2006**).

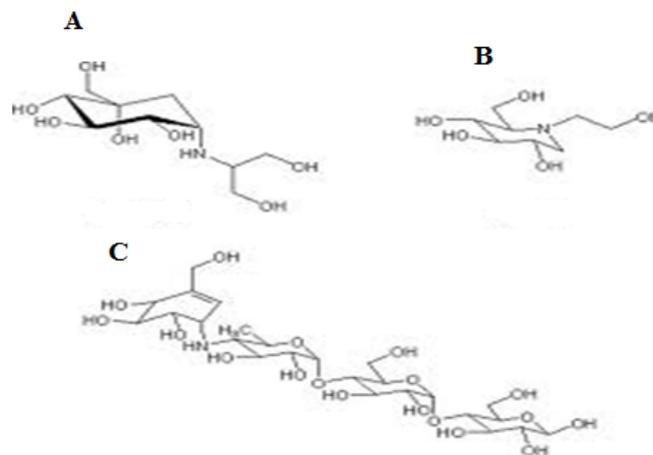


Figure 07 : Les structures des inhibiteurs de l' α -glucosidase : voglibose (A), miglitol (B), acarbose (C) (**Lysek et al., 2006**)

I-3-1-4-Mécanismes d'action de α -glucosidase

Les glucides complexes alimentaires sont segmentés en oligosaccharides et en disaccharides par les amylases pancréatiques dans le duodénum. Les oligosaccharides et les disaccharides doivent ensuite être dégradés en monosaccharides par les alpha-glucosidases, pour leur absorption par les entérocytes du jéjunum. La digestion et l'absorption des glucides à lieu

principalement dans le segment supérieur du jéjunum (**Alice et al., 2004**). Les principales étapes de la catalyse enzymatique sont : *(i)* la formation du glycosyl-enzyme avec libération du fructose, *(ii)* le transfert du glucosyle sur l'eau (hydrolyse), *(iii)* le transfert du glucosyle sur le glucose précédemment libéré par hydrolyse du saccharose pour donner le maltose (a), le nigérose (b), l'isomaltose (c), *(iv)* le transfert du glucosyle sur le saccharose pour donner le maltosylfructoside (d), *(v)* le transfert successif de résidus glucosyles sur le saccharose ou les PGFs pour former d'autres PGFs (e) (**Soro,2007**).

I-3-2-La peroxydase

I-3-2-1-Définition

Les peroxydase sont généralement connues comme peroxydases de gaïacol (classe III) parce que le gaïacol est un donneur d'électrons fréquemment utilisé pour estimer leurs activités (**Talano et al., 2006**). Elles forment une superfamille multigénique d'où l'existence d'un très grand nombre d'isoforme (**Passardi , 2006**).

I-3-2-2-Classification

Les peroxydases sont des oxydoréductases, enzyme à hème qui constituent une grande famille et présentent sous trois classes distinctes :

Les peroxydases de classe I (EC 1.11.1.5.6/.11) : Strictement intracellulaire, aussi présentes chez les bactéries, les levures et les champignons. Elles incluent: la Cytochrome C Peroxydase de levure (CCP), une protéine soluble présente dans la chaîne de transport d'électrons des mitochondries (offre une protection contre des peroxydes toxiques), l'Ascorbate Peroxydase (AP) (principale enzyme de suppression du peroxyde d'hydrogène dans les chloroplastes et le cytosol des plantes supérieures) et les catalase-peroxydases bactériennes offrant une protection aux cellules en cas de stress oxydatif (**Larrondo et al., 2005 ; Alarcon-Gutiérrez, 2007**).

Les peroxydases de classe II (EC 1.11.1.13/.14) : Excrétée par les champignons, elles comprennent les ligninases ou Lignine Peroxydase (LiPs), qui sont des glycoprotéines monomériques impliquées dans la dégradation de la lignine; et les peroxydases manganèse-dépendantes (MnPs), chez lesquelles le Mn^{2+} sert de substrat réducteur.

Les peroxydases de classe III (l'EC 1.11.1.7) : Sécritées par les plantes, existent sous formes d'isoenzymes avec différents profils d'expressions. Elles sont pour la plupart sécrétées, possédant toutes un signal peptidique, qui permet l'adressage à la voie de sécrétion du Réticulum Endoplasmique (RE). Elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques (faisant preuve de multifonctionnalité tissu-spécifique) (**Dobias , 2004**).

I-3-2-3-Aspect structural des peroxydases

Les peroxydases sont des hémoprotéines monomériques. Elles sont constituées d'une apoenzyme glycoprotéine liée à un coenzyme héminique à cofacteur de fer : la protohématine IX (la ferriprotoporphyrine) qui est indispensable à l'activité enzymatique, et aussi deux sites de fixation au calcium (Ca^{+2}) (**Dobias, 2004; Kamel et Behere, 2008**).

Les peroxydases sont d'une taille d'environ 300 acides aminés, dont le poids moléculaire est compris entre 28 et 60 kDa, elles comportent deux histidines et huit (parfois dix) résidus de cystéine qui forment quatre ponts disulfures (structure tertiaire), impliqués dans la stabilité de l'enzyme. Elles possèdent une extension N-terminale (N-Ter) (aussi appelée signal peptide) et pour certaines, une extension C-terminale (C-Ter). Ces différents acides aminés conservés jouent un rôle important au niveau de la structure tertiaire (pont disulfure des cystéines) et de l'activité catalytique. Le site catalytique représente le noyau protohématine IX. Sa structure est représentée dans la **figure 07** : (**Diogon, 2002**)

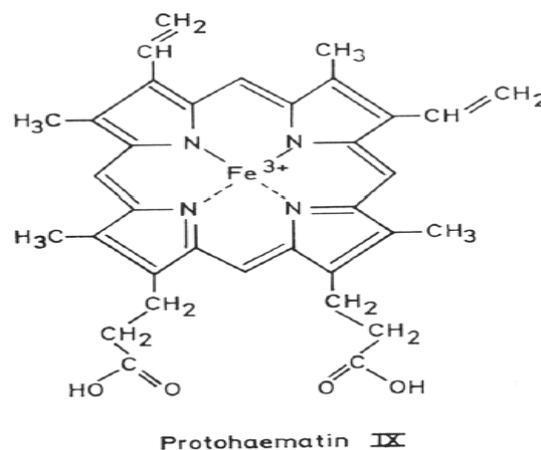


Figure 08 : Structure du noyau Protohaematin IX (**Diogon, 2002**).

I-3-2-4-Rôles des peroxydases

Les peroxydases exercent des fonctions diversifiées dans les plantes. Elles utilisent l'eau oxygénée comme accepteur d'électrons. En plus, elles peuvent catalyser l'oxydation de quelques molécules en présence d'oxygène (**Baaziz et al ., 2006**). C'est le cas de l'auxine (acide 3-indolylacétique), une hormone synthétisée dans les feuilles jeunes et les fruits et transporté vers les racines pour accomplir son activité. L'auxine joue un rôle clé dans le contrôle de l'ensemble des processus de croissance, développement et la différenciation de la plante. Au niveau cellulaire, elle est indispensable pour la division (**Passardi, 2006 ; Saroop et al., 2002**).

Les peroxydases ont un nombre considérable de substrat ce qui implique leurs rôles importantes dans le maintien ou l'adaptation des structures et des fonctions des cellules végétales dans leur environnement, ces enzymes sont impliquées dans la lignification, la biosynthèse de la paroi, le catabolisme de l'auxine, la défense contre l'infection par les agents pathogènes, la tolérance aux sels et la sénescence (**Khales et Baaziz, 2004**). La peroxydase joue un rôle aussi dans la réponse au stress oxydatif, en présence de polluants atmosphérique comme l'ozone (O₃).

Partie pratique

Matériel et méthodes

II-1-Préparation du matériel végétal

Rhamnus alaternus de la famille des Rhamnacées, appelée localement « meliless » est une plante médicinale utilisée sous forme de décoction pour le traitement de la jaunisse chez l'homme et l'animal.

Notre étude a été réalisée sur les feuilles de *Rhamnus alaternus*, que nous avons récolté au niveau du village Taghzouit de la région de Bejaia durant le mois mars 2012. Une fois récoltée, les feuilles fraîches de *Rhamnus alaternus* ont été séchées à l'air libre pendant 20 jours, puis transférées à l'étuve à 35 °C pendant 02 jours pour affiner le séchage et pour obtenir un meilleur broyage et une meilleure extraction. Après séchage, les feuilles sont broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre. Les particules ainsi obtenues après broyage sont tamisées sur un tamis de diamètre de 250µm pour avoir une poudre homogène. La poudre obtenue est conservée dans un récipient en verre et stocké à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à extraction.



Figure 9: Les feuilles (fraîches et sèches) et poudre de *Rhamnus alaternus*.

