



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج

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

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الارض 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 Biologiques



Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

Intitulé

Tests phytochimiques et activité antioxydante des parties aériennes de *Rhamnus alaternus* L.

Présenté par : SAHRAOUI Amel
SADKI Amel

Devant le jury :

Président : M^{me} FATMI Widad MCB Univ Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A
Encadrant: M^{lle} BOUSSAHEL Soulef MCB Univ Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B. A
Examineur : M^{me} MEZITI Asma MCB Univ Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B. A

Année universitaire : 2018/2019

Remerciement

« La connaissance est la seule chose qui s'accroît lorsqu'on la partage ».

Avant tout, on tient à remercier le bon Dieu, de nous avoir donné le courage et la volonté pour réaliser ce travail.

Nous tenons à remercier très chaleureusement notre promotrice Dr. Boussahel S, aussi bien que pour ses conseils, pour sa disponibilité et son soutien, soyez assurée, Docteur de toutes nos estimations et nos profonds respects.

Nous exprimons nos profonds remerciements aux membres de jury qui vont juger notre recherche.

Nos remerciements très chaleureux vont aux ingénieures de laboratoire pour leur aide et leurs conseils.

Nous remercions nos camarades et nos amies pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.

Un grand merci à toutes personnes 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.

Dédicace

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect et la reconnaissance.

Je dédie ce mémoire :

À ma chère Mère : Tu représentes pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leurs vies et leurs études.

À mon très cher père : Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour toi.

A mes chers frères et mon petit frère Mahdi Pour leur soutien.

A mes amie(s) Lamara.k , Amina, Imene, kanza , Ratiba , pour m'avoir encourager et aider beaucoup.

Toutes la promo BIOCHIMIE Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, santé et réussite.

Sahraoui Amel

Dédicace

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

Je dédie aussi ce travail à mon mari, je le remercie pour son aide précieuse, son soutien et son amour.

A mon petite bébé Mira

A ceux qui m'ont aidé et m'ont donné joie et bonheur, Un grand merci à mes trois sœurs « Dallel, Rahma et Sara »

A mes deux beaux-frères adorés « Riad et Aymen »

A toute ma famille

A tous mes amis (es) : Bahia, Nadjoua ,Habiba, Nawel ,Hasiba, Rania, Dalila

Et surtout à mon binôme Amel qui a partagée avec moi les moments difficiles pour réaliser ce travail.

Sadki Amel

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction..... 1

Partie bibliographique

Chapitre I

Stress oxydatif et activité antioxydante

1. Définition du stress oxydant	3
2. Les Radicaux libre.....	3
2.1. Définition.....	3
2.2. La nature des radicaux libres.....	4
2.2.1. Les espèces réactives de l'oxygène.....	4
a. Le radical anion Superoxyde.....	4
b. Le peroxyde d'hydrogène.....	4
c. Le radical hydroxyle.....	4
2.2.2. Les espèces réactives de l'azote.....	4
a. Le monoxyde d'azote	4
b. Le peroxydinitrite.....	5
2.3. Les cibles des radicaux libres.....	5
2.3.1. Oxydation des composés lipidiques.....	5
2.3.2. Oxydation des composés protéiques.....	5
2.3.3. Oxydation de l'ADN.....	5
3. Les antioxydants.....	6
3.1. Définition	6
3.2. Le système de défense des antioxydants	6
3.2.1. Les antioxydants endogènes (enzymatiques)	6
a. La catalase.....	6
b. Les superoxydes dismutases.....	6
c. La glutathion peroxydase.....	7
3.2.2. Les antioxydants exogènes (non enzymatiques)	7
a. Les oligo-éléments.....	7
b. La vitamine E.....	7
c. La vitamine C.....	7
d. Les tanins.....	7
e. Les coumarines.....	7
f. Les caroténoïdes.....	8
g. Les composés phénoliques	8
h. Les flavonoïdes	8

Chapitre II

Les métabolites secondaires

1. Définition	8
2. Les polyphénols	8
2.1. Définition.....	8
2.2. Classification des polyphénols.....	9
2.2.1. Les acides phénoliques	9
a. Les acides hydroxybenzoïques.....	9
b. Les acides hydroxycinnamiques.....	9
2.2.2. Les flavonoïdes.....	9
2.2.3. Les tannins.....	10
a. Les tannins condensés.....	10
b. Les tannins hydrolysables	10

2.2.4. Les coumarines	10
2.2.5. Les stilbènes	10
2.2.6. Les lignanes	10
2.3. Biosynthèse des polyphénols.....	10
2.3.1. La voie de Shikimate	10
2.3.2. La voie de l'acétate malonate	11
2.4. Propriétés antioxydantes des polyphénols.....	11

Chapitre III

Propriétés biologiques de *Rhamnus alaternus* L

1. Description et caractéristiques.....	12
2. Classification	12
3. Nomenclature	12
4. Description botanique	13
5. Description de l'habitat.....	13
6. Propriété biologique et domaine d'utilisation	14
7. Composition chimique et biochimique de <i>Rhamnus alaternus</i>	14

Partie expérimentale

Matériels et Méthodes

1. Matériels.....	15
1.1. Matériel végétal.....	15
1.1.2. Appareils et produits chimiques.....	15
2. Méthodes.....	16
2.1. Préparation de la matière végétale.....	16
2.2. Préparation des extraits.....	16
2.3. Tests phytochimiques.....	17
3. Dosage des composés phénoliques.....	21
3.1. Dosage des polyphénols totaux	21
3.2. Dosage des flavonoïdes	22
4. Etude de l'activité antioxydante in vitro.....	23
4.1 Test de piégeage du radical DPPH	23
4.2 Test du pouvoir réducteur des ions de fer	24
5. Analyses statistiques.....	25

Résultats et discussion

1. Rendements des extractions	26
2. Tests phytochimiques.....	27
3. Analyses qualitatives des extraits.....	29
3.1. Teneur en polyphénols totaux	29
3.2. Teneur en flavonoïdes.....	31
4. L'activité antioxydante.....	32
4.1. Effet scavenging du radical DPPH.....	32
4.2. Pouvoir réducteur du fer	36
Conclusion et perspectives	40

Références bibliographiques

Résumé

Résumé

Rhamnus alaternus L est un arbuste qui appartient à la famille des *Rhamnaceae*. C'est une plante médicinale largement utilisée en médecine traditionnelle à des fins thérapeutiques à cause de sa richesse en composés actifs. L'objectif de notre étude est l'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles et des rameaux de *R. alaternus* avec le chloroforme, l'acétone et l'éthanol, effectuer une analyse phytochimique et une évaluation de l'activité antioxydante. Le rendement le plus élevée est remarqué dans l'extrait chloroformique (7,45%). L'étude phytochimique a permis de mettre en évidence l'existence d'alcaloïdes, Composés phénoliques, tanins, flavonoïdes et des Coumarines. La quantification des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu et des flavonoïdes par la méthode AICl3 a donné des valeurs plus élevées avec l'extrait chloroformique et l'extrait acétonique où les valeurs sont de: $328,59 \pm 0,018 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait: $48,32 \pm 0,004 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait, respectivement. Ce qui concerne le test DPPH, l'extrait acétonique a montré la plus grande activité inhibitrice avec une IC50 de: $5,899 \pm 0,583 \mu\text{g/ml}$. En outre, la méthode de FRAP montre que l'extrait chloroformique est le plus actif avec une concentration de $0,074 \pm 0,006 \mu\text{g EAA/mg}$ d'extrait.

Mots clés: *Rhamnus alaternus* L, test phytochimique, flavonoïdes, activité antioxydante.

Abstract

Rhamnus alaternus L is a shrub that belongs to the family *Rhamnaceae*. It is a medicinal plant widely used in traditional medicine for therapeutic purposes because of its richness in active compounds. To the objectif of our work is the extraction of phenolic compounds from its leaves and twigs with chloroform, acetone and ethanol, followed by phytochemical analysis and finally the evaluation of antioxidant activity. The highest yield is noted in chloroform extract (7.45%). Phytochemical study has revealed the existence of alkaloids, phenolic compounds, tannins, flavonoids and coumarins. Quantification of the total polyphenols by the Folin-Ciocalteu method and flavonoids by the AICl3 method gave higher values with the chloroformic and the acetone extracts where the values are: $328.59 \pm 0.018 \mu\text{g EAG / mgd ' extract}$, $48,32 \pm 0.004 \mu\text{g EQ / mg of extract}$, respectively. Regarding the DPPH test, the acetone extract showed the greatest inhibitory activity with an IC50: $5.899 \pm 0.583 \mu\text{g / ml}$. In addition, the FRAP method shows that the chloroform extract is the most active with a concentration of $0.074 \pm 0.006 \mu\text{g EAA / mg of extract}$.

Key words: *Rhamnus alaternus* L, phytochemical test, flavonoids, antioxidant activity.

ملخص

Rhamnus alaternus L هي شجيرة تنتمي إلى عائلة *Rhamnaceae*. هو نبات طبي يستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي للأغراض العلاجية بسبب ثرائه للمركبات النشطة. الهدف من هذه الدراسة هو استخلاص المركبات الفينولية من أوراق وأغصان *R. alaternus* بالكلوروفورم والأسيتون والإيثانول، إجراء تحليل كيميائي نباتي، تقييم نشاط مضادات الأكسدة. لوحظ وجود أعلى عائد في مستخلص الكلوروفورم (7.45%)، حيث كشفت دراسة كيميائية نباتية عن وجود فلوينويدات، مركبات فينولية، تانينات، فلافونويدات وكومارين. أعطى القياس الكمي للبوليفينول الكلي بواسطة طريقة Folin-Ciocalteu والفلافونويدات بطريقة AICl3 قيماً أعلى باستخدام مستخلص الكلوروفورم ومستخلص الأسيتون بقيم تقدر بي: $328.59 \pm 0.018 \mu\text{g EAG / mg}$; $48,32 \pm 0.004 \mu\text{g EQ / mg d'extract}$ ، respectively. بالنسبة لاختبار DPPH، أظهر مستخلص الأسيتون أكبر نشاط مثبط مع $0.583 \pm 5.899 \mu\text{g/ml}$ IC50. بالإضافة إلى ذلك، توضح طريقة FRAP أن مستخلص الكلوروفورم هو الأكثر نشاطاً بتركيز $0.074 \pm 0.006 \mu\text{g EAA / mg}$ d'extract.

الكلمات المفتاحية: *Rhamnus alaternus* L، اختبار المواد الكيميائية النباتية، الفلافونويدات، نشاط مضادات الأكسدة.

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique.

AlCl₃, 6H₂O : Chlorure d'aluminium hydraté.

BHT: Butylhydroxytoluène.

CI₅₀: Concentration inhibitrice 50%.

Cl⁻: Ion chlore.

DPPH: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.

ERN: Espèce Réactive azotées.

ERO: Espèce Réactive de l'Oxygène.

FCR: Folin-Ciocalteu.

Fe²⁺: Ion ferreux.

Fe³⁺: Ion ferrique.

FeCl₃: Chlorure de fer.

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power.

GPx: Glutathion peroxydase.

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène.

H₂SO₄: Acide sulfurique.

HCL: Acide chlorhydrique.

HO[•]: Radical hydroxyle.

HOCL: Acide hypochlorique.

I%: Pourcentage d'inhibition.

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%.

K₃Fe(CN) 6: ferricyanure de potassium.

KI : Iodure de potassium.

Mg : magnésium.

Na₂CO₃: Carbonate de sodium.

NO[•]: Oxyde nitrique.

NaOH: hydroxyde de sodium

NH₄OH : Ammoniaque.

NO : Le monxyde d'azote.

NOS: NO synthase.

O₂^{•-}: Anion superoxyde.

ONOO⁻ : Le peroxydinitrite.

ONOOH: radical peroxydinitrite .

PARF: partie aérienne rameaux feuilles.

pH: Potentiel d'Hydrogène.

R%: Rendement exprimé en %

ROS: Reactive oxygen species.

SD: Standard de déviations.

SOD: Superoxyde dismutase.

TCA : Acide trichlorure acétique.

UV: Ultraviolet.

Listes des figures

Figure 1: Déséquilibre de la balance entre pro-oxydant et antioxydant.....	3
Figure2: La plante <i>Rhamnus alaternus</i> L (Djaâfra)	15
Figure 3: la partie aérienne (fraîche, sèche et poudre) de <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	16
Figure 4: Schéma récapitulatif le protocole d'épuisement du matériel végétal avec de l'eau.....	18
Figure 5: Schéma récapitulatif le protocole d'épuisement du matériel végétal avec l'éthanol.....	19
Figure 6: Schéma récapitulatif le protocole des Tests phytochimiques pour des autres métabolites secondaires.....	21
Figure 7: Rendements des extraits de la plante <i>R. alaternus</i> L.....	26
Figure 8: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.....	29
Figure 9: Teneurs en polyphénols des trois extraits de <i>R. alaternus</i>	30
Figure 10: Courbe d'étalonnage de quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.....	31
Figure 11: Teneurs en flavonoïdes totaux des trois extraits de <i>R. alaternus</i> L.....	31
Figure 12: Pourcentages d'inhibition du radical DPPH [*] de BHT.....	33
Figure 13: Pourcentages d'inhibition du radical DPPH [*] de quercétrine.....	33
Figure 14: Pourcentages d'inhibition du radical DPPH [*] des extraits (chloroformique, acétonique, éthanolique).....	34
Figure 15: Le pouvoir réducteur des extraits de la plante.....	37
Figure 16: Le pouvoir réducteur du standard « acide ascorbique ».....	38
Figure 17: Évaluation de l'activité antioxydante des extraits de la plante étudiée par la méthode FRAP.....	38
Figure 18: Mécanisme de réduction du Fer par les polyphénols.....	39

Liste des tableaux

Tableau I: Classification scientifique de <i>R. alaternus</i> L.....	12
Tableau II: Les noms vernaculaires de <i>Rhamnus alaternus</i> L	13
Tableau III : Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques recherchés dans la poudre de différentes parties de la plante.....	27
Tableau IV : le pouvoir antioxydant exprimé par IC ₅₀ des antioxydants de références et des extraits testés.....	34

INTRODUCTION

Introduction

De nos jours, Il existe un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. Ce n'est pas seulement dû à leur rôle dans des maladies aigus tels que le traumatisme ou l'ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire (**Guinebert et al., 2005**).

