

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de L'enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

Université Abbes Laghrou-KHENCHELA

Faculté de Science de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de master académique

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée



Thème

*Evaluation de l'activité biologique de l'extrait
méthanolique de
« Juniperus phoenicea »*

Présenté par :

KALKOUL Souad

MOUHOUBI Meryem

Soutenu le : 20 /06/2018

Membres du jury :

Président : M^{me} BOUAKKAZ Amel

MCB Univ. Khenchela

Promoteur : M^f HABIBATNI Sofiane

MAA Univ. Khenchela

Examineur : M^{me} DJEMIL Randa

MCB Univ. Khenchela

Promotion : 2017/2018

Laboratoire où le travail a été réalisé :

Laboratoire de l'université Abbes Laghrou-Khenchela

CRBT (Centre de Recherche en Biotechnologie) Constantine



Remerciements



A l'aide de dieu tout puissant, qui nous a aidé à compléter ce modeste travail.

Au terme des années de préparation de mémoire de master, nous tenons à remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont contribué à

l'aboutissement de ce travail :

Nous remercions également M. Habibatni Sofiane pour la qualité du sujet, son support et les orientations durant toute la réalisation de ce mémoire par ses conseils qui nous ont appris la patience.

À « M^{me} Bouakkaz Amel » de bien vouloir présider ce jury et d'examiner ce travail.

À « M^{me} Djemil Randa » d'avoir accepté examiner et juger ce travail.

Nous remercions Dr Bensouici Chawki de nous avoir accueillies dans CRBT, pour sa gentillesse et bienveillance.

Merci à tous les gens qui nous a aidés de près ou de loin.

A bouquet of pink tulips is positioned on the left side of the page. In the foreground, two cupcakes are displayed on a white surface. The cupcake on the left is decorated with green frosting and a yellow flower-like center. The cupcake on the right is decorated with purple and pink frosting and yellow centers. The background is a soft, light-colored gradient.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A mes Parents

A toute ma famille

A tous mes amis

Souad

A bouquet of pink tulips is positioned on the left side of the page. In the foreground, two cupcakes are displayed on a white surface. The cupcake on the left is decorated with green frosting and a yellow flower. The cupcake on the right is decorated with purple and pink frosting and a yellow flower. The background is a soft, light-colored gradient.

Dédicace

**Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds, Je
dédie ce modeste travail :**

**A mes parents pour leur amour, leur confiance, leur
encouragement et leur soutien tout le long de mes études**

A mes Frères et sœurs et leurs familles

A mes amis

A tous ceux qui m'aiment

Meryem

Résumé

Ce travail a porté sur l'étude phytochimique, l'évaluation des activités antioxydantes de la plante *Juniperus phoenicea* utilisée en médecine traditionnelle.

J.phoenicea est surtout utilisée comme parasiticide, cicatrisant contre les abcès, la bronchite, certains cas d'eczéma, diarrhée, rhumatisme, affections des voies urinaires, dermatoses, névralgies dentaires et de traiter les angines. L'étude phytochimique des feuilles de la plante a révélé la présence des métabolites secondaires notamment ; des polyphénols, des flavonoïdes, des coumarines, des tanins, des terpénoïdes et des composés réducteurs. Les dosages quantitatifs de deux extraits (acétate et méthanol) des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu ont été révélés des teneurs $95,33 \pm 0,03$ et $11 \pm 0,018$ mg EAG/mg respectivement, et le dosage des flavonoïdes par la méthode d'Al $(NO_3)_3$ a indiqué les valeurs $0,187 \pm 0,06$ et $2,937 \pm 0,031$ mg EQ/mg respectivement. L'activité antioxydante des feuilles de la plante avec le test DPPH de l'extrait d'acétate et méthanolique a montré des valeurs intéressantes, en particulier celui de la phase acétate, avec des IC_{50} sont $4,15$ et $52,19$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Avec le test de réduction du radical cation $ABTS^+$, la phase acétate et méthanolique ont affichés des valeurs d' IC_{50} de $9,39$ et $35,21$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Tandis qu'en ce qui concerne le test de CUPRAC de la phase acétate et méthanolique, leurs $A_{0,50}$ égales à $15,15$ et $29,50$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Le test du pouvoir réducteur de la phase acétate, et celui de la phase méthanolique, a montré des $A_{0,50}$: $104,69$ et $41,94$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Ces résultats peuvent être considérés comme point de départ pour des applications thérapeutiques et justifiés leur utilisation traditionnelle.

Mots-clés : *Juniperus phoenicea*, activité antioxydante, méthanol, acétate, métabolites secondaires.

Abstract

This work is concerned about the phytochemical screening and evaluation of the antioxidant activities of the plant *Juniperus phoenicea* used in traditional medicine.

J.phoenicea is used particularly for the treatment of abscess, bronchitis, certain cases of eczema, diarrhea, rheumatism, urinary tract diseases, dermatosis, dental neuralgia. The phytochemical screening of the plant leaves revealed the presence of secondary metabolites in particular, polyphenols, flavonoids, coumarins, tannins, terpenoids and reducing compounds. The quantitative dosages of two extracts (acetate and methanol) of total polyphenols by the Folin-Ciocalteu's method revealed $95,3\pm 0,03$ and $11\pm 0,018$ mg EAG/mg contents, respectively, and the dosage of flavonoids by $Al(NO_3)_3$ method indicated $0,187\pm 0,06$ and $2,937\pm 0,031$ mg EQ/mg values, respectively. The antioxidant activity of the plant leaves by DPPH assay of acetate and methanolic extract demonstrated significant values, notably that of the acetate phase, with IC_{50} of 4,15 and 52,19 $\mu\text{g/ml}$, respectively. By $ABTS^+$ assay, the acetate and methanolic phase indicated IC_{50} values of 9,39 and 35,21 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Whereas regarding the CUPRAC assay of the acetate and methanolic phase showed $A_{0,50}$ equal to 15, 15 and 29, 50 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The test of the reducing power of the acetate phase followed by the methanolic phase, showed $A_{0,50}$: 104,69 and 41,94 $\mu\text{g/ml}$, respectively. These findings can constitute a starting point for therapeutic applications and justified their traditional use.

Keywords: *Juniperus phoenicea*, antioxidant activity, methanol, acetate, secondary metabolites.

المخلص

من خلال هذا العمل تطرقنا إلى الدراسة الكيمياء النباتية و تقييم الأنشطة المضادة للأوكسدة لنبتة *Juniperus phoenicea* المستعملة في الطب التقليدي.

هذه النبتة تستعمل خاصة كمبيد طفيلي ، تضميد الجراح و ضد الخراجات، والتهاب الشعب الهوائية ، وبعض حالات الأكزيما، الإسهال، الروماتيزم، أمراض المسالك البولية، الأمراض الجلدية والألم العصبي للأسنان؛ علاج التهاب اللوزتين . كشفت عن وجود الأيضات الثانوية بشكل خاص : البوليفينول، الفلافونويد، الكومارين، التانينات، التيربينات والمركبات الرجعية. التقديرات الكمية للبوليفينول الاجمالي بطريقة-Ciocalteu Folin لمستخلصي الاسيتات والميثانول أعطت القيم mg 95.33 ± 0.03 EAG/mg و 11 ± 0.018 mg EAG/mg على التوالي، و تقدير الفلافونويد بطريقة $AL(NO_3)_3$ أشارت إلى القيم التالية 0.187 ± 0.06 mg EQ/mg و 2.937 ± 0.031 mg EQ/mg على التوالي. أظهر النشاط المضاد للأوكسدة لأوراق النبتة مع اختبار DPPH لمستخلص الأسيتات والميثانول قيماً مهمة ، خاصة في طور الأسيتات ، مع قيم IC_{50} هي 4.15 و 52.19 ميكروغرام / مل على التوالي. اختبار ABTS لطوري الأسيتات والميثانول كشف عن قيم IC_{50} هي 9.39 و 35.21 ميكروغرام / مل على التوالي. و فيما يتعلق باختبار CUPRAC لمستخلصي الأسيتات والميثانول ، فوجد أن $A_{0.50}$ يساوي 15.15 و 29.50 ميكروغرام / مل على التوالي. أما فيما يتعلق باختبار القدرة الإرجاعية لطور الأسيتات ، متبوعة بطور الميثانول ، فإن قيم $A_{0.50}$ كانت كالتالي 104.69 و 41.94 ميكروغرام / مل على التوالي. هذه النتائج يمكن اعتبارها كنقطة انطلاق للتطبيقات العلاجية و تبرير استخداماتها التقليدية.

الكلمات المفتاحية: *Juniperus phoenicea* ، نشاط مضاد للأوكسدة ، ميثانول ، أسيتات ، الأيضات الثانوية.

Abréviations

ABTS	Acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
AlNO ₃	Nitrate d'aluminium
BHA	Hydroxyanisol butylé
BHT	ButylHydroxytoluène
CH ₃ COOK	Acétate de potassium
DPPH	2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl
EAG	Equivalents d'acide galique
Eb	Extrait brute
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétra-acétique
EQ	Equivalents quercétine
FCR	Réactif de Folin Ciocalteu
FeCl ₃	Chlorure de fer
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
HCl	Acide chlorhydrique
HE	Huile essentiel
IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane
J.P	Juniperus phoenicea
MeOH	Méthanol
Na ₂ CO ₃	Carbonate de sodium
nd	Non déterminé
NH ₄ OH	Hydroxyde d'ammonium
Qté	Quantité
Sm	Solution mère
TFC	Total flavonoïd content
TPC	Total phenolic content
UV	Ultra violet

Liste des figures

Figure 01	Photo de <i>J.phoenicea</i> (photo originale)	3
Figure 02	A: Feuilles et fruits de <i>J.phoenicea</i> immatures B: Feuilles et fruits de <i>J.phoenicea</i> matures	5
Figure 03	Carte chronologique pour la distribution de <i>J.phoenicea</i>	6
Figure 04	Molécule d'isoprène	8
Figure 05	Phénol	10
Figure 06	Exemple de quelques acides phénols de la série benzoïque	11
Figure 07	Exemple de quelques acides phénols de la série cinnamique	12
Figure 08	Quelques tanins hydrolysables représentatifs	13
Figure 09	Quelques proanthocyanidines sélectionnés	13
Figure 10	Structure générale des coumarines	14
Figure 11	Structure générale des flavonoïdes	15
Figure 12	Schéma simplifié de la biosynthèse de différentes classes de flavonoïdes	15
Figure 13	Effet des radicaux libres sur les membranes cellulaires	18
Figure 14	Effets des rayonnements ionisants sur l'ADN	19
Figure 15	Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants	20
Figure 16	L'intérêt de vitamine E et C	23
Figure 17	A- Feuilles fraîches ; B- Feuilles sèches ; C- Poudre	24
Figure 18	Préparation de l'extrait méthanolique (A- Macération 24h ; B- Filtration ; C-Evaporation au Rotavapeur (40°C))	25
Figure 19	Protocole de préparation de l'extrait méthanolique de la plante <i>J.phoenicea</i> par macération	26
Figure 20	Appareil de soxhlet	27
Figure 21	Schéma d'un appareil de soxhlet	27
Figure 22	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique en µg/ml	36
Figure 23	Teneur en polyphénols totaux (mg EAG/mg)	36
Figure 24	Courbe d'étalonnage de la quercétine en µg/ml	37
Figure 25	Teneur en flavonoïdes totaux (mg EQ/mg)	38
Figure 26	Les tests d'activité antioxydante de l'extrait méthanolique	38
Figure 27	Les tests d'activité antioxydante de l'extrait acétate	39

Liste des tableaux

Tableau 01 : Tableau de la situation botanique de <i>J.phoenicea</i>	4
Tableau 02 : Classification des flavonoïdes	16
Tableau 03 : Tableau récapitulatif regroupant les rendements de deux extraits	34
Tableau 04 : Résultat des tests phytochimiques de différents extraits <i>J.phoenicea</i>	35
Tableau 05 : Résultats des tests d'activité antioxydante	40

Table des Matières

Résumé.....	I
Abstract.....	II
المخلص.....	III
Liste des abréviations.....	IV
Liste des figures.....	V
Liste des tableaux.....	VI
Table des Matières.....	VII
Introduction.....	1
CHAPITRE I : Généralité sur la plante étudiée	
I- Définition	3
II- Habitation	3
III- Systématique de la plante	4
IV- Description botanique	4
V- Distribution géographique	5
VI- Propriétés biologiques	6
VII- Toxicité	7
CHAPITRE II : Les métabolites secondaires	
I- Les métabolites secondaires	8
I-1- Les huiles essentielles	8
I-2- Les terpènes	8
I-3- Les polyphénols	9
3-1- Propriétés biologique	9
3-2- La biosynthèse	10
3-3- Classification des polyphénols	11
3-3-1- Les flavonoïdes	11
3-3-2- Les anthocyanes	11
3-3-3- Les flavanes	11
3-3-4- Les acides phénols	11
3-3-5- Autres polyphenols	12
I-4- Les tannins	12

4-1- Les tannins hydrolysables	12
4-2- Les tannins condensés	12
I-5- Les coumarines	14
I-6- Les flavonoïdes	14
6-1- Structure des flavonoïdes	14
6-2- Classification des flavonoïdes	16
CHAPITRE III : L'activité antioxydant	
I- Généralité	18
II-1- Définition de l'oxydation	18
II-2- Les mécanismes de l'oxydation	19
III- L'activité antioxydant et le stress oxydatif	20
III-1- Stress oxydatif	20
III-2- Inflammation aiguë	20
III-3- Inflammation chronique	21
IV- Les antioxydants	21
IV-1- Les antioxydants primaires	22
IV-2- Les antioxydants secondaires	22
IV-3- Les antioxydants naturels	23
CHAPITRE IV : Matériels et méthodes	
I- Matériels	24
I-1- Matériel végétal	24
I-2- Produits utilisées	24
I-3- Appareillage	25
II- Méthodes	25
II-1- Extraction	25
II-1-1- Extraction par macération	25
II-1-2- Extraction par soxhlet	27
II-2- Calcul du rendement	28
II-3- Screening chimique	28
II-3-1- Les flavonoïdes : test de Shinoda	28
II-3-2- Test des tanins	28
II-3-3- Test des coumarines	28

II-3-4- Les alcaloïdes : test de Mayer	29
II-3-5- Test des terpénoïdes	29
II-3-6- Test des saponines	29
II-3-7- Test des composés réducteurs	29
II-3-8- Test des composés phénoliques	29
II-4- Dosages	29
II-4-1- Dosage du Total Phénolique	29
II-4-2- Dosage du total Flavonoïdes	30
II-5- Activité antioxydante	30
II-5-1- Test du DPPH radical libre	30
II-5-2- Test ABTS scavenging activity	31
II-5-3- Test du CUPRAC (Cupric reducing antioxidant capacity)	32
II-5-4- Test du pouvoir réducteur	32
CHAPITRE V : Résultats et Discussion	
I- Rendements des extraits	34
II- Tests phytochimiques	34
III- Dosages	35
III-1- Dosage des polyphénols	35
III-2- Dosage des flavonoïdes	37
IV- L'activité antioxydante	38
IV-1- L'extrait méthanolique	38
IV-2- L'extrait acétate	39
V- Discussion	41
Conclusion	44
Perspective	46
Références bibliographiques	47
Annexe.....	
Glossaire.....	

Introduction

Les plantes médicinales étaient les seules sources de guérison des maladies, comme l'ont relaté Ibn-Sina dans son livre « Le canon de la médecine » et autres médecins du moyen-âge. Les connaissances que possède l'homme dans cette partie de la botanique n'ont pas été acquises sans dangers (**Beloued, 2001**). Sur le plan de la biodiversité floristique, les plantes sauvages d'Afrique du nord représentent une valeur potentielle d'utilisation en médecine, agronomie, santé animale et biotechnologie végétale (**Kaabèche, 2013**).

