

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA



FACULTE DE SCIENCES  
DEPARTEMENT DE CHIMIE  
FILIERE : CHIMIE  
OPTION : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

**Mémoire présenté pour obtenir du diplôme  
Master académique**

**Par : MAHCHOUCHE Ouarda  
LEGMA Kamir**

**Intitulé**

**Evaluation *in vitro* des activités antioxydante,  
antidiabétique et anti-Alzheimer des extraits naturels  
d'une plante de la famille des *Rhamnaceae***

**Promoteur du travail**      Dr. Kheniche Abdelhakime      MCA - Univ MB, M'sila  
**Co-promoteur du travail**      Dr. KADI Imededdine      MRB-CRBt, constantine

**Année universitaire : 2020 /2021**

# *Dédicaces*

*A l'aide de dieu tout puissant, qui nous a tracé le chemin de nos vie, nous avons pu réaliser ce travail que nous avons dédié :*

*A nos chères mères qui sont la lumière de nos yeux, l'ombre de nos pas et le bonheur de notre vie, qui ont apporté leur appui durant toutes nos années d'étude et pour leur sacrifice et leur soutien .*

*A nos chers pères qui nous ont guidés et nous ont appris les secrets de la vie.*

*A nos chers frères.*

*A nos sœurs et tous nos chères.*

*A nos enseignants qui nous ont suivi tout au long de nos cursus universitaire.*

*A tous nos collègues de la promotion 2021 de chimie pharmaceutique*

***OUARDA & KAMIR***



# Remerciements

*Avant tout, nous remercions Dieu tout puissant pour nous avoir aidé à réaliser ce modeste travail.*

*C'est avec un réel plaisir que nous réservons ces lignes en signe de gratitude et de profonde reconnaissance à tous ceux qui nous ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation et à l'aboutissement de ce travail.*

*Nous tenons tout d'abord à remercier : **Dr. Imededdine kadi et Dr. Abdelhakim Kheniche**, qui nous ont encadré et dirigé ce travail depuis les premiers instants. Nous les remercions pour ses efforts Afin de nous aider, de nous conseiller et de nous orienter.*

*Nos remerciements s'adressent aussi à **l'équipe de centre de recherche de la biotechnologie à Constantine** ou nous avant réalisé la pratique de notre recherche*

*Ainsi que le directeur **Ahmed Mir** de l'incubateur des travaux de l'université de M'SILA et l'enseignant **Issam Boudia***

*Nous remercions vivement les membres du jury qui nous ont fait l'honneur pour juger ce travail*

*Nos remerciements vont également à tous les enseignants et tous les responsables de la faculté de sciences*

*A toute personne ayant participé de près ou de loin à notre formation et à tous ceux qui nous ont apporté leur soutien et leurs encouragements durant la réalisation de ce travail.*

*Merci également à tous ceux qui, un jour ou l'autre, nous ont offert leur amitié et des moments inoubliables tout au long de notre cursus universitaire.*

# Liste des figures

## Chapitre 01

|  |    |
|--|----|
| Figure I.1 . La mitochondrie, principale source des ERO radicalaires.....          | 04 |
| Figure I.2 . Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant.....             | 05 |
| Figure I.3 .Classification des antioxydants .....                                  | 07 |
| Figure I.4 .schéma réactionnel de piégeage du radical DPPH.....                    | 08 |
| Figure I.5 .schéma réactionnel de piégeage du radical ABTS .....                   | 09 |
| Figure I.6 .Réduction du complexe chromogène de $\text{Cu}^{+2}\text{-Nc}_2$ ..... | 09 |
| Figure I.7 .Réduction du fer ferrique en fer ferreux.....                          | 10 |
| Figure I.8 .Formation du complexe $\text{Fe}^{+2}$ -phénantroline.....             | 10 |

## Chapitre 02

|  |    |
|--|----|
| Figure II.1. Biosynthèse de quelques types moléculaire de polyphénols..... | 12 |
|--|----|

## Chapitre 03

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 01</b> : schéma général de l'extraction et le fractionnement des extraits étudiés.....  | 17 |
| <b>Figure 02</b> : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (DPPH).....           | 17 |
| <b>Figure 03</b> : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (ABTS).....           | 18 |
| <b>Figure 04</b> : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (CUPRAC).....         | 18 |
| <b>Figure 05</b> : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (FRAP).....           | 19 |
| <b>Figure 06</b> : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (Phenanthroline)..... | 19 |
| <b>Figure 07</b> : mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (Anti-AChE).....      | 21 |

## Chapitre 05

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 01</b> : Teneurs en Phénols totaux des extraits étudiés.....                                      | 23 |
| <b>Figure 02</b> : Teneur en Flavonoïdes totaux des extraits étudiés.....                                   | 23 |
| <b>Figure 03</b> : Valeurs $\text{IC}_{50}$ des extraits étudiés dans la méthode de piégeage du DPPH.....   | 27 |
| <b>Figure 04</b> : Valeurs $\text{IC}_{50}$ des extraits étudiés dans la méthode de piégeage de l'ABTS..... | 27 |
| <b>Figure 05</b> : Valeurs $A_{0.5}$ des extraits étudiés dans la méthode de CUPRAC.....                    | 32 |
| <b>Figure 06</b> : Valeurs $A_{0.5}$ des extraits étudiés dans la méthode de FRAP.....                      | 32 |
| <b>Figure 07</b> : Valeurs $A_{0.5}$ des extraits étudiés dans la méthode de Phenanthroline.....            | 33 |
| <b>Figure 08</b> : Valeurs SPF des extraits étudiés.....  | 38 |

# Liste des Tableaux

## Chapitre 01

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 01</b> : distribution géographique des genres de la famille des Apiaceae. .... | 05 |
|---|----|

## Chapitre 02

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau 01</b> : Les principales classes des composants phénoliques.....      | 13 |
| <b>Tableau 02</b> : Principales classes des flavonoïdes avec quelques exemples : | 14 |

## Chapitre 03

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 01</b> : l'organisation de microplaque dans le test de $\alpha$ -amylase.....      | 20 |
| <b>Tableau 02</b> : mode de remplissage de microplaque dans le test de $\alpha$ -amylase..... | 20 |
| <b>Tableau 03</b> : Fonction normale de produit utilisée dans le calcul de la SPF.....        | 22 |

## Chapitre 04

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 01</b> : Rendement d'extraction.....   | 23 |
| <b>Tableau 02</b> : teneur en Phénols totaux et flavonoïdes.....  | 23 |
| <b>Tableau 03</b> : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH.....                                      | 25 |
| <b>Tableau 04</b> : Pourcentages d'inhibition du radical ABTS.....                                      | 26 |
| <b>Tableau 05</b> : tableau récapitulatif des valeurs IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ ).....                    | 27 |
| <b>Tableau 06</b> : les absorbances des différents extraits dans la méthode CUPRAC.....                 | 29 |
| <b>Tableau 07</b> : les absorbances des différents extraits dans la méthode FRAP.....                   | 30 |
| <b>Tableau 08</b> : les absorbances des différents extraits dans la méthode de Phenanthroline.....      | 31 |
| <b>Tableau 09</b> : tableau récapitulatif des valeurs A 0.5 ( $\mu\text{g/ml}$ ).....                   | 32 |
| <b>Tableau 10</b> : les pourcentages d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase par les extraits étudiés..... | 35 |
| <b>Tableau 11</b> : les pourcentages d'inhibition de l'AChE.....  | 36 |
| <b>Tableau 12</b> : coefficient de protection solaire des extrais étudiés.....                          | 38 |

## *Liste des abréviations*

|   |  |
|---|--|
| <b>ROS</b>                              | Les espèces réactives de l'oxygène.                  |
| <b>ADN</b>                              | Acide désoxyribonucléique.                           |
| <b>BHA</b>                              | hydrox-yanisole butylé.                              |
| <b>BHT</b>                              | hydroxy-toluene butylé                               |
| <b>SOD</b>                              | superoxydes dismutases.                              |
| <b>CAT</b>                              | Catalase.  |
| <b>GPx</b>                              | Glutathion peroxydase.                               |
| <b>GR</b>                               | Glutathion réductase.                                |
| <b>O<sub>2</sub></b>                    | Oxygène  |
| <b>OH•</b>                              | Radical hydroxyle.                                   |
| <b>Fe<sup>2+</sup></b>                  | Fer ferreux.   |
| <b>Cu<sup>2+</sup></b>                  | Ion cuivrique.                                       |
| <b>Fe<sup>3+</sup></b>                  | Fer ferrique.  |
| <b>HOCl</b>                             | Acide hypochlorique.                                 |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>       | Peroxyde d`hydrogène.                                |
| <b>O<sub>2</sub><sup>*-</sup></b>       | Anion superoxyde.                                    |
| <b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>        | Oxygène singulier.                                   |
| <b>GSH</b>                              | Glutathion.  |
| <b>DPPH</b>                             | 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl.                      |
| <b>ABTS</b>                             | 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) |
| <b>FRAP</b>                             | Ferric Reducing Antioxidant Power.                   |
| <b>IC50</b>                             | Concentration inhibitrice de 50 %.                   |
| <b>K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub></b> | Ferricyanure de potassium.                           |
| <b>FeCl<sub>3</sub></b>                 | Chlorure de fer.                                     |
| <b>HCl</b>                              | Acide chlorhydrique.                                 |
| <b>H<sub>2</sub>O</b>                   | Eau.   |
| <b>MA</b>                               | maladie d'Alzheimer.                                 |
| <b>AChE</b>                             | Acétylcholinestérase.                                |

تعرف الامراض المرتبطة بالإجهاد التأكسدي انتشارا واسعا مما يؤثر سلبا على الوضع الصحي والاقتصادي وهو ما يفرض على الباحثين في الميدان الطبي الاهتمام بإيجاد طرق علاج جديدة او البحث عن صيغ دوائية أكثر فعالية للتحكم في هذا النوع من الأمراض. الى جانب ذلك، تعتبر المركبات الطبيعية خاصة منها ذات المصدر النباتي بدائل حقيقية لأدوية أكثر فعالية. في هذه الدراسة نتطرق الى استخلاص المركبات الفعالة لنبته طبية مع تحديد تركيبها من Polyphénols و flavonoides . ونشاطها مضاد الاكسدة باستعمال تقنيات تعديل الجذور الحرة DPPH و ABTS . وكذا تقنيات ارجاع Fer و Cuivre في Phenanthroline, FRAP, CUPRAC . كما تطرقنا الى دراسة تثبيط المستخلصات للنشاط الانزيمي لكل من  $\alpha$ -amylase و AChE مع تحديد مؤشر الحماية من الأشعة فوق البنفسجية الشمسية. النتائج المحصل عليها أعطت نتائج معتبرة من Polyphénols و flavonoides خاصة بالنسبة لمستخلصات البذرة والمستخلص الكحولي للأوراق. هذا الأخير أعطى أفضل النتائج في تعديل الجذور الحرة DPPH و ABTS مقارنة بالمستخلصات الأخرى. في جانب اخر، المستخلصات المدروسة أعطت نتائج متقاربة في تقنيات ارجاع Fer و Cuivre في Phenanthroline, FRAP, CUPRAC , حيث أعطت مستخلصات الأوراق أفضل النتائج تليها مستخلصات البذرة ثم الثمرة تواليها، في حين تبقى كل النتائج بعيدة عن المقارنة بالمركبات المرجعية. إضافة الى ذلك، اعطى النشاط المضاد لانزيم AChE نتائج معتبرة خاصة لمستخلصات الأوراق والمستخلص المائي للثمار. في حين النتائج كانت ضعيفة نسبيا في تثبيط الـ  $\alpha$ -amylase من كل المستخلصات المدروسة. فيما يخص مؤشر الحماية من الأشعة الشمسية فقط أعطت المستخلصات المدروسة نتائج متوسطة نسبيا في هذا الجانب. كل النتائج المحصل عليها تبرز أهمية النبتة المختارة للدراسة في إعطاء بدائل حقيقية ذات مصدر طبيعي يمكن الاستفادة منها في الميادين الطبية، الغذائية والصناعية

الكلمات المفتاحية: المركبات الطبيعية، الاجهاد التأكسدي، السكري، الزهايمر، مضادات الأكسدة

**❖ Abstract**

Natural products represented the main source of alternative phyto-pharmaceuticals. Their molecular varieties and therapeutic efficiency offered great opportunities to discover new drugs. Actually, synthetic drugs used to treat chronic diseases such as diabetes, cancer, neurologic and cardiovascular ones exhibited deep side effects, which stimulate researchers to find efficient alternatives. In this study, phenolic and flavonoids of Rhamnaceae plant were quantified using folin-ciocalteau and AlCl<sub>3</sub> methods respectively. In addition, the antioxidant activities were studied by standard methods, DPPH and ABTS scavenging methods, Iron and copper reduction via FRAP, Phenanthroline and CUPRAC methods. On the other hand, anti-diabetic and anti-Alzheimer activities were tested via inhibition of  $\alpha$ -amylase and acetylcholinesterase respectively. Finally, the sun protective factor was determined for all studied extracts. The obtained results showed important levels of total phenols and flavonoids, especially for seeds extracts and methanolic extract of leaves. In the antioxidant activity, the results showed significant activities for all tested extracts, particularly methanolic extract of leaves in DPPH and ABTS scavenging methods. In addition, the studied extracts showed potent activities in CUPRAC, FRAP and Phenanthroline methods, leaves extracts exhibited the best effect followed by seeds and fruits extracts respectively in CUPRAC and FRAP methods. In addition, leaves extracts showed a great inhibition of iron in phenanthroline assay. In the other hand, in enzymatic activity, extracts showed a moderate inhibition to  $\alpha$ -amylase, in dose-dependent manner. While the inhibition of acetylcholinesterase was important, especially for leaves extracts and aqueous extracts of fruits. Finally, the studied extracts exhibited a moderate protection against sunlight in sun protection factor assay. Our results justify the Algerian traditional use of the studied plant, and enhance the biological and pharmacological effect of their extracts.

**Key words:** antioxidant, Rhamnaceae, Alzheimer, Diabetes, oxidative stress

Les produits naturels représentent une source inépuisable des alternatives d'intérêt pharmaceutique. Grâce à leur efficacité thérapeutique, ils peuvent remplacer et/ou compléter les traitements de synthèse chimique notamment dans les maladies lourdes comme le cancer, le diabète et les maladies neurologiques. Ce travail a été réalisé sur les principes actifs d'une plante de la famille des *Rhamnaceae*, commençant par la collection et l'extraction de l'espèce puis l'extraction méthanolique et aqueuse avec une quantification chimique et activités biologiques antioxydante et enzymatique. Le dosage des phénols et flavonoïdes totaux a été réalisé par les méthodes classiques de folin-ciocalteau et  $AlCl_3$  respectivement. L'activité antioxydante a été faite par cinq méthodes différentes, les méthodes de piégeage des radicaux DPPH et ABTS, les méthodes CUPRAC, FRAP et Phénanthroline. L'activité inhibitrice des enzymes a été testée sur deux enzymes, l'acétylcholinestérase et l' $\alpha$ -amylase. Les résultats obtenus ont montré des rendements d'extraction importants notamment pour l'extrait méthanolique des feuilles et l'aqueux des fruits. Dans les dosages biochimiques, les valeurs obtenues ont montré une richesse en phénols totaux notamment pour les extraits méthanolique et aqueux des graines, et l'extrait méthanolique des feuilles. Pour les flavonoïdes, l'extrait méthanolique et aqueux des graines avec l'extrait méthanolique des feuilles ont présenté des valeurs intéressantes. A propos de l'activité antioxydante, les extraits méthanoliques des feuilles ont présenté des activités intéressantes en comparaison avec les autres extraits, plus particulièrement, dans le piégeage du radical ABTS que le DPPH. Dans la méthode CUPRAC, les extraits des feuilles ont donné les meilleurs effets suivis par les extraits des graines et les fruits respectivement. Ainsi, Les extraits étudiés ont présenté un comportement presque similaire dans la méthode FRAP, que celui présenté dans la méthode CUPRAC, l'extrait méthanolique des feuilles et fruits a donné le meilleur effet alors que les autres extraits, notamment des graines, ont donné des activités faibles. Dans l'activité de phénanthroline, Les résultats obtenus ont montré que les extraits des feuilles, méthanoliques et aqueux, ont donné le meilleur pouvoir réducteur de fer. D'un autre côté, L'étude de l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase par nos échantillons de toutes les parties a révélé une inhibition modérée de l'enzyme, d'une manière dose dépendante, mais leurs  $IC_{50}$  ont été faibles. Parallèlement, une inhibition considérable de l'AChE a été détectée, d'une manière dose-dépendante, particulièrement pour les extraits des feuilles et l'extrait aqueux des fruits. Finalement, dans l'activité protectrice vis-à-vis la lumière solaire, nos extraits ont donné des résultats qui sont généralement de protection moyenne à modérée en comparaison avec les valeurs de références. Ces résultats reflètent l'importance de la plante étudiée dans la médecine traditionnelle Algérienne.