II-2-Extraction

La méthode d'extraction utilisée est celle de macération selon le protocole préconisé par (Owen et Johns, 1999) avec de légère modification. 50g de la poudre des feuilles de *Rhamnus alaternus* sont macérés dans 300 ml d'éthanol (99%). Le mélange est maintenu sous agitation pendant 07 heures à une température ambiante. Après macération, la solution obtenue a été filtrée sur papier de Wattman N°03, et le filtrat est récupéré (filtrat 1). Ensuite, 200 ml de l'éthanol (99%) ont été ajoutée pour le précipité, et le mélange a été laissé sous agitation pendant une nuit (afin d'avoir une extraction exhaustive) et ensuite filtré dans les même conditions, le filtrat (filtrat 2) est récupéré. Les deux filtrats ont été mélangé et laisser pour évaporation dans une étuve à 40 °C jusqu'à ce que le poids de l'extrait reste constant et le taux d'extraction est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = P_1/P_0 \times 100$$

P₀ : poids de la poudre avant extraction.

P₁ : poids de l'extrait sec après extraction

II-3-Caractérisation partielle par chromatographie sur couche mince (CCM)

Principe : La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique de séparation qui repose principalement sur des phénomènes d'adsorption et d'interaction : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants adapté au type de séparation recherché, qui progresse le long d'une phase stationnaire qui peut être un gel de polyamide ou de silice fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Cette méthode repose sur la séparation des différents constituants d'un extrait selon leur migration dans la phase mobile, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse (**ferrari ,2002 ; Ekoumou ,2003**).

Protocole expérimental : le protocole expérimental utilisé pour la CCM est comme suit :

Phase stationnaire : HPTLC gel de silice pré coulé 60F 254, Merck .K GaA, Lot : 013 333 609.

Phase mobile : n-butanol/acide acétique/eau (4/1/5 ; v/v).

Extrait : phase organique.

Le niveau de liquide est ajusté à environ 0,5 cm du fond de la cuve. Pendant le développement du chromatogramme, la cuve est demeurée fermée. Lorsque la position du front du solvant arrive à environ 1 cm de l'extrémité supérieure, la plaque est retirée de la cuve, le niveau atteint par le solvant est marqué par un trait fin, puis la plaque est laissée séchée à l'air libre. La visualisation des plaques est effectuée sous la lampe à UV, en utilisant deux longueurs d'ondes : 365 nm et 253,7 nm.

II-4-Dosage des polyphénols

Principe de la méthode : Les composés phénoliques réagissent avec le Folin-Ciocalteu (mélange jaune) mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique est réduit, lors de l'oxydation des polyphénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue est proportionnelle au taux de composés phénoliques présents dans l'extrait (**Ribereau-Gayon et al., 1982**).

Mode opératoire : Le taux des phénols totaux est déterminé par la méthode utilisant le Folin-Ciocalteu décrite par (**Owen et Johns ,1999**) avec quelques modifications. A température ambiante, 100µl de l'échantillon solubilisé dans de l'éthanol à 99% est mélangé avec 0,5ml du réactif de Folin-Ciocalteu (0,1N). Après 5 min d'incubation à température ambiante, 0,4ml d'une solution de monohydrate carbonate de sodium (7,5% p/v) sont ajoutées et le tout est bien mélangé. La préparation a été laissée incuber pendant 1 heure et à l'abri de la lumière, puis l'absorbance à 740 nm a été mesurée contre un témoin préparé suivant la même méthode, sauf que l'extrait éthanolique est remplacé par l'eau distillée.

Une courbe standard est réalisée avec différentes concentrations de l'acide gallique dans les mêmes conditions que le dosage de l'échantillon. La quantité des polyphénols totaux est exprimée en équivalents milligramme d'acide gallique (mg EAG/g d'extrait) (annexe).

II-5-Dosage des flavonoïdes

Principe de la méthode : Le dosage des flavonoïdes a été effectué selon la méthode de **Quettier-Deleu et al. (2000)** modifiée. Les composés phénoliques forment un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. L'aluminium perd deux électrons et s'unit à deux atomes d'oxygène du composé phénolique qui est dans ce cas donneur d'électrons (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

Mode opératoire : A température ambiante, 1ml de l'extrait solubilisé dans de l'éthanol est mélangé avec 1ml d'une solution de chlorure d'aluminium (2%). Une coloration jaune est observée immédiatement après ajout du chlorure d'aluminium. Après 15 minutes, l'absorbance est mesurée à 410nm contre un témoin préparé suivant la même méthode, sauf que la solution de l'échantillon à doser est remplacée par de l'éthanol

Une courbe standard est réalisée avec différentes concentrations de la quercétine dans les mêmes conditions que le dosage de l'échantillon. La quantité des flavonoïdes est exprimée en équivalents milligramme de quercétine (mg EAG/g d'extrait) (annexe).

II-5- Evaluation de l'activité anti-radicalaire et antioxydant

II-5-1-Evaluation de l'activité anti-radicalaire contre le radical DPPH

Principe : Le DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl), radical libre de couleur violette comme réactif, qui vire au jaune, en présence de capteurs de radicaux libres, et se réduit en diphényl picryl hydrazine (**Athamena et al., 2010**). Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm.

Mode opératoire : L'évaluation de l'activité anti-radicalaire contre le radical DPPH a été évaluée selon la méthode d'**Athamena et al. (2010)**. La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100ml de méthanol. 25µl de l'extraits (à des concentrations variables 50, 100, 150, 200 et 250 µg/ml) ou standard (acide gallique ou quercétine à des concentrations de 5, 10 15, 20 et 25µg/ml) sont ajoutés à 975µl de DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30min, et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517nm. L'activité anti-radicalaire est estimée selon l'équation suivante (. Avec quelque modification. 1mg /ml d'extrait de *Rhamnus alaternus* dilué à différentes concentration

Le pourcentage de l'activité scavenger du radical DPPH est calculé selon la formule suivante

$$\% \text{ d'activité scavenger du DPPH} = (A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{contrôle}} \times 100$$

$A_{\text{contrôle}}$: absorbance de témoin (25µl de méthanol + 975µl DPPH).

$A_{\text{échantillon}}$: absorbance de l'échantillon (25µl d'extrait + 975µl DPPH).

II-5-2-Détermination de l'activité scavenger du radical ABTS

Principe : L'ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acide) est un radical libre et stable capable de réagir avec des antioxydants (donneur d'hydrogène ou d'électron), il présente une coloration bleu vert sombre, lorsque' il est piégé par des substances antioxydantes, sa coloration devienne jaune pale. L'activité scavenger du radical ABTS a été mesurée en utilisant le protocole de **Mighri et ses collaborateurs (2010)**, avec de légère modification.

Mode opératoire : Le radical ABTS a été préparé par la réaction de la solution d'ABTS (7mM) avec du persulfate de potassium ($K_2O_8S_2$) (2,45mM), cette solution est laissée à

l'obscurité pendant 16h, et à température ambiante (formation du radical ABTS⁺). La solution d'ABTS⁺ est diluée ensuite avec de l'eau distillé afin d'obtenir une absorbance de $0,7 \pm 0,02$ à 734nm.

2ml de cette solution d'ABTS diluée sont ajoutés à un volume de 20 μ l de l'extrait (à une concentration de 1mg/ml) de *Rhamnus alaternus*, après 07 minutes d'incubation à l'obscurité, l'absorbances a été mesurée à 734nm.

Le pourcentage de l'activité scavenger du radical ABTS⁺ de l'extrait éthanolique de *Rhamnus alaternus* est calculé comme suite :

$$\text{PI (radical ABTS+)} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$$

PI: pourcentage d'inhibition de radical ABTS⁺

A₀ : Absorbance du contrôle (contenant seulement l'ABTS⁺)

A₁ : Absorbance de la solution de l'ABTS⁺ contenant l'extrait de *Rhamnus alaternus*.

Pour l'extrait, il a été testé à une concentration de 1mg/ml. Par contre, pour le trolox utilisé comme standard, les concentrations testées sont 0.5, 1, 1.5, 2 et 2.5mM (annexe).

II-5-3-Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est un mécanisme important pour examiner l'activité antioxydante des composés phénolique. Cette méthode est basée sur la réduction du fer ferrique Fe³⁺ présent dans le complexe de ferricyanure [FeCl₃/K₃Fe(CN)₆] à la forme ferreuse (Fe²⁺) (Wojdyło et al., 2007).

20-800 μ g/ml de l'extrait éthanolique de *Rhamnus alaternus* ont été solubilisé dans 200 μ l de tampon phosphate (0,2M, pH=6,5)/DMSO (10%). 200 μ l de ferricyanure de potassium (500mg/50ml) ont été ajouté à ce mélange. Après agitation, il est incubé à 50°C pendant 20 minutes. 250 μ l d'une solution d'acide trichloracétique (5mg/50ml) ont été ajouté et le a été laissé sédimenté pendant 10 minutes. Ensuite, 500 μ l d'eau distillé et 20 μ l de chlorure ferrique (FeCl₃) (50mg/50ml) sont ajoutés au mélange, le tout est laissé incubé à 37 °C pendant 10min et l'absorbance a été mesurée à 700nm.

