



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET
POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Filière: Sciences Biologiques

Spécialité: *Biochimie Appliquée*

Intitulé

Etude des propriétés antioxydantes, antidiabétiques et anti-inflammatoires *in vitro* des extraits de la plante médicinale *Capparis spinosa* L (*Capparidaceae*).

Présenté et soutenu publiquement

Le : 24/07/2019

Par

BOUZIANE Khaoula & ROUIBAH Loubna

Jury d'évaluation :

Mr. KITOUNI Rachid.	(M-C-B-UFM Constantine1)	Président.
Mr. BOUANIMBA Nour	(M-C-A-UFM Constantine1)	Rapporteur.
Mr. HAROUNI Soufiane	(M-A-A-UFM Constantine1)	Examineur.

Année universitaire
2018 - 2019

Tables des matières

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

Chapitre I : Aperçu bibliographique

I. Phytothérapie et étude botanique

1	Phytothérapie.....	4
2	Phytothérapie en Algérie.....	4
3	Plantes médicinales	5
4	Généralité de la famille <i>Capparidaceae</i>	5
4.1	Généralité sur le genre <i>Capparis</i>	6
4.2	Présentation de l'espèce <i>Capparis spinosa L</i>	6
4.2.1	Donnés botaniques.....	7
4.2.1.1	Description de la plante <i>Capparis spinosa L</i>	7
4.2.1.2	Position systématique.....	8
4.2.1.3	Le nom vernaculaire.....	8
4.2.2	Origine et historique	8
4.2.3	Aire de répartition du câprier.....	9
4.2.3.1	Distribution mondiale.....	9
4.2.3.2	Situation dans le pourtour méditerranéen.....	9
4.2.3.3	Situation géographique du câprier en Algérie	10
4.2.4	Usage traditionnelle du <i>Capparis spinosa L</i>	12
4.2.4.1	Parties utilisées en Algérie	12
4.2.5	Composition chimique de <i>Capparis spinosa L</i>	13
4.2.6	Effets biologiques de <i>Capparis spinosa L</i>	15

II. Métabolites secondaires

1	Généralité sur les métabolites secondaires.....	16
2	Composés phénoliques.....	17
2.1	Principes voies de biosynthèse des polyphénols	19
2.1.1	Voie Shikimate	19

2.1.2	Voie acétate-malonate.....	20
2.2	Principaux groupes des polyphénols.....	20
2.2.1	Phénols simples.....	21
2.2.2	Acides phénoliques.....	21
2.2.2.1	Acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque.....	21
2.2.2.2	Acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique.....	22
2.2.3	Coumarines.....	23
2.2.4	Stilbènes.....	23
2.2.5	Flavonoïdes.....	24
2.2.6	Lignanes.....	28
2.2.7	Lignines.....	28
2.2.8	Tannins.....	29
3	Intérêt des métabolites secondaires.....	31
3.1	Intérêt des polyphénols.....	31
3.2	Intérêt des flavonoïdes.....	31

III. Activités biologiques

1	Activité antioxydante.....	32
1.1	Stress oxydant.....	32
1.2	Radicaux libres.....	32
1.2.1	Espèces réactives oxygénées (ERO) des radicaux libres.....	33
1.2.2	Radical super oxyde.....	34
1.2.3	Peroxyde d'hydrogène H ₂ O ₂	34
1.2.4	Radical hydroxyle.....	34
1.3	L'origine du stress oxydatif.....	35
1.4	Rôle physiologique des radicaux libres.....	35
1.5	Les conséquences du stress oxydatif.....	36
1.5.1	Domages oxydatifs à l'ADN.....	36
1.5.2	Domages oxydatifs aux Lipides.....	36
1.5.3	Domages oxydatifs aux protéines.....	36

1.6	Maladies liées au stress oxydatif	37
1.7	Mécanismes de défense contre le stress oxydant	37
1.7.1	Système antioxydant enzymatique.....	38
1.7.1.1	Catalase	38
1.7.1.2	Glutathion Peroxydase (GPX).....	38
1.7.1.3	Super oxydes dismutases (SOD)	38
1.7.1.4	Glutathion réductases (GRD).....	38
1.7.2	Système antioxydant endogène non enzymatique	39
1.7.2.1	Glutathion.....	39
1.7.2.2	L'acide urique	39
1.7.2.3	Bilirubine.....	39
1.7.3	Système antioxydant exogène.....	39
1.7.3.1	L'acide ascorbique (vitamine C)	40
1.7.3.2	L' α -tocophérol (vitamine E).....	40
1.7.3.3	Caroténoïdes.....	40
1.7.3.4	Zinc	41
1.8	Antioxydants de synthèse.....	41
1.9	Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.....	41
2	Activité anti-Alzheimer.....	42
3	Activité antidiabétique	43
3.1	Définition de diabète	43
3.2	Types de diabète.....	43
3.2.1	Diabète de type 1	43
3.2.2	Diabète de type 2	44
3.3	Diabète et les plantes médicinales.....	44
3.4	Diabète et le stress oxydatif	44
4	Activité anti-inflammatoire	45
4.1	Types d'inflammation	45
4.1.1	Inflammation aiguë.....	45

4.1.2	Inflammation chronique.....	45
4.2	Anti-inflammatoires	46
4.2.1	Anti-inflammatoires stéroïdiens	46
4.2.2	Anti-inflammatoires non stéroïdiens	46
4.2.3	Anti-inflammatoires traditionnels.....	47

Chapitre II : matériel et méthodes

1	Aperçu et but de travail	48
2	Matériel végétale.....	48
2.1	Description de la zone de la récolte.....	48
2.2	Récolte de la plante <i>Capparis spinosa L</i>	49
3	Méthodes d'analyses phytochimiques.....	49
4	Etude phytochimique de la plante de l'espèce <i>Capparis spinosa L</i>	50
4.1	Préparation de la poudre végétale	50
4.2	Extraction par macération à froid (solide - liquide)	51
4.3	Extraction liquide - liquide (Affrontement)	51
4.4	Expression du rendement d'extraction	54
4.5	Caractéristique quantitative et qualitative des extraits	54
4.5.1	Dosage des polyphénols totaux.....	54
4.5.2	Dosage des flavonoïdes	55
4.5.3	Analyse HPLC de composés phénoliques	56
4.6	Evaluation des activités biologiques des extraits	56
4.6.1	Activité antioxydante.....	56
4.6.1.1	Test de piégeage du radical 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH).....	57
4.6.1.2	Test par piégeage du radical ABTS+•.....	59
4.6.1.3	Test de chélation des Ions ferreux (métal chélate)	60
4.6.1.4	Test de balayage du radical Galvinoxyl (GOR)	61
4.6.1.5	Test de la capacité antioxydante par réduction de l'ion cuprique (CUPRAC).....	62
4.6.1.6	Test de la capacité antioxydante par réduction de fer (Pouvoir réducteur)	63
4.6.1.7	Test de l'activité phénanthroline	64

4.6.2	Evaluation de l'activité anti Alzheimer	64
4.6.3	Evaluation de l'activité antidiabétique	66
4.6.3.1	Activité inhibitrice de l' α -amylase	66
4.6.3.2	Activité inhibitrice de l' α -glycosidase	67
4.6.4	Evaluation de l'activité anti-inflammatoire	68
4.6.4.1	Etude <i>In vitro</i> de l'effet anti-théromodénaturant des extraits	68
5	Analyse statistique.....	70

Chapitre III : résultats et discussion

1	Expression du rendement d'extraction	71
2	Dosage des polyphénols et des flavonoïdes	71
2.1	Teneurs en polyphénols.....	71
2.2	Teneurs en flavonoïdes totaux.....	73
3	Analyses HPLC des composés phénoliques.....	74
4	Résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante.....	78
4.1	Test de piégeage du radical 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH)	78
4.2	Test par piégeage du radical ABTS+•	80
4.3	Test de chélation des Ions ferreux (métal chélate)	83
4.4	Test de balayage du radical Galvinoxyl (GOR)	84
4.5	Test de l'activité réductrice de l'ion cuprique (CUPRAC)	87
4.6	Test de la capacité antioxydante par réduction de fer (Pouvoir réducteur)	89
4.7	Test de l'activité phénanthroline	91
5	Evaluation de l'activité anti Alzheimer.....	93
5.1	Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase	93
5.2	Activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase.....	94
6	Evaluation de l'activité antidiabétique	96
6.1	Activité inhibitrice de l' α -amylase	96
6.2	Activité inhibitrice de l' α -glycosidase	98
7	L'activité anti-inflammatoire	101
7.1	Etude <i>In vitro</i> de l'effet anti-théromodénaturant des extraits.....	101

Conclusion..... 101

Références

Annexes

Liste des figures

Figure I.1. Photographie de la plante <i>Capparis spinosa</i> L (A) les feuilles, la fleur et les fruits. (B) les capres.....	7
Figure I.2. Photo de <i>Capparis spinosa</i> L. (Capparidaceae) au stade fleuraison (Oued Metlili, région de Ghardaïa, Sahara septentrional Est algérien "Avril 2011")	7
Figure I.3. Distribution naturelle du Câprier en Afro-Eurasie	9
Figure I.4. Carte de répartition biogéographique du Câprier	12
Figure I.5. Exemple des composés présents naturellement dans <i>C. spinosa</i> L (A) Structures chimiques des alcaloïdes ; (B) Structures chimiques des flavonoïdes.....	15
Figure I.6. Formule chimique brute d'une fonction phénol (C ₆ H ₅ OH).....	17
Figure I.7. Schéma de classification des quelques métabolites secondaires	18
Figure I.8. Synthèse de tyrosine et de phénylalanine via l'acide shikimique.....	19
Figure I.9. Synthèse de polycéto-acides.....	20
Figure I.10. Squelettes chimiques de quelques phénols simples.....	21
Figure I.11. Formule générale et dérivés de l'acide benzoïque.....	22
Figure I.12. Formule générale et dérivés de l'acide cinnamique.	22
Figure I.13. Structure générale et dérivées des coumarines.	23
Figure I.14. (a) la structure générale des stilbènes, (b) le trans-resvératrol.	23
Figure I.15. Structure de base des flavonoïdes.....	24
Figure I.16. Différentes classes des flavonoïdes.	27
Figure I.17. Voie mixte de la biosynthèse des flavonoïdes shikimate-malonate	27
Figure I.18. Structure générale des lignanes	28
Figure I.19. Les monolignols dérivés des acides hydroxycinnamiques et leur intégration dans la lignine	29
Figure I.20. Tannin hydrolysable : gallotannin.	30
Figure I.21. La structure représente respectivement un procyanidine (110) ou un prodelphinidine (111).	31
Figure I.22. Déséquilibre de la balance des espèces peroxydant et des systèmes de défense antioxydants	32
Figure I.23. Formation de radicaux libres à partir de l'oxygène	33
Figure I.24. Principales sources des radicaux libres	35
Figure I.25. Action des antioxydants au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène.....	37
Figure I.26. Les symptômes d'une réaction inflammatoire.....	45
Figure I.27. Cascade arachidonique et site d'action des AIS et AINS.....	47
Figure II.1. Zaghia wilaya de Mila.....	48

Figure II.2. Spectrophotomètres UV-visible. (a) lecteur de microplaque Perkin Elmer, (b) spectrophotomètre à cuve.....	49
Figure II.3. Système quaternaire de l'HPLC.....	50
Figure II.4. Etapes de préparation de la poudre végétale des parties aériennes de <i>C. spinosa L.</i>	50
Figure II.5. Etapes de macération des parties aériennes de la plante et procédé de concentration des filtrats méthanoliques.....	51
Figure II.6. Etapes d'extraction liquide-liquide et procédé de concentration de chaque extrait	52
Figure II.7. Schéma du protocole d'extraction de <i>Capparis spinosa L.</i>	53
Figure II.8. Réaction de réduction du radical DPPH.....	57
Figure II.9. Oxydation de l'ABTS par le persulfate de potassium et génération de ABTS+•.....	59
Figure II.10. Réduction du complexe néocuproïne/cuivre (II).....	62
Figure II.11. Mécanisme chimique de la méthode d'Ellman's	65
Figure II.12. Principe d'action de l' α -glycosidase.....	67
Figure III.1. Illustration du dosage des polyphénols totaux.....	72
Figure III.2. Illustration de dosage des flavonoïdes totaux.....	73
Figure III.3. Chromatogrammes A, B, C, D et E représentant les composés phénoliques de cinq échantillons de <i>Capparis spinosa L</i> analysés par HPLC et détectés à 280 nm. G : acide gallique, C : acide caféique, R : rutine	78
Figure III.4. Courbe de pourcentage d'inhibition du DPPH par différents extraits de plante.....	78
Figure III.5. Valeurs des IC ₅₀ des échantillons étudiés classer en ordre croissant.....	79
Figure III.6. Schéma de la plaque de dosage de l'activité antiradicalaire (DPPH).....	79
Figure III.7. Courbes de pourcentage d'inhibition en fonction de concentration du radicale l'ABTS. 81	
Figure III.8. Les IC ₅₀ des échantillons testés classées par ordre croissant (ABTS).....	81
Figure III.9. Schéma de la plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (ABTS).....	82
Figure III.10. Schéma de la plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (métal chélate).....	84
Figure III.11. Courbes de pourcentage d'inhibition en fonction de concentration du radicale Galvinoxyl.....	85
Figure III.12. Les IC ₅₀ des échantillons testés classées par ordre croissant (GOR).....	86
Figure III.13. Schéma de la plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (GOR).....	86
Figure III.14. Courbes des absorbances en fonction des concentrations (CUPRAC).....	88
Figure III.15. Illustration de la réaction colorimétrique du test CUPRAC des extraits.....	88
Figure III.16. Courbes des absorbances en fonction des concentrations (Pouvoir Réducteur).....	90
Figure III.17. Illustration de la réaction colorimétrique du test du pouvoir réducteur des extraits.....	90
Figure III.18. Courbes des absorbances en fonction des concentrations.....	92
Figure III.19. Illustration de la réaction colorimétrique du test phénanthroline des extraits.....	92
Figure III.20. Illustration de la réaction colorimétrique de l'activité anticholinestérase.....	94
Figure III.21. Illustration de la réaction colorimétrique de l'activité anti-butrylcholinestérase.....	95

Figure III.22. Courbe de pourcentage d'inhibition de α -amylase à différentes concentrations des extraits et du standard.	96
Figure III.23. Les IC_{50} des échantillons testés classés par ordre croissant (α -amylase).	97
Figure III.24. Illustration de la réaction colorimétrique du test d'inhibition de l' α -amylase des extraits.	97
Figure III.25. Courbe de pourcentage d'inhibition de l' α -glucosidase par différents extraits de plante.	99
Figure III.26. Valeurs des IC_{50} exprimés en mg/ml des échantillons étudiés classés en ordre croissant.	99
Figure III.27. Illustration de la réaction colorimétrique du test d'inhibition de l' α -glycosidase des extraits.	100
Figure III.28. Courbe de pourcentage d'inhibition de la dénaturation de BSA à différentes concentrations des extraits.	102
Figure III.29. Les IC_{50} des échantillons testés classés par ordre croissant (dénaturation de BSA). ..	103

Liste des tableaux

Tableau I.1. Taxonomie de <i>Capparis spinosa L</i>	8
Tableau I.2. Tableau récapitulatif des enquêtes de terrain	11
Tableau I.3. Exemples de plantes médicinales douées d'activités anti-inflammatoires.....	47
Tableau II.1. Série de dilutions et concentration respectives de l'extrait méthanolique.	58
Tableau II.2. Série de dilutions et concentration respectives de l'extrait butanolique.	69
Tableau III.1. Poids des extraits avec le rendement d'extraction.....	71
Tableau III.2. Teneur des différents Extraits de <i>Capparis spinosa L</i> en Polyphénols Totaux et en flavonoïdes.	74
Tableau III.3. Concentrations de composés phénoliques dans les extraits de <i>Capparis spinosa L</i> détectées par HPLC.....	75
Tableau III.4. Pourcentage d'inhibition d'activité antioxydante par le test de chélation aux ions ferreux.	83
Tableau III.5. Valeurs de pourcentages d'inhibition de l'acétylcholinestérase selon les concentrations effectuées de chaque extrait.	93
Tableau III.6. Valeurs des pourcentages d'inhibition de butyrylcholinestérase selon les concentrations effectuées de chaque extrait.	95

Liste des abréviations et symboles

% : Pourcent et Pourcentage.

> : Supérieur.

± : Plus ou moins.

°C : Degré celcius.

ABTS : 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).

AC : Acide.

AChE : Acétylcholinestérase.

AChI : l'iodure d'acétylthiocholine.

ActOH : acétate d'éthyle.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

Al (NO₃)₃, 9H₂O : Nitrate d'aluminium.

Al₃⁺ : Ions d'aluminium.

BChE : Butyrylcholinestérase.

BHA : butyl-hydroxy-anisole.

BHT : butyl-hydroxy-toluène.

BSA : Bovine Sérum Albumine.

BuOH : butanol.

CAE : acide caféique.

CH₃COOK : Potassium acétate.

CHCl₃ : chloroforme.

Cl⁻ : ion de chlore.

COA : coenzyme A.

Cu : Cuivre.

CUPRAC : Cupric Réduicing Antioxydant Capacity.

DAD : détecteur à barrette de diodes.

DCM : dichlorométhane.

DO : Densité optique.

DPPH : 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl.

DTNB : Acide 5,5'-dithio-bis-[2-nitrobenzoïque].

EDTA : acide éthylène diamine tétracétique.

EP : éther de pétrole.

ERO : Espèces réactives de l'oxygène.

FAD : Flavine Adénine Di nucléotide.

FADH₂ : Forme réduite de la flavine adénine.

Fe : Fer.

FeCl₃ : Chlorure de fer.

g : Gramme.

GOR : radical Galvinoxyl.

GPX : Glutathion Peroxydase.

GRD : Glutathion réductases.

GSH : Glutathion réduit.

GSSG : Glutathion disulfure.

H₂O : Eau distillée.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

H₃PMo₁₂O₄₀ : acide phosphomolybdique.

H₃PW₁₂O₄₀ : acide phosphotungstique.

HCl : Acide Chlorhydrique.

HPLC : Chromatographie liquide haute performance.

IC₅₀ : Inhibition concentration (Concentration inhibitrice à 50%).

IKI : iode/iodure de potassium.

K⁺ : ion de Potassium.

K₂S₂O₈ : Persulfate de potassium.

Km : kilomètre.

LDL : lipoprotéine de basse densité.

MeOH : méthanol.

mg EQ/g d'extrait : Milligramme d'équivalent de La quercétine par gramme d'extrait sec.

mg GAE/g dw : milligramme d'équivalent de l'acide gallique par gramme d'extrait sec.

mg RUE/g : Milligramme d'équivalent de la rutine par gramme d'extrait sec.

mg : milligramme.

min : Minute.

ml : Millilitre.

mm : Millimètre.

mM : millimolaire.
MO₈O₂₃ : molybdène.
Na⁺ : ion de sodium.
NADPH : Nicotinamide Adénosine Di
nucléotide Phosphate.
NC : néocuproïne.
ND : non détecté.
nm : Nanomètre.
O₂ : oxygène.
O₃ : l'ozone.
OH : Hydroxyle.
PAL : Phénylalanine-ammonia-lyase.
PEP : phosphoénolpyruvate.
PH : Potentiel d'hydrogène.
ppm : parties par million.
ROS : radicaux libres et de métabolites
réactifs.

SM : Solution mère.
SOD : Super oxyde dismutase.
TCA : tri-chloro acétique acide.
TFC : Total flavonoïde content (teneur en
flavonoïdes totaux).
TPC : Total phénolique content (teneur en
polyphénols totaux).
T_R : temps de rétention.
UV : Ultra-violet.
W₈O₂₃ : tungstène.
XIX^{ème} : dix-neuvième siècle
CEE : communauté européenne
λ_{max} : Longueur d'onde maximale.
μl : Microlitre.
μm : Micromètre.

Introduction générale



Depuis l'aube de l'humanité, l'homme s'est intéressé aux plantes et les a utilisées de plusieurs façons ; essentiellement comme aliment ainsi pour traiter ses différentes maladies en absence des composés chimiques qui existent de nos jours.

Mais, pendant longtemps, cette utilisation a lieu sans que l'on connaisse les spécificités biologiques des plantes et sans faire la distinction entre une plante comestible et une plante toxique. Selon l'OMS, 80% de la population mondiale utilise les plantes médicinales pour se soigner. La valeur médicinale des plantes est de plus en plus démontrée scientifiquement, ce qui constitue un argument de taille pour leur utilisation en médecine [Segnou *et al.* 1992 ; Aighewi *et al.* 1998].

En effet, on appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies. Les plantes aromatiques sont utilisées comme tous les végétaux en médecine, en parfumerie, en cosmétologie et pour l'aromatisation culinaire. Elles font partie de notre quotidien sans que nous le sachions. Il reste difficile de définir les molécules responsables de l'action de ces plantes, bien que certains effets pharmacologiques prouvés sur l'animal aient été attribués aux métabolites secondaires tel que les polyphénols et flavonoïdes [ghazghazi *et al.* 2013].