**Mots clés :** antioxydants, Rhamnaceae, Alzheimer, Diabète, stress oxydatif

# Sommaire

|                            |    |
|----------------------------|----|
| Remerciements              |    |
| Liste des tableaux         |    |
| Liste des figures          |    |
| Liste des abréviations     |    |
| الملخص                     |    |
| Abstract                   |    |
| Résumé                     |    |
| Introduction générale..... | 01 |

## *Synthèse bibliographique*

### *Chapitre 01 : Le stress oxydatif*

|  |    |
|--|----|
| 1. les radicaux libres.....  | 03 |
| 1.1. Généralités.....  | 03 |
| 1.2. descriptions chimique.....  | 03 |
| 1.3. Les effets sur la santé.....  | 04 |
| 2. les antioxydants.....   | 05 |
| 2.1. Généralités.....  | 05 |
| 2.2. sources des antioxydants.....   | 06 |
| 2.3. Intérêts industriels et médicales.....                                      | 06 |
| 2.4. classification des antioxydants.....  | 06 |
| 2.5. Méthodes d'évaluation .....   | 08 |
| 2.5.1. Méthode de piégeage du radical DPPH.....                                  | 08 |
| 2.5.2. Méthode de piégeage du radical ABTS.....                                  | 08 |
| 2.5.3. la méthode de de réduction du complexe Cuivre-neocuproïne .....           | 09 |
| 2.5.4. Le pouvoir réducteur des ions de Fer.....                                 | 09 |
| 2.5.5. L'activité de réduction du complexe Fe <sup>+2</sup> -Phenanthroline..... | 10 |

### *Chapitre 02 : Les métabolites secondaires*

|  |    |
|--|----|
| 1. Généralités.....                                | 11 |
| 2. Classification.....                             | 11 |
| 2.1. Les composés phénoliques.....                 | 11 |
| 2.1.1. Généralités.....                            | 11 |
| 2.1.2. Propriétés biologiques.....                 | 11 |
| 2.1.3. Description chimique et classification..... | 12 |
| 2.1.4. Flavonoïdes.....                            | 13 |
| 2.1.4.1. Généralité.....                           | 13 |
| 2.1.4.2. Classification.....                       | 13 |
| 2.1.4.3. Propriétés biologiques.....               | 14 |
| 3. La famille des <i>Rhamnaceae</i> .....          | 15 |
| 3.1. Généralités.....                              | 15 |
| 3.2. Description chimique.....                     | 15 |
| 3.3. Propriétés médicales.....                     | 15 |

### ***Chapitre 03 : Matériels et méthodes***

|  |    |
|--|----|
| 1. Collection du matériel végétal.....   | 16 |
| 2. Séchage et broyage.....   | 16 |
| 3. Extraction et fractionnement.....   | 16 |
| 4. Dosage des composés phénoliques.....  | 16 |
| 5. Dosage des flavonoïdes.....   | 16 |
| 6. Activité antioxydante.....  | 17 |
| 6.1. Piégeage du radical DPPH.....   | 17 |
| 6.2. Piégeage du radical ABTS.....   | 18 |
| 6.3. Activité de réduction du complexe Cu <sup>+2</sup> -Neocuproïne (CUPRAC)..... | 18 |
| 6.4. Activité du pouvoir réducteur (FRAP).....                                     | 19 |
| 6.5. Activité de réduction par formation du complexe Fe+2-Phenanthroline.....      | 19 |
| 7. Activité inhibitrice des enzymes.....   | 20 |
| 7.1. Activité antidiabétique via l'inhibition de l'α-amylase.....                  | 20 |
| 7.2. Activité anti-Alzheimer via l'inhibition de l'acétylcholinestérase.....       | 21 |
| 8. Activité protectrice vis-à-vis les rayonnements solaires.....                   | 22 |
| 9. Etude statistique.....  | 22 |

### ***Chapitre 04 : Résultats et discussion***

|  |    |
|--|----|
| 1. Rendements d'extraction.....  | 23 |
| 2. Dosage des composés phénoliques.....  | 23 |
| 3. Dosage des flavonoïdes.....   | 23 |
| 4. Activité antioxydante.....  | 25 |
| 4.1. Activité de piégeage du radical libre DPPH.....                           | 25 |
| 4.2. Activité de piégeage du radical libre ABTS.....                           | 26 |
| 4.3. Activité de réduction du complexe cuivre-Neocuproïne (CUPRAC).....        | 29 |
| 4.4. Activité de pouvoir réducteur (FRAP).....                                 | 30 |
| 4.5. Activité de réduction du complexe Fe+2-Phenanthroline.....                | 31 |
| 5. Activité inhibitrice des enzymes.....                                       | 35 |
| 5.1. L'activité antidiabétique via l'inhibition de l'α-amylase.....            | 35 |
| 5.2. L'activité anti-Alzheimer via l'inhibition de l'acétylcholinestérase..... | 36 |
| 6. L'activité protectrice vis-à-vis la lumière solaire.....                    | 38 |

### ***Conclusion générale et perspectives***

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| 1. Conclusion générale..... | 39 |
| 2. Perspectives.....        | 40 |

### ***Annexes***

|  |  |
|--|--|
| 1. Lecteur des microplaques                |  |
| 2. Organisation du microplaque             |  |
| 3. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique |  |
| 4. Courbe d'étalonnage de Quercétine       |  |

# Introduction générale

## *Introduction générale*

La qualité de la santé publique est la problématique de premier ordre chez les techniciens et les chercheurs du secteur médical. La dissémination incontrôlée d'une large gamme des maladies de différentes catégories. Le diabète, le cancer, les maladies neurologiques et cardiovasculaires s'installent graduellement dans la communauté en engendrant des impacts socioéconomiques lourdes et parfois insupportables.

Actuellement, la notion du stress oxydatif devient liée directement ou indirectement avec la plupart des maladies chroniques. C'est une agression permanente à l'échelle cellulaire et moléculaire aboutissant à une dégradation plus au moins intense de la matière vivante. C'est un facteur déclenchant ou associé à plusieurs maladies particulièrement le diabète et l'Alzheimer.

Le diabète est un trouble métabolique lié à des complications qui sont parfois graves. Chez les personnes diabétiques, le métabolisme glucidique est perturbé grâce à plusieurs étiologies héréditaires et organiques. Le diabète type 2, non insulino-dépendant, est le plus répandu dans la communauté algérienne, il nécessite un traitement à base des antidiabétiques oraux pour contrôler la glycémie postprandiale, notamment les inhibiteurs de l' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glucosidase. Parallèlement l'Alzheimer, est une problématique neurologique particulièrement chez les sujets âgés. La prévalence de la MA double tous les 5 ans après l'âge de 60 ans. Elle nécessite des stratégies thérapeutiques particulières qui sont parfois insupportables.

En plus, l'importance des produits naturels dans la découverte des nouvelles molécules d'intérêts pharmacologiques est indiscutable. La médecine traditionnelle Algérienne offre des centaines des plantes médicinales qui peuvent être exploitées, sur une base scientifique, dans la recherche des alternatives médicales de haute qualité.

Dans ce travail, nous avons sélectionné une plante de la famille des *Rhamnaceae* pour faire :

- L'extraction des métabolites secondaires méthanoliques et aqueux.
- Un dosage des phénols et flavonoïdes totaux dans les différents extraits
- Etudier l'activité antioxydant, par différentes méthodes, piégeage du radical libre DPPH, Piégeage du radical ABTS, Activité de réduction du complexe  $\text{Cu}^{+2}$ -

Neocuproïne (CUPRAC), Activité du pouvoir réducteur (FRAP), Activité de réduction par formation du complexe  $\text{Fe}^{+2}$ -Phenanthroline,

- Evaluer l'activité inhibitrice des enzymes particulières, Activité antidiabétique via l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase et Activité anti-Alzheimer via l'inhibition de l'acétylcholinestérase pour les extraits sélectionnés

Pour la réalisation de ce travail, nous avons subdivisé ce manuscrit en trois parties. La première consiste en une étude théorique bibliographique traitant les composés phénoliques et leurs activités pharmacologiques, ainsi que les mécanismes et les stratégies thérapeutiques. Dans la deuxième partie, nous avons évoqué l'aspect technique et méthodologique des différentes activités étudiées, *in vitro*. La troisième partie est consacrée au côté expérimental dans laquelle nous avons présenté les résultats obtenus avec une discussion générale. Le travail est clôturé par une conclusion et des perspectives.

# Chapitre 01

# Le stress oxydatif

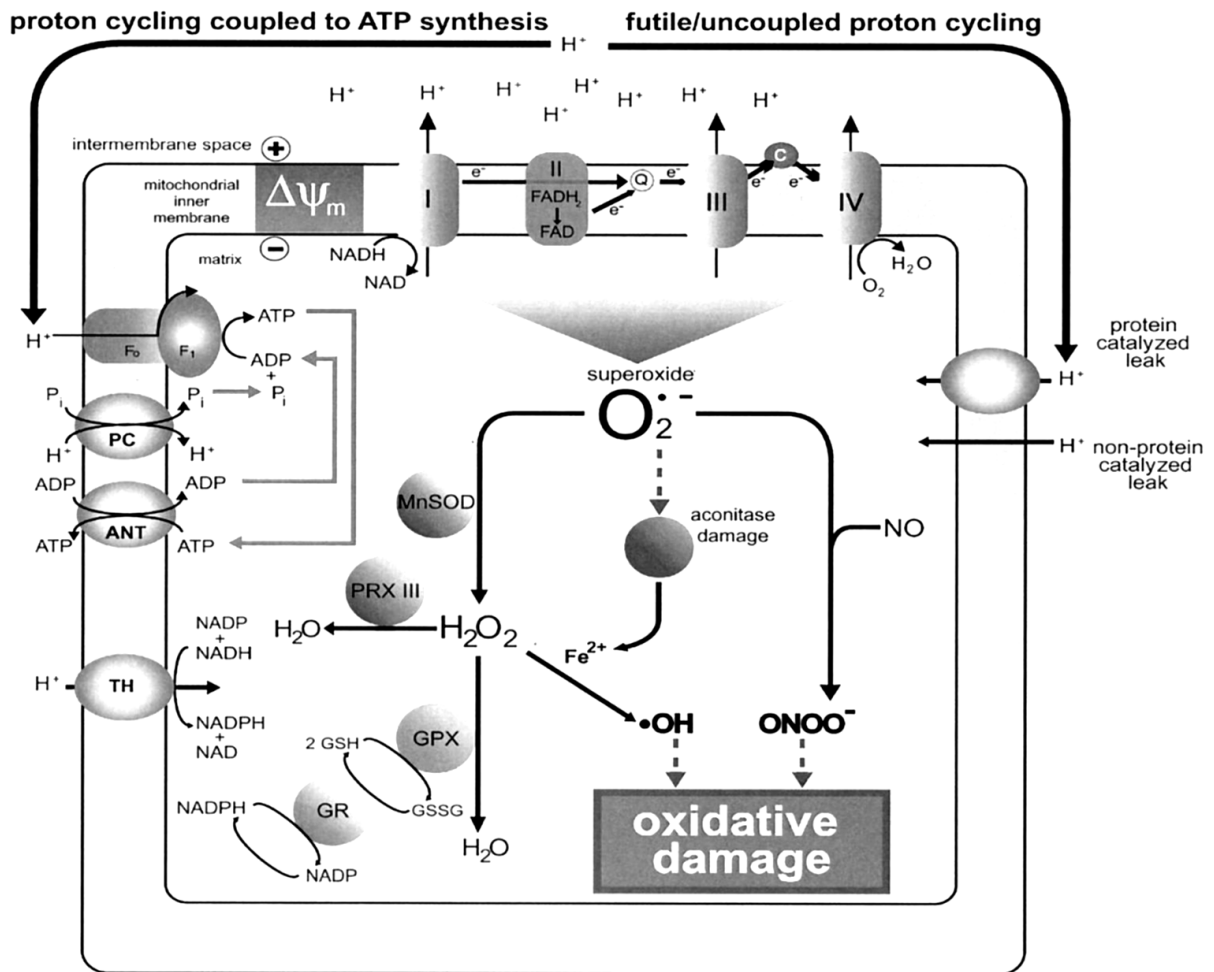
## I.1 Les radicaux libres

### I.1.1 Généralités

Un radical libre est un atome ou une molécule qui porte sur sa couche électronique périphérique un ou plusieurs électrons non appariés, c'est-à-dire non couplés à un électron de spin opposé. Cela entraîne une très haute réactivité chimique avec les éléments voisins.[1, 2] Les espèces radicalaires sont électrophiles et vont chercher à arracher un électron à une molécule voisine afin d'apparier leur électron célibataire. Cet état est donc seulement transitoire, de l'ordre de la microseconde [3], car le radical va soit accepter un autre électron, soit transférer le ou les électrons libres sur une autre molécule (lipide, protéine, acide nucléique) afin de rapparier son ou ses électrons célibataires et d'obtenir ainsi un état plus stable[4]. Il s'agit donc d'un intermédiaire de réaction ce qui va entraîner une réaction en chaîne qui va produire de nouveaux radicaux libres. L'organisme en produit en continu, Les radicaux libres sont indispensables à la vie car ils participent à de nombreuses fonctions physiologiques lors de la croissance ou de la défense de l'organisme. En effet, ils participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à l'apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes[5].

### I.1.2 descriptions chimique

En chimie, rappelons que les molécules sont constituées d'atomes liés entre eux par des liaisons covalentes (liaisons chimiques) dans lesquelles chacun des atomes met en commun un électron d'une de ses couches externes afin de former un doublet d'électrons liant les deux atomes. La plupart des molécules contiennent un nombre pair d'électrons, alors qu'un radical (souvent appelé radical libre) est une espèce chimique (atome ou groupe d'atomes) possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche externe. Il se note par un point ( $R\bullet$ ). La plupart du temps, la présence d'un électron célibataire confère à ces molécules, une grande instabilité, ceci signifie qu'ils ont la possibilité de réagir avec de nombreux composés (atomes ou molécules) dans des processus le plus souvent non spécifiques, et que leur durée de vie en solution est très courte. la stabilité de ces entités chimiques décroît généralement lorsque le nombre d'électrons célibataires augmente [6].



**Figure I.1:** La mitochondrie, principale source des ERO radicalaires.

### I.1.3 Les effets sur la santé.

Les cellules des êtres aérobies, en état d'oxydo-réduction normal, ont une concentration basale en radicaux libres de l'oxygène. Le contrôle rigoureux de la formation et de l'élimination de ces dernières préserve les cellules des effets nuisibles des radicaux libres. Quand ce précaire équilibre est rompu, en faveur des radicaux libres, il survient un stress oxydatif. On appelle stress oxydatif, une augmentation de radicaux libres de l'oxygène qui provoque des dommages cellulaires irréversibles, tels que la peroxydation des lipides ainsi que la dénaturation oxydative des acides aminés et des bases azotées entraînant, une perte de fonction et d'intégrité, voire la mort cellulaire, ces attaques radicalaires de l'ADN peuvent être sources de mutations carcinogènes [19].

Les désordres biochimiques causés par le stress oxydant impliquent celui-ci dans de très nombreuses maladies, soit comme un des facteurs déclenchant, soit comme une des causes de Complications dans leur évolution. Un exemple caractéristique de cette situation est le SIDA.

Avec l'âge, on observe une modification de l'équilibre pro-oxydant/antioxydant et de ce fait une augmentation du stress oxydant. Le stress oxydant est la principale cause initiale de nombreuses maladies souvent liées au vieillissement : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, oedème pulmonaire. Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles telles le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes, les maladies cardio-vasculaires etc.(tableau 1).[7]

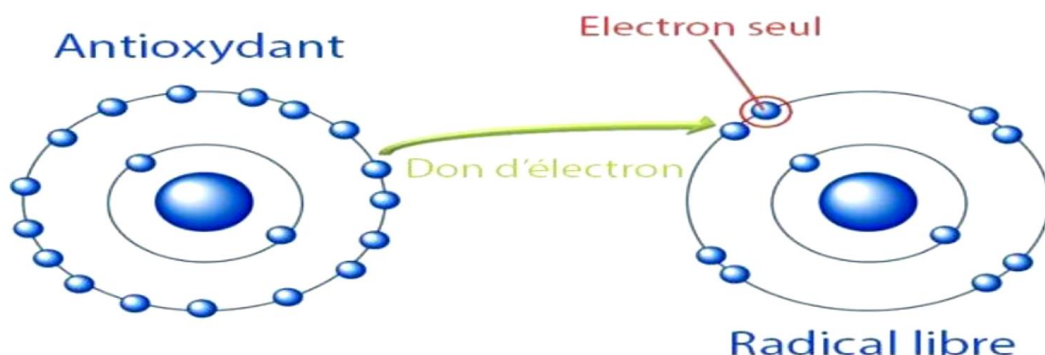
**Tableau I. 1** : Exemples des maladies qui peuvent être reliées au stress oxydatif

|   |  |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Arthrite rhumatoïde</li> <li>• Asthme</li> <li>• Athérosclérose</li> <li>• Cancers</li> <li>• Cirrhose</li> <li>• Colites ulcérautes</li> <li>• Diabète sucré</li> <li>• Emphysème</li> <li>• Fibrose kystique</li> <li>• Fibroses pulmonaires</li> <li>• Hémochromatose idiopathique</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Infection au VIH</li> <li>• Maladie d'Alzheimer</li> <li>• Maladie de Crohn</li> <li>• Maladie de Parkinson</li> <li>• Sclérose latérale amyotrophique</li> <li>• Mongolisme</li> <li>• Syndrome de détresse respiratoire chez l'adulte</li> <li>• Poumon-choc</li> <li>• Veines variqueuses (varices)</li> <li>• Syndrome de Down</li> </ul> |
|---|--|

## I. 2.les antioxydants

### I.2.1 Généralités

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme en permettant de maintenir, au niveau de la cellule, des concentrations non cytotoxiques de ROS. Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres. [8].



**Figure I.2** : Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant [9].

### **I.2.2 sources des antioxydants**

Les antioxydants viennent des sources multiples, ils peuvent être d'origine naturelle comme les produits d'alimentation, notamment, végétales comme la vitamine C, la vitamine E les minéraux et les composés du métabolisme secondaire comme les composés phénoliques. Ou d'origine synthétique comme certaines formes médicamenteuses ou sous forme des conservateurs alimentaire et diététique. Il peuvent être également d'origine endogène, comme certains enzymes comme la catalase, peroxydase, superoxyde dismutase et glutathion peroxydase ou exogène, viennent de l'extérieur de l'organisme , comme une large gamme des produits diététique [10, 11, 12, 13]

### **I .2.3 Intérêts industriels et médicales**

Les antioxydants apparaissent aujourd'hui comme les clés de la longévité et nos alliés pour lutter contre les maladies modernes. Ce sont des éléments protecteurs en neutralisant le stress oxydatif. Ce qui permet de prévenir certains types de dommages au niveau de la structure des cellules et des organes et par conséquent des maladies telles que les maladies cardiovasculaires, les cancers, etc. ces antioxydants sont utilisés sous formes des excipients, et additifs pharmaceutique dans les différentes formes galéniques. En plus, ils sont également utilisés dans l'industrie agro-alimentaire et en parfumerie en tant que conservateurs de qualité [15].