Face aux effets secondaires et aux limites thérapeutiques des médicaments chimiques, le développement de la recherche sur les plantes médicinales a été orienté vers l'obtention de phyto-médicaments (**Ghazghazi et al., 2013**) présentés sous diverses formes galéniques simples répondant à une réglementation précise en matière d'évaluation portant sur l'innocuité, l'efficacité thérapeutique et la stabilité (**Cavero et al., 2013; Ghazghazi et al., 2013**). Ainsi, les extraits de plantes tels que les métabolites secondaires ont suscité ces dernières années un intérêt accru comme source potentielle de molécules naturelles bioactives pouvant constituer une alternative aux produits de synthèse (**Ghazghazi et al., 2013; Touaibia et Chaouch., 2014**).

Le meilleur exemple est les polyphénols qui sont en effet doués de multiples vertus thérapeutiques, ils jouent un rôle très important, principalement, dans la lutte contre les cancers, les maladies cardiovasculaires. Expliquant de ce fait leur grande utilisation dans la fabrication des médicaments. Ils interviennent aussi dans la protection des plantes contre les différentes attaques microbiennes (surtout fongiques) risquant de causer la perte d'une grande quantité de végétation (**Bruneton, 1999**).

C'est pour cette raison nous nous sommes intéressés à étudier une plante médicinale qui est *Rhamnus alaternus* L, qui pousse en Algérie et qui est utilisée en médecine traditionnelle pour avoir ses propriétés médicinales et thérapeutiques.

Rhamnus alaternus une des plantes les plus utilisées dans le bassin méditerranéen, à cause de ses bienfaits, notamment dans le traitement des complications hépatiques, contre la jaunisse et certaines affections dermatologiques (**Ait Youssef, 2006**). Certains auteurs de pays méditerranéens ont entrepris des études limitées sur cette plante comme (**Ben Ammar et al., 2007 ; Ben Ammar et al., 2008 ; Djeridane et al., 2007**).

Dans ce cadre, l'objectif de la présente étude est 1/- d'avoir un extrait brut de la partie aérienne de *Rhamnus alaternus* L. 2/-réaliser des tests phytochimiques qualitative pour avoir les déférents constituant de la plante. 3/- réaliser des tests quantitatives pour déterminer le taux des composés phénoliques ainsi que celui des flavonoïdes. 4/- déterminer les propriétés anti-oxydantes des composés phénoliques d'*Rhamnus alaternus* L.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : stress oxydant et activité antioxydante

Nos cellules et tissus peuvent être soumis à une grande variété d'agressions physiques, chimiques et métaboliques. La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant (Walker *et al.*, 1982).

1. Définition du stress oxydant

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants (Pincemail *et al.*, 1999). Ce déséquilibre peut se produire quand le système de défense antioxydant est surmené par l'augmentation des oxydants, ou lorsque les défenses sont affaiblies par une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants (Kirschvink *et al.*, 2008). (Figure 1).

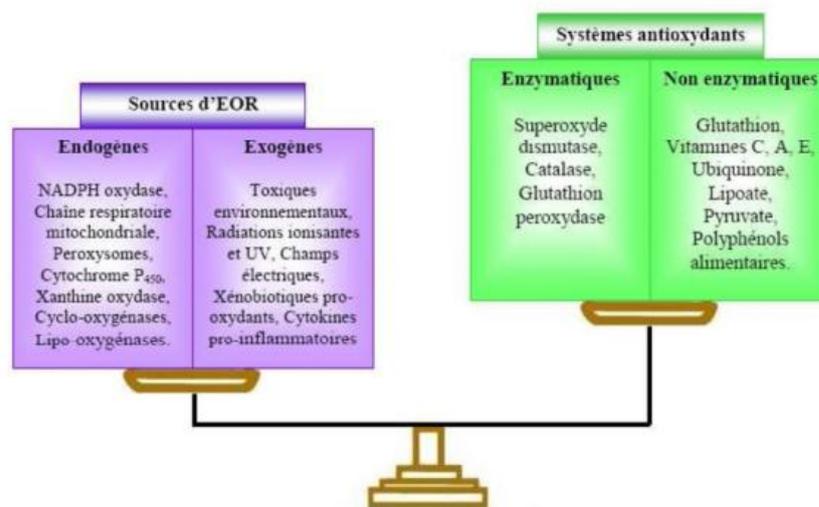


Figure 1: Déséquilibre de la balance entre pro-oxydant et antioxydant (Nkhili, 2009).

2 .Les radicaux libres

2.1.Définition

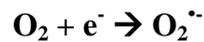
Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se réappairer, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. (Dacosta et Baenziger, 2003).

2.2. La nature des radicaux libres

2.2.1. Les espèces réactives de l'oxygène

a. Le radical anion Superoxyde

C'est la forme réduite de l'oxygène moléculaire par la réception d'un électron, c'est le premier radical formé lors du transport des électrons au niveau de la chaîne respiratoire (Harman, 2000).



b. Le peroxyde d'hydrogène

Il n'a pas d'électrons non appariés et n'est donc pas un radical. A pH physiologique, tout ion peroxyde formé va se protoner pour donner immédiatement du peroxyde d'hydrogène. La nature non ionique de cette molécule lui permet de traverser facilement les membranes cellulaires et ainsi de diffuser très facilement d'où une possibilité d'action à distance (Halliwell, 1997).

c. Le radical hydroxyle HO[•]

C'est le radical le plus dangereux dans l'organisme, il est formé de la réaction de l'anion peroxyde avec l'hydrogène peroxyde.



Cependant, une solution de peroxyde d'hydrogène avec des ions ferreux suffit à fournir des radicaux hydroxyles (Halliwell *et al.*, 1984).



2.2.2. Espèces réactives de l'azote

a. Le monoxyde d'azote

Est synthétisé par les cellules endothéliales via l'action de la NO synthétases par oxydation de l'un des azotes terminaux de l'acide aminé L-Arginine. NO[•] peut réagir avec une grande variété de substances et de radicaux libres et conduire, par exemple après réaction avec H₂O₂, à la formation de nitrite (NO₂) ou de nitrate (NO₃⁻) (Chapelle *et al.*, 2007).

b. Le peroxyinitrite

Il est formé suite à la réaction entre $O_2^{\cdot-}$ et NO^{\cdot} , la forme protonnée du radical peroxyinitrite (ONOOH) est un puissant agent oxydant causant des dommages importants similaires à ceux observés avec le HO^{\cdot} (Barus, 2008).

2.3. Les cibles des radicaux libres

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

2.3.1. Les composés lipidiques

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

2.3.2. Les composés protéiques

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

2. 3.3. l'ADN

Les radicaux libres peuvent induire des effets mutagènes, l'arrêt des réplifications des

ADN nucléaires et mitochondriaux, l'arrêt de l'induction de la transcription ou de la transduction des voies de signalisation. Ils agissent en provoquant des altérations de bases, des pontages ADN-protéines ou des ruptures de brins (**Hadi, 2004; Valko et al., 2006**).

Les cassures observées sont dues aux radicaux OH[•] issus de la réaction de Fenton en présence de fer ferreux chélate à certains acides aminés ou aux groupes phosphates de l'ADN. La prévention de ce processus par l'addition de catalase montre le rôle du peroxyde d'hydrogène dans les lésions de l'ADN (**Kruidenier et al., 2002; Hadi, 2004**).

3. Les antioxydants

3.1. Définition

Les antioxydants sont définis par **HALLIWELL** comme « toute substance qui en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé retarde ou inhibe l'oxydation de ce substrat », ils interviennent en protégeant les cellules des dommages oxydatifs induits par les radicaux libres (**Pastre et Priymenko, 2007**). Les antioxydants piègent les radicaux libres en inhibant les réactions à l'intérieur des cellules provoquées par les ROS et RNS (**Benbrook, 2005**).

3.2. Le système de défense des antioxydants

3.2.1. Les antioxydants endogènes (enzymatiques)

a. La catalase

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



b. Les superoxydes dismutases

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

C. La glutathion peroxydase

Une enzyme à cofacteur de sélénium se localise dans le cytosol et la matrice mitochondriale. Elle a pour activité la dégradation des peroxydes organiques (ROOH) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (**Valko *et al.*, 2006**).

3.2.2. Les antioxydants exogènes (non enzymatiques)

a. Les oligo-éléments

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

b. La vitamine E

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

c. La vitamine C

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

d. Les tanins

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

e. Les coumarines

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

f. Les caroténoïdes

Sont des pigments végétaux lipophiles formant une famille de plus de 600 molécules notamment le lycopène et le β -carotène, précurseurs de la vitamine A (**Marc *et al.*, 2004**).

g. Les composés phénoliques:

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

h. Les flavonoïdes

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

Chapitre II: Métabolites secondaires

1. Définition

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées par les plantes autotrophes (**Boudjouef, 2011**). Ils sont caractérisés généralement par de faible concentration dans les tissus végétaux (**Newnam et Cragg, 2012**). Mais ils n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de la plante (**Guignard, 1996**). Ils jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement, contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème (**Peeking *et al.*, 1987**). Les plus grands groupes sont les alcaloïdes, les terpénoïdes, les stéroïdes et les composés phénoliques. Ils présentent une énorme valeur économique (en particulier pour l'industrie pharmaceutique et la cosmétique) (**Peeking *et al.*, 1987**).

2. Les polyphénols

2.1. Définition

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther,

ester, hétéroside...etc. (**Bruneton, 1999**). Ce sont des pigments généralement responsable de la teinture des feuilles et les couleurs des fleurs et des fruits. Les principales sources alimentaires des polyphénols sont les fruits les légumes et les céréales (**Martin et Andriantsitohaina, 2002 ; Bruneton, 2009**).

2.2. Classification des polyphénols

Les principaux groupes appartenant aux polyphénols sont les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins

2.2.1. Les acides phénolique

Sont les principaux polyphénols alimentaires (**Watson et al., 2013**). Il existe sous deux formes: les acide hydroxybenzoïques et les acide hydroxycinnamiques (**Balasundram et al., 2006**).

a. Les acides hydroxybenzoïques

Ils sont dérivés de l'acide benzoïque, et ont une formule de base de type (C6-C1) sept acide benzoïque sont connue : acide p-hydroxybenzoïque, protocathéchique, vanilique, gallique, syringique, salicylique et gesticque (**Macheixetal., 2005 ; Collin etCrouzet, 2011**).

b. les acide hydroxycinnamiques

Représentent un groupe très important des polyphénols, dont la structure de base (C6-C3) dérive de celle de l'acide cinnamique. Les molécules de base de la série hydroxycinnamique sont : l'acide p-coumarique, caféique et férulique (**Macheixetal., 2005**).

2.2.2. Les flavonoïdes

Sont des substances généralement colorées très répandues chez les végétaux. Plus de 4000 flavonoïdes ont été répertoriés. Ils protègent les plantes terrestres des radiations ultraviolettes (**Guignard, 2000**). Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base C6-C3-C6. Ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) (**Sarni-Manchado et Cheyner, 2006**). La structure des différents types de

flavonoïdes varie par la nature de l'hétérocycle oxygéné (**Ribereau-Gayon, 1968**).

2.2.3. Les tannins

Les tannins sont des composés phénoliques hydrosolubles ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000Da, ils ont la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines Les tannins sont classés en deux groupes principaux différents par leur structure : les tanins hydrolysables et les tanins condensés. (**Bruneton, 1999**).

a. Les tannins condensés

Ce sont des tanins non hydrolysables (dits catéchiques et proanthocyaniques), ces tanins sont constitués par le mélange de produits de polymérisation oxydative de catéchines (flavan-3-ols) et de proanthocyanes (flavan-3,4- diols). (**Richter, 1993**).

b. Les tannins hydrolysables

Ce sont des esters de glucose, c'est à dire un noyau central de glucose sur lequel se fixent au moyen d'une liaison ester, des acides : l'acide gallique pour le groupe des gallotannins, l'acide ellagique pour le groupe des ellagitanins (**Sébastien, 2006**).

2.2.4. Les coumarines

Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale (**Sarni-Manchado et Cheyner, 2006**). Les coumarines ont une structure de base (C6-C3) dérivant des acides orthohydrocinnamiques (**collin et Crouzet, 2011**).

2.2.5. Les stilbènes

Les stilbènes font partie d'un groupe très vaste des polyphénols, celui de l'acide cinnamique. Le resvératrol est le stilbène le plus étudié (**Leray, 2010**).

2.2.6. Les lignanes

sont un groupe de phytonutriment largement distribuer dans le règne végétal (**Imran et al., 2015**). Ce sont des composés dimères formé par le couplage de deux fragments (C6-C 3) monomères dérivées de la voie des phénylpropanoïdes (**Gilaniet Anderson, 2002**).

2.3. Biosynthèse des polyphénols

2.3.1. La voie de l'acide shikimique

C'est la voie de biosynthèse principale des composés aromatiques (**Kening et al., 1995**). Dans les plantes et les micro-organismes, y compris les acides aminés aromatiques : la Phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. Ce sont des métabolites primaires qui servent de

précurseurs pour de nombreux de produits naturels (secondaire) tel que les flavonoïdes, les acides phénoliques, les coumarines, les alcaloïdes. (**Ghasemzadeh et Ghasemzadeh, 2001**).

2.3.2. La voie de l'acétate

Ce mode de formation plus secondaire consiste à cyclisation des chaînes polycétonique, elle-même obtenue par condensation de groupement acétate. La condensation de groupement acétate ne se fait qu'après carboxylation de l'acétyle COA en malonyles COA (**Merghem, 2009**).

2.4. Propriétés antioxydantes des polyphénols

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 (**Apak et al., 2007**). Leurs structures leur confèrent une activité antioxydante aussi importante. Les groupes hydroxyle des polyphénols sont bien des donneurs d'atomes d'hydrogènes, ils peuvent réagir avec les ROS de l'oxygène et les RNS, enfin de réaction, le cycle de génération de nouveaux radicaux est interrompu (**Laughton et al., 1989**).