Certains remèdes chimiques synthétiques possèdent des effets secondaires néfastes sur le corps humain ; pour cela, les recherches scientifiques modernes intéressées par les plantes médicinales sont en cours pour produire des médicaments efficaces, tout en ayant le minimum d'incidences indésirables (**Boutiti, 2010**).

Les plantes, avec leur nombre illimité, constituent un réservoir immense de nouveaux composés médicinaux potentiels, grâce à leurs molécules qui présentent l'avantage d'une grande diversité de structure chimique et activités biologiques. Les plantes aromatiques sont caractérisées par leur richesse en principes actifs et en substances telles que les polyphénols, flavonoïdes,...etc, qui sont dotées des propriétés importantes et différentes (**Madi, 2010**).

Notre présent travail se concerne les tests phytochimiques et l'évaluation de l'activité antioxydante de *Juniperus phoenicea*, plante commune dans la région de Khenchela.

La présentation de notre travail se répartit comme suit:

- **La première partie** comprend trois chapitres dont

Le premier chapitre est consacré à une présentation botanique de l'espèce *J.phoenicea* et ses propriétés biologiques.

Le deuxième chapitre met le point sur quelques métabolites secondaires, leurs structures et ses propriétés biologiques.

Le troisième chapitre aborde l'activité antioxydante et le stress oxydant.

- **La seconde partie** comprend une partie expérimentale traitant deux chapitres :
- Dans le premier chapitre, sera réservé au matériel et méthodes et l'étude phytochimique.
- Dans le deuxième chapitre, nous évaluerons la capacité antioxydante des extraits de la plante.
- Nous terminons par une conclusion, synthèse globale des résultats obtenus et les recommandations.

I- Définition

Juniperus phoenicea, appartient à la famille (Cupressacées), est un arbre monoïque ou rarement dioïque pouvant atteindre huit mètres de hauteur. Son aire de répartition couvre l'ensemble de la région méditerranéenne (Mansouri et al., 2011). Et il est vrai que, croquées crues, les petites baies du genévrier sont amères. Également nommé genévrier rouge ou mourven, *J. phoenicea* ne fait référence qu'indirectement à la Phénicie, région du Liban, en raison du « rouge phénicien » de ces fruit (Vignes et Vignes, 2007). Appelé aussi Genévrier de Lycie, « Zimba » en chaoui ou « ara'ar » et Arar lahmar en Algérie (Hlimi, 1997).



Figure 01 : Photo de *J. phoenicea* (photo originale).

II- Habitation

Le Genévrier de Phénicie habite les garrigues les plus pauvres et retrouvé souvent dans les rochers, dans les anfractuosités des falaises calcaires ou ses boules vertes défient pendant des siècles l'ensoleillement le plus fou et l'aridité quasi absolue. Ne le rencontre pas partout dans la région de l'Olivier : abondant en basse Provence et dans le Languedoc, il est moins abondant en altitude et accompagne rarement l'Oxycèdre en haute Provence. Il a cependant quelque station rupestre privilégiée dans le Dauphiné, dans les causses et jusque dans l'est des basses-Pyrénées. Le Genévrier de Phénicie est commun en Corse, aux basses altitudes. Il croît dans toute la région méditerranéenne d'Europe, sans s'éloigner beaucoup des côtes, en Afrique du nord sur les dunes littorales et dans les montagnes arides jusqu'à 2200 m (Lieutaghi, 2004).

III- Systématique

La situation botanique de l'espèce *J.phoenicea* L est, selon (Teibi, 1992 ; Adams, 2004), illustrée dans le tableau qui suit :

Règne	Plantae
Division	Pinophyta
Classe	Pinopsida
Ordre	Pinales
Famille	Cupressaceae
Genre	<i>Juniperus</i>
Espèce	<i>Juniperus phoenicea</i>

IV- Description botanique

Les feuilles sont toutes ou presque squamiformes (de 0.7 à 1 mm), ovales ou rhomboïdales, obtuses, convexes, sillonnées sur le dos, glanduleuses et de couleur vert foncé (Abdelli, 2017).

Elles sont non articulées, groupées par trois et étroitement imbriquées les unes sur les autres sur 4 ou 6 rangées faisant corps avec le rameau, tandis que l'espèce Sabine et le Savinier ont des feuilles aigues (Abdelli, 2017 ; Fournier, 2010).

Les rameaux du genévrier sont beaucoup plus grêles et ses fruits sont rouge roussâtre. Le Genévrier est un arbuste buissonnant de 1m à 1.50m, dès fois peut atteindre 2 à 8m. Sa floraison est entre le mois de février et mars et la maturation des ses fruits après deux ans au mois d'automne (Fournier, 2010).

Les fleurs mâles et les fleurs femelles sont souvent réunies sur les mêmes pieds (rarement sur des individus différents). Les premières forment de très nombreux petits chatons ovales ou arrondis, munis d'écailles pédicellées, portés sur de courts pédoncules feuillés et disposés latéralement le long des rameaux. Les fleurs femelles sont beaucoup moins nombreuses, leurs écailles sont épaisses, aigues et disposées sur 4 rangs. La floraison s'étend de février à avril et finit par produire de fausses baies sphériques rouge sombre à maturité (Abdelli, 2017).

Les fruits, improprement qualifiés de baies, sont d'abord de couleur verte virant au brun rouge luisant à maturité (au bout de 2 ans), de forme globuleuse et charnue, d'un diamètre de 7 à 10 mm, à surface irrégulière. Leur chair est ferme, sèche, fibreuse, jaune

teinté de vert puis de brun, à odeur forte et contenant de 4 à 9 graines ovales, aux extrémités aigues avec une enveloppe dure. La période de fructaison a lieu de septembre à décembre (Abdelli, 2017).

Longévité

Jusqu'à 1000 ans (la croissance est très lente) (Abdelli, 2017).

**(A)****(B)**

Figure 02 : A : Feuilles et fruits de *J.phoenicea* immatures (Site web 1).

B : Feuilles et fruits de *J.phoenicea* matures (Nedjimi et al., 2015).

V- Distribution géographique

J.phoenicea est distribué dans toute la région méditerranéenne où il pousse dans les endroits rocaillieux : Algérie, Tunisie, Maroc, Libye, France, Italie, Espagne, Turquie, Grèce, Albanie, Egypte (sinai), chypre, et au Liban.il pousse également en Roumanie, Portugal, Allemagne, Andorre, Bulgarie, Bosnie-Herzégovine, Croatie, Jordanie, Arabie Saoudite (le long de la mer rouge), et au Macaronésie (iles Canaries et de Madère Arquipelago) (Adams et al., 2002).

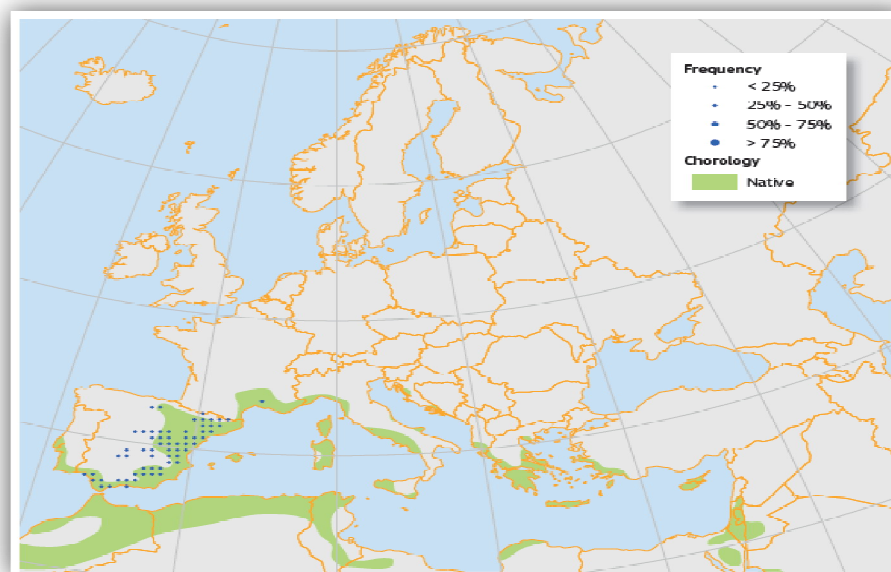


Figure 03 : Carte chorologique pour la distribution de *J.phoenicea*
(Caudullo et de Rigo, 2016).

VI- Propriétés biologiques

Cette espèce est très utilisée en médecine traditionnelle, les feuilles sont utilisées sous forme de décoction pour soigner le diabète, diarrhée et rhumatisme alors que les fruits séchés sont réduits en poudre peuvent guérir les ulcérations de la peau et les abcès (Akrouf, 2004).

Des études ont montré que cette espèce possède des activités diurétique, antiseptique pulmonaire et antidiabétique (Gérard, 2014).

D'autres ont montré qu'elle possède des fonctions viscérales stomachique, dépuratif, sudorifique, recommandé en cas de lassitude générale, d'affections des voies urinaires, des calculs urinaires, de goutte, de rhumatismes, parasiticide, antiseptique, cicatrisant, séquelle de paralysie, dermatoses, névralgies dentaires. Aussi elle permet de traiter les angines et certains cas d'eczéma (Ali-Delille, 2013).

Autre étude montrée qu'elle est utilisée à l'état vapeur pour la bronchite et le contrôle de l'arthrite, son huile est irritante pour les microbes (Derwich et al., 2010).

Les feuilles *J.phoenicea* sont utilisées pour traiter les diarrhées les rhumatismes et le diabète (**Bellakhder, 1997 ; Allali et al., 2008**).

Le mélange de feuilles et de baies de cette plante est utilisé comme agent hypoglycémiant (**Amer et al., 1994**).

VII- Toxicité

L'abus des baies de genièvre peut provoquer l'irritation des voies urinaires. Leur usage est à proscrire en cas de grossesse, d'infection ou d'insuffisance rénale. Les huiles essentielles à savoir ; sabinol, pinène, géraniol, camphène, citronelol, semblent être toxique à des doses élevées (**Debuigne et Couplan, 2009**).

Selon la littérature, cette espèce possède diverses activités biologiques, ces activités sont justifiées par la présence de métabolites secondaires appartenant à diverses classes notamment les polyphénols, flavonoïdes, terpénoïdes, coumarines, composés réducteurs, tanins...etc. C'est pour cette raison nous avons choisi cette espèce.

I- Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques variés (alcaloïdes, terpènes, composés phénoliques...) qui sont très inégalement repartis chez les végétaux mais dont le niveau d'accumulation peut quelquefois atteindre des valeurs élevés. La notion de métabolites secondaires résultait initialement de trois groupes d'observations : d'abord une difficulté à attribuer à ces métabolites une fonction précise dans la physiologie même de la plante, ensuite une répartition très inégale selon les végétaux, quelquefois entre des espèces ou variétés à l'intérieur d'une même espèce, une certaine inertie biochimique car ces substances sont rarement remobilisées dans la plante après qu'elles y ont été accumulées (Macheix *et al.*, 2005 ; Ngene *et al.*, 2015).

1- Les huiles essentielles

Les huiles essentielles appelées aussi essences ou huiles volatiles (Bruneton, 2009). Elles sont extraites des plantes par distillation, comptent parmi les plus importants principes actifs des plantes (Iserin, 2008).

2- Les terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à cinq atomes de carbone (C_5H_8).

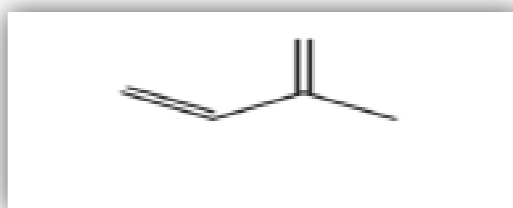


Figure 04 : Molécule d'isoprène (Randrianarivelo, 2010).

Les terpènes sont subdivisés selon le nombre d'unités isopréniques en :

Les hémiterpènes: ($n=1$, C_5H_8), les monoterpènes ($n=2$, $C_{10}H_{16}$), les sesquiterpènes: ($n=3$, $C_{15}H_{24}$), les diterpènes: ($n=4$, $C_{20}H_{32}$), les sesterpènes: ($n=5$, $C_{25}H_{40}$), les triterpènes: ($n=6$, $C_{30}H_{48}$), les tétraterpènes: ($n=8$, $C_{40}H_{64}$) et les polyterpènes: (n unités isopréniques) (Randrianarivelo, 2010).

Les monoterpènes et les sesquiterpènes sont les plus courants dans les huiles essentielles car leur masse moléculaire faible permet leur incorporation dans la fraction volatile que constitue l'huile essentielle (**Randrianarivelo, 2010**).

Des diterpènes sont rencontrés plus rarement lorsque l'hydrodistillation est longue. Au-delà, les composés ne sont plus considérés comme volatils. La diversité des structures observées s'explique par la haute réactivité des carbocations (ion carbone) impliquées dans les processus biosynthétiques. Globalement, on y retrouve monoterpènes et sesquiterpènes acyclique, monocyclique, bicyclique ou tricyclique issus de réarrangement complexes du squelette hydrocarboné, des réactions de fonctionnalisation ultérieures, conduisant à des molécules généralement intéressantes sur le plan olfactif et même biologique tels que des alcools, aldéhydes, cétones esters, éthers, peroxydes, phénols (**Randrianarivelo, 2010**).

3- Les polyphénols

Les polyphénols sont synthétisés par les plantes et constituent un groupe important de substances naturelles présentes dans le règne végétal. Les scientifiques en ont identifié plus de 8000 (**Massaux, 2012**). L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction éther, ester, hétéroside (**Bruneton, 2009**).

Il existe une très grande variété de phénols, de composés simples comme l'acide salicylique, molécule donnant par synthèse l'aspirine, à des substances plus complexes comme les composés phénoliques auxquels sont rattachés les glucosides.

Les plantes produisent ces métabolites dans le but de se protéger contre les infections et les insectes phytophages. Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires. De plus, ils peuvent avoir des propriétés antivirales (**Iserin, 2008**).

3-1- Propriétés biologique

Les cellules végétales répondent aux stimuli environnementaux en synthétisant des métabolites secondaires tels que les polyphénols qui peuvent les protéger contre les agresseurs. Lorsque la plante est blessée, des composés phénoliques et phénol simple sont synthétisés et l'activité peroxydasique caractéristique des tissus en voie de lignification est stimulée. Ces réactions aboutissent à la formation, au niveau de la blessure, d'un tissu

cicatriciel résistant aux infections. De même, lors de l'attaque par des pathogènes, une cascade de réaction aboutissent à la résistance exprimée à l'emplacement de l'infection ou dans d'autres parties non infectées de la plante se met en place. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée à la teneur en composés phénoliques, les principes actif et leurs mécanismes d'action font maintenant l'objet d'un nombre croissant d'études (**Hadj Salem, 2009**).

Les polyphénols possèdent aussi de nombreuses propriétés biologiques comme : l'activité antioxydante, antiulcéreuse, antivirale, anti tumorale, antibiotique et anti-inflammatoire (**Massaux, 2012**).

Ainsi, ils ont également été décrits dans plusieurs processus physiologiques tels que la croissance cellulaire, différenciation, organogenèse, dormance des bourgeons, floraison et tubérisation (**Hadj Salem, 2009**).

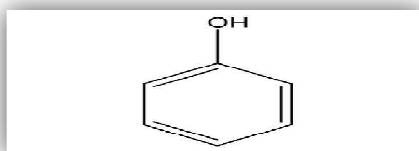


Figure 05 : Phénol (Massaux, 2012).

3-2- La biosynthèse

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromagenèse :

La voie la plus courante est celle qui, via le shikimate (l'acide shikimique) conduit des oses aux aminoacides aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés: acides benzoïques, acétophénonnes, de lignanes, lignines, coumarines,...etc (**Ghasemzadeh et Ghasemzadeh, 2011**).

