



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعرييرج

Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi - B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologique



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعرييرج

Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi - B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologique

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : science biologique

Spécialité : biochimie

Intitulé

Activité antioxydante de *Quercus ilex.L*

Présenté par : Bessa saliha
kadri linda

Soutenu le :09/07/2019

Devant le jury :

Président :M^{me} ROUAIGUIA NADIA

Encadrant :M^{me} MEZITI ASMA

Examineur :M^{me} NASRI MERIEM

Année universitaire : 2018/2019

Remerciements

Nous remercions en premier lieu, le bon Dieu, tout puissant, pour nous avoir donné la santé, la force et le courage nécessaires pour réaliser ce travail.

Le présent travail fait partie d'axes de recherches respectifs du Dr MEZTO Asma de l'université Mohamed El Bachir El Ibrahimi Bordj Bou Arreridj.

Notre profonde gratitude va à notre promotrice Dr MEZTO Asma, pour l'honneur qu'elle nous a fait de nous encadrer, pour ses précieux conseils, ses orientations, sa disponibilité, son encouragement et la confiance qu'elle a mis à nous, dont nous garderons ses qualités profondément humaines comme exemple.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude au Dr ROUAIGUA Nadia qui nous a honoré en acceptant d'être président du jury de soutenance et Dr NASRI Meriem qui ont bien voulu donné de leur temps pour examiner ce travail.

Nous ne manquons surtout pas de remercier chaleureusement toutes les personnes qui nous ont aidé à la réalisation de ce travail, Mme Kadri Meryem qui nous aidé à avoir accès à plusieurs sources bibliographiques.

Nos vifs remerciements vont également aux professeurs, ingénieurs, et techniciens de département et de laboratoire pour leur aide lors de la réalisation de ce travail.

Que toutes les personnes qui, un jour ou l'autre, nous ont offert leurs amitiés et des moments inoubliables tout au long de notre cursus universitaire, en soient ici vivement remercié.

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Ceux que j'ai tant aimé avec beaucoup d'affection et je suis très fière de les avoir et tous les mots du monde ne peuvent exprimer l'amour et le respect que je leur porte, mes très chers parents, que Dieu me les protège, et mes sœurs, mes frères, Hamza, Adam, A toute ma famille petite et grande.

A tous mes chers amis depuis mon enfance.

KADRI Linda

je dédie ce travail

à mes chers parents, à mon frère Ayoub, a ma unique sœur Meriem

A ma famille

ainsi qu'à tous mes amis.

BESSA Saliha

Aux techniciens et ingénieurs du laboratoire : Wassima, Mr Makhoukh

A mes collègues de travail. A Tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce

travail.

Résumé :

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces réactifs de l'oxygène (EOR) et les défenses antioxydantes de l'organisme. Celui ci est impliqué dans un grand nombre de phénomènes pathologiques .

La connaissance et l'usage des plantes médicinales constituent un vrai patrimoine de l'être humain, grâce aux thérapeutiques qu'elles procurent. Dans ce contexte nous avons tenté d'analyser et d'évaluer l'activité antioxydante des extraits méthanoliques et aqueux préparés à partir de l'écorce de Quercus ilex,

L'analyse quantitative des polyphénols totaux et de flavonoïde en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu et de trichlorure d'aluminium révèle la présence de quantités importantes de polyphénols et de flavonoïdes dans l'extrait méthanolique (536µg EAG/mg d'extrait et 24.96µg EQ/mg d'extrait) en comparaison avec l'extrait aqueux (776µg EAG/mg d'extrait et 4.11µgEQ/mg d'extrait)

De même, L'évaluation de l'activité antioxydante vis-à-vis du radical DPPH, montre que l'extrait méthanolique possède un pouvoir antiradicalaire puissant (IC50 = 7µg/ml) supérieur à celui de l'extrait aqueux IC50 = 12µg/ml) et de l'acide ascorbique (IC50= 68µg/ml).

D'après les résultats obtenus dans ce travail, on peut dire que l'écorce de quercus il possèdent une activité antioxydante considérable qui est localisée principalement dans l'extrait méthanoliques et qui est attribué à sa richesse en polyphénols et flavonoides.

Mots clés : Espèces oxygénées réactives (EOR), Stress oxydatif, composés phénoliques, activité antioxydantes.

Abstract :

Oxidative stress is defined as an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the antioxidant network. This stress is involved in many pathological phenomenons or in many diseases.

The Knowledge and use of medicinal plants are a real heritage of human beings, owing to therapeutic that it provide. In this context we tried to analyze and estimate the antioxidant activity of the methanolic and aqueous extracts prepared by the bark of quercus ilex.

Quantitative analysis of total polyphenols and flavonoids, The methods used are the Folin - Ciocalteu and the aluminum trichloride reveals the presence of significant amounts of polyphenols and flavonoids in the methanolic extracte (536µg EAG/mg extract and 24.96µgEQ/mg extract) in comparison with the aqueous extract (776µg EAG/mg extract and 4.11µgEQ/mg extract)

Of the same, the evaluation of the antioxidant activity towards the DPPH radical shows that the methanolic extract has a powerful antiradical power (IC50 = 7µg/ml) superior than that of extract aqueous IC50 = 12µg/ml) and of ascorbic acid (IC50= 68µg/ml).

We can say from the obtained data in the present study that the bark of quercus ilex have a considerable antioxidant activity, which is concentrated mainly in the methanolic extracts and which attributed to its richness in polyphenols and flavonoids.

Key words: Reactive Oxygen Species (ROS), oxidative stress, phenolic compounds, antioxidant activity,

ملخص

يقابل الإجهاد التأكسدي اختلال التوازن بين توليد أنواع الأكسجين التفاعلي (EOR) و الدفاعات المضادة للأكسدة في الجسم. و يشارك في عدد كبير من الظواهر المرضية و استخدام النباتات الطبية هو حقيقي تراث المعرفة الانسانية. و ذلك بفضل العلاجات التي يقدمونها في هذا السياق حاولنا تحليل و

تقييم نشاط مضادات الأكسدة في المستخلصات المائية و الميثانولية المحضرة من لحاء Quercus ilex . كشف التحليل الكمي لمجموع البوليفينول والفلافونويد باستخدام طريقة folin-ciocalteu و ثلاثي كلوريد الالومينيوم وجود كميات كبيرة من البوليفينول و الفلافونويدات في مستخلص الميثانول (536µg EAG/mg and 24.96µgEQ/mg) بالمقارنة مع المستخلص المائي (776µg EAG/mg 4.11µgEQ/mg) و بالمثل فان

تقييم نشاط مضادات الأكسدة مقابل DPPH الجذري . يوضح ان مستخلص الميثانول يمتلك IC50= 7µg/ml اكبر من المستخلص المائي IC50= 12µg/ml و حمض الاسكوربيك IC50= 68µg/ml

بعد النتائج التي تم الحصول عليها في هذا العمل .يمكن القول ان اللحاء يمتلك نشاطا كبيرا من مضادات الأكسدة و الذي يقع بشكل أساسي في مستخلص الميثانول و يعزي إلى محتواه العالي من البوليفينول و الفلافونويد.

Liste des abréviations

ABs : absorbance

AGPI : acides gras polyinsaturés

Cu-SOD : SOD à cuivre

DPPH : 1,1diphényl-2-pécrylhydrazyl

EAG : équivalent acide gallique

EC₅₀ : concentration efficaces à 50%

EOR : espèces réactives de l'oxygène

EQ : équivalent de quercitrine

Fe-SOD : SOD ferreux

GP : glutathion peroxydase

GSH-Px : glutathion peroxydase

GSS : glutathion réduit

GSSH : glutathion oxydé

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HOCl : acide hypochloride

IC₅₀ : concentration inhibitrice à 50%

LDL : lipoprotéines de faible densité

MDA : malondialdéhyde

Mn-SOD : SOD à manganèse

MPO : méthylperoxydase

OH• : radical hydroxyl

ONOO• : peroxydinitrite

O₂ : dioxygène

O₂• : anion superoxyde

R• : alkyles

RL : radicaux libres

RO• : alkoxyles

ROO• : peroxyles

RO•₂ : radical peroxyde

SOD : superoxyde dismutase

Listes des tableaux

Tableau I : Principales classes des composés phénoliques.....	15
Tableau II : Taxonomie de chêne vert.....	18
Tableau III : Aspects, couleurs et rendements des extraits de quercus ilex.....	30

Listes des figures

Figure 01 . Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants.....	03
Figure 02 . Principales voies de formation des espèces réactives de l'oxygène.....	05
Figure 03 . Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR	07
Figure 04 . Oxydation de la guanine par les radicaux libres.....	08.
Figure 05 . Oxydation de la sérine	09
Figure 06 . Oxydation de la cystéine	09
Figure 07 . Action des antioxydants au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène	11
Figure 08 . Réaction de dimérisation du glutathion.....	12
Figure 09 . Aspect botanique de <i>Quercus ilex.L.</i>	19
Figure 10 . Répartition géographique du Chêne vert.....	21
Figure 11 . Extraction par macération à l'aide d'un solvant Méthanoïque.....	25
Figure 12 . Extraction, par décoction à l'aide d'eaux distillé.....	26
Figure 13 . Droite d'étalonnage d'acide gallique (moyenne des trois essaie).....	31
Figure 14 . Représentation graphique des Taux de polyphénols totaux (PT) des écorces de deux extraits étudiées.....	32
Figure 15 . Droite d'étalonnage de quercétine (moyenne de trois essaie).....	33
Figure 16 . Représentation graphique des Taux de flavonoïde des écorces de deux extraits étudiées	33
Figure 17 . Pourcentage de réduction du radicale libre DPPH en fonction des concentrations d'extrait méthanolique	34
figure 18 . Pourcentage de réduction du radicale libre DPPH en fonction des concentrations de Extrait aqueux	35
Figure 19 . Pourcentage de réduction du radicale libre DPPH en fonction des concentrations d'acide ascorbique.....	35
figure 20 . Les concentrations efficaces à piégé 50% (EC50) du radical DPPH par les extraits de plantes étudiés et les antioxydants de référence.....	36