D'après (**Pereira et al., 2009**). Suite à l'interaction avec les espèces réactives initiales, la forme radicalaire de l'antioxydant est produite, ayant une plus grande stabilité chimique que le radical initial. L'interaction des groupes hydroxyle de composés phénoliques avec les électrons du noyau benzénique donne les radicaux libres, où le radical est stabilisé par la délocalisation. Le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est également attribué à leur capacité à chélater les métaux ioniques impliqués dans la production de radicaux libres. Cependant, les composés phénoliques peuvent agir comme des prooxydants. Les polyphénols peuvent agir selon divers mécanismes :

- Inhibition enzymatique (par la réduction des hydro peroxydes et du peroxyde d'hydrogène).
- Chélation des ions métalliques (par la séquestration des ions métalliques).
- Piégeage des radicaux libres (par des réactions de complexation) (**Apak et al., 2007**).

Chapitre III: *Rhamnus alaternus* L

Généralités sur *Rhamnus alaternus* L

1-Description et caractéristiques

Rhamnus alaternus L. est une espèce botanique qui appartient à la famille des Rhamnaceae (Cuoco et al., 2014), c'est une famille endémique d'arbres, arbustes et herbacées qui contient environ 50 genres et 900 espèces (Richardson et al., 2000). Les plantes de cette famille sont connues comme espèces médicinales possédant diverses propriétés biologiques (Bas et al., 2005 ; Bhourri et al., 2011). En Algérie, 9 espèces végétales appartenant à 3 genres sont répertoriées dans diverses régions et classées selon leurs caractéristiques morphologiques (Quezel et Santa, 1963).

2. Classification

La classification des plantes de la famille des *Rhamnaceae* est la suivante (Tableau I). (MobileReference, 2008).

Tableau I: la classification botanique de *R. alaternus* L.

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Rhamnales
Famille	<i>Rhamnaceae</i>
Genre	<i>Reynosia</i>
Sous genre	<i>Rhamnus</i>
Espèce Sous espèce	<i>Rhmanusalaternus</i> <i>R. alaternus eu-alaternus</i> Maire (Quezel et Santa, 1963) .

3. Nomenclature

Les noms vernaculaires du nerprun sont mentionnés dans le (Tableau II).

Tableau II: les noms vernaculaires de *Rhamnus alaternus* L.

	Noms (références)
Noms communs	Nerprun, Bourg-épine, épine de cerf (Bardin, 2004).
Noms targuis et kabyles	Ajrroudj, Khalis n'imidekh, Amliles (Beloued, 2001).
Noms arabes	Méliles, Qaced (Beloued, 2001) ; Ouchbat el safar (Saidet al., 2002); Oud el khir (Beloued, 2001; Ben Ammar et al., 2008; Ben Ammar et al., 2009).
Noms français	Alaterne (Beloued, 2001), Nerprun méditerranéen (Izhaki et al., 2002)
Noms anglais	ItalianBuckthorn, MediterraneanBuckthorn (Akerreta, 2009).

4. Description botanique

Rhamnus alaternus est un arbuste toujours vert, d'origine méditerranéenne (**Akerreta, 2009**). à feuilles alternes, ovoïdes-lancéolées, pétiolées et luisantes, longues de 6 cm sur 3 cm de large, dentées sur leurs bords, coriaces à nervures médianes épaisses, trinervées à la base; Stipules linéaires petites, caduques, fleurs dioïques et petites de 2-3 mm, d'un jaune verdâtre, en grappes axillaires, plus longues que le pétiole. Calice à 5 lobes lancéolés, pétales nuls, baies petites de 4-6mm, peu charnues, rouges puis noires à maturité. La croissance de *Rhamnus alaternus* .L est lente, cependant sa durée de vie peut aller jusqu'à 100 ans (**Beloued, 2001; Bas et al., 2002**). La tige est dressée et rameuse, les rameaux sont alternes, non épineux de 1-5m.

-Floraison : Mars-Avril (**Beloued, 2001**). Ses fruits charnus mûrissent à la fin du printemps et le début de l'été (**Gulias et al., 2004**).

-Récolte : la récolte des baies se fait en septembre et octobre que l'on récolte ses pour leurs propriétés thérapeutiques (**Bardin, 2004**).

5. Description de l'habitat

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

6. Propriété biologique et domaine d'utilisation

En médecine traditionnelle *R. alaternusa* été employé en tant que digestif, diurétique, laxatif, astringent, hypotensif et pour le traitement des complications hépatiques et dermatologiques (**Bhouriet al., 2012**).ainsi que les problèmes cardiovasculaires (**Calvo etCavero, 2014**). Des études antérieures ont montré que l'extrait brut de *Rhamnus alaternus*, est un puissant antioxydant, antimutagène, antigénotoxique (**Ben Ammar et al.,2005; Ben Ammaret al., 2007; Ben Ammar et al., 2008; Bhouriet al., 2011**). antimicrobien (**Kosalecet al., 2013**). Les tiges et les feuilles de *Rhamnus alaternus* étaient utilisées en Algérie- dans le constantinois, contre la jaunisse et les troubles hépatiques provoqué par le paludisme. Le fruit était utilisé en Algérie comme purgatif doux ; au Maroc- dans le Haut Atlas et le Moyen Atlas, il est toujours employé comme laxatif (**Ait Youssef, 2006**).

7. Composition chimique et biochimique de *Rhamnus alaternus*

La plante de *Rhamnus alaternus* est caractérisée par une richesse de substances phénoliques spécialement les tanins, les anthraquinones tel que l'émodin, chysophanol, alaternin et physcion qui sont les quatre anthraquinones aglycones isolés des parties aériennes de *Rhamnus alaternus* (**Izhaki et al., 2002**).Elle contient aussi des flavonoïdes glycosylés tel que kaempferol 3-O-Bisorhamninoside, rhamnocitrin 3-O-B-isorhamninoside et rhamnetin-3-O-B-isorhamninoside (**Ban Ammar et al., 2009**) , et des flavonoïdes aglycones comme le kaempferol, quercétine et l'apigénine (**Ben Ammar et al ., 2008 ; Ben Ammar et al ., 2009**).Elle est aussi riche en flavones hétérosides (**Stocker et al ., 2004**) et coumarines (**Ben Ammar et al ., 2005**).La pulpe de *R. alaternus* est composée principalement d'eau (68%), de minéraux, de lipides, protéineset de fibres (cellulose, hemicellulose et lignine). (**Izhaki et al ., 2002**).

***MATERIEL ET
METHODES***

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

La partie aérienne de *Rhamnus alaternus* (rameaux et feuilles) est récoltée à la fin du mois de janvier 2019 dans la région de Djaâfra (figure 2), qui est située au nord de Bordj Bou Arreridj. L'identification botanique de l'espèce a été réalisée au niveau du département des Sciences Biologiques, Université Mohamed El Bachir El Ibrahim, Bordj Bou Arreridj.



Figure 2: La plante *Rhamnus alaternus* (Djaâfra).

1.1.2. Appareils et produits chimiques

Rota-vapeur (Buchi), Agitateur magnétique (GP SELECTAS ACE), Etuve (Memmert), Bain marie (Memmert), Balance de précision (Kern), pH-mètre (*Hanna*), Vortex (Top Mix), Centrifugeuse (*Sigma*) et Spectrophotomètre.

Les solvants organiques utilisés dans cette étude sont : chloroforme, acétone, éthanol, méthanol ont été fournis par Sigma –Aldrich.

Les produits utilisés sont : l'acide trichloracétique (TCA), et l'acide ascorbique provient de *Biochem*, l'acide gallique, acid chlorhydrique(HCL) et acid acétique(C₂H₄O₂) de sigma-Aldrich. Les réactifs chimiques sont : le DPPH, et le trichlorure d'aluminium hydraté (AlCl₃ 6H₂O) qui ont été fournis par *Sigma-Aldrich*, le Folin-Ciocalteu (FCR) et le réactif de Fehling A par *Biochem*. D'autres produits chimiques utilisés sont : la quercétine, le Chlorure de fer (FeCl₃) et Ferricyanure de potassium (K₃Fe(CN) 6) fournis par *Sigma-Aldrich*.

Le butylhydroxytoluène (BHT) par *Fluka*. Ammoniaque (NH₄OH), chlorure de mercure (HgCl₂), iodure de potassium (KI) et bicarbonate de sodium (Na₂CO₃), magnésium (Mg) sont fournis par sigma- Aldrich.

2. Méthodes

2.1. Préparation de la matière végétale

La partie aérienne de *R.alaternus* constituée de (rameaux et feuilles) , a été nettoyée des impuretés, puis sèche à température ambiante et à l'ombre pendant quelques jours, jusqu'elle deviens sèche, ensuit broyés à l'aide d'un mortier puis dans un robot électrique pour avoir une poudre qui est stockées dans des boites fermés et placée dans un endroit à l'abri de la lumière et de la chaleur jusqu'à son utilisation (figure 3).

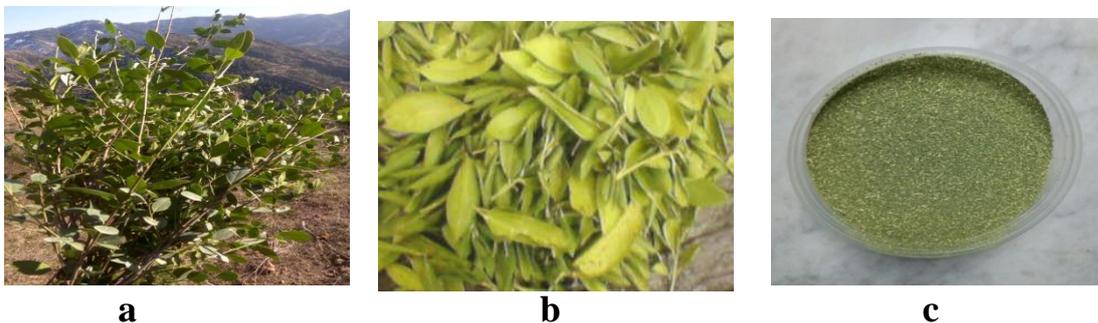


Figure 3: la partie aérienne de *Rhamnus alaternus* L : (a-fraiche, b-sèche, c- poudre).

2.2. Préparation des extraits

L'extraction de la partie arienne (rameaux et feuilles) de *R. alaternes* a été préparée à l'aide d'un Soxhlet selon la méthode décrite par (Sokmen et al. 1999) avec quelques modifications. La matière végétale broyée (30g) est placé dans une cartouche qui sera mise en contact avec les solvants d'extractions qui sont par ordre : chloroforme, acétone, éthanol absolu (250ml) pendant 3h. La cartouche est ensuite retirés et les solvants sont évaporés grâce à un évaporateur rotatif (BÜCHI) à une température de 45°C ensuite sont placées dans une étuve 40°C pendant 24 h. Les extraits secs sont conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à leurs utilisations.

- ❖ Pour chaque extrait, le rendement d'extraction, est exprimé en pourcentage par la formule suivante :

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

R%: Rendement exprimé en %

M: Masse en gramme de l'extrait sec résultant

M₀: Masse en gramme du matériel végétal à traiter.

2.3. Tests phytochimiques

2.3.1. Epuisement du matériel végétal avec de l'eau chaude

Dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant, 20 g de matériel végétal est mélangé avec 200 ml d'eau. Le mélange est porté au système reflux pendant une heure.

Ensuite, le mélange est filtré et l'extrait aqueux est soumis à des tests mentionnés (Figure 4).

2.3.1.1. Saponosides

La détection des saponosides est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 ml de l'extrait aqueux, puis la solution est fortement agitée. Ensuite, le mélange est laissé pendant 20 minutes (figure 4) et la teneur en saponosides est évaluée:

Pas de mousse = test négatif

- ✓ Mousse moins de 1 cm = test faiblement positif
- ✓ Mousse de 1-2 cm = test positif
- ✓ Mousse plus de 2 cm = test très positif (**Trease et Evans, 1987**).

2.1.3.2. Tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, 1 ml de l'extrait aqueux, 1ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl₃ diluée. L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleu-vert indique la présence des tanins (figure 4) (**Trease et Evans, 1987**).