### **I.2.4 classification des antioxydants**

Les antioxydants peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine. On distingue deux grandes classes, antioxydants de synthèse et antioxydant naturelles qui sont partagés en antioxydants enzymatiques et non enzymatiques

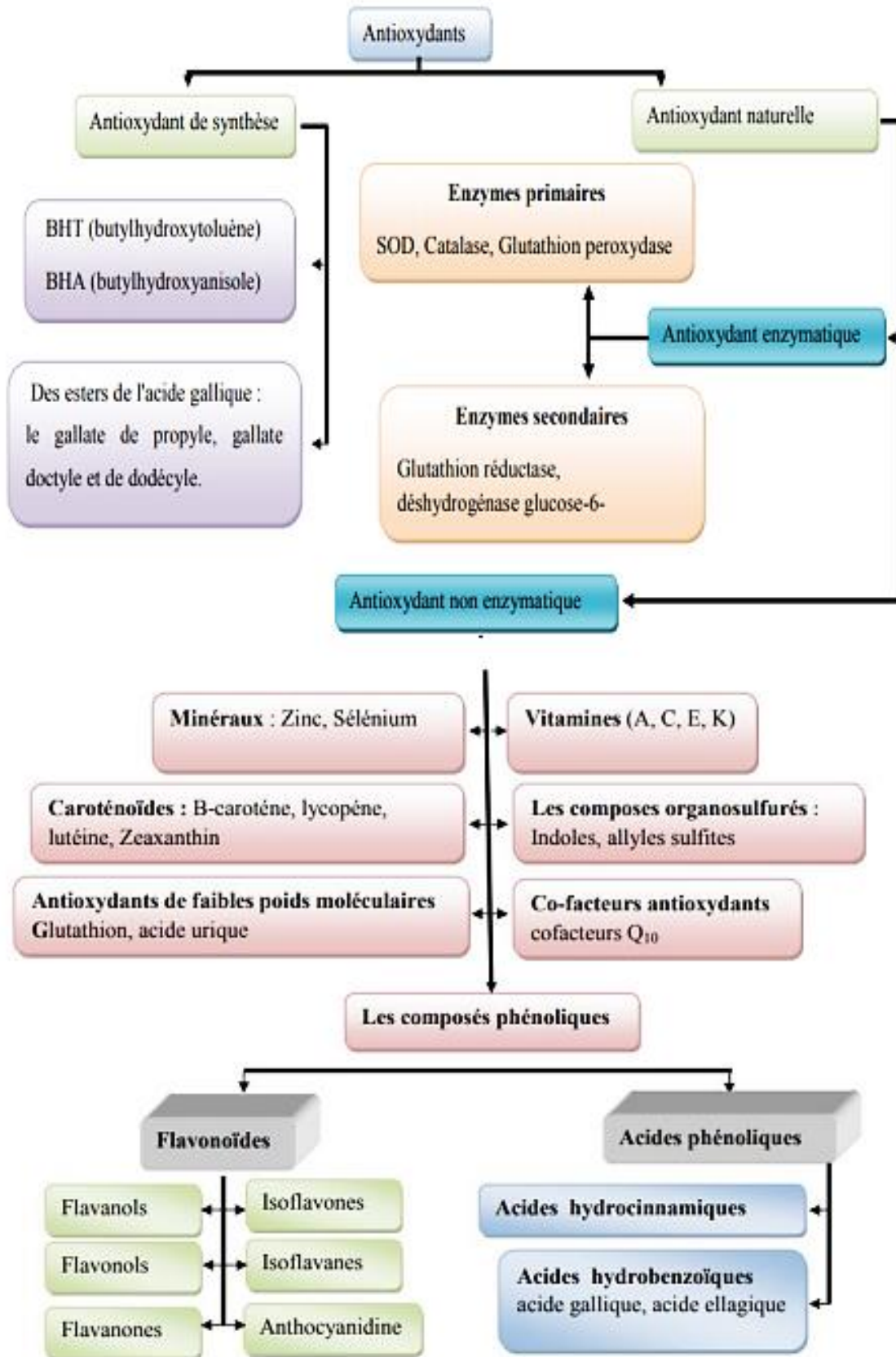


Figure I.3 : Classification des antioxydants [14].

### I.2.5 Méthodes d'évaluation :

La diversité moléculaire des antioxydants avec les différentes modalités de réactions, nous oriente à utiliser plusieurs méthodes pour évaluer l'activité antioxydante des extraits naturels [16]. Nous discutons dans cette partie les méthodes qui sont réalisés dans la partie pratique.

#### I.2.5.1 Méthode de piégeage du radical DPPH

Méthode décrite par Blois en 1958, elle permet d'évaluer la capacité des extraits à neutraliser un radical monomère stable DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle,  $C_{18}H_{12}N_5O_6$ ,  $MM=394,32 \text{ g/mol}^{-1}$ ), à température ordinaire. La stabilité est dû à La délocalisation électronique qui provoque aussi la couleur violette bien caractéristique de la solution de DPPH. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration violette, mesurable par spectrophotométrie à 517 nm [17].

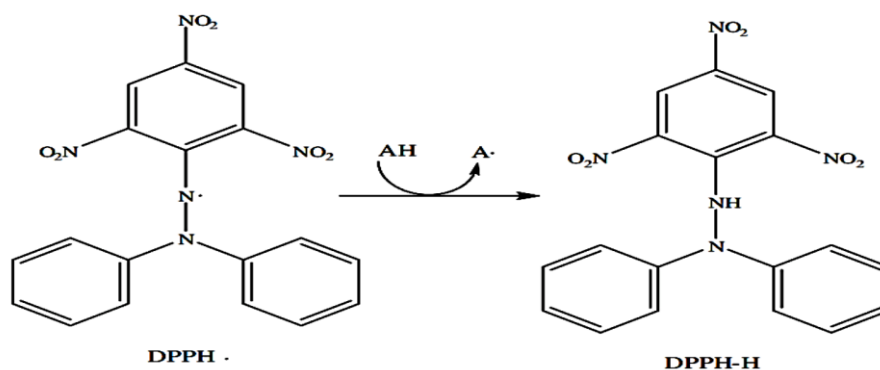


Figure I. 4 : schéma réactionnel de piégeage du radical DPPH

#### I.2.5.2 Méthode de piégeage du radical ABTS

Méthode développée par Miller en 1993. Elle permet l'évaluation de la capacité des extraits à neutraliser le radical ABTS [acide 2,2'-azidobis- (acide 3 éthylbenzothiazolin-6-sulfonique)] produit par voie chimique. La diminution de l'absorbance est suivie par spectrophotométrie dans une gamme caractéristique de 600-750 nm [18].

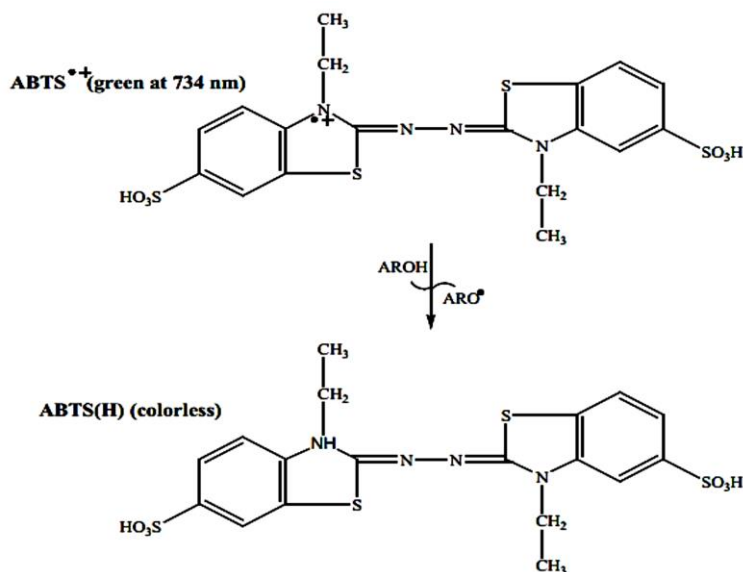


Figure I. 5 : schéma réactionnel de piégeage du radical ABTS

### I.2.5.3 la méthode de de réduction du complexe Cuivre-neocuproïne (CUPRAC)

C'est Méthode qui permet de mesurer l'absorbance du complexe  $\text{Cu}^{+2}$ -neocuproïne (2) après un contact avec l'extrait naturel. La réduction du complexe par les antioxydants induit un changement de la coloration vers le jaune, et réaction peut être évalué par spectrophotométrie a 450 nm. [20]

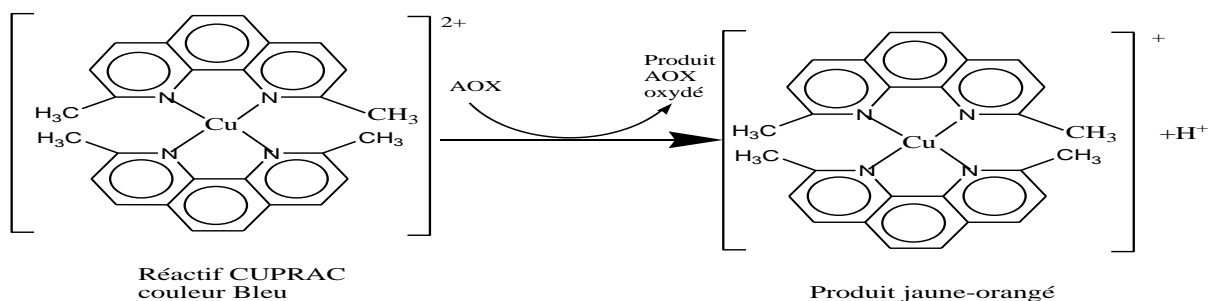
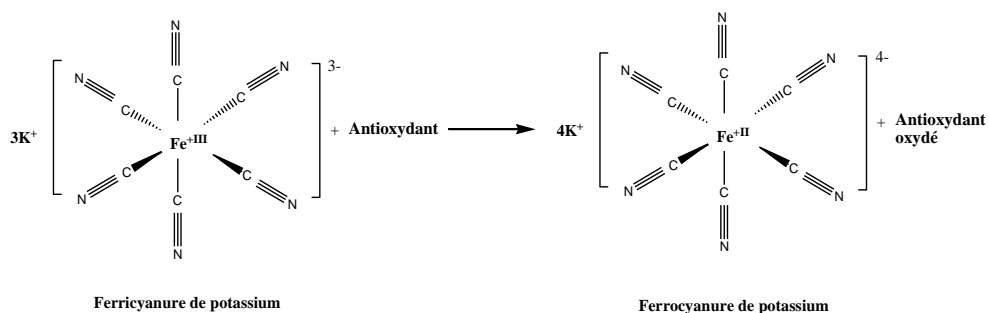


Fig. I 6 : Réduction du complexe chromogène de  $\text{Cu}^{+2}$ -Nc<sub>2</sub>

### I.2.5.4 Le pouvoir réducteur des ions de Fer

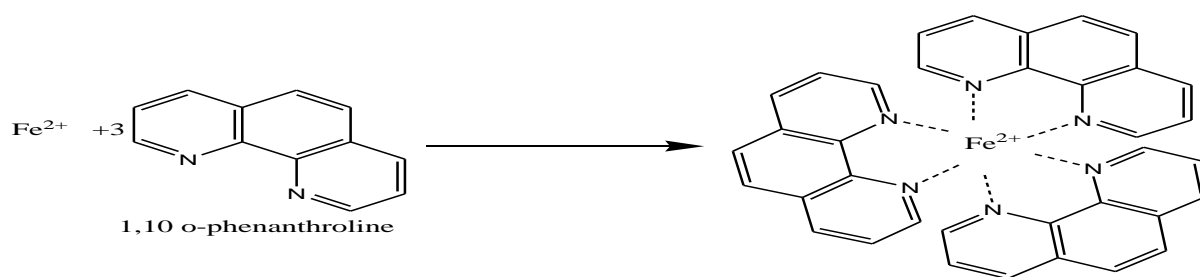
C'est une méthode basée sur la réduction des ions fer ferrique ( $\text{Fe}^{+3}$ ) de ferricyanure de potassium ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) en ions fer ferreux ( $\text{Fe}^{+2}$ ) par des composés antioxydants en formant ainsi le ferrocyanure de potassium ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ). La réaction est caractérisée par un virage de couleur vers le Blue/vert et suivi par spectrophotométrie a 700 nm.[19]



**Fig. I 7 :** Réduction du fer ferrique en fer ferreux

### I.2.5.5 L'activité de réduction du complexe $\text{Fe}^{+2}$ -Phénanthroline

Cette technique est basée sur la formation du complexe  $\text{Fe}^{+2}$ -phénanthroline rouge-orangé suite à une réaction d'oxydoréduction. Ce complexe est soluble à pH basique et peut être mesuré à une absorbance de 510 nm [21].



**Fig. I 8 :** Formation du complexe  $\text{Fe}^{+2}$ -phénanthroline.

# Chapitre 02

## Les métabolites secondaires

## II.1. Généralités

Les plantes produisent, en plus des métabolites primaires, un grand nombre de composés qui ne sont pas issus directement lors de la photosynthèse, mais résultent des réactions chimiques ultérieures. Ces composés sont appelés métabolites secondaires [16]. Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes [17]. Ils présentent des intérêts importants, en particulier, pour l'industrie pharmaceutique et cosmétique grâce à leurs propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et anti-carcinogènes ou mutagènes [18, 19]

## II.2. Classification

Les métabolites secondaires sont classés en 3 classes majeures: les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité [20]. Nous détaillons dans cette partie seulement les composés phénoliques.

### II.2.1. Les composés phénoliques

#### II.2.1.1. Généralités

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des métabolites secondaires très largement répandus dans le règne végétal. Ces composés sont présents dans toutes les parties des plantes mais avec une répartition quantitative qui varient entre les différents tissus. [21]. Ainsi, ils constituent une vaste famille de métabolites secondaires comprenant plusieurs groupes, contenant chacun quelques dizaines à plusieurs milliers de molécules différentes. Ces derniers sont des substances naturellement présentes dans les fruits, les légumes, les graines, les fleurs et aussi les herbes, dans les boissons (thé, café, jus de fruits), les céréales et les graines oléagineuses où ils contribuent à la couleur et aux propriétés sensorielles telles que l'amertume [22].

#### II.2.1.2. Propriétés biologiques

Les polyphénols prennent une importance croissante grâce à leurs propriétés et leurs effets bénéfiques sur la santé des êtres vivants végétales ou les êtres humains. Ils ont un rôle dans le contrôle de la croissance et le développement des plantes en interagissant avec les diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent le rôle permettant de lutter contre les infections causées par les champignons ou par les bactéries. D'autres sont des inhibiteurs d'enzymes et interviennent dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies. En plus, Ils constituent une importante famille d'antioxydants naturels, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériennes, antivirales, anticancéreuses, anti-allergènes et vasodilatatrices. Ils montrent des

intérêts dans l'industrie agro-alimentaire et en cosmétologie comme additifs, colorants, arômes ou agents de conservation [23, 24].

### II.2.1.3. Description chimique et classification

L'élément structural caractéristique de cette catégorie est la présence d'au moins d'un noyau benzoïque au quel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside [24]. Une classification de ces substances a été proposée par Harborne en 1980, qui permet de classer les différentes classes des polyphénols selon d'une part, le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base [25].

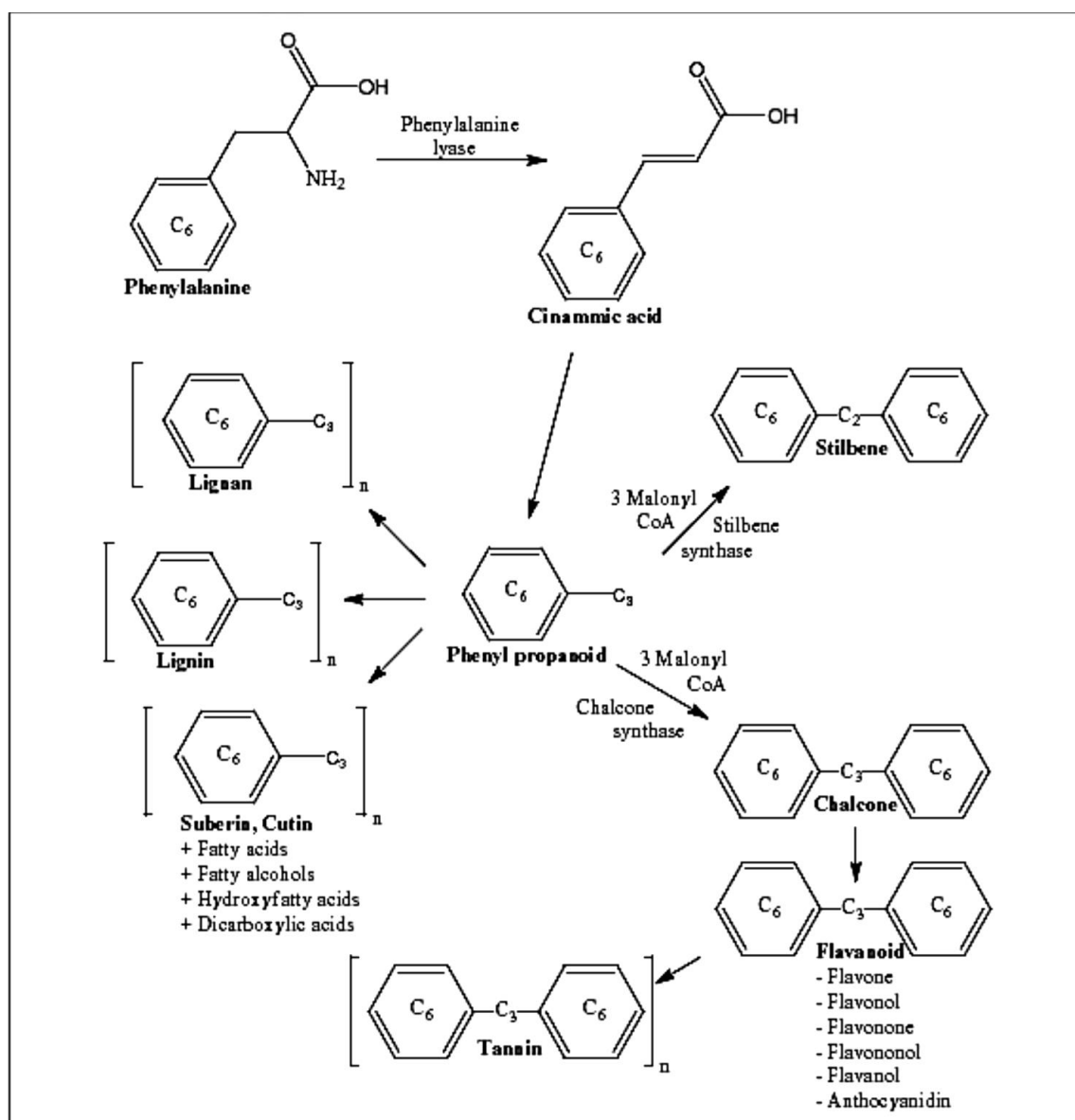


Fig. II 1 : biosynthèse de quelques types moléculaire de polyphénols

**Tab. II. 1:** Les principales classes de composants phénoliques [25].

| Squelette Carboné  | Classe                                |
|--|---------------------------------------|
| C <sub>6</sub>   | Phénols simples                       |
| C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>                                 | Acides hydroxybenzoïques              |
| C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>                                 | Acides hydroxycinnamiques, coumarines |
| C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>                                 | Naphtoquinones                        |
| C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>                 | Stilbènes                             |
| C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>                 | Flavonoïdes                           |
| (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                 | Lignanes                              |
| (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>                 | Lignines                              |
| (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub> | Tanins                                |

Nous détaillons dans la partie suivante, les flavonoïdes, la classe la plus importante dans les activités biologiques des composés phénoliques.