Sommaire

Introduction	1
--------------------	---

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. STRESS OXYDANT CELLULAIRE.....	3
I.1.1. Les radicaux libres	4
I.1.2 Les espèces oxygénées réactives (EOR).....	4
I.1.3 Les principales espèces oxygénées réactives (EOR).....	5
I.1.3.1 Le radical anion superoxyde	5
I.1.3.2 Le peroxyde d'hydrogène	6
I.1.3.3 Le radical hydroxyle	6
I.1.3.4 Les radicaux alkyles R•, alkoxyles RO• et peroxydes ROO•.....	6
I.1.4 Stress oxydant et ses conséquences biologiques.....	7
I.1.4.1 Les acides nucléiques.....	7
I.1.4.2 Les protéines.....	8
I.1.4.3 Les lipides.....	9
I.1.5 Implications pathologiques des ROS.....	10
I.1.6 Systèmes de défenses antioxydants.....	10
I.1.6.1 Systèmes enzymatiques.....	11
I.1.6.1.1 La catalase.....	11
I.1.6.1.2 Glutathion peroxydase.....	12
I.1.6.1.3 Le superoxyde dismutase.....	13
I.1.6.2 Systèmes non enzymatiques.....	13
I.1.6.2.1 Endogène.....	13
I.1.6.2.2 Exogène.....	13
La vitamine E.....	13
La vitamine C.....	14
β-carotène.....	14
a. Le coenzyme Q10.....	14
I.1.7 Polyphénols naturels comme antioxydants.....	14
I.1.7.1 Classification des polyphénols.....	15
I.1.7.2 Les flavonoïdes.....	16

I.2 LA PLANTE <i>Quercus ilex</i> L.....	17
I.2.1. Généralités.....	18
I.2.2 Classification de <i>Quercus ilex</i>	18
I.2.3 Aspect botanique.....	19
I.2.4 Habitat et distribution géographique.....	20
I.2.5 Composition chimique de <i>Quercus ilex</i>	21
I.2.6 Propriété biologiques.....	21

CHAPITRE II :MATÉRIEL ET METHODES

II.MATERIEL ET METHODES.....	23
II.1 MATERIEL.....	24
II.1.1 Matériel végétal.....	24
II.1.2 Appareillage et produits chimiques.....	24
II.2. METHODES.....	25
II.2.1. Préparation de matériel végétal.....	25
II.2.1.1 Broyage et tamisage.....	25
II.2.2 Préparation de l'extrait brut.....	25
II.2.2.1. Préparation de l'extrait méthanolique.....	25
II.2.2.2 Préparation de l'extrait aqueux.....	26
II.2.3. Analyse des extraits de <i>Quercus ilex</i>	26
II.2.3.1. Dosage des composés phénoliques.....	27
II.2.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	27
II.2.3.3. L'activité antiradicalaire du DPPH°.....	28

CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Préparation des extraits.....	30
III.2. Analyse des extraits.....	31
III.2.1. Dosage des polyphénols.....	31
III.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	33
III.3 Activité antioxydante des extraits de <i>Quercus ilex</i> L DPPH.....	34

Conclusion

Références bibliographique

Introduction

Introduction

Introduction :

L'oxygène est indispensable à la vie. En effet, c'est cette molécule qui permet l'apport d'énergie à l'être humain par son rôle d'accepteur final d'électron au sein de la mitochondrie. Pourtant, elle est fortement impliquée dans l'initiation du stress oxydant qui, bien qu'il soit utile à l'organisme, peut être délétère et entraîner des pathologies variées dans certaines situations. En effet, ce paradoxe de l'oxygène entraîne la formation de radicaux libres très réactifs, qui sont regroupés sous le terme d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO).

Le stress oxydant est lié à de nombreuses pathologies, par exemple l'athérosclérose, les cancers, le diabète de type 2, les maladies neurodégénératives et rhumatismales. C'est pour cela que la recherche sur les antioxydants dans les plantes s'est beaucoup développée ces dernières années, afin de permettre de trouver les meilleurs antioxydants possibles dans l'espoir de protéger notre santé et même guérir ces différentes maladies.

Un grand nombre de plantes aromatiques, médicinales, des plantes épices et autres possèdent des propriétés biologiques très intéressantes qui trouvent application dans divers domaines en savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et agriculture. Cependant, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme antioxydante demeure une tâche intéressante et utile., Quercus ilex L connue sous le nom vernaculaire (chêne vert) est une plante médicinale largement utilisée en médecine traditionnelle et comme condiment alimentaire.

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail dont le but essentiel est la recherche de molécules à effet antioxydant dans l'écorce de Quercus ilex L . Pour cela nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- Préparation des extraits méthanolique et aqueux de l'écorce de la plante Quercus ilex.
- Evaluation de la teneur en polyphénols totaux, et en flavonoïdes des extraits aqueux et méthanolique de Quercus ilex
- Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de Quercus ilex par les tests de DPPH.

Chapitre I:

synthèse

bibliographique

CHAPITRE I : synthèse bibliographique

I.1.1. STRESS OXYDANT CELLULAIRE

Des molécules prooxydantes appelées radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites quotidiennement dans l'organisme. Ces dernières sont cependant contrôlées par les antioxydants. Un stress oxydatif survient lorsque l'équilibre est rompu en faveur des radicaux libres. Toutefois, une production excessive de ces molécules réactives ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut déséquilibrer la balance oxydant/antioxydant (Cristophe, P et Cristophe S., 2011).

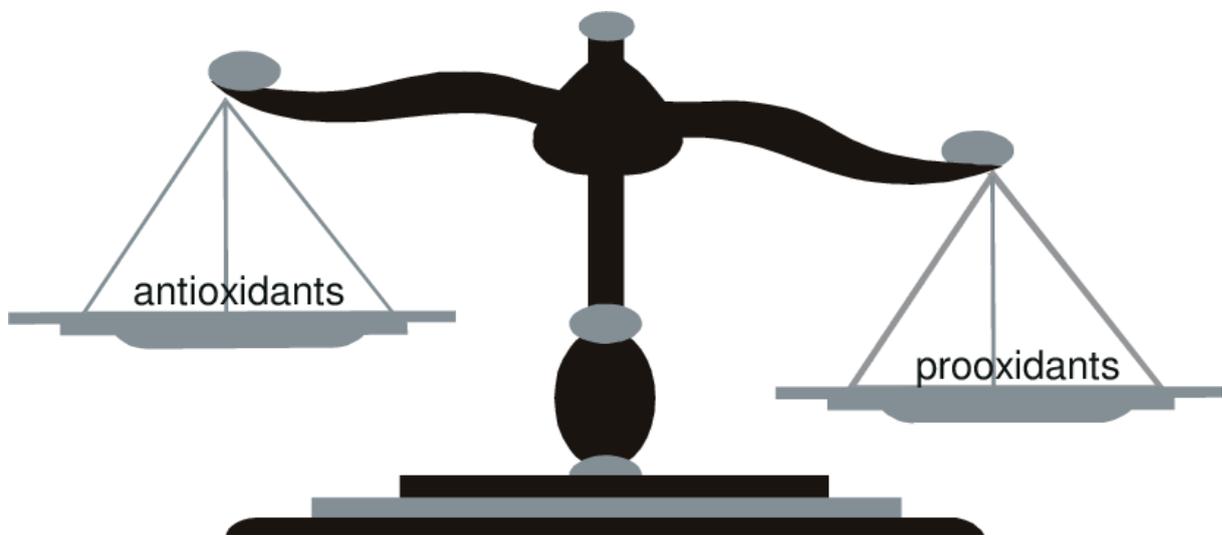


Figure 01 .Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants.

Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telle que l'exposition aux radiations ionisantes (exposition importante au soleil, radioactivité artificielle ou naturelle), la pollution, le contact avec certains pesticides et solvants, la consommation de tabac et d'alcool, la prise de certains médicaments, la pratique du sport intensif et tout processus susceptible de surcharger les réactions de détoxification hépatique, notamment une perte de poids importante (Papazian et Roch., 2008) .

CHAPITRE I : synthèse bibliographique

I.1.1. Les radicaux libres

D'après Goudable et Favier(1997), un radical libre est une espèce chimique, molécule, ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante en contenant un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié sur une orbitale). Cela lui confère une grande réactivité et donc une demi-vie très courte.

En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable, il va donc se réduire en oxydant un autre composé (Marfak, 2003).

Les radicaux libres les plus courants possèdent un seul électron célibataire. Ils peuvent être formés depuis une espèce radicalaire qui subit une réaction d'oxydoréduction. Il y a alors perte ou gain d'électron.

I.1.2 Les espèces oxygénées réactives (EOR)

Les EOR sont majoritairement produits au sein de 2 sites cellulaires : d'une part la mitochondrie et d'autre part la membrane plasmique.

Les EOR peuvent être générés au niveau de la chaîne mitochondriale, plus précisément au niveau de la membrane mitochondriale interne. La mitochondrie est un organite essentiel dans le métabolisme de l'oxygène. Le métabolisme de la chaîne mitochondriale consiste en une succession de transferts d'électrons catalysée par des enzymes permettant la production d'énergie sous forme d'ATP à partir de l'oxygène O₂. En cas de métabolisme incomplet ou de défaillance, certains EOR peuvent être produits et traverser la membrane mitochondriale. Du fait de l'activité importante de la chaîne respiratoire, la production mitochondriale de EOR est supérieure à celle provenant de la NADPH oxydase. Dans des conditions normales, on estime que 80% des EOR sont produites par la chaîne mitochondriale (Leverve,2009).

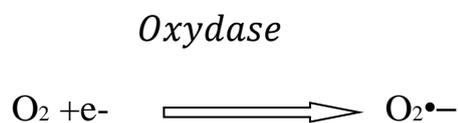
CHAPITRE I : synthèse bibliographique

I.1.2 Les principales espèces oxygénées réactives (EOR)

Les différentes espèces réactives de l'oxygène sont le radical superoxyde, perhydroxyle, hydroxyle, peroxyde, alkoxyde (Rochet, 2008) .

I.1.3.1 Le radical anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$

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



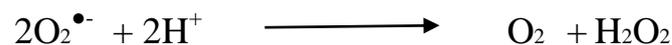
La durée de vie du radical $O_2^{\bullet-}$ ainsi créé est très courte du fait de sa forte réactivité. Il va ainsi interagir rapidement avec son environnement direct (molécules de solvant). L'anion

CHAPITRE I : synthèse bibliographique

superoxyde est un souvent désigné comme une des espèces permettant la production de nombreuses autres espèces réactives de l'oxygène.

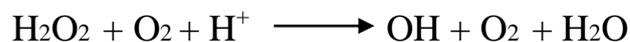
I.1.3.2 Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) se forme par la dismutation spontanée ou enzymatique du radical superoxyde (Palyu, 1994), La dismutation enzymatique est catalysée principalement par la superoxyde dismutase (SOD)



I.1.3.3 Le radical hydroxyle $\bullet OH$

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



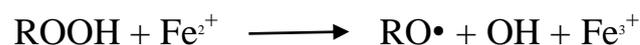
Le radical hydroxyle peut également provenir de la réduction du peroxyde d'hydrogène par un métal de transition comme par exemple l'ion ferreux. Cette réaction est appelée la réaction de Fenton.