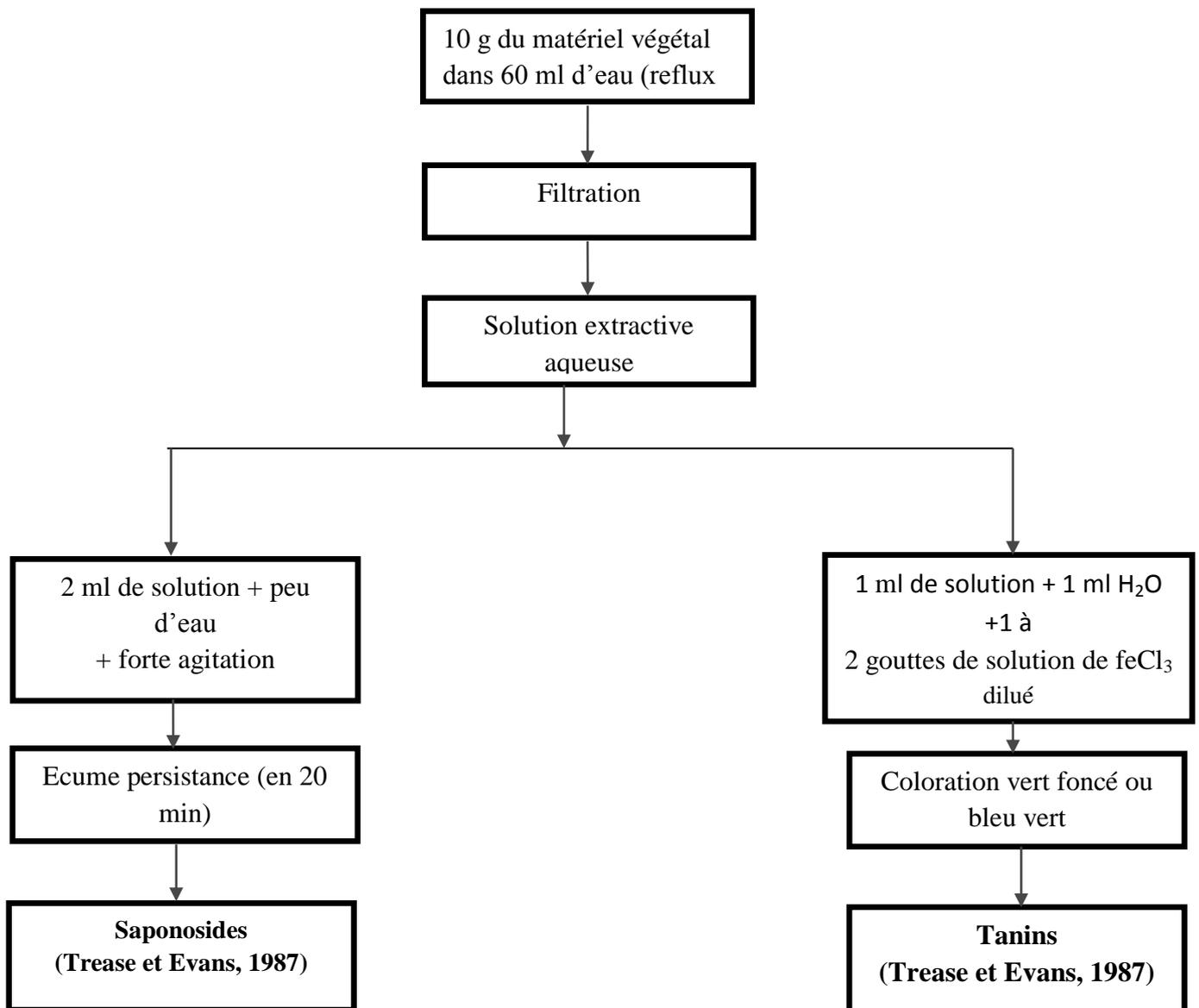


Figure 4: Schéma récapitulatif le protocole d'épuisement du matériel végétal avec de l'eau

2.3.2. Epuisement du matériel végétal avec l'éthanol

20 g de matériel végétal est mis en présence de 60 ml d'éthanol. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Ensuite, le mélange est filtré et l'extrait éthanolique est soumis aux tests illustré dans (Figure 5).

2.3.2.1. Flavonoïdes

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5 ml de l'extrait éthanolique avec 1 ml d'HCl concentré et 0,5 g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes

est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe après 3 minutes (figure 5) (Debrayb *et al.*, 1971; Paris *et al.*, 1969).

2.3.2.2. Tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 1 ml de l'extrait éthanolique, 2 ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl_3 diluée. Un test révélé par l'apparition d'une coloration bleu- noire (tanins galliques), bleu-vert (tanins cathéchiques) (figure 5) (Trease et Evans, 1987).

2.3.2.3. Composés phénoliques

Leur détection consiste à traiter 1 ml de l'extrait éthanolique avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling, puis chauffer le tout. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique (figure 5) (Trease et Evans, 1987).

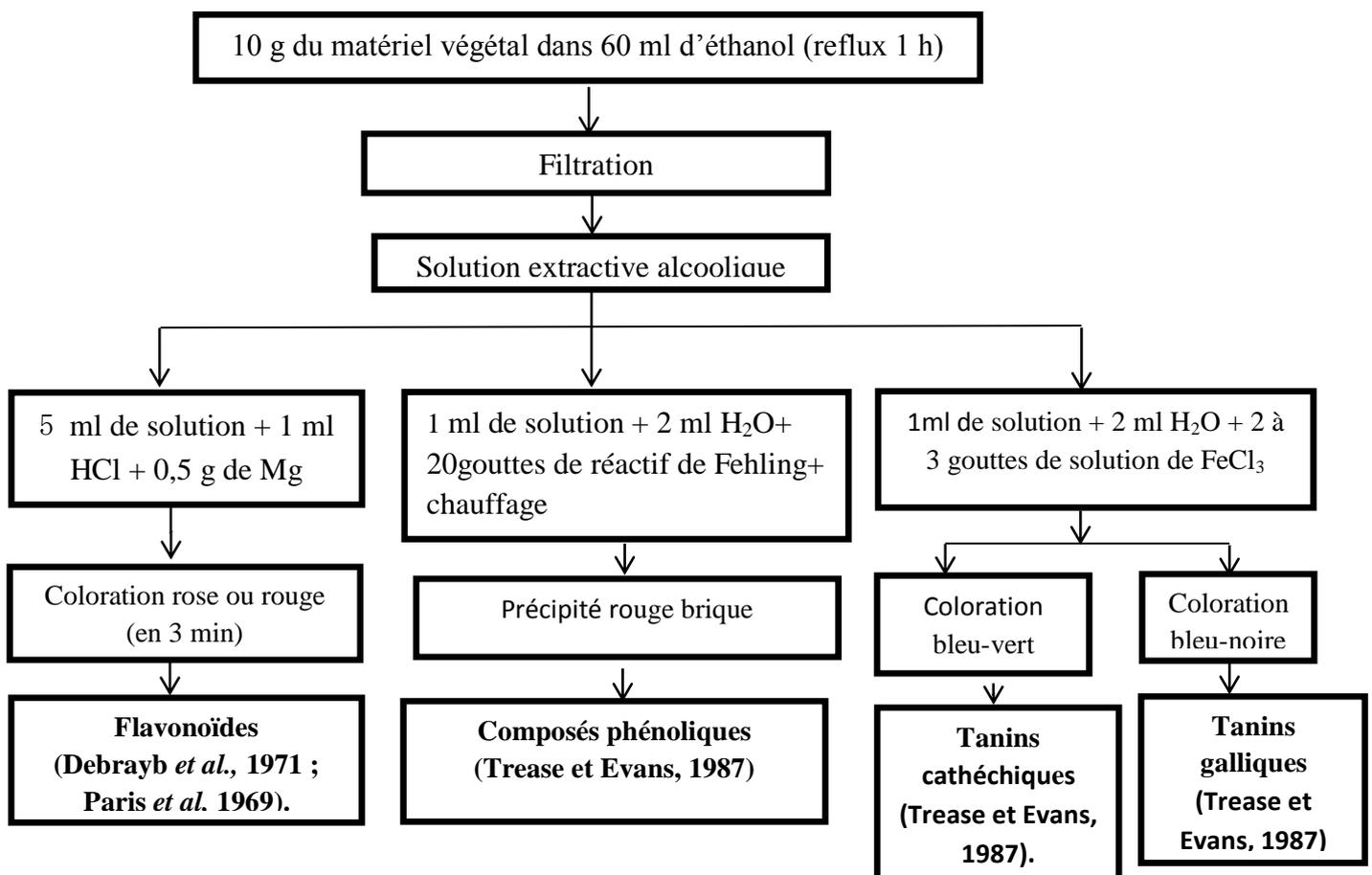


Figure 5 : Schéma récapitulatif le protocole d'épuisement du matériel végétal avec l'éthanol.

2.4. Autres métabolites secondaires

2.4.1. Coumarines

1 g d'échantillon de la poudre végétal est placé dans un tube à essai en présence de quelque gouttes d'eau distillée. Le tube est recouvert avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et porté dans un bain marie pendant quelques minutes. Puis on ajoute 0,5 ml de NH_4OH dilué (10%) et on va mettre deux taches sur un papier filtre qui sont examinées sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines (Figure 6) (Rizk, 1982).

2.4.2. Alcaloïdes

Préparation du réactif

Réactif de WAGNER

- ✓ 2g iodure de potassium
- ✓ 1.27g d'iode
- ✓ 100ml d'eau distillée

Le test

Nous avons procédé à une macération sous agitation pendant 24 h de 10 g de la poudre végétale dans 50 ml de H_2SO_4 dilué au 1/10 à la température ambiante du laboratoire. Après filtration sur un papier lavé à l'eau distillée et de manière à obtenir environ 50 ml de filtrat, 1ml du macéré est introduit dans un tube 2-3 gouttes de réactif de Wagner ont été ajoutés. La présence d'une turbidité ou d'un précipité, après 15 minutes indique la présence d'alcaloïdes (Figure 6) (Paris *et al.*, 1969).

2.4.3. Anthocyanes

2 ml d'infusé aqueux sont ajoutés à 2 ml de HCL 2N. L'apparition d'une coloration rose- rouge qui vire au bleu violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes (Figure 6) (Debrayb *et al.*, 1971 ; Paris *et al.*, 1969).

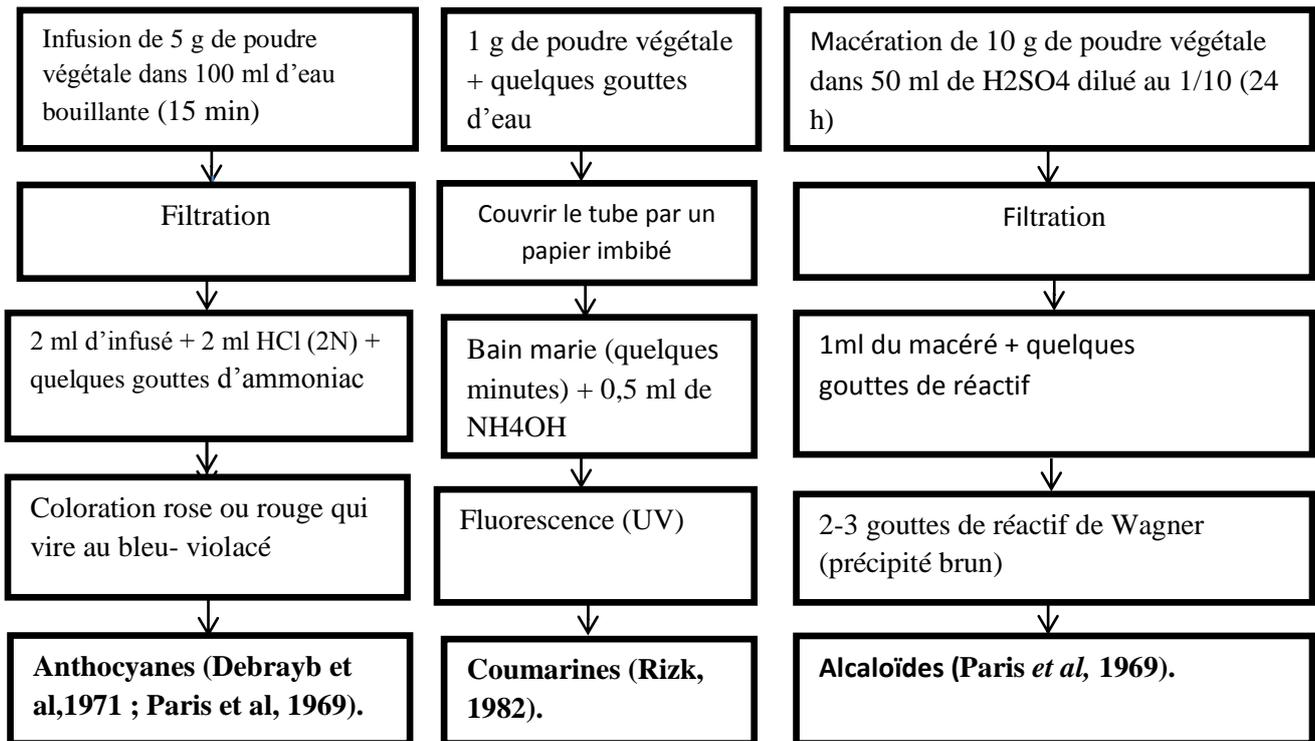


Figure 6: Schéma récapitulatif le protocole des Tests phytochimiques pour autres métabolites secondaires.

3. Dosage des composés phénoliques

3.1. Dosage des polyphénols totaux

Principe

Le dosage des polyphénols totaux se fait par le réactif de Folin-Ciocalteu. (**Singleton et Rossi, 1965**). Le réactif est 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 bleue de tungstène et de molybdène (**Ribéreau-Gayon, 1968**). La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans les extraits végétaux. (**Boizot et Charpentier, 2006**).

Mise en œuvre pratique

a) préparation des solutions

-folin-ciocalteu à 10% : 10ml du réactif dans une fiole graduée de 100ml et compléter au trait de jauge avec l'eau distillée.

-Na₂CO₃ à 7.5% : 7.5g dans 100ml d'eau distillée.

b) mode opératoire

Un volume de 200 µl de chaque extrait végétale dilué dans (chloroforme, Acétone, éthanol) est introduit dans des tubes à essai, est mélangé avec 1ml du réactif de Folin Ciocalteu dilué 10 fois. Après une incubation pendant 4 minutes un volume de 0,8 ml de carbonate de sodium à 7.5% est additionné. Les tubes sont incubés 2 heures à l'obscurité. L'absorbance est mesurée à 765 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre. Le blanc du test contient 200 µl de solvant, 1 ml de folin et 800 µl de Na₂CO₃.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif. Pour chaque extrait, le test est réalisé en triplicata. Les résultats sont exprimés en microgrammes équivalent acide gallique par milligramme de la matière végétale sèche (µg EAG /mg d'extrait).

3.2. Dosage des flavonoïdes

Principe

L'estimation de la teneur en flavonoïdes dans nos extraits est réalisée par la méthode de (Djeridane *et al.*, 2006). Le principe est basé sur l'interaction de groupement hydroxyle des flavonoïdes avec le chlorure d'aluminium, qui se traduit par un complexe jaunâtre dont l'intensité optique est mesurée à 430 nm.

Mise en œuvre pratique

a) préparation des solutions

-chlorure d'aluminium à 2% : 2g dans 100ml de solvant.

b) mode opératoire

1 ml de chaque extrait avec dilutions convenables sont ajoutés à 1 ml d'AlCl₃ (2 %)

Après 15 min d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm. Le blanc du test contient 1ml d'extrait et 1ml de solvant, le test est réalisé en triplicata. Les concentrations des flavonoïdes sont déduites à partir des gammes d'étalonnage établies avec la quercétine (0- 35µg/ml), et sont exprimées en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg).