L'oxygène est essentiel à la vie des cellules aérobies, paradoxalement cette molécule peut présenter des effets toxiques via ses dérivés partiellement réduits appelés espèces oxygénées réactives (EOR). En faible concentration, les EOR sont indispensables à la vie cellulaire en intervenant dans plusieurs processus physiologiques tels que la signalisation cellulaire, la régulation de la réponse immunitaire, mais, à fortes doses, elles deviennent destructrices. Heureusement, La cellule dispose de mécanismes protecteurs capables de contrer l'action oxydante de ces EOR, cependant, lorsque leurs productions excèdent les capacités de détoxification cellulaires, un déséquilibre se produit. L'implication du stress oxydant dans une multitude de maladies en l'occurrence les troubles neurodégénératifs, les maladies cardiovasculaires, le cancer et le diabète sont confirmés par plusieurs chercheurs. Ce déséquilibre peut être compensé par un apport externe en antioxydants [Benzidane Nadia. 2014]. Une multitude de plantes médicinales ont été prouvées riches en antioxydants. D'autres effets très intéressants sont attribués aux plantes médicinales y compris leurs propriétés anti-inflammatoires, antidiabétique, antimicrobienne, anti Alzheimer, protectrices des cellules hépatiques, antidépressive...etc. ces activités jouent un rôle dans la lutte contre plusieurs



maladies grâce à la présence des composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes et autres métabolites secondaires.

L'Algérie est caractérisée par sa diversité florale : Méditerranéenne, Saharienne et une flore Paléo Tropicale, estimée à plus de trois milles (3000) espèces appartenant à plusieurs familles botaniques. Ces espèces sont pour la plupart spontanées avec un nombre non négligeable (15%) d'espèces endémiques [Ozenda. 1977 ; Gausсен et Leroy. 1982]; ce qui a donné à la pharmacopée traditionnelle une richesse inestimable. Parmi ces espèces, El Kabbar ou *Capparis spinosa* L connu dans les régions semi-arides particulièrement dans l'Est Algérien, est largement utilisé dans la médecine traditionnelle et en nutrition.

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une contribution à une meilleure connaissance et valorisation des plantes médicinales de l'Algérie et à la découverte éventuelle d'extraits à activités pharmacologiques. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et la détermination du contenu en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de la partie aérienne de *Capparis spinosa* L avec une analyse quantitatif et qualitatif par HPLC, ainsi l'évaluation de ses activités ; antioxydante par sept méthodes (DPPH, ABTS, GOR, CUPRAC, pouvoir reducteur, phénanthroline et métal chélate), anti Alzheimer par inhibition de deux enzymes acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BChE), antidiabétique aussi par inhibition de deux enzymes différentes, α -amylase et α -glycosidase et antiinflammatoire par la méthode de dénaturation de la bovine sérum albumine (BSA), de cette plante médicinale.

Ce travail est scindé en trois chapitres :

- ❖ Le **premier** concerne la recherche bibliographique, réunit en trois volets différents distincts :
 - ✓ Le **1^{er}**, consacré à la phytothérapie, aux aspects botaniques et aux études chimiques antérieures, inclus une présentation de l'espèce *Capparis spinosa* L, leurs propriétés biologiques, puis les principaux résultats phytochimiques antérieurs réalisés ainsi que ses usages en médecine traditionnels.
 - ✓ Le **2^{ème}**, présentera les composés phénoliques, leur définition, leur classification, leur biosynthèse ainsi que leur intérêt thérapeutique.
 - ✓ Le **3^{ème}**, s'intéresse aux activités biologiques testés au cours de notre recherche et une présentation générale de quelques tests de ces activités.
- ❖ Le **deuxième** chapitre du manuscrit évoque nos travaux personnels composée de :



- L'extraction, la caractérisation quantitative et qualitatif des composés phénoliques et des flavonoïdes par les produits chimiques ainsi par analyse HPLC des extraits (méthanolique, éther de pétrole, chloroformique, acétate d'éthyle et butanolique) de la partie aérienne de *Capparis spinosa L.*
 - L'évaluation du potentiel antioxydant de la plante *Capparis spinosa L* par la mise au point de sept différents tests à savoir : DPPH, ABTS, métal chélate, GOR, CUPRAC, phénanthroline et Pouvoir réducteur.
 - L'évaluation de l'activité anti Alzheimer par l'inhibition des enzymes, acétylcholinestérase et Butyrylcholinestérase.
 - L'évaluation de l'activité antidiabétique par l'inhibition de deux enzymes, l' α -amylase et l' α -glycosidase.
 - En fin, L'évaluation de l'activité antiinflammatoire par la méthode de dénaturation de BSA (bovin sérum albumine).
- ❖ Le **troisième** chapitre expose l'interprétation et la discussion des résultats personnels obtenus.

Chapitre I

Aperçu bibliographique

I. *Phytothérapie et étude botanique*



1 Phytothérapie

Le mot phytothérapie provient de deux mots grecs « phyton » et « therapeuein » qui signifient essentiellement « soigner avec les plantes ». Elle est une alternative aux traitements par les médicaments d'origine chimique. Ses indications sont basées sur l'utilisation traditionnelle des plantes et leurs différentes formes phyto-thérapeutiques. En générale la plupart des médicaments sont issus des plantes par l'extraction de la partie utilisée (racine, feuille, écorce, fruit, ...) et contenant le ou les principes actifs [Volak et Stodola. 1983].

D'après [Zeghad. 2008 ; Strang. 2006] il y'a différents types de phytothérapie :

- **Aromathérapie** : est une thérapeutique qui utilise les extraits aromatiques de plante (essences / huiles essentielles).
- **Gemmothérapie** : est une thérapeutique qui utilise les extraits alcooliques des tissus embryonnaires végétaux en croissance tel que jeunes pousses, bourgeons et les radicelles.
- **Herboristerie** : consiste dans la préparation et la commercialisation de plantes médicinales ou de préparations dérivées. La préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau : décoction, infusion, macération.
- **Homéopathie** : elle consiste à traiter une maladie par des substances susceptibles de produire des troubles semblables à ceux déterminés par la maladie elle-même.
- **Phytothérapie pharmaceutique** : utilise des produits d'origines végétales obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant. Après transformation chimique, les plantes sont vendues sous forme de tisanes, de liquide, de sachets, ou de gélules.

2 Phytothérapie en Algérie

En Algérie, on trouve que les plantes sont largement utilisées et occupent une place importante dans la médecine traditionnelle, qui, elle-même est largement employée dans divers domaines de la santé. Dans les dernières années, la phytothérapie est très répandue, des herboristes sont partout et sans aucune formation spécialisée ou connaissance scientifique sur la phytothérapie, ils prescrivent des plantes et des mélanges pour toutes les maladies : diabète, rhumatisme, minceur et même les maladies incurables. D'après le Centre national du registre de commerce, des chiffres montrent qu'à la fin 2009, l'Algérie comptait 1926 vendeurs spécialisés dans la vente d'herbes médicinales, dont 1393 sédentaires et 533 ambulants. La capitale en abritait, à



elle seule, le plus grand nombre avec 199 magasins, suivie de la wilaya de Sétif (107), Bechar (100) et El Oued avec 60 magasins [Mahmoudi. 1992].

3 Plantes médicinales

Les plantes médicinales regroupent toutes les plantes dont l'un de leurs organes contient une ou des substances chimiques qui sont destinées à produire une activité pharmacologique. Elles représentent la forme la plus ancienne et la plus répandue de médication.

Des règles pour la cueillette des plantes médicinales :

1. Il faut avoir une bonne connaissance des plantes médicinales pour les récolter afin de ne pas se tromper sur les plantes dangereuses et toxiques.
2. Pour éviter la disparition totale de l'espèce des plantes médicinales, la cueillette ne doit jamais toucher tous les spécimens d'une certaine espèce dans un endroit donné.
3. Éviter de récolter les plantes malades ou infectées par des insectes nuisibles.
4. Les plantes ne doivent pas être récoltées humides, car elles se dégradent rapidement par échauffement (Le meilleur moment pour cueillir est entre 10h du matin-5h du soir, temps sec et ensoleillé).
5. Ne ramasser pas les plantes médicinales dans les prairies et les vergers où on a utilisé des désherbants et pesticides.
6. Les plantes récoltées doivent être séchées le plus tôt possible après leur cueillette [Frantisek. 1992].

Dans notre recherche nous avons choisi une plante qui intervient à la famille *Capparidaceae*. Le choix de cette plante, *Capparis spinosa L*, dans notre étude a été guidé par son usage dans la pharmacopée traditionnelle et par les études phytochimiques répertoriées dans la littérature.

4 Généralité de la famille *Capparidaceae*

La famille des *Capparidaceae* ou *Capparaceae* est une famille de plantes dicotylédones. Ce sont des arbres, des arbustes, des lianes et parfois des plantes herbacées. Elle comprend 39 genres, souvent adaptés aux zones arides, des régions tempérées à tropicales. C'est une famille largement répandue dans le bassin méditerranéen, et dans les milieux secs le long du littoral d'Europe, d'Afrique du nord sur le littoral du bassin méditerranéen jusqu'au sud de l'Asie et dans l'Australie.



Les membres de cette famille contiennent des thioglucosides (appelés glucosinolates) qui libèrent des isothiocyanates (huiles de moutarde) lorsque les plantes sont endommagées. Généralement, les plantes produisent de l'isothiocyanate de méthyle à partir de glucosinolate de méthyle (également appelé glucocapparine) [Satyanarayana T et al. 2008].

4.1 Généralité sur le genre *Capparis*

Les plantes du genre *Capparis* sont des arbres ou des arbustes ou avec des épines stipulaires, aux feuilles alternes, simples et entières, possédant généralement une paire de stipules épineuses à la base. Les fleurs, actinomorphes et bisexuées. Elles se composent de quatre sépales libres et imbriqués, de quatre pétales libres et imbriqués, rapidement caducs, de nombreuses étamines libres et exsertes, disposées sur un réceptacle conique, et d'un ovaire supère et uniloculaire, sur un gynophore allongé, avec 2-8 placentas. Les fruits sont des capsules bacciformes.

Les espèces de ce genre, se retrouvent dans les régions tropicales et subtropicales de l'hémisphère Nord et Sud. Environ 250 espèces appartenant à ce genre sont recensées. Il regroupe des arbustes ou de petits arbres à feuilles caduques ou persistantes, aux feuilles alternes, simples et entières, possédant généralement une paire de stipules épineuses à la base [Satyanarayana T et al. 2008].

4.2 Présentation de l'espèce *Capparis spinosa* L

Capparis spinosa L, est un représentant célèbre de la famille des *Capparidaceae* communément appelée le câprier, « El-Kabbar » en Algérie. Il est l'une des rares espèces arbustives qui présente autant de qualités avec de nombreux usages. Plante spontanée, xérophile, est très répandue dans le bassin méditerranéen. Elle tolère les conditions climatiques contraignantes des zones arides et semi-arides ainsi que des températures extrêmes. Elle peut donc jouer un rôle écologique très utile, dans ces régions, pour la protection contre l'érosion. Elle fournit un condiment recherché, la câpre, qui correspond au bouton floral de la plante [Benseghir-Boukhari L.A ; Seridi R. 2007].



Figure I.1. Photographie de la plante *Capparis spinosa* L. (A) les feuilles, la fleur et les fruits. (B) les capres [Karnouf. 2009].

4.2.1 Donnés botaniques

4.2.1.1 Description de la plante *Capparis spinosa* L

Le câprier est un arbrisseau de 1m de haut, aux tiges lignifiées à la base, vertes et flexibles plus haut, simples ou parfois ramifiées. Ses feuilles, presque rondes ou ovales, vertes, munies à leur base de deux stipules transformées en épines. Elles ont un court pétiole, un bord entier et une consistance charnue. Ses fleurs ont quatre sépales verts, des pétales blancs, de nombreuses étamines d'un rouge violacé et s'insèrent de façon singulière par un long pédoncule à l'aisselle des feuilles supérieures [figure I.2] [Satyanarayana *et al.* 2008].



Figure I.2. Photo de *Capparis spinosa* L. (*Capparidaceae*) au stade fleuraison (Oued Metlili, région de Ghardaïa, Sahara septentrional Est algérien "Avril 2011") [Kemassi Abdellah. 2014].



4.2.1.2 Position systématique

La classification de l'espèce *Capparis spinosa* L est comme suit :

Tableau I.1. Taxonomie de *Capparis spinosa* L [Ozenda. 1991].



Capparis spinosa L.

Domaine	<i>Biota</i>
Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Spermaphytes</i>
S/ Embranchement	<i>Angiospermes</i>
Classe	<i>Dicotylédones</i>
Ordre	<i>Capparales</i>
Famille	<i>Capparidaceae</i>
Genre	<i>Capparis</i>
Espèce	<i>Capparis spinosa</i> L

4.2.1.3 Le nom vernaculaire

Le nom du câprier se diffère selon la région et la langue, il prend plusieurs noms tel que :

- En occitan : Tàpera
- En arabe : Kobar ou Shaffalah
- En espagnol : Alcaparra
- En hébreu : Tzalaf
- En anglais : Caper bush
- En berbère : Chalem

4.2.2 Origine et historique

Originaires de la région méditerranéenne, les câpriers y sont encore spontanés dans les zones rocheuses. Les italiens ont été les premiers à parler de la culture du câprier et ce dès le 13^{ème} siècle. Les français l'ont connue vers 17^{ème} siècle. Quant aux espagnols c'est en 1875 qu'ils avaient commencé la production. Les marocains vers 1920 ont collecté et exporté sur les marchés les câpres. La culture de cette capparidacée remonte à l'antiquité [Noailles. 1965]. Dans la Grèce ancienne la câpre est très prisée comme condiment. Le Maroc est le premier exportateur mondial de câpres. En 1983, un vaste programme de recherche et de développement financé par la CEE a été lancé en Italie. En revanche, en Algérie, le câprier n'est pas ou peu



cultivé, mais la population rurale algérienne a tissé des liens solides avec cette plante, car elle présente de nombreuses propriétés thérapeutiques qui sont décrites minutieusement lors des enquêtes locales.

4.2.3 Aire de répartition du câprier

4.2.3.1 Distribution mondiale

Le câprier est une espèce répandue sur le pourtour méditerranéen. Son aire de répartition mondiale (Afro-Eurasie) a été précisée par **Jiang et al. (2007)** [Figure I.3].

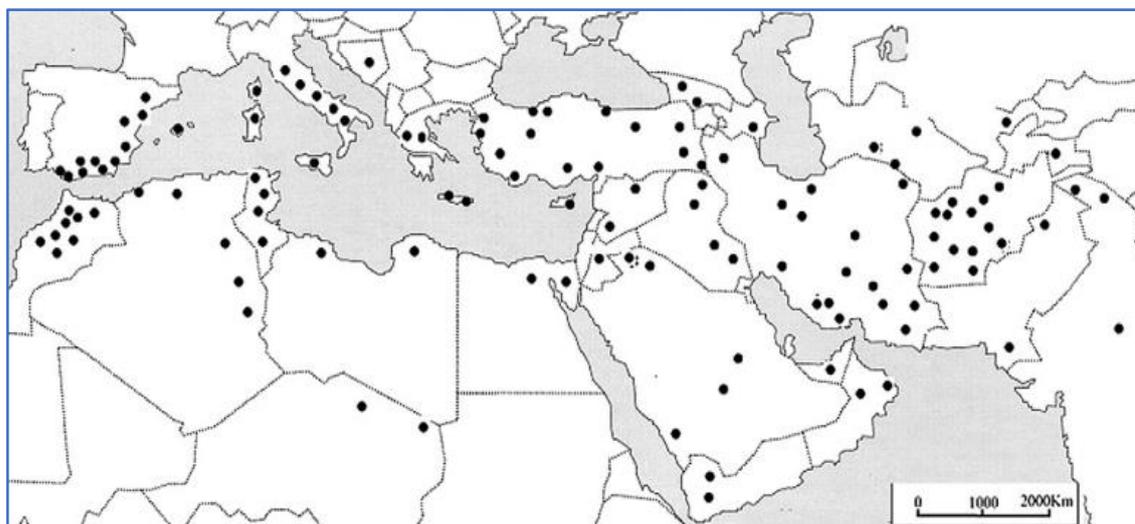


Figure I.3. Distribution naturelle du Câprier en Afro-Eurasie [**Jiang et al. 2007**].

On remarque alors qu'il s'est localisé de façon éparse aussi en divers points. Le câprier est cultivé dans les pays du bassin méditerranéen ainsi dans les pays de l'Asie. Il est cependant connu également comme plante économique en Australie et il tend à se répandre en Amérique latine [**Barbera. 1991**].

4.2.3.2 Situation dans le pourtour méditerranéen

Il se trouve depuis les côtes atlantiques des îles Canaries et du Maroc jusqu'à la Mer Noire en Crimée et en Arménie et à la Mer Caspienne en Iran. Elle a été naturalisée dans de nombreux pays au climat méditerranéen, comme les États-Unis (Californie) et l'Australie. En France, on trouve des câpriers sur les murs et rochers bien exposés, en Provence, dans le Languedoc, le Roussillon et la Gironde. Il est produit dans différents pays méditerranéen comme l'Algérie, Espagne, Italie, Grèce, Türkiye et Maroc [**Benseghir-Boukhari et Seridi. 2007**].



4.2.3.3 Situation géographique du câprier en Algérie

En Algérie, il n'est cultivé que dans de rares situations en Kabylie, note que le câprier du littoral méditerranéen ne se montre sauvage que sur la côte algérienne. Le câprier couvre de vastes surfaces mais de manière éparse [figure I.4]. Il a été redécouvert depuis peu par les forestiers qui ont alors engagé l'étude de son développement. Celui-ci pourrait, il est vrai, être planté dans les espaces inaptes à l'agriculture, pour la reconstitution végétale des zones où on ne saurait faire pousser des espèces délicates [**Benseghir-Boukhari L. S. 2007**].

En effet, le câprier est doté d'un système racinaire très puissant qui mobilise des volumes importants de sous-sol. Cette caractéristique lui confère une forte tolérance à la sécheresse. Il a donc la particularité de se développer sur les sols les plus ingrats et sur de fortes pentes, d'où son intérêt écologique contre l'érosion dans les zones arides et semi-arides. Il est signalé dans les stations les plus xérophiiles [**Kadik. 1986 ; Maire. 1965 ; Ozenda. 1983**]. On a observé, lors de la campagne de terrain, que deux câpriers phénotypiquement différents peuvent être présents ensemble sur une même station, sans facteur de variation écologique. Des variétés moins épineuses intermédiaires à la variété inerme sont présentes, dont certaines semblent rarement donner des fruits. Le tableau suivant présente quelques wilayas où localise le câprier avec écotype et utilisation.



Tableau I.2. Tableau récapitulatif des enquêtes de terrain [Benseghir-Boukhari. 2007].

Wilaya	Localités	Bioclimats	Écotype (épineux-inerme)	Utilisations principales
MOSTAGANEM	La Macta	Semi-aride Chaud	Épineux	Non décrit
GHELIZANE	Périmètre de La mina	Semi-aride Chaud/doux	Echantillon altéré	Non décrit
ALGER	Raïs Hamidou	Subhumide chaud	Épineux	Consommation de câpres
BEJAIA	Falaises Cap Carbon, Gorges de Kherrata, Ighhil Ali à Akbou, Barbacha à Oued Amizour	Subhumide chaud/frais	Épineux / inerme	Graines - asthme racines - rhumatisme consommation de câpres
ANNABA	Jardin en zone urbaine (quelques pieds)	Subhumide chaud	Inerme	Consommation de câpres
MILA	Ferdjioua, Ferdj Mzala, Radjas, Rouached, Djimla	Subhumide frais	Épineux	Graines - asthme racines - rhumatisme baies - diverses feuilles – digestion
CONSTANTINE	Zone urbaine : Les abattoirs, murs à Bellevue (quelques pieds)	Subhumide frais	Épineux	Divers soins consommation de câpres
JIJEL	Autour du barrage Beni Haroun épineuse	Subhumide Frais/chaud	Épineux	Divers soins

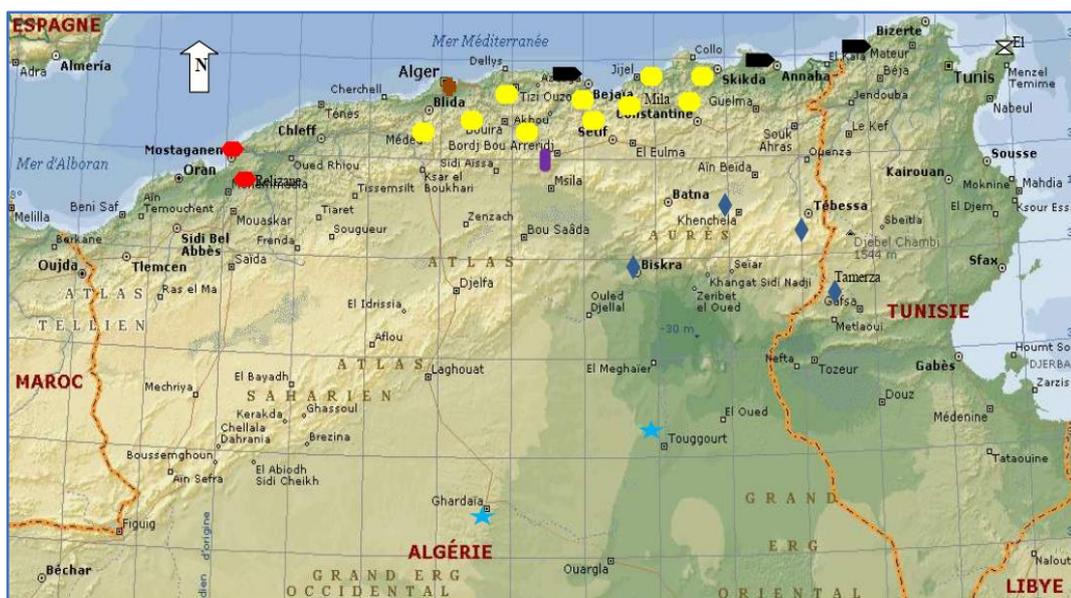


Figure I.4. Carte de répartition biogéographique du Câprier [Benseghir-Boukhari. 2015].

