

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة امحمد بوقرة بومرداس
Université M'hamed Bougara de Boumerdès



Faculté des Sciences
Département de Biologie

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du **Diplôme de Master en Biologie**

Filière et Domain : Science de la nature et de la vie

Spécialité: Biologie des Populations et des Organismes

Thème

Potentiel anti-inflammatoire de l'extrait polyphénolique d'une
plante médicinale de la famille des Fabaceae.

Réalisé par

M^{elle} BOUKABOUYA Souad

M^{me} BENNADJI Souad

Soutenu publiquement le 10/07/2019, devant le jury composé de :

M ^{me} ROUANE Asma	MAA	UMBB	Présidente
M ^{me} BENHABYLES-BOUTTABA Narimen	MCB	UMBB	Promotrice
M ^{me} LAOUFI Razika	MCB	UMBB	Co-promotrice
M ^{me} BOUCHENAK-ARAB Ouahiba	MCA	UMBB	Examinatrice

Année universitaire 2018-2019



Remerciements

Avant tout, nous remercions Allah tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la volonté, la patience pour accomplir ce travail.

*Nous adressons nos plus sincères remerciements et le plus grand respect à notre promotrice **M^{me} BENCHABYLES Narimen** qui nous a encadrées et dirigées à faire ce travail avec ses conseils et la confiance qui nous a permis de réaliser ce travail.*

*Nos remerciements vont aux membres de jury, **M^{me} BOUCHNEK Ouahiba** et **M^{me} RAOUANE Asma** pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nos s'adressent aussi remerciements à notre co-promotrice **M^{me} LAOUFI Razika** pour ses conseils et orientation.*

Nos s'adressent aussi remerciements à tous nos enseignants qui nous ont transmis leurs savoir, ce qui nous a permis d'acquérir les connaissances indispensables pour réaliser ce mémoire.

Nous témoignons enfin notre reconnaissance à tous ceux et celles ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de notre mémoire de fin de cycle.

A tous les étudiantes de graduation « master 2 BPO 2019 »



DÉDICACE

Tout au début, je tiens à remercier Allah de m'avoir donné du courage et de la patience afin de réaliser ce travail. J'ai l'honneur de lui dédiées ma réussite

À mon père

Certes, tu nous as quittés très tôt mais tes souvenirs sont gravés dans ma mémoire. Tu as toujours été de coeur avec nous. Tu n'as ménagé aucun effort pour la réussite de tes enfants Nous ne saurons jamais te remercier assez. J'aurai voulu que tu sois aujourd'hui à mes cotés mais Allah a voulu ainsi. Qu'Allah t'accorde Sa miséricorde !

Je ne parle jamais de ton décès mais au fond de moi manque et j'en meurs.

À ma mère

Tu m'as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir

Tu ce que je peux t'offrir ne pourra exprimer l'amour et reconnaissance que je porte

Je vous remercie pour votre soutien, votre patience à mon égard. Un grand merci pour votre grand amour, votre patience, vos encouragements.

À mes chers sœurs Nadia

Meriem et son marie et la petite princesse Nourhane

À mes chers frère Khotir et Zidane

À tout les enfants de mes frères

Abd elhamid, Romaiassa ,Lina, Djamila, Rahaf, Adem, Abderrezak.

À tout les amies et la famille

À ma meilleure amie Amira

À ma binôme Souad et sa famille

À toute la promotion 2018 /2019 de Master II BPO

الحمد لله

Souad Boukabouya

DEDICACES

Tout au début, je tiens à remercier Allah de m'avoir donné du courage et de la patience afin de réaliser ce travail que je dédie :

A mes chers parents pour leur sacrifice, leur multiple soutien, et leur encouragement, leur tendresse, disponibilité durant toutes mes années d'étude. Que dieu vous protège et vous prête bonne santé et longue vie. J'espère que je suis à la hauteur de ce que vous attendez de moi.

Je vous aime.

A ma FILLE :Meryoma

A ma chère sœur : Meriem, Asmaa, Amina, Ikram

Naima et son mari et ses enfants : Ramzy, Asile, Norine.

Sarah et son mari et ses enfants :Yacine, Khawla

A mes chers frères :

Amine

Mohammed et Sa fiancé Amira

A ma binôme Souad et sa famille

A ma famille, mes amies et à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin

الحمد لله

Souad Bennadji

Résumé

Le présent travail contribue à la quantification des polyphénols et des flavonoïdes, l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* et l'activité anti-inflammatoire *in vivo* des différents extraits préparés à partir des feuilles, des gousses et des graines de *Sophora japonica* L. Les rendements d'extraction des polyphénols de l'extrait des feuilles (83,33%) et des gousses (79,16%), est important par rapport à l'extrait des graines (24,33%). La quantification des polyphénols par la méthode de Folin-Ciocalteu de l'extrait des gousses, des feuilles et des graines a donné la valeur de l'ordre 0,112 mg EAG/g de matière sèche, 0,088 mg EAG/g de matière sèche et 0,022 mg EAG/g de matière sèche. L'effet antioxydant a été déterminé par le test de DPPH, la méthode FRAP et le test de blanchissement du β -carotène. L'évaluation de l'activité antioxydante a montré que les différents extraits de *Sophora japonica* L ont une forte activité antioxydante (l'extrait des feuilles dans le test du β -carotène et FRAP et l'extrait des graines dans le test de DPPH). Par ailleurs, L'effet anti-inflammatoire a été évalué en utilisant la méthode de l'œdème plantaire provoqué par la carragénine chez la souris avec une injection sous cutanée sur les pattes postérieures gauche. Les résultats de cette étude montrent que l'extrait méthanolique des gousses (89,03%), des feuilles (74,5%) et des graines (72,22%) de *Sophora japonica* L. présente une efficacité réductrice de l'œdème légèrement inférieure à celle du Diclofénac (94%).

Mots clés: *Sophora japonica* L, polyphénols, activité antioxydante, activité anti-inflammatoire, DPPH, FRAP, β -carotène.



*Liste des
abréviations*

AINS. Anti-inflammatoire non stéroïdiens.

AIS. Anti-inflammatoire stéroïdiens.

AlCl₃. Trichlorure d'aluminium.

BHT. Butyl-hydroxy-toluène.

D.O. Densité Optique.

DPPH. 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl.

EAG. Equivalent d'Acide Gallique.

EQ. Equivalent de quercétine

ERO. Espèces Réactifs de l'oxygène.

ESM. Erreur standard de Moyen.

FRAP. Ferric reducing antioxidant power.

IC₅₀. Concentration Inhibitrice à 50 %.

R. Rendement.

TCA. Acide trichloroacétique.



Liste des figures

Figure 1. Distribution de <i>Sophora Japonica</i> dans le monde.....	03
Figure 2. Photo originale de <i>Sophora japonica</i> au milieu de récolte.....	04
Figure 3. Structure des polyphénols.	07
Figure 4. Structure de bases des flavonoïdes.....	09
Figure 5. Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B).....	12
Figure 6. La réaction inflammatoire schématisée.....	15
Figure 7. Mécanisme d'action des AINS.....	16
Figure 8. Mécanisme d'action des glucocorticoïdes.....	17
Figure 9. La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydant.....	19
Figure 10. Gousses de <i>sophora japonica</i> L.	22
Figure11. Feuilles de <i>Sophora japonica</i> L.	22
Figure 12. Graines de <i>Sophora japonica</i> L.....	23
Figure 13. Poudre végétale de la plante <i>Sophora japonica</i> L.	24
Figure 14. Souris Swiss albinos femelles.	25
Figure 15. Carte géographique de la région de Boumerdes indiquant la zone de récolte.....	25
Figure 16. Schéma récapitulatif des différentes étapes du travail.....	26
Figure 17. Extraits des polyphenols de <i>Sophora japonica</i> L.	27
Figure 18. Protocole d'extraction des composés phénoliques	27
Figure 19. Protocole de dosage des polyphénols totaux.....	29
Figure 20. Protocole de dosage des flavonoïdes	30
Figure 21. Protocole de la méthode du DPPH.....	31
Figure 22. Protocole de la réduction du fer (FRAP).....	32
Figure 23. Protocole du test de blanchissement de la β -Carotène /acide linoléique.....	33
Figure 24. Etapes d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	36

Figure 25. Rendement des extraits phénoliques des feuilles, gousses et grains de <i>Sophora japonica L</i>	40
Figure 26. Courbe d'étalonnage d'acide gallique (mg/ml).....	40
Figure 27. Courbe d'étalonnage de la Quercétine.	42
Figure 28. Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration des extraits et de l'acide ascorbique.....	44
Figure 29. Histogramme représentant les IC50 des extraits méthanolique et de l'acide ascorbique.	45
Figure 30 Absorbance des extraits de <i>S. japonica</i>	46
Figure 31. Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en présence de l'extrait méthanolique du <i>Sophora Japonica L</i> et du BHT	48
Figure 32. Pourcentages d'augmentation de l'œdème chez toutes les souris pendant cinq heures.....	49
Figure 33. Pourcentages de la réduction de l'œdème chez toutes les souris pendant cinq heures.	51



Liste des tableaux

Tableau 1. Classification botanique de <i>Sophora japonica</i>	04
Tableau 2. Principaux acides hydro benzoïque.....	08
Tableau 3. Principaux acides hydroxy-cinnamiques	08
Tableau 4. Les différentes classes de flavonoïdes	09
Tableau 5. Les principaux types de coumarines.....	11
Tableau 6. Exemples de plantes médicinales douées d'activités anti-inflammatoires.....	17
Tableau 7. Localisation et fonction des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques...	21
Tableau 8. Les différentes doses injectées par voie sous cutané.....	35
Tableau 9. Rendement des extraits des feuilles, des gousses et des graines en composés phénoliques.....	39
Tableau 10. Concentration des polyphénols des différents extraits méthanoliques.....	41
Tableau 11. Concentration des flavonoïdes de l'extrait méthanolique.....	42
Tableau 12. Les valeurs d'IC50 des trois extraits méthanolique de la plantes et de l'acide ascorbique.....	45

SOMMAIRE

Introduction	01
Partie I. Revue bibliographique.	
Chapitre I.Présentation de la plante étudiée	
I.1.Origine et distribution.....	03
I.2.Classification taxinomique.....	03
I.3.Description botanique.....	05
I.4.Principaux métabolites secondaires.....	05
I.5.Propriétés biologiques et utilisation thérapeutique traditionnelle.....	05
Chapitre II. Les composés phénoliques	
II.1.Généralités.....	06
II.2.Biosynthèse.....	06
II.3.Structure chimique	06
II.4. Classification des polyphénols.....	07
II.4.1. Formes simples	07
II.4.1.1. Acide hydroxy-benzoïques.....	07
II.4.1.2. Acide hydroxy cinnamique.....	08
II.4.1.3. Flavonoïdes.....	09
II.4.2. Formes condensées.....	10
II.4.2.1. Coumarines.....	11
II.4.2.2. Lignines	11
II.4.2.3. Tanins.....	11
II.5. Rôle des polyphénols.....	12
II.5.1. Chez les végétaux	12

SOMMAIRE

II.5.2. Chez les humains.....	12
II.6. Propriétés biologiques des composés polyphénoliques.....	13
• Activité anti-inflammatoire.....	13
• Activité antibactérienne:.....	13
• Activité anticancéreuse.....	13
• Activité antioxydante.....	13
Chapitre III: L'inflammation	
III.1. Définition	14
III.2. Facteurs étiologiques	14
III.3. Types d'inflammation	15
III.3.1. Inflammation aiguë	15
III.3.2. Inflammation Chronique.....	15
III.4. Anti-inflammatoires.....	16
III.4.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens AINS.....	16
III.4.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)	16
III.4. 3. Anti-inflammatoires d'origine végétale.....	17
Chapitre IV. Le stress oxydatif	
IV.1. Les radicaux libres	18
IV.2. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	18
IV.3. Origine de production des ERO	18
IV.4. Le stress oxydant.....	19
IV.4.1. Les causes d'un stress oxydant.....	19
IV.4.2. Les conséquences moléculaires du stress oxydatif	20
IV.5. Les antioxydants	20
Partie II. Matériel et Méthodes	

SOMMAIRE

I. Matériel.....	22
I.1. Matériel biologique.....	22
I.2. Matériel non biologique.....	25
I.3. Présentation de la région d'étude.....	25
II. Méthodes.....	26
II.1. Extraction des polyphénols.....	26
II.2. Expression du rendement de l'extraction.....	28
II.3. Analyse quantitative des composés phénoliques.....	28
II.3.1. Dosage des polyphénols totaux.....	28
II.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	29
II.4. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante des extraits de <i>Sophora japonica</i> L.....	30
II.4.1. Méthode de piégeage du radical libre DPPH.....	30
II.4.2. Méthode de la réduction fer (FRAP).....	31
II.4.3. Test de blanchissement de la β -Carotène /acide linoléique	32
II.5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits de <i>S. japonica</i> L.....	34
Partie III. Résultat et Discussion	
III.1. Extraction et caractérisation des extraits phénoliques.....	39
III.1.1. Rendement de l'extraction.....	39
III.1.2. Dosage des polyphénols totaux.....	40
III.1.3. Dosage des flavonoïdes	41
III.2. Evaluation de l'activité antioxydante.....	43
III.2.1. Méthode de piégeage du radical libre DPPH.....	43
III.2.2. Pouvoir réducteur de fer (FRAP)	46
III.2.3. Test de blanchissement du β - carotène/acide linoléique.....	47

SOMMAIRE

III.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	49
Conclusion et perspectives.....	53
Référence bibliographique	55

INTRODUCTION

Les plantes ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines grâce à leurs richesses en composants de valeur thérapeutiques. Le pouvoir de guérison des plantes provient des effets de leurs métabolites secondaires. On distingue plusieurs groupes de métabolites notamment les phénols (simples phénols, acides phénoliques, flavonoïdes, flavones, flavonols, tannins et coumarines) (Khadhri et *al.*, 2013).

Beaucoup de plantes sont riches en composés phénoliques, qui constituent une classe importante d'antioxydantes (Yoa et *al.*, 2010 ; Oancea et *al.*, 2012). Les propriétés physiologiques attribuées aux composés phénoliques comprennent les effets antidiabétiques, antiallergiques, antifongiques, anti-inflammatoires, anticancéreux et vasodilatateurs (Del Bano et *al.*, 2003 ; Cao et *al.*, 2015).

Au cours de ces dernières années, des études sur les activités antioxydantes des principes actifs des plantes ont augmenté de façon remarquable qui est due à un intérêt accru pour leur potentiel d'être utilisé en tant que source naturel d'antioxydants (Almani et *al.*, 2009).

L'inflammation est un processus habituellement bénéfique : son but est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, par anomalies des régulations du processus inflammatoire, ou par anomalie quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation (Rousslet et *al.*, 2005).

Sophora japonica est un arbre, qui appartient à la famille des fabaceae (Panthati et *al.*, 2012) ; parmi les plantes médicinales employées dans la médecine traditionnelle chinoise (Xiao, 2013). Ces parties sont souvent utilisés ensemble pour traiter divers problèmes de santé, notamment divers types d'hémorragies (hémoptysie, épistaxis, métrorragie) (Orwa et *al.*, 2009), des maux de tête (Xiao, 2013), peut faire baisser la tension artérielle, prévenir les accidents vasculaires cérébraux et éliminer la fatigue (Lucienne B et *al.*, 1980).

Selon notre recherche bibliographique, aucune étude phytochimique de cette plante n'a été rapportée, c'est pour cela, cette étude est de l'objectif d'estimer la teneur en composés

Introduction générale

phénoliques de cette plante médicinale, par dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes, comme elle vise à l'évaluation de leur activité antioxydant *in vitro* et anti-inflammatoire *in vivo*.

Le contenu de ce mémoire est réparti en trois parties :

La première comprend d'une partie bibliographique composé de :

- Description botanique de *Sophora japonica L* et de ses propriétés thérapeutiques.
- Les métabolites secondaires.
- Généralités sur l'inflammation et les anti-inflammatoires.
- généralités sur les radicaux libres, le stress oxydatif et les antioxydants.

La deuxième partie comprend d'une étude expérimentale composée de :

- Extraction des polyphénols.
- L'évaluation de l'activité antioxydante par le test DPPH, par mesure du pouvoir réducteur de fer (FRAP) et le test de blanchissement β -carotène.
- L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits méthanoliques de *Sophora japonica L*.

La troisième partie contient les principaux résultats obtenus, leur interprétation ainsi que leur discussion.

Et enfin une conclusion et perspectives.

Chapitre I. Présentation de la plante étudiée

I.1. Origine et distribution

La plante *Sophora japonica* L. (sophora du Japon), aussi connu sous le nom scientifique de *Styphnolobium japonicum* est un arbre largement distribué en Chine. Il est cultivé depuis longtemps au Japon, Corée en Asie mineure et en Caucasic. Il est parfois planté dans les parcs en Afrique du nord, en Europe occidentale et en Amérique du nord (Lucienne et *al.*, 1980) (figure 01).

Aujourd'hui rare et protégé dans son pays d'origine qui lui a donné son nom, on ne trouve plus de cèdres à l'état naturel que dans quelques points du nord de la Syrie et surtout dans la chaîne montagneuse du sud de la Turquie (le Taurus) (Delphine et *al.*, 2007).

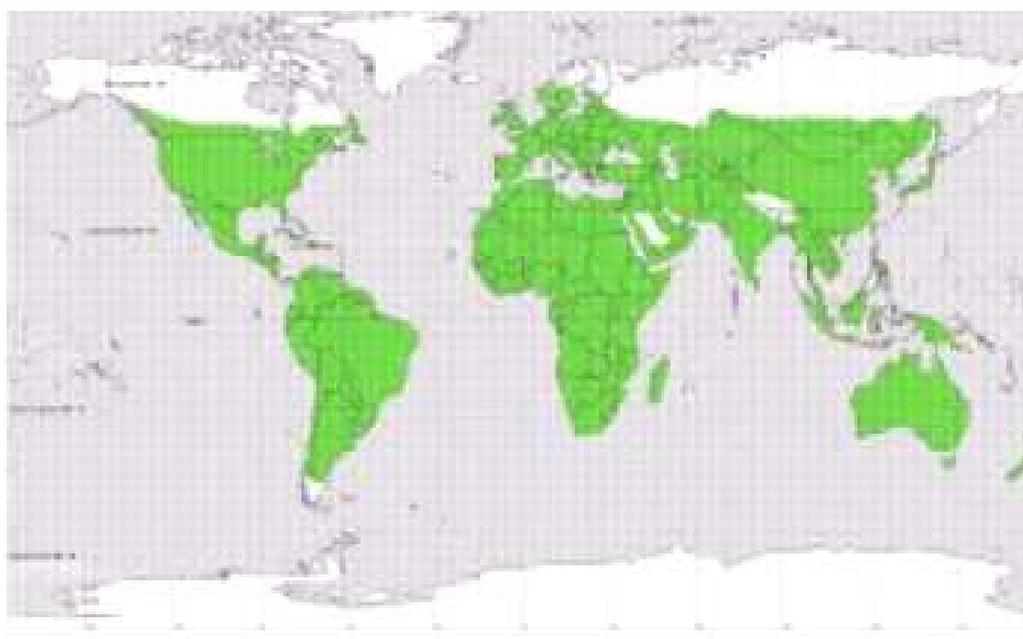


Figure 1. Distribution de *Sophora Japonica* dans le monde d'après Heywood, (1996).

I.2. Classification taxinomique

La *Sophora japonica* appartient à la famille des fabacées contenant environ 52 espèces, dix-neuf variétés, et sept formes largement distribuées en Asie, en Océanie, et en îles du Pacifique. Allant des herbacées aux arbres (*Sophora japonica* L.), ses deux sous-genres sont *sophora* (fruits déhiscent charnu et mésocarpe incomplet) et *styphnolobium* (fruit indéhiscent charnu et mésocarpe complet) (Panthati et *al.*, 2011).



Figure 2.Photos originales de *Sophora japonica* au milieu de récolte.