Le radical hydroxyle représente l'EOX la plus réactive et la plus toxique, sa durée de vie étant extrêmement courte de l'ordre de 10^{-9} s. Le radical hydroxyle réagit de manière non spécifique avec son environnement (comme l'ADN ou les protéines), il intervient donc comme un initiateur de la peroxydation lipidique ayant comme résultat la dégradation de la membrane lipidique.

I.1.3.4 Les radicaux alkyles $R\bullet$, alkoxydes $RO\bullet$ et peroxydes $ROO\bullet$

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



CHAPITRE I : synthèse bibliographique

I.1.4 Stress oxydant et ses conséquences biologiques

Les Espèces Réactives de l'Oxygène réagissent avec de nombreuses molécules, ce qui entraîne certaines modifications de ces dernières. Elles perdent alors leur activité au sein de la cellule et cela a un impact sur le fonctionnement cellulaire physiologique.

Les principales cibles des EOR sont l'ADN, les protéines et les lipides.

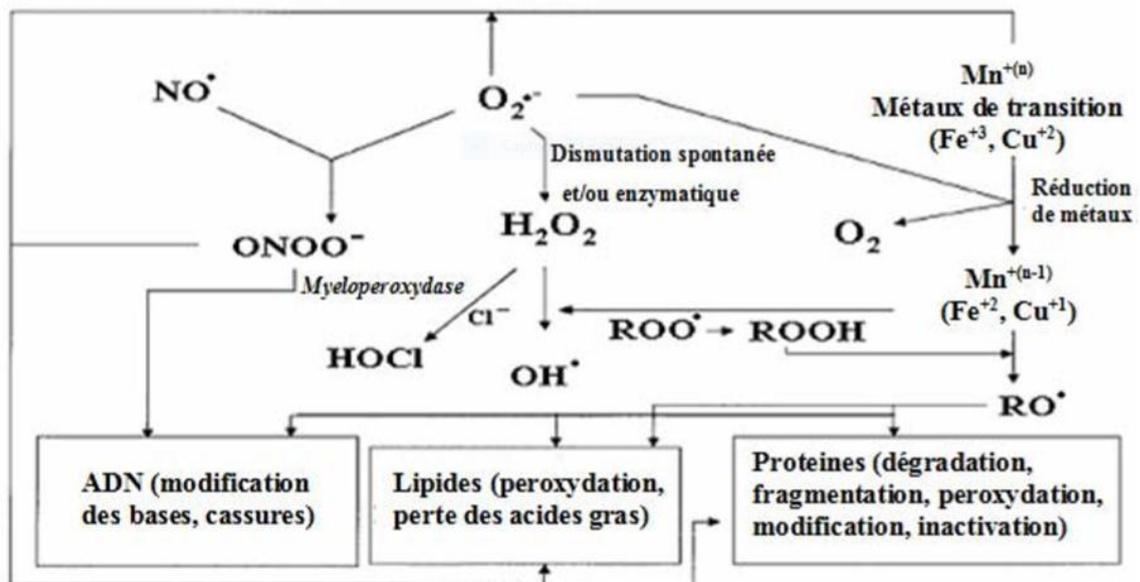


Figure 03: Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR (Kohen et Nyska, 2002).

I.1.4.1 Acides nucléiques

Les EOR, et plus spécifiquement le radical hydroxyle, peuvent provoquer des dégâts au niveau des acides nucléiques ; des cassures, des mutations ou endommager le processus de réparation de l'ADN. De plus, les EOR peuvent induire des modifications au niveau de la transcription ou de la traduction de l'ADN et ainsi aboutir à la formation de protéines altérées. Ces modifications peuvent être à l'origine de phénomènes mutagènes ou d'un vieillissement accéléré.

Ainsi les radicaux libres ont notamment la capacité de pouvoir oxyder les bases nucléiques. La guanine est la base la plus touchée par ce phénomène et les dérivés oxydés les plus générés sont la 8-hydroxyguanine et la 2,6-diamino-4-hydroxy-

CHAPITRE I : synthèse bibliographique

5formamidopyrimidine(Valko et *al.*, 2006). La plupart des bases oxydées seront éliminées par le mécanisme de répartition de l'ADN par excision de base, c'est-à-dire par élimination de la base, suivie d'un clivage du désoxyribose.

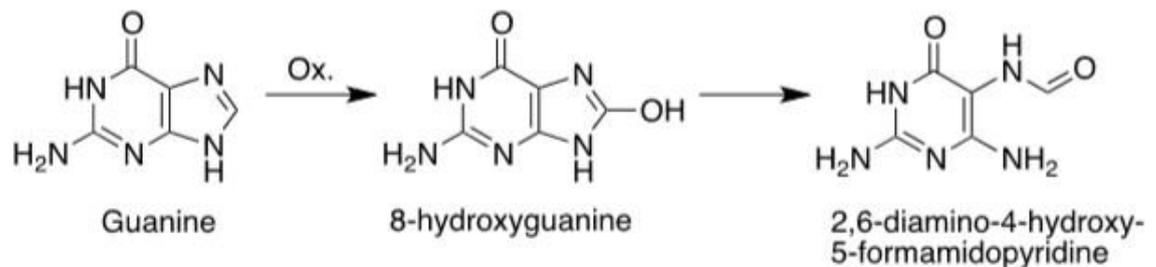


Figure 04. Oxydation de la guanine par les radicaux libres

I.1.4.2 Les protéines

Les EOR peuvent oxyder les protéines et les acides aminés permettant la formation de produits carbonylés ou hydroxylés. Ces modifications vont entraîner une altération des protéines et ainsi modifier les systèmes enzymatiques associés en les activant ou en les inactivant. Les acides aminés soufrés ainsi que les basiques et les aromatiques sont les plus sensibles à ces oxydations qui peuvent s'effectuer selon 3 types.

- Par fragmentation des protéines et formation de produits carbonylés impliqués dans les maladies liées à un dysfonctionnement des neurotransmetteurs dans l'organisme. C'est le cas notamment dans l'épilepsie.
- Par réaction lors de la peroxydation lipidique ce qui provoque l'accumulation de lipoprotéines notamment à l'origine du développement des plaques d'athérome.
- Par réaction de glyco-oxydation pouvant se manifester par une augmentation de la glycémie en cas de diabète.

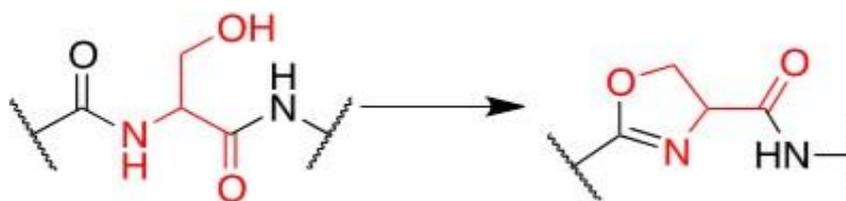


Figure 05. Oxydation de la sérine

I.1.4.3 Les lipides

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont la cible privilégiée des EOR en raison de leurs hydrogènes bis allyliques facilement oxydables. Comme ces derniers sont les lipides majeurs des membranes cellulaires et des lipoprotéines, on comprend leurs vulnérabilités particulières. Les produits d'oxydation formés peuvent participer en tant que second messager à la régulation de fonctions métaboliques, de l'expression des gènes et de la prolifération cellulaire. Ils peuvent aussi, et surtout, se comporter comme des substances toxiques responsables des dysfonctionnements et d'altérations cellulaires (perte d'acides gras polyinsaturés, diminution de la fluidité membranaire, modification de l'activité des enzymes et des récepteurs membranaires, libération du matériel à partir du compartiment subcellulaire)(Beckman et Ames, 1998). La peroxydation lipidique, se déroule en trois phases suivantes :

a) l'initiation: l'attaque par un radical $\text{OH}\cdot$ du groupement méthylène présent entre deux doubles liaisons d'acide gras polyinsaturés produit un radical carboné $\text{R}\cdot$ ($\text{OH}\cdot$ enlève un atome d'hydrogène du CH_2 puis les doubles liaisons subissent un réarrangement moléculaire conduisant à la formation de diènes conjugués), en présence d' O_2 le radical carboné est transformé en radical peroxyde $\text{RO}\cdot_2$ (Martínez-Cayueta, 1995).

b) la propagation: le radical $\text{RO}\cdot_2$ enlève un hydrogène à un nouvel AGPI voisin qui à

CHAPITRE I : synthèse bibliographique

son tour produira un radical $R\bullet$ puis un radical $RO\bullet_2$, une réaction en chaîne s'installe. En présence de métaux de transitions, les hydroperoxydes formés peuvent subir un clivage au niveau des liaisons C-C pour donner naissance à divers produits de décompositions ; le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal représentant les produits les plus toxiques de la peroxydation lipidique (Martínez-Cayuela, 1995).

c) la terminaison : cette phase consiste à former des composés stables issus de la rencontre entre deux espèces radicalaires ou le plus souvent par la réaction d'un radical avec une molécule antioxydante dite 'briseur de chaîne (Khohen et Nyska., 2002).

I.1.5 Implications pathologiques des EOR

la plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, car le vieillissement diminue les défenses antioxydants et augmente la production mitochondriale de radicaux.(Favier, 2003).

Le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies comme le cancer, syndrome de détresse respiratoire aigue, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré...ect (Donnet, 2001).

I.1.6 les antioxydants

Un antioxydant est une espèce chimique plus ou moins complexe diminuant le stress oxydant au sein de l'organisme. Un antioxydant peut donc : prévenir la synthèse de radicaux libres en inhibant l'initiation des chaînes réactionnelles ou désactiver directement les EOR.

L'organisme possède des systèmes endogènes dédiés à cette action protectrice. Cependant, cette ligne de défense est facilement saturée. De nombreux antioxydants exogènes sont également présents dans l'alimentation apportant un soutien significatif dans la lutte antioxydante. ils se trouvent dans les fruits (pommes, poires, fruits rouges...), les légumes (brocoli, oignon...), les boissons (café, thé, vin...) ainsi que dans les épices, le cacao ou encore les céréales. Ces antioxydants sont surtout connus pour leur capacité à réagir directement avec les radicaux libres en les « neutralisant » par réaction de réduction. Les

CHAPITRE I : synthèse bibliographique

antioxydants peuvent être classés selon leurs modes d'actions : systèmes enzymatiques, et non enzymatique.

I.1.6.1 Système Enzymatiques

Pour faire face à ces attaques, les organismes ont développé des systèmes d'action antioxydante qui visent :

1. à éliminer les espèces réactives de l'oxygène et les catalyseurs de leur formation.
2. à induire la synthèse des antioxydants.
3. à augmenter l'activité des systèmes de réparation et d'élimination des molécules endommagées. Trois types d'enzymes antioxydantes sont mis en œuvre pour la destruction des espèces réactives de l'oxygène comme illustre la figure.

