

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 أمحمد بوقره – بومرداس
Université M'Hamed Bougara – Boumerdes



**Facultés des sciences
Département de Biologie**

Mémoire de projet de fin d'étude en vue de l'obtention du Diplôme de
MASTER

Domaine : Science de la nature et de la vie
Filière : biologie
Spécialité : Biochimie Appliquée

Thème

Thème

**Extraction et caractérisation des quelques métabolites
secondaires des feuilles de deux arbustes oléastre (olivier
sauvage) et *buxus dioice* (katham)**

Présenter par :

- ❖ Karim Soumia
- ❖ Touati Saida

Soutenu le 03/07/2016 devant le jury :

M: MAAMRI.S

M : LECHEB.F

Mr : DJEZIRI. M

M.A.B/UMBB

M .C.B/UMBB

A.R/CRAPC, UMBB

President

Examinatrice

Promoteur

Promotion : 2015/2016



Remerciement



En premier lieu je remercie ALLAH le toute puissant de m'avoir donné la volanté , la santé et le courage pour réaliser ce travail.

Je remercie chaleureusement mon encadreur monsieur DJIZIRI MOURAD pour son aide précieuse et ses conseils éclairés dans la direction de mon travail, ainsi que pour sa grande disponibilité et son immense gentillesse.

Nous exprimons notre reconnaissance à M^m MAAMERI qui a accepté de présider jury. Nous remercions également M^{elle} LACHAB SAMIRA que nous faite l'honneur d'examiner ce mémoire

Nous exprimons notre reconnaissance aussi envers mes enseignants et mes camarades de promotion 2016.

Nous remercions également toutes les familles Karim et Touati.

*** Merci ***

À ceux et celles qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin

Dans mon travail, je les remercie du fond du cœur.





Dédicace

Je dédis ce mémoire :

A mon cher père

qui m'a toujours souhaité la réussite et le bonheur et qui m'a encouragé dans tout mon cursus scolaire et universitaire, a celui qui m'a tout donné sans rien attendre en retour et J'espère que tu sois fière de ta fille.

A mon chère maman

qui m'a permis de devenir ce que je suis aujourd'hui.

A mes chers frères

Les épaules solides, les yeux attentifs compréhensifs et les personnes les plus dignes de mon estime et de mon respecte

Aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments, que dieu te préserve et procure santé et longue vie.

A mes chères sœurs

Mes belles sœurs et beaux frères, mes nièces et mes neveux

En témoignage de mon profond amour et respect, aux quels je souhaite le succès et la bonheur.

A mes chers amis

A tous mes amis, tous ceux que j'aime, tous ce qui m'aimes et tous ceux qui me sont chers sans oublier mes collègues d'études de notre section

BIOCHIMIE

*A ma chère binom **Soumia***

Pour leur réconfort moral et sa famille

Et a la fin je dédie ce travail a moi-même

Saída



Dédicace

A mes grands parents

A mon mère NACIRA , mon Deuxième Souffle, qui m'a mis au monde, veillé sur moi, et qui a su me transmettre ses valeurs et son chaleureux amour durant toutes ces années qui m'a encouragé et qui a veillé à ce que je réussisse à mes études, qui m'a permis de donner le meilleur de moi même et me surpasser. Je t'aime aujourd'hui plus qu'hier mais bien moins que demain. Que Dieu te Garde pour nous.

A Mon très agréable père AHMED, qui s'est tant sacrifié pour moi, qui s'est toujours donné du mal pour assurer mon bien être. J'espère que je suis à la hauteur de ce qu'il attend de moi. Je t'aime papa.

A mon MARI OMAR compréhensif par son soutien et ses encouragements sans oublier de remercier leurs parents FATIHA et MAHDI et A mon fils que j'adore MOHMED IYAD.

A mes agréables et aimables sœurs ASMA , SIHEM, ROKIA , SOUHILA ,HOUDA ,NADIA , ZOHRA ,SAMIA et mes frères MOHAMED AMINE , BILLAL ,HICHAM , ALLILO, DJAMEL qui ont toujours été avec moi.

A mes fils sœurs AYOUB, ALAA, MANAL, JINANE mes anges que j'adore.

A toutes mes chères amies, HOUDA, SARA, CHAHINAZE, CHAHIRA, DJAMILA, CHRIFA ,AMINA ,SIHEM.

A mon Ame et mon binôme SAIDA



SOUMIA

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1

Partie bibliographique

Chapitre I : Les plantes médicinales

I-1- Introduction	3
I-2-Présentation des plantes étudiées.....	4
I -2-1- l'oléastre ou l'olivier sauvage.....	4
I -2-2- Classification	4
I-2 -3- Répartition géographique:.....	4
I-2-4- Description botanique	5
I-2-5- Composition chimique	5
I-2-6- Propriétés biologiques.....	6
I-2-7- Utilisation traditionnelle	7
I-3-1- Le Katham (<i>Buxus diocia</i>)	7

Chapitre II: Les métabolismes secondaires

II -1- Définition	8
II -2- Les polyphénols	8
II -2-1- Classification des polyphénols.....	8
II -2-2-Effets biologiques des polyphénols	10
II -3 -Les flavonoïdes	12
II-3-1- Structure et classification.....	12
II-3-2- Effets biologiques des flavonoïdes	13
II-4-Les tanins	14
II-4-1-Classification	15

II-4-2- Utilisation des tanins.....	16
-------------------------------------	----

Chapitre III : L'activité antioxydant

III-1- les radicaux libres	18
III -1-1- Les espèces réactives de l'oxygène	18
III -2- Le stress oxydatif.....	20
III -2- 1- Définition.....	20
III-2- 2-Stress oxydatif :.....	20
III -2- 3- Conséquences du stress oxydatif :.....	20
III-3 : les antioxydants.....	21
III-3 -1- Défenses enzymatiques	21
III-3- 2 Défenses non enzymatiques	22

Partie experimentales

Chapitre I : matériel et méthodes

I-1- Matériel	23
I-1-2-Démarche expérimentale.....	23
I-1-3- Matériel végétal.....	24
I-2-Méthodes	24
I-2-1-préparation du l'infusé :	24
I-2-2-screening phytochimique	24
I-2-2-1- Recherche des polyphénols :.....	24
I-2-2-2-Recherche des flavonoïdes.....	25
I-2-2-3- Recherche des tanins.....	25
I-2-2-4-Recherche des saponines	25
I-2-3- Analyse quantitative.....	25
I-2-3-1-Dosage des polyphénols	25
I-2-3-2-Dosage des flavonoïdes	26
I-2-3-3-Dosage des tannins condensés	26
I-3-Etude de l'activité antioxydant.....	27
I-3-1-Principe de l'activité antioxydant par la méthode de DPPH	27
I-3-2-Mode opératoire	28

Chapitre II : Résultat et discussion

II -1- Tests phytochimiques (Test qualitatif).....	28
II-2- Test quantitatif	29
II-2-1- Dosage des polyphénols.....	29
II -2-3- Dosage des flavonoïdes	30
II-2-4-Dosage des tanins	32
II-3- Résultat de l'activité antioxydante	33
II-3-1- Pouvoir antiradicalaire des extraits	33
Conclusion	
Référence bibliographique	
Annexe	
Résumé	

Liste d'abréviations

DPPH : diphenyl-1-picrylhydrazyl.

EAG : équivalent d'acide gallique..

EQ : équivalent de Quercitine.

EC : équivalents de catéchine

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène.

IC₅₀ : concentration inhibitrice de 50%..

NO*: monoxyde d'azote

ONOO⁻ : peroxydinitrite

O₂*⁻ : superoxyde

***OH** : l'hydroxyle.

O⁻·2 : les anions superoxyde.

SOD: superoxyde dismutase.

FeCl₃ : chlorure ferrique

HCL : acide chlorhydrique concentré

Mg : magnésium

NaHCO₃ : bicarbonate de sodium

vitamine C : L'acide ascorbique

Cu⁺ : ion du cuivre

Fe²⁺ : ions du fer

ERO : espèces réactives de l'oxygène

% : pourcentage

m/v : masse/volume

Liste d'abréviations

v :v :volume/volume

Liste de figure

liste de figure	N ^o
Figure 1 : Aire de répartition de l'olivier sauvage et cultivée dans le bassin Méditerranéen	5
Figure 2 : feuilles et fruits de l'olivier sauvage	5
Figure 3 : feuilles du Katham (<i>Buxux dioicia .L</i>)	7
Figure 4 : Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe	10
Figure 5 : Effets des polyphénols dans le maintien de l'intégrité de l'endothélium vasculaire. Les symboles (-) représentent l'effet inhibiteur des polyphénols, et les symboles (+) montrent l'amélioration de la vasodilatation endothéliale par les polyphénols	11
Figure 6 : Effets biologiques des polyphénols	11
Figure 7 : Structure de base des flavonoïdes	12
Figure 8 : Structures chimiques de quelques flavonoïdes	13
Figure 9 : Piégeage des espèces réactives oxygénées par les flavonoïdes	14
Figure 10 : Structure des tanins	15
Figure 11 : Classification des tanins	16
Figure 12 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène	18
Figure 13 : Déséquilibre de la balance entre pro-oxydant et antioxydant	19
Figure 14 : Réaction d'intervention du Glutathion peroxydase	21
Figure 15 : diagramme récapitulatif des différentes étapes du travail	22
Figure 16 : Matériel biologique (feuilles des deux arbustes)	23
Figure 17 : Mécanisme de réduction du radical DPPH• Par un antioxydant	26
Figure 18 : La courbe d'étalonnage de l'acide gallique	30
Figure 19 : Evaluation des polyphénols des plantes	30
Figure 20 : La courbe d'étalonnage de la Quercitine	31
Figure 21 : Evaluation des flavonoïdes des plantes	31
Figure 22 : La courbe d'étalonnage de la catéchine	32
Figure 23 : Evaluation des tanins dans l'extrait des plantes	32
Figure 24 : Le Pourcentage d'inhibition des radicaux libres en fonction des différentes concentrations des extraits (<i>oléastre .L, Buxux dioïca .L</i>)	33

Liste de Tableau

Liste de tableau	N ^o
Tableau 1: Structure des squelettes des polyphénols	9
Tableau 2: Préparation de la courbe d'étalonnage des polyphénol	24
Tableau 3: Préparation de la courbe d'étalonnage des flavonoïdes	25
Tableau 4 : Screening phytochimique des extraits de plantes <i>oléastre L. et Buxus dioïca L.</i>	28

I-1- Introduction

La flore Algérienne dont plusieurs espèces ont été inventoriées apparaît comme une issue de secours pour l'élaboration de nouveaux médicaments qui seront non seulement efficaces dans le traitement des maladies endémiques propres aux pays du Maghreb, mais surtout facilement accessibles pour leur grande disponibilité. Cet intérêt pour la médecine traditionnelle est toujours croissant. Il en est de même pour l'expérimentation scientifique qui a pris un essor vertigineux et qui a permis d'isoler plusieurs substances d'origines naturelles et de leur trouver des vertus thérapeutiques. C'est le cas de l'Aspirine (acide acétyl salicylique) isolé initialement des feuilles et des écorces de *Salix alba L.* (Salicaceae) [8], de la Galegine (agent antihyperglycémiant) isolé de *Galega officinalis L.* (Fabaceae). La Galegine a servi de modèle de synthèse de la Metmorfin et d'autres médicaments antidiabétiques [9].

A l'heure actuelle, d'autres équipes de chercheurs obtiennent à partir des plantes médicinales, des substances nécessaires à la création de nouveaux médicaments. Parmi ces plantes, nous pouvons citer *Mansonia altissima* (Sterculaceae), dont la mansonine demeure le principal composé purifié pouvant être utilisé dans le traitement des affections cardiovasculaires [10], [11].

Cependant, le potentiel des plantes comme sources pour la production de nouveaux médicaments est largement inexploité [12] eu égard au nombre d'espèces de plantes supérieures (angiospermes et gymnospermes) sur la planète. En effet, sur le nombre total, seulement tout un petit pourcentage qui a été testé pour leur activité biologique et un autre pourcentage qui a été évalué sur le plan phytochimique [13]. Il faut toutefois noter que de nos jours, en Algérie, nous sommes de plus en plus confrontés à la résurgence de nouvelles maladies. Entre autres, nous pouvons citer : les maladies liées au stress oxydant. En effet, le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications. La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la multiplication mitochondriale de radicaux [14]. Le stress oxydant est la principale cause initiale de plusieurs maladies [15]. C'est le facteur potentialisant l'apparition des maladies plurifactorielles telles que le diabète, la maladie d'alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires [16]. Vu la diversité et la gravité des maladies qu'induit le stress oxydant, plusieurs équipes de chercheurs se sont investis dans la recherche de nouveaux antioxydants en vue de lutter contre le stress oxydant et ses pathologies associées.

I-2-Présentation des plantes étudiées

Les plantes étudiées ont été choisies en fonction de leurs emplois très fréquents en Algérie, l'oléastre dans la thérapie et le Katam dans la coloration associée en général au Henné.

I -2-1- l'oléastre ou l'olivier sauvage

Les produits végétaux sauvages récoltés ont généralement une valeur soit de consommation, de subsistance ou commerciale. Parmi eux, on retrouve les arbres d'oliviers sauvages, connus sous le nom oléastres (*Olea europaea* subsp *europaea* var *sylvestris*) [17].

Les populations d'oliviers sauvages sont distribuées dans différents environnements, avec des altitudes différentes et des sols qui peuvent être une source très importante de sa résistance aux stress abiotiques tels que la sécheresse, le sel, le vent et la baisse de température [18].

I -2-2- Classification

L'olivier appartient à la famille des oléacées. Le genre est appelé "*Olea*" et comporte 30 espèces différentes réparties sur la surface du globe. L'espèce cultivée en Méditerranée est "*Olea europaea*", dans laquelle on trouve l'oléastre ou l'olivier sauvage, et l'olivier cultivé. La classification botanique de l'arbre de l'olivier selon (Ghedira., 2008) [19] est la suivante :

Embranchement : Magnoliophyta ;

Sous embranchement : Magnoliophytina ;

Classe : Magnoliopsida ;

Sous classe : Asteridae ;

Ordre : Scrophulariales ;

Famille : Oleaceae ;

Genre: *Olea* L ;

Espèces: *Olea europaea* L ;

Sous-espèces : *Olea europaea* L. ssp.*Oleaster* Hoffm.et Link (= *O. europaea* L. ssp. *Sylvestris* Miller).

I-2 -3- Répartition géographique:

L'olivier (*Olea europaea* subsp *europaea* var *europaea*) est l'une des plus anciennes cultures d'arbres agricoles dans le bassin méditerranéen. Plusieurs centaines de divers cultivars d'oliviers géographiquement existent dans le bassin méditerranéen. Ils se distinguent par la morphologie des feuilles, la forme de drupe et la couleur, la composition de l'huile et de la phénologie (adaptation avec les climats) [20].

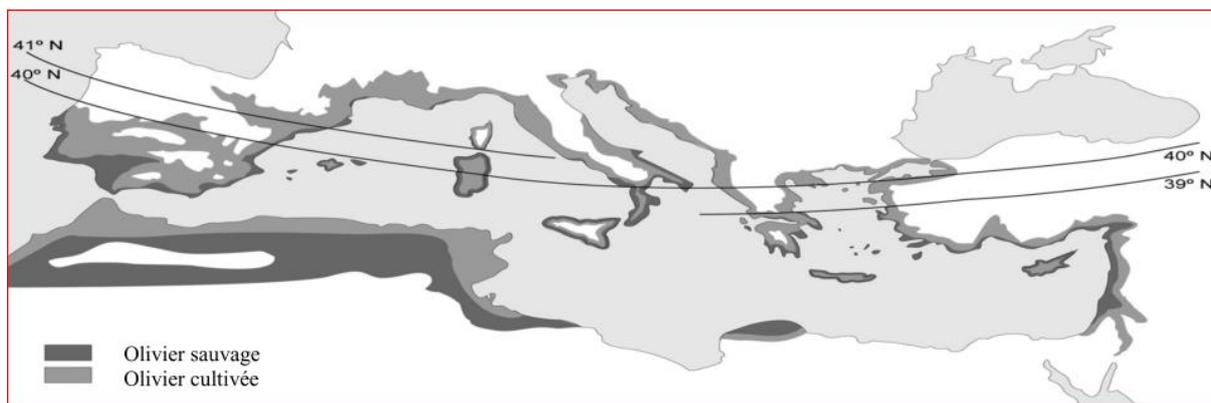


Figure 1 Aire de répartition de l'olivier sauvage et cultivée dans le bassin Méditerranéen [22].