#### II.2.1.4. Flavonoïdes

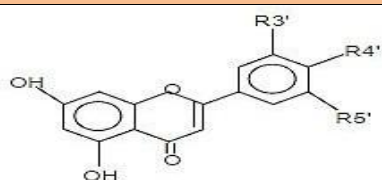
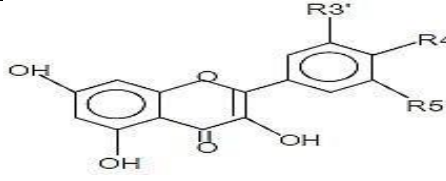
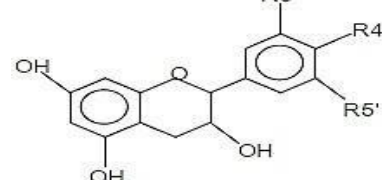
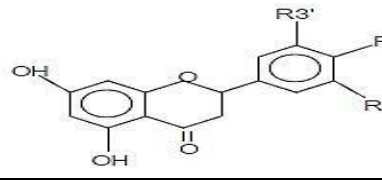
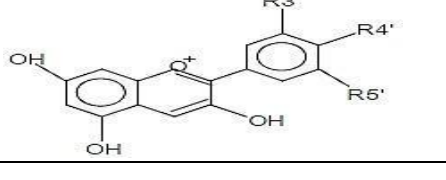
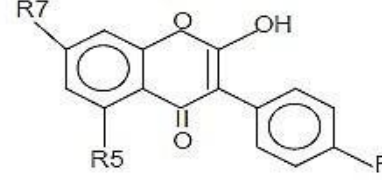
##### II.2.1.4.1. Généralité

Le terme flavonoïde, de flavus « jaune » en latin, désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols [25]. C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Elles ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres [26]. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux [27]. Actuellement, environ de 4000 composés flavoniques sont connus et ont tous le même squelette de base à 15 atomes de carbones, constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C<sub>3</sub> en formant ainsi l'hétérocycle (C) [28]. Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> [29]. En formant une structure de type diphényle propane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule [30, 31].

### II.2.1.4.2. Classification

Les flavonoïdes sont divisés en plusieurs classes : flavones, flavanols, flavonols, isoflavones, flavanones et anthocyanes [32].

**Tab. II. 2:** Principales classes des flavonoïdes avec quelques exemples [33].

| Classes         | Structureschimiques   | R3' | R4'   | R5' | Exemples      |
|-----------------|---|-----|-------|-----|---------------|
| Flavones        |    | H   | OH    | H   | Apigénine     |
|                 |   | OH  | OH    | H   | Lutéoline     |
|                 |   | OH  | OCH3  | H   | Diosmétine    |
| Flavonols       |    | H   | OH    | H   | Kaempférol    |
|                 |   | OH  | OH    | H   | Quercétine    |
|                 |   | OH  | OH    | OH  | Myrecétine    |
| Flavanols       |   | OH  | OH    | H   | Catéchine     |
| Flavanones      |  | H   | OH    | H   | Naringénine   |
|                 |   | OH  | OH    | H   | Eriodictyol   |
| Anthocyanidines |  | H   | OH    | H   | Pelargonidine |
|                 |   | OH  | OH    | H   | Cyanidine     |
|                 |   | OH  | OH    | OH  | Delphénidine  |
| Isoflavones     |  | R5  | R7    | R4' |               |
|                 |   | OH  | OH    | OH  | Genisteine    |
|                 |   | H   | O-Glu | OH  | Daidezine     |

### II.2.1.4.3. Propriétés biologiques

Les flavonoïdes présentent de nombreuses activités biologiques, Elles protègent la plante contre l'attaque des champignons et des insectes. Elles montrent des propriétés dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance [33]. En pharmacologie, elles peuvent être des

antioxydantes, anti-inflammatoires, antivirales, antiallergiques, anti-hypertensives, hypocholestérolémiantes, anticancéreuse, inhibitrices d'enzymes et préventives des maladies cardiovasculaires [34, 28].

### II.3. La famille des *Rhamnaceae*

#### II.3.1. Généralités

La famille des *Rhamnaceae* est formée d'environ 900 espèces, réparties en 45 genres plus ou moins cosmopolites mais très diversifiés dans les régions tropicales. L'aire de distribution de cette famille s'étend des régions tempérées aux régions tropicales, y compris pour quelques espèces aux régions arides [1, 2]. Les principaux genres sont *Rhamnus*, avec 150 espèces, *Phyllica*, avec 150 espèces africaines, *Zizyphus* avec 90 espèces presque exclusives des régions tropicales et chaudes, *Gouania* avec 60 espèces des régions tropicales et chaudes, *Pomaderris*, avec 55 espèces dont 50 sont endémiques d'Australie, *Ceanothus*, avec 50 espèces d'Amérique du Nord, *Colubrina*, avec 31 espèces des régions tropicales et chaudes d'Amérique. Selon la classification APG III, les *Rhamnaceae* sont des Eudicotylédones (Dicotylédones vraies) appartenant aux Eudicotylédones supérieures. La famille est divisée en trois sous-familles<sup>3</sup> : les Ziziphoides, les Rhamnoides et les Ampeloziziphoides [3,4].

#### II.3.2. Description chimique

Les métabolites secondaires identifiés chez les *Rhamnaceae* sont les saponosides, les alcaloïdes, les tannins, les dérivés de l'acide benzoïque et les acides organiques [7]. Plusieurs espèces élaborent des hétérosides hydroxyanthracéniques comme la bourdaine (*Frangula alnus*), le cascara (*Frangula purshianus*) et le nerprun (*Rhamnus cathartica*). Les *Rhamnaceae* contiennent également des flavonoïdes (*Zizyphus zizyphus*) et certaines espèces appartenant aux genres *Ceanothus*, *Rhamnus*, *Zizyphus*..., élaborent des peptides macrocycliques [1].

#### II.3.2. Propriétés médicales

Plusieurs espèces de la famille des *Rhamnaceae* ont un usage alimentaire et/ou médicinal ou ornemental. L'écorce, les feuilles et les fruits de plusieurs espèces du genre *Rhamnus* sont utilisés comme laxatifs et purgatifs notamment les écorces de bourdaine (*Frangula alnus*) et de cascara (*Frangula purshiana*)<sup>5</sup>. Le charbon de bois de bourdaine a longtemps été recherché pour préparer la poudre destinée à la fabrication des cartouches. Le fruit de nerprun (*Rhamnus cathartica*) est diurétique et laxatif [1].

# Chapitre 03

## Matériels et méthodes

### **1. Collection du matériel végétal**

La plante a été collectée dans la période d'avril 2021 de la région Oum el Bouaghi, le nord-est de l'Algérie. Elle a été identifiée par Dr. KADI Imededdine, maître de recherche à l'unité de recherche sur les plantes médicinales, centre de recherche en biotechnologie, Constantine.

### **2. Séchage et broyage**

Après la collection, la totalité de la partie aérienne (feuilles, fruits et fleurs) a été séchée dans un endroit sec à l'abri de la lumière et la chaleur pendant deux semaines. Ensuite, la partie aérienne a été broyée à l'aide d'un mixeur afin d'obtenir des particules fines. Un spécimen d'herbier a été archivé à l'Herbarium du centre de recherche en biotechnologie.

### **3. Extraction et séparation**

Pour l'extraction des principes actifs, deux types d'extraits ont été préparés, méthanolique et aqueux, pour les feuilles, les fruits et les graines. Une masse de 10 g de la matière sèche de chaque partie de la plante étudiée a été macérée dans le méthanol (100%) et l'eau distillée (100%) pendant 48 heures avec une répétition de trois fois en renouvelant le solvant. L'extrait obtenu a été filtré à l'aide du papier filtre (n°4) et séché par un Rotavapor (35°C / 130 mbar) pour l'extrait méthanolique et (35°C / 0 mbar) pour l'extrait aqueux. Schéma III. 1.

### **4. Dosage des composés phénoliques**

La teneur des polyphénols totaux a été estimée en utilisant la technique classique de Folin-Ciocalteu (FCR) en utilisant une microplaque de 96 puits [35]. Un volume de 20 µl d'extrait (1 mg / 1 ml de méthanol) a été ajouté à 100 µl de FCR dilué (1:10). Ensuite un volume de 75 µl de carbonate de sodium (7,5%) a été additionné. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 2 heures à température ambiante. L'absorbance a été déterminée à 765 nm. Un blanc a été préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (Méthanol). Parallèlement, Une courbe d'étalonnage de l'acide gallique a été préparée. Les résultats sont exprimés en µg équivalent de l'acide gallique par mg d'échantillon.

### **5. Dosage des flavonoïdes**

Le dosage des flavonoïdes a été fait selon la méthode décrite par Topçu et al., (2007) [36]. Dans une microplaque à 96 puits. Un volume de 50 µl de l'échantillon a été mélangé avec 130 µl de méthanol, 10 µl d'acétate de potassium et 10 µl de nitrate d'aluminium. Le mélange

a été ensuite maintenu à la température ambiante pendant 40 min puis une lecture d'absorbance a été réalisée à 415 nm.

Une courbe d'étalonnage de Quercétine a été préparée en parallèle. Les résultats sont exprimés en µg équivalent de Quercétine par mg d'extrait.

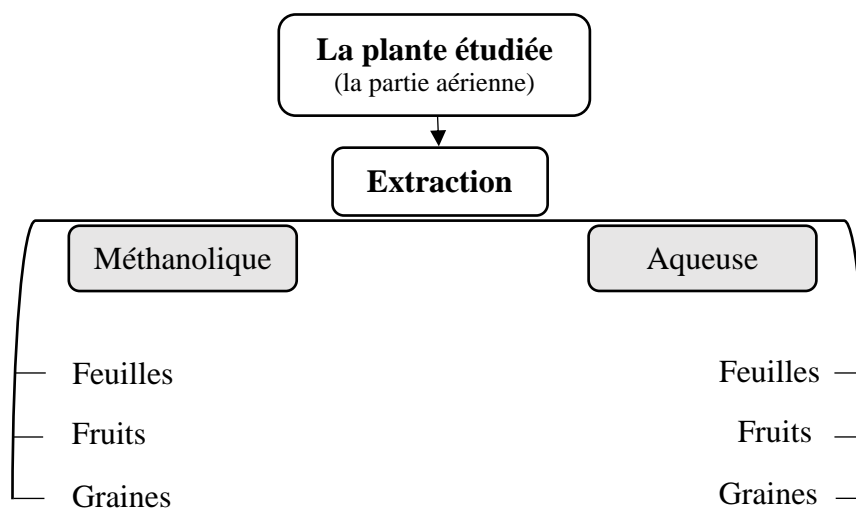


Fig. III. 1. schéma général de l'extraction et le fractionnement des extraits étudié

### 6. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits étudiés a été déterminé par cinq méthodes différentes.

#### 6.1. Piégeage du radical DPPH

L'activité antiradicalaire au DPPH est déterminée selon la méthode décrite par Blois (1958) [37]. Brièvement, sur une microplaque à 96 puits, une solution de 160 µl du DPPH• (A=0.7) a été mélangé avec 40 µl de différentes concentrations de l'extrait. Le mélange a été maintenu à une température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30 min. L'absorbance a été mesurée à 517 nm. Le BHA, le BHT et l'α-tocophérol ont été utilisés comme standards.

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

$$\% \text{ inhibition} = \frac{A(\text{control}) - A(\text{extrait})}{A(\text{control})} \times 100$$

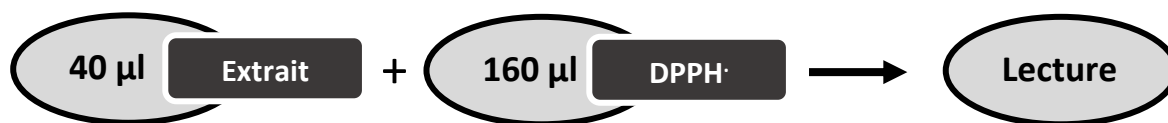


Fig III.2. Mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon

### 6.2. Piégeage du radical ABTS

L'activité du piégeage du radical ABTS a été déterminée par la méthode de Re et al., (1999) [38]. Sur une microplaque à 96 puits, un volume de 160  $\mu\text{l}$  d'ABTS  $\bullet+$  ( $A=0.7$ ) a été ajouté à 40  $\mu\text{l}$  de différentes concentrations de l'extrait. Le mélange a été maintenu à température ambiante pendant 10 min. l'absorbance a été mesurée à 734 nm. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme standards.

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

$$\% \text{ inhibition} = \frac{A(\text{control}) - A(\text{extrait})}{A(\text{control})} \times 100$$



Fig. III.3. Mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon

### 6.3. Activité de réduction du complexe $\text{Cu}^{+2}$ -Neocuproïne (CUPRAC)

L'activité CUPRAC a été déterminée selon la méthode décrite par d'Apak et al., (2004) [39]. Dans une microplaque, un mélange réactionnel contenant 60  $\mu\text{l}$  d'acétate d'ammonium, 50  $\mu\text{l}$  de chlorure de cuivre, 50  $\mu\text{l}$  de néocuproïne et 40  $\mu\text{l}$  d'extrait en différentes concentrations a été construit. Après une heure d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 450 nm. Le BHA et le BHT sont utilisés comme standards. Les résultats ont été calculés à titre de  $A_{0,5}$  ( $\mu\text{g/ml}$ )

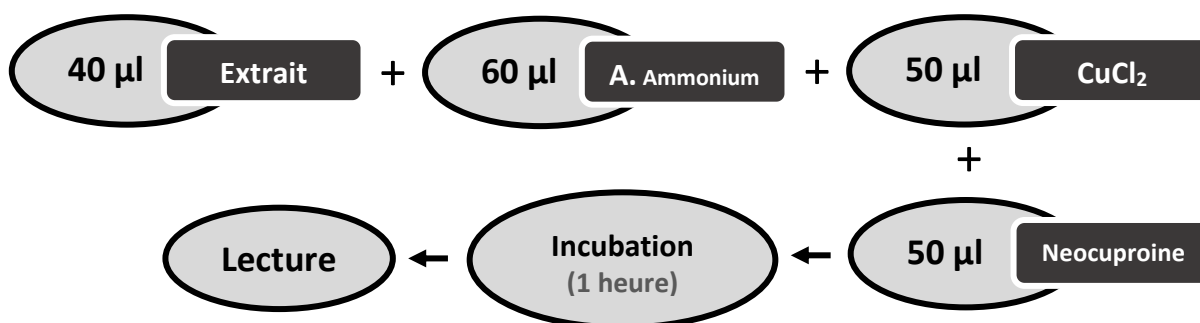


Fig. III. 4. Mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon

#### 6.4. Activité du pouvoir réducteur (FRAP)

Le pouvoir réducteur des extraits a été déterminé selon la méthode d'Oyaizu (1986) [40]. 10  $\mu$ l de l'extrait a été additionné à 40  $\mu$ l d'une solution tampon phosphate (pH 6,6) et à 50  $\mu$ l d'une solution de ferricyanide de potassium (1%). L'ensemble a été incubé à l'étuve à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 50  $\mu$ l d'acide tri-chloroacétique (10%) a été ajouté pour stopper la réaction. Enfin, un volume de 40  $\mu$ l d'eau distillée et 10  $\mu$ l d'une solution de chlorure de fer anhydre (0,1%) ont été ajoutés. L'absorbance a été mesurée à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par le méthanol. L'acide ascorbique et l' $\alpha$ -tocophérol ont été utilisés comme standards. Les résultats ont été calculés à titre de  $A_{0,50}$ .

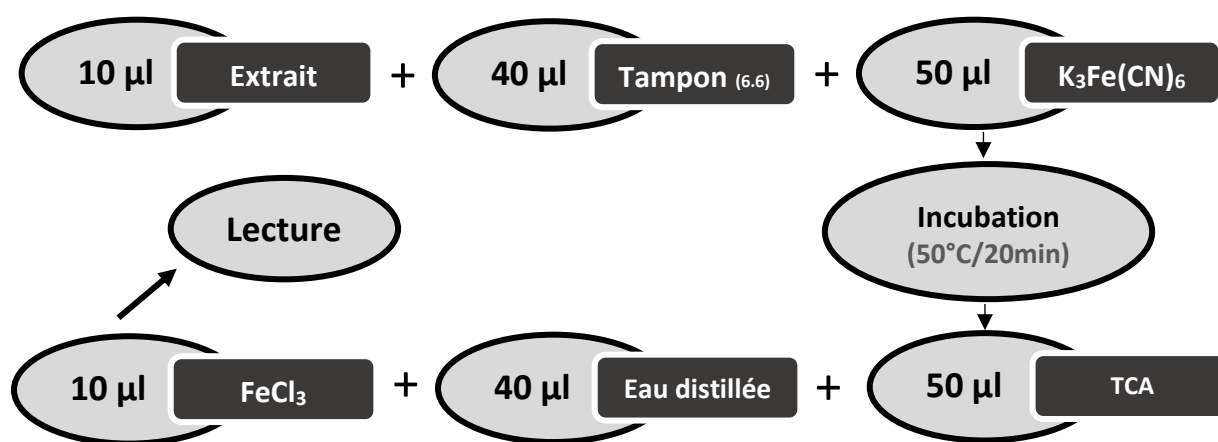


Fig. III. 5. Mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon

#### 6.5. Activité de réduction par formation du complexe Fe<sup>+2</sup>-Phénanthroline

L'activité de phénanthroline a été déterminée par la méthode décrite par Szydłowska-Czerniak et al., (2008) [41]. 10  $\mu$ l de l'extrait a été mélangé avec 50  $\mu$ l de chlorure de fer anhydre (0,2%), 30  $\mu$ l de phénanthroline (0,5%) et 110  $\mu$ l de méthanol. Le mélange obtenu a été incubé dans l'étuve à 30°C pendant 20 min et l'absorbance a été mesurée à 510 nm. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme standards. Les résultats ont été calculés à titre de  $A_{0,50}$  ( $\mu$ g/ml)

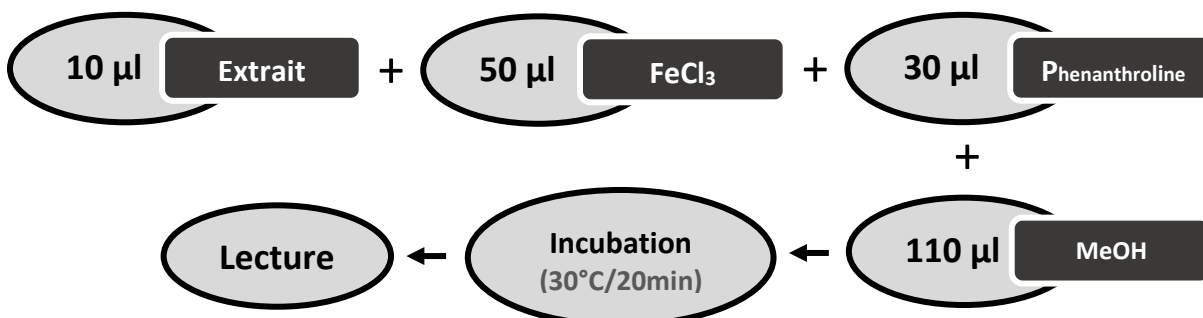


Fig. III. 6. Mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon

**7. Activité inhibitrice des enzymes**

**7.1. Activité antidiabétique via l'inhibition de l'α-amylase**

L'activité inhibitrice de l'alpha -amylase a été déterminée selon la méthode décrite par Zengin et al., (2014) [42]. 25 µl d'extrait a été mélangé avec 50 µl d'une solution d'α-amylase (1U), puis incubé pendant 10 min à 37°C. Ensuite, 50 µl d'amidon (0,1%) a été additionné. Le mélange est incubé une autre fois pendant 10 minutes à 37°C. Après incubation, 25 µl d'acide hypochlorique (1M) et 100 µl d'iodure de potassium iode ont été ajoutés. La lecture de l'absorbance a été fait à 630 nm. L'acarbose a été utilisé comme standard.