4. Tests d'activités antioxydantes in vitro

4.1. Test de piégeage du radical DPPH

Principe

Le DPPH• (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence des composés anti-radicalaires, le radical DPPH• est réduit en diphényle picryl hydrazine de couleur virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH•, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (**Parejo et al., 2002**).

Mode opératoire

Dans la présente étude, ce test a été évalué suivant le protocole de (**Shirwaikar et al.,2006**) . La solution du DPPH est préparée à l' avance par solubilisation de 4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. Brièvement, 0,5 ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,1 mM) a été mélangé avec 1,5 ml de différentes concentrations des extraits de la plante (5-100 µg/ml). Le mélange obtenu est ensuite garde à l'abri de la lumière à la température ambiante pendant 30 minutes. Puis l'absorbance est mesurée à 517 nm contre un blanc composé de 0,5 ml de MeOH et de 1,5 ml de chaque extrait. Un contrôle négatif est compose de 1,5 ml méthanol et 0,5 ml de solution méthanolique de DPPH. Des solutions d'antioxydant de référence (quercétine, BHT) sont également préparées dans les mêmes conditions opératoires.

L'activité antioxydante, qui exprime les capacités de piéger le radicale libre est estimé par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol (Inhibition % ou I%) suivant la formule suivante :

$$I \% = (Ac - At / Ac) \times 100$$

Ac: Absorbance de control

At: Absorbance du test – absorbance du blanc du test

Les résultats obtenus pour chaque concentration d'extrait testé ont été comparé par rapport à ceux obtenus par le BHT et quercétine qui sont pris comme antioxydant standards.

Evaluation du potentiel anti-radicalaire par le calcul de l'IC50

L'IC50 est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH. Les IC50 sont calculés graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés (Torres *et al.*, 2006). La valeur d'IC50 la plus faible correspond à l'efficacité de l'extrait la plus élevée. La valeur de l'IC50 est exprimée en µg/ml. Pour toute l'expérimentation, chaque test est réalisé en triplicata et les résultats ont été calculés par la moyenne des trois essais. (3 répétitions pour chaque concentration).

4.2. Test du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur (FRAP) d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}). En effet le Fe^{3+} participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm (Oyaizu, 1986). Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Hubert, 2006).

Mode opératoire

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode préconisée par (Amarowicz *et al.*, 2004). Elle consiste à mélanger 1,5ml de l'extrait avec 1 ml de tampon phosphate (0,2 M, Ph 6,6), et 1ml d'une solution de ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$ à 1%). Le mélange obtenu est incubé à 50°C pendant 20min, puis on ajoute 1ml de l'acide trichloracétique (TCA) à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction. Le mélange est centrifugé à 3000g pendant 10 min à température ambiante. 1,5 ml de surnageant sont additionnés puis

1,5ml d'eau distillée et 0,3 ml de chlorure de fer (FeCl_3) à 0,1%. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700nm.

Le blanc est préparé de la même façon sauf que l'extrait est remplacé par le solvant. Les concentrations en composés réducteurs des extraits sont déterminées se référant à la courbe d'étalonnage obtenue à différentes concentrations d'acide ascorbique dans le méthanol (10-50 $\mu\text{g/ml}$). Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalent de l'acide ascorbique par milligramme de poids sec de l'extrait (EAA $\mu\text{g/mg}$ d'extrait).

5. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne $\pm\text{SD}$ (déviation standard). ($n= 3$). Les valeurs d'IC50 (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)] et le programme Origin 2015. Les comparaisons Statistiques ont été faites par l'analyse ANOVA, les résultats sont considérées statistiquement significatif à partir de $P<0.05$. Les courbes et les histogrammes sont tracés par le Microsoft Excel 2007.

***RESULTATS ET
DISCUSSION***

1. Rendements des extractions

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 7.

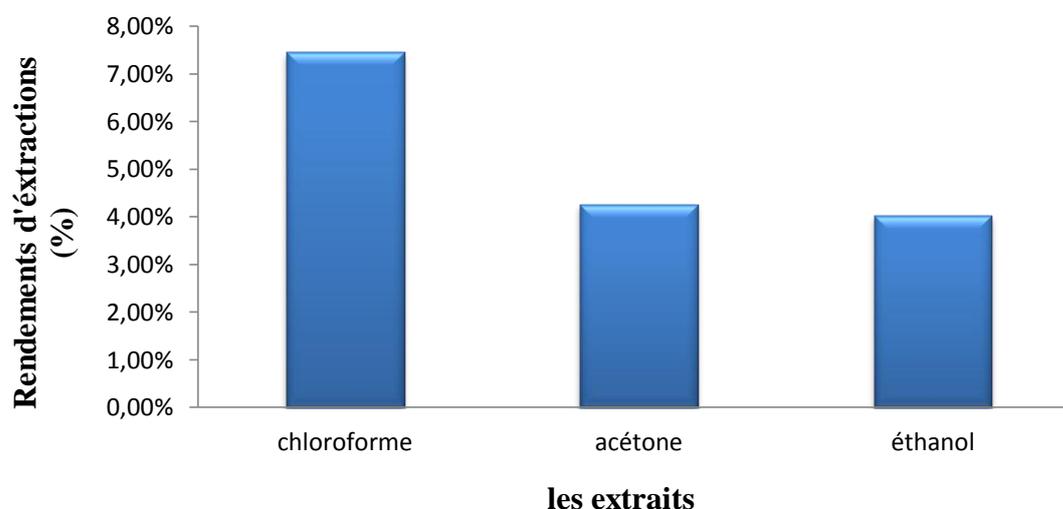


Figure 7 : Rendements des extraits de la plante *R. alaternus*.

Une extraction par Soxhlet a été réalisée sur 30g de la poudre de PARF du *R. alaternus* avec 250ml des solvants (chloroforme, acétone, l'éthanol). Après extraction de l'échantillon et évaporation du solvant, on a obtenu des rendements élucidés dans la figure 7.

Les résultats obtenus montrent que le rendement le plus élevé a été observé chez l'extrait chloroformique (7,45%) suivis de l'extrait acétonique avec un rendement de (4,26%) tandis que l'extrait éthanolique a présenté le plus faible rendement (4,03%).

La différence dans le rendement entre les trois extraits est due à la différence de la nature chimique des composés phénoliques de l'extrait et la nature de solvant utilisé. La différence dans les polarités des solvants d'extraction influence la solubilité des constituants chimiques d'un extrait ainsi que le rendement d'extraction (Sulaiman *et al.*, 2011).

Ce qui explique les teneurs obtenues avec les trois solvants utilisés.

Dans une étude réalisée par (Ben Ammar *et al.*, 2008). Sur la même espèce (*R. alaternus*) originaire de Tunisie, la macération des feuilles dans le méthanol suivi par le butanol saturé en eau a donné un rendement de 9 %. Tandis que l'étude menée par (Harrare., 2012) a signalé un rendement de 10% pour les racines de *R. alaternus* obtenus par Soxhlet en utilisant le méthanol comme solvant.

Ses résultats sont assez proches que celle trouvés chez l'extrait chloroformique (7,45%).

D'autres résultats différents ont été trouvés par (Boussahel et al., 2013) sur la même espèce récoltée aussi de Bordj Bou Arreridj, la macération dans le méthanol et d'autre dans l'eau distillée a donnée des rendements de 14,48% et 14,20% respectivement, ces résultats sont élever par rapport à notre résultats.

La période de récolte de la plante, la procédure de séchage, la granulométrie des Particules, le temps de macération, le volume ainsi que la nature du solvant, constituent les paramètres susceptibles d'influencer le taux d'extraction et affecter ainsi l'activité antioxydant des extraits (Hayouni et al., 2007).

2. Testes phytochimiques

Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques réalisés sur le matériel végétal broyé de *Rhamnus alaternus* sont mentionnés dans le tableau III.

Tableau III : Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques recherchés dans la poudre de différentes parties de la plante.

Types d'extrait et de substances Recherchée		Résultats (+/-)	Résultats (photos)
Extrait aqueux	Saponosides	-	
	Tanins	+	
Extrait éthanolique	Composés phénolique	+	
	Tanins	+	

	Flavonoïdes	+	
	Alcaloïdes	+	
	Coumarines	+	
	Anthocyanes	-	

⊕ : présence des substances

⊖ : Absence des substances

Le screening phytochimique permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de la plante. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette.

La présence des différent classes de métabolites secondaire: flavonoides, tanins (galliques) les comarins et les alcaloïdes et l'absence des anthocyanes, saponosides.

La comparaison avec les données de la littérature n'est pas aisée, tant divers facteurs (végétal, saison, climat, variété, procédé d'extraction, solvant utilisé,...etc.) peuvent influencer la détection des différents groupements photochimiques (**Chelghoum, 2016**).

3. Analyses quantitatives des extraits

3.1. Teneur en polyphénols totaux

Le dosage des phénols totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrie avec le réactif de Folin-Ciocalteu. (Singleton et Ross, 1965). Les résultats obtenus sont exprimés en microgrammes équivalent acide gallique par milligramme de la matière végétale sèche (μg EAG /mg d'extrait) (figure8).

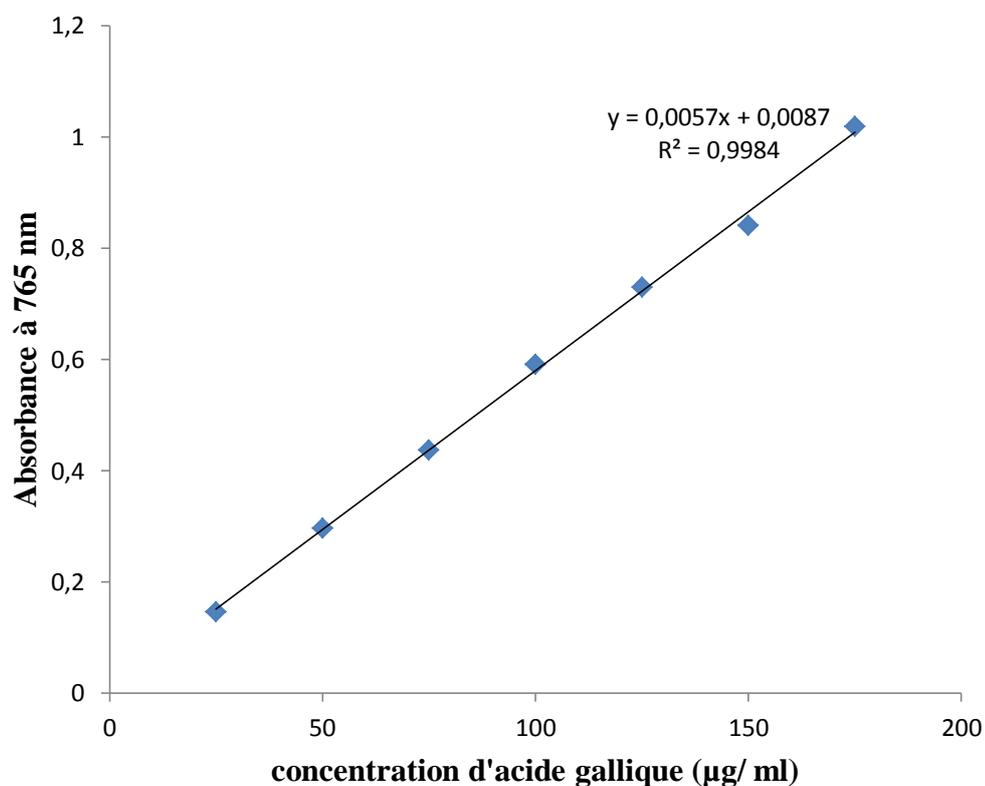


Figure 8: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

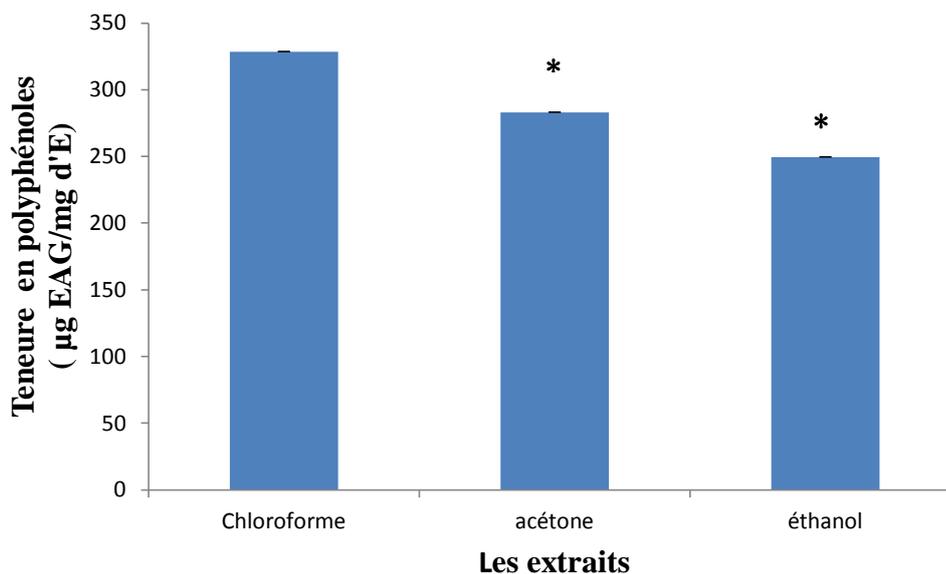


Figure 9 : Teneurs en polyphénols des trois extraits de *R. alaternus*. (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

* = la différence est significative ($P < 0,05$) par rapport à l'extrait chloroformique.

Pour les trois extraits de la plante étudiée *Rhamnus alaternus* les teneurs en phénols totaux (figure 9) été variables. L'extrait chloroformique a présenté un résultat significativement plus élevée d'une valeur ($328,59 \pm 0,018 \mu\text{g EAG/mg d'extract}$) par rapport à l'extrait acétonique et éthanolique ($282,98 \pm 0,006$; $249,64 \pm 0,007 \mu\text{g EAG/mg d'extract}$ respectivement). Aucune différence significative a été remarqué entre les extraits (acétonique et éthanolique). Cette différence entre les trois extraits peut être expliquée par les différences entre les solvants.