4.2.4 Usage traditionnelle du *Capparis spinosa L*

Le câprier est utilisé depuis l'antiquité dans plusieurs pays soit en cuisine, soit en médecine traditionnelle. En effet, les câpres sont généralement utilisées en cuisine méditerranéenne comme épice, apéritive avec les olives et le fromage ou comme complément à la viande, aux salades, aux pâtes, et à d'autres nourritures. Indépendamment de son utilisation comme condiments, le câprier a été utilisé depuis des siècles dans la phytothérapie traditionnelle, comme antifongique [Ali-Shtayeh et Abu Ghdeib. 1999 ; Lemhadri et al. 2007], antileishmaniose [Jacobson et Schlein. 1999 ; Lemhadri et al. 2007], anti hépatotoxique [Gadgoli et Mishra. 1999], anti-inflammatoire [Satyanarayana et al. 2008], anti-hyperlipidémique et hypoglycémiant [Eddouks et al. 2005]. Les câpres sont connues dans différents pays méditerranéens pour leurs propriétés curatives, expectorantes, diurétiques, anti-hypertensives, cataplasmiques et toniques.

D'après [Lemmi Cenna et Rovesti. 1979], en Grèce et dans le Maghreb méditerranéen, les câpres étaient utilisées en cosmétiques, elles sont mêlées à de l'huile d'olive, ou du lait ou du miel, ou encore à des graisses animales pour rendre la peau lisse ou veloutée.

4.2.4.1 Parties utilisées en Algérie

Les parties utilisées en Algérie sont les racines, écorce, boutons floraux et feuilles. Les liens entre le Câprier algérien et la médecine traditionnelle ont été évoqués dans les travaux de Benseghir et Seridi. 2005, étayant les éléments d'écologie et leurs rapports



avec la phytothérapie à travers le territoire. Les principales utilisations : poudre de graines pour les problèmes d'asthme ; racines pour rhumatisme ; feuilles pour les problèmes digestifs ; baies pour divers soins ; baies et feuilles pour les problèmes digestifs ; tiges et feuilles pour les céphalées et la digestion.

4.2.5 Composition chimique de *Capparis spinosa* L

Plusieurs études phytochimiques ont montré que *Capparis spinosa* L comporte un amalgame de composés actifs dans ses diverses parties. Les polyphénols et les flavonoïdes sont également présents dans le câprier [Panico A et al. 2005 ; Satyanarayana et al. 2008].

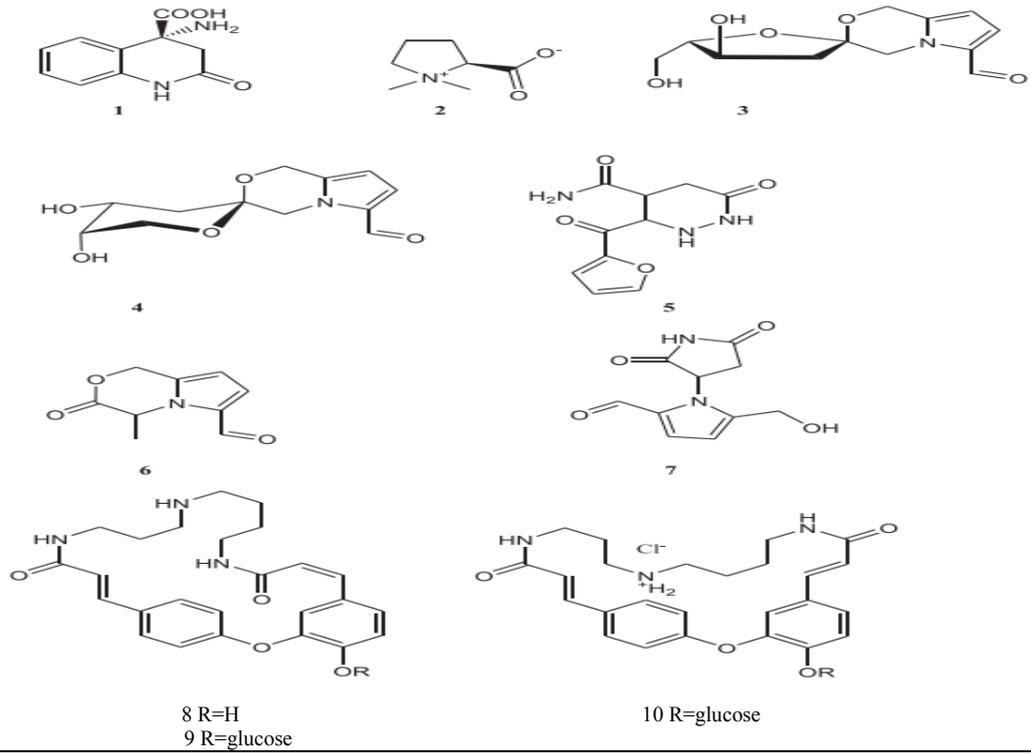
Il a été montré que les bourgeons floraux du câprier renferment les flavonoïdes suivants : La quercétine, rutine, quercétine-3-rutinosides, quercétine-7-O-glucorhamnoside, kaempférole-3-rutinosides, kaempférole 3-O-rhamnosyl-rutinoside [figure I.5. (B)] [Inocencio et al. 2000 ; Bonina et al. 2002]. La partie aérienne de la plante contient aussi la quercétine 3-O-glucoside, la quercétine 3-O-glucoside-7-O-rhamnoside, la quercétine 3-O- [6''-α-L-rhamnosyl-6''-β-D-glucosyl] -β-D-glucoside et la quercétine-7-O-D glucopyranoside -β-L rhamnopyranoside [Satyanarayana et al. 2008]. Ainsi Les graines contiennent 34,6% d'huile, principalement composée d'acide linoléique et d'acide oléique [Pernet. 1972].

Les alcaloïdes sont aussi présents dans le câprier, ils sont distribués principalement dans les racines et les graines [figure I.5. (A)] [Panicoa et al. 2005 ; Satyanarayana et al. 2008]. Le câprier est également riche en acides hydroxycinnamiques y compris l'acide caféique, l'acide férulique, acide p-coumarique et l'acide cinnamique [Panicoa et al. 2005 ; Satyanarayana et al. 2008].

[Romeo et al. 2007], ont identifiés environs 145 composés volatiles dans le câprier. Les aldéhydes (22.2%) et les esters (21%) représentent les classes chimiques les plus abondantes dans la plante.



(A)



(B)

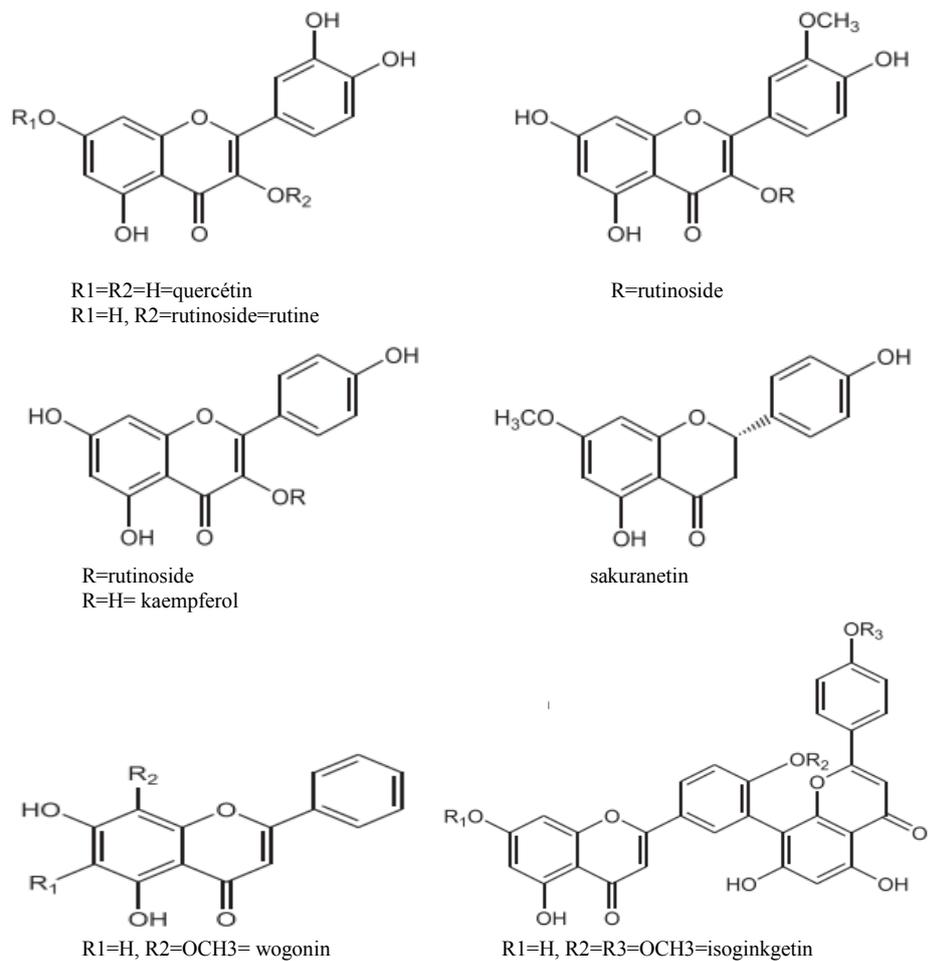




Figure I.5. Exemple des composés présents naturellement dans *C. spinosa* L. (A) Structures chimiques des alcaloïdes ; (B) Structures chimiques des flavonoïdes [Nabavi et al. 2016].

4.2.6 Effets biologiques de *Capparis spinosa* L

On a plein des effets biologiques assurés par la plante *Capparis spinosa* L :

Les feuilles de *Capparis spinosa* L ont été utilisées contre l'arthrite au lieu de l'écorce de racine [Stickel et al. 2000 ; Kloutusos et al. 2001].

Le p-méthoxy benzoïque isolé de la fraction méthanolique, d'extrait aqueux de *Capparis spinosa*, a montré une activité hépato-protectrice [Gadgoli et Mishra. 1999] et une activité antifongique vis-à-vis des dermatophytes [Ali-Shtayeh et Abu Ghdeib. 1999]. L'extrait méthanolique du bourgeon floral protège les phospholipides des membranes cellulaires contre la peroxydation induite par l'exposition aux rayons UV et apporte une protection significative contre des érythèmes cutanées chez l'homme [Bonina et al. 2002]. En outre ils ont montré un effet hypoglycémiant à 20 mg/kg de l'extrait aqueux. Cette activité pharmacologique est indépendante de la sécrétion d'insuline. [Yaniv et al. 1987 ; Eddouks et al. 2004]. Une autre étude a montré que l'extrait aqueux de *Capparis spinosa* à 20 mg/kg présente une activité puissante sur la diminution des triglycérides et le cholestérol plasmatiques chez les rats diabétiques et normaux [Eddouks et al. 2005].

L'administration de doses répétées par voie orale des extraits aqueux de *C. spinosa* a évoqué un puissant effet anti-hyperglycémiant et anti-obésité [Lemhadri et al. 2007], ainsi un effet diurétique accompagné d'une augmentation de la concentration de Na⁺, K⁺ et Cl⁻ dans les excréments urinaires du rat. La câpre est connue en région méditerranéenne pour son emploi dans l'hypertension, dans le traitement des pathologies liées aux lipides sériques et pour ses effets diurétiques [Zeggwagh et al. 2007].

L'effet anti-inflammatoire au niveau des chondrocytes de *Capparis spinosa* L, mérite une attention particulière. Cette plante contient des flavonoïdes comme le kaempférol et les dérivés de la quercétine, ainsi que des acides hydro cinnamiques qui sont connus pour leurs effets anti-inflammatoires et antioxydants [Panico et al. 2005].

Barbera. 1991, confirme l'action que peuvent exercer les câpres sur la peau. Les principes actifs sont :

- La rutine avec 0,28 à 0,32 % dans les boutons floraux frais, et la quercitrine, des flavonoïdes ayant une action analogue à la vitamine P.

II. *Métabolites secondaires*



1 Généralité sur les métabolites secondaires

Les plantes ont une importance capitale pour la survie de l'homme et des différents écosystèmes. Elles renferment une part importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme [Hartmann T. 2007].

On distingue deux groupes de métabolites :

- Les métabolites primaires (les glucides, les protéines, les lipides et les acides nucléiques...etc) sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de la plante et qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal [Hanson J. R. 2003].
- Par opposition, Les métabolites secondaires peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes, sont exclusivement synthétisés chez les végétaux [Heller et al. 2011]. Ces substances exercent cependant une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement. Ils participent ainsi, de manière très efficace, à la tolérance des végétaux à des stress variés (attaques de pathogènes, prédateurs d'insectes, sécheresse, lumière UV...etc.) [Judd W. S et al. 2002].

Les produits du métabolisme secondaire qui sont émis en très faible quantité, sont d'une grande variété structurale. Ces composés marquent de manière originale, un genre, une famille ou une espèce de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique [Epifano F et al. 2007]. Ils sont ainsi impliqués dans la couleur et le goût des aliments [François N. M. 2010].

Dans toutes les parties de plantes, on trouve des métabolites secondaires mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles. Cette distribution varie d'une plante à l'autre [François N. M. 2010]. Parmi les principales familles de métabolites secondaires trouvées chez les plantes on distingue :

- **Les composés phénoliques** qui interviennent dans les interactions plante-plante (allélopathie, inhibition de la germination et de la croissance).
- **Les alcaloïdes**, renferment un atome d'azote dans la structure.
- **Les terpenoïdes** et leurs dérivés.
- **Les huiles essentielles**, liquides concentrés et hydrophobes des composés aromatiques (odoriférants) volatils d'une plante (volatiles et non miscibles à l'eau).

Dans cette étude, nous nous intéresserons plus particulièrement aux composés phénoliques, et aux flavonoïdes ; dont nous présenterons quelques exemples ainsi que leur biosynthèse.



2 Composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols, sont des métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal [Benhamou. 2009]. Les phénols insolubles sont répartis dans les parois cellulaires, tandis que les composés phénoliques solubles sont compartimentés dans les vacuoles des cellules végétales [Stalikas. 2007].

Les polyphénols sont largement distribués, comprenant plus de 8000 différentes structures connues ne contiennent pas de l'azote [Beserra Almeida et al. 2011 ; Fleuri A et al. 2005]. Ils regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes hydroxyle, en plus d'autres constituants [Boizot N ; Charpentier J. P. 2006]. Les polyphénols naturels vont de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins.

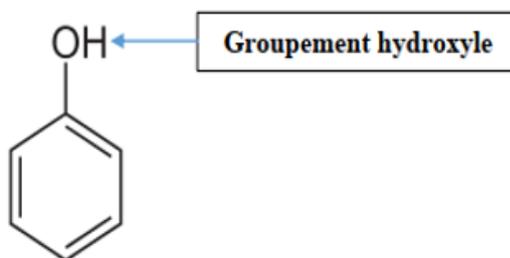


Figure I.6. Formule chimique brute d'une fonction phénol (C_6H_5OH).

Il existe différentes classes de polyphénols, notamment : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les stilbènes, les lignanes, les saponines, les phytostérols. Les plus importants sont : les acides phénols, les flavonoïdes et les tanins.

Les composés phénoliques ont une importance croissante notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé. Leur rôle d'antioxydants naturels suscite 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 [Talbi et al. 2015].

Dans la figure II.2 nous avons établi une classification des certains métabolites secondaires et en relations avec les quelques composés phénoliques.

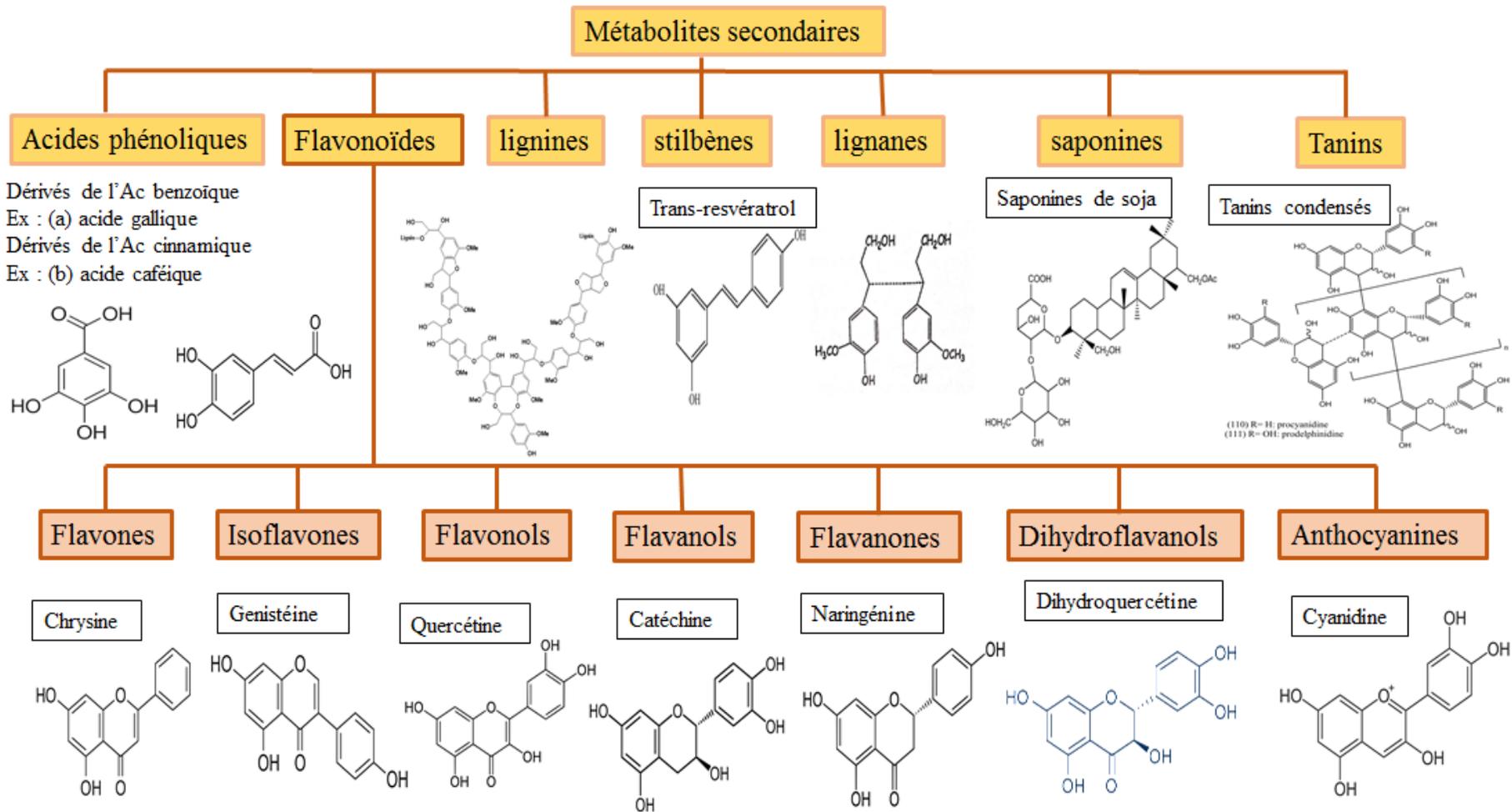


Figure I.7. Schéma de classification des quelques métabolites secondaires.