I-2-4- Description botanique

L'oléastre diffère de l'olivier cultivé par la présence des pousses courtes et épineuses, des fruits de petite taille, une faible teneur en huile [21]. Les feuilles de l'olivier sauvage sont de courte longueur, de largeur moyenne. Les fruits de la plupart des oliviers sauvages en une forme elliptique, et avec un faible poids **figure 2**.



Figure 2 : feuilles et fruits de l'olivier sauvage.

I-2-5- Composition chimique

Des études récentes ont montré que les olives contiennent des antioxydants en abondance (jusqu'à 16g/kg), représentés par les actéosides, l'hydroxytyrosol, le tyrosol et les acides phénylpropioniques ainsi que d'autres composés [23]. L'huile d'olive se caractérise par son parfum délicat et unique. Cet arôme très particulier est dû à toute une gamme de composants présents en très faibles quantités tels que les alcools, les composés polyphénoliques, la chlorophylle, les caroténoïdes, les stérols, les tocophérols et les flavonoïdes. L'huile d'olive vierge est particulièrement appréciée pour sa grande stabilité par rapport aux autres huiles

végétales et de sa teneur élevée en constituants tels que les acides gras monoinsaturés (AGMI) et les composés phénoliques [24]. Les acides gras dominants sont les acides gras monoinsaturés (AGMI) dont l'acide oléique (C 18:1), et les acides gras polyinsaturés (AGPI) dont l'acide linoléique (C 18 : 2) et l'acide linoléique (C 18:3) [25]. Les feuilles de l'arbre contiennent des quantités variables d'oligo-éléments en fonction de plusieurs facteurs: de la physiologie végétale, les conditions environnementales (principalement, les éléments disponibles dans le sol) et l'âge de la feuille [26].

I-2-6- Propriétés biologiques

L'olivier et ses dérivés peuvent être considérés comme une source potentielle d'antioxydants naturels et qui peut être utilisé dans l'industrie pharmaceutique [27]. Les polyphénols de l'olivier ont une énorme capacité à piéger les radicaux libres et montrent un comportement synergique lorsqu'ils sont combinés, ce qui se déroule naturellement dans les feuilles d'olivier et donc dans leurs extraits [28]. Parmi ces polyphénols, l'hydroxytyrosol et tyrosol qui contribuent au goût amer, astringence, et à la résistance à l'oxydation [29]. Les feuilles d'olivier possèdent la plus forte capacité à piéger les radicaux libres par rapport aux différentes parties de l'arbre d'olivier, ils présentent aussi une concentration importante en composants à haute valeur [30]. Il est mentionné par certains auteurs que l'extrait de feuille d'olivier réduit la pression artérielle et le cholestérol du plasma chez les rats [26]. De plus, les acides gras mono-insaturés disponibles dans les feuilles d'olivier tels que l'acide oléique, diminuent les lipides du plasma dont les LDL et VLDL et préviennent des maladies cardiovasculaires [31]. L'extrait de feuilles d'olivier peut contenir des traces d'éléments vitaux tels que le sélénium, le fer, le zinc, la vitamine C, la β -carotène et une grande partie d'acides aminées [28]. Les feuilles contiennent aussi du cinchonidine, un alcaloïde quinoléique aux propriétés antipaludiques. Les feuilles, l'écorce et les fruits contiennent l'oleuropéine qui possède des activités antioxydantes, hypotensives, hypoglycémiantes, hypocholestérolémiantes et antiseptiques [19].

I-2-7- Utilisation traditionnelle

Les feuilles ont été largement utilisées dans les remèdes traditionnels dans les pays européens et méditerranéens comme des extraits, des tisanes, et des poudres. Ils contiennent plusieurs composés potentiellement bioactifs [32].

Les feuilles d'olivier sont diurétiques et préconisées dans l'hypertension artérielle modérée. L'extrait de feuilles est utilisé comme adjuvant dans les formes légères de diabète (au cours de la grossesse ou en cas d'obésité) [19]. Les feuilles aussi, ont été largement utilisées en tant que remède pour le traitement de la fièvre et d'autres maladies comme le paludisme. Ils ont été consommé sous forme d'un extrait, d'un ensemble de poudre de herbor ou tisane. Ces propriétés comme : antioxydantes, anti-hypertensive, anti-inflammatoire, hypoglycémique et hypocholestérolémiantes. Les feuilles possèdent également des propriétés antimicrobiennes contre certains micro-organismes tels que des bactéries, des champignons et mycoplasmes [33].

I-3-1- Le Katam (*Buxus dioica*)

Le Katam appelé aussi *Buxus dioica* est d'origine du Yemen. C'est une plante qui est utilisé depuis des milliers d'années et très encrée dans les traditions en Islam où les femmes et les hommes l'utilisaient pour teindre leur cheveux.

NB : Vu qu'il n'y a pas de travaux sur cette plante, on s'est limité ici à donner une petite définition du Katam.



Figure 3 : feuilles du Katam (*Buxus dioica*).

Les feuilles alimentées en éléments simples (eau, sels minéraux, oligo-éléments) et, recevant l'énergie du soleil, synthétisent un ensemble de molécules organiques très complexes qui sont des agents des vertus médicinales du monde végétal [1]. A l'instar d'autres contrées du monde, l'Algérie possède aussi ses "jardins splendides" avec ses plantes vertueuses et la médecine traditionnelle, ainsi pratiquée, trouve un accueil favorable auprès des populations qui sont, hélas, parfois en proie à un charlatanisme ignorant et dangereux pour les malades [2]. Il est important de s'assurer de l'innocuité d'une plante, de connaître ses possibilités et ses limites et de savoir dans quelles conditions on peut l'utiliser [3].

Les dommages oxydatifs causés par les espèces réactives de l'oxygène sur les nutriments peuvent déclencher diverses maladies chroniques. Plusieurs études ont montré que les espèces réactives de l'oxygène sont impliquées dans l'étiologie de nombreuses maladies, telles que le vieillissement, le cancer, l'athérosclérose, les maladies coronariennes, le diabète, l'asthme et la rhinite [4]. Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydants et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leur niveau d'espèces réactives de l'oxygène.

Les antioxydants agissent de plusieurs manières. Leur mécanisme d'action peut être direct ou indirect, en tant que partie de la structure d'enzymes et/ou cofacteurs d'enzymes antioxydantes, comme dans le cas des éléments traces. Les mécanismes les plus fréquents sont l'interruption de la spirale oxydative (vitamines C et E, NADPH, glutathion), la prévention des dégâts par la mise à disposition d'électrons (céruloplasmine, vitamine C, superoxyde dismutase, GSHPx), et la réparation des molécules d'ADN (Zn, acide folique, niacine) [5].

Les plantes médicinales sont une autre source importante pour une grande variété d'antioxydants naturels. Elles ont été utilisées pour traiter des maladies pour des milliers d'années. Les gens sont de plus en plus intéressés par ces plantes médicinales en raison de leur effet bénéfique thérapeutique avec une faible toxicité. Au cours des dernières années, des études sur les activités antioxydantes des plantes médicinales ont été développer de façon remarquable due à un intérêt accru pour leur potentiel d'être utilisé en tant que source d'antioxydants riche et naturel. Parmi ces plantes : *oléastre et buxus dioice* et bien d'autres [6].

Sachant que ces deux arbustes couvrent une grande superficie dans le monde, poussent surtout en région méditerranéenne [7]. Qui est une zone privilégiée par rapport au reste du monde pour la culture de l'olivier et Katham. Nous nous proposons dans un premier temps à chercher les métabolites secondaires dans les deux plantes médicinale par un screening chimiques.

Dans un second temps nous allons évaluer l'activité biologique des deux espèces. Ainsi, l'analyse de ces espèces portera sur la recherche des principaux groupes chimiques et le dosage des polyphénols totaux, tanins et flavonoïdes. Finalement nous mettons en évidence l'activité antioxydante des extraits des feuilles *d'oléastre et buxus dioïce*.

II -1- Définition

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, ils sont divisés principalement en trois grandes familles: Les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes [34], [35].

II -2- Les polyphénols

Les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Les polyphénols sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la production

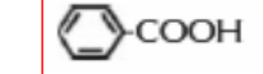
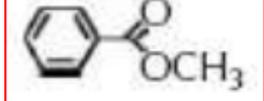
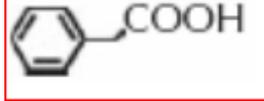
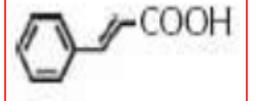
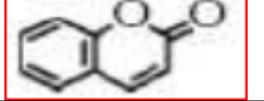
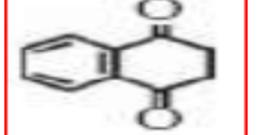
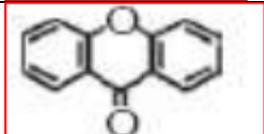
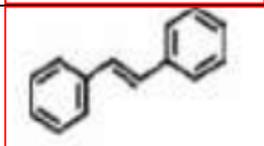
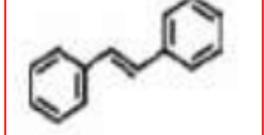
Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent tous un point en commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles OH [36].

Les principales classes de composants phénoliques sont: les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines [37].

II -2-1- Classification des polyphénols

Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones (Tableau 1). Ces molécules sont généralement trouvés conjuguées aux sucres et les acides organiques.

Tableau 1 : Structure des squelettes des polyphénols [38].

N ^{bre} de Carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de Base
7	C6-C1	Acides phénols	Acide gallique	
8	C6-C2	Acétophénonnes	Gallacetophénone	
8	C6-C2	Acide Phénylacétique	Acide p-hydroxyphényl acétique	
9	C6-C3	Acides Hydroxycinamiques	Acide Coumarique	
9		Coumarines	Esculitine	
10	C6-C4	Naphthoquinones	Juglone	
13	C6-C1-C6	Xanthones	Mangiférine	
14	C6-C2-C6	Stilbènes	Resveratrol	
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes	Naringénine	

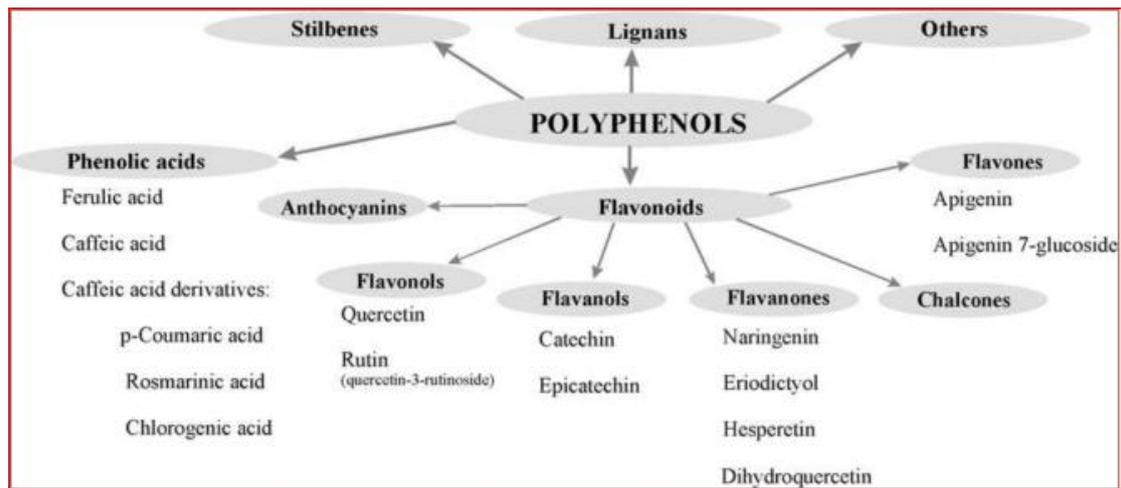


Figure 4 : Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe.[39].

II -2-2-Effets biologiques des polyphénols

Les composés polyphénoliques sont d'ailleurs de plus en plus utilisés en thérapeutique [38]. De nombreux travaux suggèrent que les polyphénols participent à la prévention des maladies cardio-vasculaires [40]. Leur consommation se traduit par une augmentation transitoire de la capacité antioxydante du plasma dans les heures qui suivent le repas. Parvenus au niveau des artères, ils préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (Low Density Lipoproteins ou LDL), qui est l'un des facteurs clé du processus physiopathologique de l'athérosclérose. En inhibant l'oxydation des LDLs, ils limitent leur incrustation dans les parois des artères qui contribuent à l'épaississement des parois et à réduire le flux de sang qui parvient au niveau des tissus.

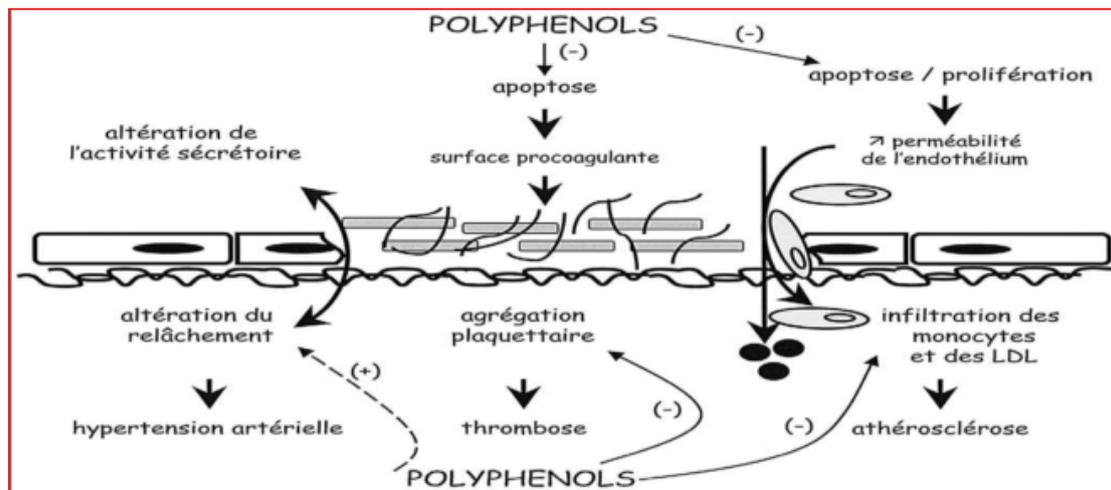


Figure 5: Effets des polyphénols dans le maintien de l'intégrité de l'endothélium vasculaire.

Les symboles (-) représentent l'effet inhibiteur des polyphénols, et les symboles(+)montrentl'amélioration de la vasodilatation endothéliale par les polyphénols [41].

Les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques interviennent dans la qualité alimentaire, impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques [42].

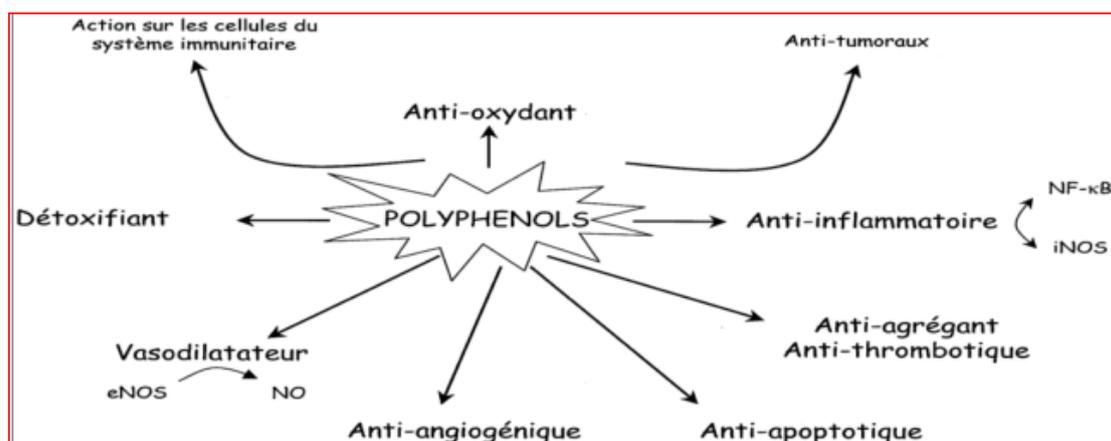


Figure 6: Effets biologiques des polyphénols [42].

II -3 -Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments quasiment universels des végétaux. Presque toujours hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Du point de vue structurale, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, en effet plus de 6400 structures ont été identifiées [43].