II-6-Evaluation de l'activité anti-enzymatique

II-6-1- Activité anti α -glucosidase

Préparation des solutions : La préparation de l' α -glucosidase et son substrat le *p*-NPG (nomination complète) a été réalisée selon la méthode de **Kim et ses collaborateurs (2005)** avec quelques modifications. La solution d' α -glucosidase a été préparée en la solubilisant dans un tampon phosphate (0,01M, pH=6,9) à une concentration de 130 μ g/ml. Le substrat de l'enzyme, le *p*NPG a été solubilisé dans le même tampon à une concentration de 1,9 mg/ml. L'extrait a été solubilisé dans le DMSO/tampon phosphate (10%). Une série de concentrations a été préparée dans le même mélange (3mg/ml, 1,5mg/ml, 1mg/ml, 0,75mg/ml)

Procédé expérimental : Dans des tubes à essai, des concentrations différentes de l'extrait (3mg/ml, 1,5mg/ml, 1mg/ml, 0,75mg/ml) ont été préparés. Un volume de 250 μ l de chaque tube a été prélevé et ajouté à 01 ml d'enzyme dans un autre tube à essai, Le mélange d'enzyme et d'extrait ont été ensuite homogénéisés et incubés à 37°C pendant 10 minutes. Après l'incubation, un volume de 250 μ l de substrat a été ajouté au mélange précédent, et immédiatement, une lecture de l'absorbance à 405nm est effectuée par spectrophotomètre.

Le témoin utilisé, dans ce test, est la solution de l'enzyme sans extrait. La lecture effectuée par spectrophotomètre consiste à suivre la cinétique de la réaction enzymatique pendant 5minutes. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la loi suivante :

$$\frac{(\text{DO contrôle} - \text{DO échantillon})}{\text{DO contrôle}} \times 100$$

DO contrôle : Activité enzymatique en absence de l'extrait

DO échantillon : Activité enzymatique en présence de l'extrait

II-6-2-Activité anti peroxydase

Extraction de l'enzyme : L'extraction de la peroxydase a été réalisée selon la méthode de **Ponce et ses collaborateurs (2004)** avec quelques modifications. Après nettoyage, les têtes de choux ont été coupées, 10g de ce chou sont homogénéisés avec un mélangeur électrique à une vitesse élevée pendant 03min et au cours de l'homogénéisation, 30ml de l'eau sont ajoutés au même temps, toutes les étapes ont été effectuées à 4°C. La suspension a été

filtrée sur papier de wattman et centrifugé à 10000g pendant 15min et le surnageant contenant la peroxydase a été utilisée comme source d'enzyme.

Préparation des solutions : La solution de la peroxydase a été préparée en la solubilisant dans un tampon phosphate (0,05M, pH=6,5). La solution de substrat contient 10ml de guaiacola à (1%) ,10ml de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 0,3% et 100ml tampon phosphate (0,05 M, pH = 6,5)

Procédé expérimental : Dans des tubes à essai, des concentrations différentes de l'extrait (6mg/ml, 3mg/ml, 1,5mg/ml, 0,75mg/ml) ont été préparés. Un volume de 100µl de chaque tube a été prélevé et ajouté à 20µl d'enzyme dans un autre tube à essai. Le mélange à été ensuite homogénéisé et incubé à 37°C pendant 10 minutes. Après incubation, un volume de 1.4 ml de substrat a été ajouté au mélange précédent, et une lecture de l'absorbance à 470nm par spectrophotomètre a été effectuée immédiatement après l'addition du substrat. Le témoin réalise dans ce test, est la solution de l'enzyme sans extrait. La lecture effectuée par spectrophotomètre consiste à suivre la cinétique de la réaction enzymatique pendant 5 minutes. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la loi suivante :

$$\frac{(\text{DO contrôle} - \text{DO échantillon})}{\text{DO contrôle}} \times 100$$

DO contrôle : Activité enzymatique en absence de l'extrait

DO échantillon : Activité enzymatique en présence de l'extrait

Résultats et discussion

II-2-Résultats et discussion

II-2-1-Taux d'extraction

Une macération a été réalisée sur la poudre des feuilles de *Rhamnus alaternus* avec l'éthanol, après extraction de 50g de l'échantillon et évaporation du solvant du filtrat, on a obtenu un extrait sec ayant un poids de 6,56 g qui correspond à un rendement de 13,12%. Si on compare le rendement de notre plante à celle d'*Ajuga iva* (rendement = 6.46% ; la macération a été réalisée sur la partie aérienne dans les mêmes conditions et avec le même solvant), on remarque que les feuilles de *Rhamnus alaternus* sont plus riches en composés phénoliques polaires. Et aussi largement supérieure à celui obtenu par **Ljubuncic et ses collaborateurs (2005)** en utilisant comme solvant l'eau distillée qui est de l'ordre de 8%.

Cette différence est due peut être à la nature du solvant car, le taux d'extraction des composés phénoliques à partir d'une matière végétale peut être influencé par leur nature chimique, la nature du solvant, la méthode d'extraction utilisée, le diamètre des particules de l'échantillon et du temps de macération (**Nacz et Shahidi, 2004**).

II-2-2-Caractérisation partielle par CCM de l'extrait éthanolique de *R. alaternus*

L'utilisation du système n-butanol/acide acétique/eau (4/1/5 ; v/v) pour séparer l'extrait éthanolique de *R. alaternus* sur chromatographie sur couche mince nous a permis d'avoir une séparation des différents constituants de l'extrait. Ce système a permis de séparer l'extrait en cinq spots selon leur migration dans la phase mobile.

Les rapports frontaux des différentes fractions ont été calculés selon la formule suivante :

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

Les spots ont été visualisés sous deux longueurs d'onde différentes, 253,7 nm puis 365nm, le tableau IX illustre les différentes taches obtenues dans le chromatogramme avec leurs rapports frontaux (Rf)



Figure 10 : les composés phénoliques de *R. alaternus* après migration sur la CCM

Tableau IX : Les rapports frontaux des différentes fractions obtenues par CCM.

Les différentes taches	Rf
Tache 1	0,5
Tache 2	0,67
Tache 3	0,86
Tache 4	0,90
Tache 5	0,93

II-2-3-Dosage des polyphénols totaux

Les composés phénoliques constituent une classe principale des antioxydants présents dans les plantes et sont généralement quantifiés par une méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu (Kanatt et al., 2007).

Après l'addition de la solution de monohydrate carbonate de sodium et le réactif de Folin Ciocalteu à l'extrait des feuilles de *Rhamnus alaternus*, une couleur bleu est obtenu, cette coloration varie en fonction de la concentration de l'extrait de la plante. Donc les feuilles de *R. alaternus* sont riches en composés phénoliques. La teneur en composés phénoliques de l'extrait est exprimée mg EAG/g E (Annexe) La teneur en composés phénoliques totaux montre que l'extrait éthanolique de *R. alaternus* contient environ **34,13±1,30 mg EAG/g**

d'extrait sec, cette teneur correspond à 448 mg/100g d'extrait qui légèrement inférieure à celles obtenues Par **Stocker et ses collaborateurs (2004)** en utilisant le méthanol qui est de l'ordre 600mg/100g d'extrait, cette différence est due peut être à la nature du solvant utilisé, et la méthode d'extraction.

II-2-4-Dosage des flavonoïdes

Lors du dosage des flavonoïdes, après l'addition d' AlCl_3 et après incubation une couleur jaunâtre est obtenue dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de l'extrait de la plante, ce qui confirment la présence des flavonoïdes dans l'extrait des feuilles de *R. alaternus*. La teneur en flavonoïdes de l'extrait est obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (**Annexe**).

La teneur en flavonoïdes montre que l'extrait éthanolique des feuilles de *R. alaternus* contient environ **118,72±4 mg EQ/g E** (mg d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait sec). Donc, les feuilles de *R. alaternus* sont très riches en flavonoïdes polaires, ce taux est même inférieur à celui rapporté par **Ben Ammar et ses collaborateurs (2007)** qui ont démontré que l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus* de Tunisie contient environ **283±11mg EQ /g E**. Cette différence pourrait s'expliquer par la nature du solvant, la région dans laquelle la plante est cultivée, ainsi que la période de la récolte.

II-2-5- Evaluation de l'activité anti-radicalaire et antioxydante

II-2-5-1- Evaluation de l'activité anti-radicalaire contre le radical DPPH

L'extrait éthanolique de la plante *R. alaternus* a montré une activité anti radicalaire contre le radical DPPH dépendante de la concentration de l'extrait, par diminution de couleur violette de la solution DPPH. Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH augmente en fonction de la concentration de l'extrait (Figure 11).