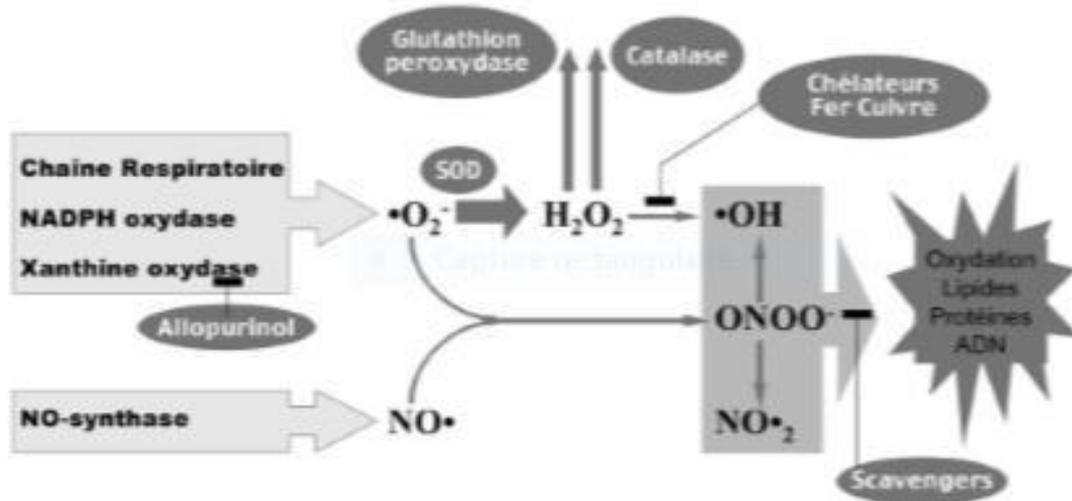


Figure 07. Action des antioxydants au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène.

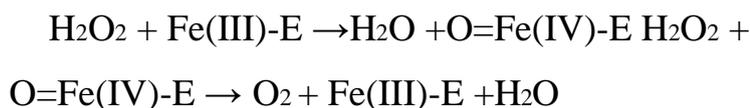
I.1.6.1.1. La catalase

C'est une enzyme que l'on retrouve principalement au sein des peroxysomes, dans les hépatocytes, les érythrocytes et les cellules rénales. Elle catalyse la dismutation de peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau.



Cette enzyme est constituée de quatre chaînes polypeptides, comportant chacune un atome de Fer sous forme ferrique (Fe³⁺). Ces derniers constituent les sites actifs de cette enzyme. Le mécanisme de dismutation du peroxyde d'hydrogène est le suivant :

CHAPITRE I : synthèse bibliographique



Sa vitesse de réaction est uniquement dépendante de la vitesse limite avec laquelle les molécules parviennent au site actif de l'enzyme ce qui en fait une des enzymes les plus efficaces connues.

I.1.6.1.2. La glutathion peroxydase

La glutathion peroxydase (GSH-Px) est une enzyme à sélénium ayant la propriété de pouvoir catalyser la réduction des hydroxyperoxydes. Elle se retrouve dans les liquides extracellulaires ainsi que dans les cellules, au sein du cytosol et des mitochondries. Elle est constituée de 4 sous-unités contenant chacune un atome de sélénium. Il existe 5 isoformes de cette enzyme variant suivant leur localisation dans l'organisme.

Cette enzyme constitue la voie majeure de dégradation des hydroperoxydes. Cette fonction antioxydante est d'autant plus importante qu'elle joue un rôle essentiel avec les superoxydes dismutases et la vitamine E. Elle va donc assurer l'équilibre intra et extracellulaire de la balance pro-/antioxydants.

Son activité principale est de permettre l'oxydation du glutathion par réaction de dimérisation avec la formation d'un pont disulfure. Cette réaction conduit à la génération de H₂ pouvant réduire les espèces environnantes.

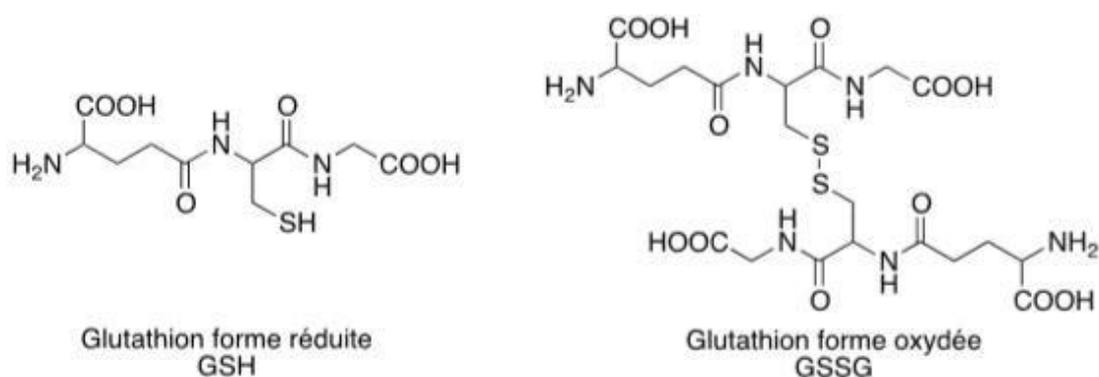


Figure 08. Réaction de dimérisation du glutathion

CHAPITRE I : synthèse bibliographique

I.1.6.1.3. La superoxyde dismutase

Les superoxydes dismutases sont des métalloenzymes (ce sont des enzymes utilisant des métaux comme cofacteurs). Il s'agit d'une des premières lignes de défense contre les ERO. Leur cible privilégiée est l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) qu'elle transforme en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) :



Il existe plusieurs isoformes selon le métal utilisé par l'enzyme (cuivre/zinc, manganèse, fer, nickel). Chez l'Homme, on retrouve seulement trois isoformes de l'enzyme SOD : SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD).

I.1.6.2. Systèmes non enzymatiques

I.1.6.2.1. Endogène

Ce groupe de systèmes anti-oxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoiique. De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion réduit (thiol majeur au niveau intracellulaire) (Favier, 2003). La bilirubine est, quant à elle, capable de piéger les radicaux peroxydes et l'oxygène singulier, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Neuzil et Stocker, 1993).

I.1.6.2.1. Exogène

Ce groupe est représenté par des substances exogènes apportées par l'alimentation, telles que :

a-La vitamine E:

Le terme générique de vitamine E désigne en fait la famille constituée des tocophérols, la forme la plus active étant l'alpha-tocophérol. Cette vitamine est décrite comme étant le principal antioxydant liposoluble dans le plasma et les érythrocytes chez l'homme. Elle empêche ou réduit l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL). Cette oxydation des LDL est associée à l'apparition de l'athérosclérose et donc aux maladies cardiovasculaires (Delattre et al., 2005) et elle est capable, d'une part, de piéger chimiquement l'oxygène (O_2) en s'oxydant en quinone. D'autre part, de réagir avec le radical hydroxyle ($OH\cdot$), mais son principal rôle biologique est de prévenir la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en capturant les radicaux

CHAPITRE I : synthèse bibliographique

peroxydes(ROO.)(Rondeau,2009).

Elle est présente dans les huiles végétales (huiles d'arachide, de soja, de chardon, de tournesol et d'olive pressées à froid) ainsi que dans les noix, les amandes, les graines, le lait, les œufs, et les légumes à feuilles vertes(Bossokpi,2002).

b-La vitamine C:

L'acide ascorbique ou la vitamine C est un antioxydant dans les fluides extracellulaires. C'est un piègeur très efficace des anions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène, des radicaux hydroxyles et peroxydes, et de l'oxygène. Il est présent dans les légumes, le chou, le poivron, les agrumes (Mak et *al.*,2002). Elle joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E (Bossokpi,2002).

C-β-carotène:

Le β-carotène est un type de caroténoïdes et précurseur de la vitamine A. Leur rôle protecteur dans les systèmes biologiques implique la désactivation des EOR telle que ROO[•], qui peuvent faire des dommages oxydatifs(Stahl et Sies, 2002). Il est présent dans les légumes verts, la salade, les carottes, l'abricot, le melon, les épinards...(Boss, 2002).

d-Le coenzyme Q10:

Le coenzyme Q10 forme pré dominante d'ubiquinone chez l'homme et l'animal, peut agir comme un antioxydant liposoluble, en complément de son rôle dans le métabolisme énergétique. Sa fonction serait de stimuler un recyclage efficace de la vitamine E, plutôt que d'agir directement sur les radicaux libres(Beyer, 1992).

I.1.7.Polyphénols comme antioxydants naturel

Les polyphénols constituent une famille importante d'antioxydants présents dans les végétaux. L'alimentation fournit environ 1g de polyphénols par jour principalement par l'apport en fruits et, dans une moindre mesure, en légumes et en céréales. Ils sont présents sous forme d'anthocyanine dans les fruits rouges et le vin rouge, sous forme de flavonoïde dans les agrumes, l'huile de lin et sous forme d'épicatéchine dans le vin, le thé, le chocolat, les pommes, les oignons et les algues brunes. Globalement, ce sont d'excellents piègeurs des EOR et de très bons chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre (Haleng et *al.*,2007). Les composés phénoliques sont capables d'agir comme des antioxydants qui peuvent neutraliser les radicaux libres en donnant un électron ou un atome d'hydrogène. Leurs structures leur confèrent une activité antioxydante aussi

CHAPITRE I : synthèse bibliographique

importante. Les groupes hydroxyle des polyphénols sont bien des donneurs d'atomes d'hydrogènes ; ils peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactifs de l'azote, enfin de réaction, le cycle de génération de nouveaux radicaux est interrompu.

I.1.7.1. Classification des polyphénols

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes (tableau1) qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base allant d'un simple C₆ à des formes très polymérisées, ensuite par le degré de modification du squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation, ...) et par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autre molécules (glucides, lipides, protéines, ou autre métabolites secondaires) (Macheix et *al.*, 2006).