Dans d'autres résultats en prenant le méthanol comme solvant, (**Kosalec et al ., 2013**) ont eu une quantité des polyphénols totaux égale à $38,4 \pm 1,56 \text{ mg EAG/g d'extract}$. Ainsi, **Boussahel et al (2013)** ont obtenu $33,65 \pm 2,5 \text{ mg EAG/g d'extract}$. Ces résultats sont inférieure à nos résultat Tandis que **Ben Ammar et ses collaborateurs(2007)** ont dévoilé que l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus* de Tunisie contient environ $138 \pm 9 \text{ mg EAG/ g d'extract}$. Ces résultats sont notamment inferieures à nos résultats.

Cette variation peut être attribuée au phénomène de dégradation thermique, les composés phénoliques étant thermosensible et à cause de la polarité différente des solvants utilisées et aussi la capacité de solubilisation des composés phénoliques dans les différents solvants utilisés.

3.2. Teneur en flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode colorimétrique décrite par (Djeridane *et al.*, 2006). La quercétine considérée comme contrôle positif a permis de réaliser une courbe d'étalonnage, d'où on a calculé la teneur en flavonoïdes des différents extraits qui est exprimé en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg}$). (Figure 10).

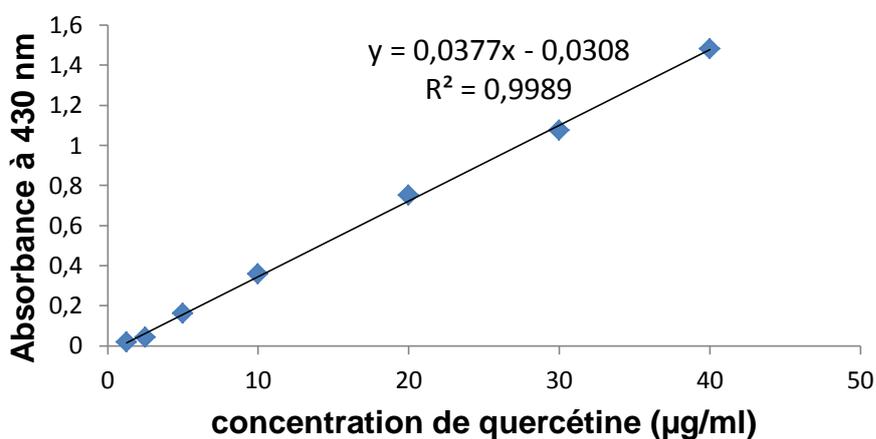


Figure 10: Courbe d'étalonnage de quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.

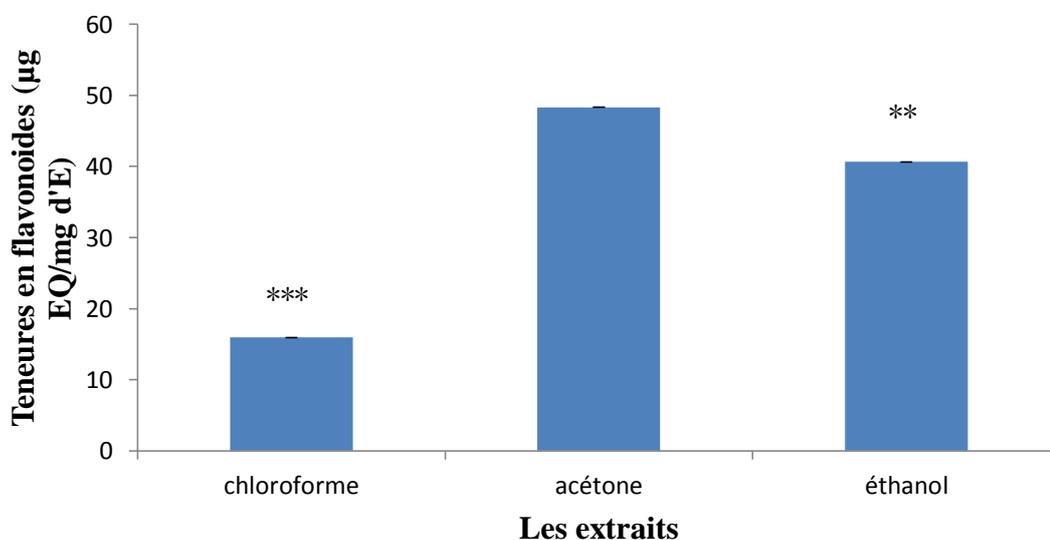


Figure 11: Teneurs en flavonoïdes totaux des trois extraits de *R. alaternus*. (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

** = la différence est très significative ($P < 0,01$) par rapport à l'extrait acétonique.

*** = la différence est hautement significative ($P < 0,001$) par rapport à l'extrait acétonique.

D'après l'histogramme illustré dans la figure 11, l'extrait acétonique présente le meilleur résultat dans ce test avec une teneur ($48,32 \pm 0,004 \mu\text{g EQ/mg d'extrait}$), ce résultat est très significativement élevé par rapport à l'extrait éthanolique ($40,63 \pm 0,008 \mu\text{g EQ/mg d'extrait}$), et hautement significativement élevé par rapport à l'extrait chloroformique ($15,96 \pm 0,004 \mu\text{g EQ/mg d'extrait}$). Cette différence peut être expliquée parce que les flavonoïdes sont solubilisés dans les solvants éthanol plus beaucoup que les solvants acétone et chloroforme.

Une étude réalisée par **Ben Ammar et ses collaborateurs (2007)** a rapporté que l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus* de Tunisie contient environ $283 \pm 11 \text{ mg EQ/g E}$. ainsi que, **Boussahel et ses collaborateurs (2013)** ont confirmé la présence des flavonoïdes chez cette espèce de teneurs de $61,12 \pm 1,2017 \text{ mg EQ/g d'extrait fraîche}$ pour l'extrait méthanolique des feuilles de la même espèce qu'ils ont récolté de la région Teniet En Nasr Bordj–Bou-Arriridj, ces résultats sont notamment supérieures à nos résultats obtenus.

4. Activité antioxydante

Les deux types de tests que nous avons utilisés pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de plante sont: le radical DPPH et le test FRAP.

4.1. Effet « scavenging » du radical 2,2'-Diphényl-1-picrylhydrazyle

Le DPPH• (2,2'-Diphényl-1-picrylhydrazyle) est largement utilisé pour estimer la capacité des substances d'agir en tant que piègeurs des radicaux libres ou donateurs d'hydrogène, et d'évaluer ainsi leur activité antioxydante (**Milardovic et al., 2006**). La capacité à piéger ces radicaux libres est proportionnelle à la concentration de la substance antioxydante (**Luis et al., 2006**).

Les graphes ci-dessous représentent la variation du pourcentage du pouvoir inhibiteur en fonction de la concentration de chaque extrait. D'après les résultats représentés dans les figures 12, 13, 14. Il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec

l'augmentation de la concentration soit pour les standards (quercétine, BHT) ou pour les différents extraits de la plante.

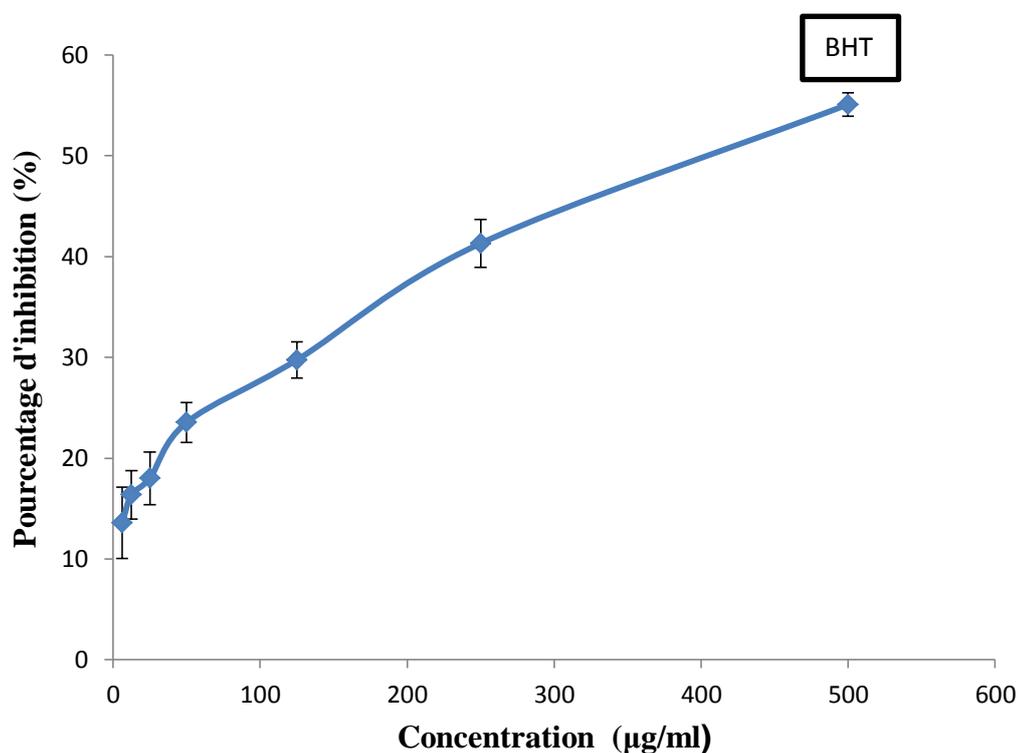


Figure 12: Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• du standard BHT. (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

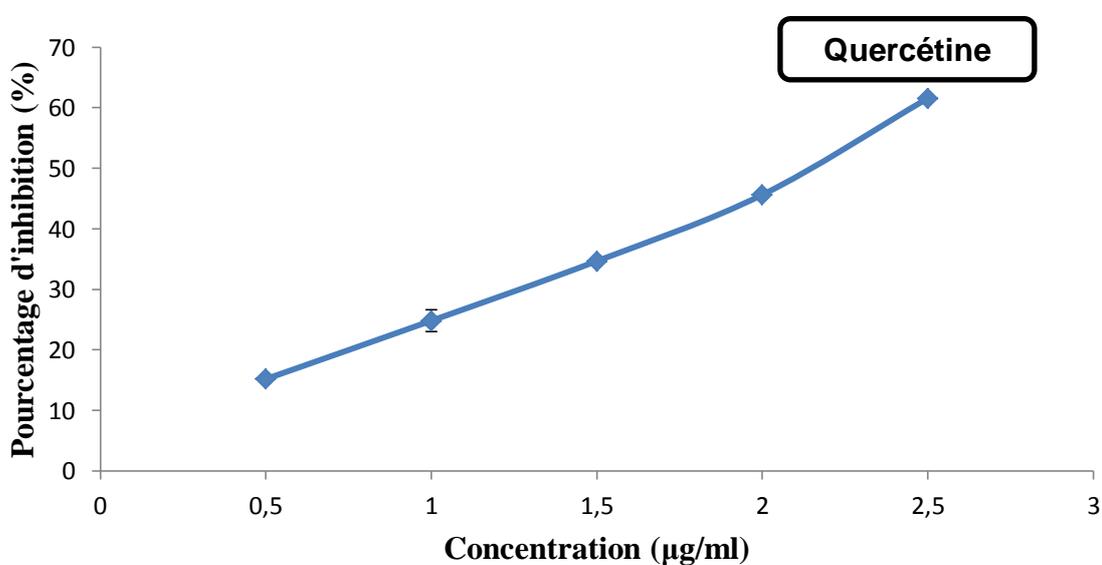


Figure 13: Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• du standard quercétine. (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

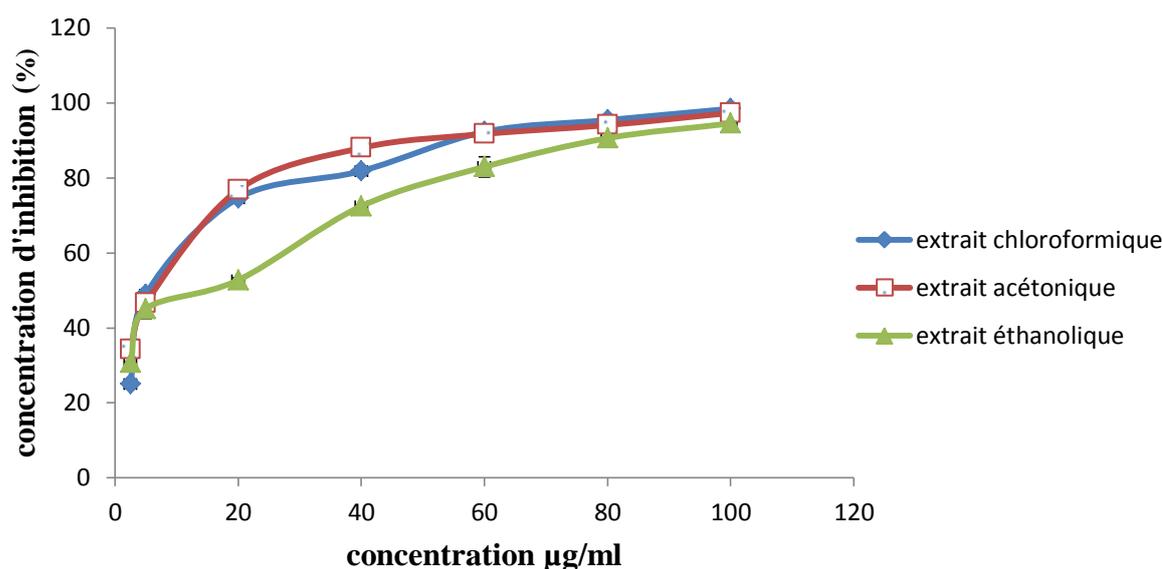


Figure 14 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• des extraits (chloroformique, acétonique, éthanolique). (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

La capacité antioxydante des différents extraits a été déterminée à partir de l'IC₅₀, c'est la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH. Plus la Valeur de l'IC₅₀ est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant. (Kumbhare *et al.*, 2012 ; Khoudali *et al.*, 2014 ; Hebi et Eddouks, 2016).

Pour chaque extrait, la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical libre DPPH est déterminée. Les IC₅₀ des extraits et des standards sont représentés dans le tableau 4.