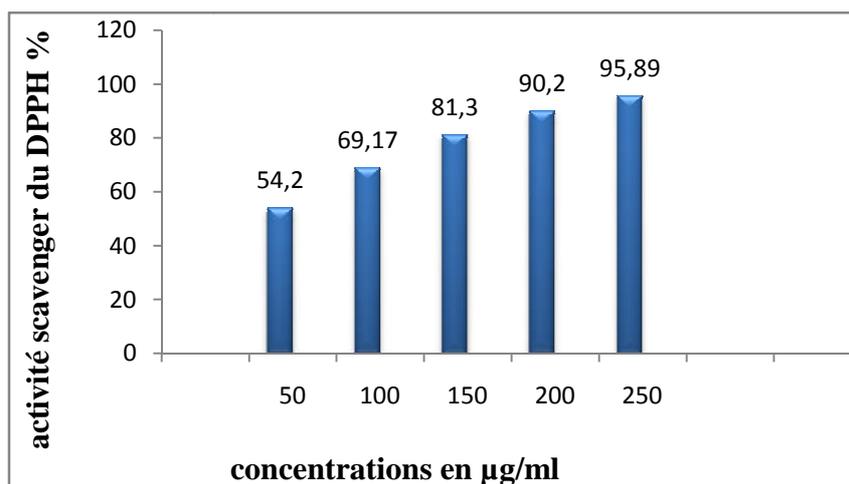


Figure11 : Effet scavenger contre le radical DPPH de l'extrait éthanolique de *R. alaternus* à différentes concentrations.

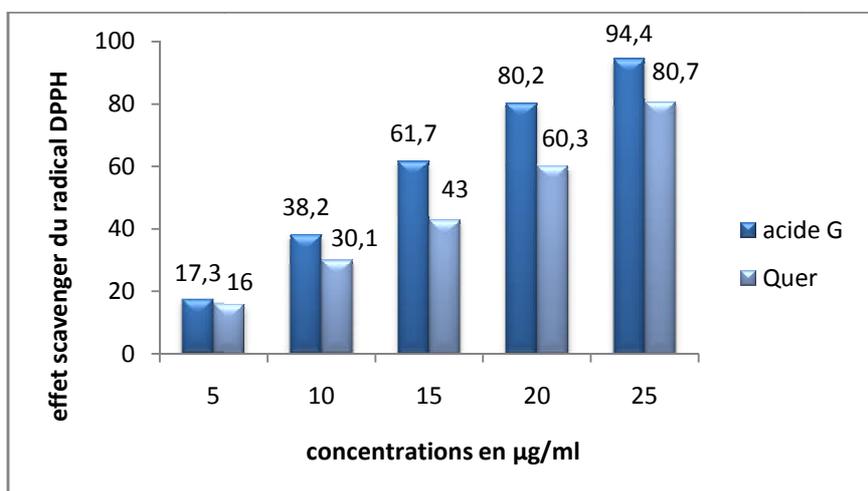


Figure12 : Effet scavenger contre le radical DPPH des standards (acide gallique et quercétine) à différentes concentrations.

L'activité anti-radicalaire de l'extrait est mesurée par sa capacité de piéger un électron non apparié du radical DPPH, qui est exprimé par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution. A partir des deux figures précédentes, on peut calculer l'IC₅₀ qui est définie comme étant la concentration en extrait ou du standard ayant un pourcentage d'inhibition du DPPH de 50% (Pourmorad et al., 2006). Après l'addition de la solution de DPPH, le changement de couleur est apparu avec différente intensité dans les solutions éthanolique de l'extrait à des concentrations variées.

La comparaison de l'activité scavenger du radical DPPH de l'extrait et des standards (acide gallique et quercétine) montre une activité anti-radicalaire dépendante de la concentration. A chaque fois que la concentration augmente, le pourcentage d'inhibition augmente. Par exemple, à la concentration de 50µg/ml, on a un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 54,2% et à 250µg/ml, le pourcentage atteint 95,89%. On remarque que même à des faibles concentrations, l'extrait montre un pourcentage d'inhibition important, ce qui nous permis de déduire que les composés phénoliques contenu dans l'extrait éthanolique des feuilles de *R. alaternus* sont très efficace comme antioxydants. La valeur de l'IC₅₀ calculé pour l'extrait de *R. alaternus* est de l'ordre de 48,5 µg/ml. Cette valeur obtenue est élevée par rapport à celles rapportées dans les études réalisées sur l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus* qui est de l'ordre de 25,38µg/ml (**Ben Ammar et al., 2005**). Cette différence pourrait s'expliquer par la nature des composés phénoliques contenus dans l'extrait qui est influencé par la période de récolte (mai - juin), sachant que notre échantillon a été récolté au mois de mars. Comme elle pourrait s'expliquer aussi par la différence des conditions climatique et celles du sol ou la plante est cultivée.

Les IC₅₀ de l'acide gallique et de la quercétine sont respectivement de l'ordre 12,85µg/ml et 13,19µg/ml. Ils sont largement inférieurs à celui de l'extrait éthanolique (48.5µg/ml), donc l'acide gallique et la quercétine présentent une grande activité anti-radicalaire. De même, l'extrait présent une bonne activité anti-radicalaire contre le DPPH mais à des concentrations beaucoup plus élevés.

II-2-5-2- Evaluation de l'activité anti-radicalaire contre le radical ABTS

L'activité antioxydant de l'extrait de *R. alaternus* a été déterminée aussi par la méthode TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant capacity), cette activité est déduite par la capacité des molécules à inhiber le radical ABTS⁺. L'effet scavenger du radical a été calculé à partir de la courbe d'étalonnage. L'IC₅₀ du trolox est estimé à 1.42mM La valeur d'IC₅₀ du Trolox obtenue et de 1,42mM. D'après ce résultat, le Trolox a montré la plus faible IC₅₀, donc présente une grande activité anti-radicalaire contre le radical ABTS⁺. (**Annexe**).

La comparaison des absorbances, mesurées en fonction du temps du témoin (ABTS⁺ seul) et celles obtenues en présence des composés phénoliques de l'extrait éthanolique des feuilles de *Rhamnus alaternus* montre une diminution de l'absorbance de 0,7 à partir de la première minute pour atteindre 0,33 au bout de la 7^{ème} minutes, ce qui correspond à un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 52,85%. Cette diminution continue jusque à la 5min ou elle devient presque stable, ce qui signifie que toutes les molécules ABTS⁺ sont réduites en

ABTS. Ces résultats montrent que les feuilles de *Rhamnus alaternus* sont riches en composés phénolique capables de réduire le radical ABTS⁺, surtout riches en flavonoïdes tels que Rhamnocitrin-3-O-B-isorhamnoside et le kaempferol-3-O-B-isorhamnoside qui sont étudiées par **Bhour** et ses collaborateurs (2012) pour leurs effets anti-radicalaires contre le radical ABTS pour lesquels ils ont rapporté des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 72%, 97% respectivement à une concentration de 0.2mg/ml.

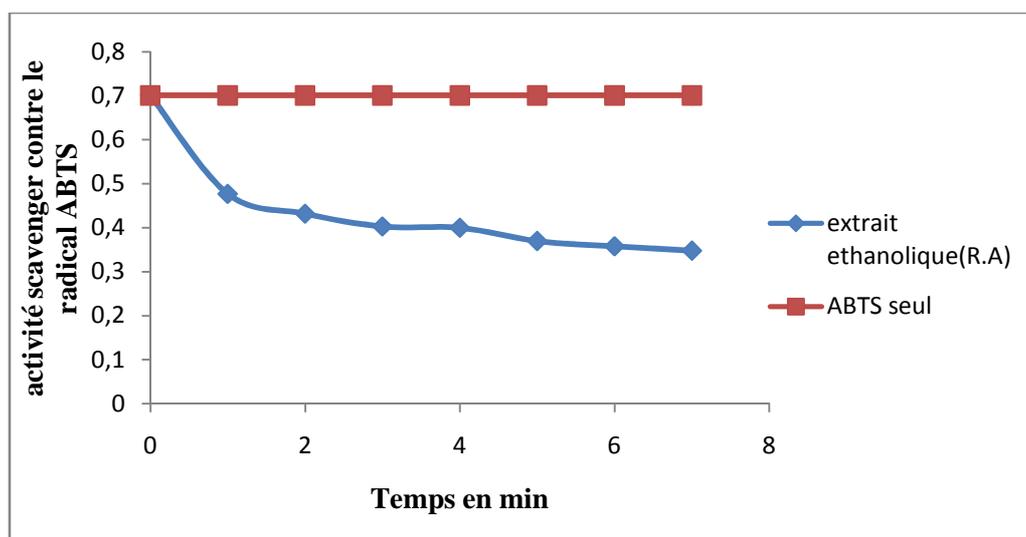


Figure 13 : Activité scavenger de l'extrait éthanolique contre le radical ABTS en fonction de temps

II-2-5-3-Pouvoir réducteur

Le potentiel antioxydant des extraits est estimé par la méthode de la réduction du ferricyanure de potassium. Le fer ferrique (Fe^{3+}) est réduit en fer ferreux (Fe^{2+}) par les antioxydants (polyphénols totaux) présent dans l'extrait (**Wojdyło et al., 2007**).