D'après Linné(1830), la position systématique de *S.japonica* est la suivante :

Tableau 1. Classification botanique de *Sophora japonica* (Linné 1830).

Classification phylogénique	
Règne	Plantae
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Fabales
Famille	Fabaceae
Sous-famille	Fabiodeae
Tribu	Sophoreae
Genre	<i>Styphnolobium</i>
Espèce	<i>Japonicum</i>
Range	Espèce
Nom scientifique	<i>Styphnolobium japonicum</i>
Basionyme	<i>Sophora japonica</i>
Synonymes	<i>Sophora japonica</i> , <i>Sophora korolkowi</i> , <i>Sophora pubescens</i> , <i>Sophora sinensis</i>
Nom communs	<i>Sophora japonica</i> , Sophora du japon (Français) Japanese pagodatree (Anglais)

I.3.Description botanique

S.japonica est un bel arbre de 15 à 20m de hauteur, à croissance rapide qui s'élargit en vieillissant. Originaire de la chine, aux feuilles composés imparipennées, les fleurs sont odorantes, jaune pâle, de type Papilionacées. Le fruit est une gousse épaisse, brun dressés et longs de 7 à 11 cm, contentent 14 graines réniformes (des étranglements). Ses grosses branches sont étalées et étagées. Son tronc est divisé. Son écorce est gris foncé et crevassée (Lucienne et *al.*, 1980; Xiao, 2013).

I.4.Principaux métabolites secondaires

La composition chimique de Sophora contient divers types de composés phytochimiques, tels que les flavonoïdes, les saponines, les acides phénoliques, les acides gras, les tanins et les pigments. Parmi ces composés, les flavonoïdes, comprenant la rutine, la quercétine, la génistéine et le kaempférolsont les composants principaux de *S. japonica* (Fu-sheng Zhang et *al.*,2015).

I.5.Propriétés biologiques et utilisation thérapeutique traditionnelle

S.japonica possèdent une large gamme de propriétés pharmacologiques des activités sédatives, dépressives, anti-oxydantes, anticancéreuses, anti-asthmatiques, anti-néoplasiques, antimicrobiennes, antivirales, anti pyrétiques, cardiotoniques, anti-inflammatoires, diurétiques, analgésiques, hypothermiques, et antispasmodiques (Panthati et *al.*, 2013).

En médecine traditionnelle *S.japonica* est utilisée pour traiter divers problèmes de santé, notamment les hémorragies (nasals, digestives, hémorroïdes, gynécologiques), les vertiges, les maux de tête, ainsi que la prévention des accidents liée à la fragilité des capillaires (athérosclérose, hypertension) (Lucienne et *al.*, 1980; Xiao, 2013).

Elle est également utilisée dans la prise en charge des maladies cardiovasculaires, des déficiences de la rate et de l'obésité chez les personnes âgées. Elle peut inhiber efficacement la réplication des cellules du VIH-1, empêchant ainsi l'entrée du virus et inactive la transcriptase inverse du VIH-1 (Fu-sheng et *al.*, 2015).

En usage externe, elle est souvent employées dans le traitement de la peau comme l'eczéma, la colite et le psoriasis (Panthati et *al.*, 2012).

Chapitre II. Les composés phénoliques

II.1. Généralités

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ces métabolites sont trouvés dans tous les fruits et légumes, depuis les racines jusqu'aux fruits, mais avec une répartition quantitative qui varie entre les différents tissus (Waksmundzka et Sherma, 2011). Leurs rôles ne sont pas strictement indispensables à la vie du végétal, cependant ces substances jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement (Hynes, 2004).

Près de 8000 composés naturels appartiennent à cette famille de polyphénols. Ils ont en commun un noyau benzénique portant au moins un groupement hydroxyle (Stalikas, 2007).

II.2. Biosynthèse

Les polyphénols sont synthétisés par deux voies biosynthétiques :

- Celle de l'acide shikimique, qui conduit après transamination et désamination, aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples (Knaggs, 2003).
- Celle issue de l'acétate, qui conduit à des composés polycycliques tels que les 1,8-dihydroxyanthraquinones ou les naphthoquinones (Bruneton, 1999).

II.3. Structure chimique

La structure chimique est identique à tous les polyphénols: un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxyles. Les polyphénols sont classés en différents groupes en fonction du nombre des noyaux aromatiques qui les composent et des éléments qui les relient (Manllah, 2012).

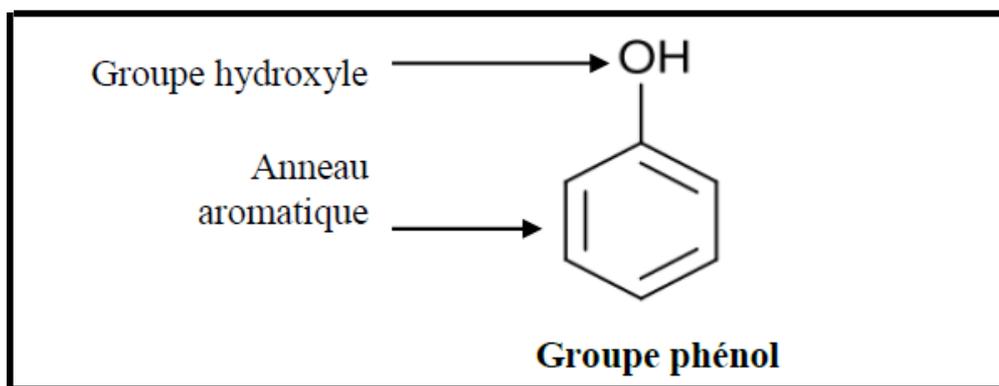


Figure 3. Structure des polyphénols.

II.4. Classification des polyphénols

Les composés phénoliques sont classés en plusieurs principaux groupes qui se distinguent par le nombre d'atomes de carbone constitutifs et la structure du squelette de base (Robard et *al.*, 1999; Michalak, 2006).

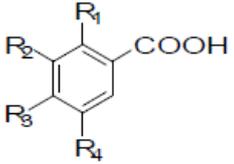
II.4.1. Formes simples

Présentent des structures chimiques allant de C6 aux C15. On distingue: les Acides hydroxy benzoïques, les acides hydroxy cinnamiques et les flavonoïdes.

II.4.1.1. Acides hydroxy-benzoïques

Ces acides sont dérivés de l'acide benzoïque, ils sont fréquents sous formes d'esters méthyliques ou glycolyses chez les gymnospermes et les angiospermes. Ils sont libérés après hydrolyse alcaline de certaines molécules en particulier la lignine et certains tanins (Macheix et *al.*, 2005). Les acides hydrox benzoïques les plus abondants sont répertoriés dans le tableau 2:

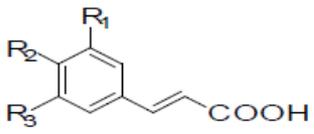
Tableau 2. Principaux acides hydro benzoïques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

structure	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Acide phénolique
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide phydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH ₃	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

II.4.1.2. Acides hydroxy-cinnamiques

C'est une classe très importante qui dérive de l'acide cinnamique. Avec une structure générale de base de type (C6-C3), ils existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de ces molécules sont représentés dans le tableau 3.

Tableau 3. Principaux acides hydroxy-cinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Structure	R ₁	R ₂	R ₃	Acide phénolique
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide cafféique
	OCH ₃	OH	H	Acide férulique
	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide sinapique

II.4.1.3. Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un des principaux groupe de polyphénols avec plus de 9000 composés différents, et distribués de manière générale dans toutes les plantes vasculaires (Halliwell et *al.*, 1987). Leur squelette chimique commun possède 15 atomes de carbones, constitué de deux noyaux benzéniques A et B reliés par un cycle pyranique central C (figure4).

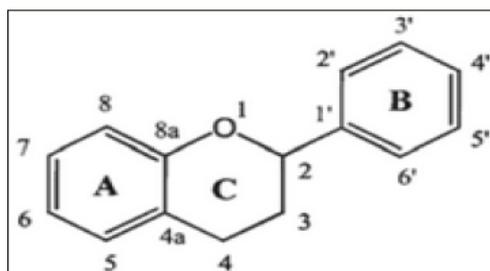
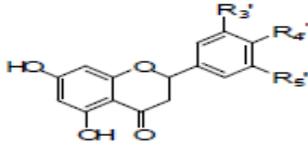
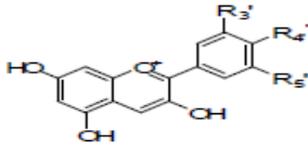
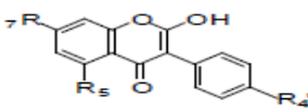


Figure 4. Structure de bases des flavonoïdes.

Les flavonoïdes diffèrent les uns des autres par la position des substitutions sur les noyaux A et B, et la nature de C. les flavonoïdes sont répartis en différentes catégories dont les plus importantes sont les flavonols, les flavones, les flavanols les isoflavonones, les flavanones et les anthocyanes (Tableau 4).

Tableau 4. Les différentes classes de flavonoïdes (Narayana et *al.*, 2001).

classe	Structure chimique	R ₃ '	R ₄ '	R ₅ '	exemple
flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH ₃	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myricétine
flavanols		OH	OH	H	Catéchine

flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphémidine
isoflavones		R ₅	R ₇	R ₄ '	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidezine

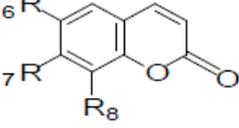
Ces molécules se rencontrent à la fois sous forme libre, mais sont souvent liées avec des sucres, on parle alors d'hétérosides constitués d'une partie phénolique aglycone associée à un sucre. Ils sont plutôt présents sous forme de cire dans les feuilles, les écorces et les bourgeons (Sun *et al.*, 2007). La couleur des fruits, des fleurs et des feuilles et une caractéristique des flavonoïdes (Benhammou *et al.*, 2009).

II.4.2. Formes condensées

II.4.2.1. Coumarines

Les coumarines sont des hétérocycles oxygènes ayant comme structure de base le benzo-2pyrone (Iwueke, 2008). Les coumarines de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Elles sont capables de prévenir la peroxydation des lipides et des peroxydes et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (Madhavi, 1996).

Tableau 5. Les principaux types de coumarines.

structure	R ₆	R ₇	R ₈	Acide phénolique
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH ₃	OH	H	Scopolétole
	OCH ₃	OH	OH	Fraxétole
	H	OH	OH	Daphnétole

II.4.2.2.Lignines

Les lignines résultent de la polymérisation tridimensionnelle de 3 molécules phénoliques de base dénommés monolignols et qui sont les alcools coumaryliques, coniferylques et sinapyliques (Macheiket *al.*, 2005).

II.4.2.3.Tannins

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques Polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présente, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (Haslam, 1996; Cowan, 1999). Les tannins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toute les parties de la plante: l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (Scalbert, 1991). On distingue deux groupes de tannins différents par leur structure et par leur origine biogénétique:

- **Tannins hydrolysables** ceux sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins soit l'acide ellagique dans le cas des tannins classiquement dénommés ellagitannins (Figure 5) (Bruneton, 1993; Cowan, 1999).

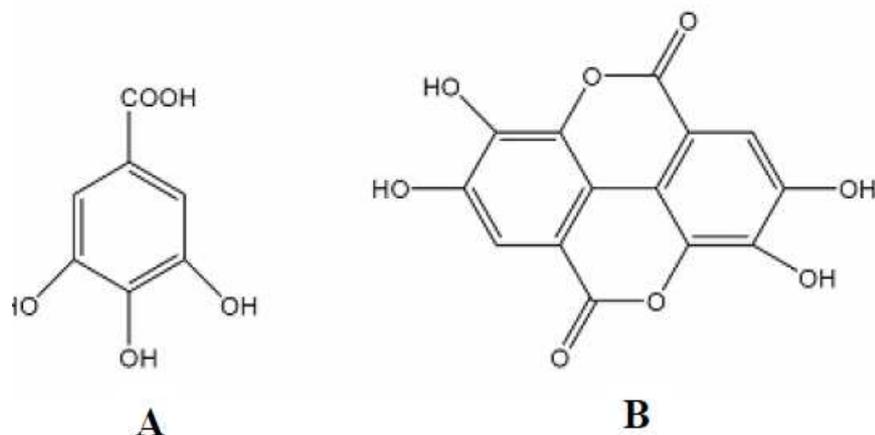


Figure 5. Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B).

- **Tannins condensés** : Ils diffèrent fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes végétaux, Gymnospermes et Fougères (Bruneton, 1999).

II.5. Rôle des composés phénoliques

II.5.1. Chez les végétaux

Les polyphénols ont un rôle dans le contrôle de la croissance et le développement des plantes en interagissant avec les diverses hormones végétales de croissance. Ils permettent aux végétaux de se défendre contre les rayons ultraviolets (Makoi et Ndakidemi, 2007). Ils assurent la pigmentation des fleurs, des fruits et des graines pour attirer les pollinisateurs. Ils représentent un système de défense contre les microorganismes pathogènes. Ils interviennent dans la fertilité des plantes et la germination du pollen (Stalikas, 2007). Certains d'entre eux jouent le rôle de phytoalexine permettant de lutter contre les infections causées par les champignons, ou par les bactéries chez les plantes (Makoi et Ndakidemi, 2007).

II.5.2. Chez les humains

Le rôle des composés phénoliques est largement montré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes (Fleuriet et al., 2005). Contrairement aux antioxydants synthétiques comme le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT) et 2,2-

diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), les polyphénols n'ont aucun effet nuisible sur la santé humaine. Ils sont également utilisés dans l'industrie agro-alimentaire comme additif, colorant, arôme ou agent de conservation (Bruneton, 1999).

II.6. Propriétés biologiques des composés phénoliques

Ces dernières années, les recherches sur les composés phénoliques se sont accentuées en raison de leur activités anti-inflammatoires, antibactériennes, antifongiques, antioxydantes et même anticancéreuses (Moutoro *et al.*, 2005).

- ✓ **Activité anti-inflammatoire** : Les propriétés anti-inflammatoires des composés polyphénoliques peuvent être dues à leurs capacités d'inhiber des enzymes impliquées dans les processus inflammatoires (Škerget *et al.*, 2005) et leurs activités antioxydantes.
- ✓ **Activité antibactérienne**: Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tanins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes (Basli *et al.*, 2012).
- ✓ **Activité anticancéreuse**: Les flavonoïdes et autres phénols peuvent jouer un rôle préventif dans le développement du cancer (Genoux, 2011). Ils interviennent dans l'étape d'initiation comme piègeurs des mutagènes électrophiles ou en stimulant la réparation de l'ADN muté. Durant les étapes de promotion et de progression, ils agissent comme des agents suppresseurs de tumeurs par différents mécanismes comme l'induction de l'apoptose et l'inhibition de la prolifération cellulaire (Gerber *et al.*, 2002).
- ✓ **Activité antioxydante**: L'activité antioxydante des composés phénoliques est due à leur capacité à piéger les radicaux libres, donner l'atome d'hydrogène et électron et chélater les cations métalliques. La structure des composés phénoliques est l'élément déterminant de leur activité. Pour les acides phénoliques, l'activité antioxydante augmente proportionnellement avec le degré d'hydroxylation et la présence de groupement C=CH-COOH (Balasundram *et al.*, 2006). Pour les flavonoïdes, la relation structure activité antioxydante est généralement plus compliquée que les acides phénoliques à cause de la complexité de la molécule de flavonoïdes (Bors *et al.*, 1997).

Chapitre III.L'inflammation

III.1. Définition

L'inflammation est un processus physiologique complexe de défense utilisée par l'organisme, après une agression étrangère, vasculaire et tissulaire, qui vise à éliminer ou isolé l'agresseur et maintenir l'intégrité des tissus infectés (Sarkhel, 2015).

L'inflammation est une réponse protectrice normale à une lésion tissulaire provoquée par un traumatisme physique, un agent chimique nocif ou un agent microbien. C'est la réponse du corps à inactiver ou à détruire les organismes envahisseurs, à éliminer les irritants et à préparer le terrain pour la réparation des tissus (Sangita et *al.*, 2012).

Ce processus comprend :

- **Des phénomènes généraux** : exprimés biologiquement par le syndrome inflammatoire et cliniquement de façon variable, le plus souvent par de la fièvre et éventuellement une altération de l'état général (Rousselet *et al.*, 2005).
- **Des phénomènes locaux**: l'inflammation se déroule dans le tissu conjonctif vascularisé. Les tissus dépourvus de vaisseaux (cartilage, cornée) sont incapables de développer une réaction inflammatoire complète. Les tissus épithéliaux n'ont pas de rôle actif dans le déroulement de la réaction inflammatoire mais ils peuvent être altérés par l'agression qui déclenche l'inflammation puis être réparés au cours de la phase terminale de l'inflammation (Rousselet *et al.*, 2005).

III.2.Facteurs étiologiques

- **Agents endogènes**

Ce sont essentiellement les antigènes, les complexes immuns circulant, également les cristaux formés dans les liquides biologiques (Zerbato, 2010).

- **Agents exogènes**

Ce sont les pathogènes microbiens, piqûre d'insecte, produits chimiques ou biologiques (Zerbato, 2010).

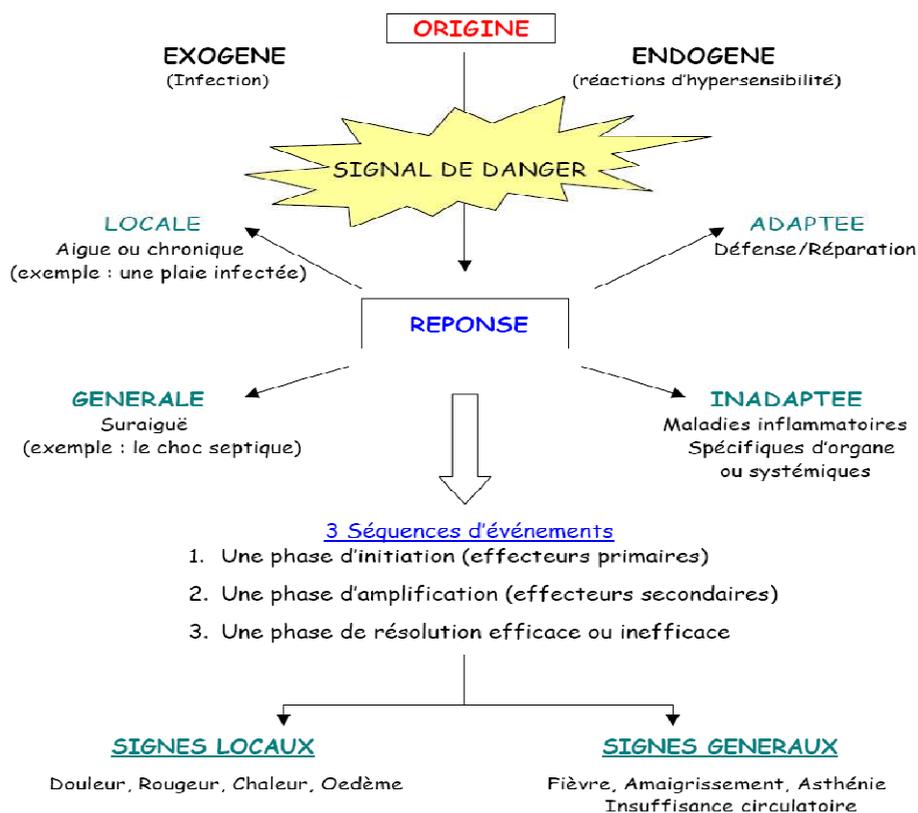


Figure 6. La réaction inflammatoire schématisée (Prin et *al.*, 2009).

III.3.Types d'inflammation

III.3.1.Inflammation aigue

L'inflammation aigue est caractérisée par quatre phénomènes typiques, qui sont l'œdème, la douleur, la chaleur et la rougeur de courte durée (Jacques-Paul et *al.*, 1988). Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante (Rousslet et *al.*, 2005).