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. L'intérêt nutritionnel des flavonoïdes date de la découverte de la vitamine C.

II-3-1- Structure et classification

Les flavonoïdes sont des dérivés benzo-y-pyranne [44]. Leur structure de base est celle d'un diphenyl propane à 15 atomes de carbone (C₆-C₃-C₆), constitué de deux noyaux aromatiques qui désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C [45].

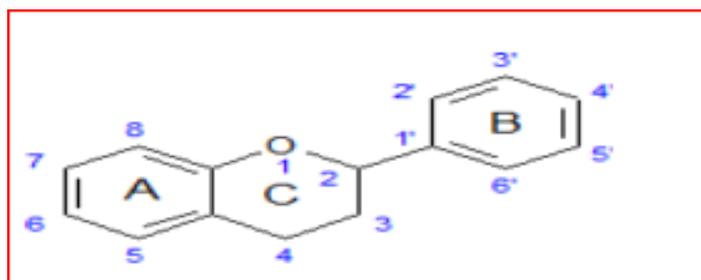


Figure 7 : Structure de base des flavonoïdes [45].

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et de ce fait possèdent le même élément structural de base. Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central, le noyau B relié à l'hétérocycle C dans les positions 2, 3 (figure 5). Dans la position 2 : le flavonoïde est appelé Flavane. Si la position 4 de la flavane porte un groupement carbonyle la flavane est appelé Flavanone. Si la liaison C2-C3 dans le squelette de la flavanone est insaturée le composé est nommé Flavone. Si le squelette est substitué en position 3 par un groupement hydroxyle il est désigné par le nom de Flavonol. Dans la position 3 : le flavonoïde est désigné par le terme Isoflavane [46].

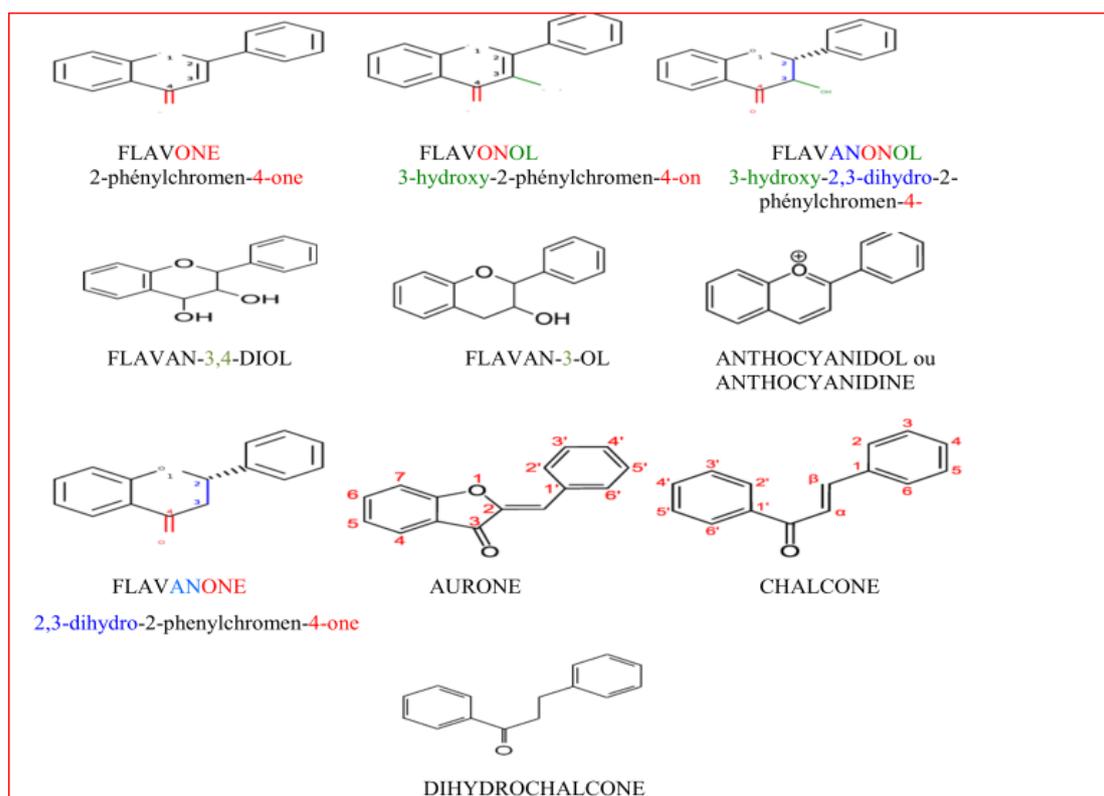


Figure 8 :Structures chimiques de quelques flavonoïdes [47].

II-3-2- Effets biologiques des flavonoïdes

❖ Activité antioxydante :

Les flavonoïdes possèdent de nombreuses activités biologiques, ces activités sont attribuées en partie aux propriétés antioxydantes de ces composés naturels [48]. L'action antioxydante de ces composés ne s'exerce pas seulement par l'inhibition des radicaux libres, mais elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation d'ions métalliques responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène [49].

À cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants (R*), comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle, par transfert d'hydrogène et le radical Flavonoxy (FL-o) qui en résulte peut réagir avec un autre radical pour former une structure stables [50].

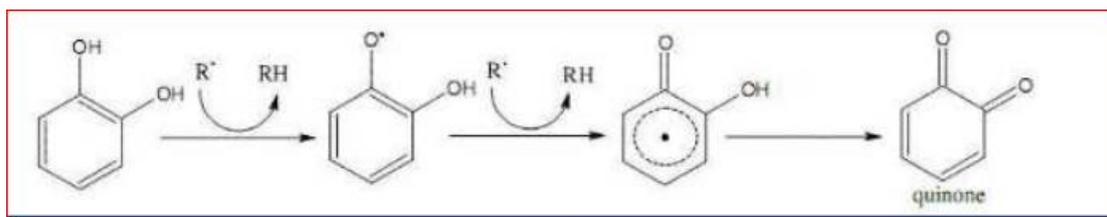


Figure. 9: Piégeage des espèces réactives oxygénées par les flavonoïdes [51].

❖ **Activité antibactérienne :**

Grâce à leur structure caractérisée par la présence de groupe phénolique, et d'autres fonctions chimiques, les flavonoïdes sont considérés de très bons agents antimicrobiens [43]. De nombreuses études ont rapporté les activités antimicrobiennes des flavonoïdes [52]. De même ces propriétés détectées chez la propolis, sont attribuées à leur teneur élevée en flavonoïdes, en particulier le galangin et le pinocembrin [53]. L'activité antifongique des flavonoïdes est aussi établie, une étude faite sur *Dianthus caryophyllus* a montré l'efficacité de flavonoïde glycoside, sur des souches fongiques [54].

Un nouveau flavanone prénylé isolé à partir de l'arbuste *Eysenhardtia texana*, et un flavane 7hydroxy-3,4- méthylendioxy flavane isolé à partir des fruits de *Terminalia bellerica*, ces deux flavonoïdes montrent une activité contre le microbe pathogène opportuniste : *Candida albicans* [55].

Les flavonoïdes, en particulier les anthocyanes, sont les seules molécules du règne végétal capables de produire une vaste gamme de couleurs, susceptibles de donner des teintes allant du jaune-orangé au bleu, en passant par le pourpre et le rouge [56]. Les flavones, aurones et chalcones donnent plutôt des couleurs jaune, beiges voire blanche, ou participent aux nuances produites par les anthocyanes et les caroténoïdes.

II-4-Les tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure variée, de saveur astringente ayant en commun la propriété de tanner la peau, cette aptitude est lié à leur propriété de se combiner aux protéines. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Da [57],

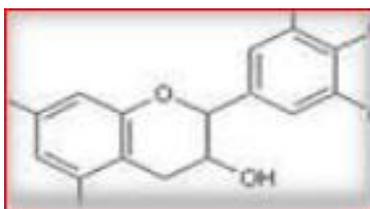


Figure.10: Structure des tanins [58].

Caractérisées par leur astringence, ils ont la propriété de précipiter les protéines et les métaux lourds. Ils favorisent la régénération des tissus et la régulation de la circulation veineuse, tonifient la peau dans le cas des rides [58].

Les tanins sont très répandus dans le règne végétal, mais ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les conifères, les Fagacées, les Rosacées [59]. Ils peuvent exister dans divers organes: l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les graines [60].

II-4-1-Classification

On distingue habituellement chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétique: Les tanins hydrolysables et les tanins condensés [61].

❖ Tanins hydrolysables :

Les tanins hydrolysables sont des polyesters de glucides et d'acides phénols, ils sont facilement scindés par les enzymes de tannases en oses et en acide phénol, selon la nature de celui-ci on distingue: les tanins galliques, et les tanins ellagiques [57].

Tanins galliques (Gallo tanins) :

Ils donnent par l'hydrolyse des oses et de l'acide gallique.

Tanins ellagiques (Ellagitanins) :

Ils sont scindés par les enzymes en oses et en acide ellagique [57].

❖ Tanins condensés

Les tanins condensés sont des polymères flavanols constitués d'unités flavan-3-ols, le plus souvent épicatechine et catéchine [60].

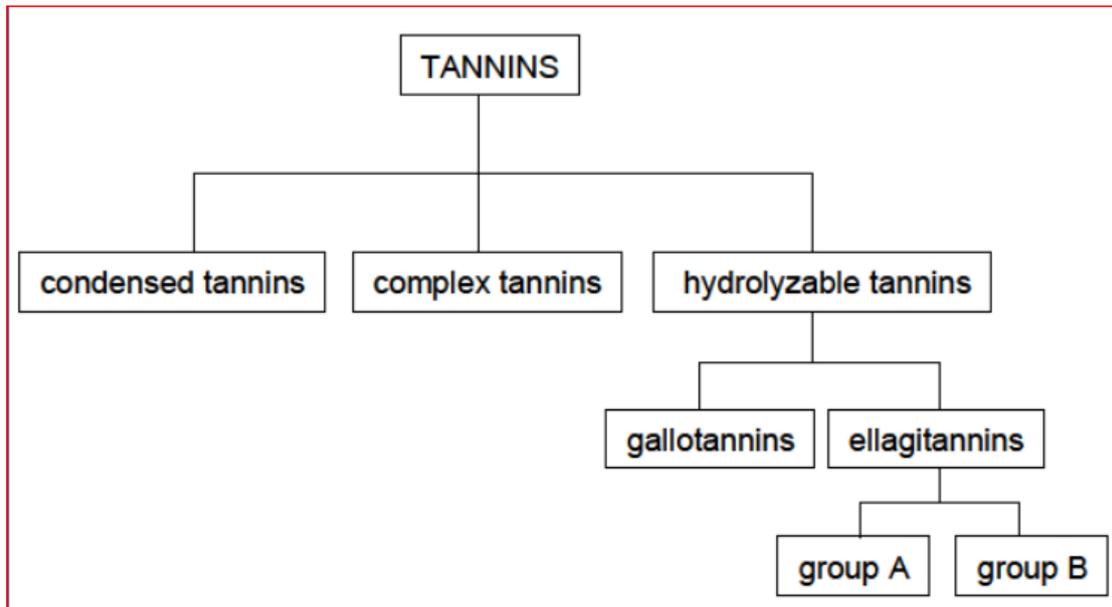


Figure. 11: Classification des tanins [62].

II-4-2- Utilisation des tanins

Grâce à leurs astringente les tanins sont utilisés comme antidiarrhéiques, vasoconstricteurs et hémostatiques, mais surtout comme protecteurs veineux dans le traitement des varices et hémorroïdes [57]. Ils sont largement employés dans l'industrie du cuir surtout dans celle des vernis et peintures [57].

III-1- les radicaux libres

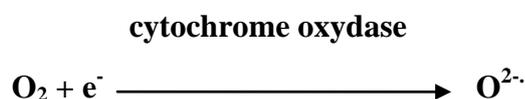
Un radical libre est définie comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés [63], cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité, une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre [64].

III -1-1- Les espèces réactives de l'oxygène

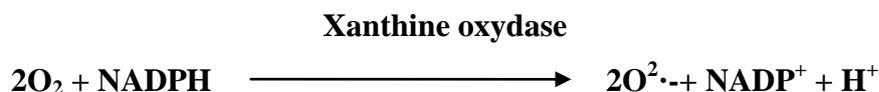
Parmi les espèces radicalaires les plus intéressantes se trouvent les espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont des radicaux libres qui dérivent de la molécule d'oxygène, par addition d'un électron. les principales espèces réactives de l'oxygène sont: le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($\cdot OH$), le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), et aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxyde d'azote ($ONOO^{\cdot}$) [63].

❖ Le radical superoxyde :

L'origine principale du radical superoxyde est sans conteste la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, ce système permet la production du radical superoxyde par l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire, cette réaction est catalysée par le cytochrome oxydase mitochondrial:



Le radical superoxyde peut également se former lors de la phagocytose grâce à la NADPH oxydase présente dans la membrane plasmique des phagocytes :



Le radical superoxyde est peu réactif, mais il entre comme agent oxydant dans la majorité des réactions [51].

❖ Le radical hydroxyle :

Le radical hydroxyle ($\cdot OH$) est une espèce radicalaire hautement réactive. Il est principalement formé lors des réactions d'ions métalliques avec le peroxyde d'hydrogène, ces réactions sont décrites sous le nom de réactions de Fenton:



Le fer peut également catalyser la transformation de l'anion superoxyde en présence de peroxyde d'hydrogène avec production de radical hydroxyle selon la réaction dite

Haber-Weiss. Cette réaction est relativement lente et moins courante que la précédente dans les tissus vivants [63].



❖ Le peroxyde d'hydrogène

Il se forme par une réaction de dismutation du radical superoxyde, catalysée par la superoxyde dismutase (SOD).



Le peroxyde d'hydrogène est moins réactif que l'anion superoxyde, mais il possède une capacité de diffusion importante [63].

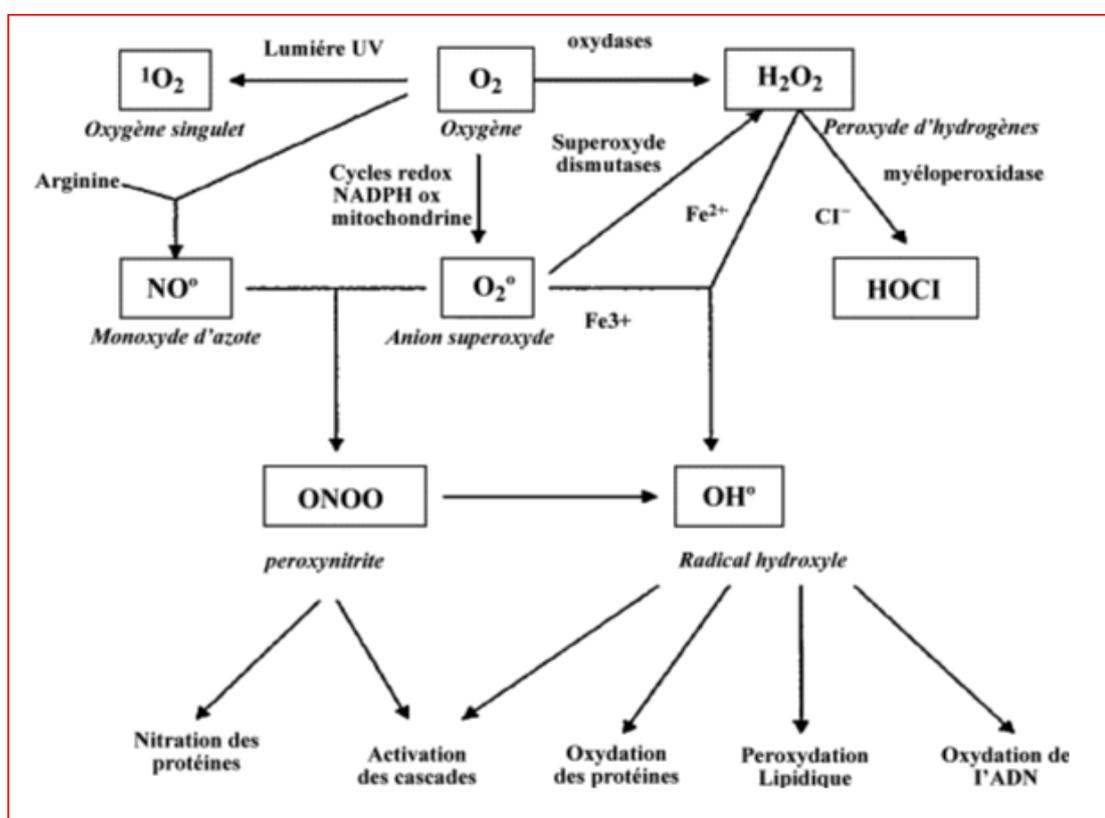


Figure 12 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène [65]

III -2- Le stress oxydatif

III -2- 1- Définition

Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs [66].