Après l'addition de chlorure ferrique, une couleur bleu est obtenue dont l'intensité varie en fonction de la concentration de l'extrait de plante, ce qui confirme les propriétés réductrices de l'extrait de la plante, et ceci par la réduction de Fe^{3+} /complexe de ferricyanure à la forme ferreuse (Fe^{2+}) et ce pouvoir étant en fonction de la concentration d'extrait.

La figure14 montre le pouvoir réducteur de l'extrait éthanolique de *Rhamnus alaternus* en fonction de différentes concentrations. On remarque que le pouvoir réducteur augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait. Cette augmentation est très considérable à partir d'une concentration de 0,02mg/ml jusqu'à une concentration de 0,08mg/ml, et à partir de cette dernière et jusqu'à une concentration de 0.17mg/ml, le pouvoir réducteur se stabilise et atteint presque son maximum qui est de l'ordre de 0,529. Cette stabilité du pouvoir réducteur confirme que tous les ions du fer ferrique Fe^{3+} sont réduits en ions de fer ferreux Fe^{2+} .

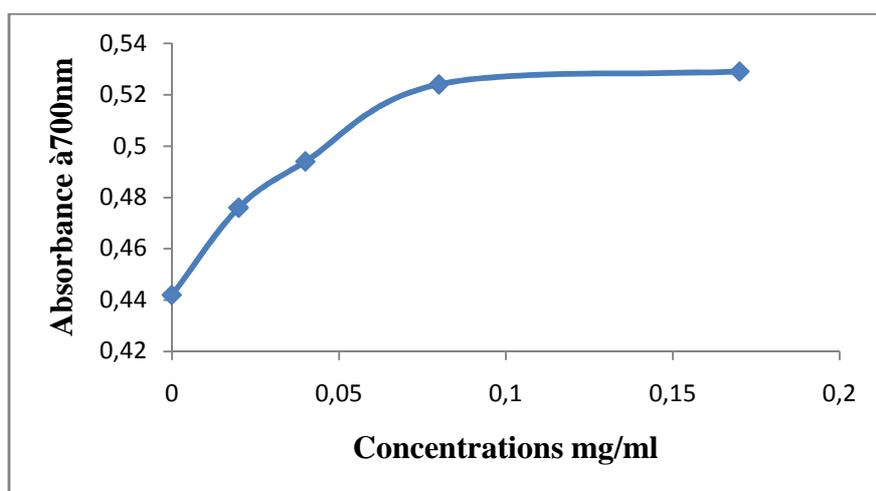


Figure 14 : Pouvoir réducteur en fonction de la concentration de l'extrait

II-2-6-Evaluation de l'activité anti-enzymatique

II-2-6-1- Activité anti α -glucosidase

Les α -glucosidases [α -D-glucoside glucohydrolase] sont des enzymes responsable de la digestion des glucides en monosaccharides dans le processus de l'absorption intestinale (Shim et al., 2003). La figure15 montre le taux d'inhibition de l'activité enzymatique de la peroxydase par les composés phénolique de l'extrait éthanolique de *Rhamnus alaternus*.

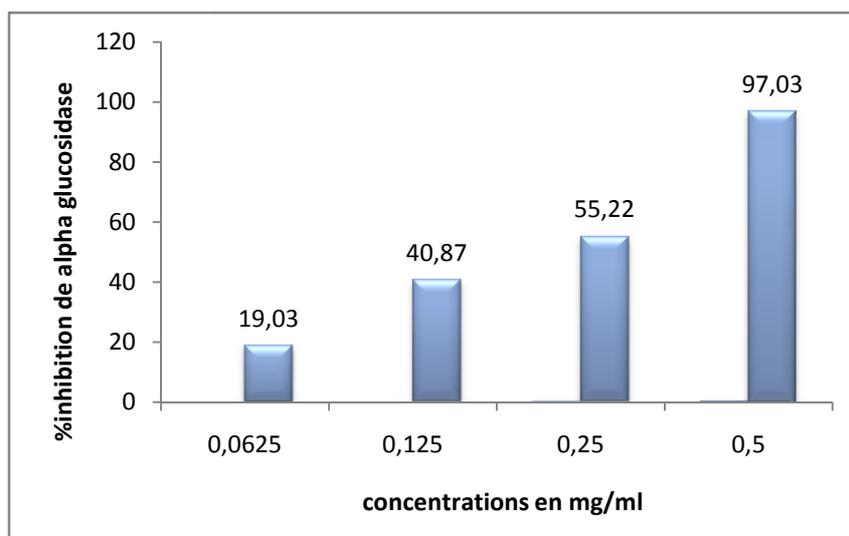


Figure15 : Inhibition de l'alpha glucosidase par l'extrait éthanolique de *R. alaternus*.

Selon la figure 15 qui représente le pourcentage d'inhibition de l' α -glucosidase, on remarque que le taux d'inhibition est proportionnel à la concentration de l'extrait. À la concentration de 0,0625mg/ml on a un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 19,03%. À 0.25mg/ml, le pourcentage d'inhibition augmente pour atteindre 55.22%. Et à une concentration de 0.5mg/ml, l'inhibition a atteint un taux très important qui est de l'ordre de 97.03%. Cette propriété inhibitrice pourrait être attribuée aux flavonoïdes qui exercent une inhibition non compétitive (Stocker et al., 2004).

Plusieurs études 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). L'acide éllagique et la quercétine ont un fort pouvoir inhibiteur de l'activité enzymatique de l'alpha glucosidase (You et al., 2012).

D'après ces résultats, on peut déduire que les feuilles de *Rhamnus alaternus* sont un bon moyen pour réduire la glycémie postprandiale, et ainsi être utilisée dans la médecine traditionnelle pour les personnes diabétiques.

II-2-6-2-Activité anti peroxydase

Les peroxydases sont des enzymes catalysant l'oxydation de plusieurs substrats en présence du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Baaziz et al., 2006). La figure 17 représente le pourcentage d'inhibition de l'activité de la peroxydase par les composés phénolique de l'extrait éthanolique de *Rhamnus alaternus*.

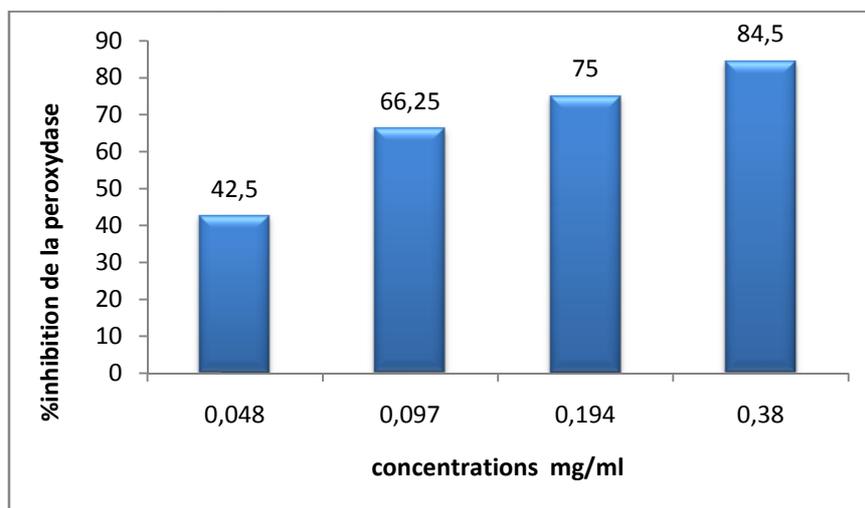


Figure16 : Inhibition de la peroxydase par les composés phénolique d'*R alaternus*.

La figure 16 montres que le pourcentage d'inhibition de la peroxydase augmente par l'augmentation de concentration de l'extrait de la plante à 0,048 mg/ml présente une inhibition de 42,5%, Ce taux augmente pour atteindre 66,25% à une concentration de 0.097mg/ml, et un maximum d'inhibition 84,5% apparait avec une concentration de 0,38mg/ml.

La concentration inhibitrice de 50% de l'activité enzymatique (IC_{50}) a été estimée à 0,05mg/ml, qui correspondent à une faible concentration. Cette valeur montre que l'extrait éthanolique de *R. alaternus* est riche en antioxydants. **Perez et ses collaborateurs (2002)** ont démontré que les composés phénoliques de *R. alaternus* comme les flavonoïdes possèdent des effets inhibiteurs important sur la peroxydase.