III.3.2.Inflammation Chronique

C'est une inflammation de durée prolongée, due à la persistance des facteurs d'agression (Jackson et Evers, 2006). Elle est caractérisée par une réponse immunitaire adaptative, elle fait intervenir des cellules lymphocytaires spécifiques sur l'endothélium vasculaire, permettant leur transmigration dans les compartiments extravasculaires. Par l'apparition de molécules d'adhésion, sur la surface des cellules endothéliales (Cavaillon, 1993).

III.4. Anti-inflammatoires

III.4.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens AINS

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, anti-pyrétique et antalgiques (Nicolas et *al.*, 2001). Son rôle principale c'est l'inhibition de la cyclooxygénase, enzyme qui permet la production de prostaglandine à partir de l'acide arachidonique (Krzyszinski et *al.*, 2002).

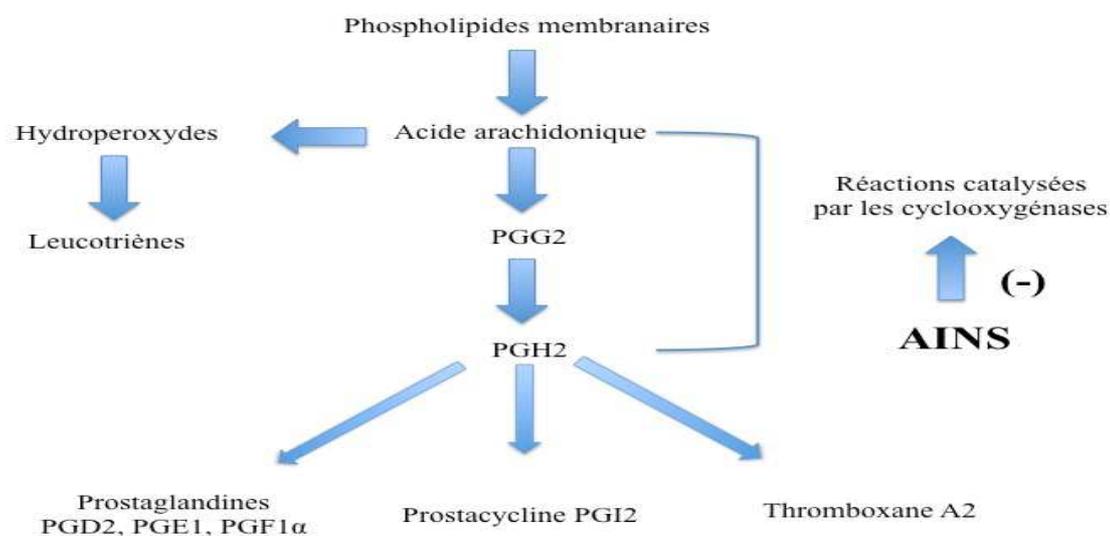


Figure 7. Mécanisme d'action des AINS (Nicolas, 2001).

III.4.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS), constituent une vaste famille de médicament dérivé de cortisol, principale glucocorticoïdes surrénaliens. Les glucocorticoïdes sont des substances dérivées de cholestérols, sous l'action de l'hormone adrenocorticotropine (ACTH) de l'hypophyse (Weill et *al.*, 2003).

Le mécanisme opposé est appelé transrépression. Le récepteur hormonal activé interagit avec des facteurs de transcription spécifiques et prévient la transcription des gènes-cibles (figure 8). Les glucocorticoïdes sont capables d'empêcher la transcription de tous les gènes immuns, incluant celui codant l'IL-2 (Barnes, 1998).

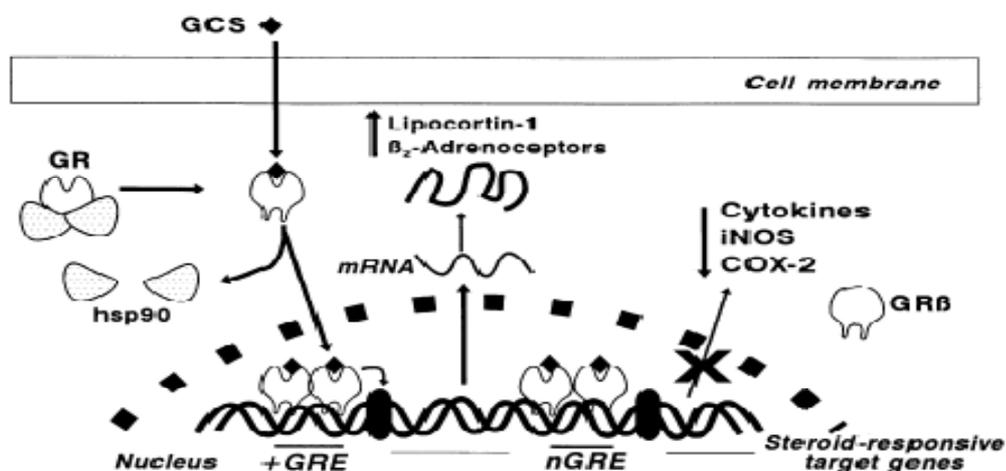


Figure 8. Mécanisme d'action des glucocorticoïdes (Barnes, 1998).

III.4. 3. Anti-inflammatoires d'origine végétale

Le nombre de composés phytochimiques, trouvés dans le règne végétal est très vaste, et leur spectre d'activité est tout aussi grand. Certains de ces composés phytochimiques ont des propriétés anti inflammatoires (Fiebich et Chrubasik, 2004). Le tableau suivant montre les effets anti-inflammatoires de quelques plantes médicinales.

Tableau 6. Exemples de plantes médicinales douées d'activités anti-inflammatoires (Barnes, 1998).

Nom scientifique	Famille	Partie utilisée	Nom commun	Utilisation
<i>Zingiber officinale</i>	Zingiberaceae	Rhizome	Gingembre	arthrose, migraine, douleurs rhumatismales
<i>Urticadioica</i>	Ortie	Ortie	Feuilles, Racines	Rhinite allergique, eczéma goutte
<i>Helleborus orientalis</i>	Ranunculaceae	Racines	Lenten-rose	Oedemes, douleurs rhumatismales
<i>Laurocerasus officinalis</i>	Rosaceae	Feuilles	Laurier	Fièvre, douleurs d'estomac
<i>Laurocerasus officinalis R</i>	Rosaceae	Feuilles	Laurier	Fièvre, pharyngite, douleurs d'estomac

Chapitre IV. Le stress oxydatif

IV.1. Les radicaux libres

Un radical libre est définie comme toute molécule chimique possédant un ou plusieurs électrons célibataire qui lui confère une réactivité vis -à-vis d'autres molécules (Milane, 2004). Cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants asseyant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité. Une réaction en chaine débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre (Martinez- cayuela, 1995).

IV.2. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Parmi toutes les ERO, on distingue un ensemble restreint de ces composés qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appelons les radicaux primaires à savoir : l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle (OH), le monoxyde d'azote (NO). Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires tels que l'oxygène singulet O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le nitroperoxyde (ONOOH), le radical peroxyde (ROO), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Favier, 2003).

Notre organisme produit donc en permanence ces ERO, leur production est nécessaire pour le maintien du statut redox de l'organisme, ainsi ces espèces sont impliquées dans la régularisation des activités cellulaires, signalisation et différenciation cellulaire, activation des voies métaboliques et immunité (Manea et al., 2010).

Les sources de ces radicaux libres sont très variées : la pollution atmosphérique, le tabac, le rayonnement UV, les radiation ionisantes, le métabolisme cellulaire (activité mitochondriale, réaction enzymatiques), l'information et les métaux toxiques (chrome, cuivre) (Uttara et al., 2009).

IV.3. Origine de production des ERO

Les radicaux libres nocifs sont produits dans l'organisme au cours du métabolisme normal. Cette production augment en rapport avec l'élévation de la consommation d'oxygène. (Gonzaliz et al., 2010). Plusieurs mécanismes et systèmes responsables de la production de radicaux libres ont été identifiés jusqu'à présent, parmi eux nous citons:

-Des fuits d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie (Aurasseau, 2002).

-Des processus inflammatoire produits par les cellules phagocytaires activées (Milane, 2004; Van Antwerpen, 2006).

-Des agressions de l'environnement, comme les agents infectieux, la pollution, les UV, la fumée de cigarette et le rayonnement (Tamer, 2003).

IV.4. Le stress oxydant

Le stress oxydant apparait dans une cellule quand l'équilibre entre les espèces pro-oxidantes et anti-oxidantes est rompu en faveur des pro-oxidantes.

Dans les systèmes vivants, une production physiologique ou provoquées pour des facteurs exogènes, une surproduction de ces espèces réactives est possible. Les défenses antioxydantes, dont une partie est dépendant de l'alimentation, peuvent être insuffisantes pour empêcher les dégâts cellulaires que peuvent causer les radicaux libres de l'oxygène (Valko et al., 2007) (figure9).

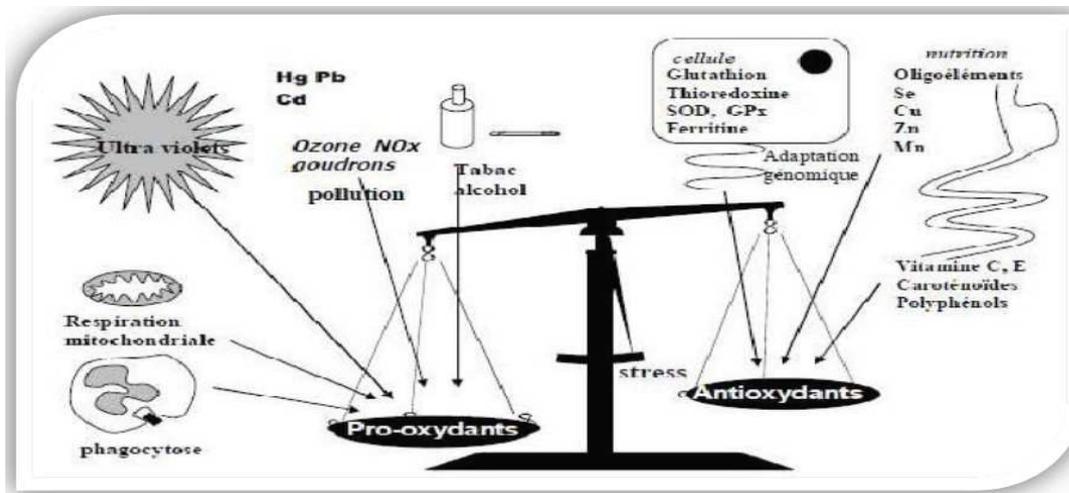


Figure 9. La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydant (Fieffer, 2006).

IV.4.1. Les causes d'un stress oxydant

Diverses conditions peuvent entraîner un stress oxydant, on peut notamment citer les UV. en effet, ils sont connus pour induire des dommages directs de l'ADN pouvant mener à des mutations délétères (Brash et al., 1991). Les UV sont également responsables de la production de ROS dans divers compartiments cellulaires (Black et al., 1987). En ce qui

concerne la température, il a été démontré que des chocs thermique aussi bien vers des température élevées (Davidson et *al.*, 1996) que des températures faibles (Prasad et *al.*, 1994) étaient à l'origine d'une surproduction de ROS (Flanagan et *al.*, 1998). Dans les deux cas, cela lie directement à la chaîne respiratoire mitochondriale. Comme les mitochondries sont la principale source de ROS dans la cellule, une augmentation de leur activité entraîne une augmentation de la production de ROS. Dans le cas d'une exposition à des faibles températures, la diminution de certaines enzymes de la chaîne respiratoire entraînerait une augmentation de la fuite d'électrons à l'origine de la production de ROS.

IV.4.2. Les conséquences moléculaires du stress oxydatif

Il est important d'évoquer alors le paradoxe de l'O₂: il est indispensable au fonctionnement cellulaire mais il est aussi la source des ROS pouvant provoquer des dommages aux macromolécules biologique (ADN, protéines, phospholipides membranaires) (Droge, 2002). Les ERO sont impliqués dans la prolifération cellulaire et la mort cellulaire programmée en agissant comme second message en activant différents facteurs ou gènes impliqués dans le développement de diverses pathologies (Parke et Parke, 1995; Thannickal et fanburg, 2002).

IV.5. Les antioxydants

Les antioxydants sont des molécules ayant la capacité de neutraliser les radicaux libres qui sont responsables de nombreuses maladies. Les antioxydants sont des composés qui inhibent ou retardent le processus d'oxydation en bloquant l'initiation ou la propagation des chaînes de réactions oxydatives (Behera et *al.*, 2006).

Les antioxydants naturels ou synthétiques sont utilisés pour prévenir de nombreuses maladies (cardiovasculaires et neurodégénératives, inflammation, diabète...) et le vieillissement, dus à la formation exagérée des radicaux libres. Les antioxydants sont également utilisés dans les aliments pour retarder la détérioration, le rancissement ou la décoloration qui est souvent due à l'oxydation causée par la lumière, la chaleur et certains métaux (Méda et *al.*, 2005). Ils peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine selon le tableau 6.

Tableau 7. Localisation et fonction des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (Favier, 1997; Orban, 2011).

	L'antioxydant	Localisation et fonction
Enzymatique	Le superoxyde dismutase (SOD)	localisés dans le cytoplasme, la mitochondrie et les milieux extra cellulaires. Il catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) et en oxygène
	Catalase (CAT)	localiser dan la mitochondrie, le peroxysome et le cytoplasme. Elle est capable de transformé le peroxyde d'hydrogène, produit généralement par la SOD en eau et oxygène moléculaire.
	Glutathion Peroxydase (GPx)	localise dans le cytosol (cGPx), la matrice Mitochondriale, le plasma (pGPx) et au niveau de la membrane cellulaire (HPGPx).
Non enzymatique	La vitamine E	Elle est présente dans tous les organes, à l'exception du cerveau. Elle empêche la réaction de peroxydation lipidique
	La vitamineC	qui se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire. Elle peut piégé directement l'anion super oxyde (O ₂), le radical hydroxyle (OH) l'oxygène singulier et réduit le peroxyde d'hydrogène en eau, Elle permet la régénération de la forme non radicalaire de la vitamine E.
Non enzymatique	Les caroténoïdes	comportent nombreuses doubles liaisons conjuguées, au sien de leur structure, qui lui offre une activité antioxydant. Assurés par trois mécanismes, soit par l'abstraction d'hydrogène, transfère d'électrons et addition de radicale.
	Les polyphénols	Sont des molécules de métabolisme secondaire ils .sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduise les radicaux libres
	Les flavonoïdes	Ils ont la capacité de piéger les radicaux libres, comme O ₂ [*] , le OH [*] , pyroxyde et alotoxyde, par transfère de l'hydrogène.

Le présent travail porte sur l'évaluation des deux activités anti-inflammatoires et antioxydantes de l'extrait polyphénolique des gousses, graines et feuilles de *Sophora japonica* L.

La partie expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de Biologie des Population et des Organismes (BPO) ainsi qu'à l'Animalerie de la faculté de Biologie de l'université M'Hamed Bougara de Boumerdes (UMBB).

I. Matériel

I.1. Matériel biologique

I.1.1. Matériel végétale

Le matériel végétal est constitué des gousses, graines et feuilles de *Sophora japonica* L. récoltés dans la région de Boumerdes. Notre recherche bibliographique confirme que cette plante détient plusieurs avantages thérapeutiques, et son utilisation en médecine traditionnelle est très fréquente.

➤ Récolte

La récolte des gousses a été réalisée au mois de Mars et des feuilles au mois d'Avril 2019. Cette collecte a été faite au niveau de la région centre de wilaya de Boumerdes.



Figure 10. Gousses de *Sophora japonica* L.



Figure11. Feuilles de *Sophora japonica* L.



Figure12. Graines de *Sophora japonica* L.

➤ **Séchage**

La matière végétale est séchée en plein air et à l'abri de la lumière. Cette étape de dessiccation est très importante car elle consiste à abaisser la teneur en eau contenue à l'intérieur de la drogue végétale (Wichtl et Anton, 1999; Ghestem et *al.*, 2001).

➤ **Broyage et conservation**

Les gousses, les graines et les feuilles séchées sont réduites en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique. La poudre obtenue est conservée à l'abri des agents pouvant entraîner leur altération tels que : l'air, l'humidité, la lumière, les champignons et les insectes...etc (Ghestem et *al.*, 2001).



a- poudre des feuilles

b-poudre des gousses

c- poudre des graines

Figure 13. Poudre végétale de la plante *Sophora japonica* L.

I.1.2. Matériel animale

Des souris Swiss albinos femelles dont le poids varie entre 23 et 30g, ont été utilisées lors de l'étude *in vivo*. Ces animaux ont été procurés auprès de l'Institut Pasteur d'Alger. Les souris ont été placées dans des cages recouvertes d'une grille en acier inoxydable avec une couche de sciure déposée au fond. Les animaux ont accès libre à l'eau et à l'alimentation.



Figure 14. Souris Swiss albinos femelles.

I.2. Matériel non biologique

Le matériel non biologique utilisé pour réaliser notre étude est composé d'appareillage, de verrerie, et d'un ensemble de réactifs et produit chimique (Annexe1).

I.3. Présentation de la région d'étude

Boumerdes est une ville d'Algérie située à 45 km à l'est d'Alger et 52 km à l'ouest de Tizi-Ouzou. Cette région appartient au climat méditerranéen, caractérisé par un hiver pluvieux et doux et un été chaud et humide. La figure 15 représente la situation géographique de la willaya.

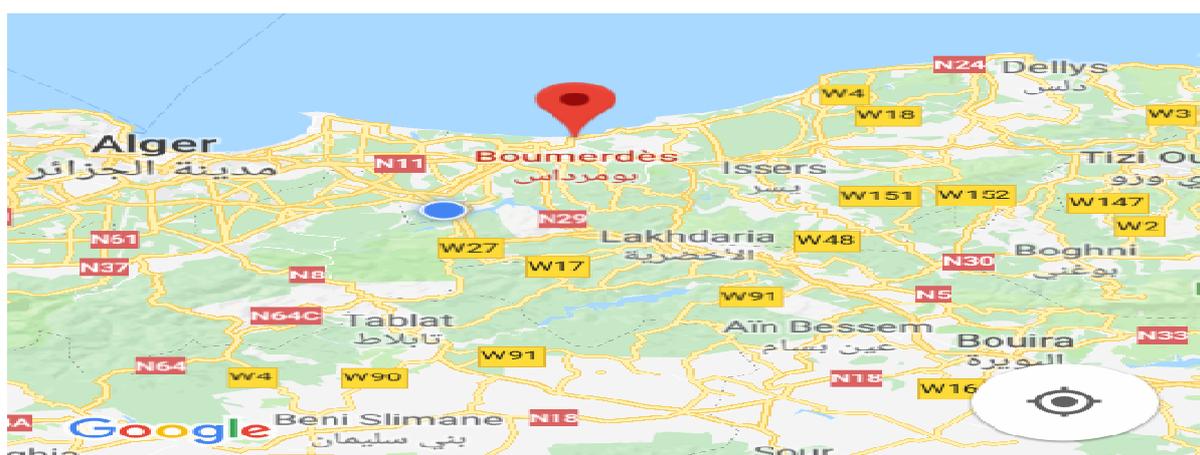


Figure 15. Carte géographique de la région de Boumerdes indiquant la zone de récolte.

II. Méthodes

Plusieurs méthodes sont utilisées pour extraire, caractériser et tester l'activité anti-inflammatoire *in vivo* et antioxydante *in vitro* des substances bioactives de la plante *Sophora japonica*. Les différentes étapes de ce travail sont résumées dans la figure 16.