L'autre voie, le précurseur c'est l'acétate, qui conduit à des poly- β -cétoesters de longueur variable, les polyacétates, qui engendrent par cyclisation (réaction de CLAISEN ou condensation aldolique), des composés souvent polycycliques : chromofiés, isocoumarines, orcinols, depsides, depsidones, xanthonnes, quinones,...etc (**Bruneton, 2009 ; Tran, 2015**).

3-3- Classification des polyphénols

Parmi les classes des polyphénols on a :

3-3-1- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent le principal groupe de polyphénols, avec plus de 5000 composés différents identifiés dans le règne végétal (Massaux, 2012).

3-3-2- Les anthocyanes

Les anthocyanes donnent des couleurs très variées : bleu, rouge, mauve, rose ou rouge. ces molécules ont comme les flavonoïdes, un squelette de base en C15 formé de deux cycles A et B, et d'un hétérocycle (cycle C) ; mais leur caractéristique principale est que ce dernier est chargé positivement. Cette charge est due à leur structure de base commune : le cation flavylum ou 2 phenyl 1-benzopyrilium (Akroum, 2011).

3-3-3- Les flavanes

Les flavanes sont sous forme de monomères (ex : la catéchine) ou sous forme de polymères (dimères, trimères...de catéchine). Ils existent sous forme de plusieurs stéréoisomères provenant de deux carbones asymétriques : C2 et C3. Les flavanes sont très répandues dans les écorces végétales (Akroum, 2011).

3-3-4- Les acides phénols

Les acides phénols, ou acides phénoliques, ont une fonction acide ou plusieurs fonctions phénols. Ils sont incolores et plutôt rares dans la nature. Ils se divisent en deux catégories : Les acides phénols dérivés de l'acide benzoïque sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinée à l'état d'esters ou d'hétérosides (Pawlowska et al., 2006).

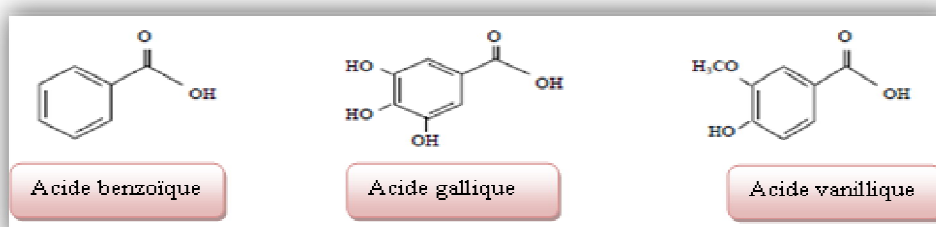


Figure 06 : Exemple de quelques acides phénols de la série benzoïque (Akroum, 2011).

Les acides phénols dérivés de l'acide cinnamique sont souvent estérifiés. Les plus courants sont l'acide cinnamique, l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide p-coumarique et l'acide sinaptique; dont certains sont représentés dans la (figure 07) (Pawlowska et al., 2006).

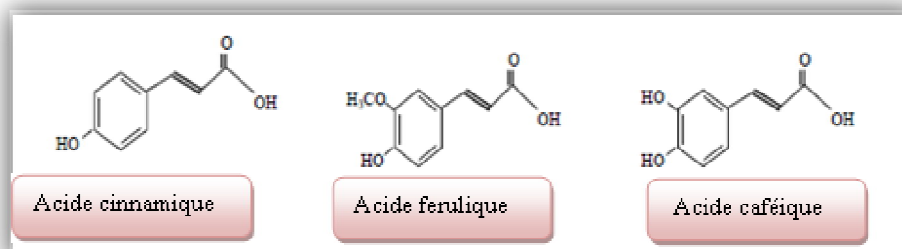


Figure 07 : Exemple de quelques acides phénols de la série cinnamique (Pawlowska et al., 2006).

3-3-5- Autres polyphénols

Néanmoins, de nombreuses autres structures existent, tels que tanins hydrolysables, coumarines, lignanes, quinones et autres phloroglucinols. Il est à noter que certains composés appartenant à ces groupes chimiques ne comportent en fait aucun hydroxyle libre, de même qu'on peut signaler la présence de fonctions phénoliques chez des composés naturels appartenant à d'autres groupes phytochimiques (terpènes, alcaloïdes,...etc) (Hennebelle et al., 2004).

4- Les tannins

Les tannins sont des macromolécules qui se divisent selon leur structure en deux groupes principaux :

4-1- les tannins hydrolysables : sont des esters d'acide gallique qui se lient aux molécules de glucose. Plus précisément, un glucose se lie à plusieurs molécules d'acide gallique (Figure 08).

4-2- Les tannins condensés : proanthocyanidines : ce sont des composés phénoliques hétérogènes. Ils se trouvent sous forme d'oligomères ou polymères de flavanes, flavan-3-ols, 5 desoxy-3-flavonols et flavan-3, 4-diols (Figure 09).

Les polymères donnent une structure hérissée d'OH phénoliques capable de former des liaisons stables avec les protéines (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

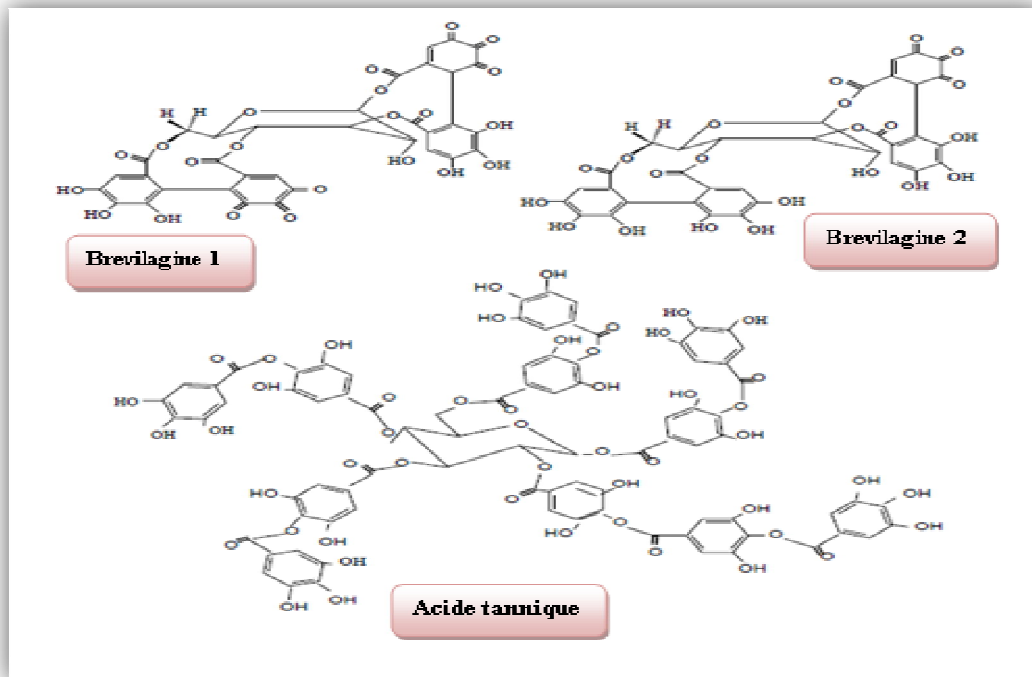


Figure 08 : Quelques tanins hydrolysables représentatifs (Cheynier, 2006).

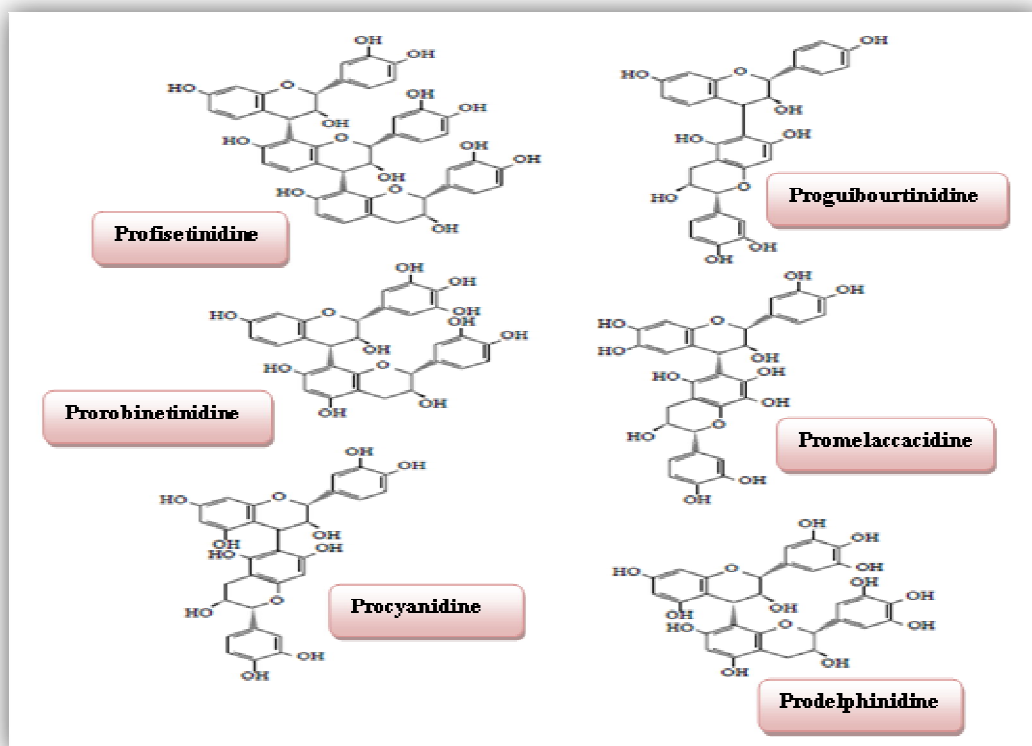


Figure 09 : Quelques proanthocyanidines sélectionnés (Cheynier, 2006).

5- Les coumarines

Les coumarines sont des substances naturelles aromatique, dotés d'odeur qui se rapproche de la vanilline, ils sont utilisés beaucoup en parfumerie. Ils sont présents sous forme libre ou hétéroside dans la plus part des familles de dicotylédones. On trouve des coumarines simples chez les Oléacées, Loganiacées et Solanacées, et des coumarines complexes, en particulier, chez les Apiacées, Fabacées, Astéracées, Moracées, Rosacées, Rubiacées et Rutacées (Bruneton, 2009).

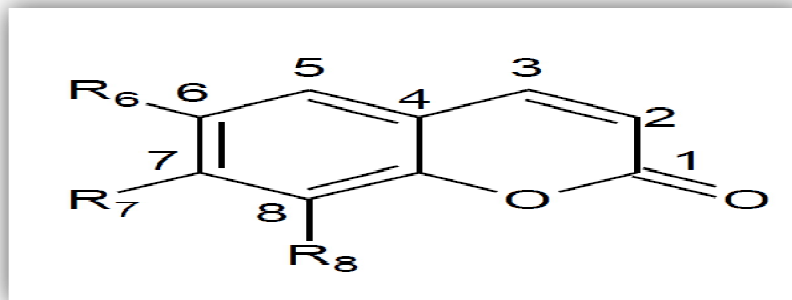


Figure 10 : Structure générale des coumarines (Bruneton, 2009).

6- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes, présents dans la plupart des plantes, sont des pigments polyphénoliques qui contribuent, entre autres, à colorer les fleurs et les fruits en jaune ou en blanc. Ils ont un important champ d'action et possèdent de nombreuses vertus médicinales. Certains flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires, antivirales et des effets hépato-protecteurs. Des flavonoïdes comme l'hésperidine et la rutine, chez *F.esculentum* et *C.limon*, renforcent les parois des capillaires et préviennent l'infiltration dans les tissus voisins. Les isoflavones (*T.pratense*), possèdent des effets œstrogéniques, sont efficaces dans le traitement des troubles liés à la ménopause (Iserin, 2008).

6-1- La structure des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent tous un même squelette de base de quinze atomes de carbones constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C₆ (A et B) reliés par une chaîne en C₃ (Hadj Salem, 2009).

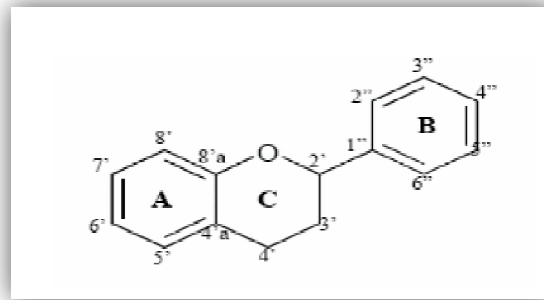


Figure 11 : Structure générale des flavonoïdes (Benhammou, 2012).

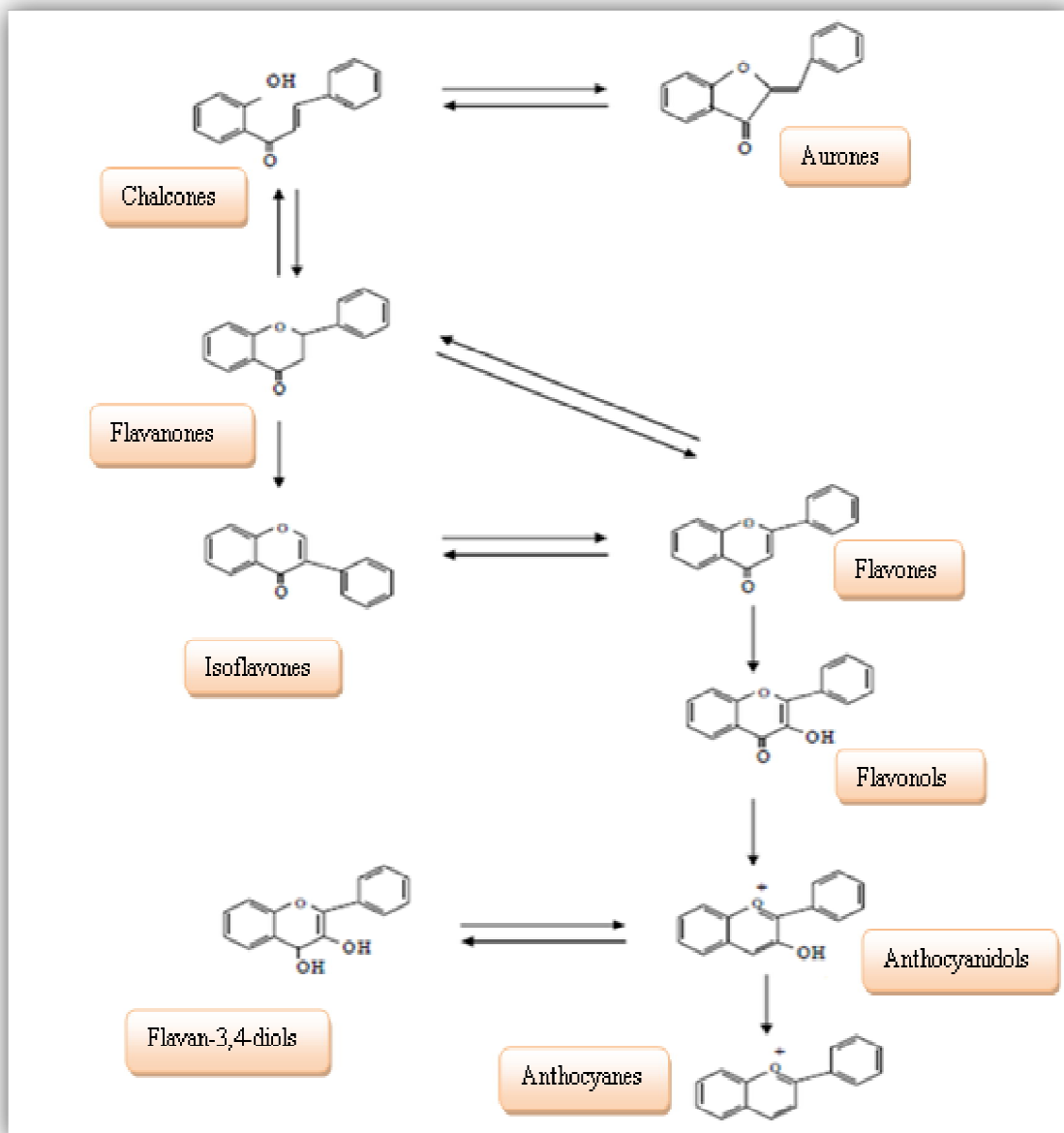
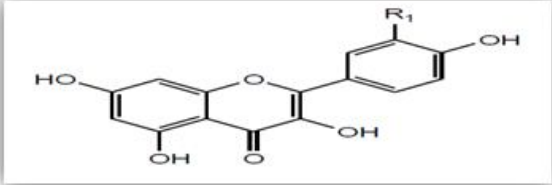
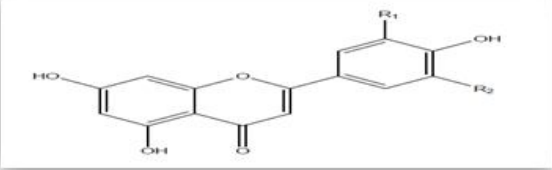
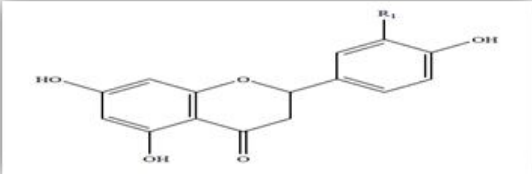
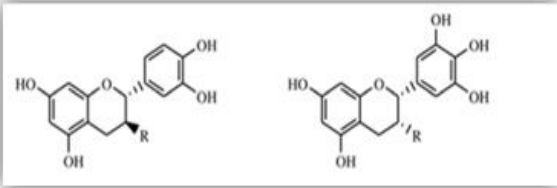
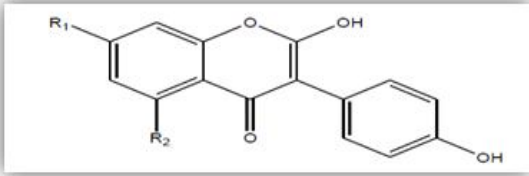
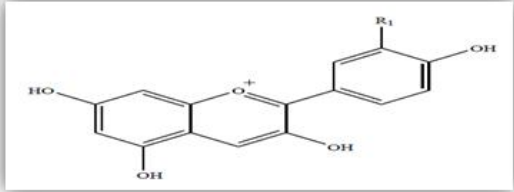