Conclusion

Conclusion

Rhamnus alaternus est une plante très répandue dans le nord de l'Algérie et vu son utilisation locale comme plante médicinale, elle présente un grand intérêt pharmacologique et pour le futur.

La présente étude s'est intéressée sur l'extrait éthanolique des feuilles de *Rhamnus alaternus*, pour évaluer le taux des polyphénols totaux, des flavonoïdes, de l'activité antioxydante (anti DPPH, anti ABTS et le pouvoir réducteur) ainsi que l'évaluation de l'activité anti-enzymatique (anti-alpha glucosidase et anti-peroxydase).

Le protocole d'extraction appliqué est de type liquide solide, en utilisant un solvant organique, l'éthanol (99%). Le taux d'extraction obtenu est de 12,13%.

La détermination quantitative des composés phénoliques a révélé les résultats suivants : le taux des composés phénoliques totaux est estimé à **34,13±1,30 mg EAG/g E** et celui des flavonoïdes à **118,72±4mgEQ/g** d'extrait sec. La séparation de cet extrait sur CCM en utilisant un système : n-butanol/acide acétique/eau a donné 05 taches.

Concernant l'activité antioxydante, nous avons constaté par mesure du pouvoir réducteur, que l'extrait de la plante étudiée a la capacité de réduire le fer, cette capacité réductrice est proportionnelle à la concentration. À la concentration de 0,17mg/ml le pouvoir réducteur est de l'ordre 0,529.

L'extrait présente une activité anti-radicalaire très importante contre le radical DPPH, le pourcentage d'inhibition de l'extrait est de 95,89% à une concentration de 250µg/ml. Pour l'ABTS, le pourcentage d'inhibition est estimé à 52,85% à une concentration de 1mg/ml.

L'évaluation de l'activité anti-enzymatique de l'extrait éthanolique a montré un puissant effet anti-alpha glucosidase qui est de l'ordre de 79,03% à une concentration de 0,5mg/ml, les feuilles de *Rhamnus alaternus* sont un bon moyen pour réduire la glycémie postprandiale, et ainsi être utilisée dans la médecine traditionnelle pour les personnes diabétiques. Pour la peroxydase, l'extrait éthanolique a donné un taux d'inhibition de l'ordre de 84,5% à une concentration de 0,38mg/ml.

Au terme de ce travail, il serait intéressant de compléter cette étude en réalisant des fractionnements de l'extrait pour pouvoir isoler la fraction active ainsi que ses composés. Comme il serait aussi intéressant de réaliser des tests *in vivo*, ainsi que d'étudier la toxicité.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **Affek H. P. et Yakir D. (2002):** Protection by Isoprene against Singlet Oxygen in Leaves. *Plant Physiology*. Vol. 129 : 269-277.
- **Ait youssef M. (2006):** les plantes médicinales de kabylie ; *Edition Ibis press* PP:278-279.
- **Alarcon-gutiérrez E. (2007):** Influence de facteurs abiotiques sur la régulation des paramètres microbiens impliqués dans la dégradation de la matière organique d'une litière forestière méditerranéenne. Thèse de docteur, Université de Paul cezanne, P : 227.
- **Alice P.Y., Cheng M.D., Frcpc., Robrt G., Josse M.F. (2004):** Les inhibiteurs de l'absorption intestinale dans la prévention et le traitement du diabète de type 2, *endocrinologie*, Volume 4, numéro7.
- **Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., Mcdonald S et Robards K. (2002):** Methods for testing antioxidant activity, *the Analyst*, Vol. 127, p: 183-198.
- **Aronne G et Wilcock C-C. (1995) :** Reproductive lability in pre-dispersal biology of *Rhamnus alaternus L.* (Rhamnaceae) *Protoplasma* ,187:49-59
- **Athamena S., Chalghem I., Laouar A.K., Laroui S et Khebri S. (2010):** Activite Anti-Oxydante etAntimicrobienne d'extraits de *cuminum cyminum L.* *Lebanese Science Journal*, Vol. 11, No. 1.
- **Bas J- M., Gómez C.et Pons P5. (2005):** Fruit production and predispersal seed fall and predation in *Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae). *Acta Oecologic.*,27 :115–123.(a)
- **Bas J-M., Oliveras J.et Gomez C. (2009):** Myrmecochory and short-term seed fate in *Rhamnus alaternus*: Ant species and seed characteristics. *Acta Oecologica*.xxx:1-5.
- **Baaziz. M, Qacif. N, Bendiab, K. et Aouad A. (2006) :** les peroxydase des plantes aspect théorique et applications pratiques, congrès international de biochimie, Agadir, P 5.
- **Balasundram N., Sundram K. et Samman S. (2006):** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by -products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, **99** (1):191-203.
- **Ben Ammar R., Kilani S., Abdelwahed A., Hayder N., Mahmoud A., Chibani J., Chekir- Ghedira L. et Ghedira k. (2005):**In vitro Mutagenicity, Antimutagenicity and

free Radical scavenging Activities of *Rhamnus alaternus* L.(Rhamnaceae) Extracts. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8(3):439-445.

- **Ben Ammar R., Bouhlel I., Valenti K., Ben Sghaier M., Kilani S., Mariotte A-M, Dijoux- Franca M-G., Laporte F., Ghedira K. et Chekir-Ghedira L. (2007)** :Transcriptional response of genes involved in cell defense system in human cells stressed by H₂O₂ and pre- treated with (Tunisian) *Rhamnus alaternus* extracts: Combination with polyphenolic compounds and classic in vitro assays .*Chemico-Biological Interactio*.,168:171-183.
- **Ben Ammar R., Ben Sghaier M., Boubaker J., bhouri W., Naffeti A., Skandrani I., Bouhlel I., Kilani S., Ghedira K. et Chekir-Ghedira L. (2008)**:Antioxidant activity and inhibition of aflatoxin B1-, nifuroxazide-, and sodium azide-induced mutagenicity by extracts from *Rhamnus alaternus* L. *Chemico-Biological Interactions*,174:1-10
- **Ben Ammar R., Bhouri W., Ben Sghaier M., Boubaker J., Skandrani I., Neffati A., Bouhlel I., kilani S., Mariotte A.M., Chekir-Ghedira L., Dijoux- Franca M.G.et 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*.In press.
- **Berger M.M. et Chiolero R.L. (2001)** : Apport d'antioxydants en réanimation : pourquoi, lesquels, avec quels objectifs. *Réanimation*, Vol. 10, p. 527-534.
- **Berger M.M. (2006)** : Manipulations nutritionnelles du Stress Oxydant: état des connaissances, Nutritional manipulation of Oxidative Stress : review of the evidence. *Nutrition clinique et métabolisme*, Vol. 20, p. 48-53.
- **Bharatham K., Bharatham N., Park K-H., Lee K-W. (2008)**: Binding mode analyses and pharmacophore model development for sulfonamide chalcone derivatives, a new class of α -glucosidase inhibitors. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 26: 1202–1212.
- **Bhouri W., Boubaker J., Kilani S., Ghedira K., Chekir-GhediraL. (2012)**: Flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): Kaempferol 3-O- β -isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O- β -isorhamninoside protect against DNA damage in human lymphoblastoid cell and enhance antioxidant activity, *South African Journal of Botany*, 80 :57–62 .
- **Boizot N et Charpentier J.P. (2006)** : Méthodes rapides d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. INRA.**79-82**.

- **Boukerouis D. (2008)** : Caractérisation de l'activité antioxydante de *Pistacia lentiscus* et *fraxinus angustifolia*. Thèse magister, Université de Béjaïa.
- **Bruneton J. (1999)** : pharmacognosie .phytochimie. Plantes médicinales.3^eédition. TEC et DOC : Lavoisier, paris .ISBN 2-7430-0315-4 :227-387.
- **Bruneton J. (1999)** : plantes toxiques. végétaux dangereux pour l'Homme et les animaux.3^e édition .TEC et DOC, paris : p 240-242.
- **Chiba S. (1988)**: α -Glucosidases. In: *Handbook of Amylases and related enzymes* (The Amylase Research Society of Japan, éd.). Pergamon Press, Oxford, U.K. pp: 104-116.
- **Chiba S. (1997)**: Molecular mechanism in alpha- glucosidase and glucoamylase. *Biosci Biotechnol Biochem.* **61**: 1233-1239.
- **Diogon T. (2002)** : Isolement et caractérisation de messagers codant pour des peroxydases chez *Spinacia oleracea*. Thèse de Docteur des sciences, Université de Genève, P82.
- **Dobias J. (2004)** : Fonction et Localisation d'Atprx42, une peroxydase de classe III. Mémoire de Biologie, Université de Genève, P62.
- **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.
- **Ernst H.A., Leggio L.L., Willemoes M., Leonard G., Larsen S (2006)** : Structure of the *Sulfolobus solfataricus* α -glucosidase: implications for domain conservation and substrate recognition in GH31. *J Mol Biol.* **35**.
- **Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M.et Abdely C.(2008)**:phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities .*Comptes Rendus Biologies*, **331**:372-379.
- **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 Lausanne.
- **Guignard, P.J. (2000)** : composés phénoliques, biochimie végétale 2^e édition. DUNOD. p :199-201.
- **Gulias J., Traveset A., Riera N. et Mus M. (2004)**: Critical Stages in the Recruitment Process of *Rhamnus alaternus* L. *Annals of Botany* **93**: 723-731.
- **Haslam E. (2007)**: Review Vegetable tannins – Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry*, **68**: 2713–2721.