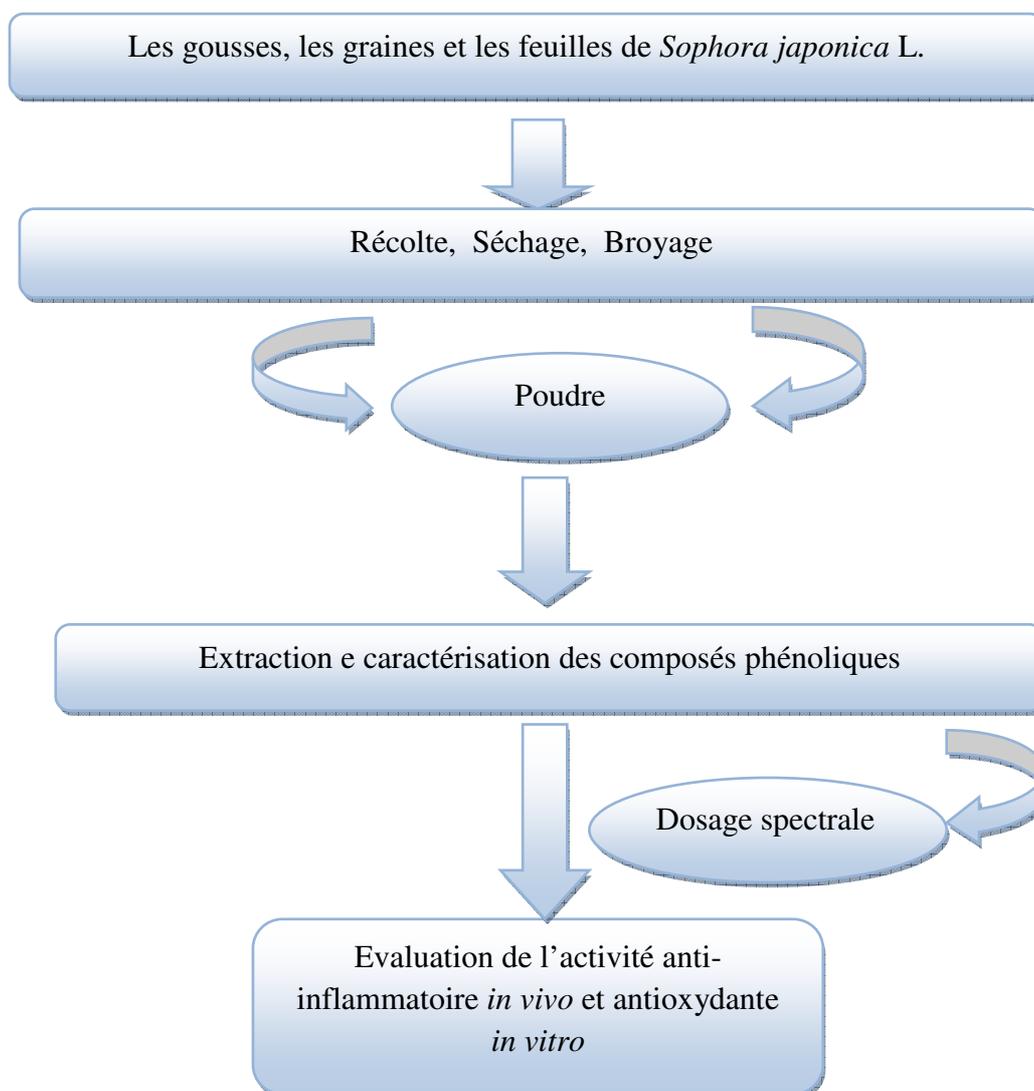


Figure 16. Schéma récapitulatif des différentes étapes du travail.

II.1. Extraction des polyphénols

L'extraction des composés phénoliques a été faite par macération selon la méthode de Mahmoudi *et al.*, (2013). Pour cela, 0,1g de la poudre des feuilles et 0,4g de la poudre des gousses et graines ont été mélangés avec 20ml de solvant d'extraction (méthanol 60%). Les macéras ont été mis sous agitation magnétique pendant 1 heure. Les extraits sont récupérés après centrifugation à 5000tr /min pendant 10min et filtration du surnageant. Le méthanol est évaporé dans l'étuve à 45°C. Les différents extraits récupérés sont conservés (Figure 17).



a- extrait des gousses

b- extrait des feuilles

c- extrait des graines

Figure 17. Extraits des polyphénols de *Sophora japonica L.*

Un récapitulatif des étapes effectuées durant cette étude sont représentées dans la figure 18.

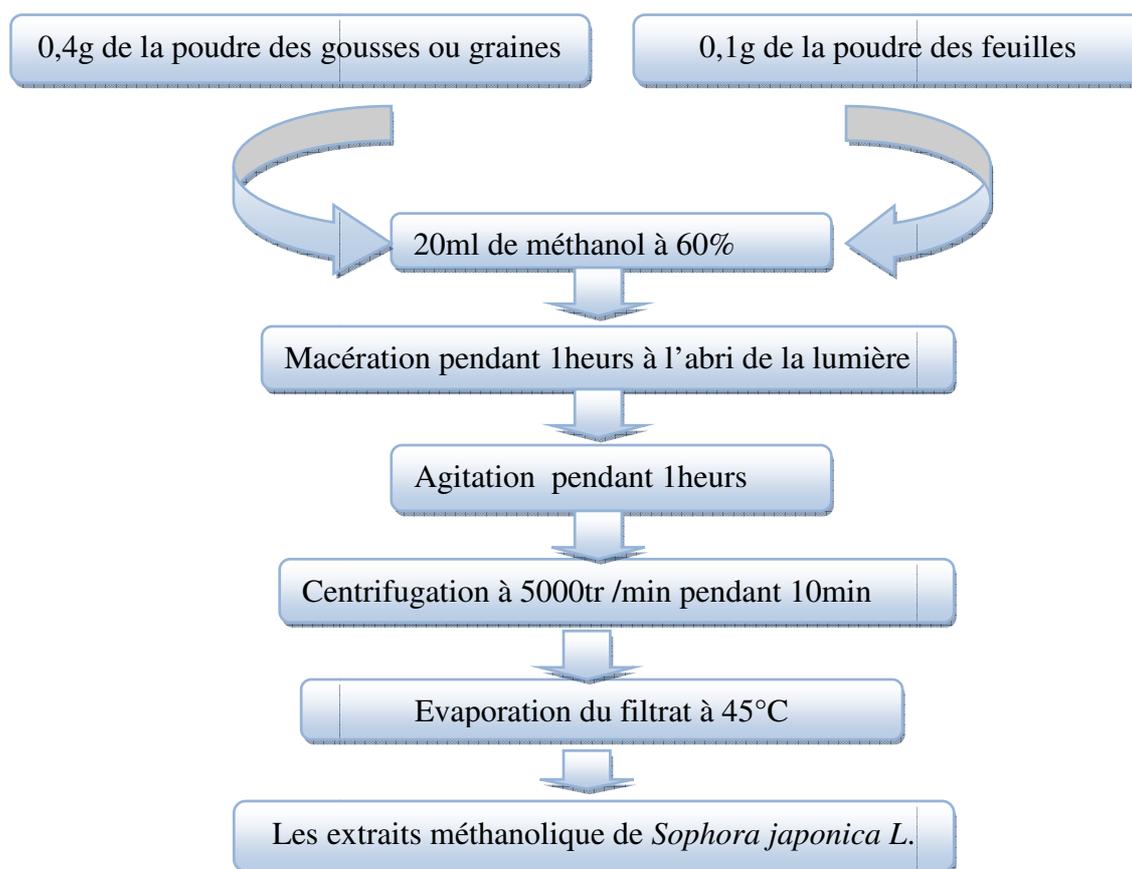


Figure 18. Protocole d'extraction des composés phénoliques (Mahmoudi et al., 2013).

II.2. Expression du rendement de l'extraction

Le rendement de l'extraction est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenue après évaporation du solvant et la masse de la poudre végétale utilisée. Ce rendement est calculé par l'équation suivant:

$$R\% = \frac{(m - m_0) \times 100}{mT}$$

Tel que :

R(%): Rendement en %.

m₀: Masse du bécher vide.

M: Masse du bécher après évaporation.

m_T: Masse de la matière sèche.

II.3. Analyse quantitative des composés phénoliques

II.3.1. Dosage des polyphénols totaux

➤ Principe

Le teneur des polyphénols est effectué par la méthode utilisant le Folin-Ciocalteu (Figure19) décrite par Skerget et *al.*,(2005). Cette méthode est basée sur l'oxydation en milieu alcalin de ce réactif par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation d'un mélange d'oxyde bleu. L'intensité de la coloration produite qui a une absorbance maximale à 765nm, est proportionnelle à la quantité des polyphénols présente dans l'extrait analysé (Georgé et *al.*, 2005).

➤ Mode opératoire

Un volume de 200µl de chaque extrait est ajouté à un 1000µl du réactif Folin-Ciocalteu dilué à 1/10. Après une incubation de 5min à température ambiante et à l'obscurité, on ajoute 800µl de carbonate de sodium (75%) au mélange. Par la suite une incubation à 50°C pendant 5min, l'absorbance est mesurée à 765nm. La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique, en suivant les mêmes étapes du dosage.

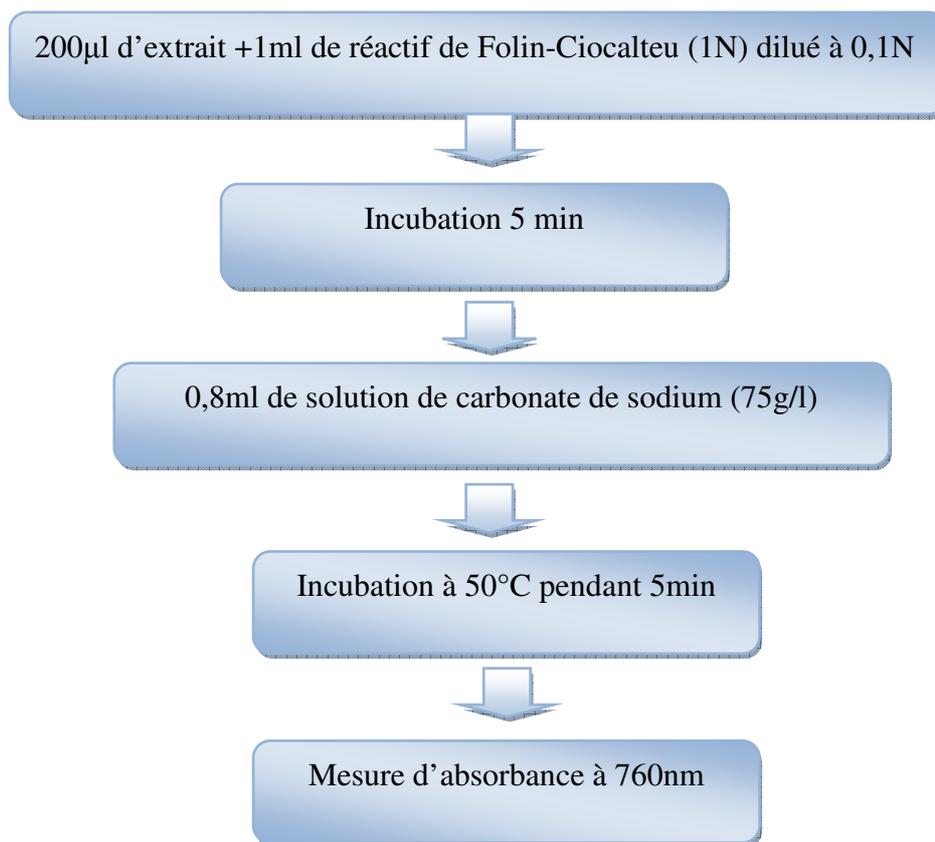


Figure 19. Protocole de dosage des polyphénols totaux (Skerget et *al.*, 2005).

II.3.2. Dosage des flavonoïdes

➤ Principe

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le trichlorure d'aluminium. Les flavonoïdes donnent des complexes jaunâtres par chélation des métaux (Fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (AL) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygènes de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (Ribereau-Gayon et *al.*, 1972).

➤ Mode opératoire

Une prise de 1ml des différentes concentrations de chaque extrait est mélangée avec 1ml du Trichlorure d'Aluminium (AlCl₃) à 2%. L'absorbance est mesurée à 450nm après incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 10min.

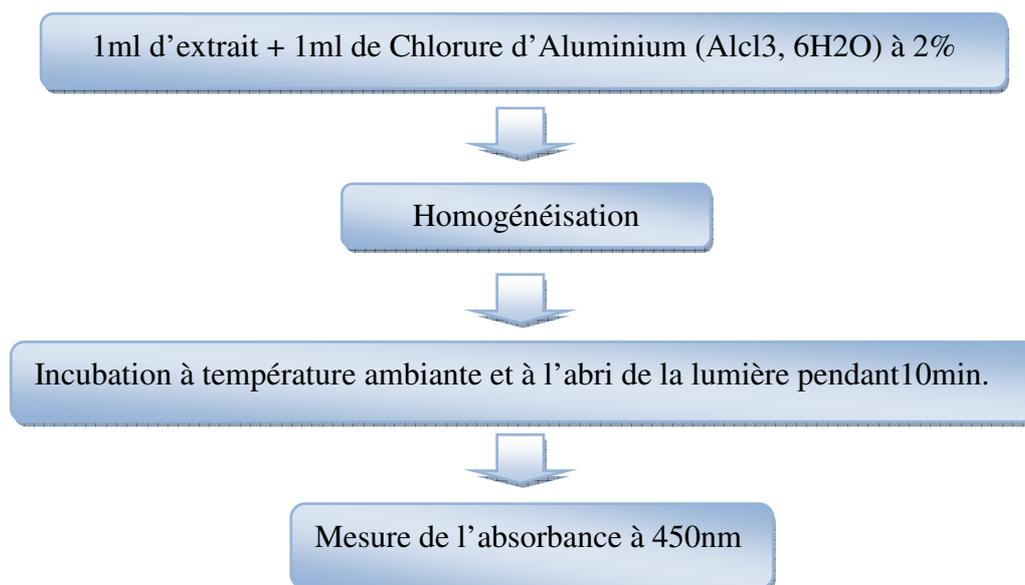


Figure20. Protocole de dosage des flavonoïdes (Lamaison et Carnat, 1990).

II.4. Evaluation *in vitro* de l'activité antioxydant des extraits de *Sophora japonica L.*

L'activité antioxydant des extraits de *Sophora japonica L.* est évaluée par trois méthodes différentes : l'activité anti radicalaire par le DPPH, le pouvoir réducteur de fer (FRAP) et le teste de blanchissement par la β carotène.

II.4.1. Méthode de piégeage du radical libre DPPH

➤ Principe

Dans le test du DPPH, les antioxydants réduisent le radical DPPH (diphénylpicryl-hydrayl) ayant une couleur violette en un composé jaune (diphénylpicryl-hydrazine). Il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényl picrylhydrazine par un composé à propriété anti radicalaire (Sanchez-Moreno, 2002).

➤ Mode opératoire

Pratiquement, une solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. Un volume de 25 μ l des différentes concentrations de chaque extrait a été incubé avec 975 μ l de la solution méthanolique de DPPH. Après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité et à température ambiante pour une période d'incubation de 30 minutes. Les absorbances ont été lues trois fois par un spectrophotomètre à 517nm.

Le pourcentage d'inhibition (I%) du radical DPPH par les extraits de *S.japonica* a été calculé comme suit:

$$I\% = \frac{(A_C - A_E) \times 100}{A_C}$$

Tel que :

I% : pourcentage de l'activité anti-radicalaire.

A_C: absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif).

A_E: absorbance en présence des extraits.

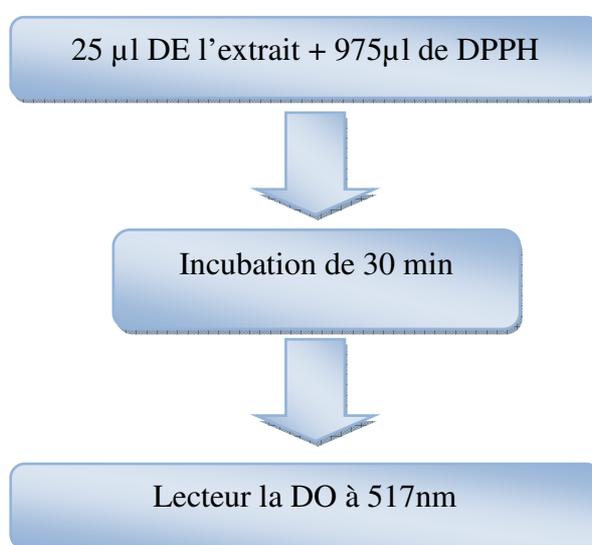


Figure 21. Protocole de la méthode du DPPH.

II.4.2.Méthode de la réduction fer (FRAP)

➤ Principe

Dans ce test, le pouvoir chélateur est évalué selon la méthode décrite par Karagozler et *al.*,(2008).

➤ Mode opératoire

1ml de chaque concentration de chaque extrait, est mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate (0,2 M, Ph : 6,6) et 2,5ml de la solution aqueuse d'hexacyanoferrate de potassium [K₃Fe] à 1%. Après 30min d'incubation à une température de 50°C, 2,5ml de la solution d'acide trichloracétique [TCA] à 10% est ensuite centrifugé pendant 10min à

3000tr/min. 2,5 ml du surnagent sont ajoutés à 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml de la solution aqueuse de FeCl_3 à 0,1 % puis l'absorbance est mesurée à 700nm.

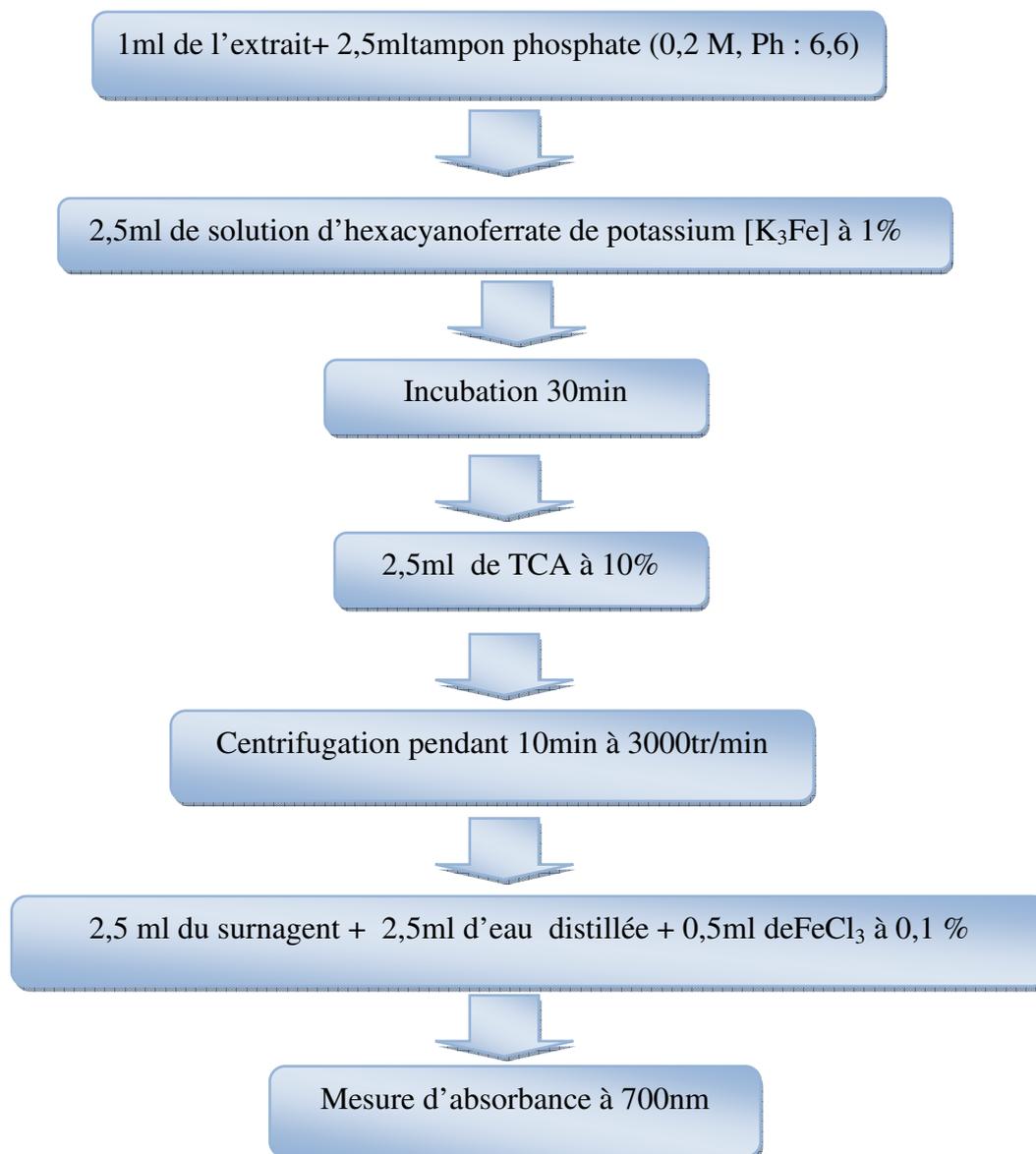


Figure 22. Protocole récapitulant la méthode FRAP (Karagozler et *al.*, 2008).