Le pourcentage d'inhibition de l'α-amylase a été calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = 1 - \frac{(Ac - Ae) - (As - Ab)}{(Ac - Ae)}$$

- Ac : Absorbance [Amidon+IKI+HCl+MeOH+Tampon]
- Ae : Absorbance [Enzyme+Amidon+IKI+HCL+ MeOH]
- As : Absorbance [Enzyme+Extrait+Amidon+IKI+HCl]
- Ab : Absorbance [Extrait+IKI+ tampon]

**Tableau III. 1.** l'organisation de microplaque dans le test de α-amylase

|   |                 |   |   |                       |                 |   |    |                       |            |    |    |                       |
|---|-----------------|---|---|-----------------------|-----------------|---|----|-----------------------|------------|----|----|-----------------------|
|   | 1               | 2 | 3 | 4                     | 5               | 6 | 7  | 8                     | 9          | 10 | 11 | 12                    |
| A | Extrait 01 (As) |   |   | Blanc extrait 01 (Ab) | Extrait 02 (As) |   |    | Blanc extrait 02 (Ab) | Extrait 03 |    |    | Blanc extrait 03 (Ab) |
| B |                 |   |   |                       |                 |   |    |                       |            |    |    |                       |
| C |                 |   |   |                       |                 |   |    |                       |            |    |    |                       |
| D |                 |   |   |                       |                 |   |    |                       |            |    |    |                       |
| E |                 |   |   |                       |                 |   |    |                       |            |    |    |                       |
| F |                 |   |   |                       |                 |   |    |                       |            |    |    |                       |
| G |                 |   |   |                       |                 |   |    |                       |            |    |    |                       |
| H | Ae              |   |   |                       |                 |   | Ac |                       |            |    |    |                       |

**Tableau III. 2.** mode de remplissage de microplaque dans le test de α-amylase

| Extraits                   | Blanc d'extrait | Ae          | Ac          |
|----------------------------|-----------------|-------------|-------------|
| 25µl extrait               | 25µl extrait    | 25µl MeOH   | 25µl MeOH   |
| 50µl Enzyme                | 50µl tampon     | 50µl Enzyme | 50µl Tampon |
| Incubation à 37°C – 10 min |                 |             |             |
| 50µl Amidon                | 50µl tampon     | 50µl amidon | 50µl amidon |
| Incubation à 37°C – 10 min |                 |             |             |
| 25µl HCL                   | 25µl tampon     | 25µl HCL    | 25µl HCL    |
| 100 IKI                    | 100 IKI         | 100 IKI     | 100I        |

### 7.2. Activité anti-Alzheimer via l'inhibition de l'acétylcholinestérase

L'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE) a été déterminée par la méthode développée par Ellman et al., (1961) [43]. Brièvement, 150 µl de tampon phosphate de sodium à (pH 8) (100 mM) a été ajouté à 10 µl d'extrait et à 20 µl d'enzyme AChE (6,85 x10<sup>-3</sup> U). Le mélange a été incubé pendant 15 minutes à 25°C, puis 10 µl de DTNB (acide 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoïque)) (0,5 mM) ont été ajoutés. Ensuite, la réaction a été initiée par l'addition de 10 µl acetylthiocholine iodide (0.71 mM). L'absorbance a été mesurée à 412 nm. La galantamine a été utilisée comme standard.

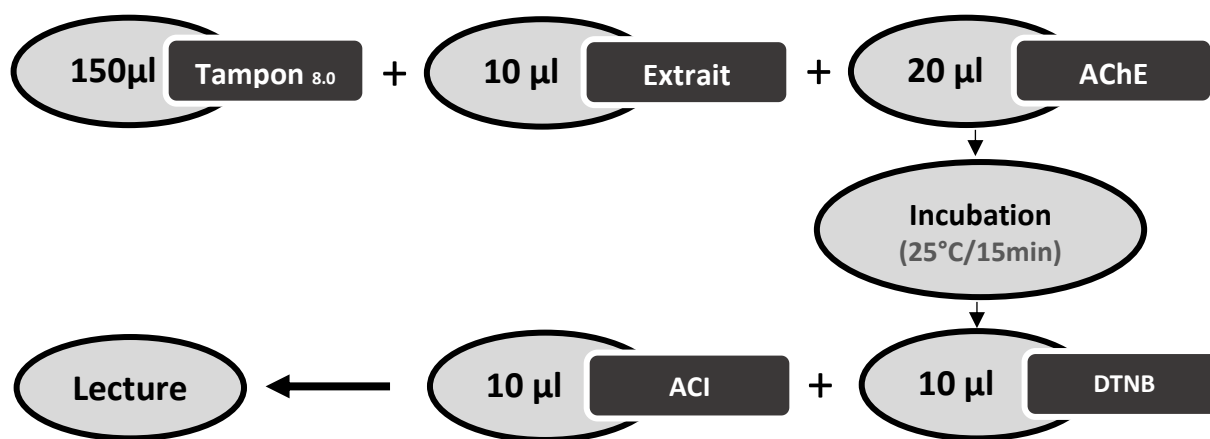


Fig. III. 7. Mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon

### 8. Activité protectrice vis-à-vis les rayonnements solaires

L'activité protectrice vis-à-vis la lumière solaire a été évaluée selon la méthode décrite par Mansur et al. (1986) [44]. L'absorbance de 200 µl de chaque échantillon (2mg/ml) a été mesurée dans l'intervalle de 290 à 320 nm chaque 5 nm (UV-B), et la valeur du SPF est calculé par l'application de l'équation mathématique de Mansur.

$$\text{SPF spectrophotométrique} = \text{CF} \times \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda) \times \text{Abs}(\lambda)$$

- EE: spectre d'effet thermique
- I : spectre d'intensité solaire
- Abs: absorbance de l'échantillon
- CF: facteur de correction (= 10)

**Tableau III. 3.** Fonction normale de produit utilisée dans le calcul de la SPF

| Longueur d'onde $\lambda$ (nm) | EE ( $\lambda$ )x I( $\lambda$ ) (Normes) |
|--------------------------------|---|
| 290                            | 0,0150                                    |
| 295                            | 0,0817                                    |
| 300                            | 0,2874                                    |
| 305                            | 0,3278                                    |
| 310                            | 0,1864                                    |
| 315                            | 0,0837                                    |
| 320                            | 0,0180                                    |
| Total                          | 1   |

### 9. Etude statistique

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD avec trois répétition pour chaque essai. Les valeurs de  $IC_{50}$  et de  $A_{0,5}$  sont calculées par la méthode de régression linéaire. Les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification sont faites par ANOVA a un seul facteur contrôlé suivi par un test post-hoc de tuckey à l'aide du logiciel Graphpad Prism 7.0. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05.

# Chapitre 04

## Résultats et discussion

1. Rendements d'extraction

Les rendements d'extraction des extraits méthanoliques et aqueux, sont organisés dans le tableau IV.1.

Tableau IV. 1 Rendement d'extraction des parties étudiés

|                 | Extraits méthanoliques | Extraits aqueux |
|-----------------|------------------------|-----------------|
| <b>Feuilles</b> | 23.18%                 | 21.08%          |
| <b>Fruits</b>   | 19.44%                 | 22.81%          |
| <b>Graines</b>  | 15.57%                 | 17.39%          |

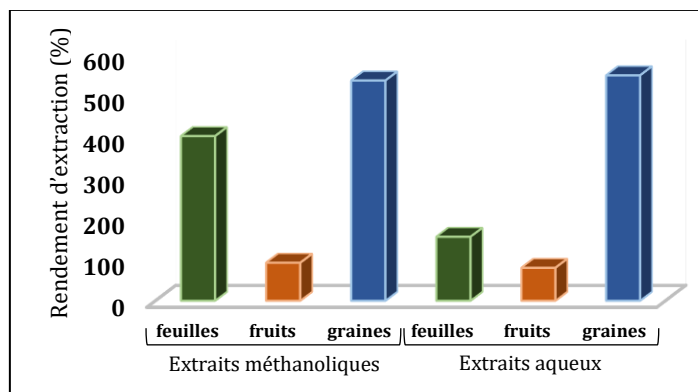


Fig. IV. 1. Rendement d'extraction des parties étudiées

2. Dosage des phénols totaux et flavonoïdes

Tableau IV. 2. teneur en Phénols totaux et flavonoïdes

|        | Extraits | µg EAG/ml/mg extrait | µg EQ/ml mg extrait |
|--------|----------|----------------------|---------------------|
| MeOH   | Feuilles | 402.23±18.00         | 135.17±09.11        |
|        | Fruits   | 092.82±00.00         | 027.19±06.73        |
|        | graines  | 537.58±20.00         | 174.42±06.08        |
| Aqueux | Feuilles | 156.33±05.49         | 041.05±03.92        |
|        | Fruits   | 080.41±00.21         | 026.18±01.57        |
|        | graines  | 550.07±23.07         | 090.11±10.08        |

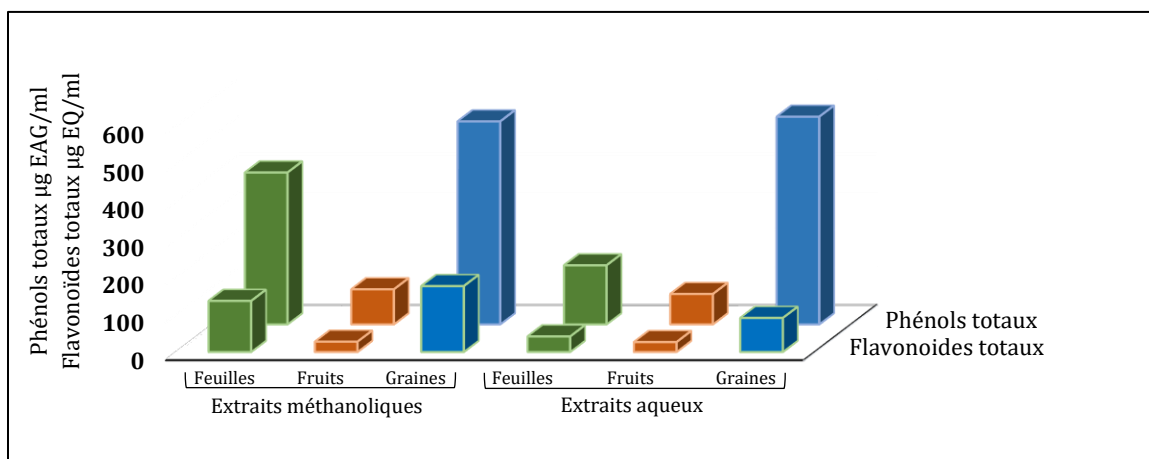


Fig. IV. 2. Teneur en Phénols et flavonoïdes totaux des parties étudiées

Les résultats obtenus ont montré des rendements d'extraction importants notamment pour l'extrait méthanolique des feuilles et l'aqueux des fruits, qui dépassent 20% du poids de la matière sèche, ce qui reflète la richesse moléculaire des trois parties étudiées.

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique ( $y=0.0034x+0.1044$ ,  $R^2=0.9972$ ) nous a permis de déterminer la teneur en composés phénoliques pour chaque extrait étudié. Les résultats sont exprimés en microgrammes équivalent en acide gallique par milligramme d'extrait et par millilitre (Tab. IV. 2). Les valeurs obtenues ont montré une richesse en phénols totaux notamment pour les extraits méthanoliques et aqueux des graines et l'extrait méthanolique des feuilles, tandis que les extraits des fruits, que ce soit méthanoliques ou aqueux, ont donné des valeurs faibles.

La courbe d'étalonnage de Quercétine ( $y= 0.0048x$ ,  $R^2=0.997$ ) nous a permis de déterminer la teneur en flavonoïdes totaux pour chaque extrait étudié. Les résultats sont exprimés en microgrammes équivalent en Quercétine par milligramme d'extrait et par millilitre (Tab. IV. 2). Les valeurs obtenues ont montré que l'extrait méthanolique des feuilles et graines ont présenté des valeurs intéressantes avec l'extrait aqueux des graines, tandis que les autres extraits ont présenté des quantités modérées à faibles.

Plusieurs études ont montré que les composés phénoliques notamment les flavonoïdes sont responsables aux activités biologiques des extraits naturels [45, 46], ce que l'on va confirmer durant la partie qui traite les activités biologiques, antioxydantes et enzymatiques.

## 3. Activité antioxydante

## 3.1. Activité de piégeage du radical libre DPPH

Les pourcentages d'inhibition du radical DPPH sont organisés dans le tableau IV. 3.

Tableau IV. 3. Pourcentages d'inhibition du radical DPPH

| Parties étudiées     | 12.5 µg     | 25 µg       | 50 µg      | 100 µg     | 200 µg     | 400 µg     | 800 µg     | 1600 µg    | IC <sub>50</sub> (µg/ml) |
|----------------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------------------|
| <b>MeOH</b>          |             |             |            |            |            |            |            |            |                          |
| <b>Feuilles</b>      | 06,91±1.66  | 16,88±1.66  | 26,86±1.66 | 51,24±1.92 | 63,98±2.54 | 82,82±0.96 | 85,76±1.10 | Nt         | <b>92.86±2.3</b>         |
| <b>fruits</b>        | 08,02±0.96  | 15,77±0.96  | 19,76±0.77 | 27,13±2.49 | 39,60±2.54 | 48,47±1.66 | 62,32±2.54 | Nt         | <b>429.6±9.0</b>         |
| <b>graines</b>       | Nt          | 16,88±0.00  | 22,15±1.51 | 24,20±0.93 | 25,30±1.50 | 30,74±1.34 | 46,47±0.29 | 65,37±1.27 | <b>1021.8±18</b>         |
| <b>Aqueux</b>        |             |             |            |            |            |            |            |            |                          |
| <b>Feuilles</b>      | 14,52±1.38  | 26,21±1.15  | 48,59±1.63 | 80,61±1.69 | 85,45±0.72 | 85,26±0.35 | 86,25±0.20 | Nt         | <b>55.83±1.0</b>         |
| <b>fruits</b>        | 01,84±0.09  | 10,34±2.10  | 16,18±0.12 | 26,15±2.65 | 35,05±0.60 | 59,15±0.69 | 80,67±0.40 | Nt         | <b>322.0±4.7</b>         |
| <b>graines</b>       | Nt          | 1,64±0.10   | 05,76±0.87 | 10,07±0.30 | 28,07±0.20 | 38,23±1.99 | 48,86±1.15 | 58,16±1.99 | <b>922.1±10</b>          |
| <b>Standards</b>     |             |             |            |            |            |            |            |            |                          |
| <b>BHA*</b>          | 76,55± 0,48 | 79,89± 0,26 | 81,73±0,10 | 84,18±0,10 | 87,13±0,17 | 89,36±0,19 | 90,14±0,00 | Nt         | <b>006.14±0</b>          |
| <b>BHT*</b>          | 49,09± 0,76 | 72,63± 2,06 | 88,73±0,89 | 94,00±0,31 | 94,97±0,08 | 95,38±0,41 | 95,02±0,23 | Nt         | <b>012.99±0</b>          |
| <b>α-tocophérol*</b> | 37,21±1,82  | 81,53±1,51  | 89,23±0,12 | 89,38±0,19 | 89,45±0,22 | 89,99±0,23 | 89,52±0,33 | Nt         | <b>013±5,17</b>          |

• Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne ± SD des trois répétitions pour chaque essai

• (\*) les standards : molécules de références

• BHA : hydrox-yanisole butylé

• BHT : hydroxy-toluene butylé

• Nt : non testée

## 3.2. Activité de piégeage du radical libre ABTS

Les pourcentages d'inhibition du radical ABTS sont organisés dans le tableau IV. 4.