- **Hemmami I., Allagui M-B., Chakroun M., et El Gazzah M. (2006):** *Rhamnus lycioides* in Tunisia is a new aecial host of oat crown rust. *European Journal of Plant Pathology*, 115: 357–361.
- **Hennebelle T. (2006):** Investigation chimique et chimiotaaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants. *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota Pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbénacées). Thèse de Doctorat en Chimie Organique et Macromoléculaire. Université des Sciences et Technologique de Lille.
- **Heo S.J., Hwang J.Y., Choi J.I., Han J.S., Kim H.J., Jeon Y.J. (2009):** Diphlroethohydroxycarmalol isolated from *Ishige okamurae*, a brown algae, a potent α -glucosidase and α -amylase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice, *European Journal of Pharmacology*, **615** : 252–256
- **Hopkins W.G. (1995).** Physiologie végétale .2édition.DeBoeck, Bruxelles : 278-280
- **Izhaki I., Tsahar E., Irena P. et Jacob F. (2002):** Within population variation and interrelationships between morphology, nutritional content, and secondary compounds of *Rhamnus alaternus* fruits .*New Phytologist*, **156**: 217-223.
- **Kamel A.J.K., Behere V.D. (2008):** Kinetic stabilities of soybean and horseradish peroxidises. *Journal of Biochemical Engineering*, **38**: 110–114.
- **Kanatt S.R., Chander R. et Sharma A.(2007):** Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L) in radiation-processed lamb meat .*food chemistry*.**100**:451-458
- **Khales A., et Baaziz M. (2004):** peroxydase d'opuntia ficus indica L. *Activités cataliques et propriétés biochimiques*, P142
- **Kimura A., Lee J-H., Lee I-S., Lee H-S., Park K-H., Chiba S., Kim D.(2004):** Two potent competitive inhibitrts discriminating α -glucosidase family I from famil II. *Carbohydr Res*. **339**: 1035-1040.
- **Kim Y.M., Jeong M.H., Wang W .Y., Lee H.I. (2005):** Inhibitory effect of pine extract on alpha-glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition* **21**:756-761.
- **Larrondo L.F., Gonzalez A., Perez-Acle T., Cullen D., Vicunà R. (2005):** The nop gene from *Phanerochaete chrysosporium* encodes a peroxidase with novel structural features; *Biophysical Chemistry*, **116**: 167 – 173.
- **Ljubuncic P., Azaizeh H., Portnaya I., Coganc U., Said O., Saleh K.A., Bomzon A.(2005):** Antioxidant activity and cytotoxicity of eight plants used in traditional Arab medicine in Israel, *Journal of Ethnopharmacology* **99** :43–47

- **Ludwikow A., Gallois P and Sadowski J. (2004):** Ozone-induced oxidative stress response in *Arabidopsis*:transcription profiling by microarray approach, *Cellular & Molecular Biology letters*, **9**: 829-842.
- **Lyse R. C., Schutz, S. Favre, AC. O’Sullivan, C. Pillonelet al. (2006):** search for a-glucosidase inhibitor: New N-substituted valienamine and conduramine F-1 derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; **14**:6255-6282).
- **Manna C., Galletti, P., Cucciolla, V., Moltedo, O., Leone, A. et Zappia, V. (1997):** The protective effect of olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl) - ethanol counteracts reactive oxygen metabolite- Induced cytotoxicity in caco-2cells. *The Journal of Nutrition*, N° vol.127, p.286-292.
- **Macheix J J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C. (2005):** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. p4-5.
- **Makoi J.H.J.R., Ndakidemi P.A. (2007):** Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes. *African Journal of Biotechnology*, **6(12)**, 1358-1368.
- **Mighri H., Hajlaoui H., Akrouf A., Najjaa H., Neffati M. (2010):** Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone. *C. R. Chimie* **13**: 380–386.
- **Mooser G., Iwaoka K. R. (1989):** Sucrose 6-alpha-D-glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*: characterization of a glucosyl-enzyme complex. *Biochemistry*. **28**:443-449.
- **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 – glucosidase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Enzyme and Microbial Technology* **37**:472–480
- **Owen P-L. et Johns T.(1999):** Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacologie*, **64**: 149-160.
- **Passardi F. (2006):** From root tips to phylogenetic branches: a functional and evolutionary study of peroxidases. Thèse de Docteur des sciences, Université de Genève, P 346.

- **Perez F.J., Villegas D., Mejia N. (2002):** Ascorbic acid and flavonoid-peroxidase reaction as a detoxifying system of H₂O₂ in grapevine leaves, *Phytochemistry*, **60**: 573–580.
- **Ponce A.G., Valle del C.E., Roura S.I. (2004):** Natural essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables. *Lebensm-Wiss.u-technol.***37**:199-2.
- **Pourmorad F., Hosseinimehr S-J et Shahabimajd N. (2006) :** Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African journal of biotechnology*.**5 (11)**:1142-1145.
- **Quettier-deleu C., Gressier B., Vasseur J., Dine T., Brunet C., Luyckx M., Cazin, M., Cazin J. C. Bailleul F. and Trotin F. (2000) :** Phenolic compounds and antioxidants activities of buckwheat hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, **72**: 35-42.
- **Ribéreau-Gayon P(1968):**« Notion générales sur les composés phénoliques » In Composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod, Paris, pp : 105-133.
- **Ribéreau Gayon J., Peynaud E., Sudraud P. et Ribéreau Gayon P. (1982) :** « Composés phénoliques » In « traité d’oenologie, sciences et techniques du vin ». *Edition Dunod*, Paris, pp 477-499.
- **Ribéreau-Gayon, (1968): Saroop S., Chanda S. V and Singh Y. D. (2002):** Changes in soluble and ionically bound peroxidase activities during, *BULG. J. PLANT PHYSIOL*, **28**: 26–34.
- **Sarni-Manchado et Cheynier (2006) :** Les polyphénols en agroalimentaire. Editions TEC&DOC, paris : p 2-9.
- **Schuller D.J., Ban N., Huystee R.B.V., Pherson A.M and Poulos T.L. (1996):** The crystal structure of peanut peroxidase, *Structure*, **4**: 311–321.
- **Shim J-Y., Doo H-K., Ahn S-Y., Kim Y-S., Seong J-K., Park I-S., Min B-H. (2003):** communication 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 Short.
- **Soro Yadé René. (2007):** Purification et caractérisation de l’alpha-glucosidase du suc digestif de *Archachatina ventricosa* (Achatinidae) ; Application à la synthèse de polyglucosylfructosides, thèse doctorat Toulouse.
- **Stocker P., Yousfi M., Djerridane O., Perrier. J., Amziani R., El Boustani. S. et Moulin A. (2004):** Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Biochimie*, **86**:919-925.

- **Tamimi R.M., Lagiou P., Adami H.O. et Trichopoulos D. (2002):** Prospects for Chemoprevention Of Cancer. *Journal of internal Medicine*, Vol. 251, p. 286.
- **Talanoa M.A., Agostini A., Medinaa M L., Reinosob H., Tordableb M.D.C., Horacio A., Tigiera y., Milrad S. (2006):** Changes in ligno-suberization of cell walls of tomato hairy roots produced by salt treatment: The relationship with the release of a basic peroxidase, *Journal of plant physiology* **163**: 740-749.
- **Vattemet ph D¹⁻³.D.A, Ghaedian ph D².R and Shetty ph D¹. (2005):** Enhancing health denefics of borries through phenolic antioxidant enrichment:focus on cramberry. *Asia par c J Nutre.* **14(2)**:120-130.
- **Wang H., Yang J.D., Hua C. S. (2010):** a-Glucosidase and a-amylase inhibitory activities of guava leaves, *Food Chemistry*,123:6–13
- **Wojdyło A., Oszmianski J., Czemerys R. (2007):** Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs .*Food Chemistry* **105**: 940–949.
- **Yi-ling C et Pan-Kai C. (1982) :** Rhamnaceae. In: Chen Yi-ling, ed., Fl. Reipubl. Popularis Sin. **48(1)**:1-169.
- **You Q., Feng C., Wang X., Jiang Y., Lin S. (2012):**Anti-diabetic activities of phenolic compounds in muscadine against alpha-glucosidase and pancreatic lipase, *LWT - Food Science and Technology* ,**46**: 164-168.