II.4.3. Test de blanchissement de la β -Carotène /acide linoléique

➤ **Principe**

Dans ce test l'activité anti radicalaire des extraits est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β -carotène par les produits d'oxydation de l'acide linoléique selon la méthode décrite par (Barros et *al.*, 2007).

➤ **Mode opératoire**

0,5mg de la β - Carotène sont ajouté à 1ml du chloroforme. 25 μ l d'acide linoléique et 200mg Tween 40 sont ajouté à l'émulsion précédente après évaporation du chloroforme à l'air libre. 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés. 2,5 ml de cette préparation sont ajoutés à 0,5 ml de chaque extrait et le standard BHT. L'incubation est réalisée dans un bain-marie pendant 2 heures de temps à 50°C. L'absorbance T0 est mesurée à 490nm, et cela dès l'ajout de l'émulsion à l'échantillon, puis l'absorbance est lue à chaque fois avec un intervalle de 20 min.

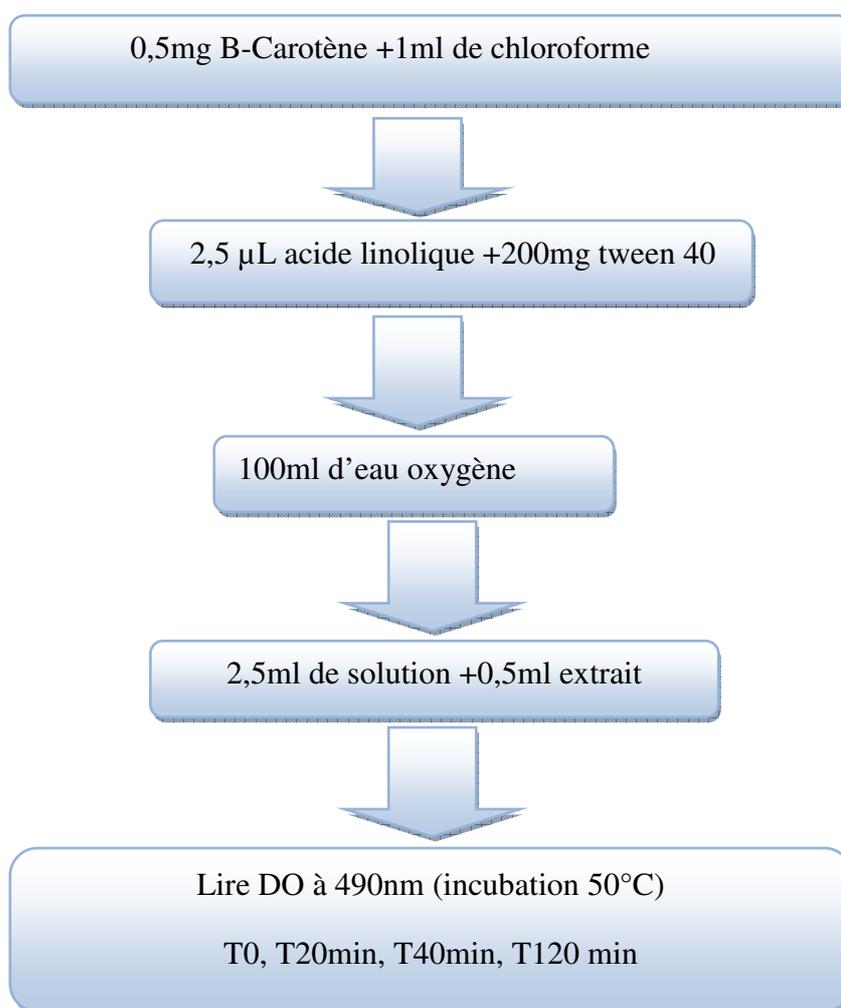


Figure 23. Protocole du test de blanchissement de la β -Carotène /acide linoléique.

II.5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits de *S. japonica* L.

La recherche de la propriété anti-inflammatoire a été réalisée sur les extraits méthanolique de *Sophora japonica* L.

➤ **Principe**

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée par l'injection de la carragénine, agent utilisé pour induire des foyers inflammatoires (œdème à la carragénine) dans la sous-région plantaire de la patte arrière gauche chez des souris suisses albinos. Cela crée un œdème qui peut être réduit par l'administration d'un produit anti-inflammatoire. Cette expérience permet de comparer la réduction de l'œdème de la patte induit par le carragénine après l'administration des extraits méthanolique testés et le produit de référence correspondant au Diclofénac. Cette étude est inspirée de celle décrite par (Winter *et al.*, 1970).

➤ **Méthode**

Dans ce test, 5 lots contenant 3 souris chacun, dans le poids corporel est compris entre 23et30g.

- ❖ un lot traité par l'extrait des feuilles.
- ❖ un lot traité par l'extrait des gousses.
- ❖ un lot traité par l'extrait des graines.
- ❖ un lot traité par l'anti-inflammatoire standard, Diclofénac 75mg/ml.
- ❖ un lot témoin traité par le Na Cl.

Les souris sont laissées à jeun 16 h avant l'expérimentation avec un accès libre à l'eau, et cela pour faciliter l'absorption des solutions (Ndiaye *et al.*, 2006). Les souris ont été traitées par voie orale avec une micropipette.

- **Au temps T₀**, le traitement des souris des cinq lots est regroupé dans le tableau 8.

Tableau 8. Les différentes doses injectées par voie sous cutané.

Souris Réactifs	Lot témoin	Lot référence	Lot extrait des feuilles	Lot extrait des gousses	Lot extrait des graines
Na Cl	100µl/kg	0	0	0	0
Diclofénac	0	100µl/kg	0	0	0
Extrait des feuilles	0	0	300mg/kg	0	0
Extrait des gousses	0	0	0	300mg/kg	0
Extrait des graines	0	0	0	0	300mg/kg

- 30 minutes après l'administration orale des différentes substances, on crée un œdème expérimental par injection de la solution de carragénine à 1% par voie sous-cutanée au niveau de l'aponévrose de la patte postérieure gauche (PG) avec un volume de 50µl pour toutes les souris. La patte arrière droite (PG) non traitée est considérée comme un témoin.

La différence du volume entre la PG et la PD a été mesurée en utilisant le pied à coulisse chaque heure depuis 5 heures après l'induction de l'inflammation par la carragénine.



-Administration des extraits
à l'aide d'une micropipette.



-Injection sous cutanée de la
carragénine dans la patte gauche des souris.



-La mesure de la patte avec un
pied à coulisse chaque heure.

Figure 24.Etapes d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire.

- **Au temps T₅**, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale.

➤ **Expression des résultats**

L'activité anti inflammatoire est exprimée en variation de la moyenne du volume de la patte gauche des groupes traités et ont été comparées avec celle du groupe témoin.

Les pourcentages d'augmentation de l'œdème sont calculés selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'augmentation} = \frac{(VG - VD) \times 100}{VD}$$

Tel que :

VG : est le volume de l'œdème de la patte arrière gauche.

VD : est le volume de l'œdème sur la patte arrière droit.

Le pourcentage de réduction de l'œdème est calculé chez les souris traitées par les extraits méthanolique et Diclofénac par rapport aux témoins selon la formule suivante :

$$\% \text{ de réduction} = \frac{(\% \text{ d'œdème témoin (Na Cl)} - \% \text{ d'œdème traité}) \times 100}{\% \text{ d'œdème témoin (Na Cl)}}$$

➤ **Analyse statistique**

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm l'Erreur Standard à la Moyenne (M \pm ESM). La comparaison des moyennes est effectuée par le test *t* de student pour des échantillons appariés. La valeur trouvée par le calcul du *t* peut affirmer que les populations sont différentes avec un risque d'erreur *p* tel que:

$p > 0,05$ = la différence n'est pas significative ;

$0,05 > p > 0,01$ = la différence est significative;

$0,05 > p > 0,001$ = la différence est hautement significative ;

$p < 0,001$ = la différence est très hautement significative.

La moyenne arithmétique (X), l'écart-type (S) et l'erreur standard à la moyenne (E.S.M) sont calculées par les formules suivantes:

$$X = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X)^2}{n - 1}}$$

$$E. S. M = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Avec :

- **X** : Moyenne arithmétique.
- **X_i** : Valeur individuelle.
- **n** : Effectif (nombre d'individu).
- **S** : Ecart-Type.
- **E.S.M** : Erreur standard à la moyenne.

Dans cette partie du travail, nous allons présenter les résultats relatifs à l'extraction, la caractérisation et à l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire et antioxydante des composés phénoliques des extraits des feuilles, des gousses et des graines.

III.1.Extraction et caractérisation des extraits phénoliques

III.1.1. Rendement de l'extraction

L'extraction des polyphénols par macération à froid au méthanol des différentes parties de la plante étudiée, nous a permis de déterminer les rendements d'extraction.

Le rendement de chaque extrait obtenu est calculé à partir de la masse de l'extrait avant et après évaporation par rapport à la masse de la matière sèche de la poudre végétale. Les résultats sont rapportés dans le tableau 9.

Tableau 9. Rendement des extraits des feuilles, gousses et graines en composés phénoliques.

Partie utilisée	Aspect de l'extrait	Masse de ballon vide(g)	Masse de Ballon avec l'extrait(g)	m-m0	mT	Rendement (%)
Extrait des gousses	Liquide	54,957	55,907	0,95	1,2	79,16%
Extrait des graines	Liquide	69,785	70,077	0,292	1,2	24,33%
Extrait des feuilles	Liquide	42,82	43,07	0,25	0,3	83,33%

Les résultats révèlent que les feuilles et les gousses de *Sophora japonica* présentent un bon rendement en composés phénolique par rapport aux graines (figure 25). Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement en polyphénols dépend de la nature, de la région de récolte, de l'espèce et de la méthode d'extraction utilisée, ce qui a été confirmé par les travaux de (Nazck et Shahidi, 2004; Mazit, 2009).

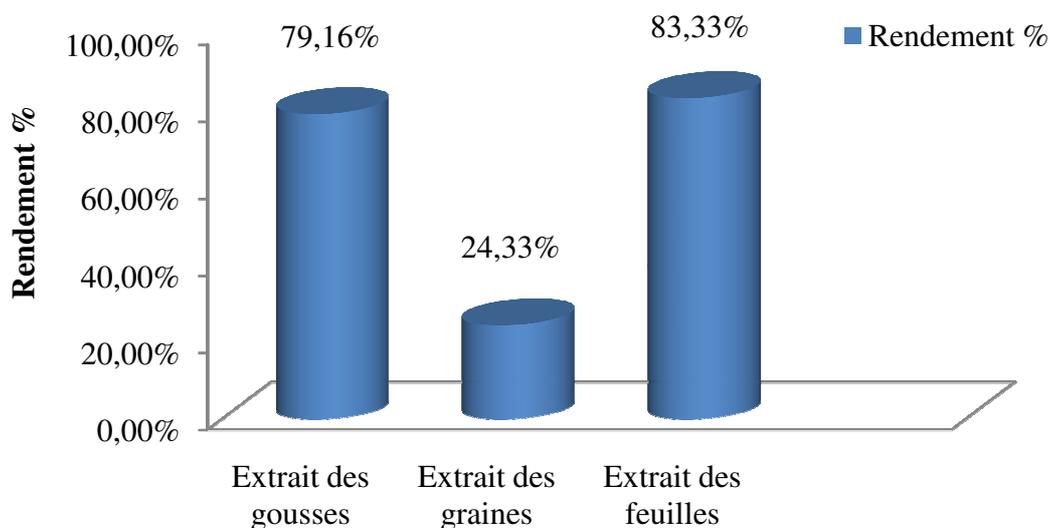


Figure 25. Rendement des extraits phénoliques des feuilles, gousses et graines de *Sophora japonica L.*

III .1.2. Dosage des polyphénols totaux

A partir de la courbe d'étalonnage obtenue par les différentes concentrations d'acides gallique (figure 26), la concentration des composés phénoliques est déterminée en milligramme équivalent en acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg EAG /g d'extrait).

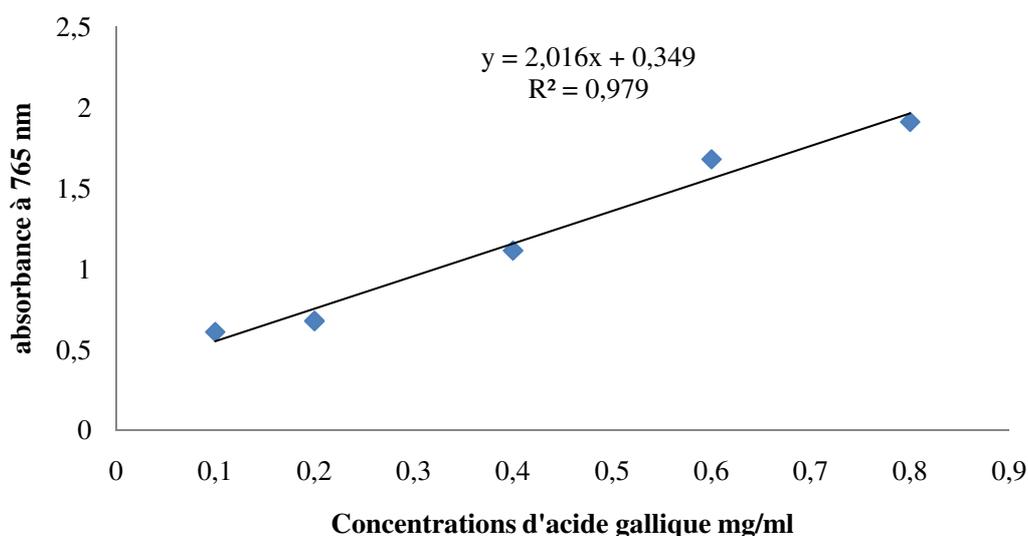


Figure 26. Courbe d'étalonnage d'acide gallique (mg/ml).

Les résultats du dosage des polyphénols sont indiqués dans le tableau 10 :

Tableau 10. Concentration des polyphénols des différents extraits méthanoliques.

Partie Utilisée	Absorbance (A) à 760nm	Facteur de dilution	Concentration en mg d'équivalent d'acide gallique par 1g de matière végétale
Extrait des feuilles	0,514	1	0,088
Extrait des gousses	0,576	1	0,112
Extrait des graines	0,307	1	0,020

Les résultats illustrés dans le tableau 10 ont permis de donner des estimations sur les quantités des polyphénols totaux contenus dans les extraits de *sophora japonica*. L'extrait des gousses est le plus riche en polyphénols (0,112 mg EAG/g). Alors que les extraits des feuilles et des graines ont des faibles teneurs avec des valeurs respectives de 0,088 mg EAG/g et 0,02 mg EAG/g, ce qui montre que notre extrait est moyennement riche en polyphénols. La quantité des composés phénoliques varie considérablement à travers les diverses parties de la plante (Atmani et al., 2009).

Les valeurs des polyphenols totaux dans les trois extraits sont beaucoup plus faibles que les teneurs trouvées par Belmokhtar, (2015) et Boulanouar et al.,(2014) dans l'extrait méthanolique de *Retama monosperm* L.(Fabaceae) (239,85mgEAG /g) et *Cytisus monosulanus* L (66,61 mg EAG/g) respectivement.

La variabilité des teneurs en polyphénols chez les espèces végétales est due probablement aux conditions biotiques (organe et l'étape physiologique) abiotiques (facteurs édaphiques) (Ksouri et al., 2008) et à la nature du sol (Atmani et al., 2009).

III .1.3. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode d' AlCl_3 en se référant à l'équation linéaire de la courbe d'étalonnage de la quercétine (figure 27).

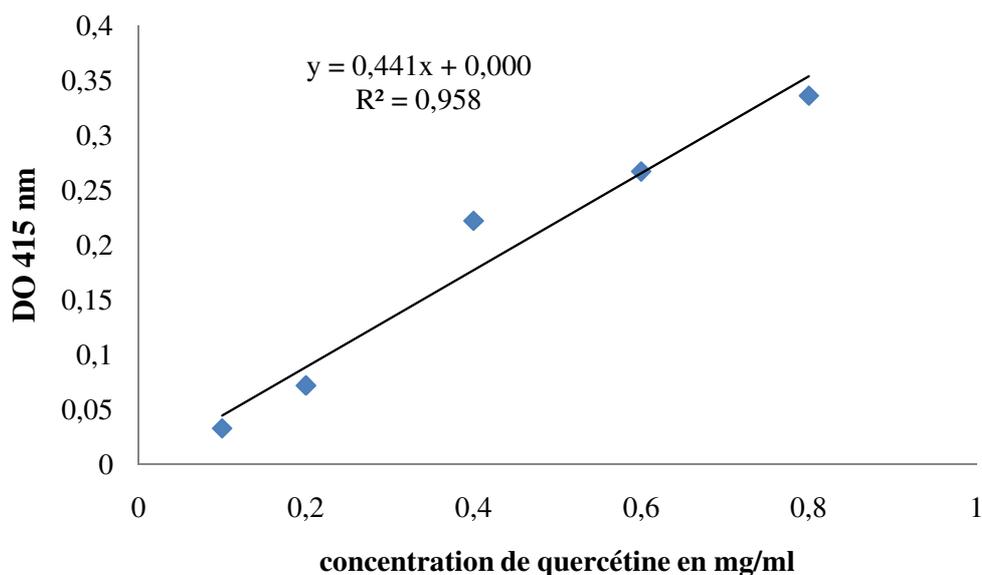


Figure 27. Courbe d'étalonnage de la Quercétine.

Les teneurs en flavonoïdes sont rapportés dans le tableau 11 et sont exprimées en milligramme équivalent de quercétine par gramme de matière végétale sèche (mg EQ/g d'extrait).

Tableau 11. Concentration des flavonoïdes de l'extrait méthanolique de *S. japonica*.

Partie utilisée	Absorbance (A) à 450nm	Facteur de dilution	Concentration en mg d'équivalent d'acide gallique par g de matière végétale
Extrait des feuilles	0,475	1	1,07
Extrait des gousses	0,271	1	0,64
Extrait des graines	0,16	1	0,36

Les résultats montrent clairement que la meilleur teneur est celle de l'extrait des feuilles (1,07mg EQ/g de matière végétale sèche), suivi par l'extrait des gousses (0,64mg EQ/g de matière végétale sèche) et par l'extrait des graines (0,36mg EQ/g de matière sèche). Ces résultats suggèrent que la plante *S. japonica* moyennement riche en flavonoïdes.

Les résultats obtenus durant cette étude sont inférieure à ceux trouvés chez une plante de la famille des Fabaceae, *Cytisus monospessulanus* L. qui a une teneur de 20,44 mg EAG/g matière sèche (Boulanouar et *al.*, 2014).

La différence entre les teneurs en flavonoïdes est en fonction de la partie de la plante. La grande distinction entre les parties apparait au niveau de la richesse de certaines et la pauvreté des autres (Atmani et *al.*, 2009).

III.2.Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits a été évaluée *in vitro* par trois méthodes différentes. Il s'agit du piégeage du radical libre DPPH, le pouvoir réducteur du fer ferreux (FRAP) et le test de blanchissement de la β -carotène.

III.2.1.Méthode de piégeage du radical libre DPPH

L'activité anti-radicalaire a été estimée spectrophotométrie en suivant la réduction de DPPH à 517nm (Maisuthiaskul, 2007). Le radical DPPH est souvent utilisé comme un indicateur pour tester la capacité de l'extrait à donner un atome d'hydrogène ou un électron et donc l'activité antioxydante (Tepe et *al.*, 2005).