**Tableau IV. 4.** Pourcentages d'inhibition du radical ABTS

| Parties étudiées | 12.5 µg    | 25 µg      | 50 µg      | 100 µg     | 200 µg     | 400 µg     | 800 µg     | 1600 µg    | IC <sub>50</sub> (µg/ml) |
|------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------------------|
| <b>MeOH</b>      |            |            |            |            |            |            |            |            |                          |
| <b>Feuilles</b>  | 35,38±0.00 | 52,33±0.47 | 80,95±2.56 | 86,97±0.19 | 88,48±0.19 | 92,68±0.09 | 93,38±0.16 | Nt         | <b>24.03±0.5</b>         |
| <b>fruits</b>    | 07,49±0.49 | 14,49±2.43 | 22,35±2.10 | 53,04±1.62 | 53,04±0.19 | 67,15±0.93 | 76,41±2.19 | Nt         | <b>181.8±2.2</b>         |
| <b>graines</b>   | Nt         | 07,16±1.49 | 13,79±0.89 | 24,18±0.97 | 29,67±0.81 | 46,42±1.41 | 51,32±0.99 | 67,47±2.59 | <b>678.2±6.1</b>         |
| <b>Aqueux</b>    |            |            |            |            |            |            |            |            |                          |
| <b>Feuilles</b>  | 34,09±1.95 | 46,07±1.49 | 77,05±0.18 | 89,84±0.26 | 91,36±0.26 | 92,27±0.15 | 93,83±0.18 | Nt         | <b>27.09±0.1</b>         |
| <b>fruits</b>    | 08,46±1.66 | 16,19±1.76 | 23,07±1.26 | 34,04±1.86 | 64,47±1.49 | 90,60±0.26 | 91,91±0.23 | Nt         | <b>150.6±4.7</b>         |
| <b>graines</b>   | Nt         | 17,30±1.81 | 27,26±0.99 | 39,60±1.47 | 60,42±0.69 | 83,22±1.07 | 87,11±0.76 | 88,73±0.61 | <b>151.1±4.0</b>         |
| <b>BHA*</b>      | 92.83±1,42 | 94.68±0,42 | 94.95±0,90 | 95.32±0,25 | 95.59±0,47 | 95.83±0,15 | 95.86±0,10 | Nt         | <b>1.81±0.10</b>         |
| <b>BHT*</b>      | 69.21±0,40 | 78.23±1,34 | 88.12±1,28 | 88.76±3,07 | 90.85±1,74 | 90.95±0,51 | 96.68±0,39 | Nt         | <b>1.29±0.30</b>         |

- Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne ± SD des trois répétitions pour chaque essai
- (\*) les standards : molécules de références
- BHA : hydrox-yanisole butylé
- BHT : hydroxy-toluene butylé
- Nt : non testée

Tableau IV. 5. tableau récapitulatif des valeurs IC<sub>50</sub>

|           | Extrait      | DPPH      | ABTS      |
|-----------|--------------|-----------|-----------|
| MeOH      | Feuilles     | 92.86±2.3 | 24.03±0.5 |
|           | Fruits       | 429.6±9.0 | 181.8±2.2 |
|           | Graines      | 1021.8±18 | 678.2±6.1 |
| Aqueux    | Feuilles     | 55.83±1.0 | 27.09±0.1 |
|           | Fruits       | 322.0±4.7 | 150.6±4.7 |
|           | Graines      | 922.1±10  | 151.1±4.0 |
| Standards | BHA          | 006.14±0  | 1.81±0.10 |
|           | BHT          | 012.99±0  | 1.29±0.30 |
|           | α-tocopherol | 013±5,17  | /         |

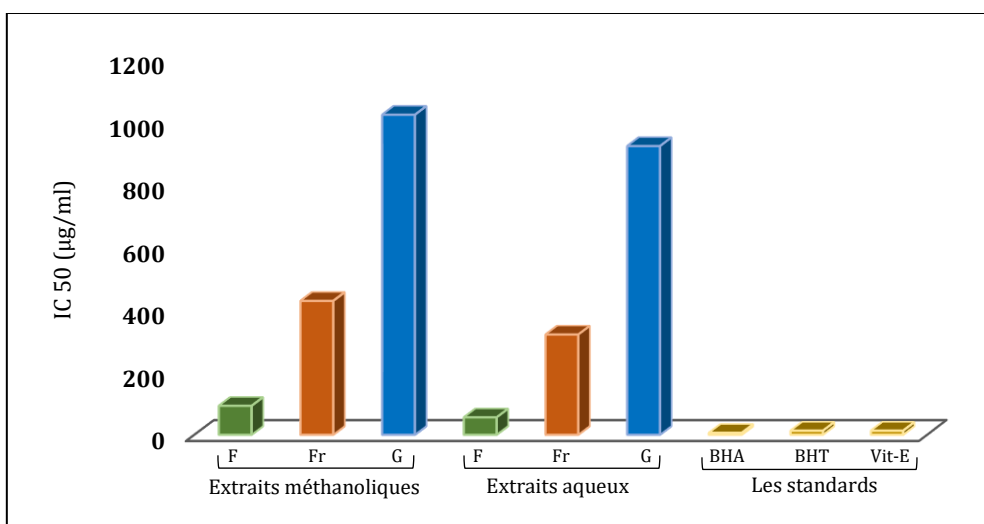


Fig. IV. 3. Piégeage du radical DPPH par les extraits étudiés

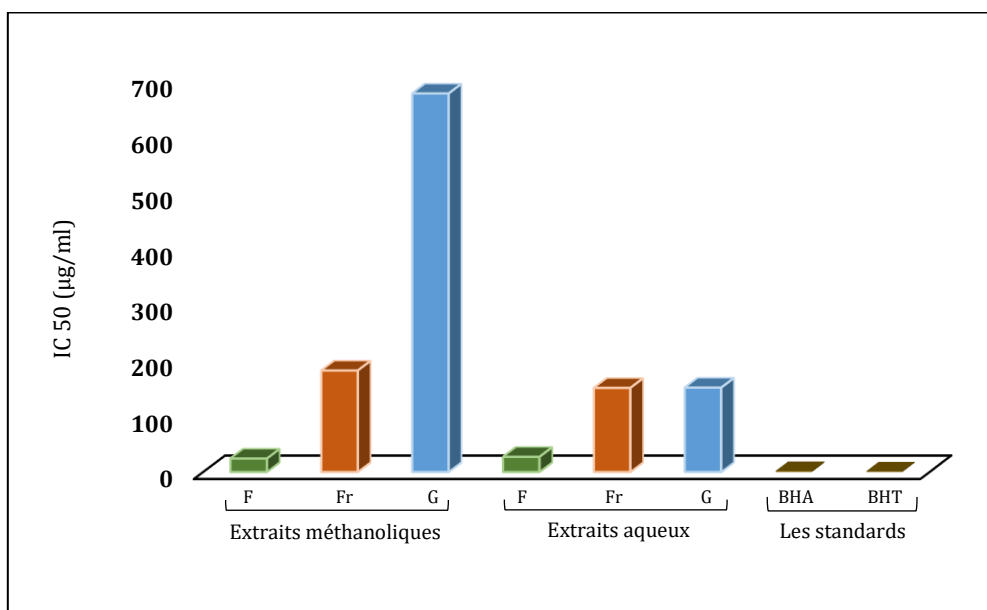


Fig. IV. 4. Piégeage du radical ABTS par les extraits étudiés

Plusieurs études ont montré l'intervention du stress oxydatif dans l'apparition des maladies comme le diabète, le cancer, les maladies cardiovasculaires et les maladies neurologiques. Les chercheurs ont orienté les vues vers la recherche des molécules antioxydantes de premier degré afin de lutter contre le stress oxydatif, et par conséquent prévenir l'apparition de ce genre de maladies, et d'un autre côté pour remplacer les antioxydants de synthèse chimiques, utilisés en agroalimentaire et en cosmétique, qui présentent dans la majorité des cas des effets néfastes et indésirables sur la matière vivante.

Pour l'évaluation *in vitro*, les tests de piégeage des radicaux comme le DPPH et l'ABTS sont largement utilisés pour évaluer l'activité antioxydante des extraits naturels. Les résultats sont exprimés en terme d'IC<sub>50</sub> (µg/ml) (Tab. IV. 5). Les valeurs obtenues ont montré que les extraits méthanoliques des feuilles ont présenté des activités intéressantes en comparaison avec les autres extraits. Cette activité est apparue plus particulièrement dans le piégeage du radical ABTS que le DPPH. Les extraits aqueux et méthanoliques des fruits et les graines ont donné des valeurs d'IC<sub>50</sub> faibles à modérées. Les standards utilisés BHA, BHT et  $\alpha$ -tocophérol ont gardé le meilleur effet.

Ce pouvoir anti radicalaire est attribué aux teneurs élevées, des extraits étudiés, en composés phénoliques, et en flavonoïdes. Le radical ABTS est plus apte à être neutraliser que le DPPH. Ça peut être dû à la stéréochimie de la molécule qui est plane, alors que la molécule de DPPH est complexe ce qui gêne les protons d'hydrogènes à la neutraliser. D'un autre côté, l'activité inhibitrice du radical DPPH n'est pas dépendante du contenu total en polyphénols mais aux polyphénols qui ont des structures chimiques spécifiques [47]. La haute sélectivité de certains types de polyphénols au DPPH est un facteur déterminant, car il ne réagit qu'avec les flavonoïdes contenant des groupes hydroxyles dans le cycle B [48], ainsi que les acides aromatiques comportant plus d'un groupe hydroxyle [49].

Des travaux antérieurs ont montré l'activité anti radicalaire des extraits de plantes de la même famille de la plante étudiée particulièrement ceux de Cheurfa et al. (2020) [53], et Bekkar et al. (2021) [54].

## 3.3. Activité de réduction du complexe cuivre-Neocuproïne (CUPRAC)

Les valeurs d'absorbance dans la méthode CUPRAC sont organisées dans le tableau IV. 6.

**Tableau IV. 6.** les absorbances des différents extraits dans la méthode CUPRAC

| Parties étudiées | 12.5 µg    | 25 µg      | 50 µg      | 100 µg     | 200 µg     | 400 µg     | 800 µg     | 1600 µg    | A <sub>0.5</sub> (µg/ml) |
|------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------------------|
| <b>MeOH</b>      |            |            |            |            |            |            |            |            |                          |
| <b>Feuilles</b>  | 00,33±0.02 | 00,46±0.04 | 00,72±0.03 | 01,28±0.02 | 01,96±0.02 | 02,80±0.18 | 03,72±0.10 | Nt         | <b>28,85±2.3</b>         |
| <b>fruits</b>    | 00,14±0.00 | 00,16±0.01 | 00,21±0.01 | 00,30±0.01 | 00,47±0.01 | 00,81±0.04 | 01,37±0.06 | Nt         | <b>288,4±1.0</b>         |
| <b>graines</b>   | Nt         | 00,16±0.00 | 00,21±0.01 | 0,26±0.01  | 00,37±0.01 | 00,81±0.02 | 01,05±0.03 | 01,75±0.05 | <b>222,8±1.1</b>         |
| <b>Aqueux</b>    |            |            |            |            |            |            |            |            |                          |
| <b>Feuilles</b>  | 00,17±0.01 | 00,23±0.00 | 00,33±0.02 | 00,55±0.18 | 00,77±0.02 | 01,33±0.02 | 02,44±00.0 | Nt         | <b>91,71±0.0</b>         |
| <b>fruits</b>    | 00,12±0.01 | 00,13±0.01 | 00,13±0.00 | 00,17±0.00 | 00,26±0.01 | 00,45±0.01 | 00,75±0.03 | Nt         | <b>484,3±11</b>          |
| <b>graines</b>   | Nt         | 00,13±0.00 | 00,15±0.00 | 00,24±0.01 | 00,38±0.02 | 00,65±0.02 | 01,34±0.61 | 02,07±0.40 | <b>259,5±14</b>          |
| <b>BHA*</b>      | 1,12±0,05  | 01,95±0,31 | 03,14±0,46 | 03,58±0,42 | 03,35±0,20 | 03,77±0,19 | 03,92±0,13 | Nt         | <b>05,35±0,7</b>         |
| <b>BHT*</b>      | 1,41±0,03  | 02,22±0,05 | 02,42±0,02 | 02,50±0,01 | 02,56±0,05 | 02,86±0,07 | 03,38±0,13 | Nt         | <b>1,29±0,30</b>         |

- Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne ± SD des trois répétitions pour chaque essai
- (\*) les standards : molécules de références
- BHA : hydrox-yanisole butylé
- BHT : hydroxy-toluene butylé
- Nt : non testée

## 3.4. Activité de pouvoir réducteur (FRAP)

Les valeurs d'absorbance dans la méthode FRAP sont organisées dans le tableau IV. 7.

**Tableau IV. 7.** les absorbances des différents extraits dans la méthode FRAP

| Parties étudiées     | 3.125 µg   | 6.25 µg    | 12.5 µg    | 25 µg      | 50 µg      | 100 µg     | 200 µg     | 400 µg     | A <sub>0.5</sub> (µg/ml) |
|----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------------------|
| <b>MeOH</b>          |            |            |            |            |            |            |            |            |                          |
| <b>Feuilles</b>      | 00,08±0.00 | 00,10±0.02 | 00,16±0.06 | 00,32±0.07 | 00,50±0.04 | 00,82±0.05 | 00,95±0.01 | Nt         | <b>50.60±2.5</b>         |
| <b>fruits</b>        | 00,06±0.00 | 00,12±0.01 | 00,19±0.00 | 00,28±0.07 | 00,36±0.01 | 00,58±0.02 | 00,74±0.01 | Nt         | <b>83.16±3.2</b>         |
| <b>graines</b>       | Nt         | 00,10±0.01 | 00,14±0.00 | 00,19±0.05 | 00,32±0.03 | 00,33±0.02 | 00,36±0.03 | 00,55±0.02 | <b>334.7±0.4</b>         |
| <b>Aqueux</b>        |            |            |            |            |            |            |            |            |                          |
| <b>Feuilles</b>      | 00,09±0.03 | 00,09±0.02 | 00,12±0.07 | 00,23±0.09 | 00,25±0.03 | 00,44±0.03 | 00,58±0.24 | Nt         | <b>150.5±1.4</b>         |
| <b>fruits</b>        | 00,06±0.01 | 00,10±0.00 | 00,13±0.01 | 00,20±0.00 | 00,34±0.00 | 00,47±0.03 | 00,72±0.03 | Nt         | <b>112.3±1.7</b>         |
| <b>graines</b>       | Nt         | 00,07±0.01 | 00,10±0.03 | 00,15±0.05 | 00,21±0.05 | 00,34±0.09 | 00,40±0.09 | 00,54±0.02 | <b>327.9±2.5</b>         |
| <b>A-ascorbique*</b> | 0.35±0.05  | 0.46±0.03  | 0.84±0.12  | 0.93±0.30  | 1.18±0.34  | 1.37±0.20  | 1.44±0.21  | Nt         | <b>06.77±1.1</b>         |
| <b>α-tocophérol*</b> | 0.11±0.00  | 0.16±0.00  | 0.21±0.03  | 0.35±0.03  | 0.73±0.03  | 1.37±0.08  | 1.81±0.09  | Nt         | <b>34.93±2.3</b>         |

- Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne ± SD des trois répétitions pour chaque essai
- (\*) les standards : molécules de références
- Nt : non testée

3.5. Activité de réduction du complexe Fe<sup>+2</sup>-Phenanthroline

Les valeurs d'absorbance dans la méthode de phenanthroline sont organisées dans le Tab. IV. 8.

**Tableau IV. 8.** les absorbances des différents extraits dans la méthode de Phenanthroline

| Parties étudiées | 3.125 µg   | 6.25 µg    | 12.5 µg    | 25 µg      | 50 µg      | 100 µg     | 200 µg     | 400 µg     | A <sub>0.5</sub> (µg/ml) |
|------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------------------|
| <b>MeOH</b>      |            |            |            |            |            |            |            |            |                          |
| <b>Feuilles</b>  | 00,35±0.04 | 00,38±0.02 | 00,49±0.03 | 00,56±0.02 | 00,89±0.04 | 01,60±0.04 | 02,69±0.21 | Nt         | <b>16,95±1.1</b>         |
| <b>fruits</b>    | 00,16±0.02 | 00,21±0.01 | 00,24±0.02 | 00,27±0.02 | 00,32±0.01 | 00,34±0.01 | 00,54±0.03 | Nt         | <b>180,2±9.6</b>         |
| <b>graines</b>   | Nt         | 00,25±0.02 | 00,30±0.02 | 00,32±0.02 | 00,36±0.03 | 00,49±0.05 | 00,58±0.08 | 01,16±0.02 | <b>150,5±3.3</b>         |
| <b>Aqueux</b>    |            |            |            |            |            |            |            |            |                          |
| <b>Feuilles</b>  | 00,32±0.00 | 00,32±0.01 | 00,38±0.01 | 00,44±0.01 | 00,62±0.04 | 01,03±0.03 | 02,34±0.11 | Nt         | <b>33,25±2.8</b>         |
| <b>fruits</b>    | 00,22±0.04 | 00,26±0.01 | 00,27±0.02 | 00,28±0.02 | 00,33±0.01 | 00,35±0.00 | 00,57±0.03 | Nt         | <b>167,6±8.0</b>         |
| <b>graines</b>   | Nt         | 00,26±0.02 | 00,26±0.01 | 00,27±0.03 | 00,28±0.00 | 00,37±0.01 | 00,49±0.04 | 00,73±0.02 | <b>203,6±6.5</b>         |
| <b>BHA *</b>     | 00,73±0,02 | 00,93±0,01 | 01,25±0,04 | 02,10±0,05 | 04,89±0,06 | Nt         | Nt         | Nt         | <b>0,93±0,07</b>         |
| <b>BHT *</b>     | 00,53±0,03 | 01,23±0,02 | 01,84±0,01 | 03,48±0,03 | 04,84±0,01 | Nt         | Nt         | Nt         | <b>2,24±0,17</b>         |

• Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne ± SD des trois répétitions pour chaque essai

• (\*) les standards : molécules de références

• BHA : hydrox-yanisole butylé

• BHT : hydroxy-toluene butylé

• Nt : non testée

Tableau IV. 9. tableau récapitulatif des valeurs A<sub>0.5</sub>

|           | Extrait      | CUPRAC    | FRAP      | Phenanthroline |
|-----------|--------------|-----------|-----------|----------------|
| MeOH      | Feuilles     | 28.85±2.3 | 50.60±2.5 | 16.95±1.1      |
|           | Fruits       | 288.4±1.0 | 83.16±3.2 | 180.2±9.6      |
|           | Graines      | 222.8±1.1 | 334.7±0.4 | 150.5±3.3      |
| Aqueux    | Feuilles     | 91.71±0.0 | 150.5±1.4 | 33.25±2.8      |
|           | Fruits       | 484.3±11  | 112.3±1.7 | 167.6±8.0      |
|           | Graines      | 259.5±14  | 327.9±2.5 | 203.6±6.5      |
| Standards | BHA          | 05,35±0,7 | /         | 0,93±0,07      |
|           | BHT          | 1.29±0.30 | /         | 2,24±0,17      |
|           | α-tocopherol | /         | 34.93±2.3 | /              |
|           | A.ascorbique | /         | 06.77±1.1 | /              |