III-2- 2-Stress oxydatif :

Le stress oxydatif est une circonstance anormale que traversent parfois nos cellules ou un de nos tissus lorsqu'ils sont soumis à un déséquilibre entre la production des radicaux libres ou pro-oxydants et les systèmes de défenses antioxydantes (**figure 11**), ce qui produit des dégâts tissulaires à travers les modifications oxydatives des biomolécules cellulaires [67].

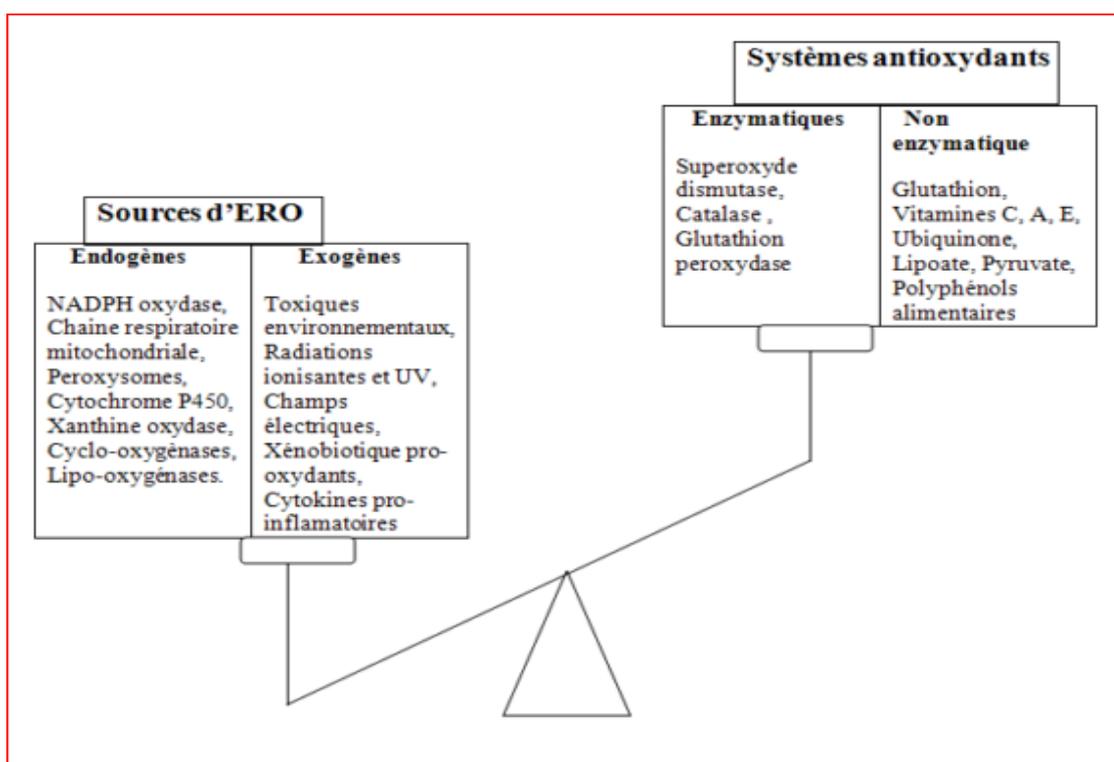


Figure 13: Déséquilibre de la balance entre pro-oxydant et antioxydant [68].

III -2- 3- Conséquences du stress oxydatif :

Les conséquences biologiques du stress oxydatif seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion ; des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydatif : mutation, carcinogenèse, malformation des fœtus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, et immunosuppression [69].

III-3 : les antioxydants

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques d'ERO. Les défenses antioxydantes reposent sur :

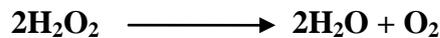
III-3 -1- Défenses enzymatiques**❖ Superoxydes dismutases (SOD) :**

La SOD catalyse la dismutation de l'O₂^{•-} en dioxygène et H₂O₂

Chez l'homme, trois isoformes compartimentées de l'enzyme SOD ont été caractérisées de façon biochimique et moléculaire. La Cu/Zn-SOD ou SOD₁cytosolique, et la EC-SOD ou SOD₃ extracellulaire, qui utilisent le cuivre et le zinc comme cofacteurs nécessaires à l'activité enzymatique, alors que la SOD₂ mitochondriale utilise le manganèse [70].

❖ Catalases :

La catalase est l'une des principales enzymes du système antioxydant biologique. Elle joue un rôle important dans les voies de défense antioxydantes. Le site actif de la catalase est l'hémoglobine, et il agit en tant que catalyseur dans la décomposition de H₂O₂ en eau et oxygène moléculaire [71].

**❖ Glutathion peroxydases:**

Les GSHPx, enzymes antioxydantes, constituent l'une des principales lignes de défense contre les agressions produites par les radicaux libres de l'oxygène. Elles réduisent le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et les hydroperoxydes lipidiques. Pour leur fonctionnement, elles utilisent le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur sur lequel elles transfèrent l'oxygène, le transformant en glutathion oxydé (GSSG) [72].

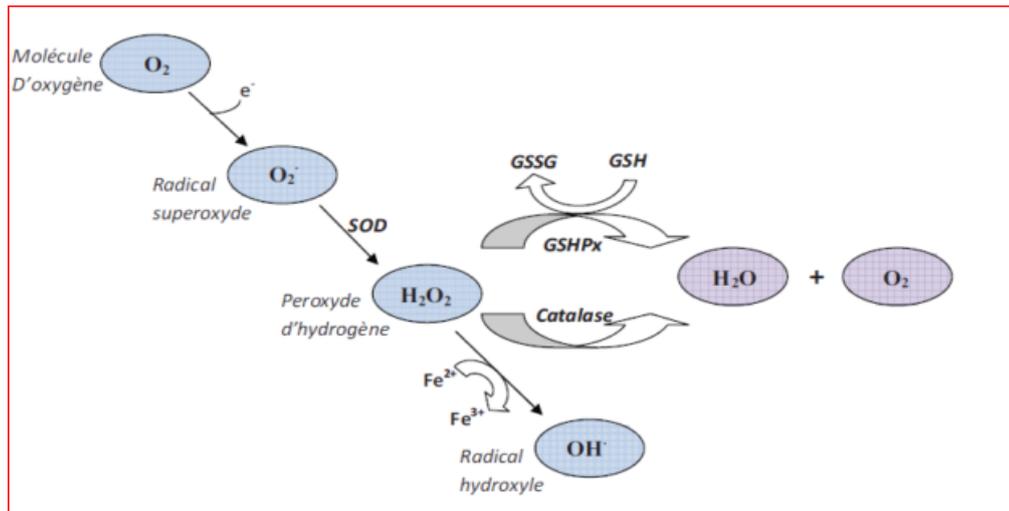


Figure 14: Réaction d'intervention du Glutathion peroxydase [72].

III-3 2 Défenses non enzymatiques :

❖ La vitamine C :

La vitamine C est impliquée dans un certain nombre de processus métaboliques dans le corps humain, y compris ceux qui peuvent être importantes pour le fonctionnement optimal du système d'énergie à l'oxygène. De plus, elle présente un pouvoir antioxydant élevé, aidant à prévenir des dommages cellulaires et des troubles du système immunitaire vis-à-vis des radicaux libres générés au cours d'un exercice intense [73].

❖ La vitamine E :

Antioxydant puissant, la vitamine E circule dans le sang liée aux lipoprotéines LDL. Elle est donc vectorisée sur les sites d'oxydation des lipoprotéines et elle est particulièrement intéressante.

❖ Polyphénols :

❖ Les polyphénols sont des antioxydants complexes avec une importance croissante de la santé publique, en particulier dans les domaines de la nutrition, et de l'épidémiologie. En fonction de leur structure et les caractéristiques physico-chimiques, leurs effets bénéfiques (par exemple, antioxydant, anti-inflammatoire et anti-tumoraux) peuvent varier [61].

NB : Il y'a aussi d'autres défenseurs non enzymatiques comme : Le cuivre (Cu), Manganèse (Mn), Zinc (Zn), le sélénium.

Le présent travail a été réalisé au sein du laboratoire de biochimie, Département de Biologie, Faculté des sciences, Université de Boumerdes et fsc .

Il consiste essentiellement à étudier les métabolites secondaires de deux plantes médicinales (*oléastres et buxus dioice*) et voir leurs applications à travers leur propriété antioxydante.

I-1- Matériel

Le matériel utilisé pour réaliser cette étude est composé de verreries, d'équipements, appareillages et des produits chimiques. (**Annexe 01**).

I-1-2-Démarche expérimentale

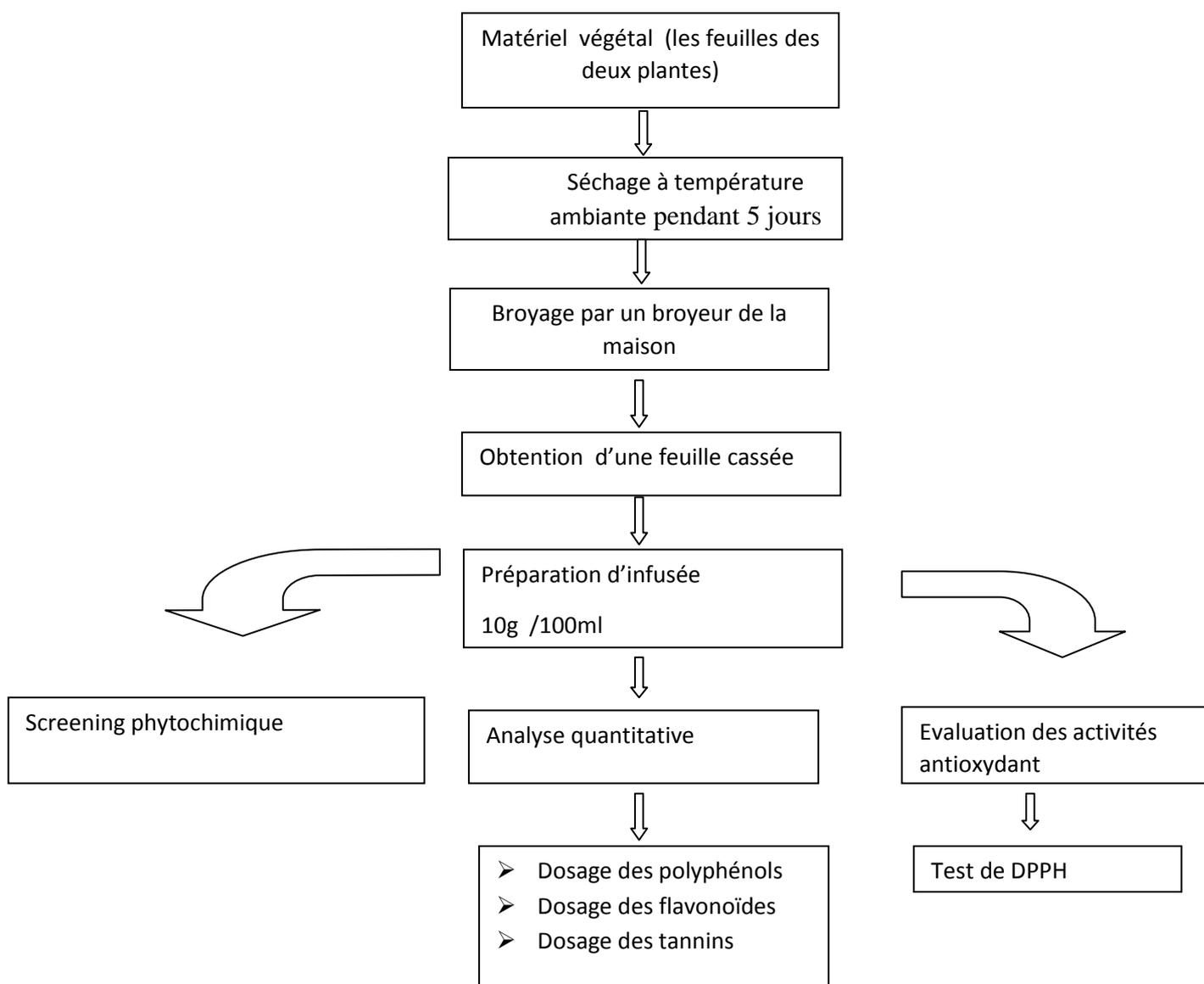


Figure 15 : diagramme récapitulatif des différentes étapes du travail.

I-1-3- Matériel végétal

Les feuilles d'*oléastre* (l'olivier sauvage) sont récoltées de la région de **LAKHDARIA-BOUIRA** durant le mois d'avril 2016 ,et les feuilles de *buxus dioicia* (le **katam**) sont récoltées de la région de **Khémis-EL-Khechna Boumerdes** . Après le lavage avec de l'eau, elles sont séchées pendant 5 jours à l'abri de la lumière et de l'humidité à température ambiante .Une fois séchées, la matière végétale a été réduite en poudre à l'aide d'un broyeur.



Figure 16 : Matériel biologique (feuilles des deux arbustes)

I-2-Méthodes

I-2-1-préparation du l'infusé :

Environ 10 grammes (10 g) de poudre sont mis à infuser dans 50 ml d'eau distillée bouillante puis on laisse au repos pendant 15 min, ensuite on filtre avec du papier filtre. Le filtrat est ajusté à 100 ml avec l'eau distillée.

I-2-2-screening phytochimique

I-2-2-1- Recherche des polyphénols :

La réaction au FeCl_3 a permis de caractériser les polyphénols.

A 2 ml d'extrait, on ajoute une goutte de solution alcoolique de trichlorure Ferrique FeCl_3 à 2% La présence de dérivés polyphénoliques provoque l'apparition d'une coloration bleue ou vert foncé [74].

I-2-2-2-Recherche des flavonoïdes

Le test consiste à ajouter à 1 ml des extraits quelques gouttes HCL et 0.5 g de Mg. On laisse agir 3 minutes. Une coloration orange ou rouge implique la présence des flavonoïdes [75].

I-2-2-3- Recherche des tanins

1 ml de l'extrait a été mélangé avec 10 ml d'eau distillée et filtrée. Le réactif de FeCl₃ à 1% (3 gouttes) a été ajouté au filtrat. Un bleu-noir ou vert précipité a confirmé la présence de tanins galliques ou tanins catéchol, respectivement [76].

I-2-2-4-Recherche des saponines

A 5 ml de chaque extrait, une goutte de bicarbonate de sodium a été ajoutée. Les tubes ont été secoués vigoureusement et maintenus au repos pendant 3 minutes. L'apparition d'une mousse a indiqué la présence de saponines. [77].

I-2-3- Analyse quantitative

I-2-3-1-Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols est réalisé selon la méthode décrite par [78]. 0.1 ml de chaque extrait est mélangé avec 2 ml d'une solution de carbonate de sodium à 2% fraîchement préparée, le tout est agité par un vortex. Après 5 min, 100 µl du réactif de Folin Ciocalteu 1 N sont ajoutés au mélange, le tout est laissé pendant 30 min à la température ambiante et à l'abri de la lumière. La lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 700 nm.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique. (Annexe3)

Tableau -2: Préparation de la courbe d'étalonnage des polyphénols.

Dilutions	S	S/2	S/4	S/8	S/16	S/32	S/64
Concentration (g / ml)	0,8	0,4	0,2	0,1	0,05	0,025	0,0125

Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par 100 grammes de la matière végétale sèche (mg GAE/100g). [79]

I-2-3-2-Dosage des flavonoïdes

L'estimation quantitative des flavonoïdes totaux contenus dans les extraits est réalisée par la méthode colorimétrique de [80].

• Mode opératoire

0,5 ml d'extrait est mélangé avec 0,5 ml de chlorure d'aluminium à 2 % (solution éthanolique). Après 10 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 420 nm.

La quantité de flavonoïdes contenue dans les extraits des feuilles est calculée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec la quercétine [81]. (**Annexe4**)

Tableau -3: Préparation de la courbe d'étalonnage des flavonoïdes.

Dilutions	S	S/2	S/4	S/8	S/16	S/32	S/64
Concentration (g / ml)	0,4	0,2	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625

Les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercétine par 100 grammes de la matière végétale sèche (mg QE/100g).