Les résultats montrent un virage de la couleur des extraits phénolique à différentes concentrations via la méthode de DPPH.

Plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de la réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, rapport Antioxydant/DPPH, type de solvants) et le profil phénolique en particulier. Le mécanisme principal d'action des composés phénoliques est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome d'hydrogène sur le DPPH alors transformé en une molécule stable DPPH (Popovici et *al.*, 2010) .

Les résultats de l'inhibition du radical libre DPPH par les extraits méthanoliques et le standard sont représentés dans le tableau de l'annexe 5 et illustrés par la figure 28.

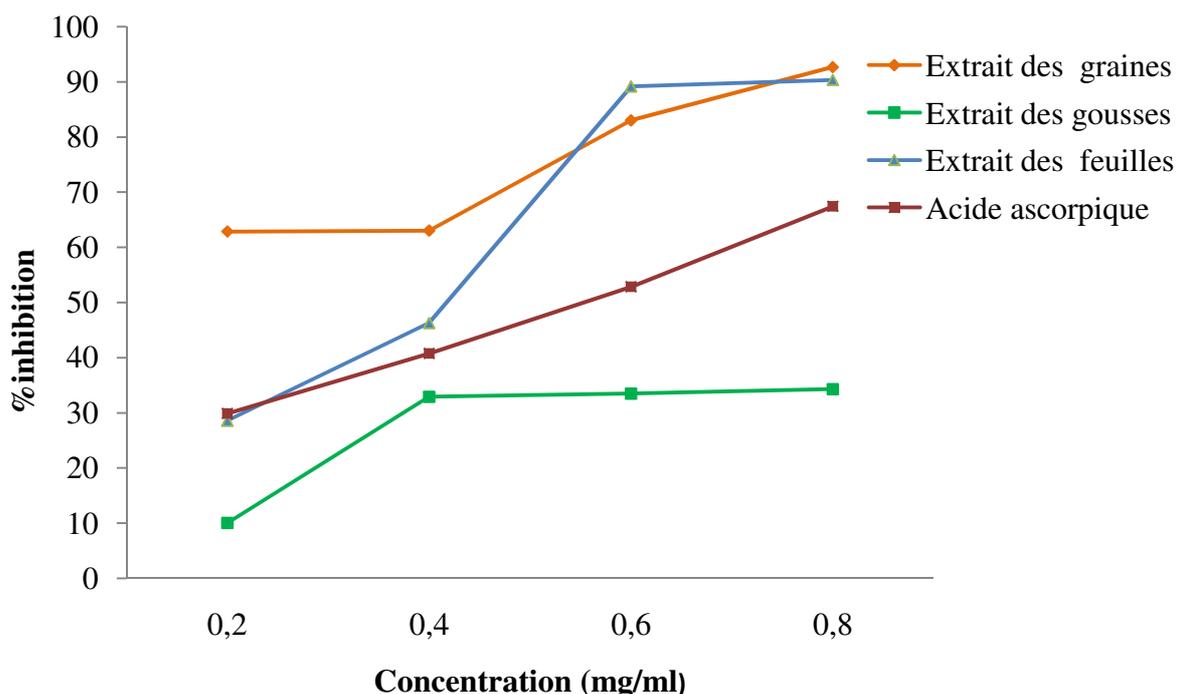


Figure 28. Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration des extraits et de l'acide ascorbique.

Les résultats de l'inhibition du DPPH montrent que tous les extraits ont une activité anti-radicalaire dose dépendante. Les courbes illustrées dans la figure 28 nous montrent que tous les extraits testés sont capables de neutraliser le radical DPPH en fonction de la concentration des antioxydants, ceci se traduit par la diminution de la concentration initiale de ce radical en comparaison avec le contrôle, l'acide ascorbique.

A une concentration de 0,8 mg/ml, le pourcentage de l'activité anti-radicalaire de l'extrait des graines, des feuilles, de l'acide ascorbique et des gousses sont respectivement de l'ordre de $92,66\% \pm 0,1$ et $90,32\% \pm 0,45$ et $67,41$ puis $34,28\% \pm 0,01$.

Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant, nous avons introduit le paramètre IC 50 (la valeur qui correspond à 50% d'inhibition). Plus l'IC 50 est faible plus l'effet antioxydant est élevé (Boumarfegue et *al.*, 2012). Les IC50 des extraits et du standard ont été déterminés graphiquement à partir des courbes de tendances représentant les taux d'inhibition. Les différents IC50 sont représentées dans le tableau 12 et la figure 29.

Tableau 12. Les valeurs d'IC50 des trois extraits méthanolique de la plantes et de l'acide ascorbique.

Extrait	IC50 (mg/ml)
Extrait des feuilles	1,83 ±0,005
Extrait des graines	0,020±0,008
Extrait des gousses	2,64±0,01
Acide ascorbique	0,46±0,11

Les valeurs représentent la moyenne ± E.S.M (moyenne de 3 essais).

Le tableau 11 montre que le potentiel anti-radicalaire global des extraits des gousses et des feuilles a été significativement supérieur à celui de l'acide ascorbique avec des IC50 respectives de 2,64±0,01mg/ml et 1,83±0,005mg/ml, 0,46±0,11 mg/ml ($p < 0,001$). L'extrait des graines représente l'IC50 la plus proche de celle du standard (0,02±0,008mg/ml) ($p < 0,05$). Plus la valeur de l'IC50 est faible, plus l'activité anti-radicalaire d'un composé est appréciable. De ce fait, l'extrait des graines présente le pouvoir antiradicalaire le plus fort suivi de celui de l'acide ascorbique de l'extrait des feuilles et enfin celui des gousses.

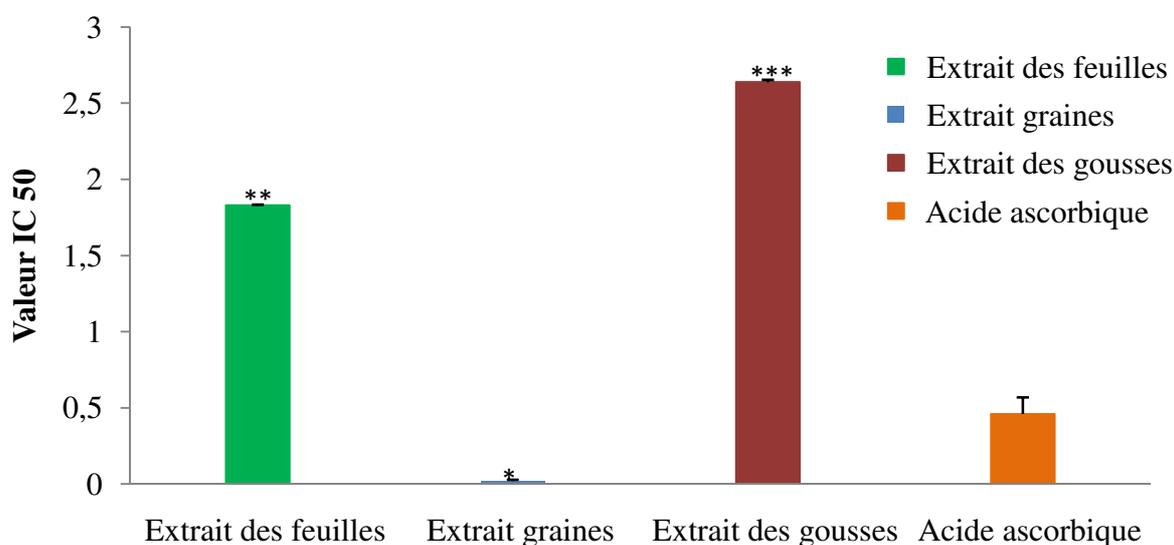


Figure 29. Histogramme représentant les IC50 des extraits méthanolique et de l'acide ascorbique.

*Chaque point représente la Moyenne ± E.S.M (moyenne de 3 essais). Test de student : * $P < 0,05$ la différence est significative, ** $P < 0,01$ la différence est hautement significative, *** $p < 0,001$ la différence est très hautement significative. Echantillons comparés avec l'Acide ascorbique.*

Le pouvoir antioxydant de l'extrait des feuilles est inférieur a celui obtenu par (Ghalem *et al.*, 2012) sur les feuilles d'*Anthyllis vulneraria* (Fabaceae) dont l'IC50 est égale à $15 \pm 0,024$ mg/ml. Egalement, l'extrait méthanolique de *Genista vurali* avait présenté une activité antiradicalaire plus active à celle de l'extrait des gousses avec une IC50 égale à 0,78mg/ml (Duran *et al.*,2015).

III.2.2. Pouvoir réducteur de fer (FRAP)

Cette activité est basée sur la capacité des constituants des extraits à réduire le fer ferrique Fe_3^+ en fer ferreux Fe_2^+ . Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. Les résultats représentés dans la figure 30 montrent que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des échantillons.

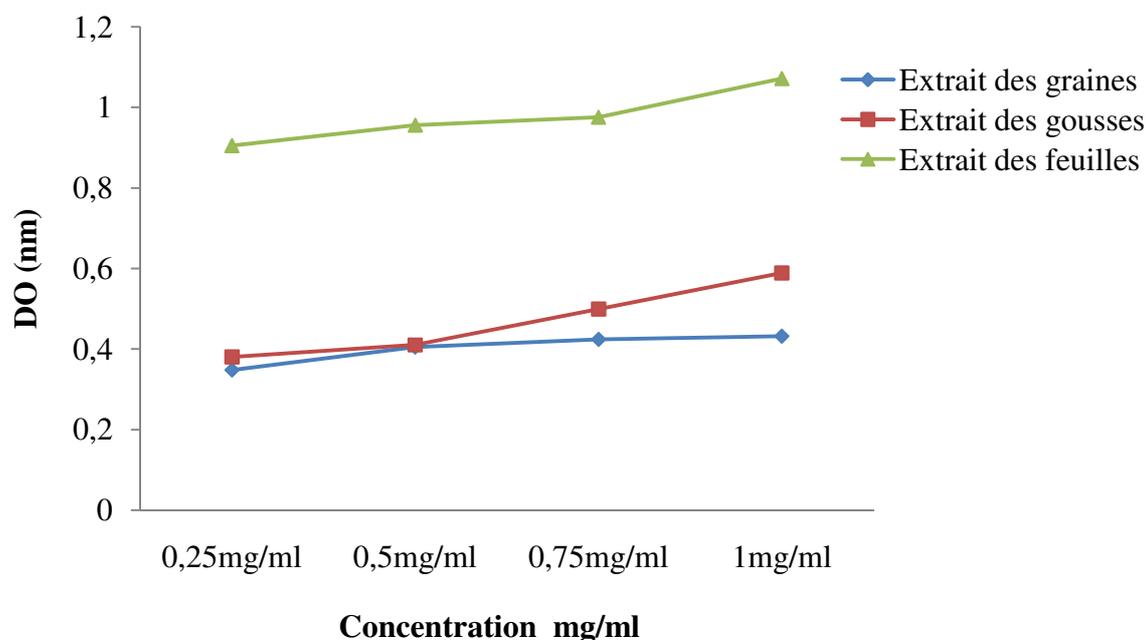


Figure 30. Absorbance des extraits de *S. japonica*.

D'après les résultats obtenus, on constate que la variation de la densité optique augment en fonction de la concentration de l'extrait. A une concentration de 0,75 mg/ml, l'extrait des feuilles possède un pouvoir réducteur maximum de l'ordre 0,976, tandis que l'extrait des gousses et des graines montrent des valeurs plus faibles à la même concentration (0,499 et 0,424 respectivement). Ceci signifie que l'extrait des feuilles est le plus actif pour l'évaluation du pouvoir réduction de fer pour *Sophora japonica* L.

La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe^{3+}/Fe^{2+} Complexe ferricyanide à la forme ferreuse. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700 nm (Bougandoura et Bendimerad, 2012). 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).

Le pouvoir réducteur des extraits de la plante est probablement dû à la présence de groupements hydroxyles dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants (Bougandoura et Bendimerad, 2012). Les études menées par Van Acker et *al.*, (1995) sur la chélation des ions du fer par certains flavonoïdes ont mis en évidence les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques :

- Les groupes 3'-hydroxy et 4'-hydroxy du cycle B (les fonctions catéchol),
- Les groupes 3-hydroxy et 4-oxo du cycle C.
- Les groupes 4-oxo et 5-hydroxy en position 3.

III.2.3. Test de blanchissement du β - carotène/acide linoléique

Le mécanisme de blanchiment de β -carotène est un phénomène à médiation des radicaux libres résultant d'hydroperoxydes formés à partir d'acide linoléique. Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie spectrophotométriquement à 490 nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et/ou inhibé l'oxydation donc prévenir le blanchissement du β -carotène (Naidu et *al.*, 2011).

Après un temps d'incubation en présence des extraits de *Sophora japonica* et le témoin positif (le BHT), Tous les extraits de la plante inhibent le blanchiment du β -carotène à différentes valeurs (Figure31).

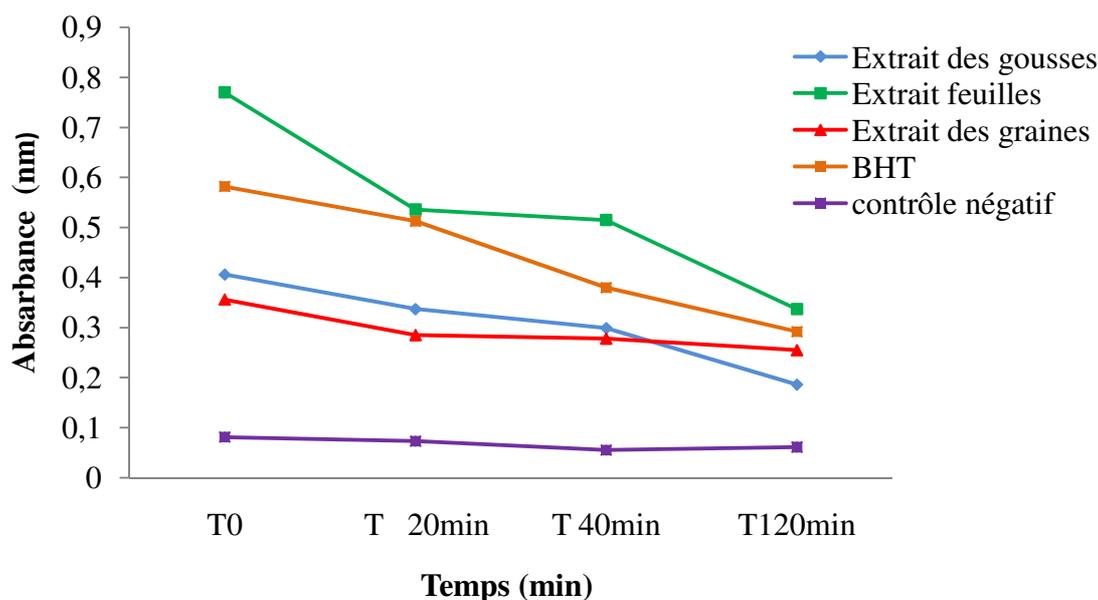


Figure 31. Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en présence de l'extrait méthanolique du *Sophora Japonica* L. et du BHT .

Le BHT est utilisé comme contrôles positifs. Chaque point représente la moyenne \pm E.S.M (moyenne de 3 essais).

Le potentiel antioxydant des extraits et le BHT est évalué par la détermination de la capacité d'inhibition de l'oxydation du β -carotène.

D'après ces résultats, il est évident que l'extrait de *S. Japonica* et le BHT testés sont capables d'inhiber l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β -carotène par rapport au contrôle négatif qui représente une faible inhibition de blanchissement du β -carotène.

L'extrait des feuille sa présenté la plus grande inhibition suivie par le BHT, l'extrait des gousses et des graines. En effet, une corrélation linéaire remarquable et significative est trouvée entre l'activité antioxydante relative des extraits et la teneur en polyphénols. Ces résultats sont probablement due à la haute spécificité de l'essai du blanchissement du β -carotène pour les composés lipophiles (Gachkar et *al.*, 2007).

III.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

Le diamètre de la patte mesuré par le pied à coulisse a donné les résultats illustrés dans les tableaux de l'annexe 6.

Afin de mettre en évidence l'effet anti-inflammatoire de nos extraits, on a calculé les pourcentages d'augmentation de l'œdème en fonction du temps (heures). Les résultats sont rapportés dans le tableau de l'Annexe 6 et illustré par la figure 32.

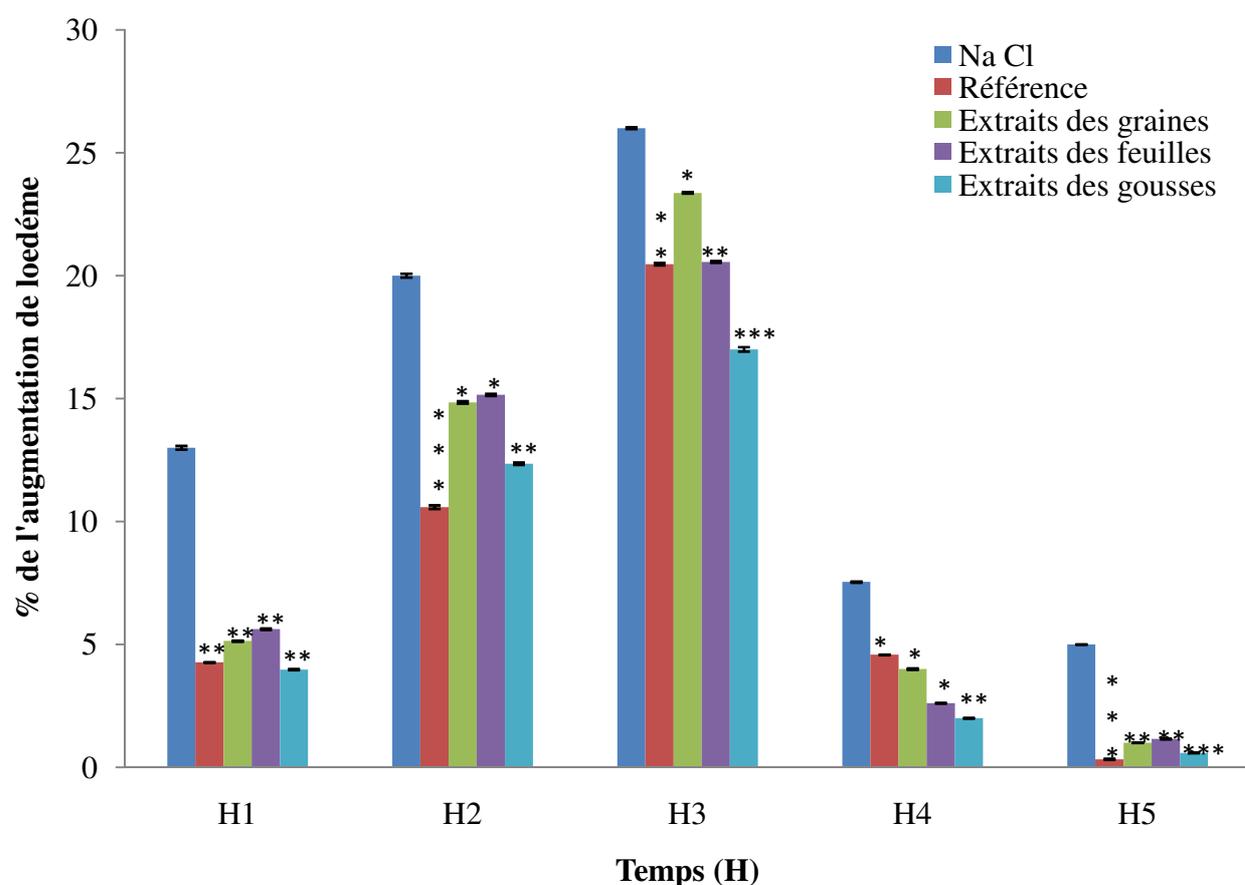


Figure 32. Pourcentages d'augmentation de l'œdème chez toutes les souris pendant cinq heures.