2.1 Principes voies de biosynthèse des polyphénols

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires synthétisés par des plantes au cours de leur développement, ces composés phytochimiques provenant de la phénylalanine et la tyrosine sont ubiquitaires dans les plantes [Pereira Nunes X *et al.* 2012]. Ils sont eux-mêmes formés à partir de sucres simples issus du métabolisme primaire [Macheix. 2005]. Les polyphénols sont synthétisés généralement à partir de deux voies :

2.1.1 Voie Shikimate

La voie du Shikimate, spécifique des bactéries et des plantes, démarre par la condensation du phosphoénolpyruvate (PEP) et de l'érythro-4-phosphate (deux composés issus du métabolisme primaire) en Shikimate. Une succession d'étapes enzymatiques permet de produire l'acide préphénique à partir duquel seront synthétisés les 3 acides aminés aromatiques : la tyrosine, le tryptophane et la phénylalanine. Ces acides aminés sont les précurseurs des voies de biosynthèse de métabolites secondaires [Amelot. 2010]. Leur biosynthèse est basée sur l'action de PAL (phénylalanineammonia-lyase), l'enzyme clé du sentier shikimique laquelle par désamination, aboutit à la transformation de la phénylalanine en acide cinnamique et à ses dérivés : acétophénones, acides phénols, coumarines, lignanes, lignines etc [Benhamou. 2009 ; Ellis. 2009 ; Roberts. 1996].

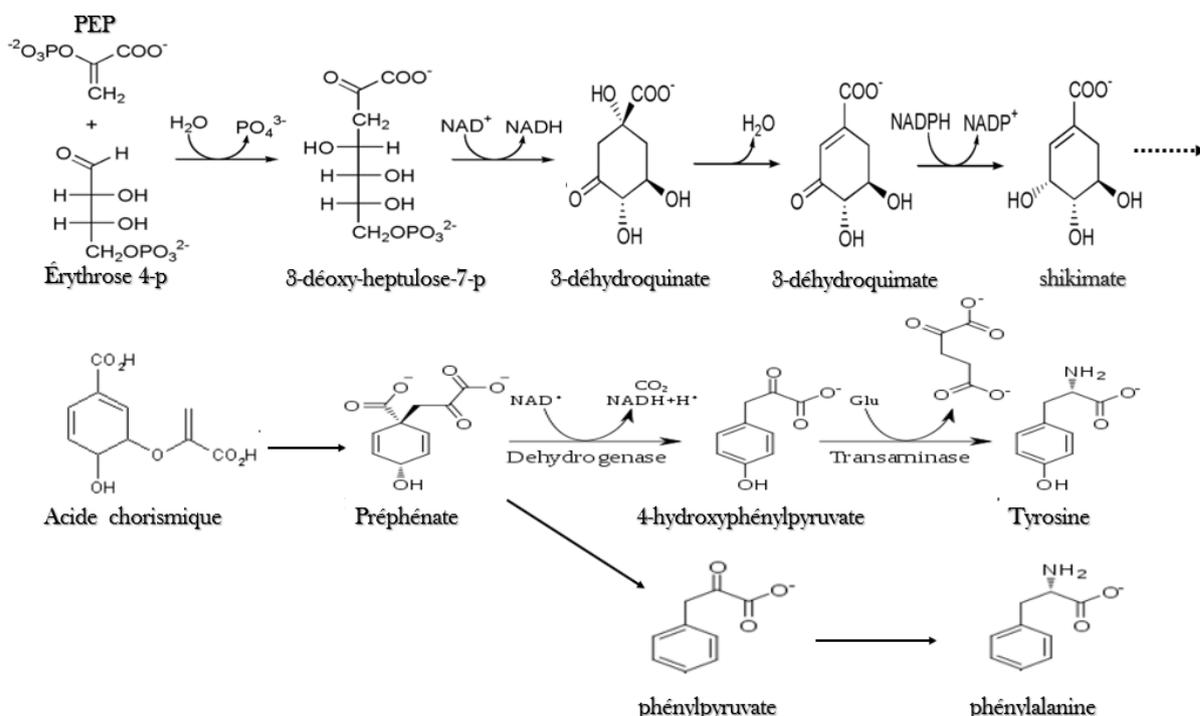


Figure I.8. Synthèse de tyrosine et de phénylalanine via l'acide shikimique [Mergheim. 2009].



2.1.2 Voie acétate-malonate

Ce mode de formation plus secondaire prédomine chez les plantes non vertes consiste en la cyclisation des chaînes poly-cétoniques elles-mêmes obtenus par condensation de groupements acétates, la condensation de celles-ci ne se fait qu'à après carboxylation de l'acétyle COA en malonyl COA [Merghem. 2009]. Cette voie est utilisée pour la synthèse du noyau aromatique(A) des flavonoïdes [Ross. 2014].

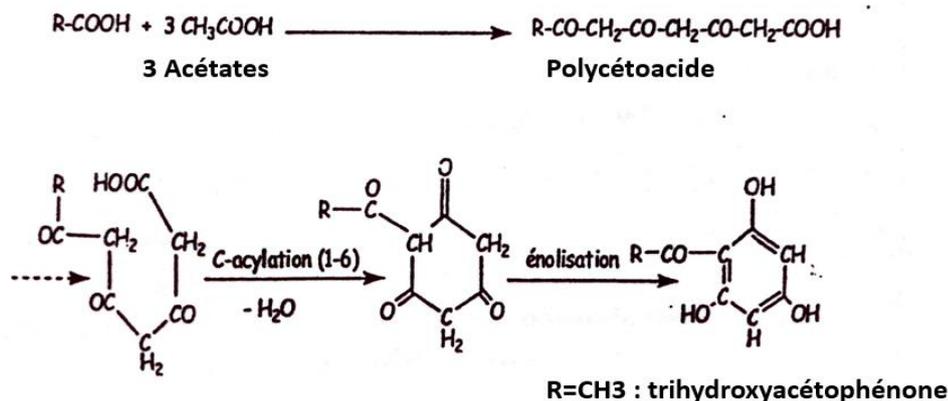


Figure I.9. Synthèse de polycéto-acides [Merghem. 2009].

La diversité structurale des composés poly-phénoliques due à cette double origine biosynthétique, est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, tels que les flavonoïdes, stilbènes... etc. [Hemingway. 1992 ; Geissamn. 1972].

2.2 Principaux groupes des polyphénols

La structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux sont les caractères dominants de la classification des polyphénols [Ross. 2014].

[Harborne. 1980 ; Machiex et al. 1990] ont classifiés les composés phénoliques en se basant sur le nombre du carbone dans la molécule. On distingue :

- Les phénols simples
- Les acides phénoliques (C₆-C₁ et C₆-C₃)
- Les flavonoïdes (C₆-C₃-C₆)
- Les lignanes (C₆-C₃-C₃-C₆)
- Les Tannins (C₆-C₃-C₆) n



La classification proposée ici correspond à ce que proposent la plupart des auteurs (malgré quelques variantes).

2.2.1 Phénols simples

Les phénols simples tels que le catéchol, guaiacol, phloroglucinol...etc [Figure II.5] sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (Ericaceae, Rosaceae...). Les deux phénols hydroxylés, le catéchol avec deux groupes OH et le pyrogallol avec trois, ont été montré pour sa toxicité vis-à-vis des microorganismes [Cowan, 1999].

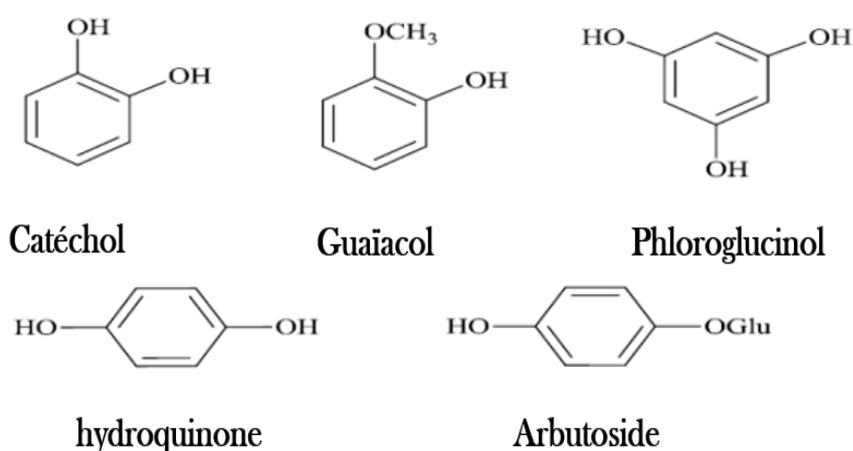


Figure I.10. Squelettes chimiques de quelques phénols simples.

2.2.2 Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont largement distribués dans les fruits, les tiges et les feuilles des légumes. Ils sont en principe solubles dans les solvants organiques polaires [Andrade et al. 2009]. On distingue deux principales classes d'acide phénolique :

2.2.2.1 Acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque

Les acides phénoliques en C₆-C₁, dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, sont très communs aussi bien sous forme libre que combinés à l'état d'ester ou d'hétéroside [Bruneton, 1993].

La concentration de l'acide hydroxy-benzoïque est généralement très faible chez les végétaux comestibles. Ces dérivés sont assez rares dans l'alimentation humaine par contre ceux d'acides hydroxy-cinnamiques sont très présents. Les acides hydroxy-benzoïques existent fréquemment sous formes d'esters ou de glycosides [Macheix, J et al. 2005]. Les principaux acides hydroxy-



benzoïques retrouvés dans les végétaux sont les acides *p*-hydroxy-benzoïque, protocatéchine, vanillique, gallique et syringique [Chanforan C. 2010].

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Acide <i>p</i>-hydroxy-benzoïque	H	H	OH	H
Acide protocatéchine	H	OH	OH	H
Acide vanillique	H	OH	OH	OCH ₃
Acide gallique	H	OH	OH	OH
Acide syringique	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Acide salicylique	OH	H	H	H
Acide gentisique	OH	H	H	OH

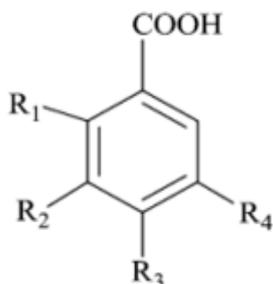


Figure I.11. Formule générale et dérivés de l'acide benzoïque.

2.2.2.2 Acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique

Les acides hydroxy-cinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base C₆-C₃ dérive de celle de l'acide cinnamique. Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires sont un des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules. De plus, l'existence d'une double liaison dans la chaîne latérale conduit à deux séries isomères (*cis* ou *Z* et *trans* ou *E*) dont les propriétés biologiques peuvent être différentes. On les trouve à l'état libre ou combiné (esters, amide, glucosides). Ces dérivés sont très présents dans l'alimentation humaine [Macheix. J et al. 2005].

	R ₁	R ₂
Acide <i>p</i>-coumarique	H	H
Acide caféique	H	OH
Acide férulique	H	OCH ₃
Acide sinapique	OCH ₃	OCH ₃

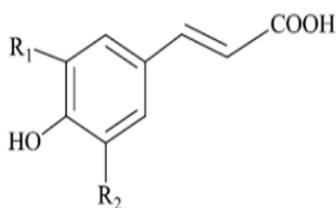


Figure I.12. Formule générale et dérivés de l'acide cinnamique.



2.2.3 Coumarines

La coumarine est une substance naturelle organique aromatique hétérosidique oxygénée de formule brute $C_9H_6O_2$, donc elle est aussi le dérivé de C_6-C_3 , connue dans la nomenclature internationale comme 1-benzopyrane-2-one ou 1,2-benzopyrone [Bensouici Ch. 2015], et caractérisée par une saveur amère et qui se présentent chez les végétaux aux niveaux des différents organes sous forme de cristaux blancs ou jaunâtre [Bruneton. 2009].

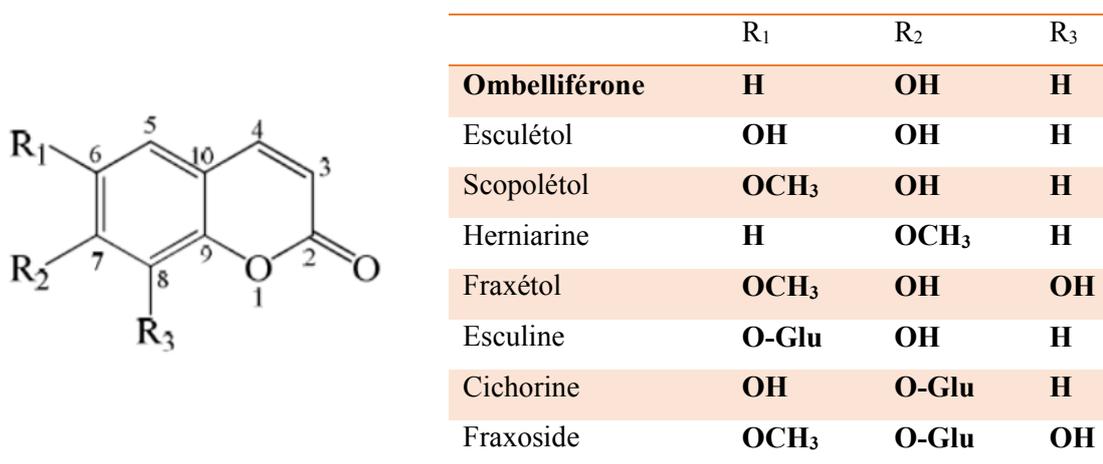


Figure I.13. Structure générale et dérivées des coumarines.

2.2.4 Stilbènes

Les membres de cette famille possèdent la structure $C_6-C_2-C_6$ comme les flavonoïdes (deux noyaux benzéniques séparés par un pont éthane ou éthène où il peut y avoir deux formes *cis* et *trans*) [Figure II.9.a]. Ce sont des phytoalexines, composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux [Crozier et al. 2006].

Parmi les, on trouve le resvératrol qui est un anticancéreux présent dans certaines plantes médicinales [Figure II.9.b] [Macheix. J et al. 2005].

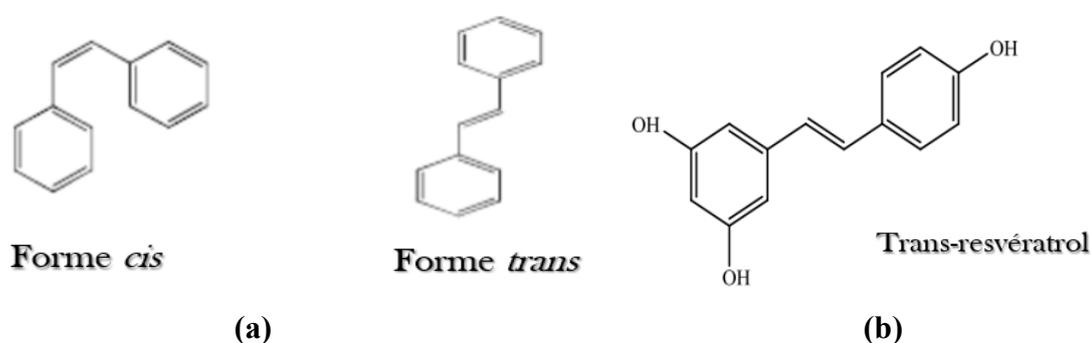


Figure I.14. (a) la structure générale des stilbènes, (b) le trans-resvératrol.



2.2.5 Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments naturels [Causse. 2005], la dénomination historique des flavonoïdes vient du mot latin *flavus* qui signifie jaune [Manach et al. 2003] très répandus chez les végétaux. Ils sont responsables de la coloration des feuilles, des fleurs et les fruits [Roux et Catier. 2007].

Par définition, les flavonoïdes sont des composés qui ont en commun la structure du diphenylpropane ($C_6-C_3-C_6$) [De Rijke E et al. 2006]. Ils présentent plus que 9000 structures et ont comme structure de base deux noyaux aromatiques A et B reliés par 3 carbones forment généralement un hétérocycle oxygéné C [Bruneton. 2009]. Plusieurs études ont montré que les flavonoïdes permettent la réduction du taux du cholestérol [Causse. 2005].

Les flavonoïdes possèdent plusieurs activités biologiques intéressantes telles que l'activité antimicrobienne [Ulanowska et al. 2006], antifongique [Ortuno et al. 2006], anti-inflammatoire [Park et al. 2008] et une activité contre la peroxydation lipidique et l'atteinte hématologique [Rao et Vijayakumar. 2008].

C'est chez les Angiospermes que la diversité structurale des flavonoïdes est maximale. Ils sont de façon très générale localisés dans les feuilles (dans l'épiderme ou entre l'épiderme et le mésophylle), dans les fleurs (cellules épidermiques) ou encore dans les fruits (tégument externe) [Bruneton. 1999].

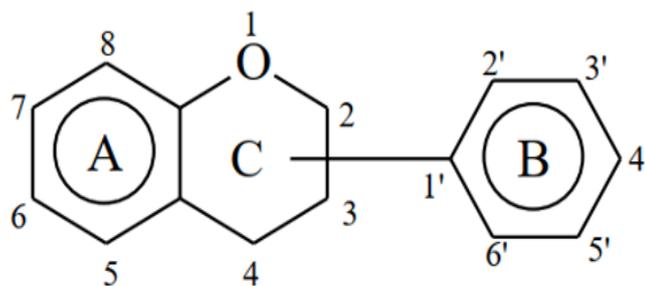


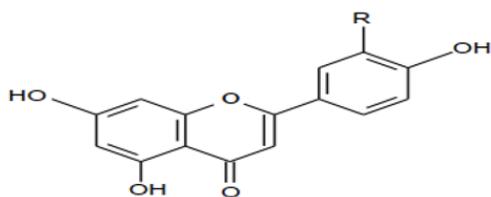
Figure I.15. Structure de base des flavonoïdes.

A. Structure chimique et classification

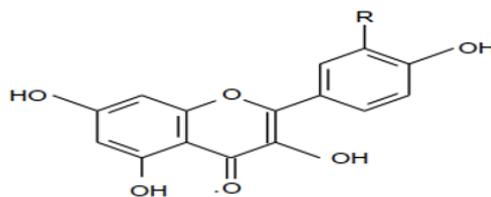
Le squelette de base des flavonoïdes peut présenter divers substituants, les plus fréquents sont les groupes hydroxylés phénoliques (-OH). Ces derniers sont combinés à des sucres pour former des glycosides [Santhakumar. 2018]. Les diverses classes de flavonoïdes diffèrent en fonction de la cyclisation et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C alors que les composés individuels au sein d'une classe diffèrent par la substitution des cycles A et B.



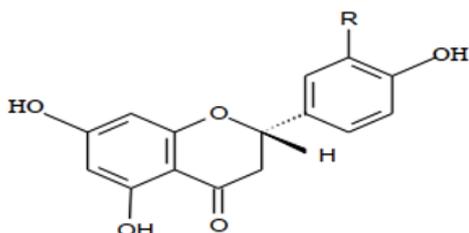
Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme *C*- ou *O*-glycosylés ; les formes libres, sans sucres attachés, sont appelées génines. Les *O*-glycosides, de loin les plus fréquents, portent leurs substituants sur les groupements hydroxyles de la génine, alors que pour les *C*-glycosides, la liaison se fait directement avec un carbone de la génine, les C-6 et/ou C-8. En effet, la formation de la (ou des) liaison(s) hétérosidique(s) est sous la dépendance de transférases très spécifiques quant au substrat et à la position d'osylation [Bruneton. 1993]. Les principales sous-classes sont : les flavones, flavanols, flavanols, flavonones, chalcones et anthocyanidines.