I-2-3-3-Dosage des tannins condensés

Les quantités des tannins condensés sont estimées en utilisant la méthode à vanilline en milieu acide [82]. Un volume de 50 μ l de l'extrait brut est ajouté à 1500 μ l de la solution vanilline/méthanol (4 %, m/v) et puis mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 750 μ l de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) additionné et laissé réagir à la température ambiante pendant 20 min.

L'absorbance à 550 nm est mesurée contre un blanc. La concentration des tannins est estimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme (g) du poids de la matière sèche (EC)/g à partir de la courbe d'étalonnage. (**Annexe5**)

I-3-Etude de l'activité antioxydant

Le but de notre étude c'est de déterminer parmi les deux extraits préparés celui qui a la plus grande activité antioxydant contre le DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl).

I-3-1-Principe de l'activité antioxydant par la méthode de DPPH

Le DPPH (**figure 17**) est un radical stable et il présente en solution une absorption caractéristique à 517 nm qui lui confère une coloration violette. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit par un capteur de radicaux libres. On peut résumer cette réaction par l'équation suivante :



Où (AH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH.(violet) pour le transformer en molécule DPPH-H [84].

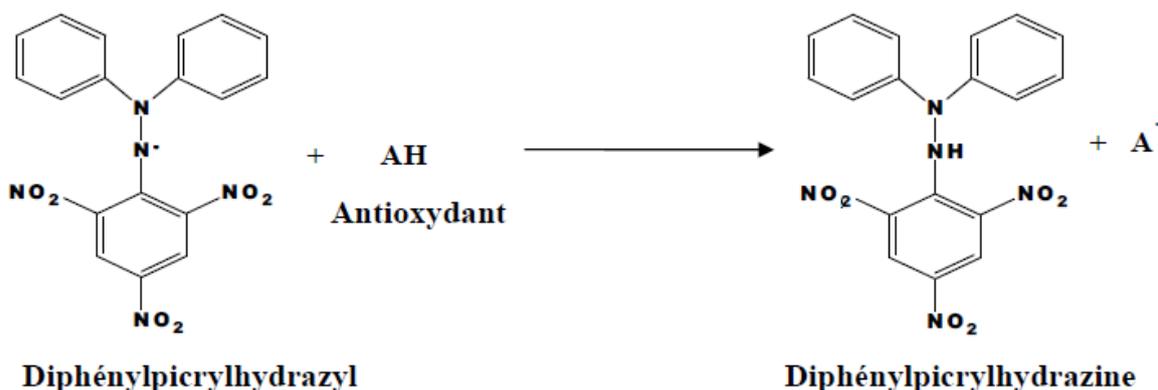


Figure 17: Mécanisme de réduction du radical DPPH[•] Par un antioxydant. [85]

I-3-2-Mode opératoire

L'activité de piéger les radicaux libres est mesuré par la méthode de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) [86]. La solution mère est préparée par la dissolution de 24 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. La solution obtenue possède une absorbance d'environ $0,98 \pm 0,021$ à 517 nm en utilisant le spectrophotomètre.

1.68 ml de cette solution a été mélangée avec 1600 µl de l'échantillon à diverses concentrations (3.125 à 100 µg/ml). Le mélange réactionnel a été bien agité et incubé dans l'obscurité pendant 30 min à température ambiante. Ensuite l'absorbance a été mesuré à 517 nm. Le contrôle a été préparé comme ci-dessus, sans aucun échantillon.

Chaque test est répété trois fois, les résultats ont été présentés par la moyenne des trois essais.

Le pourcentage de piégeage du radical DPPH est calculé selon l'équation suivante [87] :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(Abs_{\text{control}} - Abs_{\text{échantillon}}) / Abs_{\text{control}}] * 100$$

Abs_{control} : absorbance de control (solution de DPPH sans extrait)

Abs_{échantillon} : absorbance en présence d'extrait.

II -1- Tests phytochimiques (Test qualitatif)

Les résultats des tests phytochimiques réalisés sur l'infusé issu de broyage des feuilles séchées de deux plantes *oléastre .L* et *Buxus dioïca .L* sont résumés dans le **tableau N°4**.

Tableau -4 : Screening phytochimique des extraits de plantes (*oléastre L.* et *Buxus dioïca L.*).

test \ Extrait	<i>Oléastre L.</i>			<i>Buxus dioïca L.</i>		
	réaction	Résultat	image	réaction	Résultat	Image
Polyphénols	Vert claire	++		Vert fonçais	+++	
Flavonoïdes	Orange claire	++		Orange fonçais	+++	
Tanins	Vert précipité	++		Vert précipité	+++	
saponines	Apparition d'un mousse	++		Apparition d'un mousse	+++	

(++) : Très riche en métabolite secondaire, (+++) : plus riche en métabolite secondaire.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons la présence des polyphénols, des flavonoïdes, des tanins et des saponine dans les deux plantes.

En effet, le solvant eau a extrait une quantité meilleurs des composées chimiques dans l' *Buxus dioïca L.* par rapport a l' *Oléastre L.* Par ailleurs, ce qui a été prouvé dans une étude réalisée sur l' *Oléastre L.* [6].

II-2- Test quantitatif

II-2-1- Dosage des polyphénols

Après addition du réactif de Folin-Ciocalteu's, une couleur bleue est obtenue avec une intensité qui varie en fonction de la concentration de l'acide gallique (utilisé comme étalon), ou de l'extrait des plantes étudiées. Les résultats du calcul de la concentration moyenne correspondant sont exprimés en μg équivalent acide gallique par 100g du Matière sèche (μg EAG /100 g de MS) (**figure 18**).

Les teneurs en composés phénoliques totaux sont illustrées dans la (**figure 19**), les résultats des deux extraits montrent des teneurs proches et varies de 210 μg EAG/1mg de MS et 186 μg EAG/1mg de MS pour l' *Buxus dioïca L.* et l' *Oléastre L.* respectivement.

L'extraction des composés phénoliques polaires et apolaires est largement dépendante de la polarité des solvants. Ce qui est lié à la différence de polarité des principes actifs [89]. Pour cela, l'extraction par le solvant le plus polaire (Eau) été réalisée, mais il n'y a pas de données publiées sur la composition du solvant type qui extrait tous les composés phénoliques simultanément [90].

Les investigations consacrées à l'optimisation du solvant d'extraction des polyphénols sont nombreuses et les résultats sont différents d'un auteur à l'autre. Durling [89] ont trouvé que le solvant optimal pour l'extraction des polyphénols totaux est l'eau pour la sauge séchée ; l'étude réalisée par Népote [91] a évalué l'eau comme solvant d'extraction aussi avec un temps optimal de 10 minutes pour les grains d'arachide. Néanmoins, Bouabdallah [6] a rapporté que la mélange hydrométhanolique est requis pour l'extraction des polyphénols *Oléastre L.* de la région de Tlemcen, alors qu'une légère augmentation en teneur en polyphénols est remarquée si le solvant d'extraction est l'hydroacétonique.

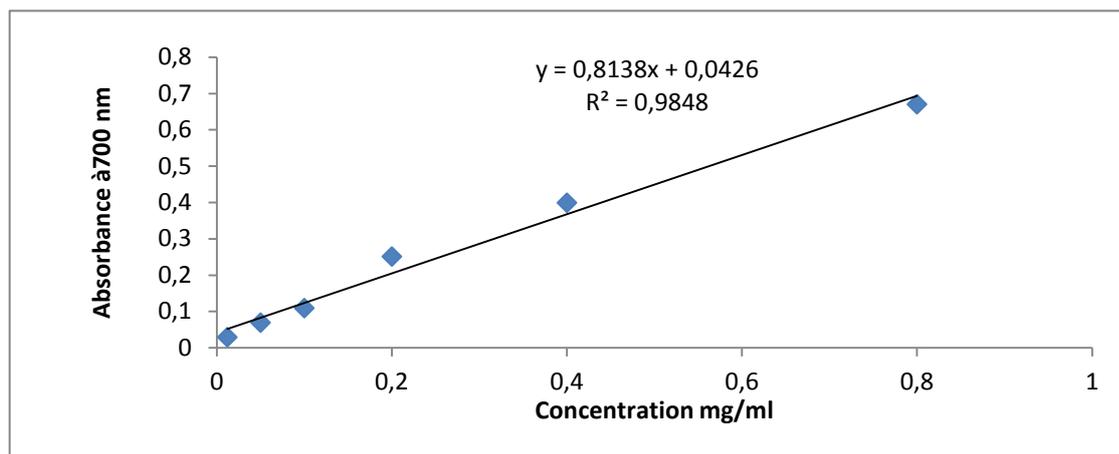


Figure 18: La courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

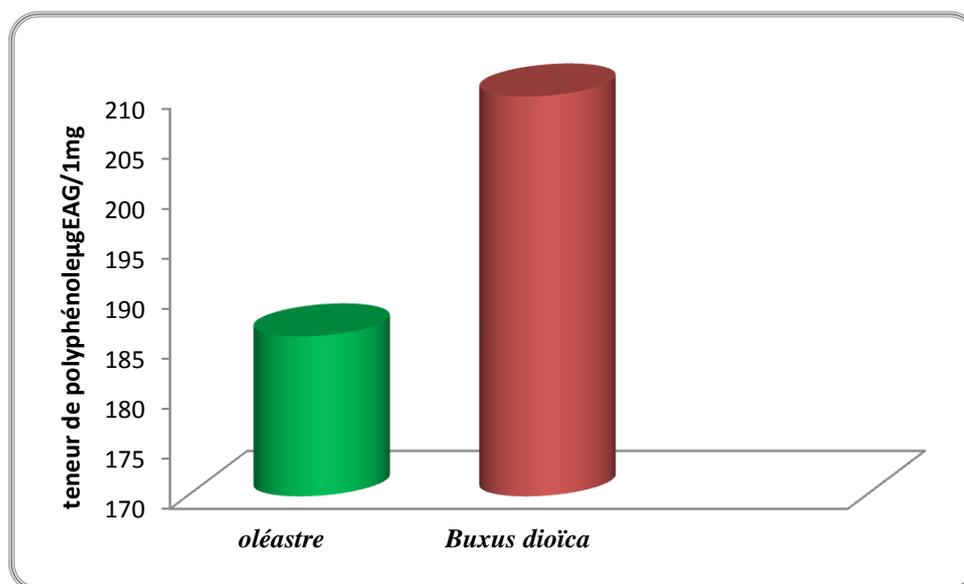


Figure 19 : Evaluation des polyphénols des plantes.

II -2-3- Dosage des flavonoïdes

Une couleur jaune est observée après l'ajout du chlorure d'aluminium à la solution aqueuse de quercétine. Cette couleur est aussi observée dans le cas des extraits étudiés, indiquant ainsi la présence de complexes par chélation des ions d'aluminium par les flavonoïdes [92]

La teneur en flavonoïdes (**Figure 20**) dans les extraits, est exprimée en µg équivalent quercétine par 100 grammes de matière sèche (µg EQ/100g MS) (**figure 21**). La teneur en flavonoïdes de tous les extraits préparés présente un profil différent à celui des polyphénols.

Les résultats des flavonoïdes de deux extraits montrent des teneurs proches et varient de 38 µg équivalent de Quercitine/1mg de matière sèche (EQ/1mg de MS) et de 27 µg EQ/1mg de MS pour l'*Buxus dioïca* L. et l'*Oléastre* L. respectivement.

Peu de travaux sur l'aspect quantitatif ont été réalisés sur l' *Buxus dioïca* L. Néanmoins, l'analyse qualitative a décelé la présence des flavonoïdes dans leur extrait aqueux, l'extrait hydrométhanolique et l'extrait hydroacétonique de *oléastre* [6]

Bouabdallah,(2014), est rapporté des teneurs en flavonoïdes dans les trois mélanges de solvants cités précédemment : aqueux, hydrométhanolique et hydroacétonique, tandis que l'extrait aqueux dans étudié dans notre cas n'extraient que 38 µg EQ /100g de MS .

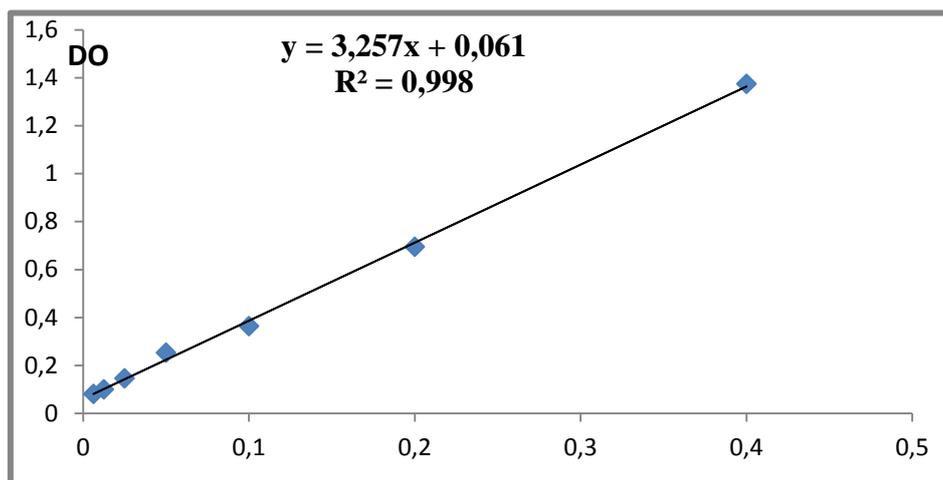


Figure 20 : La courbe d'étalonnage de la Quercitine.

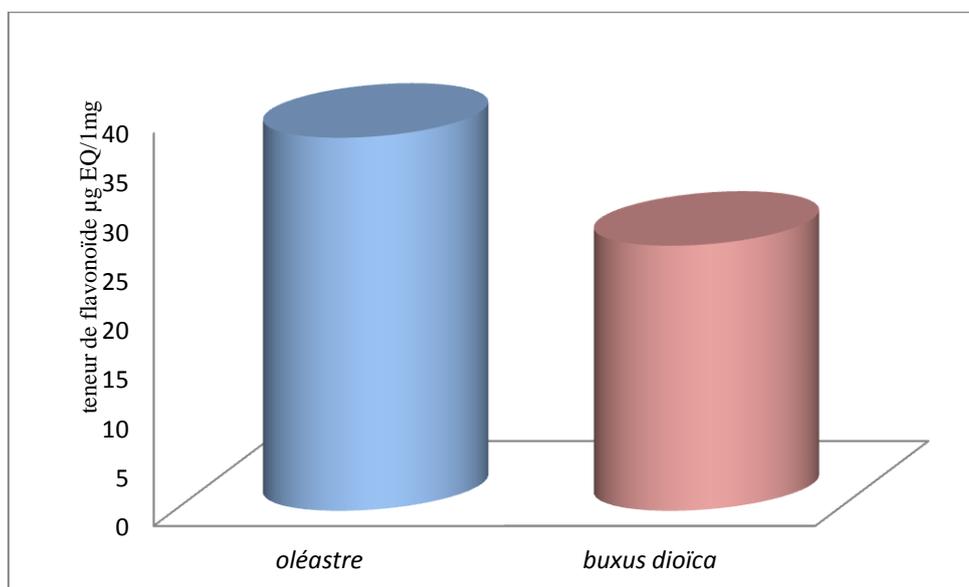


Figure 21: Evaluation des flavonoïdes des plantes.

II-2-4-Dosage des tanins

Le taux des composés tanniques d'extrait des feuilles des plantes *oléastre .L* et *Buxus dioïca .L* a été obtenu à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec des concentrations précises de la catéchine selon une équation de type : $y=0,1162x-0,0034$. $R^2=0,9953$ (Figure 5).

La quantité des tanins de l'extrait aqueux de *oléastre* est $0,23\mu\text{g}$ équivalent de catéchine par 1 milligramme de matière sèche (EC/1mg MS). EC/1mg de MS (Figure 3) Alors que chez l'extrait aqueux de plante *Buxus dioïca .L* est de $0,45\mu\text{g}$ EQ/1mg d'extrait (Figure 3).