Squelettes carbonés	Classes	Exemples
C ₆	Phénols simples	Cathéchol
C ₆ -C ₁	Acide hydroxybenzoïque	P-hydroxybenzoïque
C ₆ -C ₃	Acide hydroxycinnamique coumarines	Acide caféique Scopoléines
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglone
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbénes	Résvératrole
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes, isoflavonoides	Quercétine- cyanidine, diadzéine
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanés	Pinorésinoles
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines	/
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tannins condensés	/

Tableau 1 : Principales classes des composés phénoliques (Harbone et Williams, 2000)

CHAPITRE I : synthèse bibliographique

I.1.7.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de composés naturels quasiment universels chez les plantes vasculaires (Harborne et Sherratt, 1961) ils forment des pigments responsables de colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (Middleton et *al.*, 2000). On les rencontre assez souvent dans les fruits, les légumes mais également dans plusieurs plantes médicinales (Cooray et *al.*, 2004). Ils ont une origine biosynthétique et structurale commune et par conséquent possèdent tous un squelette de base à quinze atomes de carbones constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3 (Pietta, 2000). Ils se répartissent en plusieurs classes de molécules dont les plus importantes les flavones (Chrysin, apigénine, lutéoline), les flavonols (Kaempférol, quercétine, myricétine), les flavanones (naringénine). Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous forme libre ou glycosylée (Bruneton, 1999).

Les flavonoïdes peuvent être divisés en plusieurs classes selon leur degré d'hydroxylation, méthylation et glycosylation (Harborne et Sherratt, 1961). Des travaux relatifs aux flavonoïdes se sont multipliés depuis la découverte du « French paradox » correspondant à un taux de mortalité cardiovasculaire faible observé chez des populations méditerranéennes associant une consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées (Nijveldt et *al.*, 2001). Leur propriété antioxydante (Van Acker et *al.*, 1996) ainsi que d'autres effets physiologiques potentiellement intéressants expliquent l'intérêt accru que suscitent ces composés et qui a pris un essor non négligeable ces dernières années (Scalbert et Williamson, 2000).

Les propriétés antioxydantes des flavonoïdes sont attribuées à: leur capacité de piéger directement les RL, de chélater les ions métalliques impliqués dans la production des EOR via les réactions de Fenton et Haber-Weiss, d'inhiber quelques enzymes en particulier les oxydases, d'activer les enzymes antioxydantes et de réduire les radicaux α tocophéryl (Cotelle, 2001)

Généralité Sur

Quercus ilex

CHAPITRE I : synthèse bibliographique

I.2.La Plante *Quercus ilex* L

I.2.1.Généralité

Quercus ilex ou chêne vert, parfois appelé chêne faux houx en raison de la ressemblance des ses feuilles avec celle du houx. Le terme vert évoque le caractère persistant de son feuillage durant l'hiver, contrairement à la plupart des autres espèces de chêne. *Quercus ilex* est une espèce appartenant à la famille des fagacées, Originaires du pourtour méditerranéen, il en apprécie le climat, il peut vivre sous d'autres climats océaniques, s'il est bien exposé. Il est typique des paysages de garrigue.

Quercus ilex est communément connu sous le nom de chêne à glands doux en français, EvergreenOak en anglais et البلوط en arabe (Djerroumi et Nacef, 2004).

I.2.2.Classification de la plante

Le chêne vert (*Quercus-ilex*) occupe dans la systématique de la flore la place suivantes :

Taxon	nomination
Règne	Végétal
Embranchement	Trachéophytes
Sous-Embranchement	Ptérospidés
Classe	Angiospermes
Sous-Classe	Dicotylédones
Ordre	Fagales
Famille	Fagaceae
Genre	Quercus
Sous-genre	Sclérophyllodys (Schwartz, 1936)
Espèce	<i>Quercus ilex</i> .L

Tableau 02 : Taxonomie de chêne vert.

CHAPITRE 1 : synthèse bibliographique

I.2.3.Aspect botanique

Le chêne vert est un arbre de moyenne dimension, de 5 à 10 mètres de haut, mais qui peut atteindre 20 mètres en milieu humide.

Le chêne vert présente un système racinaire pivotant pouvant atteindre 10 mètres de profondeur et des racines latérales traçantes et drageonnantes.

Cet arbre présente un houppier ovale avec un couvert épais à ramifications serrées et denses (Girardet, 1980).

Les feuilles sont alternes, coriaces, petites (3 à 8 cm de long, 1 à 3 cm de large), de forme variable. Elles peuvent être entières, dentées ou épineuses, elliptiques, lancéolées, arrondies. Elles sont luisantes, vert foncé sur le dessus, et pubescentes, blanchâtres à grisâtres dessous. Le pétiole est court 0,5 à 2 mm de longueur (Somon, 1987). Comme leur durée de vie est de deux ans, et la répartition par âge aléatoire sur les rameaux, l'arbre est sempervirent (Leceouretal., 1996).



figure 09 . Aspect botanique de Quercus ilex.L

Les fleurs sont unisexuées (arbre monoïque), et la floraison ne s'effectue que sur la première pousse de l'année pour les fleurs femelles, mais peut se retrouver sur la pousse de l'année précédente pour les fleurs mâles. La floraison s'étend d'avril à mai (Floretetal., 1992).

CHAPITRE 1 : synthèse bibliographique

Les fleurs mâles sont très abondantes et se présentent sous forme de châtons de 4 à 7 cm de long, avec une couleur jaunâtre à reflets roux. Les fleurs femelles sont solitaires et se situent à l'aisselle des feuilles supérieures.

Les fruits sont des akènes appelés glands, de dimensions variant de 1 à 3 cm de long. Ils sont regroupés sur un pédoncule commun en nombre de 1 à 5. Les glands mûrissent en un an. Ils sont bruns striés et légèrement pointus au sommet. Ils sont coiffés à leur base arrondie d'une cupule hémisphérique à écailles rapprochées, courtes, de couleur grisâtre.

La fructification est annuelle et se fait du mois de Novembre au mois de Décembre, mais ne commence que lorsque l'individu atteint environ 12 ans.

A partir de 25 à 30 ans, elle devient appréciable et finalement abondante entre 50 et 100 ans (Boudy, 1952). La pollinisation est effectuée par les insectes, mais les fruits sont dispersés par les animaux.

Selon Boudy (1952) la régénération du chêne vert est très lente et représente son principal handicap dans la concurrence avec les autres essences forestières. Mais sa vitalité est remarquable du fait qu'il rejette des souches jusqu'à un âge très avancé. Sa longévité moyenne est de 200 à 300 ans et plus.

I.2.4.Habitat et distribution géographique

Le chêne vert occupe une superficie mondiale de 200.000 ha des arbres forestiers les plus importants dans la région méditerranéenne. Il est réparti dans tout le Bassin méditerranéen , de la Grande Bretagne jusqu'à l'Himalaya ; les espèces les plus âgées se rencontrent en Asie centrale (Dehmani et Megrerouche, 2002).

En Algérie, cette essence est présente de la frontière Tunisienne à celle du Maroc. Le chêne vert s'étend surtout dans la partie occidentale. Il couvrait une grande superficie (680 000 hectares selon Boudy (1950), alors que Letrouch-Bellarouci (1991) indique une superficie de (354 000 hectares).



Figure 10. Répartition géographique du Chêne vert (Michaud, 1995)

I.2.5. Composition chimique

En étudiant la composition chimique de *Quercus*, elle dépose en éléments minéraux tels calcium, potassium, fer et magnésium, des protéines et des matières organiques (Papatheodorou et Stamou, 2004), et selon la littérature les feuilles de chênes sont connues, pour leur richesse en tanins (Dawra *et al.*, 1988), elle contient aussi de la lignine (Ben salem *et al.*, 2005), des molécules organiques volatiles biogéniques tels les terpènes (Ormeno *et al.*, 2007).

I.2.6. propriété biologiques

les feuilles, l'écorce et les glands de *Quercus ilex* L sont indiqués en thérapeutique comme des calmants, l'écorce est utilisée contre les gerçures et les dermatoses et en poudre antihémorragique (Belkader, 2003).

Il existe plusieurs espèces de chêne mais leurs propriétés thérapeutiques sont quasiment identiques. On l'utilisait pour les propriétés astringentes de son écorce, de ses feuilles et de ses glands. En décoction, l'écorce du chêne est employée contre les irritations de la gorge et l'angine. On l'administre en lavement et on l'applique en onguent ou en lotion pour soigner les hémorroïdes, les fissures anales, les petites brûlures et les affections de la peau. On la prescrit moins fréquemment contre la diarrhée, la dysenterie, les varices et les saignements du rectum.

CHAPITRE 1 : synthèse bibliographique

L'écorce, en poudre, est inhalée pour traiter les polypes du nez, ou appliquée sur l'eczéma pour assécher la zone atteinte. La galle est très astringente, et peut être utilisée à la place de l'écorce (Djerroumi et Nacef, 2004). Les composées phénoliques, tannins et les triterpènes des chênes ont été avéré responsable de beaucoup de prestations maladies, inclinant l'activité antibactérienne, antivirale, anti-carcinogène, anti-inflammatoires et antiallergique (Fernandes et al., 2011).

Chapitre II :

Matériel et

Méthodes

II. Matériels et méthodes

II.1 Matériels

II.1.1 Matériel végétal

La récolte de l'écorce de *Quercus ilex* a été effectuée en mars 2019 de la région de Zenouna (Wilaya de Bordj Bou Arréridj).

II.1.2 Appareillage et produits chimique :

Pour réaliser cette étude, on a utilisé un ensemble d'équipements, de verreries, d'appareillages et de produits chimiques :

Produits :

- ✓ Trichlorure d'aluminium $AlCl_3$.
- ✓ Les étalons poly-phénoliques (quercétine, acide gallique)
- ✓ Acide ascorbique.
- ✓ Méthanol
- ✓ Carbonate de sodium (Na_2CO_3) .
- ✓ Folin-ciocalteu
- ✓ DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl).

Appareils et verreries :

- ✓ Rota vapeur (BUCHI).
- ✓ Spectrophotomètre UV-visible (SHIMADZU : UV mini – 1240).
- ✓ Etuve.
- ✓ Agitateur magnétique.
- ✓ Vortex.
- ✓ Micropipettes
- ✓ Balance de précision.
- ✓ plaque chauffante.
- ✓ différents verrerie (ballon, tube, bécher, entonnoirs, erlenmeyer...etc).

Chapitre II : Matériels et Méthodes

II.2.méthodes

II.2.1. Préparation de matériel végétal

II.2.1.1 Broyage et tamisage

Une fois que la plante est bien séchée, elle est broyée à l'aide d'un broyeur électrique, puis tamisée à l'aide d'un tamiseur. La poudre récupérée a été conservée dans un récipient en verre à l'obscurité et à une température ambiante pour utilisation ultérieure.

II.2.2.Préparation de l'extrait brut

II.2.2.1.Préparation de l'extrait méthanolique

Une quantité de 25g de la poudre est mise à macérer dans 250 ml de méthanol, sous agitation douce pendant une nuit à température ambiante. L'extrait alcoolique est récupéré après filtration du mélange à l'aide d'un papier filtre, le méthanol est éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite dans un rota-vapeur (BÜCHI). L'extrait est séché dans l'étuve à 40C° pendant 2 jours. Permettant ainsi d'obtenir l'extrait brut méthanolique(Meziti, 2007).