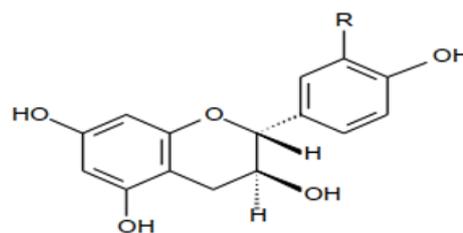
FLAVONES
R=H ; apigénine
R=OH ; lutéoline



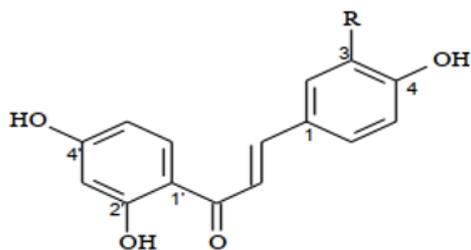
FLAVONOLS
R=H ; kaempférol
R=OH ; quercétine



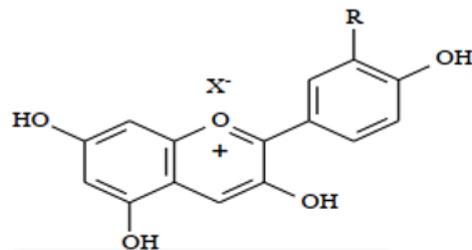
FLAVANONES
R=H ; naringénine
R=OH ; ériodictyol



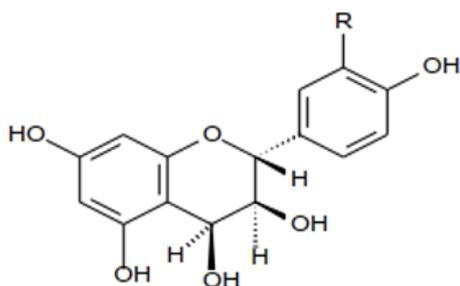
FLAVAN-3-OLS
R=H ; afzélechol
R=OH ; catéchol



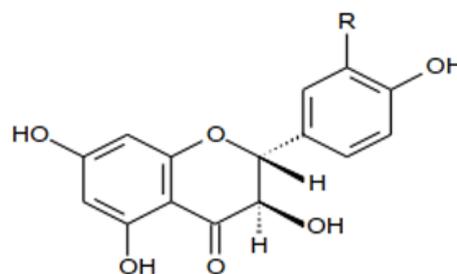
CHALCONES
R=H ; isoliquintigénine
R=OH ; butéine



ANTHOCYANIDOLS
R=H ; pélargonidol
R=OH ; cyanidol



FLAVAN-3,4-DIOLS
R=H ; leucopélargonidol
R=OH ; leucopéyanidol



DIHYDROFLAVANOLS
R=H ; dihydrokaempférol
R=OH ; dihydroquercétol

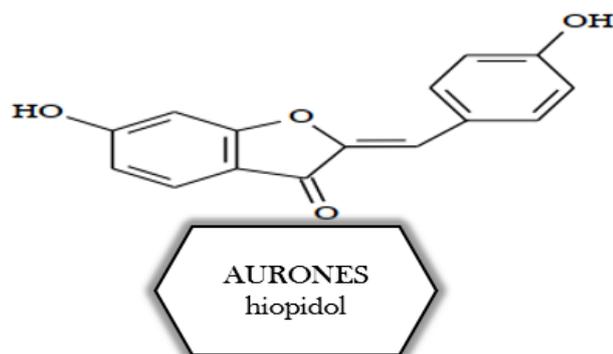


Figure I.16. Différentes classes des flavonoïdes.

B. Voie de biosynthèse des flavonoïdes

La biosynthèse des flavonoïdes se déroule au niveau des chloroplastes à partir de cinnamoyl CoA (provenant de réticulum endoplasmique). Ils résultent de la condensation de trois groupements acétates (fournis sous forme malonyl-CoA) avec l'acide 4 hydroxy cinnamoyl-CoA, cette condensation conduit à la formation de deux noyaux benzéniques A et B réunis par une chaîne de trois atomes de carbones (hétérocycle C) [Merghem R. 2009].

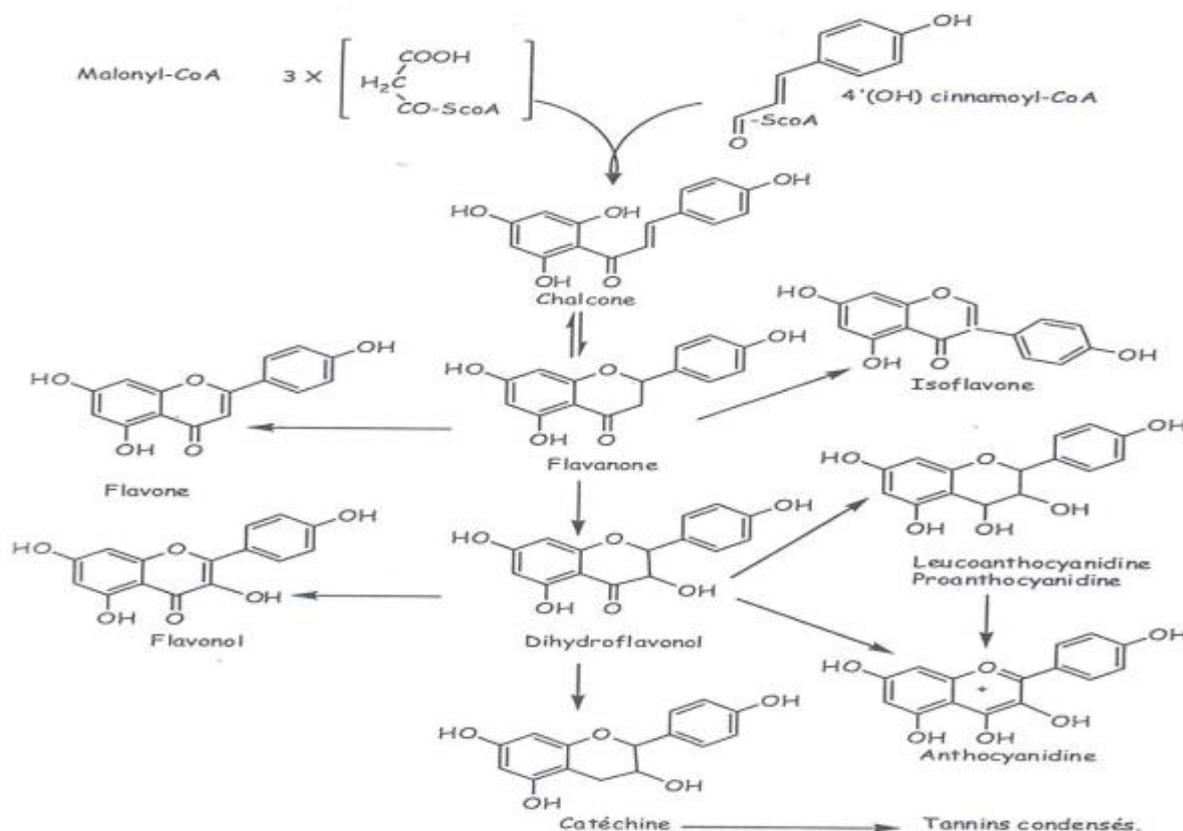


Figure I.17. Voie mixte de la biosynthèse des flavonoïdes shikimate-malonate [Merghem. 2009].



2.2.6 Lignanes

Les membres de cette famille possèdent la structure $(C_6-C_3)_2$. Ce sont des composés dont le squelette résulte de l'établissement d'une liaison entre les carbones β des chaînes latérales (liaison 8-8') de deux unités dérivant de 1-phénylpropane [Figure II.13]. Leur distribution botanique est large, plusieurs centaines de composés ont été isolés dans environ soixante-dix familles [Merghem, 2009].

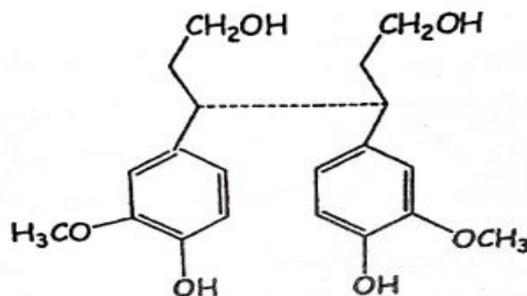


Figure I.18. Structure générale des lignanes [Merghem 2009].

2.2.7 Lignines

Les lignines se déposent dans la paroi cellulaire [Hamilton Raven et al. 2000]. Ils proviennent de la polymérisation oxydative de monolignols (monomères) qui sont les alcools *p*-coumarylique, coniférylique et sinapylique [Jutiviboonsuk A et al. 2005] à ces phénylpropanes secondaires s'ajoutent encore de petites quantités d'acide cinnamique et d'aldéhyde cinnamique (responsable de la coloration spécifique avec le mélange phloroglucine-HCL) [Macheix et al. 2005].

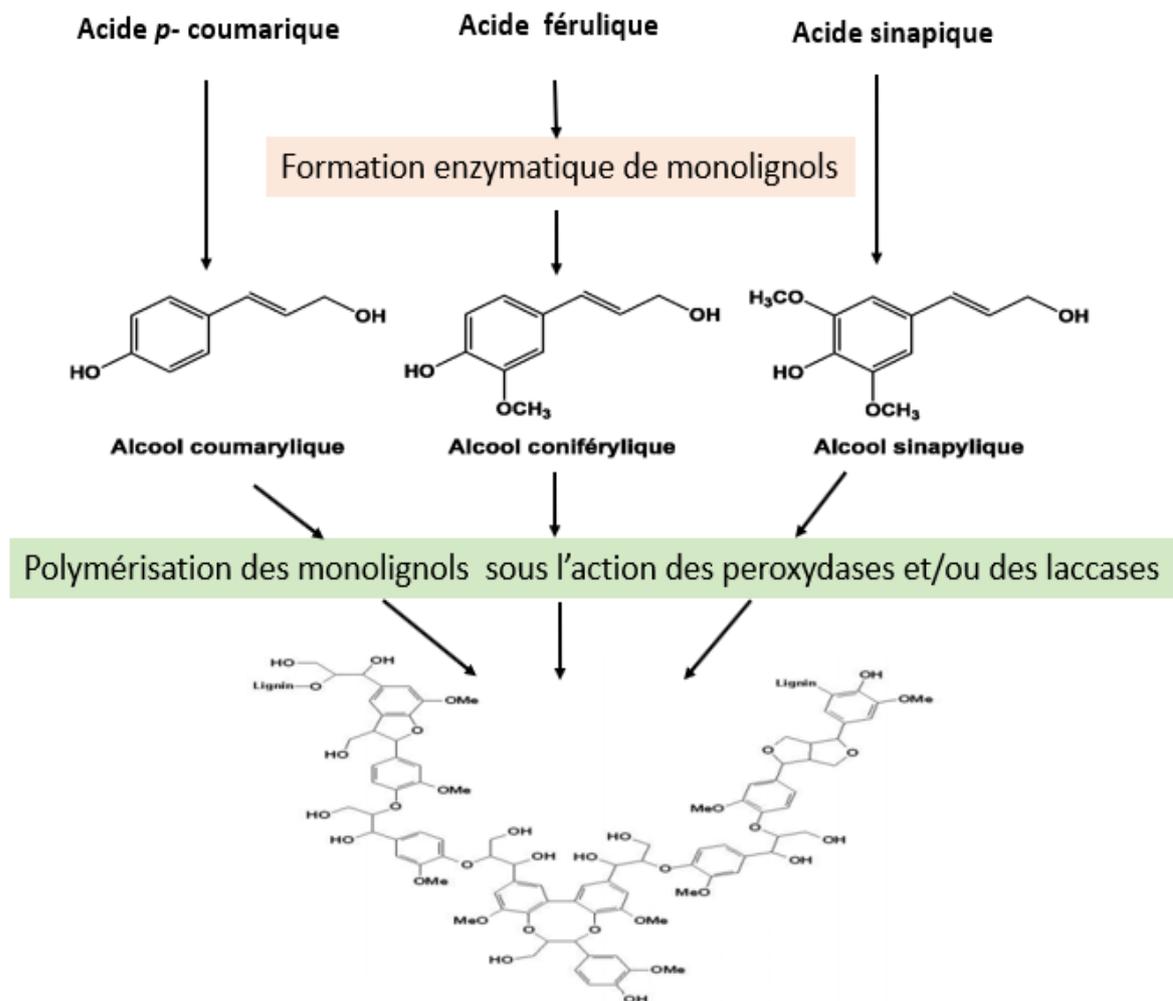


Figure I.19. Les monolignols dérivés des acides hydroxycinnamiques et leur intégration dans la lignine [Macheix et al. 2005].

Ces composées, avec des activités biologiques intéressantes, assurent la résistance à la compression et la rigidité des parois cellulaires grâce à leur propre élasticité et augmentent ainsi leurs imperméabilités à l'eau [Hamilton Raven et al. 2000].

2.2.8 Tannins

Les tannins naturels sont des molécules polyphénoliques hydrosolubles, de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 [Merghem. 2009], ils sont fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments [Alkurd A et al. 2008]. Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques et leur degré d'oxydation [Hemingway. 1992].



Les tannins sont caractérisés par une saveur astringente et par leur localisation dans toutes les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines [Scalbert. 1991]. On distingue deux groupes de tannins différents par leur structure et par leur origine biogénétique :

A. Tannins hydrolysables

Sont des Oligo ou polyester d'un sucre (glucose) et un nombre variable de molécules d'acide phénol. Selon la nature de l'acide phénol on distingue :

- les tannins galliques dérivés de l'acide gallique.
- les tannins ellagiques dérivés de l'acide hexa-hydroxy dipheniques (HHDP) et de ses dérivés [Merghem. 2009].

Tannin gallique

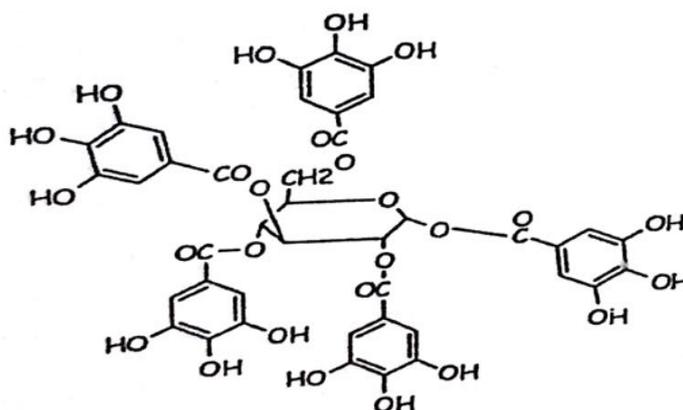


Figure I.20. Tannin hydrolysable : gallotannin.

B. Tannins condensés

Les tannins condensés se différencient fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone (C₄-C₈) [Bruneton. 1999]. Ils sont également appelés proanthocyanidines ; en effet leur oxydation en milieu alcool-acide à chaud entraîne la formation de pigments anthocyaniques tels que cyanidine et delphinidine [Merghem. 2006].

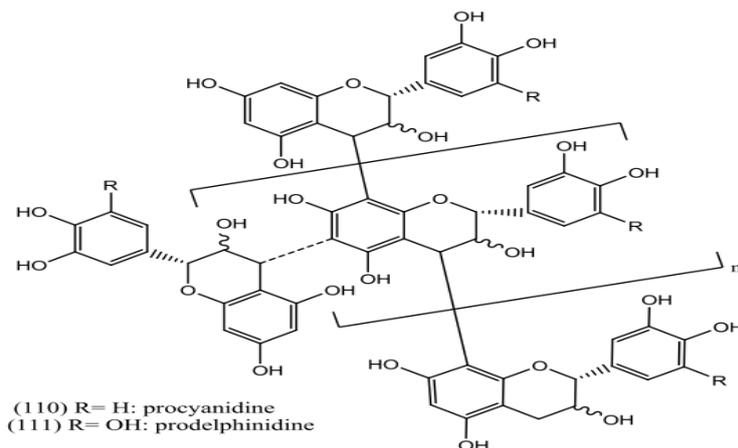


Figure I.21. La structure représente respectivement un procyanidine (110) ou un prodelphinidine (111).

3 Intérêt des métabolites secondaires

3.1 Intérêt des polyphénols

Selon [Macheix et al. 2005], Le rôle des composés phénoliques est reconnu dans différents aspects de la vie de la plante et dans leurs utilisations par l'homme. Ils peuvent en effet intervenir dans :

- Certains aspects de la physiologie de la plante (régulation de la croissance...).
- Les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique.
- Les critères de qualité (couleur, astringence, amertume...) qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux (fruit, légumes...) et des produits qui en dérivent par transformation.
- La protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes.

3.2 Intérêt des flavonoïdes

En ce qui concerne les flavonoïdes, ces composés peuvent empêcher les dommages oxydatifs par différents mécanismes d'actions : soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxydes et peroxydes (Hodek et al. 2002) ; soit par chélation des métaux (le fer et le cuivre) qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires ; soit l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres (Benavente-Garcia et al. 1997).

III. *Activités Biologiques*



1 Activité antioxydante

Le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept celui des antioxydants. Le terme " antioxydant " recouvre un ensemble d'activités diverses ou plusieurs espèces sont habiles à ralentir ou à empêcher l'oxydation des substrats biologiques. Ces molécules, occupent du point de vue biologique une place impressionnante parmi plusieurs recherches menées depuis une dizaine d'années [Ames et al. 1993].

1.1 Stress oxydant

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre la production d'oxydants (radicaux libres et de métabolites réactifs) ou ROS (des espèces réactives de l'oxygène) et les molécules anti-oxydantes en faveur des oxydants [Figure III.1], ce qui provoque des dommages oxydatifs de l'ensemble des constituants cellulaires [Atamer. 2008]. Ce déséquilibre est fonction de plusieurs paramètres tels que l'âge, l'alimentation et l'état sanitaire de l'individu [Chun et al. 2003].



Figure I.22. Déséquilibre de la balance des espèces peroxydant et des systèmes de défense antioxydants [Belaïch et Boujraf. 2016].

1.2 Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante « libre » en contenant un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié sur une orbitale). Cela lui confère une grande réactivité, donc une durée de vie très courte et il est symbolisé par un point qui indique où l'électron libre se situe [Goto et al. 2008 ; Goudable J. & Favier, A. 1997]. Lorsque ces radicaux libres sont produits plus rapidement ils ne peuvent être neutralisés par les systèmes de défense antioxydant



ce qui permet le développement de stress oxydatif [Picchi. 2006]. Ils peuvent être classés en deux catégories : les radicaux primaires et secondaires. Les premiers sont formés directement à partir de l'O₂ appelés espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les seconds sont générés par action d'un radical primaire sur des composés cellulaires tels que les acides nucléiques, les lipides membranaires ou les protéines. La formation des différents radicaux libres à partir de l'O₂ est résumée en [Figure III.2]. Le radical hydroxyle OH•, le plus toxique des radicaux libres, est principalement responsable de la réactivité des ERO sur les molécules biologiques. Il est formé par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss [Valko et al. 2007; Gardès-Albert. 2003].

Réaction de Fenton :



Réaction d'Haber-Weiss :

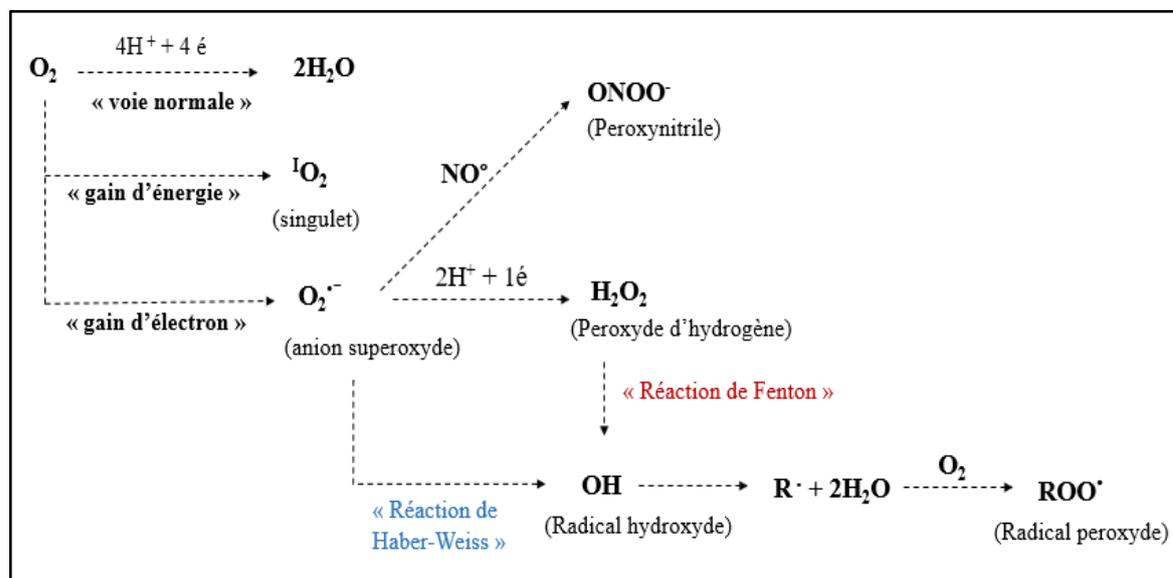


Figure I.23. Formation de radicaux libres à partir de l'oxygène [Gardès-Albert. 2003].

1.2.1 Espèces réactives oxygénées (ERO) des radicaux libres

Ce sont des molécules qui contiennent de l'oxygène mais qui sont plus réactives que l'oxygène présent dans l'air, ils sont désignés par des dérivés réactifs de l'oxygène ou d'espèces réactives de l'oxygène. Cette famille contient principalement l'anion super oxyde (O₂^{•-}) et le radical hydroxyle (OH•) et des composés réactifs oxydants non radicalaires (sans électrons libres dans



leur couche externe) comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'oxygène singlet (1O₂) et l'ozone (O₃).