Figure 12 : Schéma simplifié de la biosynthèse des différentes classes de flavonoïdes (Akroum, 2011).

6-2- Classification des flavonoïdes

Tableau 02 : Classification des flavonoïdes (Boubekri, 2014).

Classes	Structures chimiques
Flavonols	 <p data-bbox="724 656 1102 763"> R1= H Kaempférol R1=OH Quercétine R1=OCH3 Isorhamnétine </p>
Flavones	 <p data-bbox="740 1037 1102 1131"> R1=R2= H Apigénine R1=OH ; R2=H Lutéoline R1=R2=OCH3 Tricine </p>
Flavanones	 <p data-bbox="746 1384 1094 1491"> R1= H Naringénine R1=OH Eriodictyol R1=OCH3 Héspératine </p>
Flavanols	 <p data-bbox="587 1749 1251 1843"> R=OH Catéchine R=OH épigallocatechine R=O-galloyl Catéchine gallate R= O-galloyl épigallocatechine gal </p>

<p>Isoflavones</p>	<div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center; background-color: #e0f0e0; padding: 5px; margin-top: 10px;"> <p>R1= OH, R2=OH Genisteine R1=OGlu, R2=H Daidzeine</p> </div>
<p>Anthocyanes</p>	<div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center; background-color: #e0f0e0; padding: 5px; margin-top: 10px;"> <p>R1= H Pélagonidine R1=OH Cyanidine</p> </div>

L'évaluation des teneurs en métabolites secondaires de *J.phonicea* selon les études a permis de connaitre que cette espèce possède une activité antioxydante.

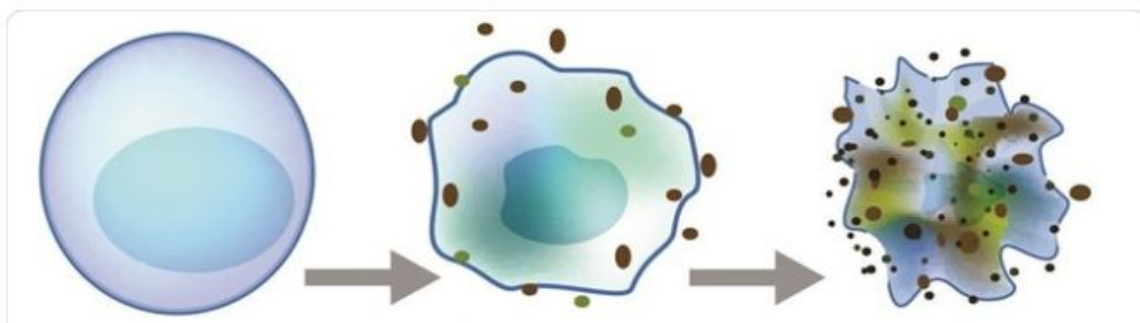
I- Généralité

Nos cellules et tissus peuvent être soumis à une grande variété d'agression physiques (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant, dû à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé, la production de radicaux dérivés de l'oxygène (Benhammou, 2012).

II-1- Définition de l'oxydation

L'oxydation est le phénomène qui fait rouiller les métaux, qui fait flétrir les légumes et les fruits, rancir les graisses. Il modifie le goût et la couleur des aliments.

Sur le plan chimique, l'oxydation est générée par des radicaux libres, espèces chimiques neutres ou chargées instables qui ne cherchent qu'à récupérer un électron dans leur environnement pour retrouver sa stabilité. Ces deux propriétés font que les réactions d'oxydation sont très rapides et se propagent en cascade. Les espèces moléculaires cibles de l'oxydation sont avant tous les corps gras comme les phospholipides des membranes cellulaires, mais aussi les protéines (Farrar Stoakes, 2018).



Cellule normale Cellule attaquée par les radicaux libres Cellule avec stress oxydatif

Figure 13 : Effet des radicaux libres sur les membranes cellulaires (Farrar Stoakes, 2018).

Dans le cas des enzymes, qui sont de nature protéique, leur oxydation entraîne une modification ou perte de leur activité biologique, ce qui entraîne des désorganisations cellulaires parfois irréversibles entraînant la mort de la cellule. Il en est de même quand l'oxydation touche l'ADN ou une partie du système traduction/ transduction.

L'oxygène de l'air à l'état fondamental O_2 est peu réactif par rapport à la majeure partie des molécules biologiques. Par contre il existe des formes beaucoup plus réactives et donc plus toxiques (Nassour, 2015).

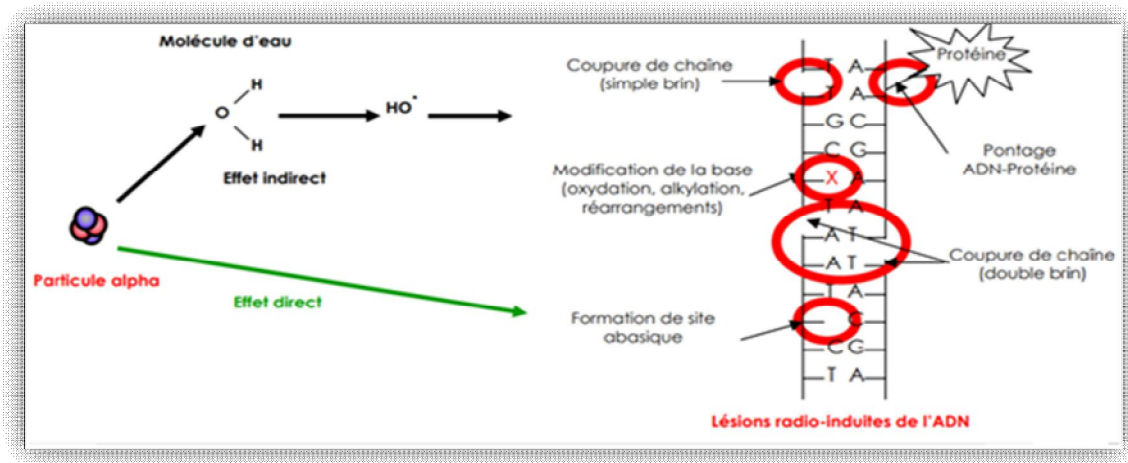


Figure 14 : Effets des rayonnements ionisants sur l'ADN (Pouthier, 2006).

II-2- Les mécanismes de l'oxydation

On décrit l'oxydation en trois phases distinctes, mais pratiquement simultanée (Thorin-Trescases et al., 2010 ; Rolland, 2004).

- **Initiation** : Engendre la formation d'hydroperoxydes. L'oxydation des molécules peut être initiée par la chaleur, les UV ou les ions métalliques. De même, l'oxygène triplet, stable, peut être activé en oxygène singulet, réactif, par l'intermédiaire d'un photosensibilisateur. La phase d'initiation aboutit donc à la formation d'espèces très réactives : ROOH et R^\bullet .

- **Propagation** : La destruction des hydroperoxydes est responsable des goûts et odeur de rance. La liaison O-O dans un hydroperoxyde est faible et peut être facilement rompue. Les deux dernières réactions sont en boucles, ce qui explique que des traces d'ions métalliques suffisent à générer une grande quantité de radicaux libres. Les espèces radicalaires produites par les premières réactions sont hautement réactives et vont à leur tour arracher un hydrogène à une autre molécule ou réagir avec un oxygène triplet.

- **Terminaison arrêt** : Apparition de nouvelles espèces moléculaires anarchiques. La chaîne de propagation peut s'arrêter par la formation de polymères ou au contact avec un autre radical. Les molécules créées n'ont plus de fonction biologique.

III- L'activité antioxydante et le stress oxydatif

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

III-1- Stress oxydatif

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

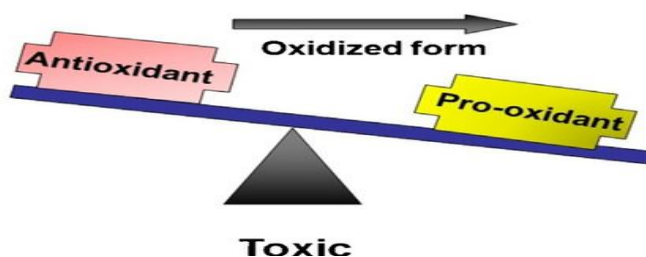


Figure 15 : Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants (Harrar, 2012).

Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telle que l'exposition aux radiations ionisantes (exposition importante au soleil, radioactivité artificielle ou naturelle), la pollution, pesticides et solvants, tabac et alcool, certains médicaments, sport intensif et tout processus susceptible de surcharger les réactions de détoxification hépatique, notamment une perte de poids importante (Boubekri, 2014).

III-2- Inflammation aiguë

Elle est caractérisée par 4 phénomènes typiques, qui sont le gonflement (œdème), la douleur, la chaleur et l'érythème. Cette réaction peut s'accompagner d'atteintes fonctionnelles régionales selon la gravité de l'agression (Weill et Batteux, 2003).

L'inflammation aiguë peut être divisée en trois grandes phases:

- Une phase vasculaire immédiate, de l'ordre de la minute, caractérisée par des modifications de la micro-circulation locale.
- Une phase cellulaire consécutive à la mobilisation de nombreuses cellules. Cette mobilisation cellulaire va permettre l'élimination des micro-organismes pathogènes et des tissus lésés.
- Une phase de résolution et de cicatrisation qui, en quelques jours, verra la restauration des tissus. **(Weill et Batteux, 2003).**

III-3- Inflammation chronique

Les signes de début sont identiques à ceux d'une inflammation aiguë, mais les destructions tissulaires sont plus graves et ont des conséquences fonctionnelles profondes. Au moins aussi fréquente que l'inflammation aiguë, cette inflammation chronique laisse des séquelles anatomiques et fonctionnelles **(Weill et Batteux, 2003).**

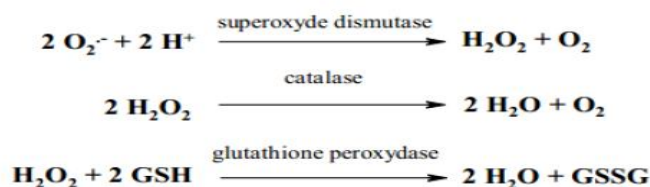
La définition du caractère chronique d'une inflammation n'est pas toujours aisée : le meilleur critère de chronicité est une durée supérieure à six semaines. Dans de nombreux cas l'inflammation semble chronique d'emblée, comportant dès le départ des phénomènes de remodelage du tissu conjonctif, de destruction et de réparation. Le mécanisme de la chronicité n'est pas toujours évident. Dans certains cas, elle tient à la persistance d'une substance pathogène que l'organisme est incapable d'éliminer : inflammation échoue dans sa finalité première qui est le maintien de l'intégrité du soi. Dans d'autres cas, on peut supposer qu'elle est auto-entretenu, les mécanismes intermédiaires continuant à opérer alors que la substance pathogène qui l'a déclenchée a été éliminée. Sur le plan phénoménologique, l'inflammation chronique s'oppose point par point à l'inflammation aiguë **(Weill et Batteux, 2003).**

IV- 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 cytotoxique de ROS. Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule **(Harrar, 2012).**

IV-1- Les antioxydants primaires

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydantes qui sont des systèmes de défense très efficaces. Cette ligne de défense est constituée de superoxyde dismutase (SOD), de catalase et de peroxydase (glutathion et ascorbate). Ces enzymes antioxydantes permettent l'élimination des radicaux libres primaires, selon les réactions suivantes :



De ce fait elles préviennent la formation de radicaux libres organiques à partir des lipides membranaires notamment et contribuent donc à la protection des membranes de la peroxydation lipidique (**Harrar, 2012**).

Les micro-éléments

Les micro-éléments sont des coéquipiers des enzymes. Ce sont des accélérateurs (catalyseurs) qui diminuent le temps nécessaire au bon déroulement d'un nombre impressionnant des réactions biochimiques. Or, les réactions biochimiques ne sont jamais isolées : elles s'enchainent « en cascade », chacune avec son oligo-élément catalyseur bien précis. Le fer est, par exemple, indispensable au transport de l'oxygène vers les cellules. Mais il ne peut être absorbé, ni stocké sans le cuivre. L'assimilation intestinale du cuivre dépend, à son tour, du manganèse présent dans l'organisme. Si l'un de ces trois oligo-éléments vient à manquer, c'est tout le processus de la respiration qui s'altère (**Simoncini, 2015**).

IV-2- Les antioxydants secondaires

Ce sont des molécules exogènes. Contrairement aux enzymes antioxydantes, une molécule d'antioxydant piège un seul radical libre. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule d'antioxydant doit donc être régénérée par d'autres systèmes.

Plusieurs substances pouvant agir en tant qu'antioxydants in vivo ont été proposés. Elles incluent : la vitamine E, l'acide ascorbique, le β -carotène, les flavonoïdes, les composés phénoliques,...etc (**Harrar, 2012**).

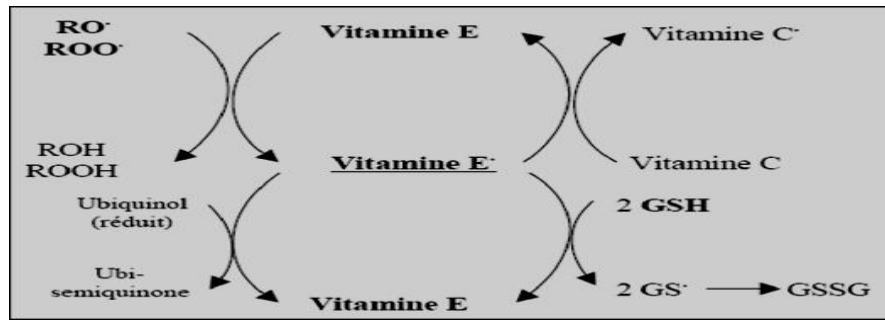


Figure 16 : L'intérêt de vitamine E et C.