Glossaire

GLOSSAIRE

Alterné : qualifier des bourgeons ou des feuilles isolées, attachées alternativement une par une sur la tige à des niveaux différents.

Anti-inflammatoire : Il s'agit d'un groupe de substances destinés à traité réaction inflammatoire et les maladies qui en résultent telles que les manifestations rhumatismales.

Antimutagène : substances utilisé pour traiter des certains mutations.

Antioxydant : sont des molécules capable d'interagir sans danger avec les radicaux libres et de mettre fin à la réaction en chaine avant que les molécules vitales ne soient endommagées. Chaque molécule anti-oxydante ne peut réagir qu'avec un seul radical libre, et par conséquent, il faut constamment refaire le plein de ressource anti-oxydante.

Arbuste : petit arbre (en générale moins de 5 m à l'âge adulte).

Laxatif : c'est une substance qui sert à purger légèrement, un médicament qui accélère le transit intestinal, ramollit les selles. On utilise les laxatifs pour combattre la constipation.

Les radicaux libre : est une espèce chimique possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur la couche externe (électrons célibataires).

Purgatif : c'est une substance qui a une action laxative.

Prostaglandines : sont des hormones de la famille des eicosanoides. Elles sont formées à partir de l'acide arachidonique par la cyclo-oxygénase .

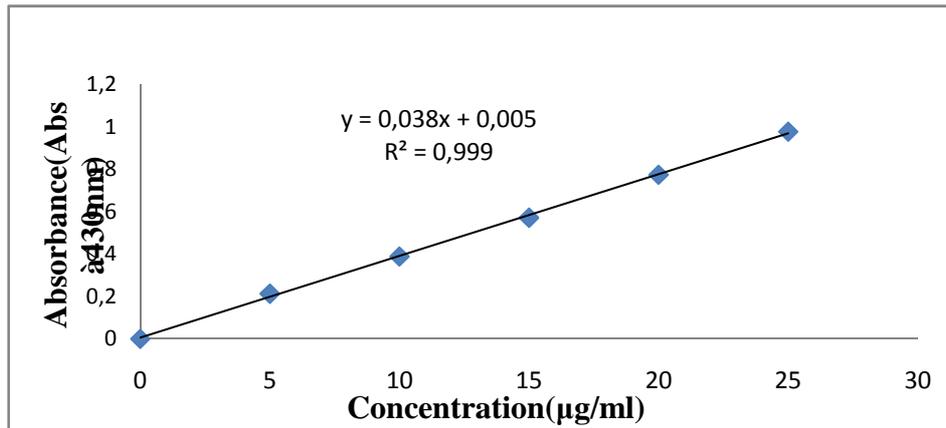
Stress oxydatif : situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des radicaux libres oxygénés toxiques.

Oxydation : réaction au cours de la quelle une molécule perd des électrons.

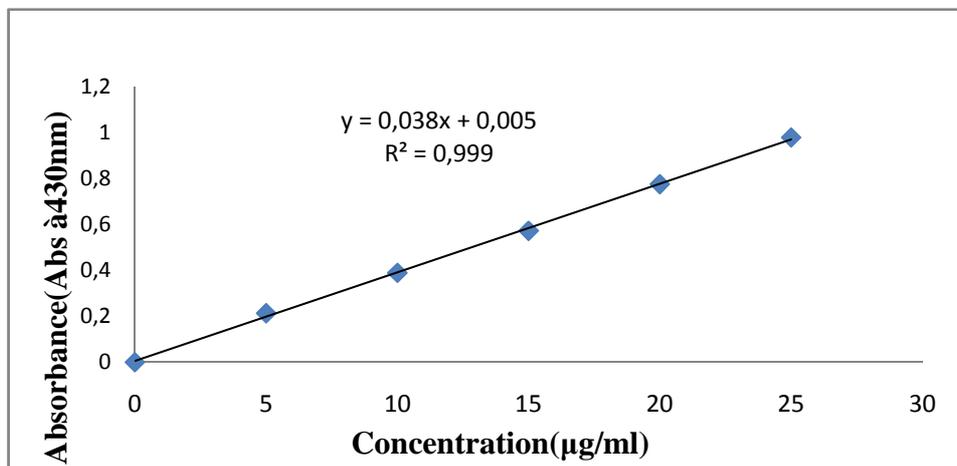
Scavenger : Stress oxydant (situation ou la cellule ne contrôle plus la presence excessive de radicaux libre).

Annexes

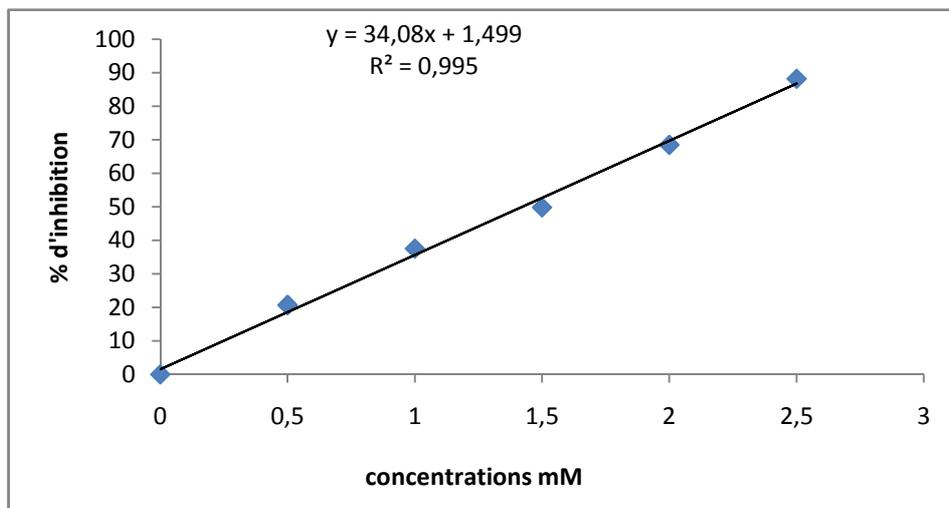
Annexe



La courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols d'*R. alaternus*



La courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes d'*Rhamnus alaternus*



La courbe d'étalonnage de trolox

Résumé

Rhamnus alaternus appelée localement «Melilése », est un arbuste à feuilles persistantes et alaternes ayant des fleurs jaunâtres et un fruit de couleur rouge qui devient noire à la maturité. Son utilisation dans la médecine traditionnelle pour le traitement de la jaunisse, nous a conduit à identifier partiellement et valoriser les substances naturelles présentes dans cette plante. Pour cela nous avons procédé à l'extraction des polyphénols à partir de ses feuilles, suivi d'une analyse phytochimique, l'évaluation de l'activité anti-oxydante et anti-enzymatique. Le dosage des polyphénols ont montrés que l'extrait sec des feuilles de *Rhamnus alaternus* contient un taux de polyphénols et flavonoïdes respectivement de : $34,13 \pm 1,30$ mg EAG /g d'extrait, $118,72 \pm 4$ EQ/g d'extrait. Trois tests ont été fait pour évaluer l'activité antioxydante, il s'agit de : l'activité anti-radicalaire avec DPPH, l'ABTS et pouvoir réducteur, et deux tests pour l'activité anti-enzymatique, il s'agit de : anti α -glucosidase et anti-peroxydase, le résultat de cette étude a montré que *Rhamnus alaternus* a une forte activité anti-oxydante et anti-enzymatique.

Mots clés : *Rhamnus alaternus*, analyse phytochimique, activité anti-oxydante, activité anti-enzymatique.

Abstract

Rhamnus alaternus locally called "Melilése", is an evergreen shrub and buckthorns with yellow flowers and red fruit that turns black when ripe. Its use in traditional medicine for the treatment of jaundice led to our partially identified and value the natural substances found in this plant. For that we precede with the extraction of polyphenols from the leaves, followed by a phytochemical analysis, evaluation of antioxidant activity and anti-enzymatique. The determination of polyphenols has shown that the dry leaves of *Rhamnus alaternus* contain an amount of polyphenols and flavonoids, respectively: $34, 13 \pm 1, 30$ mg EAG / g of extract, $118, 72 \pm 4$ EQ / g extract. Three tests were done to evaluate the antioxidant activity, these are: the anti-radical activity with DPPH, reducing power and ABTS, and two tests for the activity anti-enzymatique, it is: Anti α -glucosidase and anti peroxidase, the result of this study showed that *rhamnus alaternus* has strong antioxidant activity and anti-enzymatique.

Keywords:

Rhamnus alaternus, phytochemical analysis, antioxidant activity, activity anti-enzymatique.