1.2.2 Radical super oxyde

C'est le radical qui possède la réactivité la plus faible, c'est donc la forme primaire des ROS, il est formé par l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire (O₂) [Gardès-Albert et Jore. 2005]. Il est également hautement réactif avec certains métaux de transition comme le cuivre, le fer et le manganèse [Abreu et Cabelli. 2010]. L'anion super oxyde (O₂^{•-}) peut provenir de plusieurs sources cellulaires où la mitochondrie est considérée comme source principale [Gardès-Albert et Jore. 2005 ; Lambert et al. 2009]. Le (O₂^{•-}) ne traverse pas rapidement la membrane plasmique et se dismuté spontanément au pH physiologique en produisant du peroxyde d'hydrogène : « 2O₂^{•-} + 2 H⁺ → O₂ + H₂O₂ »

1.2.3 Peroxyde d'hydrogène H₂O₂

Le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ n'est pas une espèce radicalaire [Barouki. 2006], c'est une molécule stable diffusée très facilement à travers les membranes. Pour cela son action se déroule dans différents compartiments cellulaires tel que le noyau c'est, donc, un ERO assez toxique. Il est généré dans le peroxysome, les microsomes et les mitochondries par une réaction de dismutation [Ramirez et al. 2008] de O₂^{•-} afin de produire l'H₂O₂ [Bonfont-Rousselot et al. 2003].

1.2.4 Radical hydroxyle

Il produit principalement à partir de l'anion super oxyde et du peroxyde d'hydrogène en présence d'ions ferriques, au cours de la réaction d'Haber-Weiss.

Le radical hydroxyle possède une très grande réactivité dans les milieux biologiques, pouvant se « combiner » avec de nombreuses molécules. Il est capable de réagir avec presque tous les composants cellulaires par échange d'électron, addition sur les doubles liaisons ou arrachement d'un atome d'hydrogène. C'est un oxydant très puissant, constituant certainement le radical libre le plus toxique en biologie. Le radical hydroxyle est donc un oxydant très puissant, constituant certainement le radical libre le plus toxique en biologie et serait à l'origine de la production des radicaux libres « secondaires », suite à sa réaction avec différents composés cellulaires [Lacolley, P. 2007].



1.3 L'origine du stress oxydatif

Le stress oxydant peut avoir diverses origines, tel que des facteurs environnementaux comme : l'exposition prolongée au soleil, la lumière UV, le tabagisme, la consommation excessive d'alcool et de médicaments, le contact avec des agents cancérigènes, la pollution, ou même des facteurs endogènes comme la chaîne de transport des électrons dans les mitochondries, les phénomènes inflammatoires chroniques ou aigus et la mauvaise alimentation [Figure III.3] [Thanan *et al.* 2014].

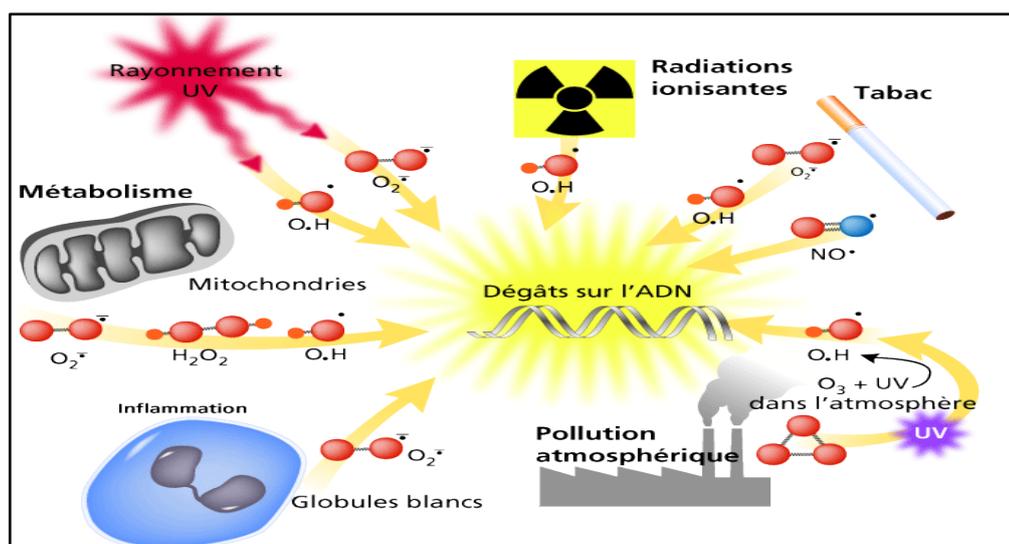


Figure I.24. Principales sources des radicaux libres [Pincimail *et al.* 2008].

1.4 Rôle physiologique des radicaux libres

Les radicaux libres longtemps considérés comme délétères ont en quantité modérée, un rôle physiologique essentiel au niveau de l'homéostasie cellulaire et plus particulièrement dans l'activité de certaines enzymes intracellulaires [Cindrova-Davies *et al.* 2014]. La mort cellulaire programmée est l'une des principales fonctions déclenchées par le stress oxydant ; elle est considérée comme un phénomène naturel qui se produit pendant le développement normal. Des ERO sont impliquées lors du développement comme molécules de signalisation et dans la modulation de la plasticité synaptique. Cependant, lorsque la production de RL est trop élevée et dépasse les capacités de défense antioxydantes des tissus, ces molécules provoquent des altérations irréversibles des fonctions cellulaires de base, de l'intégrité de la membrane cellulaire, et de l'ADN [Belaïch *et Boujraf.* 2016 ; Jauniaux *et Burton.* 2016].



1.5 Les conséquences du stress oxydatif

Le principal danger des radicaux libres vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants, tels que l'ADN [**Hadj Salem. 2009**]. Les lipides (peroxydation), les protéines...etc. [**Jacob. 2007**]. Cette oxydation provoque des dommages sur tout l'organisme, accélérant le vieillissement (maladies cardiovasculaires et neuro-dégénératives, cancer, diabète...) [**Pincemail et Defraigne. 2003**] et la dégradation des cellules et des tissus [**Bonnet, Alamigeon et Micheels. 2010**].

1.5.1 Dommages oxydatifs à l'ADN

Les acides nucléiques sont particulièrement sensibles à l'action des radicaux libres. L'attaque de l'ADN va entraîner la modification des bases puriques et pyrimidiques où des cassures au niveau de la double hélice et des mutations ponctuelles, qui peuvent avoir de graves conséquences sur la synthèse des protéines et sur la transmission de l'intégrité du patrimoine génétique [**Thanan et al. 2014**].

1.5.2 Dommages oxydatifs aux Lipides

L'oxydation des lipides, notamment des acides gras polyinsaturés, induit une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire. L'attaque radicalaire des lipoprotéines circulantes aboutit à la formation de lipoprotéines de basse densité (LDL) oxydées, qui seront captées par des récepteurs spécifiques des macrophages qui transforment en cellules spumeuses, constituant une étape dans la formation de l'athérosclérose [**Nakajima et al. 2006**].

1.5.3 Dommages oxydatifs aux protéines

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des radicaux libres. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus avec, pour conséquences, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes. Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire [**Haleng et al. 2007**].



1.6 Maladies liées au stress oxydatif

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, car le vieillissement diminue les défenses antioxydants et augmente la production mitochondriale de radicaux. En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en sur-exprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré. Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires [Favier. 2003].

1.7 Mécanismes de défense contre le stress oxydant

Les types de radicaux produits ainsi que leurs lieux de production et de propagation étant variés, la riposte anti radicalaire est polymorphe, à la fois préventive et curative [Figure III.4]. Les Antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou inhiber l'oxydation de ce substrat. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des Enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi des molécules anti radicalaires « Scavengers », qui piègent les radicaux libres (vitamines antioxydants A, C, E), thiols et β carotène) [Cano et al. 2007]. Classiquement, on répertorie les antioxydants selon leur origine, les antioxydants endogènes de type enzymatique sont plutôt impliqués dans la neutralisation des RL alors que les antioxydants non enzymatiques et ceux d'origine exogène sont des donneurs de protons ou d'électrons [Durand et al. 2013].

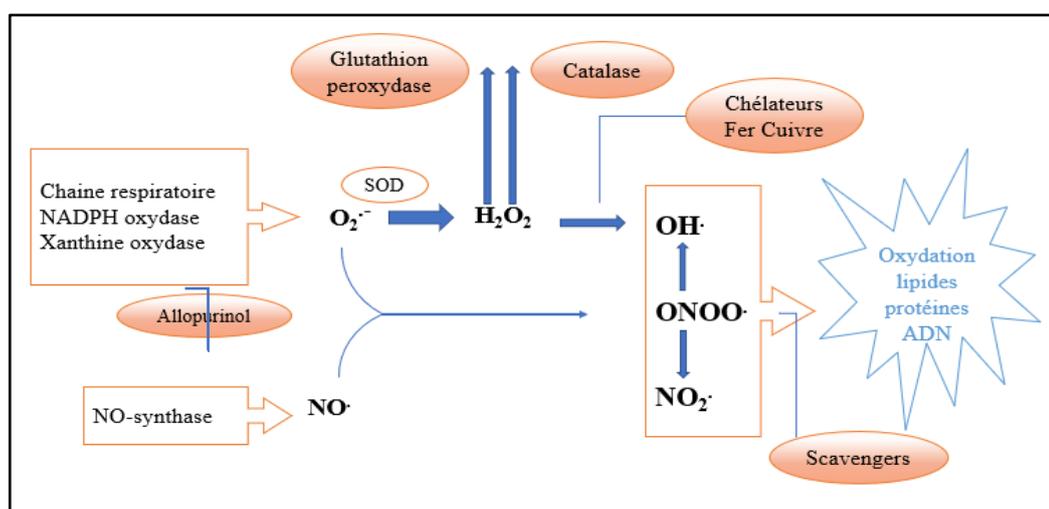


Figure I.25. Action des antioxydants au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène [Cano et al. 2007].



1.7.1 Système antioxydant enzymatique

1.7.1.1 Catalase

Le peroxyde d'hydrogène produit par les SOD (Super oxydes dismutases) va devoir être dégradé afin de ne pas provoquer des dommages cellulaires. C'est à ce niveau qu'interviennent les catalases qui composées de quatre sous-unités contenant chacune un hème et elle n'utilise pas des cofacteurs enzymatiques. Elles vont alors dégrader l' H_2O_2 en eau et en dioxygène, diminuant ainsi sa demi-vie et atténuant de ce fait la génération des radicaux hydroxyles. Elles se retrouvent préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol [Yoshimoto et al. 2007 ; Nicholls. 2012 ; Powers et Jackson. 2008].

1.7.1.2 Glutathion Peroxydase (GPX)

La glutathion peroxydase catalyse l'oxydation du glutathion aux dépens du peroxyde d'hydrogène [Levrault et al. 2003]. Elle peut aussi réagir avec d'autres substrats comme les lipides expliquant son rôle protecteur vis-à-vis de la peroxydation lipidique. Son site actif contient du sélénium et elle a besoin de glutathion réduit pour fonctionner. Dans la cellule, on la trouve essentiellement dans le cytosol et les mitochondries. C'est une des défenses antioxydants les plus importantes de l'organisme [Orban. 2010].

1.7.1.3 Super oxydes dismutases (SOD)

Les SOD représentent la première ligne de défense pour éliminer les ROS et ce sont les enzymes antioxydants les plus importantes [Higashi et al. 2009 ; Wassmann et al. 2004]. Ce sont des métallo enzymes qui catalysent la dis-mutation des ions super oxydes en peroxyde d'hydrogène et d'oxygène ($2\text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$) [Huang. 2001]. Chez les mammifères cette famille comporte trois iso formes (SOD₁, SOD₂, SOD₃) [Antwerpen. 2006] ; qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD) [Huang. 2001].

1.7.1.4 Glutathion réductases (GRD)

C'est une flavoenzyme homodimérique ; chaque sous-unité contient du FAD au niveau de son site actif, la (GRD) permet de régénérer le GSH à partir du GSSG [Raman et Berry. 2011]. La glutathion réductase utilise un cofacteur, le NADPH qui réduit d'abord le FAD en FADH₂. Le FADH₂ est ensuite une source d'électrons sur un pont disulfide (-S—S-) de l'enzyme qui réduit à son tour le GSSG en GSH [Halliwell et Gutteridge. 2008].



1.7.2 Système antioxydant endogène non enzymatique

1.7.2.1 Glutathion

Le glutathion (GSH) est un tri peptide composé de cystéine, glutamine et glycine, localisé au niveau du cytosol et des mitochondries. C'est le cofacteur de plusieurs enzymes antioxydants, il joue un rôle important, dans la protection des tissus et la réparation des protéines oxydées [Zhang et Forman. 2012 ; Carocho et Ferreira. 2013]. Le glutathion possède deux formes l'une oxydée (GSSG) et l'autre réduite (GSH). Ces deux états forment le couple redox (GSSG/GSH). La capacité antioxydante du glutathion réside dans la présence d'un groupement thiol (-SH) présent sur la cystéine réduite. [Raman et Berry. 2011].

1.7.2.2 L'acide urique

L'acide urique produit terminal majeur du métabolisme des purines chez l'homme. Il a été proposé comme un des meilleurs antioxydants du plasma, où il contribue à 35-60% de la capacité antioxydante totale. L'acide urique est un puissant réducteur des radicaux libres, il réduit les radicaux peroxydes, hydroxyles et neutralise aussi l'anion super oxyde [Favier. 1997 ; Letonturier. 2002].

1.7.2.3 Bilirubine

La bilirubine est le produit final de la dégradation de l'hème de plusieurs protéines hémiques. La dégradation de l'hème en biliverdine est faite par une enzyme appelée l'hème oxydase (HO) qui est retrouvée dans le réticulum endoplasmique. Après la biliverdine est transformée en bilirubine grâce à la biliverdine réductase présente dans le cytosol. La bilirubine possède des propriétés antioxydants envers plusieurs espèces réactives tel que le ONOO⁻ et l'¹O₂ [Paredi et al. 2002 ; Halliwell et Gutteridge. 2008], elle aussi intervient dans la protection des membranes cellulaires contre la peroxydation lipidique [Paredi et al. 2002].

1.7.3 Système antioxydant exogène

Ces antioxydants ne sont pas synthétisés par l'organisme mais doivent être apportés par l'alimentation sous forme de fruits et de légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, et polyphénols [Vertuani et al. 2004]. Egalement quelques oligo-éléments comme le sélénium et le zinc qui sont des cofacteurs importants pour l'activité de certains enzymes antioxydants [Pincemail et Defraigne. 2004].



1.7.3.1 L'acide ascorbique (vitamine C)

La vitamine C ou l'acide ascorbique est considéré comme le principal antioxydant hydrosoluble, sensible à la chaleur, aux ultraviolets [Fain, O. 2004]. Elle possède une très bonne réactivité envers plusieurs ERO comme le HO•, le O₂•-, le NO₂•, l'1O₂ [Carr et Frei. 1999]. Ainsi, elle empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle passe par une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) [Chen et al. 2000], qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée [Valko. 2011]. La plupart des plantes et des animaux peuvent synthétiser l'acide ascorbique sauf les singes et les humains en raison du manque de l'enzyme gulonolactone oxydase [Naidu. 2003].

1.7.3.2 L'α-tocophérol (vitamine E)

Cette vitamine est décrite comme étant le principal antioxydant liposoluble dans le plasma et les érythrocytes chez l'homme, situés dans les lipoprotéines et dans les membranes [Delattre et al. 2005]. Leur forme naturelle inclue quatre tocophérols isomères α, β, γ, δ, avec une activité antioxydant variable dont l'alpha tocophérol (α-Toch) est la forme la plus active. [Halliwell et Gutteridge. 2008]. Lors de la peroxydation lipidique, elle va permettre l'inhibition de l'étape de propagation, et ainsi assurer un rôle de protection des membranes contre l'oxydation lipidique [Herrera et Barbas. 2001]. Il joue un rôle dans l'atténuation du stress oxydatif, dans les symptômes des maladies neurodégénératives, et en particulier dans la maladie d'Alzheimer qui a récemment reçu un grand intérêt. En conséquence, il entrave l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales, l'agrégation des plaquettes et la formation consécutive des plaques d'athérome [Annaházi et al. 2007].

1.7.3.3 Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments fabriqués par les végétaux. Ce sont eux qui donnent aux fruits et légumes des couleurs orange, rouge et jaune. Les plus importants sont le β-carotène, l'α-carotène et le lycopène. La plupart des caroténoïdes ont une propriété antioxydante. Leur structure polyène leur permet d'absorber la lumière et de neutraliser l'oxygène singlet [Causse. 2008]. Comme ils le font pour les plantes, ils ont des effets bénéfiques sur notre santé [Rodriguez-Amaya et Kimura. 2004]. Ce sont d'excellents piègeurs d'espèces radicalaires particulièrement vis-à-vis de la lipoperoxydation des phospholipides membranaires grâce à leurs structures [Packer et al. 1981].



1.7.3.4 Zinc

Le zinc joue un rôle de cofacteur dans la SOD1, il pourrait agir comme antioxydant en déplaçant le fer (particulièrement ionique) des sites de fixation, inhibant alors la synthèse d'espèces réactives rendue possible ou facilitée par sa présence [Halliwell et Gutteridge, 2008].

1.8 Antioxydants de synthèse

Il existe plusieurs antioxydants synthétiques dont les squelettes sont souvent dérivés des antioxydants naturels [Lee et al. 2009]. Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tels que le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), et la gallate propylée (PG) sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins coûteux que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée, car ils sont susceptibles de manifester des effets secondaires et même toxiques [Lisu et al. 2003].

1.9 Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Certaines méthodes pratiques ont été développées pour une quantification rapide, simple et fiable de la capacité antioxydante *in vitro* et *in vivo*. En général, les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante peuvent être divisées en deux grandes catégories suivant les réactions mises en jeu : soit les tests basés sur le transfert d'un atome d'hydrogène (HAT : Hydrogen Atome transfer) ; soit les tests basés sur le transfert d'un simple électron (SET, Single Electron transfert). [Huang et al. 2005 ; Prior et al. 2005].

Les techniques du premier groupe sont employées pour évaluer la peroxydation lipidique en utilisant un substrat lipidique ou lipoprotéique. La quantification de cette propriété est exprimée par la mesure du degré d'inhibition de l'oxydation [Sánchez-Moreno et al. 1998].

Alors, les méthodes du deuxième groupe sont celles qui interviennent dans la mesure de l'habilité du piégeage des radicaux libres. Elles comportent le piégeage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), de l'acide hypochloreux (HOCl), de l'hydroxyle (OH•), des anions super oxyde (O₂•-), du peroxyde (ROO•) et de l'oxyde nitrique (NO•) [Sánchez-Moreno. 2002]. Il existe quatorze tests pour évaluer l'activité antioxydante, dont on cite sept tests qui nous avons les testés dans notre recherche :

- ✓ Test de piégeage du radical libre DPPH•
- ✓ Piégeage du ABTS (2,2'-azynobis- [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acide])
- ✓ Test de réduction du cuivre (CUPRAC)



- ✓ Chélation des ions métalliques.
- ✓ Capacité de réduire l'ion ferrique (Pouvoir réducteur).
- ✓ Glavinoxyl radical scavenging assay.
- ✓ Test de phénanthroline.

2 Activité anti-Alzheimer

L'Alzheimer c'est une maladie neurodégénérative signifiée variété de condition découlant d'une dégradation chronique et la détérioration des neurones produisant de l'acétylcholine, en particulier ceux du système nerveux central [Adewusi et al. 2010]. La maladie Alzheimer (MA) a été décrite pour la première fois en 1906 par un neuropchiatre bavarois, Alois Alzheimer.

On a montré qu'il existe une baisse de la concentration d'acétylcholine dans le cerveau de patients atteints de MA ; les théories du vieillissement radicalaire et du stress oxydatif suggèrent que les dommages oxydatifs sont un acteur majeur de la dégénérescence des cellules. A cet égard, des découvertes récentes indiquent clairement que les dommages oxydatifs sont l'un des premiers événements dans la pathogenèse de la MA [Valdimir-Knezevic et al. 2014].

La physiopathologie de la MA est complexe et implique plusieurs voies chimiques. Le premier défaut découvert dans cette maladie a impliqué l'Ach (acétylcholine), neurotransmetteur du système cholinergique qui est impliqué dans la mémoire et l'apprentissage [Ibrahim et al. 2016]. L'Ach une molécule organique produite par la choline acétyltransférase qui utilise l'acétyl coenzyme A et la choline comme substrats pour la formation de l'Ach est stockée dans les terminaisons nerveuses, et est libérée des celles-ci, entrant ainsi dans la synapse et se liant au récepteur. Cependant, chez les patients atteints de MA, grâce à la présence de grandes quantités d'enzymes, l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE), l'ACh qui est libérée possède une demi-vie très courte [Orhan et al. 2004 ; Ali-Shtayeh et al. 2014]. Ces enzymes hydrolysent la liaison ester dans la molécule d'Ach, conduisant à une perte d'activité de cette dernière [Adewusi et al. 2010].