Tableau IV: le pouvoir antioxydant exprimé par IC₅₀ des antioxydants de références et des extraits testés.

Les extraits	Les IC ₅₀ \pm Écart type (en µg/ml)
BHT	409,1 \pm 3,535***
Quercétine	2,118 \pm 0,008
Extrait du chloroforme	8,041 \pm 0,117**
Extrait de l'acétone	5,899 \pm 0,583
Extrait de l' éthanol	15,211 \pm 0,744**

** = la différence est très significative $p < 0.01$ par rapport au standard quercétine.

***= la différence est hautement significative $p < 0.001$ par rapport au standard quercétine.

A des fins comparatives, deux antioxydants standards sont utilisés le BHT et quercétine D'après les résultats présentés dans le tableau IV, l'extrait acétonique était aussi active que le standard positive (quercétine) avec des $IC_{50} = 5,899 \pm 0,583 ; 2,118 \pm 0,008$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement, car aucune différence significative n'a été remarqué entre eux. Par contre l'extrait chloroformique et éthanolique présentent des différences très significative avec la quercétine avec des $IC_{50} = 8,041 \pm 0,117 ; 15,211 \pm 0,744$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement, donc ils sont moins actifs que l'extrait acétonique . Alors le meilleure extrait qui présent l'activité anti oxydante la plus élever est l'extrait acétonique.

Cette différence peut être dus à la polarité des molécules est contribué à l'augmentation d l'activité anti radicalaires.

Une étude menée par (**Ben ammar et al., 2008**) sur les feuilles de la même espèce de plante de la Tunisie a montré une IC_{50} de 19 $\mu\text{g/ml}$, lorsque l'extraction a été menée par le méthanol suivie par une extraction dans le butanol sature en eau. Cette valeur est assez proche à celle trouvée avec L'extrait éthanol ($15,211 \pm 0,744$ $\mu\text{g/ml}$).

D'autre résultat ont été montré par le même groupe de chercheurs sur les écorces et les racines mélangées, une IC_{50} qui est de 7 $\mu\text{g/ml}$, lorsque l'extraction a été menée par le méthanol suivie par une extraction dans le butanol sature en eau. Cette valeur est nettement proch à celle trouvée avec l'extraits chloroforme et acétone ($8,041 \pm 0,117, 5,899 \pm 0,583$ $\mu\text{g/ml}$).

Kosalec et ses collaborateurs., 2013 ainsi que, **Khettal et ses collaborateurs., 2011** ont remarqué que la même espèce de plante présente des IC_{50} de $78,7 \pm 3,16$ $\mu\text{g/ml}$ et 50 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Ces résultats sont supérieur à nos extraits.

Dans une autre étude menée par (**Boussahel et al., 2013**) sur la même espèce de Plante, une $IC_{50} = 0,398 \pm 0,007$ et $0,082 \pm 0,0006$ mg/ml a été démontrée pour l'extrait méthanolique et aqueux respectivement. Ce résultat est nettement supérieur à celle trouvée avec nos extraits. Cette différence entre ces résultats pourrait s'expliquer par la nature des composés phénoliques contenus dans l'extrait qui est influencé par la période de récolte, sachant que nos échantillons ont été récoltés au mois de janvier. Elle pourrait s'expliquer aussi par la différence des conditions climatique et celles du sol ou la plante est cultivée, mais

essentiellement par la polarité des solvants utilisés et la quantité des composés phénoliques contenants dans nos extraits.

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

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

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

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

4.2. Le pouvoir réducteur du fer

C'est une analyse de l'activité antioxydante qui est rapide, reproductible, et facile à exécuter. Cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} . La puissance de réduction est l'un des mécanismes antioxydantes (Karagozler *et al.*, 2008).

Beaucoup de publications actuelles ont indiqué qu'il y a une relation directe entre les activités antioxydantes et la puissance de réduction des composants de quelques plantes (Bentabet *et al.*, 2014 ; Tep *et al.*, 2005).

Le présent travail a opté pour tester les différents extraits de la plante étudiée. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait qui présentant la variation du pouvoir réducteur exprimée en absorbance en fonction de diffères concentration (figures15).

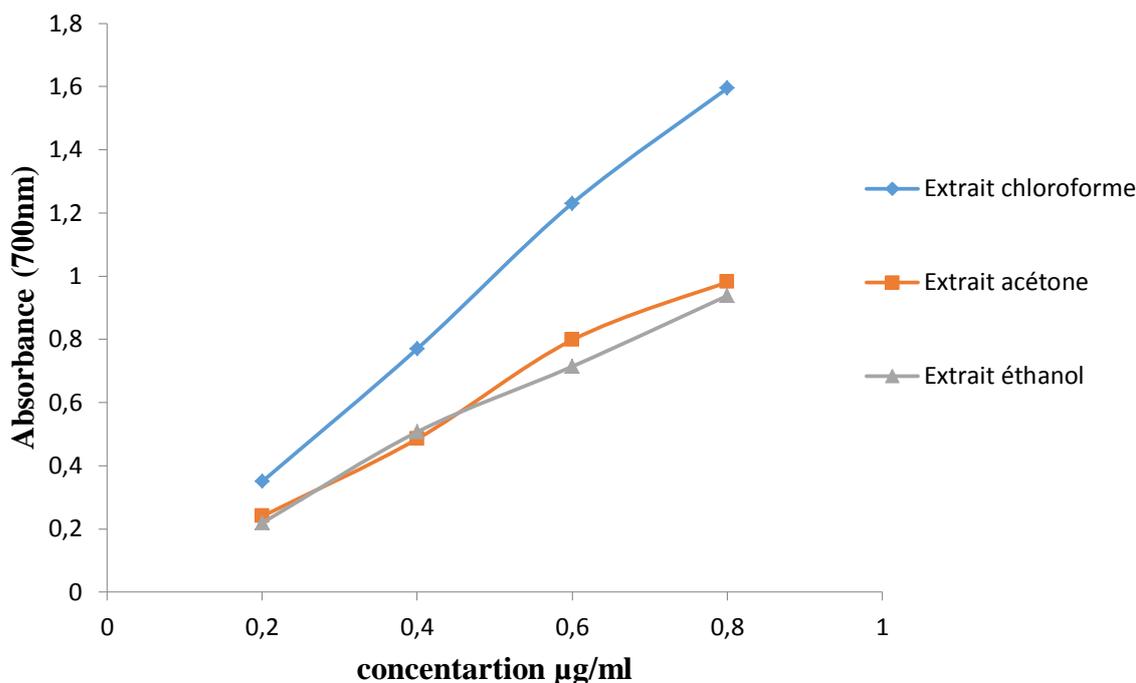


Figure15: Le pouvoir réducteur des extraits de la plante (chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

Les résultats représentés dans la figures 36 ont montré que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos échantillons (**Ozturk et al., 2007 ; Su et al, 2008 ; Liuk et al, 2009**).

Les résultats (figure 15), montrent que la capacité à réduire le fer est presque la même pour l'extrait acétone et éthanol jusque la concentration (0,5µg/ml) le pouvoir réducteur de l'extrait acétone et augmente par rapport l'extrait éthanol, mais les deux extraits sont inférieure par rapport à l'extrait chloroforme. Pour une meilleure comparaison entre les différents extraits et le standard on a exprimé le pouvoir réducteur en équivalence à l'acide ascorbique. La concentration des composés réducteurs dans l'extrait est exprimé en microgramme équivalent acide ascorbique /mg d'extrait et déterminer par l'équation de type : $y=18,19x+0,0804$ sachant que $R^2=0,9993$ (figure16).

Les résultats obtenus ont été illustrés graphiquement (figure 17).

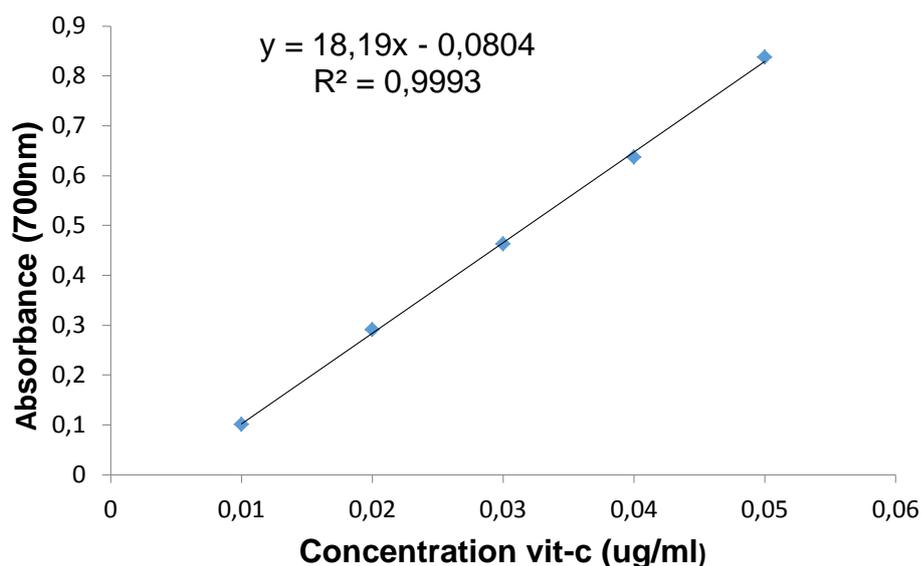


Figure 16: Le pouvoir réducteur du standard « acide ascorbique » (chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

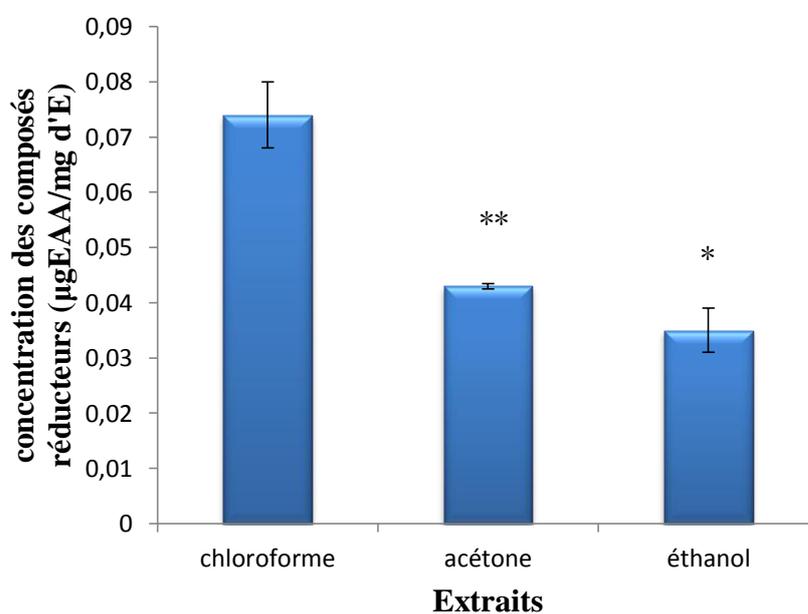


Figure 17: Évaluation de l'activité antioxydante des extraits de la plante étudiée par la méthode FRAP (chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

* = la différence est significative $p < 0,05$ par rapport à l'extrait chloroformique.

** = la différence est très significative $p < 0,01$ par rapport à l'extrait chloroformique.

Les résultats d'activité réductrice exprimés en μg équivalent acide ascorbique /mg d'extrait montrent clairement que l'extrait chloroformique présente le pouvoir réducteur le plus active avec une concentration égale $0,074 \pm 0,006 \mu\text{g EAA/ mg d'E}$, et significativement plus élevée par rapport a l'extrait éthanolique ($0,035 \pm 0,004 \text{EAA/ mg d'extrait}$) et très significative par rapport a l'extrait acétonique ($0,043 \pm 0,0005 \mu\text{gEAA/ mg d'extrait}$).

La présence des composés réducteurs dans les extraits de notre plante induit la réduction du complexe ferricyanure (Fe^{3+}) en ions ferreux (Fe^{2+}) qui réagissent comme donneurs d'électrons. L'absorbance reflétant la quantité des composés antioxydants présents dans l'échantillon testé, cette mesure permet une évaluation semi-quantitative des composés participant à la réaction réductrice (Figure18) (Tepe *et al.*, 2007 ; Rice-Evans *et al.*, 1995).

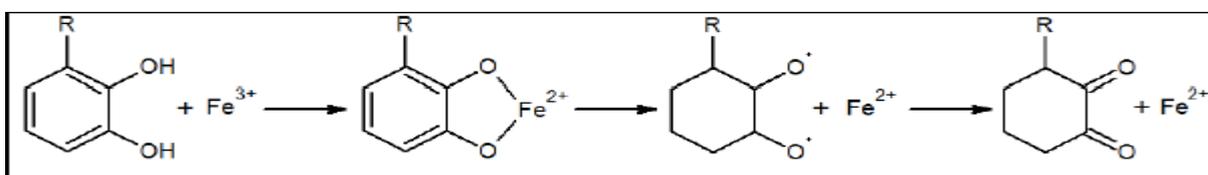


Figure 18: Mécanisme de réduction du Fer par les polyphénols (Perron Brumaghim, 2009).

Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (Bougandoura et Bendimerad, 2012 ; Bentabet *et al.*, 2014).

***CONCLUSION ET
PERSPECTIVES***

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. *Rhamnus alaternus* est une plante très répandue dans le nord de l'Algérie et vu son utilisation locale comme plante médicinale, elle présente un grand intérêt pharmacologique.

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

L'extraction effectuée par Soxhlet sur la poudre de *R. alaternus* montre que l'extrait chloroformique présente le rendement le plus élevé par rapport aux autres extraits ce qui montre que le rendement est différent en fonction de solvant d'extraction.

Les tests phytochimiques qualitatifs réalisés par les réactions de caractérisation ont permis de mettre en évidence des flavonoïdes, des tanins, des coumarines, des alcaloïdes.

L'analyse quantitative des trois extraits, a montré des résultats importants pour le dosage des polyphénols totaux et même des flavonoïdes. Dans le test de dosage des polyphénols, l'extrait chloroformique présente la teneur la plus élevée, par contre dans le test de dosage des flavonoïdes l'extrait acétonique est considéré comme l'extrait qui présente les meilleurs résultats par rapport aux autres extraits.