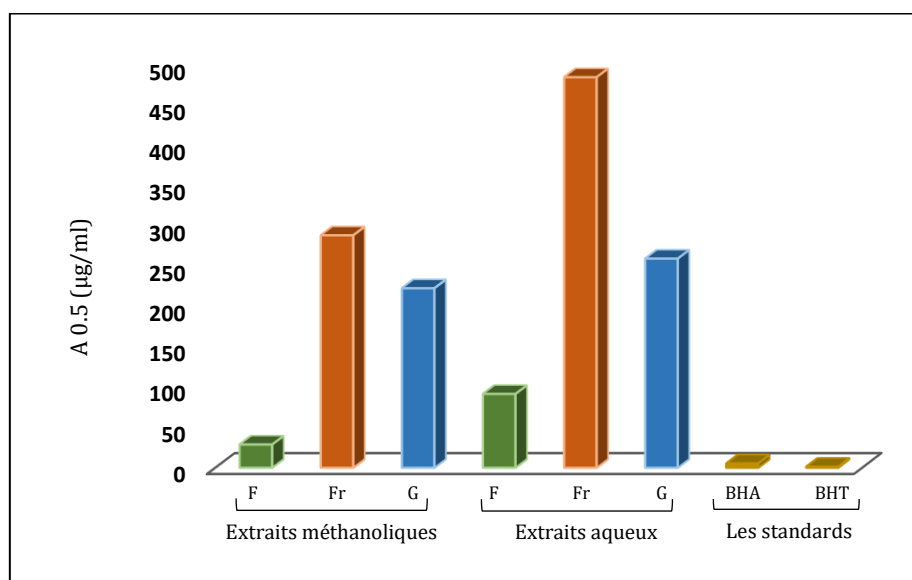


Fig. IV. 5. Réduction du complexe Cuivre-Neocuproïne par les extraits étudiés

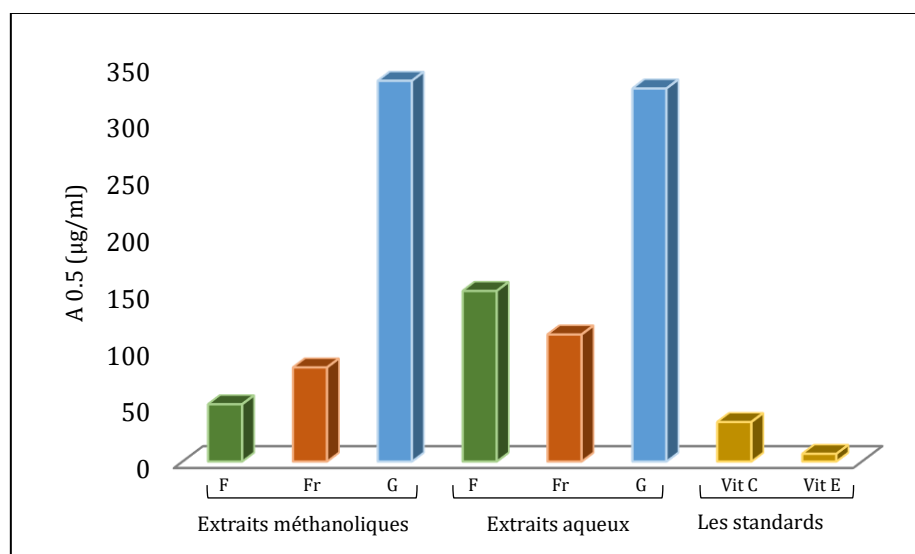
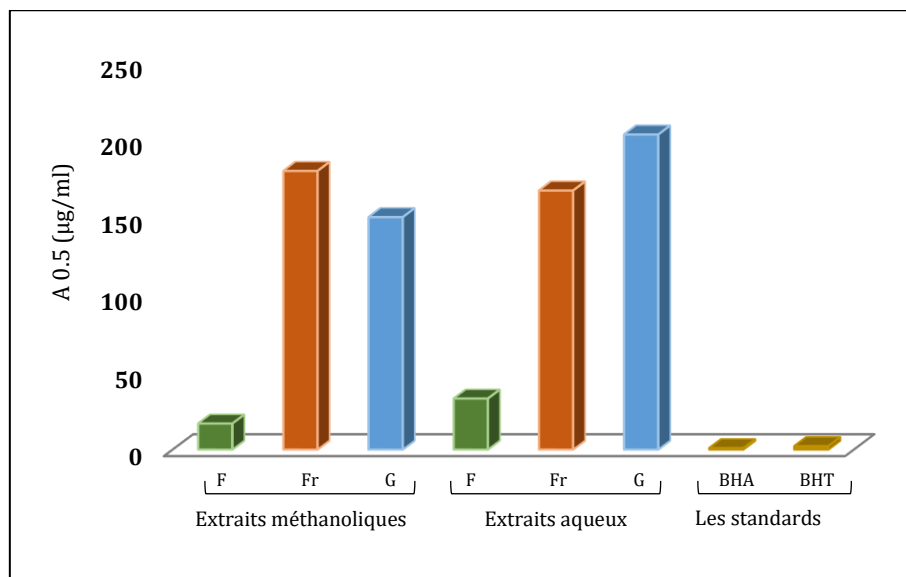


Fig. IV. 6. L'activité du pouvoir réducteur des extraits étudiés



**Fig. IV. 7.** Réduction du complexe  $\text{Fe}^{+2}$ -Phenanthroline par les extraits étudiés

Dans cette partie, le pouvoir antioxydant des extraits a été évalué par les méthodes CUPRAC, FRAP et Phenanthroline. Les résultats sont exprimés en terme de  $A_{0.5}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ). Les valeurs obtenues dans la méthode CUPRAC ont montré que les extraits des feuilles ont donné les meilleurs effets suivis par les extraits des graines et les fruits respectivement. Ces dernières ont donné des activités modérées. Les standards ont montré les meilleures activités. Plusieurs critères, que possède les polyphénols, déterminent la capacité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne tels que le nombre et la position de groupes d'hydroxyle et le degré de conjugaison de la molécule entière (double liaison C2-C3), le groupe carbonyle en position 4 (oxo) et la structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui sont importants pour le transfert facile d'électrons [50].

Dans la méthode FRAP, les extraits étudiés ont présenté un comportement presque similaire que celui présenté dans la méthode CUPRAC. L'extrait méthanolique des feuilles et fruits a donné le meilleur effet alors que les autres extraits, notamment des graines, ont donné des activités faibles. Les standards ont gardé l'activité la plus puissante. Dans cette activité, la présence des réducteurs naturels permet de réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{+3}$ ) présent dans le ferricyanure de potassium en fer ferreux ( $\text{Fe}^{+2}$ ). Le  $\text{Fe}^{2+}$  ainsi formé peut-être évalué en mesurant l'absorbance de la couleur bleue formée [51]. Le pouvoir réducteur des extraits de la plante étudiée dépend de leur concentration, en composés phénoliques [52].

Dans l'activité de phénanthroline, Les résultats obtenus ont montré que les extraits des feuilles, méthanoliques et aqueux, ont donné le meilleur pouvoir réducteur de fer en formant un complexe  $\text{Fe}^{+2}$ - phénanthroline. Les extraits des fruits et des graines ont été faible dans cette activité, et leurs valeurs  $A_{0.5}$  sont loin à être comparées avec les molécules standards. Dans cette méthode, la présence des réducteurs dans les extraits naturels étudiés permet de réduire le  $\text{Fe}^{+3}$  en  $\text{Fe}^{+2}$  qui forme un complexe stable avec la phénanthroline de couleur rouge orangé. Ce complexe est révélé par spectrophotométrie, en dosant les ions ferreux et donc déterminant le pouvoir réducteur de l'extrait testé. La différence de l'activité est, éventuellement, due à la capacité réductrice des polyphénols en tant qu'antioxydants puissants. Les travaux de Marmouzi et al. (2019) ont montré des niveaux intéressants d'activité antioxydante d'une plante de la même famille de la plante étudiée [55].

4. Activité inhibitrice des enzymes

4.1.L'activité antidiabétique via l'inhibition de l'α-amylase

Les pourcentages d'inhibition de l'α-amylase sont organisées dans le tableau IV. 10.

**Tableau IV. 10.** les pourcentages d'inhibition de l'α-amylase par les extraits étudiés

| Parties étudiées  | 06.25 µg   | 12.5 µg    | 25 µg      | 50 µg      | 100 µg     | 200 µg     | 400 µg     | 800 µg     | IC <sub>50</sub> (µg/ml) |
|-------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------------------|
| <b>MeOH</b>       |            |            |            |            |            |            |            |            |                          |
| Feuilles          | 07,15±0.89 | 08,27±0.94 | 10,77±1.15 | 11,56±0.56 | 16,10±0.47 | 23,60±1.24 | 27,3±0.171 | Nt         | > 400                    |
| fruits            | 11,60±0.58 | 11,79±0.33 | 13,41±1.00 | 17,43±1.80 | 19,62±0.84 | 21,86±1.20 | 25,28±0.12 | Nt         | > 400                    |
| graines           | Nt         | 19,17±0.03 | 19,42±1.00 | 20,39±0.47 | 22,63±0.13 | 24,06±0.29 | 26,85±0.10 | 30,73±0.29 | > 800                    |
| <b>Aqueux</b>     |            |            |            |            |            |            |            |            |                          |
| Feuilles          | 00,60±0.04 | 00,79±0.10 | 00,85±0.10 | 00,85±0.04 | 01,26±0.04 | 01,90±0.04 | 02,43±0.13 | Nt         | > 400                    |
| fruits            | 00,58±0.06 | 00,66±0.04 | 01,00±0.18 | 01,00±0.10 | 01,32±0.10 | 01,45±0.20 | 02,22±0.36 | Nt         | > 400                    |
| graines           | Nt         | 01,05±0.15 | 01,15±0.13 | 03,12±0.48 | 04,63±0.21 | 08,88±0.07 | 20,11±0.00 | 30,22±0.40 | > 800                    |
| <b>Acarbose *</b> |            |            |            |            |            |            |            |            |                          |
|                   | 07,76±0,17 | 08,08±0,30 | 09,46±0,11 | 10,70±0,96 | 31,81±2,89 | 37,21±3,54 | 53,05±1,59 | Nt         | 3650,9±10                |

• Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne ± SD des trois répétitions pour chaque essai

• (\*) Les standards : molécules de références

• Nt : non testée

## 4.2.L'activité anti-Alzheimer via l'inhibition de l'acétylcholinestérase

Les pourcentages d'inhibition de l'AChE sont organisés dans le tableau IV. 11.

**Tableau IV. 11.** les pourcentages d'inhibition de l'AChE

| Parties étudiées     | 3.125 µg   | 6.25 µg    | 12.5 µg    | 25 µg      | 50 µg      | 100 µg     | 200 µg     | 400 µg     | IC <sub>50</sub> (µg/ml) |
|----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------------------|
| <b>MeOH</b>          |            |            |            |            |            |            |            |            |                          |
| <b>Feuilles</b>      | 10,16±1.38 | 16,79±0.90 | 24,63±1.38 | 29,15±1.38 | 36,39±0.52 | 40,88±1.07 | 71,48±1.23 | Nt         | 118.45±2.4               |
| <b>fruits</b>        | 05,94±0.90 | 10,16±1.38 | 13,48±1.88 | 17,70±1.57 | 24,93±0.90 | 28,55±0.90 | 35,18±1.38 | Nt         | > 200                    |
| <b>graines</b>       | Nt         | 01,12±0.08 | 02,32±0.09 | 05,19±0.26 | 10,16±1.38 | 12,57±1.38 | 14,98±0.90 | 16,40±1.13 | > 400                    |
| <b>Aqueux</b>        |            |            |            |            |            |            |            |            |                          |
| <b>Feuilles</b>      | 16,95±0.05 | 26,21±0.79 | 27,11±1.43 | 34,67±0.92 | 45,25±0.79 | 59,01±1.21 | 75,14±0.92 | Nt         | 66.07±4.0                |
| <b>fruits</b>        | 09,28±1.65 | 17,48±3.46 | 25,89±0.97 | 34,14±1.59 | 39,70±0.79 | 49,22±1.59 | 58,21±2.00 | Nt         | 125.1±11                 |
| <b>graines</b>       | Nt         | 01,88±0.46 | 03,46±1.41 | 04,26±0.46 | 11,13±0.79 | 18,28±1.59 | 23,30±1.65 | 34,41±2.00 | > 400                    |
| <b>Galantamine *</b> | 35,93±2,28 | 43,77±0,00 | 68,50±0,31 | 80,69±0,41 | 85,78±1,63 | 91,80±0,20 | 94,77±0,34 | Nt         | 06.27±1.1                |

- Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne ± SD des trois répétitions pour chaque essai
- (\*) les standards : molécules de références
- Nt : non testée

Dans un organisme vivant, l'ensemble des bio-réactions qui assurent le bon fonctionnement des phénomènes biologiques sont catalysées par voie enzymatique. Une large gamme des maladies, légères et lourdes, apparaissent actuellement grâce à des perturbations enzymatiques. Les praticiens du secteur médicale adoptent des stratégies y inclue La modulation de l'activité enzymatique pour prévenir et/ou traiter les maladies associées. Dans la présente étude, nous avons évalué l'activité inhibitrice de nos extraits sur Ache et l' $\alpha$ -amylase qui sont liées aux deux maladies lourdes, Alzheimer et le diabète respectivement.

Le diabète, un problème métabolique largement répandu actuellement. Il présente des impacts socioéconomiques lourds. Il est, a long-terme, associé à des complications graves. Afin de contrôler la glycémie postprandiale des personnes diabétiques, les praticiens de santé ont adopté plusieurs stratégies pour une bonne gestion de cette maladie dont une est d'inhiber l'une des enzymes de digestion des carbohydrates comme l' $\alpha$ -amylase. Dans ce contexte, nous avons étudié l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase par nos échantillons. Les extraits étudiés de toutes les parties ont inhibé modérément l'enzyme et d'une manière dose dépendante mais leurs IC<sub>50</sub> ont été faibles (Tab. IV. 10).

L'activité inhibitrice des cholinestérases la stratégie la plus adoptée pour gérer les symptômes de la maladie d'Alzheimer. Plusieurs produits naturels, notamment des produits légers, ont montré une activité inhibitrice de ces enzymes et par conséquent représentent une source des nouveaux traitements de cette maladie neurodégénérative. Nos résultats, exprimés en IC<sub>50</sub>, (Tab. IV. 11.) ont montré une inhibition considérable, d'une manière dose-dépendante, particulièrement les extraits des feuilles et l'extrait aqueux des fruits, avec un effet important a été enregistré pour l'extrait aqueux des fruits. Les autres extraits étudiés ont inhibé modérément l'enzyme et leurs IC<sub>50</sub> ont été faibles (Tab. IV. 11.). D'autres études, sur des plantes de la même famille que la plante étudiée, ont montré des valeurs comparables à nos résultats [55, 56].

5. L'activité protectrice vis-à-vis la lumière solaire

Les facteurs de protection des extraits étudiés vis-à-vis les rayonnements UV de la lumière solaire sont organisés dans le tableau IV. 12.

Tableau IV. 12. coefficient de protection solaire des extraits étudiés

|        | Extraits     | SPF <sub>1</sub> | SPF <sub>2</sub> | SPF <sub>3</sub> | Moyenne ± SD | Commentaire           |
|--------|--------------|------------------|------------------|------------------|--------------|-----------------------|
| MeOH   | Feuilles     | 30.35            | 30.85            | 30.15            | 30.45±0.36   | Haute protection      |
|        | Fruits       | 02.98            | 02.79            | 03.13            | 02.96±0.17   | Protection faible     |
|        | Graines      | 28.51            | 23.47            | 29,50            | 27.16±3.24   | Protection modérée    |
| Aqueux | Feuilles     | 22.50            | 22.23            | 22.83            | 22.52±0.30   | Protection modérée    |
|        | Fruits       | 05.57            | 05.60            | 05.65            | 05.61±0.04   | Protection faible     |
|        | Graines      | 19.39            | 19.36            | 19.20            | 19.32±0.10   | Protection modérée    |
| SDR    | Référence 01 | /                | /                | /                | 50,11±0,53   | Très Haute protection |
|        | Référence 02 | /                | /                | /                | 44,22±0,35   | Très Haute protection |

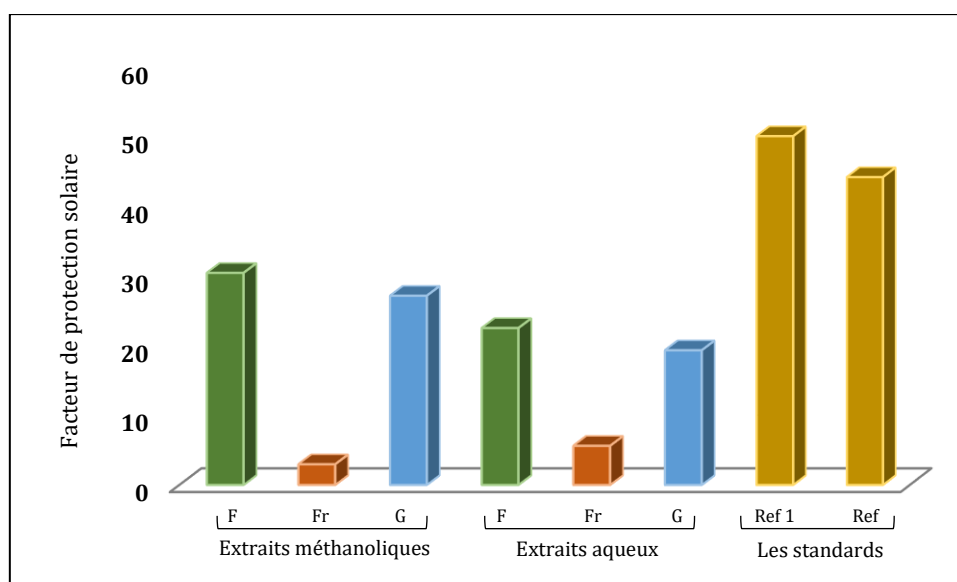


Fig. IV. 8. Valeurs SPF des extraits étudiés

Le facteur de protection solaire (SPF) est un déterminant essentiel lors de la préparation pharmaceutique et cosmétique des crèmes et produits antisolaire. Nos extraits ont donné des variétés de résultats qui sont généralement de protection moyenne a modérée en comparaison avec les valeurs de références. Les extraits des fleurs et des graines ont donné des facteurs SPF importants tandis que les extraits des fleurs ont donné des valeurs faibles. Pour améliorer cette activité nous proposons de les mélanger avec d'autres extraits en cherchant l'effet synergique, ou de vérifier l'activité d'autres formes de fractions organiques.

# Conclusion générale et perspectives

❖ **Conclusion générale**

Ce travail s'insère généralement dans le cadre de connaissance et valorisation des produits naturels vivants d'une plante de la famille des *Rhamnaceae*. Le travail a été commencé par la récolte et le séchage de la plante puis l'extraction, le fractionnement des extraits, et enfin par la réalisation des dosages chimiques et l'activité biologique, antioxydantes et enzymatiques. Le dosage des phénols et flavonoïdes totaux a été réalisé par les méthodes classiques de folin-ciocalteau et  $\text{AlCl}_3$  respectivement. L'activité antioxydante a été fait par cinq méthode différentes, les méthodes de piégeage des radicaux DPPH et ABTS, les méthodes CUPRAC, FRAP et Phénanthroline. L'activité inhibitrice des enzymes a été testé sur deux enzymes, l'acétylcholinestérase et l' $\alpha$ -amylase. Les résultats obtenus ont montré des rendements d'extraction importants notamment pour l'extrait méthanolique des feuilles et l'aqueux des fruits. Dans les dosages biochimiques, les valeurs obtenues ont montré une richesse en phénols totaux notamment pour les extraits méthanoliques et aqueux des graines et l'extrait méthanolique des feuilles. Pour les flavonoïdes, l'extrait méthanolique des feuilles et graines ont présenté des valeurs intéressantes avec l'extrait aqueux des graines. A propos de l'activité antioxydante, les extraits méthanoliques des feuilles ont présenté des activités intéressantes en comparaison avec les autres extraits, plus particulièrement, dans le piégeage du radical ABTS que le DPPH. Dans la méthode CUPRAC, les extraits des feuilles ont donné les meilleurs effets suivis par les extraits des graines et les fruits respectivement. Egalement, Les extraits étudiés ont présenté un comportement presque similaire dans la méthode FRAP, que celui présenté dans la méthode CUPRAC, l'extrait méthanolique des feuilles et fruits a donné le meilleur effet alors que les autres extraits, notamment des graines, ont donné des activités faibles. Dans l'activité de phénanthroline, Les résultats obtenus ont montré que les extraits des feuilles, méthanoliques at aqueux, ont donné le meilleur pouvoir réducteur de fer. D'un autre côté, L'étude de l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase par nos échantillons de toutes les parties a révélé une inhibition modérée de l'enzyme et d'une manière dose dépendante, mais leurs  $\text{IC}_{50}$  ont été faibles. Parallèlement, une inhibition considérable de l'AChE a été détectée et d'une manière dose-dépendante, particulièrement pour les extraits des feuilles et l'extrait aqueux des fruits, avec un effet important a été enregistré pour l'extrait aqueux des fruits. Finalement, dans l'activité protectrice vis-à-vis la lumière solaire, nos extraits ont donné des résultats qui sont généralement de protection moyenne a modérée en comparaison avec les valeurs de références.