Chaque point représente la Moyenne \pm E.S.M (moyenne de 3 essais). Test de student : * $P < 0,05$ la différence est significative, ** $P < 0,01$ la différence est hautement significative, *** $p < 0,001$ la différence est très hautement significative. Echantillons comparés avec le Na Cl.

Le pourcentage d'augmentation de l'œdème des pattes augmente considérablement en fonction du temps après injection de la carragénine, qui est le plus utilisé pour examiner

l'activité anti-inflammatoire en raison de sa simplicité d'exécution, et de sa rapidité de l'induction des symptômes caractéristiques de l'inflammation (Cuzzocrea *et al.*, 1998 ; Jilroy *et al.*, 1999).

On remarque que l'augmentation est importante chez le témoin (Na Cl) alors qu'elle est significativement diminuée chez les lots traités par les extraits et le Diclofénac ($p < 0,001$).

D'après nos résultats, les souris du groupe témoin qui ne recevait que le Na Cl et la carragénine, développent un œdème maximal à la 3^{ème} heure (25,92 %) suivi d'une phase de régression. Par contre, les souris ayant reçu comme traitement les extraits des graines et des feuilles, l'augmentation de l'œdème est plus importante par comparaison à celles traitées par le diclofénac (23,37% et 20,56% et 20,46% respectivement) ($p < 0,05$). D'autre part, le pourcentage d'augmentation de l'œdème chez les souris traitées avec l'extrait des gousses est inférieure à celui de la référence (16,52%) ($p < 0,05$).

A partir de la troisième heure, le pourcentage de l'augmentation du volume des pattes des souris commence à se réduire progressivement.

Après cinq heures d'expérimentation le pourcentage de l'augmentation du volume des pattes des souris témoins est significativement diminué comparé à celui de la première, deuxième et troisième heure ($p \leq 0,05$).

Pour comparer les résultats trouvés pour la référence et les extraits par rapport au témoin (Na Cl), on a calculé le pourcentage de la réduction de l'œdème. Les résultats sont représentés dans le tableau de l'Annexe 6 et illustrés dans la figure 34.

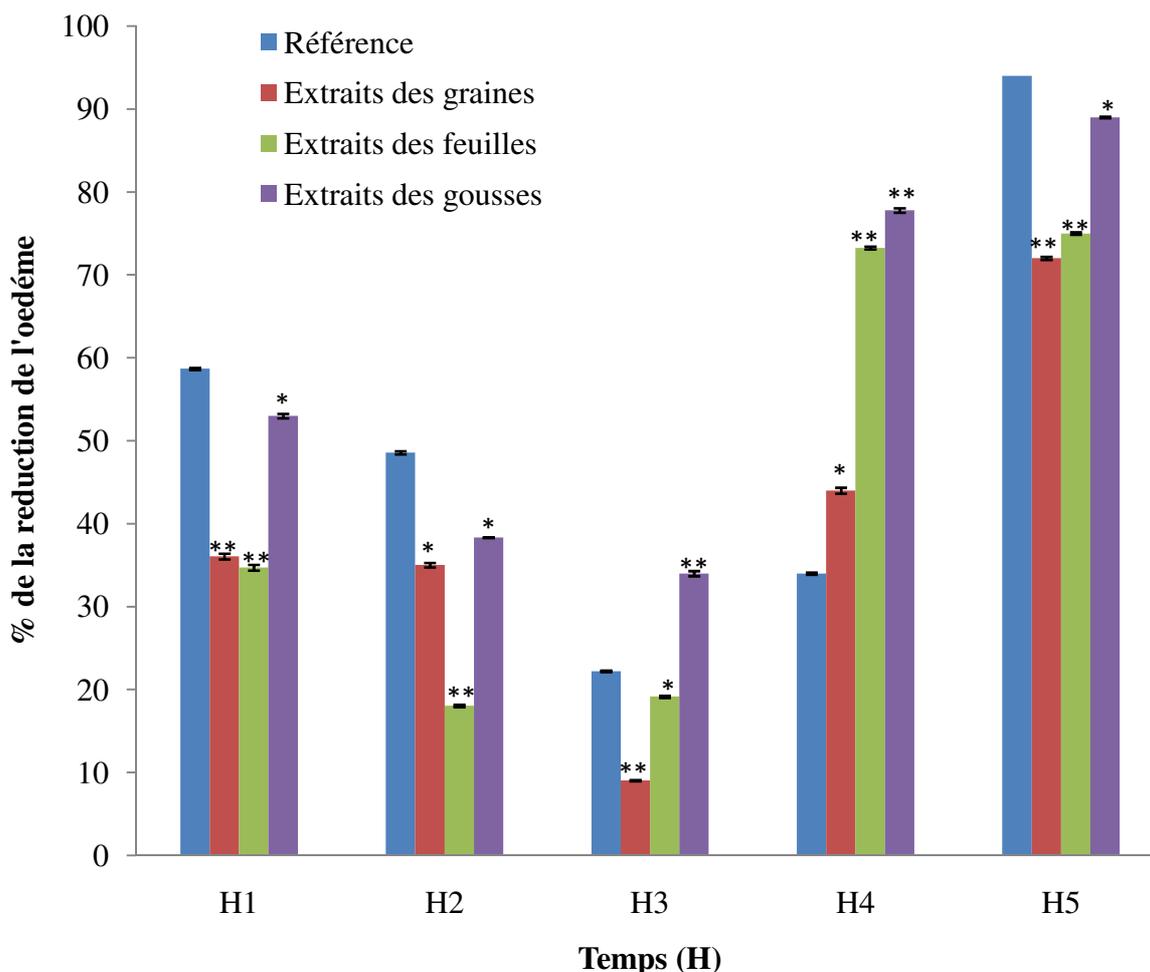


Figure 33. Pourcentages de la réduction de l'œdème chez toutes les souris pendant cinq heures.

Chaque point représente la Moyenne \pm E.S.M (moyenne de 3 essais). Test de student : * $P < 0,05$ la différence est significative, ** $P < 0,01$ la différence est hautement significative, *** $p < 0,001$ la différence est très hautement significative. Echantillons comparés avec le référence (Diclofénac).

La figure 33 montre que la réduction de l'œdème est plus importante chez les souris traitées avec la référence, le Diclofénac, avec un pourcentage de diminution de l'ordre de 94% à la 5^{ème} heure, par rapport à l'extrait des gousses, des feuilles et des graines, qui eux, possèdent des pourcentages de diminution de l'ordre de 89,03% , 74,5% et 72,22% respectivement ($p < 0,01$).

Le diclofénac, utilisé dans cette étude comme substance anti-inflammatoire de référence, se caractérise par un intervalle d'absorption de 2 à 3 heures après son administration orale

(Jacqz-aigrain et Guillonnet, 1998) ce qui explique l'augmentation du pourcentage d'inhibition dans les trois premières heures et son élimination induit une diminution progressive dans les heures qui suivaient (Gupta et *al.*, 2006; Priya et *al.*, 2008; Shedhara et *al.*, 2009).

Nos résultats ne peuvent être comparés à ceux publiés, car d'après nos recherches bibliographiques, aucun travail n'a été effectué sur l'activité anti-inflammatoire des polyphénols de *Sophora japonica*.

Le développement de l'œdème après une injection de carragénine au niveau de la patte d'une souris est attribué à la libération d'histamine, sérotonine, kinins et de prostaglandines (Akindele et Adeyni, 2007 ; Subhan et *al.*, 2007). Elle comporte trois phases distinctes :

- Une première phase qui fait intervenir l'histamine et la 5-hydroxytryptamine (sérotonine) qui favorisent la vasodilatation, la transsudation plasmatique et l'œdème (entre 0h à 1,5h) (Gao et *al.*, 2009).
- Une seconde phase qui fait appel aux kinines (bradykinines) comme médiateurs augmentent la perméabilité vasculaire (2,5h après injection) (Sanogo et *al.*, 2006 ; Marzouk et *al.*, 2011).
- Une troisième phase (3 à 6 heures après injection de la carragénine) liée à la libération des protéases, lysosomes et prostaglandine associée à la migration leucocytaire dans la zone enflammée (Sanogo et *al.*, 2006 ; Marzouk et *al.*, 2011).

Il est à noter que le contenu phénolique dans la plante *S. japonica* est responsable de l'activité anti-inflammatoire observés (Sahu et Saxena, 2013).

De plus, de nombreuses études semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations (Gallego et *al.*, 2007), d'autres flavonoïdes sont capables d'inhiber l'histamine (Kim et *al.*, 2004).

Conclusion et perspectives

Le règne végétal est une source inépuisable des molécules pouvant présenter un intérêt thérapeutique. Notre étude a été consacrée à l'étude des activités antioxydantes et anti-inflammatoires des extraits des différentes parties de la plante *Sophora japonica* de la région de Boumerdes.

Les résultats de nos recherches bibliographiques et de nos études expérimentales nous ont permis de mieux connaître *Sophora japonica* L.

Dans la première partie, nous avons axé notre travail sur l'extraction et quantifications des polyphénols des feuilles, des gousses et des graines de la plante étudiée. L'extraction des polyphénols a permis d'obtenir des extraits méthanoliques des feuilles et des gousses avec un meilleur rendement de l'ordre de 83,33% et 79,16%, suivi par le rendement de l'extrait des graines (24,33%).

La quantification par les méthodes spectrophotométrique nous a permis de déterminer les teneurs en phénols totaux par le réactif du Folin-Ciocalteu et en flavonoïdes par le trichlorure d'Aluminium. Le dosage des polyphénols totaux de l'extrait des feuilles, des gousses et des graines révèlent la présence des quantités moyennement importantes en phénols totaux (0,088 mg EAG/g d'extrait), (0,112mg EAG/g d'extrait), (0,020mg EAG/g d'extrait). D'autre part, le dosage des flavonoïdes de l'extrait des feuilles, des gousses et des graines a révélé des teneurs respectives de 1,07 mg EQ/g d'extrait, 0,64mg EQ/g d'extrait, 0,36mg EQ/g d'extrait. Ces résultats suggèrent que la plante *S. japonica* est moyennement riche en flavonoïdes.

La deuxième partie a été consacrée à l'étude des propriétés antioxydantes de l'extrait des graines, des feuilles et des gousses par trois méthodes : la méthode de réduction du radical libre DPPH, la méthode de réduction du fer (FRAP) et le test de blanchissement de la β -carotène/acide linoléique.

Pour le test au DPPH, les résultats révèlent que l'extrait méthanolique des gousses et des feuilles de *Sophora japonica* L. présentent une activité antioxydante supérieure à l'acide ascorbique avec des IC50 respectives de $1,83 \pm 0,005$ mg/ml, $2,64 \pm 0,01$ mg/ml. L'extrait des graines a présenté un meilleur IC50 de l'ordre de $0,020 \pm 0,008$ mg/ml.

Aussi, la technique de réduction du fer (FRAP), qui représente un indicateur significatif du pouvoir antioxydant des plantes, a montré que l'extrait des feuilles est le plus actif par rapport à l'extrait des gousses et des graines.

Le teste de blanchissement de la β -carotène a montré également que l'extrait des feuilles est le plus actif comme inhibiteurs de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du β -carotène par rapport au BHT.

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait des feuilles, des graines et des gousses a été validée par des pourcentages de réduction importants de l'œdème dans les pattes gauches des souris causé par la carragénine. Ces résultats sont comparables à celle du traitement par le médicament anti-inflammatoire non stéroïdien (Diclofénac), permettant ainsi, de valider scientifiquement l'utilisation de *Sophora japonica* L. dans la médecine traditionnelle chinois.

D'autre part, cette étude peut confirmer la richesse des parties de *Sophora japonica* L. étudiées en substances à caractère anti-inflammatoire.

Des études complémentaires sont à envisager dans le but d'étudier la composition chimique, d'évaluer l'efficacité des substances identifiées contre les inflammations aiguës et chroniques.

Cette étude doit être compléter par les tests suivantes :

- ✓ Chromatographie à haute performance HPLC.
- ✓ Evaluation de la vitesse de sédimentation sanguine.
- ✓ Identification de la protéine de l'inflammation (protéine réactif C) (CRP).
- ✓ Evaluation de la formule numérique sanguine (FNS).
- ✓ Les tests de toxicité du la plante pour connaître l'effet néfaste ou symptômes indésirable.

« A »

Akindele A. J et Adeyemi O.O. (2007). Ani-inflammatory activity of the aqueous leaf extracts of *Byrsocarpus coccineus*. *Fitoterapia*, 78: 25 – 28.

Atmani D., Chafer N., Berboucha M., Ayouni K., Lounis H., Boudaoud H et Debbache N. (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chem.*, 112: 303-309.

Aurousseau B. (2002). Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits, INRA PORD .Anim, 15 : 67-82.

« B »

Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006). "Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses." *Food Chemistry*, 99(1): 191-203.

Barnes Peter J. (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical Science*, 94: 557-572.

Barros L., Ferreira M J., Queiros B ., Baptista P ., Ferreira I. (2007). Total phenols, ascorpic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food chemistry*, 103: 413-419.

Basli A., Chibane M., Madani K., Oukil N. (2012). "Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum glandulosum* Desf." *Phytothérapie*, 10(1) : 2-9.

Belmokhtar. (2015). Identification et caractérisation des molécules du métabolisme secondaire de *Retama monosperma*. L. Boiss, intérêt pharmaceutique. Diplôme de Doctorat en Sciences. Biotechnologie Végétale.

Bentabet N., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K. (2014). Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Bécher en Algérie. *Phytothérapie*, 12: 364-371.

Black H.S. (1987). Potential involvement of free radical reaction in ultraviolet light-mediated cutaneous damage. *photochemphotobiol* , 46: 113-221.

Bors W., Michel C et Stettmaier K. (1997). "Antioxidant effects of flavonoids." *Biofactors*, 6(4): 399-402.

Bougandoura N et Bendimerd N. (2012). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* sp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nature et Technologie*, (9): 14-19.

Boulanouar B et Abdelaziz G. (2014). Activites antioxydantes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle d'Algérie. *International journal Innovation and Applied Studies*, 167-172.

Boumerfeg S., Baghiani A., Djarmouni M., Ameni D., Adjadj M., Belkhiri F., Charef N., Khennouf S. et Arrar L. (2012). Inhibitory activity on xanthine oxidase and antioxidant properties of *Teucrium polium* L. extracts. *Chinese Medicine*, 3: 30-41.

Brash D.E., Rudlph J.A., Lin A., Mckenna G.J., Baden H.P., Halperin A .j., Poten J. (1991). A role for sunlight in skin cancer: UV –induced P53 mutation in squamous cell carcinoma .*Proc Nail Acad SCI USA*, 88:10124-10128.

Bruneton J., (1993). *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales*. 2ème édition, Lavoisier Techniques &Documentation, Paris, 1067.

Bruneton J., (1999). *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales*. 3ème édition, Lavoisier Techniques &Documentation, Paris.

« C »

Cao H., Xie Y et Chen X. (2015). Type 2 diabetes diminishes the benefits of dietary antioxidants: Evidence from the differnt free radical scavenging potential. *Food Chem*, 186 : 106-112.

CavaillonJ. (1993). Cytokines et inflammation. *Veterinary Research .Bio Med Central*, 24 (4): 368-369.

Cowan M.M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol Re*, 12 (4): 564- 582.

Cuzzocrea S., Zingarelli B., Hake P., Salzman A., Szabo C. (1998). Anti-inflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and

peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free Radic Biol Med*, 24(3): 450-459.

« D »

Davidson J.F., Whyte B., Bissinger P.H., Schiestl R.H. (1996). Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5116-5121

Del Banom M.J., Lorente J., Castillo J., Benavente-Garcia O., Del Rio J.A., Ortuno A., Quirin K.W., Gerard D. (2003). Phenolic diterpenes, flavones and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems and roots of *Romarinus officinalis*. Antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem*, 51: 4247-4253.

Delphine D., Maud R.L., Aurélie B. (2007). A la découverte des pentes vertes de la Croix-Rousse. *Direction des Espaces Verts Lyon*. vol 40, p18.

Droge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Reviews of Physiology* 82 :47-95 .

Duran A., Uslu N., Dogan B., Musa O.M., Celik M. (2015). Antioxidant activity and phenolic contents of 30 selected medicinal plants, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 21 (2): 136-141.

« F »

Faivre C.I., Lejeune R., Staub H., Goetz P. (2006). *Zingiber officinale* rosc. *Phytotherapie*, 4(2):99-102 .

Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. 108-115.

Fiebich B.L., Chrubasik S. (2004). Effects of an ethanolic *Salix* extract on the release of selected inflammatory mediators in vitro. *Phytomedicine*, 11: 135–138.

Flanagan S.W., Mosly P.L., Buettner G.R. (1998). Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping. *Free Radic Biol Med*, 43:285-286.

Fu-sheng Zhang,,Qian-yu Wang., Ya-jie Pu., Tong-yao Chen., Xue-mei Qin., Jie Ga., (2015). Identification of genes involved in flavonoid biosynthesis in *Sophora japonica* through transcriptome sequencing. 13.

« G »

González-Mancebon S., GarciaSantos M., HernándezBenito J., Calle E., Casado J. (1999). Nitrosation of phenolic compounds :inhibition and enhancement .J Agric Food chem . 47: 2235-2240.

Gallego G., Sanchez- Campos S., Tunon M.J. (2007). Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids., 22(3):287-93.

Gao Y., Li G., Li C., Zhu X., Li M., Fu C., Li B. (2009). Anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of sophocarpine.*Journal of Ethnopharmacology*. 125: 324-329.

Genoux E. (2011). Dérivés de flavonoïdes et de vérapamil comme ligands des transporteurs MRP1 et ABCG2: de la conception à l'activité anticancéreuse, Université de Grenoble.

Georgé S., Brat P., Alter P., Amiot M.J. (2005).Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plantderived products.*Journal of agricultural and food chemistry* 53:1370-1373.

Gerber M., Boutron-Ruault M.C., Herberg S., Riboli E., Scalbert A., Siess M.H. (2002). "Actualités en cancérologie: fruits, légumes et cancers. Une synthèse du réseau Nacre." Bulletin du cancer, 89(3): 293-312.

Ghalem M., Merghache S., Ghalem S. et Belarbi M. (2012). Phenolic contents and in-vitro antioxidant activity of some secondary metabolites of *Anthyllisvulneraria l.* from Algeria. International Journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences, 2 (3): 51-64.

Ghestem A., Seguin E., Paris M., Orecchioni A.M. (2001).Le préparateur en pharmacie dossier 2^{ème} Edition Tec et Doc. Paris.275.

Gupta M., Mazumder U., Gomathi P., Selvan V.T. (2006). Anti-inflammatory evaluation of leaves of *Plumeriaacuminata*.*BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6:1-6. « H »

Halliwell, B., Gutteridge, J. M., &Aruoma, O. I. (1987). The deoxyribose method: a simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. Analytical biochemistry, 165(1): 215-219.

Haslam E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat Pro*, 59: 205-215.

Hynes M.J. (2004). kinetics and mechanism of the reaction caffeic acid , chlorogenic , acid , sinapie ,ferulic acid and nariginjournal of inorganic biocheistry.98 :1457-1484.

« I »

Iwucke A.V et Nwodo O.F.C.(2008). Antihyperglycaemic effect of aqueous extract of *Daniellaoliveri* and *Sacocephaluslatifolius* roots on key carbohudrate metabolic enzyes and glcogen in experimental diabetes , *Biokemistri*,20:63-70 .

« J »

Jackson L., Evers B.M. (2006). Chronic inflammation and pathogenesis of GI and pancreatic cancers, in: *The link between inflammation and cancer. Springer US*, 130: 39-65.

Jacques-Paul B., Jean-Claude M., Georges B. (1988). Inflammation, collagène et radicaux libres oxygénés. Laboratoire de biochimie, UA Cnrs 610, faculté de médecine, 51, rue Cognacq-Jay, 51095 Reims, France. *médecine/sciences*, 5:304-310 .