L'activité antioxydante a été déterminée, elle montre que les trois extraits de la plante étudiée présentent des propriétés antioxydantes remarquables. Cependant l'extrait acétonique est plus actif que les autres extraits vis-à-vis du piégeage du radical libre DPPH par contre l'extrait chloroformique présente l'activité la plus élevée dans le test de réduction des ions du fer.

Globalement, la plante choisie dans ce travail contient des molécules très intéressantes considérées comme des agents antioxydants qui peuvent être employées pour des applications thérapeutiques, contribuant ainsi de manière très efficace à la prévention des différentes maladies.

Comme perspectives on peut proposer :

- ✓ d'évaluer l'activité antioxydante par d'autres méthodes et de faire des tests in vivo afin de confirmer les activités observées in-vitro et déterminer de nouveaux agents thérapeutiques. ainsi une étude de la toxicité des principes actifs
- ✓ élargir le champ de recherche et d'étudier d'autres activités : Activité antimicrobienne, antivirale, antienzymatiques antidiabétique et cytotoxique.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Ait youssef M. (2006).** Les plantes médicinales de kabylie. Edition *Ibis press*, P 278- 279.
- Akerreta S. (2009).** Etnobotánica farmacéutica en Navarra: del uso tradicional de las plantas medicinales a su evidencia científica(Ph.D.thesis).Faculty of Science, University of Navarra, p. 831, Pamplona, Spain.
- Alilou H. (2012).** Etude phytochimique et antifongique de deux plantes du Sud du Maroc : *Asteriscus graveolens* sub sp. *odorus* (*Schousb.*) *Greuter* et *Asteriscus imbricatus* (Cav) DC. Thèse de Doctorat en sciences, Université Ibn Zohr, Agadir ,Maroc, 215p.
- Ammar R. B., Sghaier M. B., Boubaker J., Bhourri W., Naffeti A., Skandrani I., Bouhlel I., Kilani S., Ghedira K. & Chekir-Ghedira L. (2008).** Antioxidant activity and inhibition of aflatoxin B1-, nifuroxazide, and sodium azide-induced mutagenicity by extracts from *Rhamnus alaternus* L. *Journal of Chem.-Biol. Inter***174**, 1-10.
- Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Çelik S.E., Bektaşoğlu B., Berker,K.I. & Özyurt, D. (2007).** Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Journal of Molecules* **12** ,1496–1547.
- Aronne G & Wilcock C-C. (1995).** Reproductive lability in pre-dispersal biology of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) *Protoplasma*, 187, 49-59.
- Balasundram N., Sundram K. & Sammam S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial byproducts: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Journal of Food Chemistry* **99** ,191-203.
- Bardin J.M. (2004).** Dictionnaire illustré des plantes médicinales. Ed. Lodi, France.
- Barus C. (2008).** Etude électrochimique de molécules antioxydantes et de leur association en milieux homogène et biphasique - Application aux produits dermocosmétiques. Thèse de Doctorat en Génie des procédés et environnement, Université Toulouse III - Paul Sabatier, 235 p.
- Bas J.M., Gomez C. & Pons P. (2005).** Fruit production and predispersal seed fall and predation in *Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae). *Journal of Acta Oecol* **27**,115-123.
- Beaudeau J.L., Bonnefont-Rousselot D., Delattre J., Legrand A., Peynet J. & Therond P. (2006).** Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Journal of Immunoanalyse and Biologie spécialisée* **21**, 144-150.
- Beloued A. (2001).** *Les plantes médicinales d'Algérie*. Ben Aknoun, Alger: Ed. OPU.
- Ben Ammar R., Bhourri W., Ben Sghaier M., Boubaker J., Skandrani I., Neffati A., Bouhlel I. Kilani, S., Mariotte A.M., Chekir-Ghedira L., Dijoux-Franca M.G. & Ghedira K. (2009).** Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): a structure-activity relationship study. *Journal of Food Chemical* **116**, 258–264.

Ben Ammar R., Kilani S., Bouhlel I., Ezzi L., Skandrani I., Boubaker J., Ben Sghaier M., Naffeti A., Mahmoud A., Chekir-Ghedira L. & Ghedira K. (2008). Anti proliferative, Antioxidant, and Antimutagenic Activities of Flavonoid-Enriched Extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L: Combination with the Phytochemical Composition. *Drug, Journal of Chemical and Toxicology* **31**, 61-80.

Ben Ammar R., Kilani S., Bouhlel I., Skandrani I., Naffeti A., Boubaker J., Ben Sghaier M., Bhouri W., Mahmoud A., Chekir-Ghedira L. & Ghedira K. (2007). Antibacterial and cytotoxic activities of extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* (*Rhamnaceae*). *Journal of Microbiology* **57**, 453-460.

Ben Sghaier M., Bhouri W., Bouhlel I., Chekir-Ghedira L., Dijoux-Franca M.G., Ghedira K. & Kilani S. (2011). Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (*Rhamnaceae*): Kaempferol 3-O-b-isorhamninol and rhamnolcitrin 3-O-b isorhamninol. *Journal of Food and Chemical Toxicology* **49**, 1167–1173.

Benbrook, C.M. (2005). Elevating antioxidant levels in food through organic farming and food processing. Ed. Organic Center. 81 p.

Bhouri W., Ben Sghaier M., Kilani S., Bouhlel I., Dijoux-Franca M-G., Ghedira K. & Chekir Ghedira L. (2011). Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (*Rhamnaceae*):Kaempferol 3-O- β -isorhamninol and rhamnolcitrin 3-O- β isorhamninol. *Journal of Food and Chemical Toxicology* **49**, 1167–1173.

Bhouri W., Boubaker J., Kilani S., Ghedira K. & Chekir-Ghedira L.(2012). Flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (*Rhamnaceae*): Kaempferol 3-O- β -isorhamninol and rhamnolcitrin 3-O- β -isorhamninol protect against DNA damage in human lymphoblastoid cell and enhance antioxidant activity. *Journal of botanique* **80**, 57-62.

Boudjouref M. (2011). Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Thèse de Magister en Biochimie Université Ferhat Abbas, Sétif. Algérie. P99.

Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. mdicales internationales Editions Technique & Documentation, Cachan, [S.l.], p. 647-673.

Bruneton J. (2009). Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales. 4ème édition. Edition *Lavoisier Technique & Documentation. Médicales Internationales, Paris*, p 261, 308, 571.

Calvo M.I. & Cavero R.Y.(2014). Medicinal plants used for cardiovascular diseases in Navarra and their validation from Official sources. *Journal of Ethnopharmacology* **157**, 268- 273.

Cavero R.Y., Akerreta S. & Calvo M.I. (2013). Medicinal plants used for dermatological affections in Navarra and their pharmacological validation. *Journal of Ethno pharmacology* **149**, 533–542.

- Chapelle J.P., Charlier C., Defraigne J.O., Haleng J. & Pincemail J. (2007).** Le stress oxydant. *Journal of Revue Medical Liege*. **62**, 628-638.
- Collin S. & Crouzet J. (2011) .** Polyphénols et procédés. *Edition Lavoisier TEC & DOC*, p 5, 13, 16, 235.
- Cuoco G., Mathe C. & Vieillescazes C. (2014).** Liquid chromatographic analysis of flavonol compounds in green fruits of three *Rhamnus* species used in Stil de grain. *Journal of Microchemical*, **115**, 130–137.
- DaCosta C.J. & Baenziger J.E. (2003).** A rapid method for assessing lipid: protein and detergent: protein ratios in membrane-protein crystallization. *Acta Crystallogr. Journal of Biological Crystallography* **59**, 77–83.
- Diallo A. (2005).** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* WILLD. (MYRTACEAE). Thèse de Doctorat en Pharmacie. Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie de Bamako, Mali.
- Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Vidal N., Lesgards J. F. & Stocker P. (2007).** Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *European Journal of Food Research Technology* **224**, 801-809.
- Favier A. (2003).** Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Actualité chimique* **11**, 108-115.
- Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzade Z. & Jore D. (2003) .** Espèce réactive de l'oxygène. *L'actualité chimique*, 91-96.
- Ghazghazi H., Aouadhi CH., Sebei H. & Hasnoui, B. (2013).** Etude comparative de la teneur et de l'activité antioxydante des caroténoïdes de deux espèces tunisiennes: *Rosa canina* et *Rosa sempervirens*. *F. S. B*, XI: 76-85.
- Ghasemzadeh A. & Ghasemzadeh N. (2001).** Flavonoids and phenolic acids: role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicine Plants Research* **5** (31), 6697-6703.
- Gilani G. S. & Anderson J. J. B. (2002).** Phytoestrogens and health. *Edition Aocs Press*, P 405.
- Guinebert E., Durand P., Prost M., Grinand R. & Bernigault R. (2005).** Mesure de la résistance aux radicaux libres. *Sixièmes Journées de la Recherche Avicole*. 554-558.
- Gulias J., Traveset A., Riera N. & Mus M. (2004).** Critical Stages in the Recruitment Process of *Rhamnus alaternus* L. *Journal of Annals of Botany* **93**, 723-731.
- Gulias J., Traveset A., Riera N., & Mus, M. (2004).** Critical Stages in the recruitment process of *Rhamnus alaternus* L. *Journal of Annals of Botany* **93**, 723-731.
- Hadi M. (2004).** La quercétine et ses dérivés: molécule à caractère pro-oxydant ou capteur de radicaux libres; études et application thérapeutiques. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur (Strasbourg).

Halliwell B. & Gutteridge J. M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Journal of Biochemical* **219**, 1–14.

Halliwell B. (1997). Antioxidants and human disease: a general introduction. *Journal of Nutrition Reviews* **55**,44–49.

Harman D. (2000). Free radical theory of Aging: an update. *Annal of the New York Academy of Sciences* **928**, 1–2.

Imran M., Ahmad N., Anjum F. M., Kamran-Khan M., Mushtaq Z., Nadeem M. & Hussain S. (2015). Potentiel protective properties of flax lignin secoisolariciresinol diglucoside. *Nutrition journal* **14**, 1-7.

Izakovic M., Mazur M., Moncol J., Rhodes C.J. & Valko M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Journal of Chemico-biological interactions* **160**, 1- 40.

Izhaki I., Tsahar E., Irena P. & Jacob F. (2002). Within population variation and interrelationships between morphology, nutritional content, and secondary compounds of *Rhamnus alaternus* fruits. *Journal of New Phytologist*, **156**, 217-223.

Kening Y., Vincenzo D. L. & Normand B. (1995). Création of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptability of potato to phytophthora infestans. *Journal of The Plant Cell*, **7**, 1787-1799.

Kirschvink N., Moffarts B. & Lekeux P. (2008). The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *Journal of Veterinary* **177**, 178–191.

Kosalec I., Kremer D., Locatelli M., Epifano F., Genovese S., Carlucci G., Randic M & Zovko Končić M. (2013). Anthraquinone profile, antioxidant and antimicrobial activity of bark extracts of *Rhamnus alaternus*, *R. fallax*, *R. intermedia* and *R. pumila*. *Journal of Food Chemistry* **136**, 335–341.

Kruidenier L. & Verspaget H.W.(2002). Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease - radicals or ridiculous?. *Journal of Alimentary Pharmacology Therapeutics* **16**, 1997-2015.

Lahouel M., Amedah S., Zellagui A., Touil A., Rhouati S., Benayache F., Leghouchi E., & Bousseboua, H. (2006). The interaction of new plant flavonoids with rat liver mitochondria: relation between the anti and prooxydant effect and flavonoids concentration. *Journal of Thérapie* **61**(4), 347-355.

Marc F., Davin A., Deglène-Benbrahim L., Ferrand C., Baccaunaud M. & Fritsch P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxidant dans les aliments. *Journal of Medecines Sciences* **20**, 458-464.

MobileReference. (2008). The Illustrated Encyclopedia of Trees and Shrubs: An Essential Guide To Trees and Shrubs of the World. Ed. MobileReference, p. 5205.

Nkhili N. (2009). *Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant.* Thèse de doctorat. Université de Marrakech. 187-193.

- Pastre J. & Priymenko N. (2007).** Intérêt des anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Journal of Revue Médecine Vétérinaire* **1**, 180–189.
- Pastre J.O.C. (2005).** Intérêt de la supplémentation en antioxydant dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de docteur vétérinaire, Université Paul-Sabatier de Toulouse.
- Pincemail J., Meurisse M., Limet R. & Defraigne J.O., (1999).** Méthodes d'évaluation du stress oxydatif chez l'homme: importance en matière de prévention. *Journal of Cancérologie* **95**, 1–4.
- Piquet M.A. & Hébuterne X. (2007).** Nutrition en pathologie digestive. ed. Doin.
- Pourrut B. (2008).** Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat à l'Institut National Polytechnique de l'Université de Toulouse spécialité: Ecotoxicologie. France.
- Quezel P & Santa S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. Centre nationale de la recherche scientifique, Paris, p. 617-620.
- Richardson J.E., Fay M.F., Cronk Q.C., Bowman D & Chase M.W. (2000).** A phylogenetic analysis of Rhamnaceae using rbcL and trnL-F plastid DNA sequences. *Am J Bot* **87**(9), 13-24.
- Said O., Khalil K., Fulder S. & Azaizeh H. (2002).** Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the west bank region. *Journal of Ethnopharmacology* **83**, 251-265.
- Sies H. (1997).** Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Journal of Physiology* **82**, 291–295.
- Stocker P., Yousfi M., Djerridane O., Perrier J., Amziani R., El Boustani S. & Moulin A. (2004).** Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Journal of Biochimie* **86**, 919-925.
- Touaibia M. & Chaouch F.Z. (2014).** Pouvoir antioxydant des extraits de *Myrtus communis* L. obtenus *in situ* et *in vitro*. *Journal of Natur and Technology* **10**: 03-08.
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M. & Mazur M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Journal of Chemico-Biological Interactions* **160**, 1–40.
- Walker J.E., Saraste M., Runswick M.J. & Gay N.J. (1982).** Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* **1**, 945–951.