IV-3- Les antioxydants naturels

L'utilisation des molécules antioxydantes de synthèse est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels. Récemment certains travaux soutiennent l'utilisation des antioxydants naturels végétaux tels que les polyphénols et flavonoïdes ...etc comme moyen prophylactique pour lutter contre le stress oxydatif chez les sujets diabétiques. L'administration par voie orale de la vitamine E ou C à des rattes diabétiques gestantes réduit significativement les malformations chez leur progéniture confortant ainsi, que l'augmentation de la production des radicaux libres (ROS) a un effet tératogène. Elles suscitent de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires; ils sont également utilisés comme additifs en industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Ouali *et al.*, 2007 ; Bougandoura et Bendimerad, 2013).

Matériel et méthode

La majorité de travail expérimental a été effectué au sein du laboratoire de CRBT (Centre de Recherche en Biotechnologie) Constantine, et les testes phytochimiques ont été réalisés au laboratoire de biochimie, université Abbès Laghrour-khenchela.

Les objectifs

1- Identifier les différents groupes chimiques présents dans les feuilles de *J.phoenicea* (testes phytochimique).

2-Détermination de l'activité antioxydante des extraits obtenus par extraction au soxhlet des feuilles de *J.phoenicea*.

I- Matériel

I-1- Matériel végétal

L'espèce *J.phoenicea* a été récoltée au cours de l'année 2017 de la région semi-aride Ain Mimoun-khenchela (Latitude 35°35' N, Longitude 6°89' E). Les feuilles ont été séchées à l'abri de l'humidité et de la lumière du soleil pendant 15 jours, ensuite les broyées puis tamisées pour obtenir une poudre fine qui se conservera jusqu'à l'utilisation.



Figure 17 : (A- Feuilles fraîches ; B- Feuilles sèches ; C- Poudre) (Photo originale).

I-2- Produits utilisés

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans les expériences, parmi ces produits : Méthanol, Chloroforme, Ethanol, FeCl₃, DPPH, ABTS, réactif de Mayer,

Réactif de Wagner, acide sulfurique (H_2SO_4), HCl, NH_4OH , Quercetine, Acide gallique, FCR, Nitrate d'aluminium($AlNO_3$), Carbonate de sodium(Na_2CO_3), $FeCl_2$, $AlCl_3$.

I-3- Appareillage

Les appareils : Rotavapeur [KIT LAB], Balance analytique [OHAUS], Balance électriques [KERN], plaque chauffante [STUART], La chambre UV [], Etuve [MEMMERT], bain marie [MEMMERT], Pompe à vide [KIF LAB], vortex [VELP SCIENTIFICA], ultrason, Lecteur de microplaque [Perkin Elmer, Enspire], Agitateur.

II- Méthodes

II-1-Extraction

II-1-1-Extraction par macération

L'extraction est effectuée en utilisant 30g de la poudre de *J. phoenicea* introduit dans un bécher qui contient le mélange hydroalcoolique : Méthanol/Eau (8 : 2) pendant 24h ; après la filtration de l'extrait par une pompe à vide, le filtrat obtenu est évaporé sous pression réduite à l'aide d'un rotavapeur à une température de $40^\circ C$, l'extrait méthanolique obtenue est conservé jusqu'à l'utilisation.

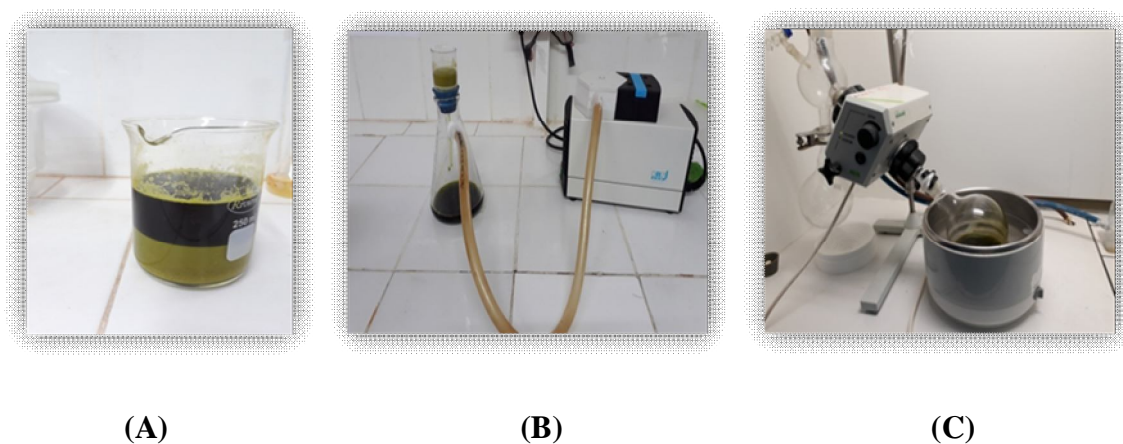


Figure 18 : Préparation de l'extrait méthanolique (A- Macération 24h ; B- Filtration ; C-Evaporation au Rotavapeur ($40^\circ C$)).

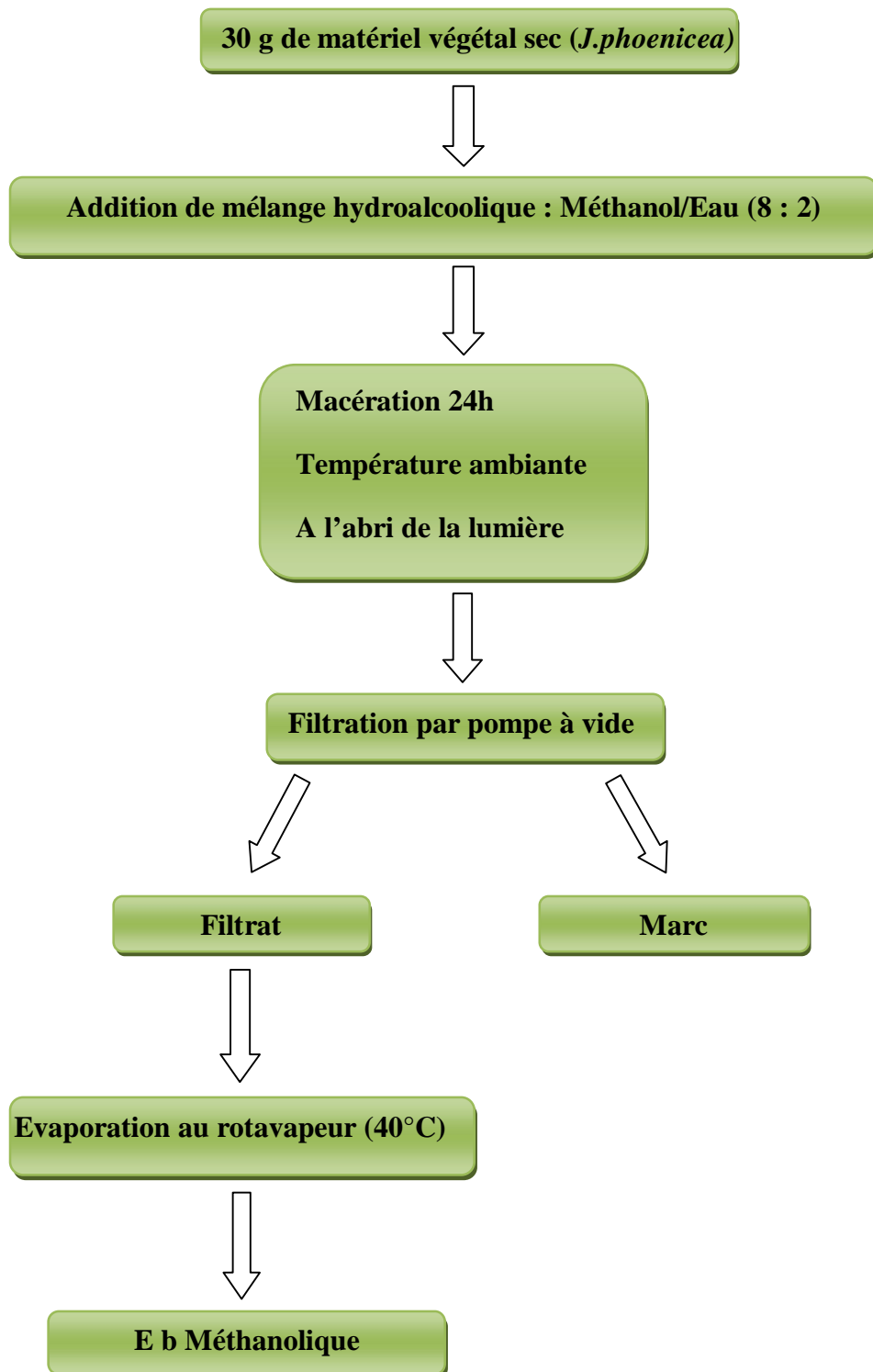


Figure 19 : Protocole de préparation de l'extrait méthanolique de la plante *J .phoenicea* par macération.

II-1-2- Extraction par soxhlet

L'extraction avec le soxhlet est une méthode classique pour l'extraction solide-liquide. Les avantages du soxhlet sont les suivants : l'échantillon entre rapidement en contact avec une portion fraîche de solvant, ce qui aide à déplacer l'équilibre de transfert vers le solvant. Cette méthode ne nécessite pas de filtration après extraction.

Le soxhlet est indépendant de la matrice végétale. Les inconvénients les plus significatifs de cette méthode, par comparaison avec les autres techniques conventionnelles sont : la durée importante d'extraction et la grande quantité de solvant consommée, ce qui conduit non seulement à des pertes économiques mais pose aussi des problèmes sur le plan environnemental. Les échantillons étant portés à haute température pendant une période relativement longue, le risque de thermodestruction de certains composés n'est pas à négliger si la matière végétale contient des composés thermolabiles. Etant donné la grande quantité de solvant utilisée, l'étape postérieure d'évaporation/concentration devient limitant. Des échauffements locaux sont également possibles (Grigonis et al., 2005).

Cette technique est limitée d'un point de vue de la sélectivité du solvant n'est facilement automatisable (Grigonis et al., 2005 ; Wang et Waller, 2006).

L'extrait a été obtenu après extraction à l'aide du soxlet, par le binôme de la promo 2016-2017. Conservé au congélateur jusqu'à l'emploi.



Figure 20 : Appareil de soxhlet.

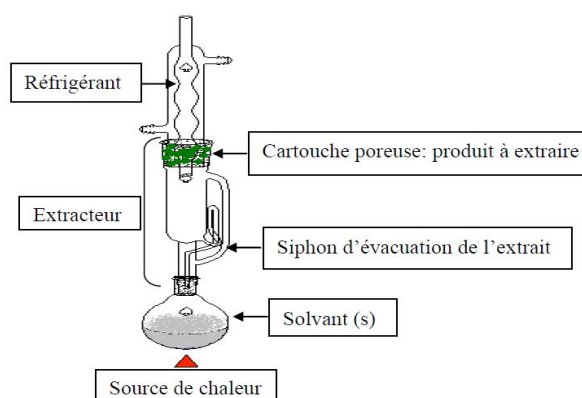


Figure 21 : Schéma d'un appareil de soxhlet
(Site web 2).

II-2- Calcul du rendement

Le rendement de l'extrait est le rapport entre le poids de l'extrait et le poids de la plante sèche. Le rendement, exprimé en pourcentage, est calculé par la formule suivante :

$$R = 100 \frac{m}{m_0} \text{ Où :}$$

R : est le rendement en %.

m : est la masse de l'extrait.

m_0 : est la masse de la plante.

II-3- Screening phytochimique

Le screening chimique est un ensemble de réactions chimiques qui permettent d'identifier la présence des principales catégories des substances chimiques naturelles contenues dans une plante et qui pourraient être responsables de propriétés pharmacologiques. Les tests phytochimiques sont réalisés sur les deux phases de *J. phoenicea* à savoir l'extrait méthanolique et chloroforme.

Les résultats obtenus ont été évalués comme suit :

(+++): Présence plus forte (++) : présence forte, (+) : présence faible, (-) : absence.

II-3-1- Les flavonoïdes : test de Shinoda

L'extrait (0,1 g) a été dissout dans 3 ml de méthanol. 0,05 g de copeau de magnésium et 4 gouttes d'acide sulfurique y ont ensuite été ajoutés. Le développement de la couleur orange a indiqué la présence des flavonoïdes (**Bruneton, 1999**).

II-3-2- Les tanins

A 1 ml d'extrait à analyser, ajouter 0.5 ml d'une solution aqueuse de FeCl_3 à 1%. La présence des tanins est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre (**Belfekih et al., 2017**).

II-3-3- Les coumarines

Introduire 5 ml d'extrait dans un tube, ajouter 0.5 ml de NH_4OH à 10%, mélanger et observer sous UV à 366 nm. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines (**Harborne, 1998**).

II-3-4- Les alcaloïdes

Les tests sont réalisés par des réactions de précipitation avec les réactifs de Mayer et Wagner. 1 ml de chaque extrait est divisé en deux volumes égaux. Un volume est traité par 0.5 ml de réactif de Mayer, l'autre par 0.5 ml de réactif de Wagner. L'apparition d'un précipité blanc ou brun, respectivement révèle la présence des alcaloïdes (**Firdouse et Alam, 2011**).

II-3-5- Les terpénoïdes

5 ml d'extrait est ajouté à 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré. La formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase indique la présence des terpénoïdes (**Edeoga et al., 2005**).

II-3-6- Les saponines : test de mousse

Dans un tube à essai, introduire 10 ml d'extrait à tester et agité pendant quelque secondes puis laissé au repos pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante indique la présence des saponines (**Harborne, 1998**).

II-3-7- Les composés réducteurs

Introduire 1 ml d'extrait dans un tube à essai, ajouter 2 ml de liqueur de Fehling (1 ml réactif A et 1 ml réactif B), incuber l'ensemble pendant 8 minute dans un bain marie bouillants. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs (**Belfekih et al., 2017**).

II-3-8- Les composés phénoliques

L'extrait (0,1 g) a été dissout dans 3 ml d'éthanol et 5 gouttes de FeCl_3 y ont été ajoutées. Le développement de la coloration verdâtre a indiqué la présence des phénols. La présence des composés phénoliques a été marquée par l'apparition de la coloration bleue verdâtre (**Bruneton, 1999**).

II-4- Dosages**II-4-1- Dosage du Total Phénolique, TPC (Total Phenolic Content)**

1- Principe de la réaction

La teneur en polyphénols totaux est déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (Singleton et Rossi, 1965) selon une méthode de dosage sur microplaque décrite par (Muller et al., 2010).

Le réactif FCR, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀), est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes de tungstène (W) et de molybdène (Mo).

La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximum aux environs de 750-765 nm.

2- Procédure

20 µl d'extrait de plante + 100 µl de FCR dilué (1 :10) + 75 µl de carbonate de sodium (7.5%) + mettre le mélange à l'obscurité pendant 2h + lecture à 765 nm. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (méthanol).

3- Gamme d'étalonnage (Annexe B)**II-4-2- Dosage du total Flavonoïdes, TFC (Total Flavonoid Content)****1- Principe de la réaction**

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre Al³⁺ et les flavonoïdes. La méthode de (Topçu et al., 2007) est utilisée avec quelques modifications pour une détermination sur microplaque 96 puits.

2- Procédure

50 µl (S2) [extrait de plante] + 130 µl [MeOH] + 10 µl (S1) [CH₃COOK] + 10 µl [Al(NO₃)₃, 9H₂O] + attendre 40 mn + lecture à 415 nm. Un blanc échantillon est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol [50 µl extrait + 150 µl méthanol].