Figure 11. Extraction par macération à l'aide d'un solvant méthanolique

Chapitre II : Matériels et Méthodes

II.2.2.1 Préparation de l'extrait aqueux:

l'extrait aqueux est préparé par décoction de 100 g de la poudre de *Quercus ilex* dans 250 ml d'E.D, pendant 10 min à température élevée. L'extrait aqueux est récupéré dans un premier temps après filtration du mélange à l'aide d'un papier filtre. L'extrait est séché dans l'étuve à 40C° pendant 2 jours .Permettant ainsi d'obtenir un extrait caractérisé par une couleur brune foncée, qui est considéré comme étant l'extrait brut.



Figure 12 . Extraction par décoction à l'aide d'eau distillé

Le rendement en pourcentage (%), est défini comme étant le rapport entre la masse d'extrait brute et celle de la plante sèche en poudre. Il est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rdt} = (\text{PB} / \text{PA}) \times 100$$

PB : poids d'extrait brut

PA : poids de la plante sèche en poudre enlever

II.2.3. Analyse des extraits de *Quercus ilex.L*

II.2.3.1. Dosage des composés phénoliques

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu selon (Li et al., 2007).

Chapitre II : Matériels et Méthodes

Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribereau, 1968).

La coloration produite, dont l'absorption maximum à 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Ghazi et Sahraoui, 2005).

Mode opératoire

Un volume de 1 ml de réactif de Folin (10% : 10 fois dilué) est ajouté à 200 μ l d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) avec des dilutions convenables, Après 4 min, 800 μ l d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel.

Après 1.5 heures d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, L'absorbance est mesurée à 765nm par un spectrophotomètre. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-160 μ g/ml) et est exprimée en μ g d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (μ g EAG/mg d'extrait).

II.2.3.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium (Baharun et al., 1996) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits aqueux et méthanolique de *Quercus ilex*.

principe

les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre en position 5 susceptible de donner en présence de chlorure d'aluminium un complexe jaunâtre par chélation de l'ion Al^{+3} . La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présente dans l'extrait (Ribéreau-Gayon et Gautheret, 1968).

Mode opératoire

À 1 ml d'échantillon (préparés dans le méthanol) est ajouté 1 ml de la solution d' $AlCl_3$ (2% dans le méthanol). Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0-40 μ g/ml) et est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (μ g EQ/mg d'extrait).

Chapitre II : Matériels et Méthodes

II.2.3.3.L'Activité antiradicalaire

L'activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique et de l'extrait aqueux de *Quercus ilex* évaluée en utilisant le Diphénylpicryl-hydrasyl (DPPH) comme un radical libre relativement stable selon le protocole décrit par Mansouri et *al* (2005)

principe

Le 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre, stable et centré par l'azote qui porte un électron impair. Il est de couleur violette foncée. En présence d'antioxydants, il réagit avec eux par l'intermédiaire de deux mécanismes différents : une abstraction directe de l'hydrogène des groupes d'hydroxyles ou un processus de transfert d'électron, pour former un produit final stable qui est le diphenyl-b-picrylhydrazine coloré en jaune et qui donne une absorption forte à 515 nm (Choi et *al.*, 2002).

Mode opératoire

La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. 100 µL des solutions d'extraits ou standards (acide ascorbique) sont ajoutés à 1900 µL DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm .

L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\%d'activité\ antiradicalaire = [(Abs_{517\ contrôle} - Abs\ échantillon_{517}) / Abs\ 517_{contrôle}] \times 100$$

Chapitre III :
Résultats et
Discussion

Chapitre III :Résultats et Discussion

III.1 Préparation des extraits

Afin d'extraire les principes actifs (polyphénols) contenus dans la plante une extraction de type solide liquide (contact direct entre le solide et le solvant) est réalisée.

Son principe consiste à la séparation des composés phénoliques solubles par diffusion à partir d'une matrice solide (poudre) en utilisant une matrice liquide (solvant). Quand une matrice solide est en contact avec un solvant, les composants solubles dans le matériel migrent vers le solvant ; ainsi, l'extraction est due au transfert de matière du principe actif de la matrice vers le solvant, selon un gradient de concentration (Kamaliroosta et al., 2012).

La préparation des extraits à partir d'écorce de *Quercus ilex* a été effectuée par deux méthodes différentes décoction et macération dans l'eau distillée et le méthanol respectivement. De ce fait, deux extraits différents ont été obtenus: l'extrait aqueux (EAq), l'extrait méthanolique (EMe). La couleur, l'aspect ainsi que le rendement de chaque extrait par rapport au poids de la matière végétale utilisée pour l'extraction sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 03 : Aspects, couleurs et rendements des extraits de *Quercus ilex*

Extrait	Aspect	Couleur	rendement
Extrait méthanolique	Poudre	brune foncée brillante	2.96%
Extrait aqueux	Poudre	brune foncée	3.16%

Le rendement d'extrait aqueux (3.16 %) est plus élevé que celui de l'extrait méthanolique (2.96%) malgré le contact prolongé de la plante avec le méthanol durant la macération, cela s'explique probablement par l'effet de la chaleur qui a accéléré le phénomène d'extraction

MEZAHM (2015) a trouvé un rendement plus élevé (13.8%) à partir des feuilles de *Quercus ilex* L en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction .

Chapitre III :Résultats et Discussion

Par ailleurs Hayouni et ces collaborateurs, (2007) trouvent un rendement beaucoup plus faible dans les feuilles de l'espèce *Q. coccifera* en utilisant l'eau, chloroforme et l'acétone comme solvant d'extraction.

Toutefois, Il est difficile de faire une comparaison de nos résultats avec les données bibliographiques en terme de taux d'extraction, sachant que elles varient en fonction des conditions biotiques (espèce, organe et l'étape physiologique), abiotiques (facteurs édaphiques) et le type du microclimat (Atmani et al., 2009); et plusieurs paramètres qui influencent sur les taux d'extractions pour la même espèce végétale, telle que la température, la méthode d'extraction utilisée, la granulométrie de la poudre, le temps de macération, ainsi que les solvants employés et leur degré de pureté (Hayat et al., 2009).

III. 2 Analyse des extraits

III.2.1. Dosage des polyphénols

Les polyphénols constituent une famille importante d'antioxydants présents dans les végétaux, la teneur des extraits de *Quercus ilex* L en polyphénols totaux est estimée par la méthode de Folin- Ciocalteu en utilisant l'acide gallique comme standard. (figure13) les résultats sont exprimés en (mg EAG/g d'extrait)

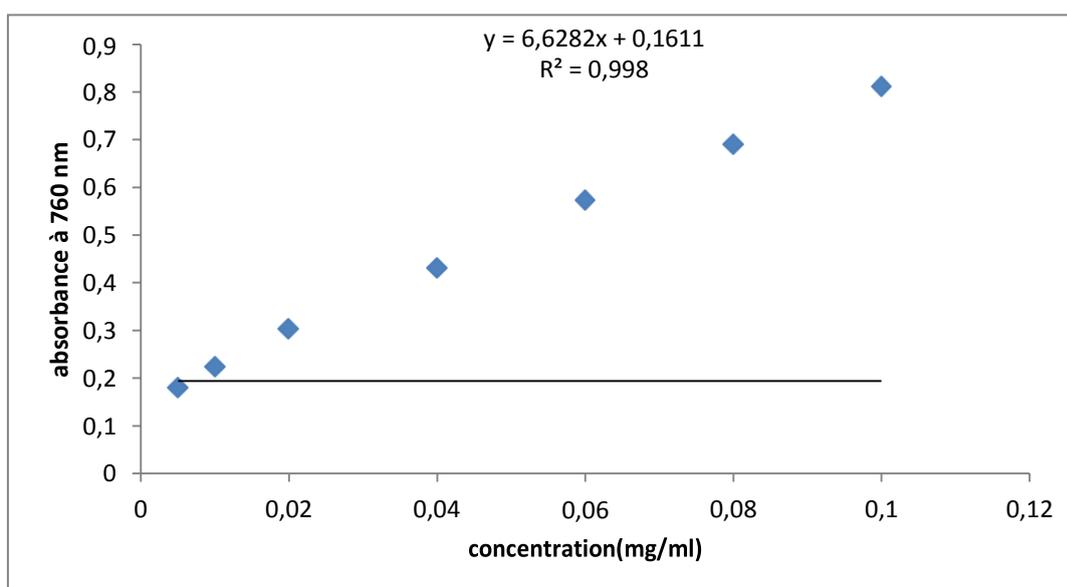


Figure 13. Droite d'étalonnage d'acide gallique (moyenne des trois essais)

Chapitre III : Résultats et Discussion

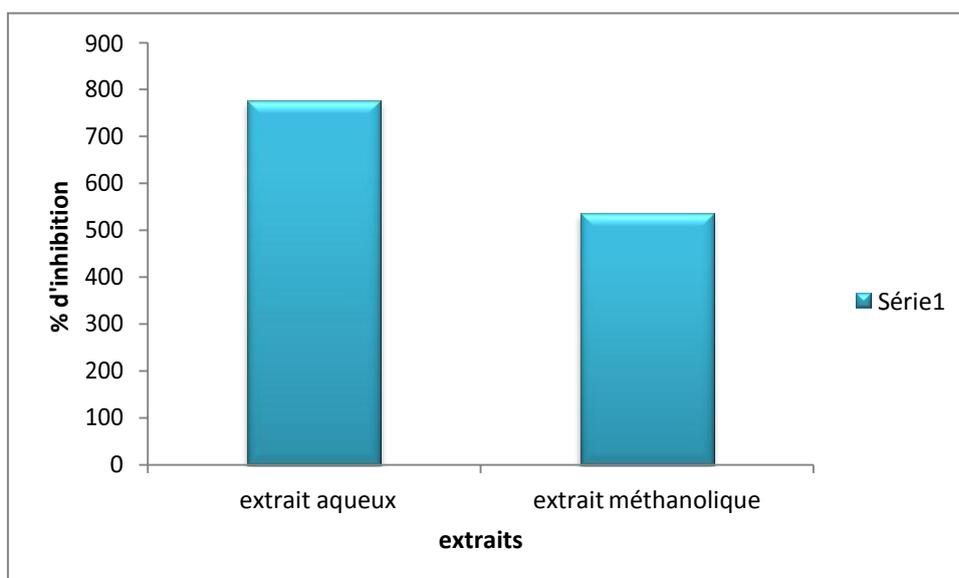


Figure 14 .Représentation graphique des Taux de polyphénols totaux (PT) des écorces de deux extraits étudiées.