D'après les résultats obtenus, La concentration la plus élevée des phénols a été mesurée dans l'extrait aqueux de plante *Buxus dioïca .L*

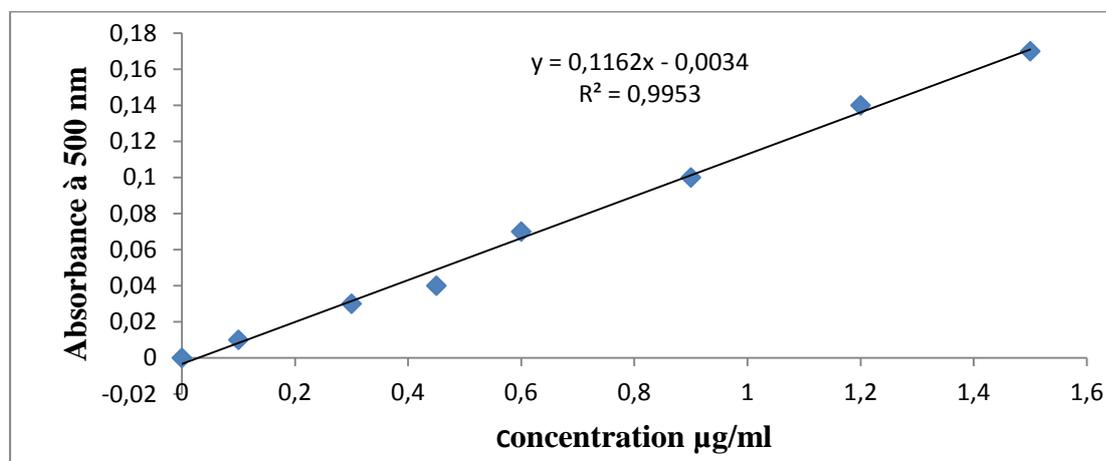


Figure 22 : La courbe d'étalonnage de la catéchine.

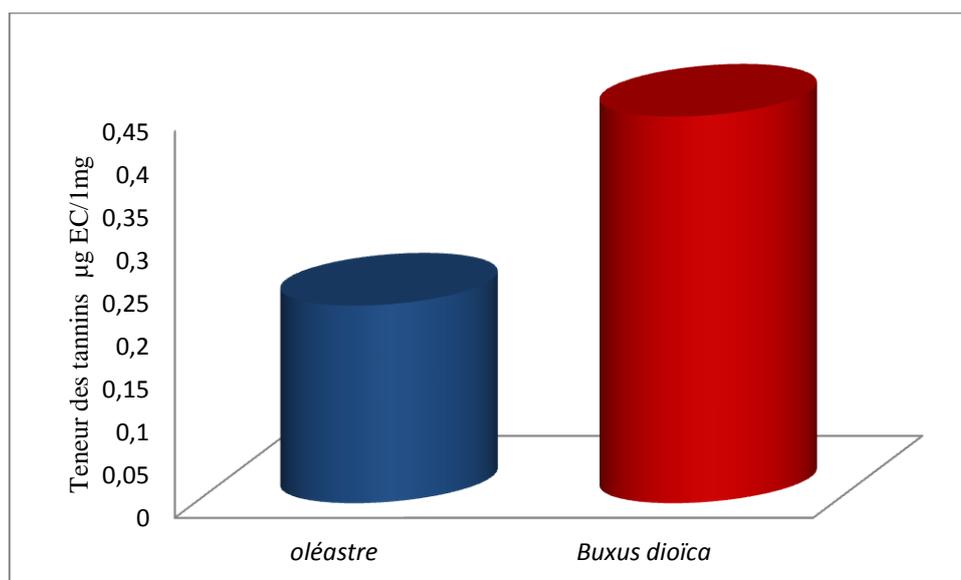


Figure 23: Evaluation des tanins dans l'extrait des plantes.

II-3- Résultat de l'activité antioxydante

Dans cette étude, la méthode au DPPH (1,1-Diphényl-2-Picryl-Hydrazyl) est sélectionnée pour évaluer l'activité antioxydante des extraits des plantes. Elle permet d'estimer plus précisément la concentration du radical inhibé par les molécules actives [93].

II-3-1- Pouvoir antiradicalaire des extraits

Jiménez-Escrig et al. [95] ont montré que l'activité antiradicalaire augmente avec le nombre des doubles liaisons et la présence des groupements fonctionnels comme dans la classe des xanthophylles.

Les résultats illustrés dans la **figure 6** montrent que les activités antiradicalaires des extraits aqueux de *oléastre .L* et de *Buxus dioïca .L* présentent une différence significative. On peut voir aussi que l'activité antiradicalaire de l'extrait aqueux de *oléastre .L* à une activité importantes. Seul l'extrait préparé de ce dernier permet d'inhiber 77,6% des radicaux libres du DPPH à de faibles concentrations (100 µg/ml).

On remarque, que le pouvoir antiradicalaire augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits pour les deux plantes traitées, ce qui est conforme l'étude réalisée par (Chaira et al., (2007).

Une étude comparative a été déjà réalisée par Bouabdelah. (2014), sur l'arbuste *oléastre .L*, avec trois solvants d'extraction (eau, eau/méthanol (30:70/v:v) et eau/acétone (30:70 /v:v) à une température de 35 °C, montre que à une concentration de 25 µg/ml de la même plante, possède une pourcentage d'inhibition de 62,54%, 90,97% et 84,2% respectivement, cette différence de pouvoir peut être due au cultivas étudié.

L'activité antiradicalaire de standard utilisé (Vit C) est sensiblement plus élevée à celle de l'extrait de *Buxus dioïca .L* et moins élevée à celle de *oléastre .L*

Par conséquent, on peut classer par ordre croissant l'activité antiradicalaire des extraits étudiés comme suit : *oléastre .L* > Vit C > *Buxus dioïca .L* .

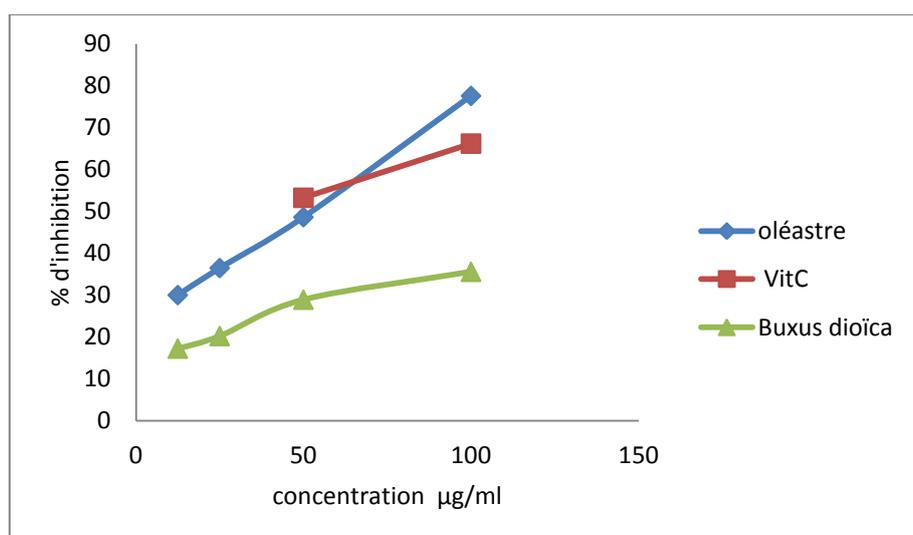


Figure 24 : Le Pourcentage d'inhibition des radicaux libres en fonction des différentes concentrations des extraits (*oléastre .L*, *Buxus dioïca .L*).

Dans ce contexte, nous avons évalué le pouvoir antioxydant d'*oléastre* et *Buxus diocia* utilisées par la population locale. L'extraction sous infusion des feuilles des deux arbustes dans l'eau chaude a donné de bons rendements.

*L'analyse phytochimique qualitative a mis en évidence la présence des Polyphénols, flavonoïdes, et des tanins en quantités importantes. Et la présence des saponines dans nos deux extraits.

*L'analyse quantitative des extraits, a montré des résultats importants pour le dosage des polyphénols totaux, les flavonoïdes et les tanins. L'extrait du katam semble très riche en polyphénols et en tanins par rapport à l'oléastre, par contre l'oléastre est révélé plus riche en termes de flavonoïdes que le Katam.

* L'activité antioxydante de l'olivier sauvage et du Katam a été évaluée par la technique de piégeage du radical libre DPPH. Pour cette technique, les résultats montrent que l'extrait des feuilles de l'olivier sauvage présente l'activité la plus élevée avec taux d'inhibition 77,6% suivi de l'extrait du Katam avec un taux de 35,61%

* Les résultats obtenus dans cette étude, montre la richesse d'*oléastre* et *Buxus diocia* en substances chimiques et qui pourraient représenter une nouvelle source potentielle de molécules bioactives en thérapeutique.

D'autres études approfondies seront nécessaires et se résument dans les points suivants :

- L'isolement et l'identification de la ou les molécule (s) bioactive (s) responsables de l'activité antioxydantes par des techniques chromatographiques et spectrales ;
- Evaluer d'autres activités comme : antidiabétiques, antimicrobiennes, anticancéreuses ... et autres ;
- Des études *in vivo* sont souhaitables pour déterminer les tissus et les organes cibles, et rechercher leurs mécanismes d'action au niveau tissulaire et moléculaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- [1]- Albouy, V., (2008), « Le jardin médicinal, pas à pas : soignez-vous avec les produits de votre jardin », Editions de la Lesse, Aix-en-Provence, France, 95p.
- [2] - Delille L., (2007), “ Les plantes médicinales d’Algérie ”, Berti éditions, Alger, 240p.
- [3] -Baba Aïssa, F., (1991), “ Les plantes médicinales en Algérie ”, Coédition Bouchène et Ad. Diwan, Alger, 97 p.
- [4] -Barnham, K.J., Masters, C.L., Bush, A.I., (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 205–214.
- [5] -Berger MM. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutr clin méta* 20 ;; 48 – 53.
- [6] - Bouabdallah Adel., (2014). Evaluation de l'activité antioxydante des feuilles d'olivier sauvage (*Olea europea sylvestris*). Mémoire de Master. Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen-
- [7] - Verdier E., (2003). L’Huile d’olive.
- [8] - Colegate S.M. & Molineux R.J., (1993). Bioactive natural products. Detection, isolation structural determination. CRC press Inc. 528p.
- [9] - Sneader W. (1985). Drug discovery: The evolution of modern medicines. John Wiley & Sons. Inc, Somerset, New Jersey, U.S.A. 435p.
- [10] - Guede–Guina F., Berebi-Bertrand I., Smith M.O. & Ochilo R., (1992). Pharmacological characterization of a novel analog from *Mansonia altissima* : an in vitro investigation of effets on Na⁺/K⁺-ATPase. *Cell. Molec. biol*, **5**: 240-247.
- [11] - Guede-Guina F., Berrebi-Bertrand I. & Maixent J.M., (1998). Cardiotoxic effets of a new novel cardiac glycoside MSN on the monkey myocardium PROC. 1st Mtg of FASBMB. 103- 108.
- [12] -Hamburger M. & Hostettmann K., (1991). Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochem.* **30**: 3864-3874.
- [12] - Verpoorte R., (2000). Pharmacognosy in the new millennium: lead finding and biotechnology. *J. Pharmacol.* **52**: 253-262.
- [14] -Girodon F., Blache D., Monget A.D., Lombart M., Brunet-Lecompte P., Arnaud J., Richard M.J. & Galan P., (1997). Effect of a two-year supplementation with low doses of antioxidant vitamins and/or minerals in elderly subjects on levels of nutrients and antioxidant defense parameters. *J Am Coll Nutr* **16**: 357-365.
- [15] -Mates J.M. & Sanchez-Jimenez F.M., (2000). Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* **32**: 157-170.

- [16] - Sergeant C., Hamon C., Simonoff M., Constans J., Conri C., Peuchant C., Delmas-Beauvieux M-C., Clerc C., Pellegrin J.L., Leng B., Pellegrin I. & Fleury H. (1998). Oxidative Stress in Cancer, AIDS and neurodegenerative diseases. Editors: L. Montagnier, R. Olivier, C. Pasquier; Marcel Dekker. Inc. New York- Basel-Hong Kong, 409-427.
- [17] - Campbell, B. M., & Luckert, M. (Eds.). (2002) Uncovering the hidden harvest: Valuation methods for woodland and forest resources. London: Earthscan,
- [18] -Aranda, S., Montes-Borrego, M., Jiménez-Díaz, R.M., Landa, B.B. (2011). Microbial communities associated with the root system of wild olives (*Olea europaea* L.subsp *europaea* var. *sylvestris*) are good reservoirs of bacteria with antagonistic potential against *Verticillium dahliae*. *Plant Soil* 343,; 329–345.
- [19] - Ghedira K. (2008). L'olivier. *Phytothérapie*. 6, ; 83-89.
- [20] - Breton Catherine, Pinatel Christian, Médail Frédéric, Bonhomme François, Berville André. (2008). Comparison between classical and Bayesian methods to investigate the history of olive cultivars using SSR-polymorphisms,; 524-200.
- [21] - Breton C. (2006). Reconstruction de l'histoire de l'olivier (*Olea europaeasubsp.europaea*) et de son processus de domestication en région méditerranéenne, étudiés sur des bases moléculaires.Thèse Doctorat Biologie des populations et Écologie, Université Paul Cézanne, France.
- [22] - Carrion, Y., Ntinou, M., Badal, E. (2010). *Olea europaea* L. in the North Mediterranean Basin during the Pleniglacial and the Early–Middle Holocene. *Quaternary Science Reviews* 29 : 952–968.
- [23]- Owen R- W., Haubner R., Wurtele G., Hull W. E., Spiegelhalter B., Bartsch H. Olives and olive oil in cancer prevention. *Eur J Cancer Prev* 13, 2004; 319-326.
- [24]- Bendini A., L. Cerretani, S Vecchi, A. Carrasco-Pancorbo, G. Lercker. Protective (2006). Effects of Extra Virgin Olive Oil Phenolics on Oxidative Stability in the Presence or Absence of Copper Ions. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 4880-4887.
- [25]- Salas J- L., Sanchez J., Ramli U- S., Manaf A- M., Williams M., Harwood J- L. (2000). Biochemistry of lipid metabolism in olive and other oil fruits. *Progr. Lipid Res.* 39; 151-180.
- [26]- Perrinjaquet-Moccetti T, Busjahn A, Schmidlin C, Schmidt A, Bradl B and Aydogan C. (2008). Food supplementation with an olive (*Olea europaea* L.) leaf extract reduces blood pressure in borderline hypertensive monozygotic twins. *Phytotherapy Research*, 22, ; 1239-1242.
- [27]- Savarese TM, Strohsnitter WC, Low HP, Liu Q, Baik I, Okulicz W, Chelmow DP, Lagiou P, Quesenberry PJ, Noller KL, Hsieh CC. (2007). Correlation of umbilical cord blood hormones and growth factors with stem cell potential: implications for the prenatal origin of breast cancer hypothesis. *Breast Cancer Res* 9: R29,.

- [28]- Polzonetti V., Egidi D., Vita A., et al. (2004). Involvement of oleuropein in digestive metabolic pathways. *Food Chemistry*. 88, ; 1-15.
- [29]- Visioli F., Galli C. (2002). Biological properties of olive oil phytochemicals. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 42; 209-210.
- [30]- Savournin, C., Baghdikian, B., Elias, Riad., Dargouth-Kesraoui, F., Boukef, K., et Balansard, G. (2001). Rapid High-Performance Liquid Chromatography Analysis for the Quantitative Determination of Oleuropein in *Olea europaea* Leaves. *J. Agric. Food Chem.*, 49,; 618-621.
- [31]- Huang, C.L.; Sumpio, B.E. (2008). Olive oil, the Mediterranean diet, and cardiovascular health. *J. Am. Coll. Surg*. 207,; 407–416.
- [32]- Wainstein J, Ganz T, Boaz M, Bar Dayan Y, Dolev E, Kerem Z, Madar Z. Olive leaf extract as a hypoglycemic agent in both human diabetic subjects and in rats. *Natural medicine*, 2013; 01-477.
- [33]- Ghanbari Rahele, Farooq Anwar, Alkharfy Khalid M, Gilani Anwarul-Hassan and Saari Nazamid. (2012). Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.)—A Review. *Int. J. Mol. Sci.*; 13, 3291-3340.
- [34]- Lutge U., Kluge M., Bauer G., (2002). *Botanique 3ème Ed : Technique et documentation*. Lavoisier .Paris. 211p.
- [35]- Abderrazak M et Joël R., (2007). *La botanique de A à Z*. Ed. Dunod. Paris. 177p.
- [36]- Hennebelle T, Sahpaz S, Bailleul F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothér*, 1,; 3-6.
- [37]- Tapiero H., Tew K.D., Nguyen B.G., and Mathé G., (2002). Polyphenol do they play a role in the prevention, of the human pathologies? *Biomed.pharmacother*. **56**: 200-207.(cited in Djemai Zoueglache S, 2008).
- [38]- Crozier, A., Jaganath, I.B., and Clifford, M.N. (2006) Phenols, polyphenols and tannins: an overview. In: Crozier, A., Clifford, M.N. and Ashihara, H. (eds.) *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell Publishing, pp. 1-24. ISBN 1405125098
- [39]- Borbála Borosa, Silvia Jakabová, Ágnes Dörnyei, Györgyi Horváth, Zsuzsanna Pluhár, Ferenc Kilár, Attila Felinger (2010). Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–massspectrometry inThymusspecies. *Journal of Chromatography A*, 1217 , 7972–7980.
- [40]- Manach C, Scalbert A, Morand C & Jimenez L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79,; 727-747.