3-Préparation de la gamme d'étalon de la Quercetin (Annexe B)**II-5- Activité antioxydante****II-5-1- Test du DPPH radical libre**

1- Principe de la réaction

L'activité anti-radicalaire libre est déterminée par spectrophotométrie par le dosage du DPPH (Blois, 1958), le α -tocophérol, BHT et le BHA sont utilisés comme standards antioxydants.

2- Préparation du DPPH

Dissoudre 6 mg dans un volume de 100 ml de méthanol, le radical DPPH est dissous dans le méthanol et gardé à -20°C à l'abri de la lumière. L'absorbance est 0.5 nm (517 nm) dans le spectrophotomètre.

3- Procédure

A 160 μl (DPPH) rajoutez 40 μl (extrait) puis lecture 517nm.

II-5-2- Test du ABTS scavenging activity

1- Principe de la réaction

L'activité ABTS est déterminée par la méthode de (Re et al., 1999).

2- Procédure

A partir de l'ABTS et du persulfate de potassium $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$: les deux produits en solution aqueuse sont mélangés et mis à l'abri de la lumière pendant 12-16 h ; l'absorbance de la solution ainsi obtenue est ajustée par (Ethanol ou H_2O) à 0.700 ± 0.020 à 734 nm avant l'usage.

(ABTS) \longrightarrow \square r 19,2 mg (7 mM) ABTS + 5 ml H_2O + \square r 3,3 mg (2.45mM) ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) + 5ml H_2O + attendre 16 heure à l'abri de la lumière.

$M(\text{ABTS}) = 548,68 \text{ g/mol}$

$M(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8) = 270,32 \text{ g/mol}$

$A = 0.70-0.75 \text{ nm de l'ABTS}$

3- Procédure

160 μl (ABTS) + 40 μl (extrait) + attendre 10min + lecture à 734 nm.

L'activité ABTS a été exprimée en pourcentage et calculée par l'équation suivante :

$$\text{ABTS scavenging effect (\%)} = ((A \text{ control} - A \text{ simple}) / A \text{ control}) \cdot 100.$$

II-5-3- Test du CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity)

1- Principe de la réaction

Le Cupric Reducing Antioxidant Capacity est déterminé par la méthode CUPRAC, (Apak *et al.*, 2004).

2- Procédure

Préparation des solutions

- $m=1.927 \text{ g}$ Acétate d'ammonium (ACNH_4) + 25 ml (H_2O) → S1 transparent (pH=7.0).
- $m=0.042625 \text{ g}$ ($\text{Cu Cl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$) + 25 ml (H_2O) → S2 bleu.
- $m=0.039 \text{ g}$ (Neocupronin) + 25 ml (EtOH) → S3.

1- ajouter la solution S1 au plat qui contient les extraits → pour lecture.

2- mélanger la solution S2 et S3 → pour lecture.

3- le CUPRAC prend une heure de temps pour lecture.

A 40 μl d'extrait rajoutez 60 μl (S1) + 50 μl (S3) + 50 μl (S2) + attendre 1 heure + lecture à 450 nm.

$$M (\text{Cu Cl}_2, 2\text{H}_2\text{O}) = 170.50 \text{ g/mol}$$

$$M (\text{ACNH}_4) = 77 \text{ g/mol}$$

$$M (\text{Neocupronin}) = 208.27 \text{ g/mol}$$

II-5-4- Test du Pouvoir réducteur

1- Principe de la réaction

L'activité Reducing Power est déterminée par la méthode de (Oyaizu, 1986) avec une légère modification.

2- Procédure

10 μ l extrait + 40 μ l phosphate buffer (pH 6.6) + 50 μ l potassium ferricyanide (1%) $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ dans 100 ml (H_2O) + incubé a 50°C pendant 20 min + 50 μ l tri- chloro acetic acid (TCA) (10%)(1g de TCA dans 10 ml H_2O) + 40 μ l H_2O + 10 μ l ferric chloride FeCl_3 (0.1%)(0.1g de FeCl_3 dans 100 ml H_2O) + lecture à 700 nm.

Résultats et discussion

Ce travail porte sur l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante de deux phases de la plante *J.phoenicea*.

I- Rendements des extraits

Le tableau 3 résume la quantité d'extrait brut obtenu après macération de la matière végétale avec le mélange hydroalcoolique (MeOH-Eau distillée 80%).

Tableau 03 : Tableau récapitulatif regroupant les rendements des différents extraits :

La plante	Le poids MV (g)	Les extraits	Le poids d'extrait (g)	Le rendement (%)
<i>J.phoenicea</i>	30	Méthanol	7.872	26.24
	30	Chloroforme	5.283	17.61

Le calcul des rendements par rapport au poids de la matière végétale pour la plante *J.phoenicea*, a permis d'avoir des valeurs de 26.24 % pour l'extrait méthanolique et de 17.61 % pour l'extrait chloroforme. L'extraction hydroalcoolique présente un meilleur rendement qui est plus importants avec les phases polaires par rapport aux phases non polaires.

II- Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques permettent de déterminer les différentes familles de composés qui existent dans les extraits : chloroforme et méthanol de *J.phoenicea* par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés ainsi que des examens en lumière ultraviolette. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 04 : Résultats des tests phytochimiques de différents extraits de *J.phoenicea* :

Extraits Phytoconstituants	Méthanol	Chloroforme
Flavonoïdes	++	+
Polyphénol	++	+
Tanins	++	+
Coumarines	++	++
Alcaloïdes	-	-
Terpénoïdes	++	+
Saponines	-	-
Composés réducteurs	++	++

(+++): Présence plus forte, (++) : présence forte, (+) : présence faible, (-) : absence

L'étude phytochimique des extraits méthanolique et chloroformique, a montré que les deux contiennent les coumarines et composés réducteurs en quantité moyenne.

Les Flavonoïdes, les polyphénols, les Tanins et les Terpénoïdes sont présents en quantités modérées dans l'extrait méthanolique par contre dans l'extrait chloroformique sont présents en faible quantité. Les tests phytochimiques ont montrés l'absence les alcaloïdes et saponines dans les deux extraits.

III- Dosages

III-1- Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols totaux de l'extrait méthanolique et acétate de *J.phoenicea* a été effectué avec le réactif colorimétrique de Folin-Ciocalteu (**Singleton et Rossi, 1965**) selon une méthode de dosage sur microplaque décrite par (**Muller et al., 2010**). Ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent ce

réactif en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés (Katalinic *et al.*, 2006).

La courbe d'étalonnage est réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme standard.

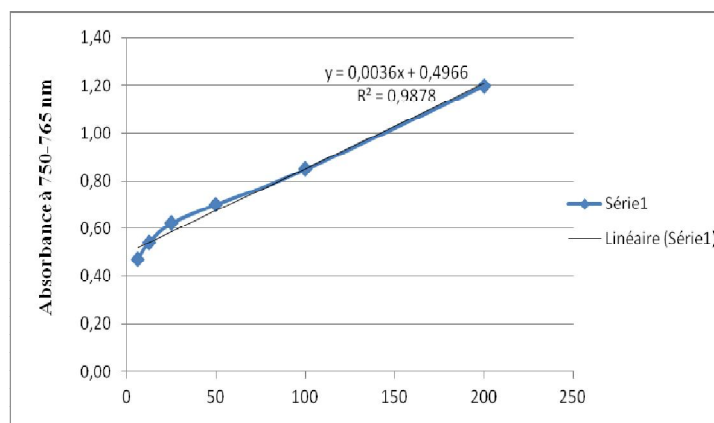


Figure 22 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique en µg/ml.

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique qui est exprimé en milligramme équivalent d'acide gallique par milligramme du poids d'extrait (mg EAG/mg d'extrait). Le taux des polyphénols totaux a été déterminé à partir de la courbe d'étalonnage d'équation (Figure 22), $D.O = 0,0036 [\text{polyphénols}] + 0,4966$; avec un coefficient de détermination R^2 égal à 0,9878.

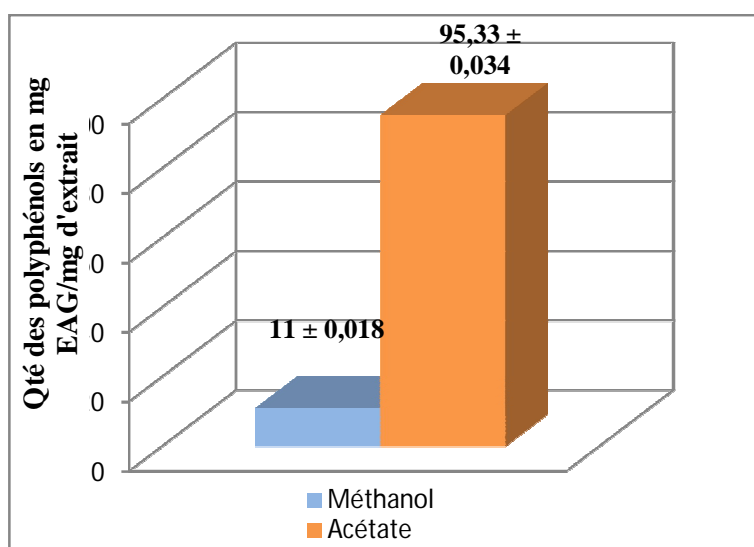


Figure 23 : Teneur en polyphénols totaux (mg EAG/mg).

Les résultats du dosage des polyphénols montrent que l'extrait acétate est plus riche en polyphénols que l'extrait méthanolique avec des valeurs de $95.33 \pm 0,034$ et $11 \pm 0,018$ mg EAG/mg d'extrait respectivement.

III-2- Dosage des flavonoïdes

L'estimation des flavonoïdes de l'extrait méthanolique et acétate de *J.phoenicea* a été effectué par la méthode (Topu et al., 2007) en utilisant le réactif nitrate d'aluminium. La quercétine est le standard le plus souvent employé dans cette méthode.

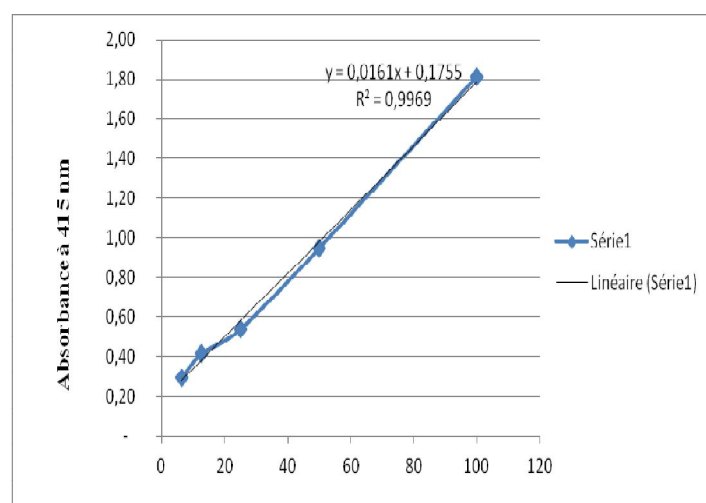


Figure 24: Courbe d'étalonnage de la quercétine en µg/ml.

La teneur en flavonoïdes de chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine et exprimé en milligramme équivalent de quercétine par milligramme du poids d'extrait (mg EQ/mg). Le taux des flavonoïdes totaux a été déterminé à partir de la courbe d'étalonnage d'équation (Figure 24), $D.O = 0,0161$ [flavonoïdes] + 0,1755 ; avec un coefficient de détermination R^2 égal à 0,9969.

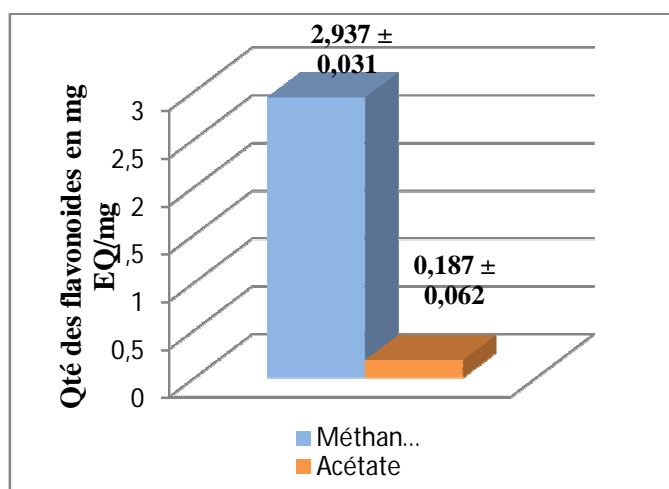


Figure 25 : Teneur en flavonoïdes totaux (mg EQ/mg).

La détermination quantitative des flavonoïdes par la méthode utilisée se base sur la formation d'un complexe flavonoïde-ion d'aluminium ayant une absorbance maximale à 415 nm, cette méthode révèle que l'extrait méthanolique a montré un taux d'environ (2.937 ± 0,031) mg EQ/mg d'extrait qui est plus élevé que celui obtenu avec l'extrait acétate (0,187 ± 0,062) mg EQ/mg d'extrait.

IV- L'activité antioxydante

IV-1- L'extrait méthanolique

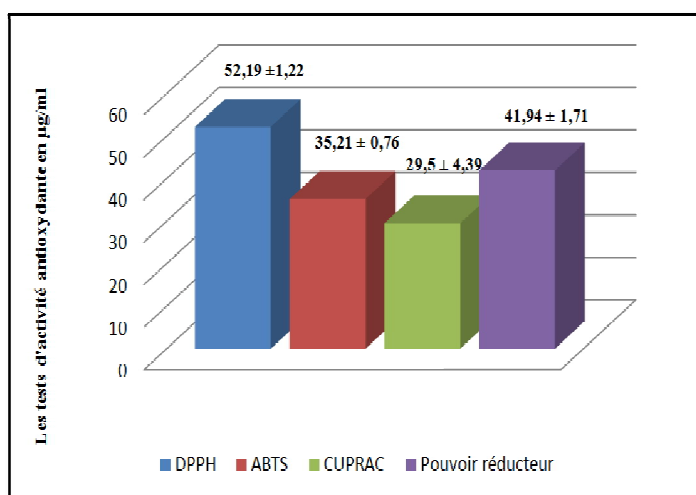


Figure 26 : Les tests d'activité antioxydante de l'extrait méthanolique.

Les résultats montrent que l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique, sont obtenus avec quatre techniques d'activité antioxydante à savoir : DPPH, ABTS, CUPRAC et pouvoir réducteur.

Le test DPPH a donné une valeur d'IC₅₀ (52,19±1,22 µg/ml) tandis que ceux du standard BHA égale 6,14±0,41 µg/ml et BHT égale 12,99±0,41 µg/ml ; cet extrait possède un pouvoir de piégeage du DPPH plus faible que les standards.

Dans le test ABTS, on a trouvé une IC₅₀ (35,21±0,76 µg/ml), cette valeur supérieur à celles des standards BHA (1,81±0,10 µg/ml) et BHT (1,29±0,30 µg/ml) ; donc moins active.

Le test CUPRAC indique une valeur de A_{0,50} (29,50±4,39 µg/ml) par comparaison avec les standards BHA (5,35±0,71 µg/ml) et BHT (8,97±3,94 µg/ml).

Une A_{0,50} = 41,94±1,71 µg/ml a été affichée dans le test FRAP avec l'extrait méthanolique. Cette valeur est supérieure que celle du standard BHA (8,41±0,67 µg/ml) et acceptable par rapport à BHT (□50) ; d'après ces résultats, le classement est comme suit : BHT □ extrait □ BHA.

Toutes les valeurs affichées n'excluent pas le potentiel antioxydant de l'extrait méthanolique même si celles-ci semblent supérieures, cette différence serait due à la présence dans l'extrait des métabolites qui pourraient entraver l'expression d'autres.