Le traitement clinique de cette maladie est palliatif et repose principalement sur l'emploi des agents inhibiteurs à la fois de l'AChE et la BchE, qui connus sous le nom d'acétylcholinestérase inhibiteur (AChEI) et butyrylcholinestérase inhibiteur (BchEI) respectivement, leur rôle consiste à améliorer la fonction cholinergique par stimulation des récepteurs cholinergiques ou prolongeant la disponibilité d'Ach libérée dans la fente synaptique neuronales [Adewusi et al. 2010]. Cette inhibition est considérée comme une stratégie prometteuse pour le traitement des troubles neurologiques [Orhan et al. 2004].



En outre, vu que fortes preuves expérimentales démontrent que le stress oxydatif est intimement implique dans les maladies neurodégénératives, plusieurs études ont examiné les effets positifs des antioxydants dans la réduction ou le blocage de la mort neuronale dans la physiothérapie de ces troubles. Par conséquent, l'utilisation d'antioxydant a été explorée dans le but de ralentir la progression de la MA et de la dégénérescence neuronale [Ali-Shtayeh et al. 2014].

Le dosage de l'activité anti-acétylcholinestérase a une grande importance pour la caractérisation in vitro des médicaments, y compris les traitements potentiels de la MA [Ali Shtayeh et al. 2014]. Les activités de l'AchEI et de la BchEI ont été mesurées en modifiant légèrement la méthode spectrophotométrique développée par [Ellman et al. 1961].

3 Activité antidiabétique

3.1 Définition de diabète

Le diabète est une maladie fréquente, connue depuis fort longtemps, très répandue en ce début de XXIème siècle. C'est une maladie définie comme un affection métabolique, caractérisée par une hyperglycémie (taux de sucre dans le sang trop élevé) liée à une déficience, soit de la sécrétion, soit de l'action de l'insuline, ou des deux [Kandouli. 2018].

Le diabète est un désordre du métabolisme lipidique, glucidique et protéique attribué à la production diminuée de l'insuline ou à une résistance anormale à cette hormone qui entraîne une hausse du taux de glucose ; soit une glycémie à jeun supérieure à 1,26g/l (7mmol/l) ou une glycémie supérieure à 2g/l (11,1mmol/l) à n'importe quel moment ou lors d'une hyperglycémie provoquée par voie orale à deux reprises [Kandouli. 2018 ; Bonnefont-Rousselot et al. 2004].

3.2 Types de diabète

3.2.1 Diabète de type 1

Le diabète de type 1 ou Le diabète insulino-dépendant concerne le plus souvent les enfants, mais il peut survenir à tout âge. Il est causé par la destruction de la cellule bêta du pancréas, d'où l'incapacité de la personne atteinte à sécréter de l'insuline, c'est pourquoi le diagnostic est souvent brutal et les injections d'insuline sont vitales chez ces personnes [Usher-Smith et al. 2012].



3.2.2 Diabète de type 2

Le diabète de type 2 ou Diabète non insulino-dépendant (DNID). Le diabète de type 2 (DT2) est plus fréquent, et compte pour 90-95 % des diabétiques. Il se caractérise par une insulino-résistance et souvent un déficit relatif de la sécrétion de l'insuline par les cellules β pancréatique. L'hyperglycémie détectée est la résultante de la diminution de l'utilisation du glucose par les tissus périphériques, notamment le muscle [Shulman. 2000 ; Shulman et al. 1990], et une augmentation de la production hépatique du glucose par le foie [Virally et al. 2007]. Le taux des acides gras est aussi élevé, à cause de la lipolyse accentuée, [Roden et al. 1996 ; Kovacs et Stumvoll. 2005].

3.3 Diabète et les plantes médicinales

Les plantes possèdent plusieurs principes actifs qui leur permettent d'avoir une action sur l'organisme. Dans le cas du diabète, elles ont une action hypoglycémiante, dont le mécanisme diffère ainsi que le principe actif responsable. Parmi les constituants des plantes ayant une activité hypoglycémiante, on trouve les polysaccharides, les peptides, les alcaloïdes, les glycopeptides, les triterpénoïdes, les acides aminés, les stéroïdes, les flavonoïdes, les phénols, les coumarines, les ions inorganiques et les guanidines [Jarald et al. 2008].

3.4 Diabète et le stress oxydatif

Les complications du diabète sont fortement liées à certain nombre de facteurs. A côté de L'hyperglycémie chronique et la glycation non enzymatique des protéines, un facteur très important impliqué dans la genèse de ces complications est le stress oxydatif [Pincemail et al. 1999].

En effet, le métabolisme cellulaire normal de l'oxygène produit de manière continue de faibles quantités d'espèces oxygénées activées dont font partie les radicaux libres (O_2 , OH, H_2O_2). Le patient diabétique présente une surproduction des ROS d'une part et d'autre part, une diminution des antioxydants, ce qui génère un état de stress oxydatif à l'origine des micros et des macro angiopathies [Pincemail et al. 1999].

L'hyperglycémie active plusieurs voies responsables d'un stress oxydant et de la surproduction d'ERO. Il est intéressant de noter que les ERO peuvent participer à l'installation du diabète en altérant l'action de l'insuline et en détruisant les cellules bêta du pancréas [Bonfont-Rousselot et al. 2004].



4 Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est une réaction de défense de l'organisme à diverses agressions qui peuvent être d'origine physique, chimique, biologique (réponse immunitaire) ou infectieuse ; son but est de mobiliser le système immunitaire afin d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Elle se traduit ordinairement par quatre symptômes cardinaux : Rougeur, chaleur, douleur, et lésion fonctionnelle énoncés par Aulus Cornelius Celsius [figure III.5] [Sarkhel. 2015].

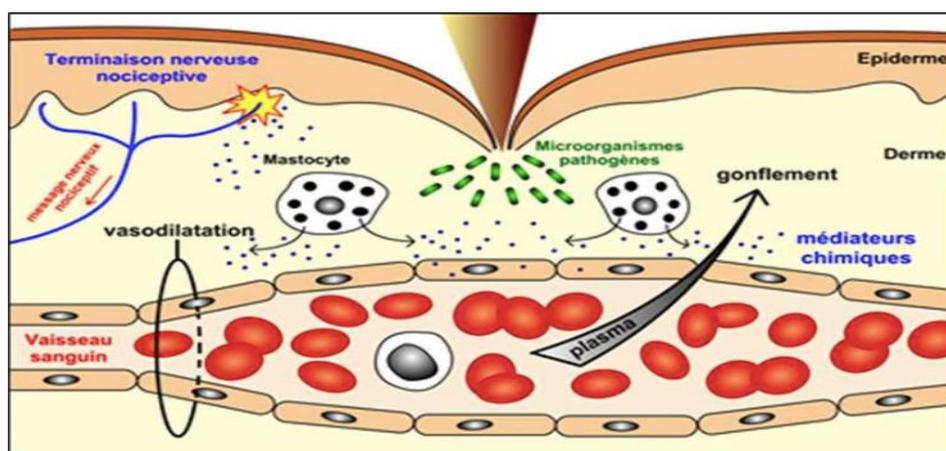


Figure I.26. Les symptômes d'une réaction inflammatoire.

4.1 Types d'inflammation

Selon le poids moléculaire de l'agent pathogène, l'intensité et la durée de l'inflammation, on distingue l'inflammation aigue et celle de chronique [Barton. 2008].

4.1.1 Inflammation aigue

L'inflammation aigue est de courte durée et caractérisée par quatre phénomènes typiques, qui sont l'œdème, la douleur, la chaleur et la rougeur. Elle est causée par l'activation de différents médiateurs et cellules spécialisés dans le site infecter. L'inflammation aigue peut-être divisée en trois grandes phases : une phase vasculaire immédiate, une phase cellulaire et une phase de résolution et cicatrisation [Jacques et al. 1988].

4.1.2 Inflammation chronique

L'inflammation chronique est d'une longue durée et qui à l'origine de différentes maladies chroniques, telle que Rhumatisme Articulaire et de la polyarthrite rhumatoïde. Elle est caractérisée par une réponse immunitaire adaptative, elle fait intervenir des cellules



lymphocytaires spécifiques sur l'endothélium Vasculaire qui permettant leur transmigration dans les compartiments extravasculaires par l'apparition de molécules d'adhésion, sur la surface des cellules endothéliales [Cavaillon. 1993].

4.2 Anti-inflammatoires

Le traitement actuel de l'inflammation fait appel aux anti-inflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes) et non stéroïdiens comme l'aspirine. Ces molécules, bien qu'étant efficaces, présentent le plus souvent des effets indésirables qui peuvent gêner leur utilisation au long durée. Pour cette raison on retourne vers un troisième type d'origine naturel qui constitue les anti-inflammatoires d'origines végétales ou bien traditionnels.

4.2.1 Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS), constituent une vaste famille de médicament dérivé de cortisol, principalement les glucocorticoïdes surrénaliens qui sont des substances dérivées de cholestérols, sous l'action de l'hormone adrénocorticotropine (ACTH) de l'hypophyse. Ils sont responsables de nombreux effets biologiques, ils augmentent la production de la lipocortine, inhibant ainsi la phospholipase A₂ donc la libération de l'acide arachidonique. Par contre ils diminuent fortement la migration des polynucléaires, monocytes-macrophages vers le site de l'inflammation et la production d'autres médiateurs comme l'histamine, la sérotonine, les cytokines, les ions superoxydes [Weill et Batteux. 2003].

4.2.2 Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), agissent en empêchant la formation de prostaglandine responsable de l'inflammation par l'inhibition de la cyclooxygénase (enzyme qui permet la production de prostaglandine à partir de l'acide arachidonique). Ils sont caractérisés par une forte fixation aux protéines plasmatiques et une large distribution tissulaire. Outre, ils sont efficaces contre la douleur et la fièvre mais Leur action anti-inflammatoire n'est efficace qu'à forte dose, et par ce fait sont considérés comme l'une des classes thérapeutiques les plus utilisés dans le monde [Krzyszinski et Piront. 2002].

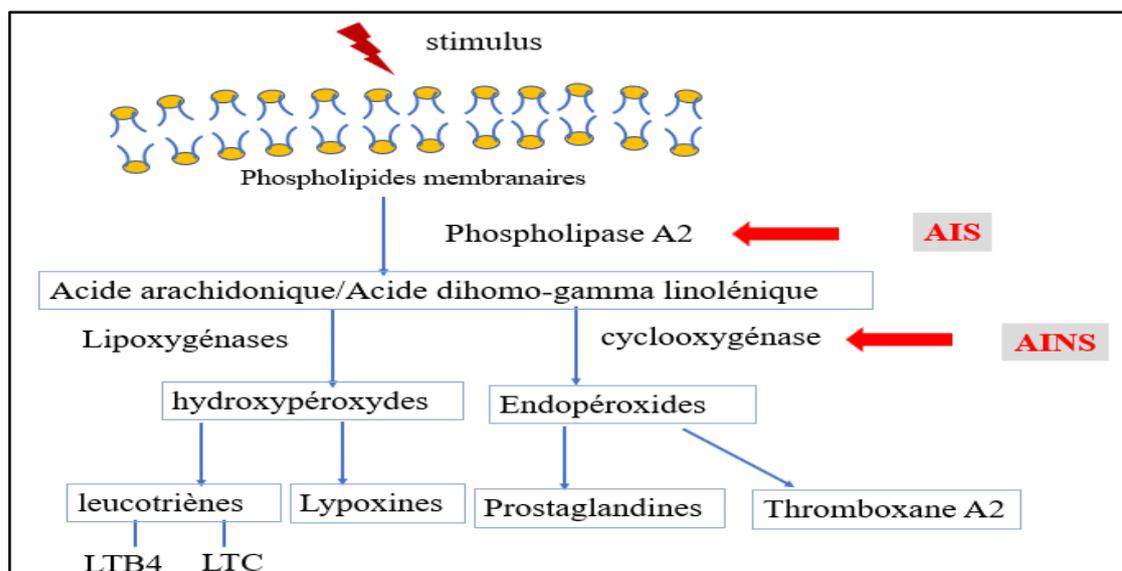


Figure I.27. Cascade arachidonique et site d'action des AIS et AINS [Bacchi et al. 2012].

4.2.3 Anti-inflammatoires traditionnels

Certains des composés phytochimiques ont des propriétés anti-inflammatoires. Des études *in vitro* et *in vivo* ont permis de montrer que les polyphénols de certaines plantes pouvaient agir sur les activités enzymatiques du métabolisme de l'acide arachidonique (AA) notamment, la phospholipase A₂, cyclooxygénase et lipoxygénase. Une inhibition de ces enzymes par les polyphénols réduit ainsi la production d'AA, de NO^{*}, de prostaglandines et de leucotriènes, médiateurs de l'inflammation [Fiebich et Chrubasik. 2004].

Tableau I.3. Exemples de plantes médicinales douées d'activités anti-inflammatoires [Barnes. 1998].

Nom scientifique	Nom commun	Famille	Partie utilisé	Utilisation
Zingiber officinale	Gingembre	Zingiberaceae	Rhizome	Arthrose, douleurs rhumatismales.
Helleborus orientalis	Lenten-ros	Ranunculaceae	Racines	Œdèmes, douleurs rhumatismales
Urticadiaca	Ortie	Urticaceae	Feuilles, Racines	Rhinite allergique, eczéma goutte.
Laurocerasus officinalis	Laurier	Rosaceae	Feuilles	Fièvre, douleurs d'estomac

Chapitre II

Matériels et Méthodes



Notre travail a commencé par la macération dans le laboratoire de biochimie au niveau de la faculté des sciences de vie et de la nature -Constantine 1- et suivi par le test des activités biologiques dans le laboratoire N° 2, et par l'analyse par HPLC dans le laboratoire N°5 au niveau du centre de la recherche de biotechnologie - CRBT- Constantine.

1 Aperçu et but de travail

Le choix de notre plante est basé sur le fait de sa large utilisation en médecine traditionnelle, sa disponibilité, la présence de molécules bioactives notamment les polyphénols et les flavonoïdes. Ce présent travail a pour but de mettre en évidence les activités biologiques présentes dans l'espèce *Capparis spinosa L* en vue de valoriser la richesse végétale de l'Algérie en plantes médicinales.

Notre étude a porté sur l'extraction des parties aériennes de la plante, l'extrait brut a été fractionné en cinq phases différentes en utilisant ampoule à décanter (extraction liquide-liquide). Ce fractionnement, suivi par le dépistage des activités antioxydantes, l'activité anti-Alzheimer, antidiabétique et anti-inflammatoire des cinq extraits.

2 Matériel végétale

2.1 Description de la zone de la récolte

La région de Zeghaia (Zeraia ou Zeraïa), en arabe زغاية, est une commune de la wilaya de Mila en Algérie, localisée au centre-est de la wilaya de Mila, à 7 Km.

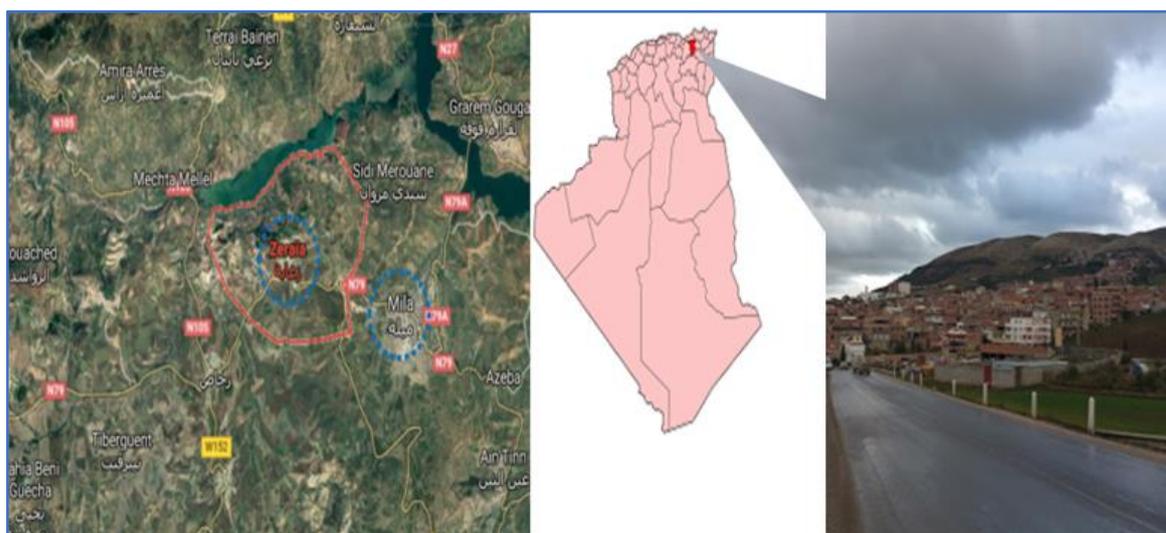


Figure II.1. Zeghaia wilaya de Mila [Google Earth. 2019].



2.2 Récolte de la plante *Capparis spinosa L*

La partie aérienne (fleurs, feuilles, fruits, bourgeons) de la plante de l'espèce *Capparis spinosa L* originaire de la zone de Zaghia ont été soigneusement récoltées au mois de Juin 2014 (stade de la floraison), de manière à ne pas détériorer les éléments organiques et minéraux présents. Cette plante a été mise à notre disposition par Mr. Zaiter et Mr. Bouaroudj ainsi son identification botanique a été faite par Mr. KAABOUCHE.

3 Méthodes d'analyses phytochimiques

On a plein des méthodes d'analyses utilisées afin de mettre en évidence les constituants d'un extrait ou les molécules qu'il contient pour cela il existe des méthodes d'analyses physico-chimique comme Spectrophotométrie UV-visible et Spectroscopie de RMN, et ainsi chromatographique tel que la chromatographie sur couche mince (CCM), chromatographie liquide sous vide (VLC), chromatographie sur colonne ouverte (CC) et la chromatographie liquide haute performance (HPLC), dans notre étude nous avons utilisé deux appareils différentes qui sont :

➤ Spectrophotométrie UV-visible

La lecture de l'absorbance a été effectuée grâce à :

- Un lecteur de microplaque Perkin Elmer (EnSpire Alpha Plate Reader) multimode. Grâce à son monochromateur le lecteur offre une grande sensibilité aux essais.
- Un spectrophotomètre à cuve pour le test anti-thérmodénaturant de l'activité anti-inflammatoire.



Figure II.2. Spectrophotomètres UV-visible. (a) lecteur de microplaque Perkin Elmer, (b) spectrophotomètre à cuve.



➤ Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Nos analyses chromatographiques (HPLC) des composés phénoliques ont été effectuées dans un appareil de Agilent technologies, c'est une 1260 infinity, Quaternary pump couplé à un détecteur UV vis à barrette de diode (DAD). Le logiciel utilisé c'est OpenLab CDS. Pour la colonne c'est une « Zorbax éclipse plus C₁₈ phase inverse 4,6*250 mm particle size 5µm »



Figure II.3. Système quaternaire de l'HPLC.

4 Etude phytochimique de la plante de l'espèce *Capparis spinosa* L

4.1 Préparation de la poudre végétale

Après l'obtention de la plante, la partie aérienne (tige, feuille, fleurs et fruits) est broyé manuellement à l'aide d'un mortier et un pilon. Le produit est pesé avec une balance électronique. Cette poudre est ensuite conservée dans un bocal en verre hermétiquement fermé.



Figure II.4. Etapes de préparation de la poudre végétale des parties aériennes de *C. spinosa* L.



4.2 Extraction par macération à froid (solide - liquide)

Le protocole extractif a été effectué selon la méthode [Koleva *et al.* 2002 ; Bammou *et al.* 2015] et comporte les étapes suivantes ; Après le séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, la partie aérienne (feuilles, fleurs et fruits) de la plante (100 g) a été macérée à température ambiante dans 570 mL de méthanol, pendant 24h. Le mélange est filtré par double filtration la première sur la gaze puis une deuxième sur papier filtre Whatman. La macération est renouvelée deux fois sur le résidu récupéré avec renouvellement du solvant chaque 24h, pour permettre la solubilisation maximum des composés. Les trois macérats filtrés sont réunis pour donner l'extrait méthanolique brut. Celui-ci est évaporé à sec sous pression réduite à 37°C à l'Evaporateur rotatif et pesé pour déterminer son rendement. Un poids du résidu sec est conservé comme extrait méthanolique jusqu'à leur utilisation et le reste est repris dans l'eau distillée bouillante (250 mL) qui solubilise proportionnellement les flavonoïdes. La solution obtenue est filtrée sur gaze afin d'éliminer les substances non phénoliques (impuretés, graisses, cires.... etc.).