- [41]- Martin S., Andriantsitohaina R., (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. **51**: 304-315.
- [42]- Bahorun T., (1997). Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food and agricultural research council, Réduit, Mauritius*. 83-94.
- [43]- Harborne J.B., and Williams C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992 *Phytochemistry*. **55**: 481-504.
- [44]- Skerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hras A.R., and Simonic M., Knez Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chem.* 89: 191-198.
- [45]- Dacosta Y., (2003). Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris. 317p. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).
- [46]- Bouakaz I., (2006). Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. Mémoire de magister, Batna.
- [47]- Scalbert A, Williamson G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphénols. *J Nutr.* Aug; 130 (8S Suppl): 2073S-80S.
- [48]- Fuhrman B, Larvy A, Aviram M. (1995). Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and LDL to undergo lipid peroxydation. *Am J Clin Nutr*; 61: 549- 554.
- [49]- Cotelle N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem* 1: 569-590.
- [50]- Jovanovic S.V., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B., and Simic M.G. (1994). Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 4846-4851.
- [51]- Marfak A. (2003). Thèse de doctorat Radiolyse Gamma des flavonoïdes ; Etude de leur réactivité avec des radicaux issus des alcools. pp: 6-7-10.
- [52]- Haraguchi, H., Ishikawa, H., Mizutani, K., Tamura, Y. & Kinoshita, T. (1998) Antioxidative and superoxide scavenging activities of retrochalcones in *Glycyrrhiza inflata*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 6, 339–347.
- [53]- Tim C.T.P, and Andrew J. L. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 26:343–356.
- [54]- Galeotti F., Barile E., Curir P., Dolci M., Lanzotti V. (2008). Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity. *Photochemistry Letters*, **1**: 44-48.

- [55]- Wachter G.A., Hoffmann.J.J.,Furbacher.T., Blake.M.E.,and Timmermann.B.N. (1999). Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia Texana*. *Phytochemistry*. 52: 1469-1471.
- [56]- Luigia Longo, Giuseppe Vasapollo., (2006). Extraction and identification of anthocyanins from *Smilax aspera* L. berries, *Food Chemistry* .226–231.
- [57]- Paris M et Hurabielle. (1981). Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie. Tome 1. Ed Masson. Paris.pp: 102-103-104-107.
- [58]- Kansole, M.M.R., (2009). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin).
- [59]- Ghestem A., Seguin E., Paris M., and Orecchioni A.M. (2001). Le préparateur en pharmacie dossier 2ème Ed TEC&DOC. Paris. pp275. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).
- [60]- Khanbaba K, Ree T.R. (2001). Tannins: Classification and Definition. *Journal of Royal Society of Chemistry*: 18, 641-649.
- [61]- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – 3ème Ed Techniques et documentations. Paris. pp: 227-310-312-313-314.494.
- [62]- Wilfred .V et Ralph .N. (2006). Phenolic compound biochemistry Ed Springer .USA. 24p.
- [63]- Jacques B, and André R. (2004). Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris. pp: 217-219-220-223-225.
- [64]- Martinez-Cayuela M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochem*.77: 147-161.
- [65]- Hazout A., Menezo Y., Madelenat P., Yazbeck C., Selva J., Cohen-Bacrie P.. (2008). Causes et implications cliniques des altérations de l'ADN des spermatozoïdes. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 36, 1109–1117.
- [66]- Boyd B., Ford C., Koepke M.C., Gary K., Horn E., McAnalley S., and McAnalley B. (2003). Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. *Glycoscience & Nutrition*. 4 (6):7.(cited in Mohammedi Z, 2005).
- [67]- Gammoudia, A. Dandanaa, H. Chaheda, S. Ferchichia, S. Ernezb, A. Mileda. (2013). Évaluation des paramètres du stress oxydant chez des patients coronariens. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* : 28,; 39–42.
- [68]- Nkhili Zohra, (2009). Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interaction avec les ions du fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant, ; thèse Doctorat.
- [69]- 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.

- [70]- Afonso Valéry, Champy Romuald, Mitrovic Dragoslav, Collin Pascal, Lomri Abderrahim. (2007). Radicaux libres derives de l'oxygène et superoxydes dismutases: role dans les maladies rhumatismales,; 637-638.
- [71]- Arockiaraj Jesu, Easwvaran Sarasvathi, Vanaraja Puganeshwaran, Singh Arun, Goudable Joëlle, Favier Alain. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Métabol*,; 115-20.
- [72]- Goudable Joëlle, Favier Alain. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Mdtabol*; 11:115-20.
- [73]- Cholewa J., Poprzeczki S., Zajac A., Waskiewicz Z. (2008). Impact de la supplémentation en vitamine C sur les paramètres du stress oxydatif dans le sang des basketteurs d'élite lors d'un effort maximal, *Science & Sports* 23, ; 176–182. [74] - Kablan B.J, Adiko M, Abrogoua D.P. (2008). Evaluation *in vitro* de l'activité antimicrobienne de *Kalanchoe crenata* et de *Manotes longiflora* utilisées dans les ophtalmies en Côte d'Ivoire. *Phytothérapie*, 6: 282–288.
- [75] -Lock O, Cabello I, Doroteo V.H. (2006). Analysis of flavonoids in plants. *Current Medicinal Chemistry*, 20: 6-11.
- [76] -Qnais E.Y, Elokda A.S, Abu Ghalyun Y.Y et Abdulla F.A. (2007). Antidiarrheal Activity of the Aqueous Extract of *Punica granatum* (Pomegranate) Peels. *Pharmaceutical Biology*, 45(9): 715–720.
- [77] -Sudha S.S, Karthic R, Rengaramanujam J et Athulya. (2011). Antimicrobial activity of *Spirulina platensis* and *Aphanothece* sp. on selected clinical bacterial isolates and its Antioxidant activity. *South As. J.Biol.Sci*, 1(2): 87 – 98.
- [78] - Vermerius W and Nicholson R. (2006). Phenolic compound biochemistry. Springer, Dordrecht, ISBN:101- 4020-5163-8.
- [79]- Yakhlef ghania (2010). Etude de l'activite biologique des extraits de feuilles de *Thymus vulgaris*L. ET *Laurus nobilis*L. Mémoire de magister. Université Hadj Lakhdar Batna.
- [80]- Kumazawa, S., Hamasaka, T., & Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84, 329-339. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00216-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00216-4)
- [81]: Seyed Hosseine Zendehbad, Mohamed Javad , Sudhakar Malla (2014) Favonoids and phenolic content in wheat grass plant (*triticum aestivum*) Vol 7, Issue 4.
- [82]- Julkunen-Titto, R., (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 33, 213–217.
- [83]- Celiktas, O.Y., Hames Kocabas, E.E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Ozek, T., Baser, K.H.C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.*, 100: 553-559.

[84]- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technology* 1995; 28:25-30.

[85]- Seyed hossein zendehbad, Mohammad javad mehran, Sudhakar malla. (2014). flavonoids and phenolic content in wheat grass plant (*triticum aestivum*). *Asian J Pharm Clin Res*, Vol 7, Issue 4, 184-187.

[86]- Roukia Hammoudi, Karima Dehak, Mahfoud Hadj Mahammed et Mohammed Didi Ouldelhadj. (2015). Composition chimique et activité antioxydante des huiles essentielles dedeverra scopariacoss&dur.(apiaceae). *Lebanese Science Journal*, Vol. 16, No. 2,

[87]- Torres MA, Jones JD, Dangi JL (2006). Reactive oxygen species (Handling editor: Yong-Biao Xue) signaling in response to pathogens. *Plant Physiol* 141 , 373 – 378.

[89] Durling N. E., Catchpole O. J., Grey J. B., Webby R. F., Mitchell K. A., Foo L.Y. et Perry N. B., 2006. Extraction of Phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures. *Food Chemistry*. 5489, 1 - 30.

[90]Baskan S., Oztekin N., Erim B., 2007. Determination of carnosic acid and rosmarinic acids in sage by capillary electrophoresis. *Food Chemistry*. (101) 1748 - 1752.

[91]Népote, V., Grosso, N. R., et Guzmán, C. A., 2005. Optimization of extraction of phenolic antioxidants from peanut skins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 33–38.

[92]Ribéreau-Gayon P., 1968. Les composés phénoliques des végétaux. Ed: DUNOD, Paris, pp 173 - 201.

[93]Maisuthisakul P., Suttajit M., Pongsawatmanit R., 2007. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry* 100: 1409–1418.

[94]Chaira N., Ferchichi A., Mrabet A., Sghairoun M.,2007.Chemical Composition of the Flesh and the Pits of Date Palm Fruit and Radical Scavenging Activity of Their extracts. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10 (13): 2202-2207.

[95] Jiménez-Escrig A., Jiménez-Jiménez I., Sanchez-Moreno C., Saura-Calixto F., 2000. Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of Science of Food Agriculture*, 80: 1686-1690.



Annexe

Annexe

Annexe 01

Liste de matériel et réactifs nécessaire :

Les Réactifs	Qauntité	Verreries	Equipements et appareils
Ethanol 96%	1l	Béchers.	Broyeur
Chlorure de fer FeCl ₃ (5%).	5 g	Ballons à col rodé.	Balance
Réactif de folin-ciocalteau's	10 ml	Entonnoirs.	Verres de montre
Méthanol	1L	Fiole ombré.	Rota vapeur
carbonate de sodium Na ₂ CO ₃	10 g	Spatule, Baguettes.	. Etuve
fragments de magnésium		Pipettes graduées.	Plaque d'agitation
Acide chlorhydrique HCL	100ml	Erlenmeyer.	Barreaux magnétiques
trichlorure d'aluminium (AlCl ₃)	40 g	Micropipettes.	Bain marie
DPPH (Déphnyl picryl hydrazyle)	1g	Para film	vortex
Acide gallique	2 g	Tubes à essai	Spectrophotomètre
Vanilline	0,5 g	Papiers filtres circuler	
Vitamine C (acide ascorbique)	2 g	Seringue.	
		Eprouvettes.	

Annexe 02

➤ Dosage des polyphénols totaux

***Solution de carbonate de sodium**

-Mettre 2g de Na_2CO_3 dans 10ml d'eau distillée.

***Solution mère d'étalon (l'acide gallique)**

-Mettre 0.08g d'acide gallique dans une fiole de 100ml, puis Ajuster au trait de jauge avec l'eau distillée.

➤ Dosage des flavonoïdes

***Solution de trichlorure d'aluminium**

-Mettre 2g d' AlCl_3 dans 100 ml d'éthanol.

***Solution mère d'étalon(Quercitine)**

-Mettre 0.2g de Quercitine dans 100 ml d'éthanol.

➤ Dosage des tannins

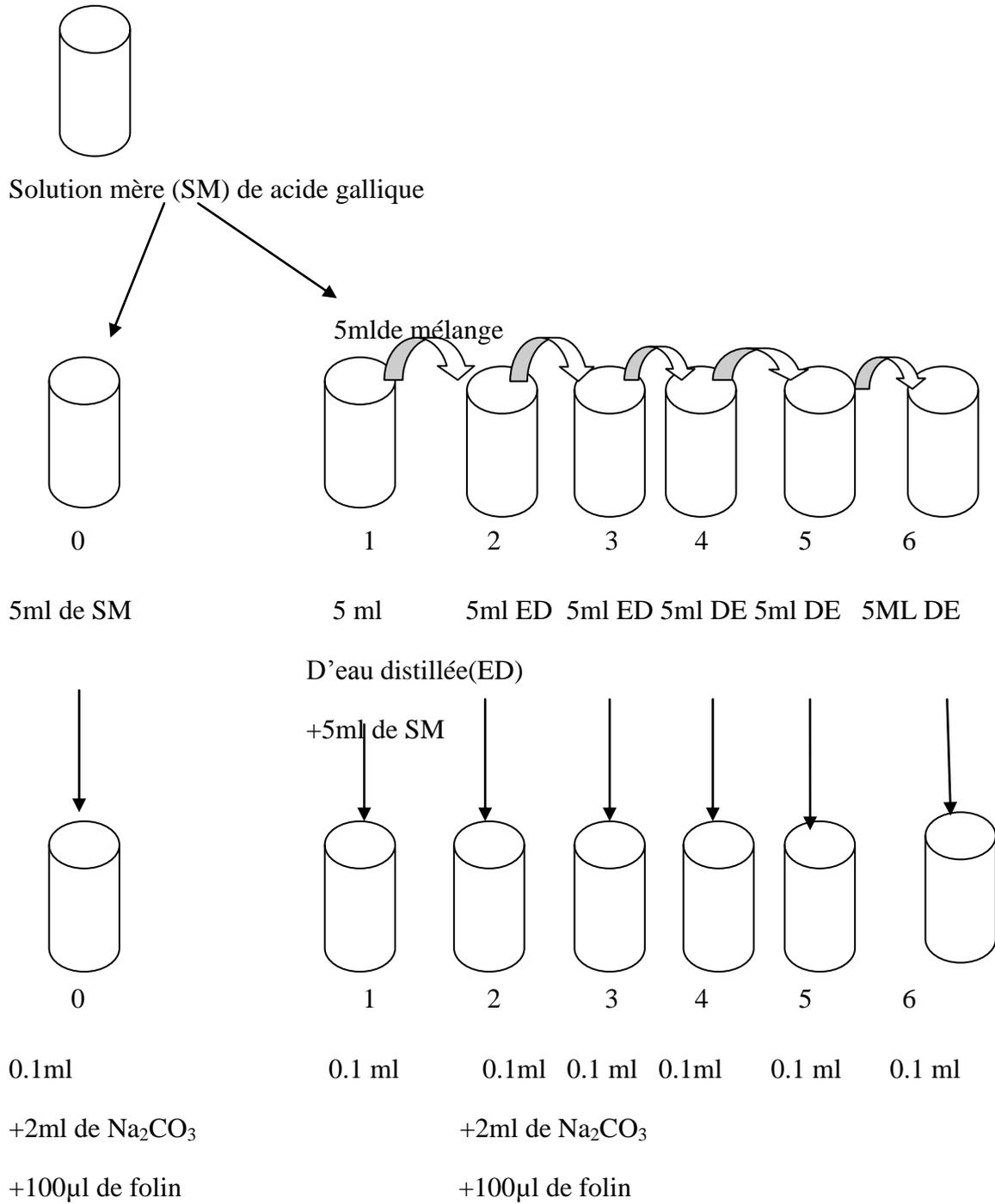
***solution mère d'étalon(Catéchine)**

-Mettre 0.01g de catéchine dans 100ml d'éthanol.

Annexe

Annexe 03

*la méthode de préparation de la gamme de dilution d'extrait de pour l'acide gallique.