IV-2- L'extrait acétate

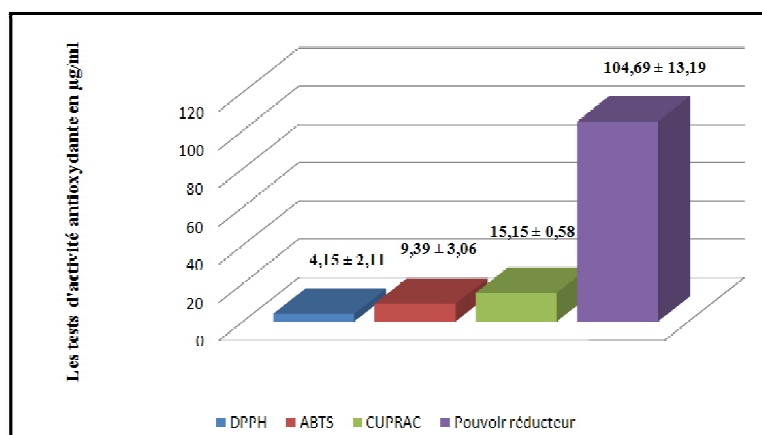


Figure 27 : les tests d'activité antioxydante de l'extrait acétate.

Les résultats de l'activité antioxydante de l'extrait acétate ont été réalisés avec quatre tests : DPPH, ABTS, CUPRAC et le pouvoir réducteur.

Le test DPPH a montré une valeur d'IC₅₀ (4,15±2,11 µg/ml) qui est proche de celle de BHA (5,73±0,41µg/ml) et quatre fois plus fort que BHT (22,32±1,19 µg/ml) donc cet extrait présente un pouvoir de piégeage très intéressant.

Dans le test ABTS, on a trouvé le résultat d'IC₅₀ (9,39±3,06 µg/ml), ce dernier est moins actif que les standards BHA (1,81±0,10 µg/ml) et BHT (1,29±0,30 µg/ml), mais cette valeur demeure intéressante.

Le test CUPRAC néanmoins indique une valeur de A_{0,50} (15,15±0,58 µg/ml) proche de la valeur de BHT (9,62±0,87µg/ml), mais le standard BHA correspond à peu près au quartier d'activité de cet extrait (3.64±0.19) .

Avec le test du pouvoir réducteur, cet extrait a affiché une valeur de A₀₅₀ (104,69±13,19 µg/ml) qui est faible par rapport le standard BHA (8,41±0,67 µg/ml) et BHT (□50).

Ces résultats nous ont permis de conclure que l'extrait acétate présente une meilleure activité antioxydante par rapport à l'extrait méthanolique. Ces activités seraient dues à la présence dans la phase méthanolique des flavonoïdes glycosylés en particulier mono, di et tri-glycosylés.

Tableau 05 : Résultats des tests d'activité antioxydante :

Extraits	tests	moyens	SD (écart type)
Méthanol	DPPH	52,19	1,22
	ABTS	35,21	0,76
	CUPRAC	29,50	4,39
	Pouvoir réducteur	41,94	1,71
Acétate	DPPH	4,15	2,11
	ABTS	9,39	3,06
	CUPRAC	15,15	0,58
	Pouvoir réducteur	104,69	13,19
Chloroforme	DPPH	Nd	Nd
	ABTS	8,80	0,19
	CUPRAC	Nd	Nd
	Pouvoir réducteur	Nd	Nd

Nd: non déterminé

Avec l'extrait chloroformique, les résultats ont montré des valeurs d'IC₅₀ et A_{0,50} supérieur à 200 µg.

V- Discussion

Selon les travaux de (Lamnaouer, 2002), il a été montré la présence de polyphénols, flavonoïdes, tanins, coumarines, tèreptoïdes et des composés réducteurs et l'absence des alcaloïdes et saponines. Ces résultats confirment nos résultats.

Les taux de polyphénols et flavonoïdes l'extrait méthanolique égalent **11 ± 0,018 mg EAG/mg** et **2,93± 0,03 mg EQ/mg** respectivement.

Selon (Laouer et al., 2017), on observe que le dosage des polyphénols trouvé est supérieur à nos résultat, contrairement au dosage des flavonoïdes qui est presque le même : **49,43± 0,88 mg EAG/g** et **2,88 ±0,10 mg EQ/g** respectivement.

Le dosage des polyphénols et des flavonoïdes de l'extrait acétate a donné des valeurs de **95,33± 0,03 mg EAG/g** et **0,18± 0,06 mg EQ/g** respectivement.

(Amalich et al., 2007) ont montré que le taux des polyphénols est de **2,91 mg EAG/g**, inférieur à notre valeur ; celui des flavonoïdes, est de **11,82 mg EQ/g**, cette valeur est supérieure à notre valeur.

Cette différence, entre nos résultats et ceux trouvés dans la littérature, serait due au fait que les méthodes d'extractions peuvent affecter les résultats du fait de la solubilité des composés phénoliques. De plus le matériel végétal a été récolté dans des régions différentes de la nôtre et la distribution des métabolites secondaires peut changer pendant le développement de la plante (Christian, 2010), l'extraction des composés phénoliques est aussi influencée par le temps et la température d'extraction, ce qui reflète les actions paradoxales de la solubilisation et la dégradation par oxydation. Par conséquent, il est important de faire le bon choix de procédure /méthode d'extraction afin de maintenir la stabilité des composés phénoliques (Turkmen et al., 2007).

Les composés phénoliques semblent être de bons candidats pour leurs activités antioxydantes du fait de la présence de nombreux hydroxyles pouvant réagir avec les radicaux libres (Govindan et Muthukrishnan, 2013).

Avec le test DPPH, on a enregistré une IC_{50} : $4,15 \pm 2,11 \mu\text{g/ml}$. Cette valeur est nettement inférieure à celle trouvée par (Amalich et al., 2007) qui ont trouvé une IC_{50} de $94,4 \mu\text{g/ml}$, cette différence serait due à plusieurs paramètres à savoir ; aux méthodes d'extractions qui peuvent être à l'origine de cette différence et également étant donné les origines géographiques différentes des deux espèces. Notre espèce semble plus riche en composés antioxydants comme l'attestent les résultats des dosages en phénols totaux et en flavonoïdes.

Avec l'extrait acétate, le test DPPH a donné une valeur d' IC_{50} : $4,15 \pm 2,11 \mu\text{g/ml}$. Si on compare cette valeur avec celle trouvée par (Amalich et al., 2007), ($94,4 \mu\text{g/ml}$), nous constatons que notre extrait est nettement plus actif, cela serait due à la richesse en polyphénols et/ou en flavonoïdes dans nos extraits qui semblent de bons acteurs de l'activité antioxydante.

Avec l'extrait méthanolique ($IC_{50} = 52,19 \pm 1,22 \mu\text{g/ml}$) semble moins actif que celui des travaux de (Keskes et al., 2014) ($2 \mu\text{g/ml}$) et de (Bekhechi et al., 2012) ($6,5 \mu\text{g/ml}$).

La variabilité des teneurs en polyphénols chez cette espèce végétale est due probablement à la composition phénoliques des extraits (Hayouni et al., 2007), les conditions biotiques (espèce, organe et l'étape physiologique) et abiotiques (facteurs édaphiques), la nature du sol et le type du microclimat et aussi des étages bioclimatiques où poussent ces plantes (Atmani et al., 2009).

(Miliauskas et al., 2004) ont montré qu'un antioxydant efficace dans un test n'est pas forcément efficace dans un autre. Aussi les composés de chaque extrait en métabolites secondaires tel que ; les flavonoïdes, les coumarines, les tanins, assure leurs activité antioxydante, qui varie en fonction de la plante, l'âge de la plante, ...etc.

Des études sur les huiles essentiels dans l'extrait méthanolique, (Bekhechi et al., 2012) ont indiqué la valeur de IC_{50} du test DPPH comme suit $22,6\text{mg/l}$.

Selon la littérature, il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la bibliographie de manière générale à cause de différence du solvant d'extraction.

La richesse de ces extraits en composés chimiques actifs pourrait expliquer son utilisation traditionnelle pour soigner de nombreuses maladies, donc les extraits pourraient

être riches en métabolites secondaires, ce qui explique les diverses activités biologiques attribuées à ces derniers.

Conclusion

Les métabolites secondaires des plantes médicinales occupent une place importante dans la découverte de nouveaux médicaments. A l'heure actuelle, l'Algérie est un pays riche en termes de biodiversité, et l'usage des pharmacopées traditionnelles par les plantes est encore une pratique bien vivante.

Dans le présent travail, notre plante a fait l'objet de deux études, étude phytochimique et activité antioxydante des extraits.

Ainsi, le screening phytochimique est complété par la détermination de la teneur totale des polyphénols et flavonoïdes par différentes méthodes de deux extraits (acétate et méthanolique) qui ont révélés des teneurs de polyphénols de $95,33 \pm 0,03$ et $11 \pm 0,018$ mg EAG/mg respectivement, et des teneurs en flavonoïdes de $0,187 \pm 0,06$ et $2,937 \pm 0,031$ mg EQ/mg respectivement.

Nous avons étudié le pouvoir antioxydant par la capacité de piégeage du radical DPPH, ABTS, CUPRAC et pouvoir réducteur.

En comparant les IC_{50} et $A_{0,50}$ des différents extraits testés (acétate et méthanolique) par rapport aux standards, nous avons trouvé que :

- Pour l'extrait méthanolique : DPPH ($IC_{50} = 4,15 \mu\text{g/ml}$), ABTS ($IC_{50} = 35,21 \mu\text{g/ml}$), CUPRAC ($A_{0,50} = 29,50 \mu\text{g/ml}$), et pouvoir réducteur ($A_{0,50} = 41,94 \mu\text{g/ml}$).
- Pour l'extrait acétate les résultats se présentent comme suit : DPPH ($IC_{50} = 52,19 \mu\text{g/ml}$), ABTS ($IC_{50} = 9,39 \mu\text{g/ml}$), CUPRAC ($A_{0,50} = 15,15 \mu\text{g/ml}$) et pouvoir réducteur ($A_{0,50} = 104,69 \mu\text{g/ml}$).

Selon les résultats obtenus dans notre travail, nous constatons que *J.phoenicea* est riche en polyphénols totaux et présente des taux relativement faibles en flavonoïdes. Les bonnes activités antioxydantes avec les tests énumérés ci-dessus, nous pouvons supposer que ces activités seraient rattachées ou corrélées avec le taux des polyphénols. Mais il ne faut pas exclure les autres classes de métabolites mises en évidences dans les tests de screening phytochimique, qui pourraient contribuer en synergie ou de façon individuelle à ces activités.

Aussi, serait-il souhaitable, pour une meilleure compréhension du mode d'action des dérivés polyphénoliques, d'évaluer *in-vitro* et *in-vivo* l'activité antioxydante de chacun de ces composés pris séparément. Ce qui permettrait alors de mettre en évidence le principe actif des extraits de plante et/ou une éventuelle synergie entre les différents composés phénoliques et l'évaluation de leurs effets sur les signalisations impliquées dans les processus inflammatoires, ainsi que les enzymes impliquées dans la production des espèces oxygénées réactives.

Perspectives

Ces résultats ne sont qu'un premier pas dans la recherche des molécules biologiquement actives. Pour cela, nous envisageons de nombreuses perspectives en élargissant le panel des tests d'activité antioxydante par l'utilisation d'autres méthodes d'évaluation *in vitro* et *in vivo* et en faisant des études sur d'autres activités biologiques (antimicrobienne, anti-inflammatoire,...etc), et identifier les molécules actives par des méthodes, telles que spectroscopiques, chromatographiques,...etc, et exploiter ces molécules en biotechnologie (industries agroalimentaire et pharmaceutique,...etc.), en remplaçant les antioxydants synthétiques qui sont néfastes pour la santé humaine., il est primordial d'étudier la cytotoxicité de ces molécules afin de confirmer ou d'infirmer l'activité attribuée à cette plante.

Nos perspectives vont vers l'aboutissement de notre étude phytochimique et pharmacologique sur l'ensemble des phases qui ont montré une activité antioxydante concluante en vue de les valoriser. Il serait intéressant donc intéressant d'isoler et de caractériser les composés phénoliques des autres phases des plantes qui ont fait objet d'étude et de réaliser un criblage biologique sur les différentes parties de deux plantes.

En fin, l'ensemble de ces résultats obtenus *in-vitro* et *in-vivo* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances et source naturelle biologiquement active. Des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidences.

I- Références bibliographiques

A

Abdelli, W. (2017). Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* et de *Thymus vulgaris*. Thèse doctorat, Université de Mostaganem.

Adams, R.P. (2004). *Juniperus of the world: The genus Juniperus. Trafford Publishing Co, Vancouver.*

Adams, R.P., Pandey, N., Rezzi, S., Casanova, J. (2002). Geographic variation in the Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) of *Juniperus phoenicea*, J.p. var. canariensis, J.p. subsp. eumediterranea, and J. p.var. turbinata. *Biochemical Systematic Ecology*, 30(3), 223-229.

Akroum, S. (2011). Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse doctorat, Université de Constantine.

Akrout, A. (2004). Etude des huiles essentielles de quelques plantes pastorales de la région de Matmata (Tunisie). *Cahiers Options Méditerranéennes*, 62, 289-292.

Ali-Delille, L. (2013). Les plantes médicinales d'Algérie. 3eme ed. BERTI Edition, Alger, Algeria.

Allali, H., Benmehdi, H., Dib, M.A., Tabti, B., Ghalem, S. Benbadji, N. (2008). Phytotherapie of diabète in west Algeria. *Asian Journal of Chemistry*. 20(4), 2701-2710.

AMALICH, S., Fadili, K., Fahim, M., Hilali, F.E., Zaïr, T. (2016). Polyphenols content and antioxidant power of fruits and leaves of *Juniperus phoenicea* L. From Tounfite (Morocco). *Moroccan Journal of Chemistry*, 4(1), 4-1.

Amer, MMA., Wasif, M.M., Abo Aytta, A.M. (1994). Chemical and evaluation of *Juniperus phoenicea* as a hypoglycaemic agent. *J. Agric. Res.* 21: 1077-1091.

Apak, R., Guclu", K., Ozyurek, M., Karademir, S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion

reducing capability in the presence of neocupronine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.

Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H. (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, 112(2), 303-309.

B

Bekhechi, C., Atik Bekkara, F., Consiglio, D., Bighelli, A., Tomi, F. (2012). Chemical Variability of the Essential Oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* from Algeria. *Chemistry & biodiversity*, 9(12), 2742-2753.

Belfekih, F., El Yahyaoui, O., Chleh, M., Abdellahi, L. O., Sammama, A., Aicha, L., Bengueddour, R. (2017). Screening phytochimique d'arbutus unedo L, *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*. 5(3), 237-245.

Bellakhder, J. (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ed : Ibis press Paris, P 272.

Beloued, A. (2001). Plantes médicinales d'Algérie. Office Des Publication Universitaires. Ben Aknoun- Alger.

Benhammou, N. (2012). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse de doctorat

Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use a stable Free Radical. *Nature*, 4617(181), 1119-1200.

Boubekri, C. (2014). Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de doctorat, Université Mohamed Khider Biskra.

Bougandoura, N., Bendimerad, N. (2013). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technology*, (9), 14.

Boutiti, A. (2010). Etude phytochimique de l'espèce *Globularia alybum*. L. Mémoire magister.

Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4eme ed., Médicales internationales and Techniques et Documentations, Lavoisier, Paris.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3eme ed., Médicales internationales and Techniques et Documentations, Lavoisier, Paris, p : 1120.

C

Caudullo, G., de Rigo, D. (2016). *Juniperus phoenicea* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. (Eds.), European Atlas of Forest Tree Species. Publ.Off. EU, Luxembourg, pp.e012f63.

Christian, Z. (2010). Altitudinal variation of secondary metabolites in flowering heads of the asteraceae: trends and cause. *Phytochemistry Review*, 9(2), 197-203.