❖ Perspectives

- Elargir la liste des plantes étudiée vers d'autres familles et espèces endémiques.
- Adopter des autres systèmes solvants d'extraction avec le fractionnement d'extraits afin de jouer sur le contenu moléculaire et par conséquent l'activité biologique
- Analyser les extraits étudiés par HPLC-MS pour détailler la composition moléculaire des extraits
- Généraliser les activités réalisées vers les systèmes *in vivo* et *in silico*.
- Pratiquer la combinaison des extraits avec autres types moléculaires pour chercher une éventuelle synergie dans l'activité biologique

## *Références bibliographiques*

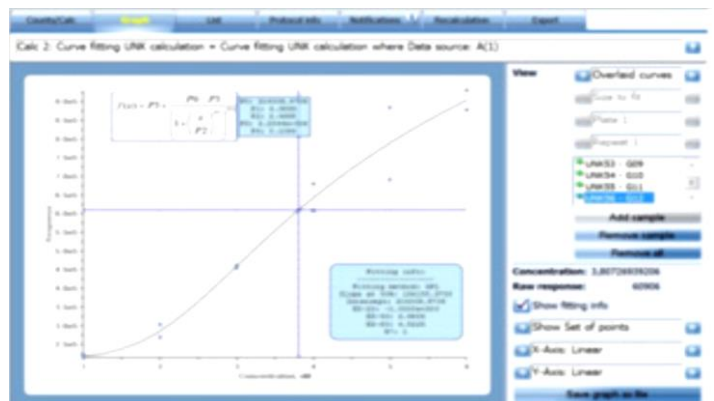
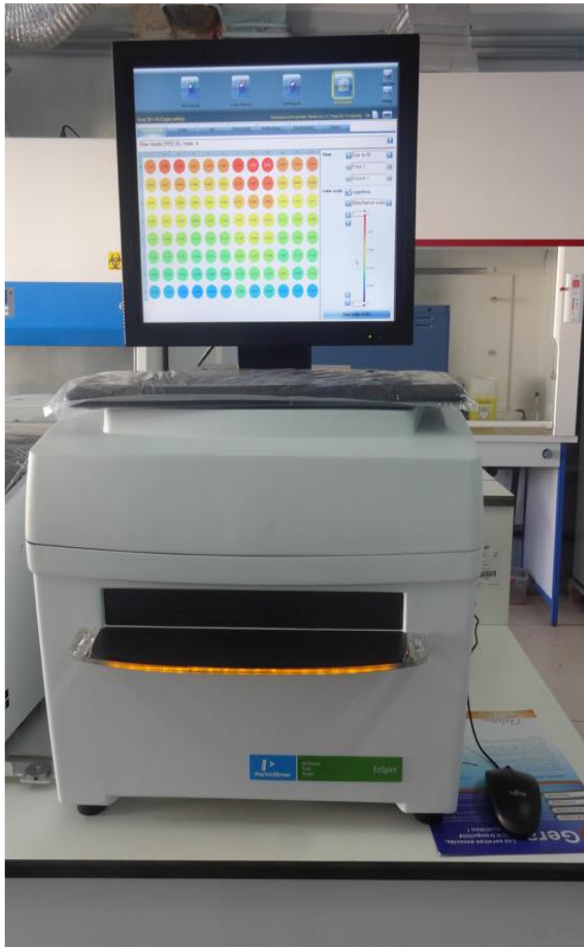
- [01] Leverage, X., Stress oxydant et antioxydants? Cahiers de Nutrition et de Diététique, 2009. **44**(5): p. 219-224.
- [02] Rochette, L., Stress oxydant et sepsis. Réanimation, 2008. **17**(6): p. 1-4.
- [03] Aicha, L. and T. Hamida, Optimisation de l'extraction de l'huile des extraits de l'huile de curcuma et évaluation de son activité antioxydante, 2020.
- [04] Fontaine, E., et al., Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique, in Réanimation2002. p. 411-420.
- [05] Favier, A., Le stress oxydant. L'actualité chimique, 2003. **108**(10): p. 863-832.
- [06] Porter, G., Problèmes d'actualité dans la spectroscopie des radicaux libres. Journal de Physique et le Radium, 1954. **15**(6): p. 497-499.
- [07] Touaylia, S., et al., Effect of permethrin (pyrethroid insecticide) on the biochemical response of the freshwater amphipod *Echinogammarus tacapensis* (Chevreux and Gauthier, 1924). Marine and freshwater behaviour and physiology, 2018. **51**(1): p. 57-66.
- [08] Carange, J., Rôle antioxydant et anti-apoptotique des brassinostéroïdes, une nouvelle stratégie de neuroprotection?, 2010, Université du Québec à Trois-Rivières.
- [09] Ahamet, S., Etudes phytochimiques et des activités biologiques de *Balanites aegyptica* (Balanitaceae), 2003, Thèse de pharmacie, Bamako.
- [10] BOUGANDOURA, N., Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales *Saturejalaminthasspnepta* (nabta) et *Ajugaiwa L.*(chendgoura) de l'ouest d'Algérie. 2011.
- [11] Ratnam, D.V., et al., Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. Journal of controlled release, 2006. **113**(3): p. 189-207.
- [12] Guillouty, A., Plantes médicinales et antioxydants, 2016, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- [13] CAPCANARI, T., et al., Conținutul total de polifenoli și activitatea antioxidantă a extractelor din ardei dulce. 2011.
- [14] JARBI, I., Etude de l'activité antioxydante et antihyperglycémiant in vitro d'une nouvelle série des dérivés des pyridazin-3 (2H)-ones, 2018.
- [15] Nadal, B., Synthèse et Evaluation de nouveau agents de protection contre les rayonnements ionisants, 2009, Université Paris Sud-Paris XI.
- [16] Merghem, R., Eléments de biochimie végétale. Edition Bahaeddine, 2009: p. 107-133.
- [17] Boudjouref, M., Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris L.*, 2018.
- [18] Epifano, F., et al., Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. Phytochemistry, 2007. **68**(7): p. 939-953.
- [19] Pecking, A., et al., Oligomères procyanidoliques (Endotelon®) et système lymphatique. Artères et veines (Saint-Denis), 1987. **6**(6): p. 512-513.
- [20] Krief, S., Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées, 2003, Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS.
- [21] Boubekri, C., Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques, 2014, Université Mohamed Khider Biskra.

- [22] Middleton, E., C. Kandaswami, and T.C. Theoharides, The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 2000. **52**(4): p. 673-751.
- [23] Stoclet, J.-C., et al., Vascular protection by dietary polyphenols. *European journal of pharmacology*, 2004. **500**(1-3): p. 299-313.
- [24] Macheix, J.-J., A. Fleuriet, and C. Jay-Allemand, Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique 2005: PPUR presses polytechniques.
- [25] TLILI, M.L., Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de *Pergularia tomentosa* issue de quatre sites sahariens différents (Sahara septentrional).
- [26] BENHAMMOU, N., Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien, 2011.
- [27] Havsteen, B.H., The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics*, 2002. **96**(2-3): p. 67-202.
- [28] BEKKOUCHE, A. and S. SEGHAIER, Contribution à l'étude phytochimique et l'activité biologique des extraits de *Matthiola livida* DC. de la région d'Oued Souf. 2020.
- [29] Emerenciano, V.P., et al., Self-organizing maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae: a classification of tribes using flavonoid data. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2007. **18**(5): p. 891-899.
- [30] Narayana, K.R., et al., Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology*, 2001. **33**(1): p. 2-16.
- [31] Malešev, D. and V. Kuntić, Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian chemical society*, 2007. **72**(10): p. 921-939.
- [32] Tabart, J., Optimisation et caractérisation d'un extrait de cassis riche en antioxydants utilisable comme complément alimentaire, 2011, Université de Liège, Liège, Belgique.
- [33] Nkhili, E.-z. Polyphénols de l'alimentation: extraction, interactions avec les ions du fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant. 2009. Avignon.
- [34] Sharma, B., et al., Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. *Food chemistry*, 2008. **110**(3): p. 697-705.
- [35] Singleton, V.L., and Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16, 144-158
- [36] Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., and Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*. 103, 816-822.
- [37] Blois, M.S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*. 181, 1199-1200.
- [38] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26, 1231-1237.
- [39] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., and Karademir, S.E. (2004). Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 7970-7981.

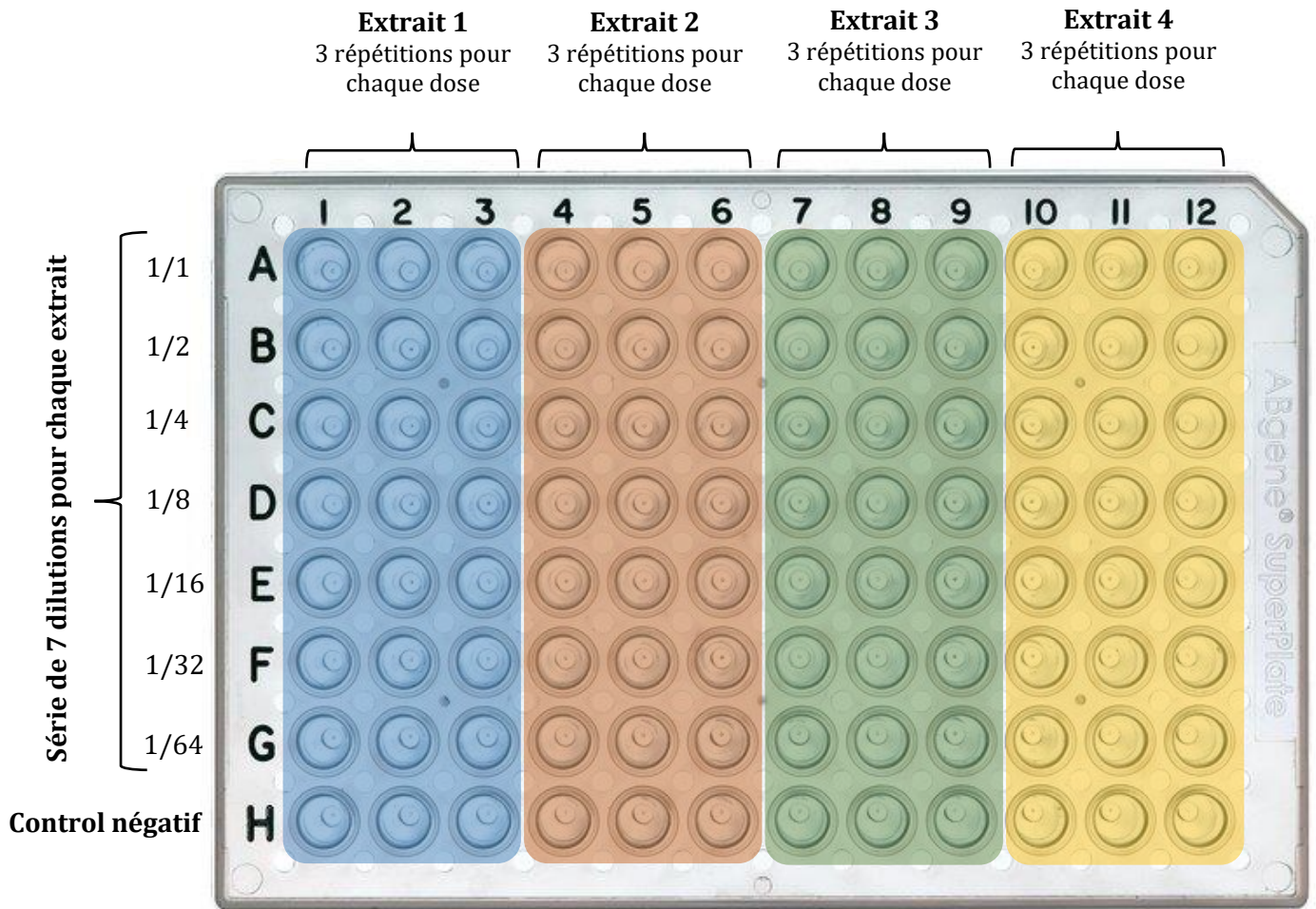
- [40] Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*. 44, 307-315.
- [41] Szydłowskaczerniak, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., and Szlyk, E. (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*. 76, 899-905.
- [42] Zengin, G., Sarikurkcu, C., Aktumsek, A., Ceylan, R., and Ceylan, O. (2014). A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products*. 53, 244-251.
- [43] Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., and Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7, 88-95.
- [44] MANSUR, J. S.; BREDER, M. N. R.; MANSUR, M. C. A.; AZULAY, R. D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol.*, Rio de Janeiro, v. 61, p. 121-124, 1986.
- [45] Rauf, A., Uddin, G., Siddiqui, B. S., Khan, H., Uzair, S., Shah, A., Khan, A. (2016). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Pistacia integerrima* galls. *Complementary Therapies in Medicine*, 25, 132–138.
- [46] Wasowski, C., Loscalzo, L. M., & Marder, M. (2013). Neuropharmacology In vitro binding affinities of a series of flavonoids for m-opioid receptors. Antinociceptive effect of the synthetic flavonoid 3,3-dibromo flavanone in mice, 72.
- [47] Sánchez-Vioque, R., Polissiou, M., Astraka, K., Mozos-Pascual, M. de los, Tarantilis, P., Herraiz-Peñalver, D., and Santana-Méridas, O. (2013). Polyphenol composition, antioxidant, and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry. *Industrial Crops and Products*. 49, 150-159.
- [48] Yokozawa, T., Chen, C.P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G.-I., and Nishioka, I. (1998). Study on the Inhibitory Effect of Tannins and Flavonoids against the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical. *Biochemical Pharmacology*. 56, 213-222.
- [49] Von Gadow, A., Joubert, E., and Hansmann, C.F. (1997). Comparison of the Antioxidant Activity of Aspalathin with That of Other Plant Phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*),  $\alpha$ -Tocopherol, BHT, and BHA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45, 632-638.
- [50] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., and Karademir, S.E. (2004). Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 7970-7981.
- [51] Chung, Y.-C., Chang, C.-T., Chao, W.-W., Lin, C.-F., and Chou, S.-T. (2002). Antioxidative Activity and Safety of the 50 Ethanolic Extract from Red Bean Fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *J. Agric. Food Chemistry*. 50, 2454-2458.
- [52] Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., and Weil, J.A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*. 84, 551-562.
- [53] Cheurfa M., Allem R., Zabel K., Aichouni W. and Mariod A. 2020. A comparative study on solvent extraction effect on the phytochemical profiling and antioxidant capacity of *Zizyphus lotus* L and *Glycyrrhizaglabra* L roots.. *Int. J. Agric. For. Life Sci.*, 4(2): 167-172.

- [54] Nour El Houda Bekkar, Boumediene Meddah, Yavuz Selim Cakmak, Bahadir Keskin. (2021). PHENOLIC COMPOSITION, ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF ZIZYPHUS LOTUS L. AND RUTA CHALEPENSISL. GROWING IN MASCARA (WESTERN ALGERIA). *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*. 10 (5) e3004
- [55] Ilias Marmouzia, Mourad Kharbachb, Meryem El Jemlid, Abdelhakim Bouyahya, Yahia Cherraha, Abdelaziz Bouklouzeb, Yvan Vander Heydenc, My El Abbes Faouzia. (2019). Antidiabetic, dermatoprotective, antioxidant and chemical functionalities in *Zizyphus lotus* leaves and fruits. *Industrial Crops & Products* 132 (2019) 134–139
- [56] Berkani, F., Serralheiro, M. L., Dahmoune, F., Ressaissi, A., Kadri, N., & Remini, H. (2020). Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from a Jujube By-Product with Valuable Bioactivities. *Processes*, 8(11), 1441.

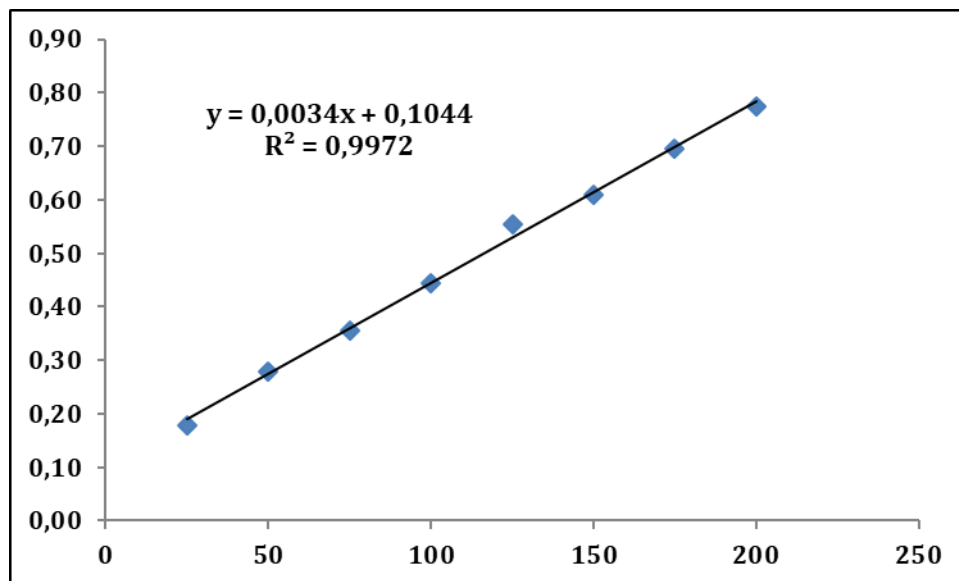
Annexe 01 : lecteur des microplaques a 96 puits



Annexe 02 : organisation de la microplaque



## Annexe 03 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique



## Annexe 04 : courbe d'étalonnage de Quercétine