Les résultats obtenus montrent que le taux de polyphénols totaux varie entre les deux extraits étudiés. L'extrait aqueux est le plus riche en polyphénols totaux avec une teneur de 776 µg EqAG/ mg , tandis que l'extrait méthanolique révèle une teneur faible 536 µgEAG/ mg . Ces résultats se concordent avec les travaux de la bibliographie et s'intègrent dans l'intervalle des données rapportées par (Karioti, 2010) (0.525 mg EAG/g MS à 12.31 mg EC/g MS)

Fernandes et ses collaborateurs, 2011 indiquent que le taux de polyphénols totaux solubles dans l'extrait des feuilles de *Quercus suber* est 12,31%.

Fernandes et ces collaborateurs(2010) ont analysé l' extraits méthanolique de feuilles de *Quercus suber* par HPLC et GC/MS, les résultats obtenus révèle la présence des tanins et de plusieurs acide sphénoliques ; acide protocatechique, acide gallique, acide caféique, acideferullique et l'acide ellagique.

III.2.2.Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes est réalisé par la méthodes de trichlorure d'aluminium en utilisant la quercétine comme standard (figure 15) .la teneur des extraits en flavonoïdes est exprimé en µg EQ/mg d'extrait.

Chapitre III : Résultats et Discussion

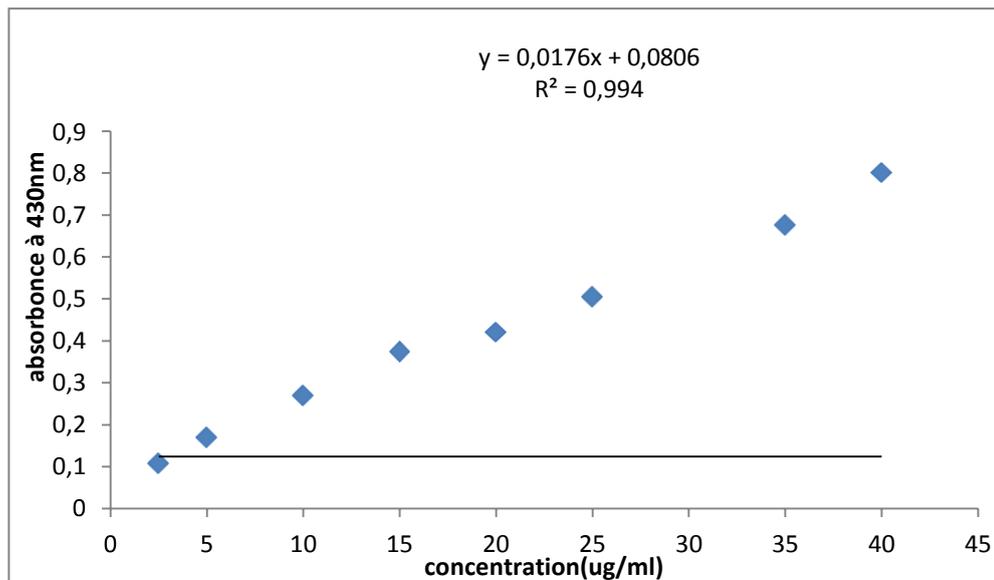


Figure 15. Droite d'étalonnage de quercétine (moyenne de trois essais)

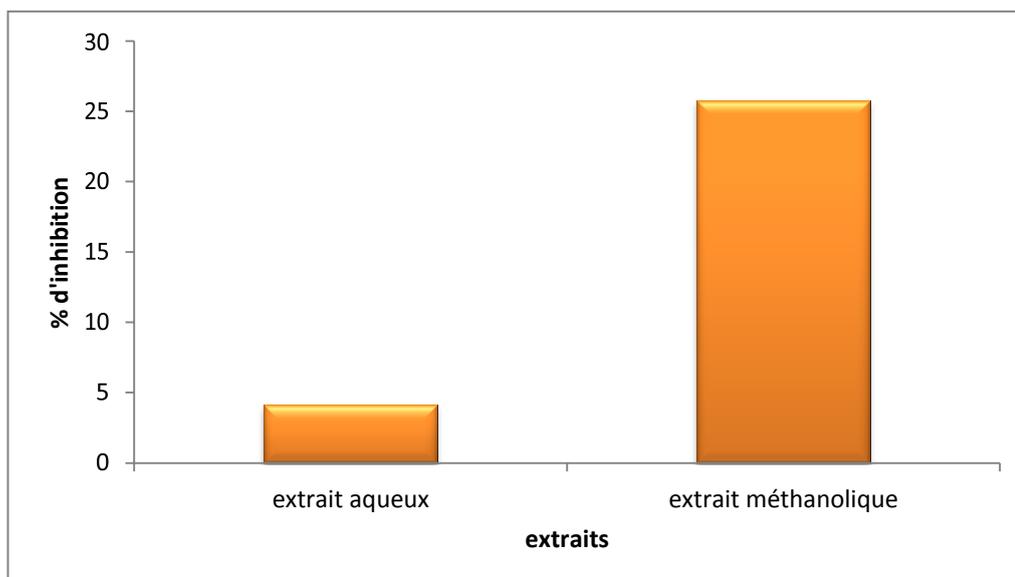


Figure 16. Représentation graphique des Taux de flavonoïde des écorces de deux extraits étudiées.

les résultats obtenue montrent également une différences dans la teneurs des extraits étudiées en flavonoïdes.

Chapitre III : Résultats et Discussion

L'extrait méthanolique représente l'extrait le plus riche en flavonoïdes 25 μg EqQ/mg par contre l'extrait aqueux contient uniquement 4 μg EQ/ mg.

Les investigations phytochimiques de Karioti et ses collaborateurs (2010) sur les extraits méthanoliques de *Quercus ilex* montrent que cette espèce présente une source importante des flavonoïdes glycosylés est surtout en Kampferol (1.22%) qui a été trouvé avec des quantités minimales dans d'autres plantes (0.5%).

III.3 Activité antioxydante des extraits de *Quercus ilex* L DPPH:

L'activité antiradicalaire des extraits de *Quercus ilex* L a été évaluée en utilisant DPPH comme un radical libre relativement stable.

Les profils de l'activité antiradicalaire obtenue avec les extraits aqueux, méthanoliques et l'acide ascorbique révèlent un effet antioxydant dose dépendant (figure 14.15.16)

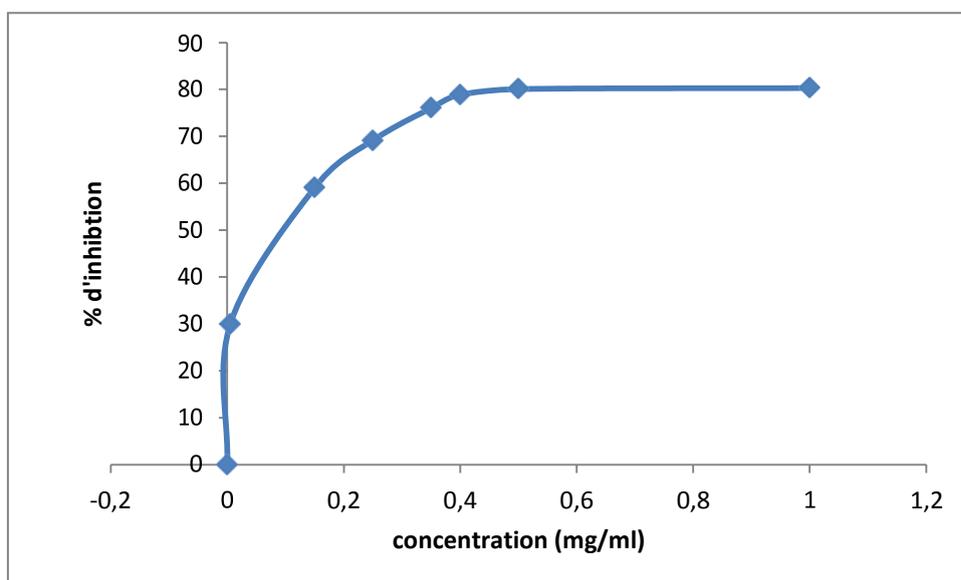


Figure 17. Pourcentage de réduction du radical libre DPPH en fonction des concentrations d'extrait méthanolique

Chapitre III : Résultats et Discussion

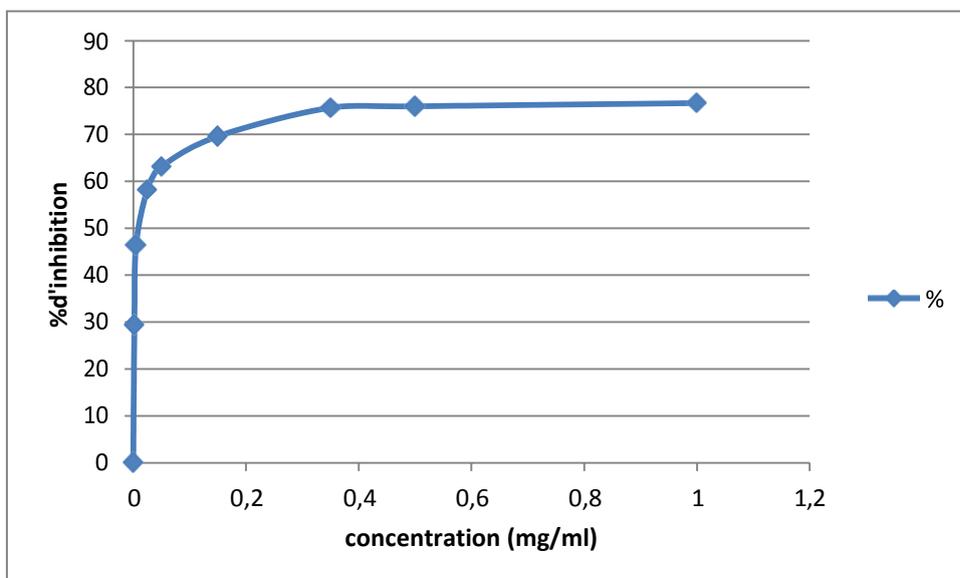


figure 18 .Pourcentage de réduction du radicale libre DPPH en fonction des concentrations de
Extrait aqueux

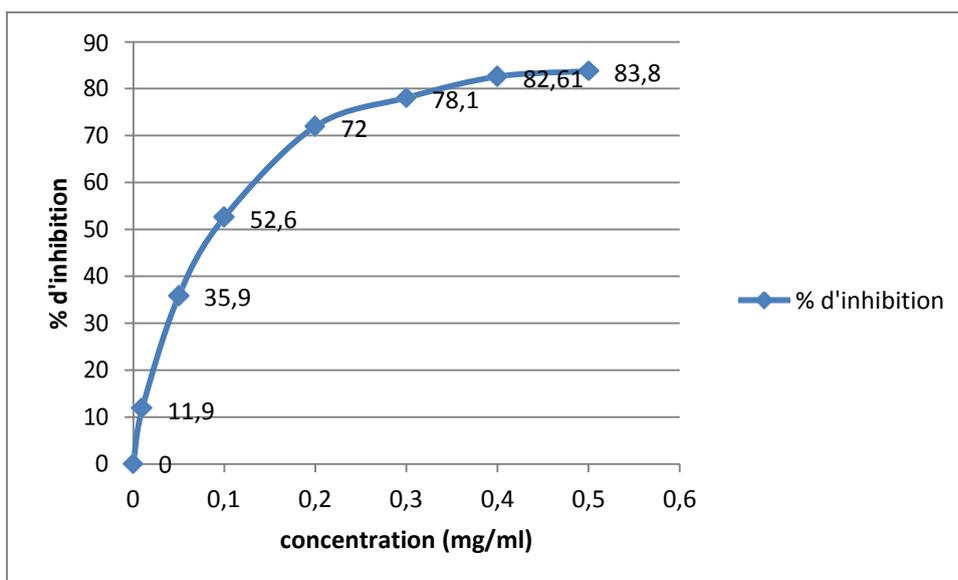


Figure 19. Pourcentage de réduction du radicale libre DPPH en fonction des concentrations
d'acide ascorbique

Dans les 3 profils ci-dessus, le % d'inhibition est dose dépendant.