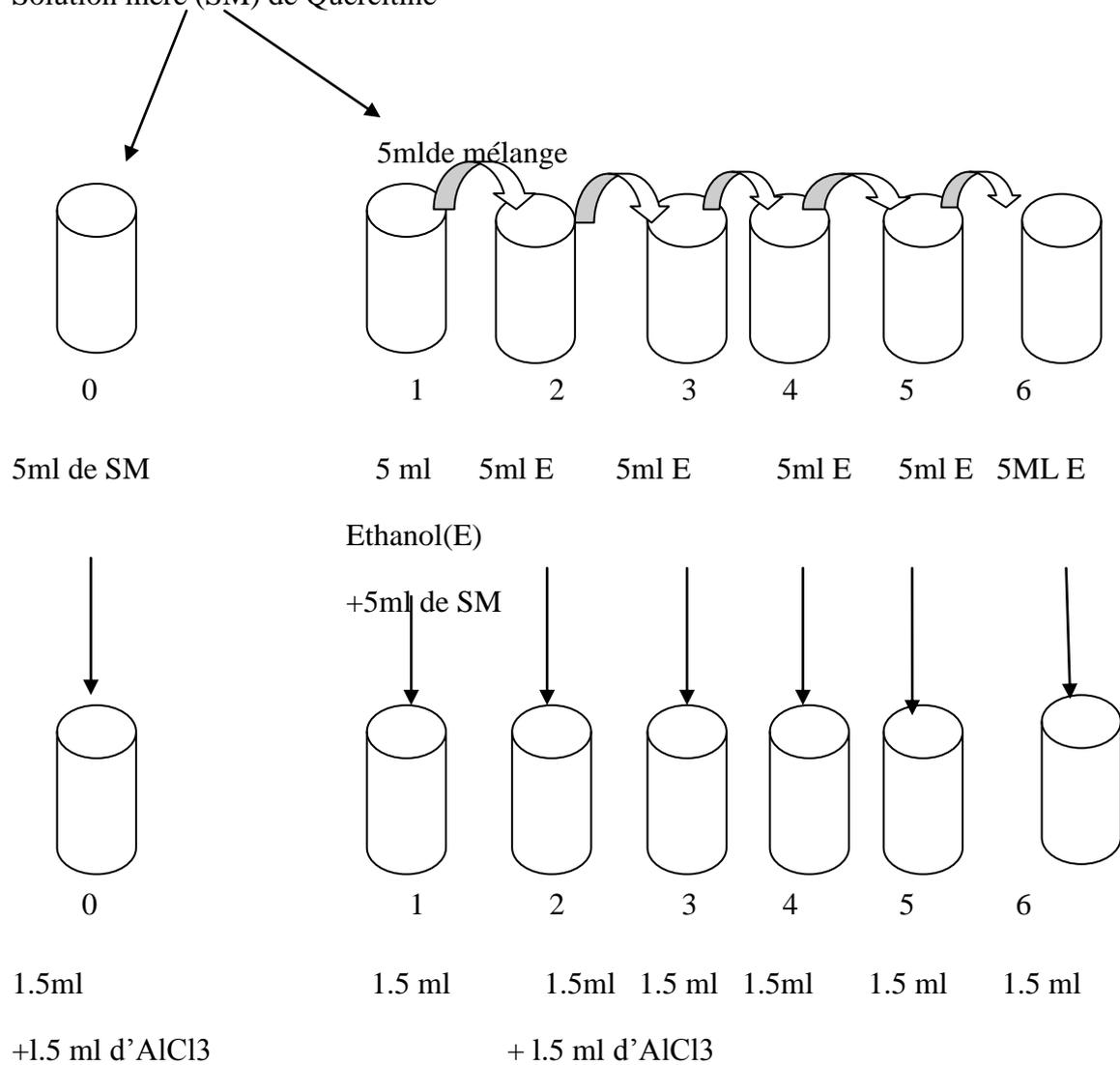


Annexe

Annexe 04

*méthode de préparation de la gamme de dilution d'extraits pour la Quercitine.

Solution mère (SM) de Quercitine

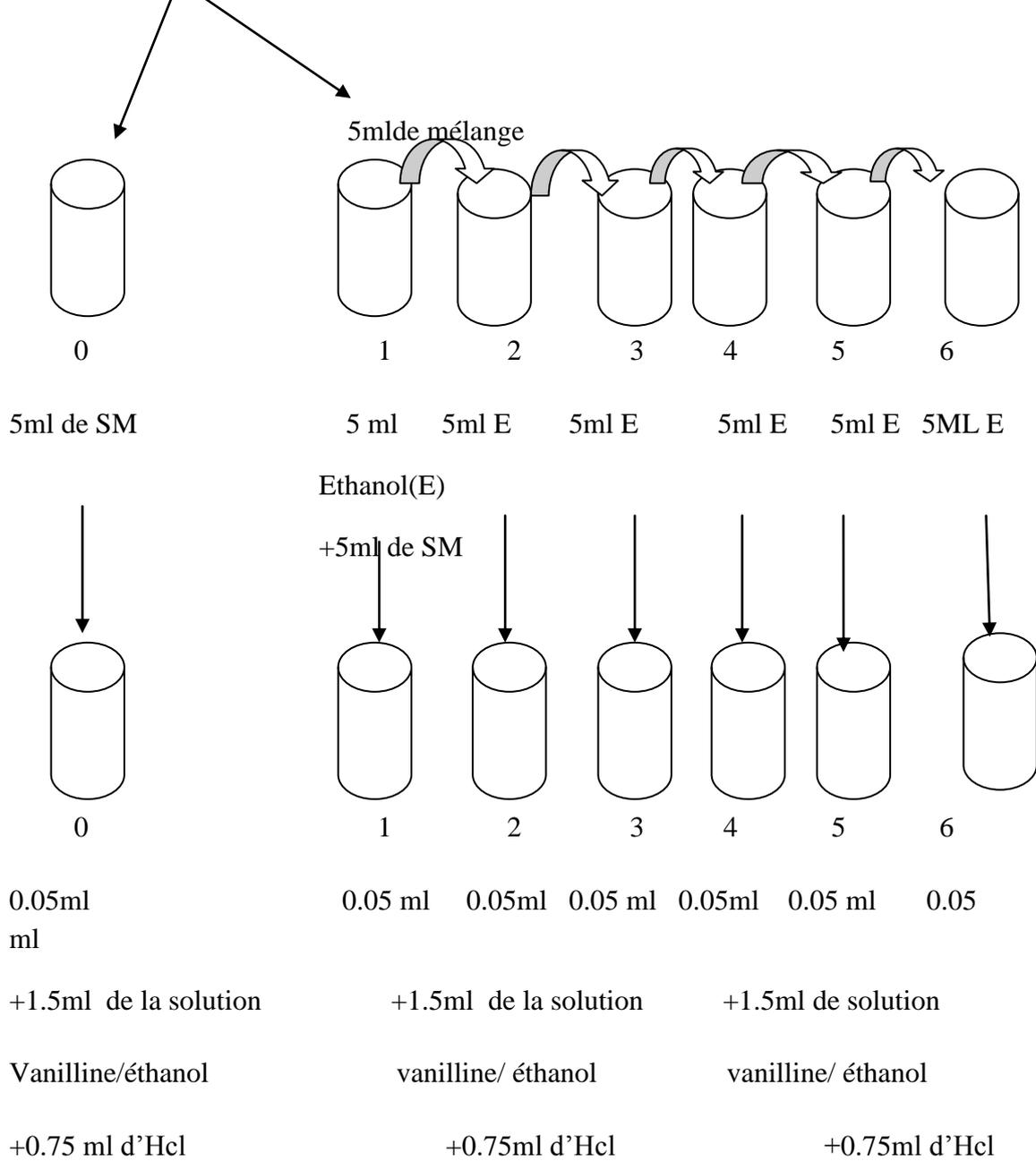


Annexe

Annexe 06

*méthode de préparation la gamme de dilution d'extrait pour la catéchine.

Solution mère (SM) de catéchine



Annexe



Agitateur



Vortex



Spectrophotomètre

Résumé

L'objectif de notre étude s'est focaliser à l'extraction et la caractérisation des métabolites secondaires de deux plantes médicinales *oléastre .L* et *buxus-dioicie .L* et voir de proche leur application à travers l'évaluation des leur activité antioxydante. Le travail à été commencé par une extraction sous reflux dans l'eau distillée. L'examen phytochimique qualitatif réalisé sur les feuilles de deux plantes a montré la présence des polyphénols ,des flavonoïdes et des tanins en quantité importante , pour la suite de l'étude phytochimique on a quantifier la teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins des deux extraits aqueux correspondants aux deux arbustes, L'extrait aqueux des deux plantes montre d'une part une richesse en métabolites secondaires suscités avec des valeurs de **186 µg EAG/1g** d'extrait et **38 µg EQ/1g** d'extrait et **0.23 µg EC /1g** d'extrait respectivement pour *oléastre .L* et **210 mg EAG/1g** d'extrait et **27 mg EQ/1g** d'extrait et **0.45 mg EC/1g** d'extrait respectivement pour *buxus-dioicie .L* . D'autre part Le pouvoir antioxydant qui a été évalué par la technique de piégeage du radical libre DPPH a été évalué également, et comparé à l'acide ascorbique. Parmi les deux extraits étudiés, l'extrait de l'*oléastre .L* qui a donné l'activité la plus élevée avec un pourcentage d'inhibition de 77 ,6 % par rapport a l'autre extrait. Tandis que l'extrait aqueux *de buxus-dioicie .L* a montré une capacité antioxydante inférieure de 35 ,61 %.

Mots clés : *oléastre* , *buxus-dioicie*, tests phytochimiques, dosages quantitatifs, activité antioxydante.

Abstract

The aim of our study was focused on the extraction and characterization of secondary metabolites of two medicinal plants: *oléastre .L* . and *buxus -dioicie L* and see their implementation through evaluation of their antioxidant activity. The work was started by extraction under reflux in distilled water. The qualitative phytochemical examination performed on the leaves of two plants showed the presence of polyphenols, flavonoids and tannins in large quantities, for the result of the phytochemical study was to quantify the total polyphenols, flavonoids and tannins, two aqueous extracts corresponding to the two bushes: The aqueous extract of both plants shows both a wealth of secondary metabolites raised with values of 186 mcg EAG / 1g extract and 38 micrograms EQ / 1g of extract and 0.23 EC mcg / 1g extract respectively for *oléastre .L* and EAG 210 mg / 1 g of extract and 27 mg EQ / 1g of extract and 0.45 mg EC / 1g extract respectively for *buxus-dioicie .L*. Moreover the antioxidant that has been assessed by trapping technique of free radical DPPH was also evaluated and compared to ascorbic acid. Among the two studied extracts, the extract of the *oléastre .L* who gave the highest activity with a percentage inhibition of 77, 6% compared to another sample. While *Buxus-dioicie .L* aqueous extract showed a lower antioxidant capacity of 35, 61%.

Keywords: *oléastre*, *Buxus-dioicie*, phytochemical tests, quantitative assays, antioxidant activity.

ملخص

الهدف من دراستنا استخراج وتوصيف المركبات الثانوية لاثنين من النباتات الطبية شجرة الزيتون البري و شجرة الكتم من خلال تقييم النشاط المضاد للأكسدة .وقد بدأ العمل عن طريق استخراج تحت الجزر في الماء المقطر .وأظهر الفحص الكيميائي النباتي النوعي الذي أجري على الأوراق وجود مادة البوليفينول، الفلافونويد والعفص بكميات كبيرة، و قد تم تحديد القيمة الكيميائية للبوليفينول الكلي، الفلافونويد والعفص للمستخلصات المائية و قد ظهر لنا أن لكل منها ثروة من المركبات الثانوية والتي تقدر ب 186 ميكروغرام / 1 EAG غ استخراج و 38 ميكروغرام مكافئ / 1 غ من استخراج و 0.23 EC ميكروغرام / 1 G استخراج التوالي ل *oléastre .L* و 210 EAG ملغ / 1 غرام من استخراج و 27 ملغ من مكافئ / 1 غ من استخراج و 0.45 ملغ EC / 1G استخراج التوالي ل *buxus-dioicie .L* .وعلاوة على ذلك فإن الأكسدة المضادة التي تم تقييمها من خلال محاصرة تقنية DPPH للجذور الحرة تم تقييم ومقارنة حامض الاسكوربيك .بين هذان العشبين، حيث أن المستخرج من *oléastre .L* أعطى أعلى نشاط مع تثبيط نسبة ال 77,60 % مقارنة مع عينة أخرى .في حين *Buxus-dioicie .L* أظهر المستخلص المائي القدرة المضادة للأكسدة أقل من 35,61 %.

الكلمات المفاتيح : *oléastre* :، *Buxus-dioicie*، اختبارات الكيميائي النباتي، المقاييسات الكمية، والنشاط المضادة للأكسدة .

Résumé

L'objectif de notre étude s'est focaliser à l'extraction et la caractérisation des métabolites secondaires de deux plantes médicinales *oléastre .L* et *buxus-dioicie .L* et voir de proche leur application à travers l'évaluation des leur activité antioxydante. Le travail à été commencé par une extraction sous reflux dans l'eau distillée. L'examen phytochimique qualitatif réalisé sur les feuilles de deux plantes a montré la présence des polyphénols ,des flavonoïdes et des tanins en quantité importante , pour la suite de l'étude phytochimique on a quantifier la teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins des deux extraits aqueux correspondants aux deux arbustes, L'extrait aqueux des deux plantes montre d'une part une richesse en métabolites secondaires suscités avec des valeurs de **186 µg EAG/1g** d'extrait et **38 µg EQ/1g** d'extrait et **0.23 µg EC /1g** d'extrait respectivement pour *oléastre .L* et **210 mg EAG/1g** d'extrait et **27 mg EQ/1g** d'extrait et **0.45 mg EC/1g** d'extrait respectivement pour *buxus-dioicie .L* . D'autre part Le pouvoir antioxydant qui a été évalué par la technique de piégeage du radical libre DPPH a été évalué également, et comparé à l'acide ascorbique. Parmi les deux extraits étudiés, l'extrait de l'*oléastre .L* qui a donné l'activité la plus élevée avec un pourcentage d'inhibition de 77 ,6 % par rapport a l'autre extrait. Tandis que l'extrait aqueux *de buxus-dioicie .L* a montré une capacité antioxydante inférieure de 35 ,61 %.

Mots clés : *oléastre* , *buxus-dioicie*, tests phytochimiques, dosages quantitatifs, activité antioxydante.

Abstract

The aim of our study was focused on the extraction and characterization of secondary metabolites of two medicinal plants: oléastre .L . and buxus -dioicie L and see their implementation through evaluation of their antioxidant activity. The work was started by extraction under reflux in distilled water. The qualitative phytochemical examination performed on the leaves of two plants showed the presence of polyphenols, flavonoids and tannins in large quantities, for the result of the phytochemical study was to quantify the total polyphenols, flavonoids and tannins, two aqueous extracts corresponding to the two bushes: The aqueous extract of both plants shows both a wealth of secondary metabolites raised with values of 186 mcg EAG / 1g extract and 38 micrograms EQ / 1g of extract and 0.23 EC mcg / 1g extract respectively for oléastre .L and EAG 210 mg / 1 g of extract and 27 mg EQ / 1g of extract and 0.45 mg EC / 1g extract respectively for buxus-dioicie .L. Moreover the antioxidant that has been assessed by trapping technique of free radical DPPH was also evaluated and compared to ascorbic acid. Among the two studied extracts, the extract of the oléastre .L who gave the highest activity with a percentage inhibition of 77, 6% compared to another sample. While Buxus-dioicie .L aqueous extract showed a lower antioxidant capacity of 35, 61%.

Keywords: oléastre, Buxus-dioicie, phytochemical tests, quantitative assays, antioxidant activity.

ملخص

الهدف من دراستنا استخراج وتوصيف المركبات الثانوية لاثنتين من النباتات الطبية شجرة الزيتون البري و شجرة الكتم من خلال تقييم النشاط المضاد للأكسدة .وقد بدأ العمل عن طريق استخراج تحت الجزر في الماء المقطر .وأظهر الفحص الكيميائي النباتي النوعي الذي أجري على الأوراق وجود مادة البوليفينول، الفلافونويد والعفص بكميات كبيرة، و قد تم تحديد القيمة الكيميائية للبوليفينول الكلي، الفلافونويد والعفص للمستخلصات المائية و قد ظهر لنا أن لكل منها ثروة من المركبات الثانوية والتي تقدر ب 186 ميكروغرام / 1 EAG غ استخراج و 38 ميكروجرام مكافئ / 1 غ من استخراج و EC 0.23 ميكروغرام / 1 G استخراج التوالي ل oléastre و EAG 210 ملغ / 1 غرام من استخراج و 27 ملغ من مكافئ / 1 غ من استخراج و 0.45 ملغ EC / 1 G استخراج التوالي ل L. *buxus-dioicie*. وعلاوة على ذلك فإن الأكسدة المضادة التي تم تقييمها من خلال محاصرة تقنية DPPH للجذور الحرة تم تقييم ومقارنة حامض الاسكوربيك .بين هذان العشبين،حيث أن المستخرج من oléastre أعطى أعلى نشاط مع تثبيط نسبة ال 77,60 ٪ مقارنة مع عينة أخرى .في حين L. *Buxus-dioicie* أظهر المستخلص المائي القدرة المضادة للأكسدة أقل من 35,61٪.

الكلمات المفاتيح : oléastre : Buxus-dioicie ، اختبارات الكيميائي النباتي، المقاييسات الكمية، والنشاط المضادة للأكسدة