Jacqz-Aigrain E et Guillonneau M. (1998). Anti-inflammatoires *Encycl MédChir (Elsevier, Paris), Encyclopédie Pratique de Médecine* 8-(1010) : 4.

Jilroy D., Colvillr-Nash P.R, Willis D., Chivers J., Paul-Clark M.J ., Willoughby D.A. (1999). Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med*, 5(6): 698-701.

« K »

Karagozler A.A ., Erdag B., Emek Y.C., Uygun D.A. (2008). Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechashastata*. *Food Chemistry*, 111 (2): 400-407.

Khadhri A., El mokni R ., Smiti S. (2013). Composes phenoliques et activitesantioxydantes de deux extraits de chardon a glu: *Atractylisgummifera*. *Revue Social Science National*, 39 : 44-52.

Kim H P., Son K. H., Chang H W., kong S. S. (2004). Antiinflammatory plant flavonoids and cellular action macanism. *J Pharmaco .Sci*, 96: 229-254.

Knaggs A.R. (2003). The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*, 20:119-36.

Krzesinski J., Rzesinski P., Piront P. (2002). Décompensation cardiaque, fonction rénale et anti-inflammatoires non stéroïdiens. *Rev Med Liege*; 57(9): 582-586.

Ksouri R., Megdiche W., Falleh H., Trabelsi N., Boulaaba M., Smaoui A., Abdelly C. (2008). Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *C.R. Biol.*, 331: 865-873.

« L »

Lamaison J., Carnat A., Petitjean-Freyet C. (1990). "Teneur en tanins et activité inhibitrice de l'elastase chez les Rosaceae." Presented at *Annales pharmaceutiques françaises*.

Lucienne B., Beauguesne., Monique T., Franis T. (1980). *Plante médicinales des régions tempérées*. 2 Edition Paris. 192.

« M »

Macheix J.J, Fleuriet A., Jay-Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 4-5.

Madhavi D.L., Deshpande S.S., Salunkhe D.K. (1996). Food antioxidants Technological, toxicological, and Health perspectives, 65.

Mahmoudi S., Khali M., Mahmoudi N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynarascolymus L.*). *Nature et Technologie*, 9: 35-40.

Makoi J.H et Nadakidemi P.A. (2007). Biological, ecological, and agronomic significance of plant phenolic compound in rhizosphere of the symbiotic legumes. *Afric.J.Biotech.* 6(12):1358-1368.

Manallah A., (2012). Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea L.* Pour obtenir le Diplôme de magister, Option : Biochimie Appliquée. Université Ferhat Abbas- sétif, 87.

Manea A. (2010). NADPH oxidase-derived reactive oxygen species : involvement in vascular physiology and pathology . *Cell Tissue Res*, 342: 325-39.

Martinez –Cayula. M. (1995) .oxygen free radicals and human disease .*biochem* .77:147-161.

Marzouk B., Marzouk Z., Haloui E., Turki M., Bouraoui A., Aouni M., Fenina N. (2011). Anti-inflammatory evaluation of immature fruit and seed aqueous extracts from several populations of Tunisian *Citrulluscolocynthis*Schrad. *African Journal of Biotechnology*, 10(20) : 4217-4225.

Mazit A. (2009). « Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigellasativa* L. Etude *in vitro* et *in vivo* ». These de Magister, Université el Hadj lakhdar de Batna.

Michalak A. (2006). Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress.*Polish Journal of EnvironmentalStudies*, 15 : 523-530.

Milane H. (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques, Université LouisPasteur (Strasbourg), 13-36.

Montoro P., Braca A., Pizza C., De Tommasi N. (2005). "Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species." *Food Chemistry*, 92(2): 349-355.

« N »

Naidu M.M., Shyamala B.N., Naik J.P., Sulochanamma G., Srinivas P. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of the husk and endosperm of fenugreek seeds.*Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 44: 451-456.

NazckM et Shahidi F. (2004).Extraction and Analysis of Phenolics in Food Review.*Journal of Chromatography A*, 1054 : 95-111.

Nicolas J.F., Florence C., Jean T . (2001). Immunologie clinique et allergologie. Aspirine et AINS : intolérance et allergie. John Libbey Eurotext, 55-58.

« O »

Oancea S., Stoia M., Coman D. (2012). Effects of extraction condition on bioactive anthocyanin content of *vacciniumcorymbosum* in the perspective of food applications. *Procedia Eng*, 42: 489-495.

OrbanJ. (2011). Oxygène, stress oxydant. Désordres métaboliques et réanimation. P 428-435.

Orwa CA., Mutua, KindtR ., Jamnadass R ., Anthony S. (2009). AgroforestryDatabase:a tree reference and selection guide version 4.0 (<http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>).

« p »

Panthati M.K., Rao K .N.V., David B. (2012). A review on phytochemical, ethnomedicale and pharmacological studies on genus *Sophora*, Fabaceae. Accepté le 22/12/2011.

Park A., Park D.V. (1995). The pathogenesis of inflammatory disease : surgical shok and multiple système organ frilure . *inflammopharmacology* 3:149-168.

Popovici C., Saykova I et Tylkowski B. (2010). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH, e-*Revue de génie industriel*. 4:1313-8871.

Prin L .,Hachulla E., Hennache B., Bonnotte B., Dubucquoi S., Abbal M., Faure G., Bouletreau P. (2009). Availablefrom:http://w3med.univlille2.fr/inflammation/ documents/Immuno_1.pdf.

Priya T.T., Sabu M. C ., Jolly C. I. (2008). Free radical scavenging and anti-inflammatory properties of *Lagerstroemia speciosa* (L) *Inflapharma*, 16: 182–187.

« R »

Ribereau-Gayon P. (1972). Propriétés chimiques des phénols. In "les composés phénoliques des végétaux". Edition Dunod Paris, 29-57.

Robards K., Prenzler P. D., Tucker G., Swatsitang, P., Glover W. (1999). Phenolic compound and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66: 401–436.

Rousselet M.C., Vignaud J.M., Hofman P., Chatelet E.P.(2005). Inflammation et pathologie inflammatoire ; Programme d'histologie et d'embryologie et d'immunologie du premier cycle des études médicales.

« S »

Sahu e R et Saxena J. (2013).Screening of Total phenolic and flavonoid content in conventional and non-conventional species of Curcuma. Journal of pharmacognosy and phytochemistry, 2(1):176-179.

Sanchez-Moreno C. (2002). Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. Food Sci Tech Int, 8(3): 121-137.

Sangita C., Priyanka C., Protapaditya D., Sanjib B. (2012). Evaluation of in vitro anti inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein Asian Pacific. Journal of Tropical Biomedicine, 178-180.

Sanogo, R ;Maiga, A ; Diallo, D. (2006). Activités analgésique et anti-inflammatoire des extraits de *maytenussenegalensis*, *stereospermumkuntranum* et *tricroiliaemetica* utilisées dans le traitement traditionnel des dysménorrhées au Mali. *Pharm. Méd. Trad. Afr.*, XIV, 123-136.

Sarkhel S. (2015). Evaluation of the anti-inflammatory activities of *Quillaja saponaria*. *Toxicology Report*, 2: 1-3.

Sarni-Manchado P et Cheynier V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec & Doc, Paris, 2-10.

Scalbert A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30: 3875-3883

Shreedhara C.S., Vaidya V.P., Vagdevi H.M., Latha K.P., Muralikrishna K.S., Krupanidhi, A.M. (2009). Screening of *Bauhinia Purpurea* Linn. for analgesic and anti-inflammatory activities *Indian J Pharmacol* 41: 75-79.

Škerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hraš A.R., Simonič M., Knez Ž. (2005). "Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities." *Food Chemistry*, 89(2): 191-198.

Stalikas C.D. (2007). Extraction, Separation and detection methods for phenolic acid and flavonoid review (J.S), 3268-3295

Subhan F., Nasiara K., Ibrar M. (2007). Anti-inflammatory activity of methanolic and aqueous extracts of *Valeriana Wallichii* rhizome *Pak. J. Pl. Sci* 13 (2):103-108.

Sun T., Powers J.R., Tang J.(2010), Evaluation of the antioxidant activity of bioccoli and their juices. *Food chem*, 105: 101-106.

« T »

Tamer E. (2003). Inference with an in complet models with endogen ouregressors *Econometric society*, 72(3): 905-932.

Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M. and Polissiou M.(2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa*Miller (Lamiaceae).*Food Chemistry*, 90: 333-340.

Thannickalv J et fanburg B.L. (2002). Reactive oxygen species in cell signaling . *Am. J. physiol . Lung cell .Mol .physiol*, 279:1005-1028.

« U »

Uttara B., Singh A., Zamboni P.,MahajanR.T.(2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases : a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic option(*Curr. Neuropharmacol*, 7: 65-74 .

« V »

ValkoM., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.*Int J BiochemCell Biol*, 39(1): 44-84.

Van Acker S., Tromp M., Haenen G R M M., Van der vijgh W &Bast A. (1995). Flavonoids as scavengers of nitric oxide Radical.*Biochemical Biophysical ResearchCommunications*, 214 (3):755- 759.

« W »

Waksmundzka-Hajnos M et Sherma J., (2011). « High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical ience. *Chromatographic Science Series* », 477-478.

Wichtl M., Anton R. (1999). Plantes thérapeutique : traduction, pratique officinale, science et thérapeutique. Ed Tec et Doc. Editions Médicinale Internationales, 636.

Wiell B., Batteux F. (2003). "Immunologie et réactions inflammatoire. 1ère édition Bruxelles, 12-24.

Winter C.A., Ristey E.A., Nuss G.W. (1962). Carrageenan-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 111: 544–547.

« X »

Xiao Fan Sang, (2013). Plantes médicinales chinoises introduites dans les pharmacopées française ., Thèse soutenue publiquement à la faculté de pharmacie de Grenoble inné .
Accepté le 11/12/2013.

« Y »

Yao J., Wang JY., Liu L. (2010). Antioxidant effects of reseratrol on mice with DSS induced ulcerative colitis. Arch Med Res, 41: 288-294.

« Z »

Zerbato M. (2010). Interet du dosage par micromethode de la proteine C, Reactive au cabinet de pédiatri, Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie.



Annexe

Annexe 1. Appareillage et matériel utilisés au laboratoire.

Verreries et petit matériel	Equipements et appareillages
Bécher	Spectrophotomètre OPTIZEN 2120UV
Erlenmeyer	Balancede précision Dhurus
Flacon en verre	Etuve Brinder
Béchers graduées	Réfrigérateur ENIEM
Cuvette de spectrophotomètre	Micropipette
Seringue	Broyeur WARINO
Eprouvette graduée	Bain marie NUVE BATH
Tube à essai	Centrifugeuse HETTICH
Spatule	
Pipette	
Portoir tubes	

Annexe 2. Liste des produits chimiques et solvants.

Produit chimique	Formule chimique
Acide trichloroacétique (TCA)	$\text{CCl}_3\text{O}_2\text{H}$
Carbonate de sodium	NaCO_3
Carragénine	
Chloroforme	CHCl_3
Chlorure ferrique	FeCl_3
DPPH	$\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$
Eau distillée saturée en oxygène	
Folin- ciocaltea (acide phosphotungestique + acide phosphomolybdique)	$(\text{FCR})=\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}+\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$
Hexacyanoferrate de potassium	$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$
Méthanol	CH_3OH
Trichlorure d'aluminium	AlCl_3
Tween 40 (polyxyéthylèneMonopalmitatedesorbitan)	

Annexe 3. Préparation des solutions

Préparation 1 : solution de trichloroacétique à 10%

Trichloroacétique10g

L'eau distillée100ml

Préparation 2 : Chlorure ferrique

Chlorure ferrique.....1g

L'eau distillée 100ml

Préparation 3 : Tampon phosphate

Solution A : 13,6g de KH_2PO_4 dans 1000ml d'eau distillée

Solution B : 17,8g de Na_2HPO_4 dans 1000ml d'eau distillée

Solution finale : 60 ml de la solution A + 40ml de la solution B

Annexe 4.

- Valeurs du dosage des polyphénols exprimée en densité optique (D O) par les extraits méthanoliques des feuilles, des gousses et des graines du *Sophora japonica* en fonction des concentrations (mg /ml) :

Concentrations	0,2	0,4	0,6	0,8
DO extraits des feuilles	0,147	0,235	0,367	0,514
DO extraits des gousses	0,038	0,173	0,498	0,576
DO extraits des graines	0,119	0,129	0,197	0,307

- Valeurs du dosage des flavonoïdes exprimée en densité optique (DO) par les extraits méthanoliques des feuilles, gousses et graines du *Sophora japonica* en fonction des concentrations (mg /ml) :

Concentrations	0,2	0,4	0,6	0,8
DO extraits des feuilles	0,157	0,237	0,316	0,475
DO extraits des gousses	0,06	0,108	0,129	0,271
DO extraits des graines	0,041	0,055	0,086	0,160

Annexe 5. Les activités antioxydantes

- Méthode du piégeage du radical DPPH

Concentration(mg/ml)	0,2	0,4	0,6	0,8
% d'inhibition				
Extrait des gousses	10,02	32,91	33,48	34,28
Extrait des graines	62,85	63,01	82,99	92,66
Extrait des feuilles	28,55	46,26	89,15	90,32
Acide ascorbique	29,87	46,47	52,84	47,41

- Le pouvoir réducteur de fer (FRAP)

	Extrait des graines	Extrait des gousses	Extraits des feuilles
0,25mg/ml	0,348	0,38	0,905
0,5mg/ml	0,405	0,41	0,956
0,75mg/ml	0,424	0,499	0,976
1mg/ml	0,432	0,589	1,072

- Teste de blanchissement β -carotène

Temps	0min	20min	40min	120min
Extraits des gousses	0,406	0,337	0,299	0,186
Extraits feuilles	0,77	0,536	0,515	0,337
Extraits des graines	0,356	0,285	0,278	0,255
BHT	0,582	0,513	0,38	0,292
contrôle négatif	0,081	0,073	0,055	0,061

Annexe 6. Activité anti-inflammatoire

- Diamètre des pattes mesuré par le pied à coulisse.

	NaCl	Référence	Extrait des graines	Extrait des feuilles	Extrait des gousses
Diamètre des pattes Droites	0,2	0,18	0,23	0,22	0,2
	0,25	0,22	0,25	0,23	0,215
	0,18	0,2	0,27	0,18	0,235
Moyenne	0,21	0,2	0,25	0,21	0,2166667
ESM	0,0255713	0,0141844	0,0141844	0,0187642	0,0124535
Diamètre des pattes gauche (1h)	0,25	0,19	0,235	0,225	0,215
	0,26	0,225	0,26	0,24	0,22
	0,2	0,21	0,295	0,2	0,24
Moyenne	0,2366667	0,2083333	0,2633333	0,2216667	0,225
ESM	0,0227982	0,0124535	0,0213749	0,0143314	0,0093821
Diamètre des pattes gauche (4h)	0,26	0,22	0,28	0,26	0,235
	0,27	0,23	0,25	0,248	0,225
	0,22	0,21	0,31	0,215	0,27
Moyenne	0,25	0,22	0,28	0,241	0,2433333
ESM	0,0187642	0,0070922	0,0212766	0,0165265	0,0167582
Diamètre des pattes gauche (3h)	0,26	0,23	0,295	0,26	0,265
	0,3	0,25	0,3	0,27	0,25
	0,23	0,24	0,329	0,227	0,28
Moyenne	0,2633333	0,24	0,308	0,2523333	0,265
ESM	0,024907	0,0070922	0,0130195	0,0159588	0,0106383
Diamètre des pattes gauche (4h)	0,215	0,19	0,23	0,225	0,21
	0,26	0,23	0,26	0,23	0,215
	0,2	0,21	0,29	0,19	0,235
Moyenne	0,225	0,21	0,26	0,215	0,22
ESM	0,0221454	0,0141844	0,0212766	0,0154571	0,0093821
Diamètre des pattes gauche (5h)	0,21	0,18	0,23	0,221	0,201
	0,26	0,22	0,255	0,233	0,215
	0,19	0,202	0,275	0,182	0,238
Moyenne	0,22	0,2006667	0,2533333	0,212	0,218
ESM	0,0255713	0,014208	0,0159902	0,0189111	0,0132493

- %de l'augmentation du l'œdème

	Na Cl	Référence	Extraits des graines	Extraits des feuilles	Extraits des gousses
H1	13	4,27	5,14	5,62	3,98
H2	20	10,59	14,85	15,15	12,35
H3	26	20,47	23,37	20,56	17
H4	7,54	4,58	4	2,61	2
H5	5	0,33	1	1,15	0,59

- % de réduction du l'œdème

	Référence	Extrait des graines	Extrait des feuilles	Extrait des gousses
H1	58,68	36,06	34,72	53
H2	48,57	35,02	18,05	38,34
H3	22,22	9,04	19,15	34
H4	34	44	73,26	77,78
H5	94	72	75	89

ملخص

يساهم العمل الحالي في تقدير كمية البوليفينول والفلافونويد وتقييم النشاط المضاد للأكسدة في المختبر والنشاط المضاد للالتهابات في الجسم الحي للعديد من الأجزاء المحضرة من أوراق الصفيراء اليابانية، ثمارها وبذورها. إن استخراج البوليفينول من مستخلص الأوراق (83, 33%) والثمار (79.16%) مهمة مقارنة مع مستخلص البذور (24.33%). أعطى القياس الكمي للبوليفينول بواسطة طريقة Folin-Ciocalteu لاستخراج الثمار والأوراق والبذور بقيمة 0.112 ملغم EAG / غم المادة الجافة ، 0.088 ملغم EAG / غم المادة الجافة و 0.022 ملغم EAG / غم المادة الجافة. تم تحديد تأثير مضادات الأكسدة عن طريق اختبار DPPH وطريقة FRAP واختبار التبييض β كاروتين. أظهر تقييم نشاط مضادات الأكسدة أن المستخلصات المختلفة من الصفيراء اليابانية لها نشاط مضاد قوي للأكسدة (مستخلص الأوراق في اختبار β كاروتين و FRAP ومستخلص البذور في اختبار DPPH). بالإضافة إلى ذلك ، تم تقييم تأثير مضاد للالتهابات في نموذج حيواني باستخدام طريقة حقن كاراجينين تحت الجلد على الكفوف الخلفية اليسرى للفئران. أظهرت نتائج هذه الدراسة أن مستخلصات الثمار (89,03%) والأوراق (74,5%) والبذور (72,22%) من الصفيراء اليابانية له كفاءة خفض الالتهاب أقل قليلاً من ديكلوفيناك (94%).

الكلمات المفتاحية: الصفيراء اليابانية، البوليفينول ، نشاط مضاد للأكسدة ، نشاط مضاد للالتهابات ، DPPH ، FRAP، β كاروتين.

Abstract

The present work contributes to the quantification of polyphenols and flavonoids, the evaluation of in vitro antioxidant activity and the in vivo anti-inflammatory activity of the various extracts prepared from the leaves, pods and seeds of *Sophora japonica*. L. The extraction yields of polyphenols from leaf extract (83, 33%) and pods (79.16%) are significant compared to the seed extract (24.33%). Quantification of the polyphenols by the Folin-Ciocalteu method of the pod extract, leaves and seeds gave the order value 0.112 mg EAG / g dry matter, 0.088 mg EAG / g dry matter and 0.022 mg EAG / g dry matter. The antioxidant effect was determined by the DPPH test, the FRAP method and the β -carotene bleaching test. The evaluation of the antioxidant activity showed that the various extracts of *Sophora japonica* L have a strong antioxidant activity (leaf extract in the test of β -carotene and FRAP and the extract of the seeds in the DPPH test) . In addition, the anti-inflammatory effect was evaluated in an animal model using the method of plantar edema caused by carrageenin in mice with subcutaneous injection on the left hind paws. The results of this study show that the methanolic extract of the pods (89,03%), leaves (74,5%) and seeds (72,22%) of *Sophora japonica* L. has a reducing efficiency of edema slightly lower than that of Diclofenac(94%).

Key words: *Sophora japonica* L, polyphenols, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, DPPH, FRAP, β -carotene.