Chapitre III : Résultats et Discussion

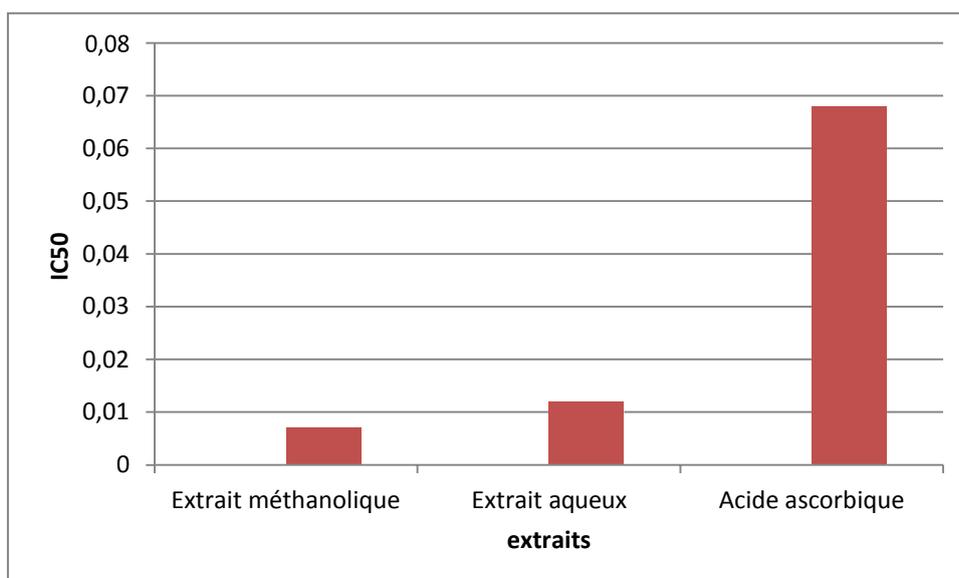


figure 20. Les concentrations efficaces à piégé 50% (EC50) du radical DPPH par les extraits étudiés et l'acide ascorbique.

Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant, le paramètre IC50 est introduit. L'IC50 est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydants nécessaires pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante est élevée.

Les IC50 trouvées sont représentées dans la figure 16, Les résultats obtenues montrent une activité anti radicalaire considérables dans des deux extraits de *Quercus ilex* avec des IC50 de l'ordre de 0,007 mg/ml et 0.012mg/ml 1 pour l'extrait méthanolique et aqueux respectivement.

L'extrait méthanolique possède une activité antioxydante presque 2 fois supérieure à celle de l'extrait aqueux.

L'acide ascorbique (IC50 =0,06 mg/ml) a montré un pouvoir antioxydant inférieur à celui de l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique.

L'activité antioxydante élevé de l'extrait méthanolique est attribuée à sa richesse en polyphénols et en flavonoïdes, ces composés sont connus par leur capacité de réduire les radicaux libres par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyle

Conclusion

Conclusion

Conclusion:

Les plantes médicinales sont considérées depuis des siècles comme une source majeure des produits utilisés en thérapeutique. Parmi ces produits, on trouve les polyphénols qui suscitent actuellement beaucoup d'intérêts en raison du bénéfice qu'ils pourraient apporter en termes de prévention et traitement des maladies.

Quercus ilex est une plante largement exploitée dans la médecine traditionnelle.

L'estimation quantitative des polyphénols totaux et de flavonoïde des extraits de l'écorce de *Quercus ilex* par la méthode de folin-ciocalteu et trichlorure d'aluminium révèle la richesse de l'extrait méthanolique en comparaison avec l'extrait aqueux.

De même, l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits étudiés par la méthode de piégeage de radical libre DPPH, montre que l'extrait méthanolique présente un pouvoir antioxydant plus important que celui de l'extrait aqueux et de l'acide ascorbique.

L'activité importante exercée par l'extrait méthanolique s'expliquent probablement par sa richesse en polyphénols et en flavonoïdes .

D'après les résultats obtenus, nous pouvons déduire que les extraits testés et plus particulièrement l'extrait méthanolique contient des antioxydants et peuvent être employés pour des applications thérapeutiques, et comme perspectives on propose :

D'identifier les molécules responsables de l'activité antioxydante par des méthodes plus performantes HPLC, spectrométrie de masse.

De confirmer l'activité antioxydante par des études *in vivo*

Référence

- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., Pinkas, M., Luycky, M., Gazin, M. (1996) Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*. 46: 1086-1089.
- Beckman, K.B., Ames, B.N. (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews*. 78: 547-581.
- Beyer, R. E. (1994), the role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes, Interaction with vitamin E and coenzyme Q. *J Bioenerg Biomembr.*; 26, 349-358.
- Bossokpi, I. P. L. (2002). Etude des activités biologiques de *Fagarazanthoxyloïdes* Lam (Rutaceae) (Doctoral dissertation, Thèse de pharmacie, Université de Bamako, Bamako).
- BOUDY, P., 1952.- Guide du forestier en Afrique du Nord. Ed. La Maison Rustique, Paris. 505p.
- Bruneton, J. 1999. Pharmacognosie, phytochimie plantes médicinales 3^{ème} édition. Tec&doc. Paris.
- Christophe, P. & Christophe S. (2011). Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain. Edition Springer, p 84.
- Dalatre, J., Beaudoux, J. L., Bonnefont-Rousselot, D. Radicaux libres et stress oxydant (aspect biologique et pathologiques). (2005).
- Dizdaroglu M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res*. 1 sept 1992;275(3):331- 42.
- Flavonoid glucosides, *Food Chemistry* 123 131-142.
- FLORET, C., GALAN, M.J., LE-FLOCH, E. & ROMANE, F., 1992.- Dynamics of holm oak (*Quercus ilex* L.) coppices after clearcutting in southern France. *Veg*. 99 (100) : 97-105.
- Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. déc 1988;85(24):9748- 52.
- GIRARDET, P., 1980.-Chêne vert (*Quercus ilex*). Bull. Vulg. Ed. C.A.V.I.F. (Secrétariat d'état aux forêts et à la mise en valeur des terres). Alger. 6pp.
- Gutteridge JMC, Halliwell PB. Invited Review Free Radicals in Disease Processes: A Compilation of Cause and Consequence. *Free Radic Res Commun*. 1 janv 1993;19(3):141- 58.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liege*. (2007); 62(10): 628-38.272
- Heller, R., Esnault, R., et Delance, C. 1998. physiologie végétale 1-nutrition 6^{ème} édition. Dunod. Paris, Pp 289-288.
- Karioti, A, Bilia, A.R, Skaltsa, H, (2010), *Quercus ilex* L A rich source of polyacylated
- Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol*. 1993;23(1):21- 48.
- LECOEUR, C., AMAT, J. P., DORIZE, L. & GAUTIER, E., 1996.- Eléments de géographie physique. Coll. Grand Amphi. Breal: 416p.
- LEVERVE, X. (2009). Stress oxydant et antioxydants ? *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 44(5), pp.219-

Référence

224.

Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., Jiang, Y., Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemist.* 102(2007) 771-776.

Macheix, J.J., Fleriet, A et Christian, A .2006. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. PPTUR Lausanne.

Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., Kefalas, P. (2005) Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry.* 89: 411-420.

Marfac, A. 2003. Radiolyse Gamma des Flavonoïds. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de Depsides. Thèses de Doctorat. Université de Limoges

Mark, S., Skerget, M., Kenz, Z., Antioxydant and antimicrobial activity of hyperoxia-mediated vasoconstriction and impairment of endothelium-dependent vasodilatation, *American Journal Physiol.* (2002); 282, 414-421.

Martínez-Cayuela, M. (1995) Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie.* 77: 147-161.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: The first twenty years (1968–1988). *Free Radic Biol Med.* 1 janv 1988;5(5):363- 9.

Papazian, L. & Roch, A. (2008). Le syndrome de détresse respiratoire aiguë, Edition Springer, p 153.

Pearl PL, Taylor JL, Trzcinski S, Sokohl A. The pediatric neurotransmitter disorders. *J Child Neurol.* mai 2007;22(5):606- 16.

Ribéreau-Gayon. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Ed Dunod, Paris, p : 5-7, 10-13, 55-86.

Richard MJ, Belleville F, Chalas J, Ceballos-Picot I, Vitoux D, Boyer MJ, et al. Les glutathion peroxydases : intérêt de leur dosage en biologie clinique. *Ann Biol Clin (Paris).* 24 avr 1997;55(3):195- 208.

Rochette, L. (2008). Stress oxydant et sepsis. *Réanimation*, 17(6), pp.1-4.

Rondeau, P. (2009). Stress oxydant et glycation: relation structure et activités biologiques de l'albumine in vitro et in vivo dans le cadre de la pathologie diabétique (Doctoral dissertation, Université de la Réunion).

Sanchez-Moreno, C. (2002) Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology.* 8: 121-137.

Shahidi, F ; Naczk, M. 1995. Food phenolics: sources chemistry effect application. Technomic Publishing. Pp 3-47.

SOMON, E., 1987.- Arbres, Arbustes et Arbrisseaux d'Algérie. Ed.O.P.U. 143pp.

Stahl, W., et Sies, H., Caroténoïde and protection against UV radiation. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* (2002); 15, 291-296.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 10 mars 2006;160(1):1- 40.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 10 mars 2006;160 (1):1- 40.