D

Debuigne, G., & Couplan, F. (2009). Petit Larousse des plantes médicinales. Larousse.

Derwich, E., Benziane, Z., Taouil, R., Senhadji, O. and Touzani, M. (2010). A Comparative Study of The Chimiical Composition of the Leaves Volatil Oil of *Juniperus phoenicea* and *Juniperus oxycedrus*. *Middle East Journal of Scientific Research*, 5(5), 416-424.

Ducerf, G. (2014). L'encyclopédie des plantes bio-indicatrices alimentaires et médicinales: guide de diagnostic des sols. 4me ed. Promonature.

E

Edeoga, H.O., Okwu, D.E., Mbaebie, B.O. (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African journal of biotechnology*, 4(7), 685-688.

F

Farrar Stoakes, S 2018. Peroxydation des lipides. *News Medical Life Sciences*.

Firdouse, S., Alam, P. (2011). Phytochemical investigation of extract of *Amorphophallus campanulatus* tubers. *International Journal of Phytomedicine*, 3(1), 32-35.

Fournier, P., Boisvert, C. (2010). Dictionnaire des plantes médicinales et vénéneuses de France. Omnibus.

G

Ghasemzadeh, A. Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(31), 6697-6703.

Govindan, P., Muthukrishnan, S. (2013). Evaluation of total phenolic content and free radical scavenging activity of *Boerhavia erecta*. *Journal of Acute Medicine*, 3(3), 103-109.

Grigonis, D., Venskutonis, P.R., Sivik, B., Sandahl, M., Eskilsson, C.S. (2005). Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloa odorata*). *The Journal of supercritical fluids*, 33(3), 223-233.

Guinebert, E., Durand, P., Prost, M., Grinand, R., Bernigault, R. (2005). Mesure de la résistance aux radicaux libres. *Acte du 6ème Journées de la Recherche Avicole, S Malo, les*, 30, 554-558.

H

Hadj Salem, J. (2009). Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique. Thèse de doctorat. Vandoeuvre-les-Nancy, INPL.

Harborne, B. J. (1998). *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. 3me ed., springer science & business media..

Harrar, A. (2012). Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. Thèse de magister, Université Ferhat Abbas de Sétif.

Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105(3), 1126-1134.

Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1), 3-6.

Herzi, N. (2013). Extraction et purification de substances naturelles: comparaison de l'extraction au CO₂-supercritique et des techniques conventionnelles. Thèse de doctorat, INPT.

Hlimi, A. (1997). Les plantes médicinales en Algérie. 290.

I

Iserin, P. (2008). Larousse des plantes médicinales.

K

Kaabèche, M. (2013). La flore d'Algérie : ressource de développement durable ou source de biopiraterie?. M'sila, Department of Nature and Life Sciences, Algérie. 81. P 15. *1st International Seminar on Medicinal Plants, Health and Environment.*

Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M. (2006). Screening 70 medicinal plants extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94, 550-557.

Keskes, H., Mnafgui, K., Hamden, K., Damak, M., El Feki, A., Allouche, N. (2014). In vitro anti-diabetic, anti-obesity and antioxidant proprieties of *Juniperus phoenicea* L. leaves from Tunisia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4, S649-S655.

L

Laouar, A., Klibet, F., Bourogaa, E., Benamara, A., Boumendjel, A., Chefrou, A., Messarah, M. (2017). Potential antioxidant properties and hepatoprotective effects of *Juniperus phoenicea* berries against ccl4 induced hepatic damage in rats. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 10(3), 263-269.

Lieutaghi, P. (2004). *Le livre des arbres, arbustes & arbrisseaux.* Actes Sud.

M

Macheix, J.J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques.

Madi, A. (2010). Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Mémoire de magister, Université Mantouri, Constantine.

Mansouri, N., Satrani, B., Ghanmi, M., Ghadraoui, L.E., Boukir, A., Aafi, A. (2011). Effet de la provenance sur le rendement, la composition chimique et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des rameaux de *Juniperus phoenicea* L. du Maroc. *Acta botanica gallica*, 158(2), 215-224.

Massaux, C. (2012) . Polyphénols : des alliés pour la santé. Abeilles & c^{ie}. (4).

Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., Van Beek, T.A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food chemistry*, 85(2), 231-237.

Müller, L., Gnoyke, S., Popken, AM., V. Böhm V. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), 922-999.

N

Nassour , J. (2015). Rôle du stress oxydant et des cassures de l'ADN dans l'émergence néoplasique post-sénescence. Thèse doctorat, Université du Droit et de la Santé - Lille II. France.

Ngene, J.P., Ngoule, C.C., Kidik, C.P., Ottou, P.M., Dibong, S.D., Mpondo, E.M. (2015). Importance dans la pharmacopée traditionnelle des plantes à flavonoïdes vendues dans les marchés de Douala est (Cameroun). *Journal of Applied Biosciences*, 88(1), 8194-8210.

O

Ouali, K., Trea, F., Toumi, L., Bairi, A., Maurel, D., Guellati, M. A. (2007). L'héspéridine, un antioxydant flavonoïde qui diminue le stress oxydatif et prévient les malformations fœtales au cours du diabète gestationnel expérimental. *Phytothérapie*, 5(4), 204-209.

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44(6), 307-315.

P

Pawlowska, A.M., De Leo, M., Braca, A. (2006). Phenolics of *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) fruits: Identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 10234-10238.

Pouthier, T. (2006). Mise en évidence de cassures double brin de l'ADN induites par irradiation de kératinocytes humains en microfaisceau alpha. Doctoral dissertation, Université Sciences et Technologies-Bordeaux.

R

Randrianarivelo, R. (2010). Etude de l'activité antimicrobienne d'une plante endémique de Madagascar « *Cinnamosma fragrans* », alternative aux antibiotiques en crevetticulture.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

Rolland, Y. (2004). *Antioxydants naturels végétaux. Oléagineux, Corps gras, Lipides*. Review. 11(6), 419-424.

S

Sarni-Manchado P, Cheynier V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Techniques et Documentations, Lavoisier Paris, 300-398.

Simoncini, I. (2015). Oligo-éléments : les micro-éléments aux macro-effets .blog.nutriflshop.

Singleton, V.L and Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.

T

Teibi, M. (1992). Contribution à l'étude de l'estimation de biomasse aérienne d'un taillis de chêne vert (*Quercus ilex*) et de deux Genévriers : Genévrier oxycèdre, Genévrier de Phénicie dans la région de Kesserou. Mémoire d'ingénieur en agroalimentaire. Université de Batna, Algérie.

Thorin-Trescases, N., Voghel, G., Farhat, N., Drouin, A., Gendron, M.È., Thorin, É. (2010). Âge et stress oxydant-Vers un déséquilibre irréversible de l'homéostasie endothéliale. *médecine/sciences*, 26(10), 875-880.

Topç̇u, G., Ay, A., Bilici, A., Sarikürkcü, C., Öztürk, M., Ulubelen A. (2007). A new flavones from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103(3), 816-822.

Tran, D.T. (2015). Conception et synthèse de sondes moléculaires pour l'étude d'interactions polyphénol-protéine. Thèse doctorat, Université de Bordeaux.

Turkmen, N., Velioglu, Y.S., Sari, F., Polat, G. (2007). Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*.

V

Vignes, P., Vignes, D. (2007). L'herbier des plantes sauvages: à l'usage de tous les amateurs: 275 espèces botaniques répertoriées: usage, culture, description, particularités. Larousse.

W

Wang, L., Waller, C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*, 17(6), 300-312.

Weill, B., & Batteux, F. (2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. De Boeck Supérieur.

II- Sites web

Site web 1 : Exposition « *Genévriers, usages et tourments* » IV^e colloque international sur le genévrier thurifère, 5 – 8 octobre 2011 à Mont-Dauphin & Saint-Crépin (Hautes-Alpes). L'EPI page consulté le 10/03/2018.

En ligne : URL :<http://ethnobotanique-epi.org/genevriers-usages-tourments/>.

Site web 2: Benabdallah, H. Techniques d'extraction, de purification et de conservation
Page consulté le 07/05/2018.

En ligne:URL: <https://fsnv.univ-setif.dz/telecharger/polycopie/benabdallah%20hassiba.pdf>.

Annexe A

Test des alcaloïdes

Réactif de Mayer :

Chlorure de mercure 1,36 g

Iodure de potassium..... 5 g

Eau distillée..... qsp 100 ml

Réactif de Wagner :

Iodure de potassium..... 2 g

Iode..... 1,27 g

Eau distillée..... qsp 100 ml

Annexe B

Dosage du Total Phénolique, TPC (Total Phenolic Content)

Préparation de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7.5% :

7.5g de Na_2CO_3 et sont dissouts dans 100 ml d'eau distillée.

Préparation de l'extrait de plante :

Une masse de 1 mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1 ml de l'eau distillée (ou Méthanol).

Préparation de Folin Ciocalteu (FCR) dilué 10 fois

1 ml de la solution FCR concentré (2M) est complété à 10 ml avec l'eau distillée (9ml).

Gamme d'étalonnage :

Préparation de la gamme d'étalon de l'acide gallique :

On prend 0.5 mg de l'acide gallique et on le dissout dans 5 ml de méthanol pour obtenir la solution S1 (0.2mg/ml). Les dilutions sont préparées dans des eppendorfs comme la suite :

25 µg/ml	—————>	25 µl S1 + 175 µl MeOH
50 µg/ml	—————>	50 µl S1 + 150 µl MeOH
75 µg/ml	—————>	75 µl S1 + 125 µl MeOH
100 µg/ml	—————>	100 µl S1 + 100 µl MeOH
125 µg/ml	—————>	125 µl S1 + 75 µl MeOH
150 µg/ml	—————>	150 µl S1 + 50 µl MeOH
175 µg/ml	—————>	175 µl S1 + 25 µl MeOH
200 µg/ml	—————>	200 µl S1

20 µl de chaque dilution sont transférés dans une microplaque + 100 µl de FCR dilué (1 :10) + 75 µl de Na₂CO₃ (7.5%) + incubation 2h + lecture à 765 nm.

Dosage du total Flavonoïdes, TFC (Total Flavonoid Content)

Préparation des solutions :

- Pour 1 M potassium acétate (CH₃COOK) on dissout 9.80 gramme de (CH₃COOK) dans 100 ml d'eau distillé pour obtenir la solution (S1).
- Pour 10% nitrate d'aluminium (Al(NO₃)₃, 9H₂O) on pèse 10g de ce produit dans 100 ml d'eau distillée.

Préparation de l'extrait de plante :

Une masse de 1 milligramme d'extrait est dissoute dans un volume de 1 ml de méthanol pour obtenir la solution (S2).

Préparation de la gamme d'étalon de la Quercetin :

On prend 1 mg de la Quercetin et on le dissout dans 5 ml de méthanol pour obtenir la solution 0.2mg/ml Sm.

Les dilutions sont préparées dans des eppendorfs comme la suite :

Quercetin (25) —————→ 25 μ l Sm + 175 μ l MeOH

Quercetin (50) —————→ 50 μ l Sm + 150 μ l MeOH

Quercetin (75) —————→ 75 μ l Sm + 125 μ l MeOH

Quercetin (100) —————→ 100 μ l Sm + 100 μ l MeOH

Quercetin (125) —————→ 125 μ l Sm + 75 μ l MeOH

Quercetin (150) —————→ 150 μ l Sm + 50 μ l MeOH

Quercetin (175) —————→ 175 μ l Sm + 25 μ l MeOH

Quercetin (200) —————→ 200 μ l Sm + 0 μ l MeOH

50 μ l de chaque dilution sont transférés dans une microplaque 96 puits + 130 μ l [MeOH] + 10 μ l (S1) [CH₃COOK] + 10 μ l [Al(NO₃)₂, 9H₂O] + attendre 40 mn + lecture à 415 nm.

Glossaire

Abcès : c'est une accumulation locale de pus après nécrose dans une cavité néoformée.

Anti-inflammatoire : se dit d'un agent, d'un médicament qui fait dégonfler et diminuer l'irritation.

Antioxydant : est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques.

Antiseptique : qui détruit les microbes et empêche leur développement

Arthrite : inflammation aiguë ou chronique des articulations.

Bronchite : c'est une inflammation des bronches, des poumons, qui entraîne l'arrêt du fonctionnement des cils des cellules épithéliales.

Dépuratif : corps contribuant à l'expulsion des impuretés du sang.

Dioïque : dont les individus ne portent que des fleurs du même sexe.

Diurétique : qui favorise la production des urines.

Eczéma : nom de diverses maladies de la peau, caractérisées par des vésicules, une sécrétion séreuse et une desquamation consécutive de l'épiderme.

Ménopause : fin de l'activité générale chez les femmes.

Névralgie : douleur vive, ressentie sur le trajet des nerfs.

Rhumatisme : maladie caractérisée par une fluxion douloureuse des articulations.

Stomachique : propre à rétablir le fonctionnement de l'estomac.

Sudorifique : production des sueurs.

Epicatechine : c'est un composé de la famille des flavonoïdes de la sous-classe des flavanols. Elle est aussi connue sous le nom de catéchol.

Monoïque : se dit d'une espèce végétale dont les individus portent des fleurs mâles et fleurs femelles.

Master Académique

Option : biochimie appliquée

Date de la soutenu : 20/06 /2018

Présenté par :

KALKOUL Souad

MOUHOUBI Meryem

Thème :

*Evaluation de l'activité biologique de l'extrait méthanolique de
« Juniperus phoenicea »*

Résumé

Ce travail a porté sur l'étude phytochimique, l'évaluation des activités antioxydantes de la plante *Juniperus phoenicea* utilisée en médecine traditionnelle.

J. phoenicea est surtout utilisée comme parasiticide, cicatrisant contre les abcès, la bronchite, certains cas d'eczéma, diarrhée, rhumatisme, affections des voies urinaires, dermatoses, névralgies dentaires et de traiter les angines. L'étude phytochimique des feuilles de la plante a révélé la présence des métabolites secondaires notamment ; des polyphénols, des flavonoïdes, des coumarines, des tanins, des terpénoïdes et des composés réducteurs. Les dosages quantitatifs de deux extraits (acétate et méthanol) des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu ont été révélés des teneurs $95,33 \pm 0,03$ et $11 \pm 0,018$ mg EAG/g respectivement, et le dosage des flavonoïdes par la méthode d'Al $(NO_3)_3$ a indiqué les valeurs $0,187 \pm 0,06$ et $2,937 \pm 0,031$ mg EQ/g respectivement. L'activité antioxydante des feuilles de la plante avec le test DPPH de l'extrait d'acétate et méthanolique a montré des valeurs intéressantes, en particulier celui de la phase acétate, avec des IC_{50} sont 4,15 et 52,19 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Avec le test de réduction du radical cation $ABTS^+$, la phase acétate et méthanolique ont affichés des valeurs d' IC_{50} de 9,39 et 35,21 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Tandis qu'en ce qui concerne le test de CUPRAC de la phase acétate et méthanolique, leurs $A_{0,50}$ égales à 15,15 et 29,50 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Le test du pouvoir réducteur de la phase acétate, et celui de la phase méthanolique, a montré des $A_{0,50}$: 104,69 et 41,94 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Ces résultats peuvent être considérés comme point de départ pour des applications thérapeutiques et justifiés leur utilisation traditionnelle.

Mots clés : *Juniperus phoenicea, activité antioxydante, méthanol, acétate, métabolites secondaires.*

Jury d'évaluation :

Président :	M ^{me} BOUAKKAZ Amel	MCB	Univ. Khenchela
Promoteur :	M ^r HABIBATNI Sofiane	MAA	Univ. Khenchela
Examineur:	M ^{me} DJEMIL Randa	MCB	Univ. Khenchela

Lieu de travail :

Laboratoire de l'université Abbes Laghrour-Khenchela

CRBT (Centre de Recherche en Biotechnologie) Constantine

Année Universitaire 2017-2018