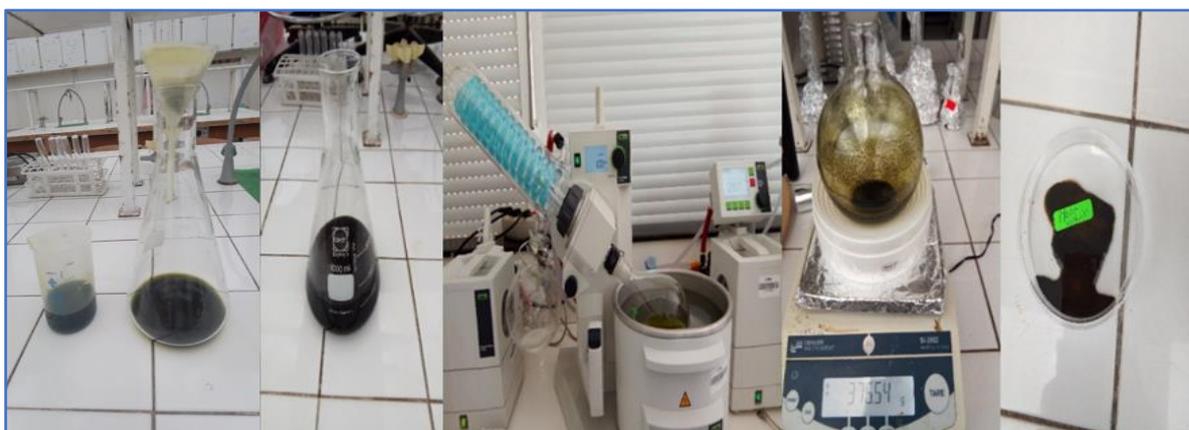


Figure II.5. Etapes de macération des parties aériennes de la plante et procédé de concentration des filtrats méthanoliques.

4.3 Extraction liquide - liquide (Affrontement)

La solution aqueuse obtenue est soumise à une extraction liquide-liquide avec les solvants organiques suivants. La première extraction est réalisée avec l'éther de pétrole (3 X 100 mL) qui permet d'entraîner les graisses ainsi que les substances lipophiles ; la deuxième avec le chloroforme (3 X 100 mL) ; la troisième avec l'acétate d'éthyle (3 X 200 mL) et la dernière avec le butanol (3 X 200 mL).

Le fractionnement est réalisé pendant 20 minutes et l'opération est répétée trois fois pour chaque solvant. Les quatre phases organiques ont été réunies et évaporées à sec sous pression



réduite, puis pesées. Cinq fractions sont à la fin récupérées : fraction méthanolique (MeOH), fraction éther de pétrole (EP), fraction chloroforme (CHCl_3), fractions acétate d'éthyle (ActOH) et la fraction *n*-butanolique (BuOH). Les fractions ont été séchées et conservées jusqu'à leur utilisation.



Figure II.6. Etapes d'extraction liquide-liquide et procédé de concentration de chaque extrait.

Un diagramme schématique (protocole) pour la préparation d'extraits organiques de *Capparis Spinosa L* est représenté sur la [Figure II.7].

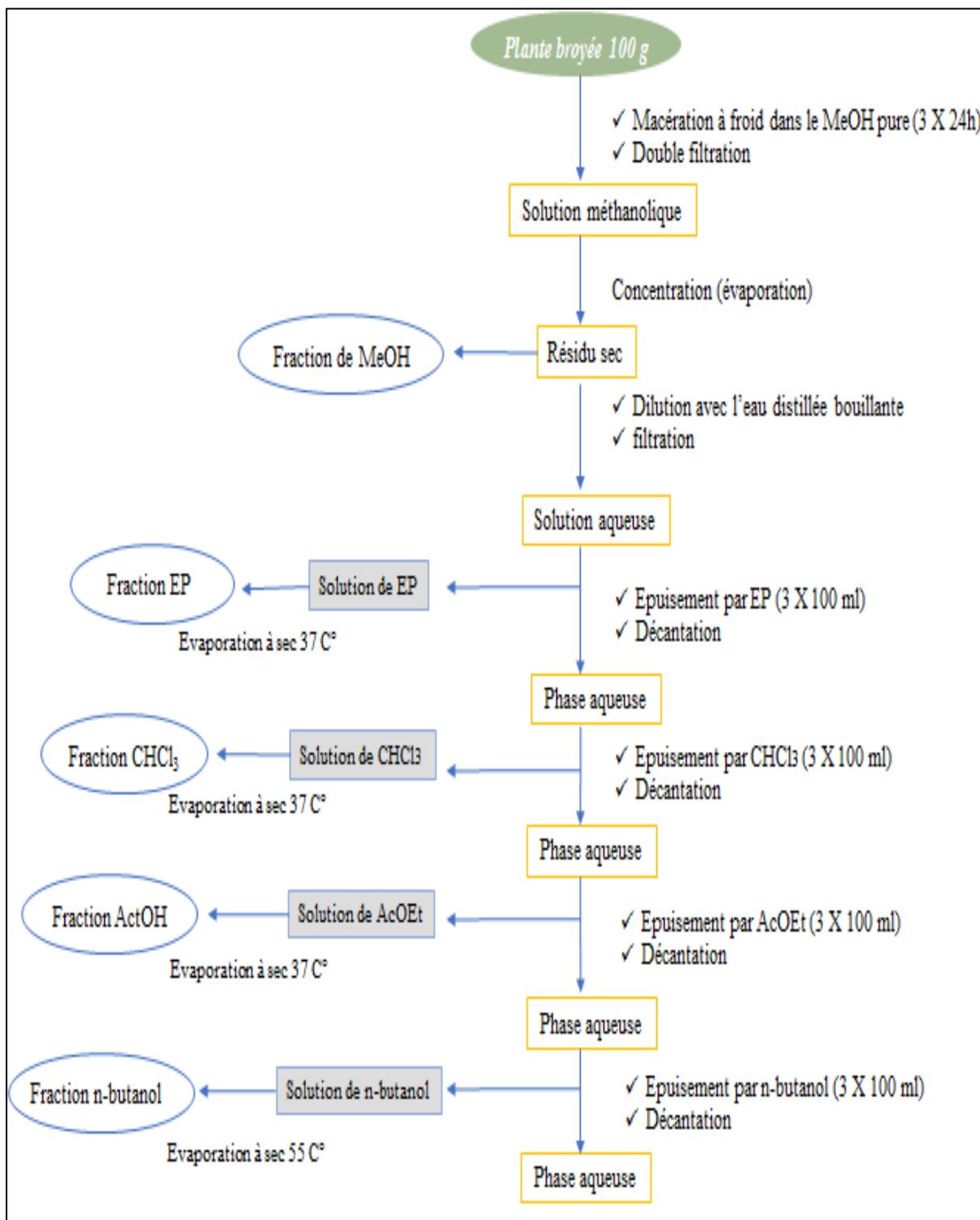


Figure II.7. Schéma du protocole d'extraction de *Capparis spinosa L.*



4.4 Expression du rendement d'extraction

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

$$R (\%) = (M1 - M0 / M) \times 100$$

Où :

R (%) : Rendement en %.

M0 : Masse de ballon vide.

M1 : Masse de ballon après évaporation.

M : Masse de matière sèche.

4.5 Caractéristique quantitative et qualitative des extraits

4.5.1 Dosage des polyphénols totaux

a) Principe

Le dosage des polyphénols totaux dans les extraits de *C. spinosa L.*, est effectué selon la méthode de Folin Ciocalteu [Singleton et al. 1999]. Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) de couleur jaune. Le principe de la méthode est basé sur la réduction de Folin Ciocalteu par les composés phénoliques qui entraîne la formation d'un nouveau complexe d'oxydes métalliques de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (MO_8O_{23}) de couleur bleue. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

b) Procédure

➤ Préparation de l'échantillon

Une quantité de 1 mg de l'extrait méthanolique, Ether de pétrole, chloroformique, acétate d'éthyle et butanolique, ont été dissoutes dans 1 mL du méthanol.

➤ Protocole

Le dosage est effectué comme suit, 20 μ L de chaque extrait dissous dans le méthanol sont ajoutés à 100 μ L du réactif de Folin Ciocalteu (dilué 10 fois dans de l'eau distillée). Puis, 80



μL de Na_2CO_3 (7,5 g/L) dilué également dans l'eau distillée, sont additionnés au mélange. Parallèlement, un blanc est préparé en ajoutant 20 μL d'extrait à 180 μL de méthanol (MeOH). Pour chaque concentration, le test est répété trois fois. Le mélange est agité et incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 2 heures et l'absorbance est mesurée à 765 nm par un spectrophotomètre UV (Perkin Elmer).

c) Expression des résultats

La concentration des phénols totaux est exprimée en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg GAE/g d'extrait) calculée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions réactionnelles avec l'acide gallique comme phénol standard [Annexe 1].

4.5.2 Dosage des flavonoïdes

a) Principe du test

La détermination de la teneur en flavonoïdes des cinq extraits (MeOH ; EP ; CHCl_3 ; ActOH ; BuOH) est effectuée par une méthode décrite par **Topçu et al. (2007)**. Cette méthode repose sur le principe du dosage direct par le nitrate d'aluminium ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3, 9\text{H}_2\text{O}$). La coloration jaunâtre donnée dans ce test est due à la formation d'un complexe entre les ions Al^{3+} et les flavonoïdes.

b) Procédure

➤ Préparation de l'échantillon

Le protocole de préparation des extraits est celui utilisé pour le dosage des polyphénols totaux.

➤ Protocole

Au niveau d'une microplaque multi puits, 130 μL de MeOH ont été ajoutés à 50 μL de chaque extrait mère, puis on a additionné 10 μL de CH_3COOK et un volume de 10 μL d' $\text{Al}(\text{NO}_3)_3, 9\text{H}_2\text{O}$. En Parallèle, le blanc est préparé avec 150 μL de MeOH et 50 μL d'extrait. Le test est répété dans trois puits pour chaque extrait. Enfin, la microplaque est incubée à température ambiante pendant 45 min. Après le temps d'incubation, l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 415 nm à l'aide de lecteur Perkin-Elmer.



c) Expression des résultats

La concentration des phénols totaux sont exprimés en milligrammes équivalents de quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g d'extrait) calculé en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions réactionnelles avec le quercétine comme flavonoïde standard [Annexe 2].

4.5.3 Analyse HPLC de composés phénoliques

Selon le protocole décrit par **Kandouli et al. (2017)**, pour séparer les composés phénoliques. Pour chaque fraction (2 mg/ mL dans le méthanol), les quantités moyennes de composés phénoliques ont été calculées à partir des courbes d'étalonnages standards obtenues pour les absorbances UV maximales des flavonoïdes, des composés hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques, et ont été quantifiées en tant qu'équivalents quercétine, acide gallique, et acide caféique (CAE) par gramme de poids d'extrait, respectivement. Les spectres UV ont été enregistrés dans la plage 220-600 nm pour identifier les différentes classes de composés phénoliques et tester leur pureté. L'HPLC en phase inverse a été réalisée à température ambiante sur une colonne C₁₈ (250 mm × 4 mm ; 5 µm).

4.6 Evaluation des activités biologiques des extraits

4.6.1 Activité antioxydante

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise [**Cristina et al. 2009**].

Dans le présent travail nous avons essayé d'évaluer les capacités totales antioxydantes de nos cinq extraits (MeOH, EP, CHCl₃, ActOH et BuOH) en utilisant sept méthodes spectrophotométrique à savoir :

- L'activité antiradicalaire pour le radical libre DPPH•
- L'activité antiradicalaire pour le radical-cation ABTS+•
- L'activité chélatrice des ions de fer
- Le test de radical Galvinoxyl GOR
- Le pouvoir réducteur de cuivre CUPRAC
- Le pouvoir réducteur de fer (reducing power)
- L'activité de Phénanthroline



Les résultats, sauf pour le dosage CUPRAC, pouvoir réducteur et phénanthroline, ont été enregistrés à la concentration 50% d'inhibition (IC_{50}). L'activité antioxydante des extraits testés a été comparée à celles des standards.

L'indice IC_{50} montre les concentrations de l'antioxydant qui sont nécessaires pour faire décroître la concentration initiale du réactif avec 50%. Cet indice est donné en mg/mL du milieu réactionnel, du coup la capacité antioxydante d'un échantillon est d'autant plus élevée que son IC_{50} est petit.

4.6.1.1 Test de piégeage du radical 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH)

a) Principe du test

Ce test consiste en une mesure de la capacité d'un composé antioxydant à réduire le radical libre persistant DPPH• par spectrophotométrie visible [Alencar et al. 2008]. Le DPPH• est un radical stable d'une coloration violette, due à la présence d'un électron non apparié sur l'atome d'azote, possédant un maximum d'absorption dans le visible à 517 nm en solution alcoolique.

L'absorbance de la solution du DPPH• diminue en donnant une couleur jaune, quand l'électron célibataire sur l'atome d'azote du DPPH• est réduit par un atome d'hydrogène provenant du produit antioxydant [Figure II.8]. La capacité antioxydante augmente d'autant plus que la substance réduit le DPPH• [Blois. 1958].

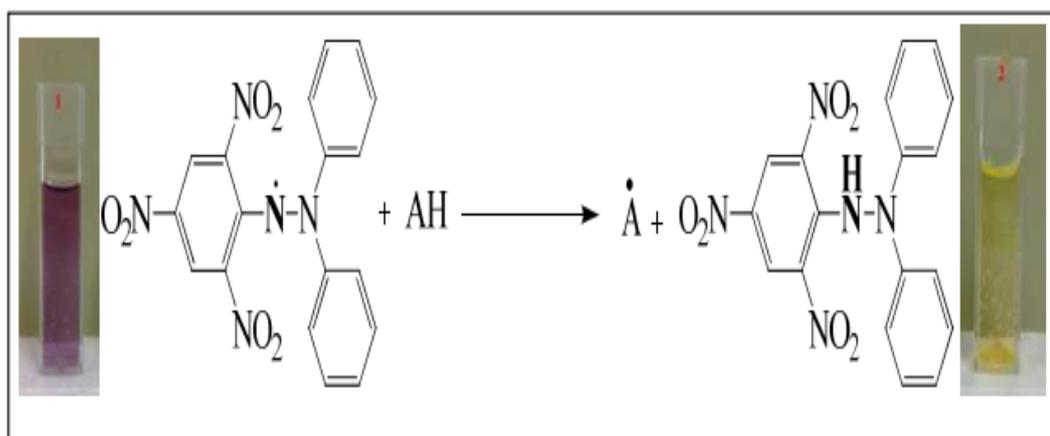


Figure II.8. Réaction de réduction du radical DPPH.

b) Procédure

➤ Préparation de l'échantillon

Une quantité de 4 mg de chaque extrait, a été dissoute dans 1 mL du méthanol (Solution mère (SM) de 4000 ppm), c'est à partir de cette dernière qu'une série de dilution de 1/2 a été préparé.



Le tableau II.1 présente la série de dilution préparée pour l'extrait méthanolique sachant que tous les extraits ont été préparé de la même manière.

Tableau II.1. Série de dilutions et concentration respectives de l'extrait méthanolique.

Extrait méthanolique							
Dilution	1/1 (Solution mère)	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Concentration de la solution (mg/mL)	4 mg/mL (4000 ppm)	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625
Concentration dans le milieu réactionnel en mg/mL	0,8	0,4	0,2	0,1	0,05	0,025	0,0125

➤ Protocole

L'activité antiradicalaire été mesurée selon le protocole décrit par [Blois. 1958] avec de légères modifications. Un volume de 40 μ L de chaque extrait avec un volume de 160 μ L de DPPH (0,1 mM) a été ajouté dans chaque puits de la microplaque multi puits, les tests sont pratiqués en triplicata pour les cinq extraits. Parallèlement un contrôle négatif (blanc) a été préparé en remplaçant l'extrait par le MeOH. Après incubation à température ambiante à l'obscurité pendant 30 min. la lecture des absorbances a été mesurée à 517 nm. La couleur violette disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényl picryl-hydrasine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration. Le contrôle positif est représenté par trois antioxydants standards le BHA ButylHydroxy-Anisol, le BHT butyl-hydroxy-toluène et α -tocophérol.

c) Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en pourcentage de réduction du DPPH qui est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A_c - A_e) / A_c] \cdot 100$$

Où

A_c : absorbance du contrôle négatif.

A_e : absorbance de l'échantillon ou standard.



4.6.1.2 Test par piégeage du radical ABTS+•

a) Principe du test

L'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) est un cation radicalaire facilement formé par oxydation en présence de persulfate de potassium pour donner une solution colorée en vert-bleu [Figure II.9]. La concentration de ce radical peut être déterminée en mesurant l'absorbance à la longueur d'onde appropriée. L'addition d'un antioxydant à une solution de ce cation radicalaire entraîne la réduction de ce radical et une diminution de l'absorbance mesurable à 734 nm. Cette diminution dépend de l'activité antioxydant des composés testés mais souvent aussi du temps et de la concentration [Re et al. 1999].

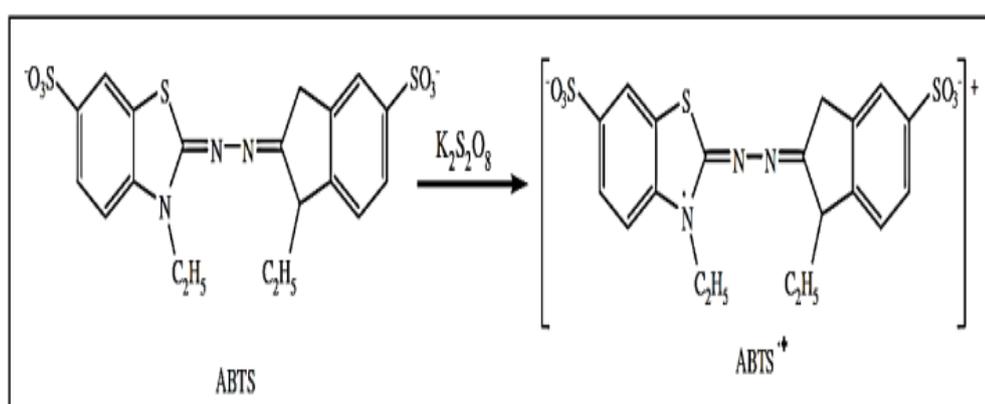


Figure II.9. Oxydation de l'ABTS par le persulfate de potassium et génération de ABTS+•.

b) Procédure

➤ Préparation de l'échantillon

Le protocole de dilution des extraits et celui utilisé pour l'activité DPPH.

➤ Protocole

Cette activité est déterminée selon la méthode de [Re et al. 1999] avec des volumes ajustés pour une manipulation sur microplaque de titration. Le cation radicalaire ABTS+• est généré en mélangeant 5 mL de la solution aqueuse d'ABTS (7 mM) avec le persulfate de potassium à 2,45 mM (concentration finale dans le mélange), le tout est conservé à l'abri de la lumière et à 4 °C durant 12-16 h avant l'utilisation. La solution obtenue est diluée avec le méthanol pour obtenir une absorbance de $0,7 \pm 0,020$ à 734 nm.

Dans chaque puits de la microplaque, 40 μ L de chaque extrait à différentes concentrations ont été mélangés avec 160 μ L de l'ABTS+•. Le mélange est laissé à l'abri de la lumière à température



ambiante pendant 10 min et la décoloration par rapport au control négatif contenant (40 μ L MeOH avec 160 μ L ABTS+•) est mesurée à 734 nm par le lecteur de microplaque Perkin Elmer. Trois essais ont été effectués pour chaque concentration de produits testés. Le contrôle positif est représenté par deux antioxydants standards le BHA (ButylHydroxy-Anisol) et le BHT (butyl-hydroxy-toluène).

c) Expression des résultats

Le pourcentage de l'activité anti radicalaire est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(Ac - Ae) / Ac].100$$

Où

Ac : absorbance du contrôle

Ae : absorbance de l'extrait

4.6.1.3 Test de chélation des Ions ferreux (métal chélate)

a) Principe du test

Le test sur la chélation des ions Ferreux est basé sur la capacité d'une molécule à fixer les ions Fe^{2+} . Ces derniers jouent un rôle important lors de la production des radicaux libres notamment lors de la réaction de Fenton, qui survient à chaque fois qu'une molécule d' H_2O_2 est en contact d'ions Fe^{2+} et qui est à l'origine de la production des radicaux hydroxyle (OH) [Huang et al. 2005]

La capacité chélatrice de nos cinq extraits est déterminée selon la méthode de [Denis et al 1999] qui est basée sur l'inhibition de la formation du complexe Fe (II)-Ferrosine après le traitement des échantillons avec les ions Fe^{2+} .

b) Procédure

➤ Préparation de l'échantillon

Le protocole de dilution des extraits est celui utilisé pour les activités précédentes.

➤ Protocole

Ce test été mesuré selon le protocole décrit par [Dinis et al. 1999] avec de légères modifications. 40 μ L de MeOH ont été ajoutés à 40 μ L d'extrait, puis 40 μ L d'une solution de $FeCl_2$ (0,2 mM). La réaction a été initiée par l'addition de 80 μ L de ferrozine et incubée à



température ambiante pendant 10 min. Parallèlement un contrôle négatif (blanc) a été préparé en remplaçant l'extrait par le MeOH. L'absorbance a ensuite été mesurée spectrophotométriquement à 562 nm. L'EDTA est utilisée comme standard.

c) Expression des résultats

L'activité chélatrice est exprimée en pourcentage en utilisant l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité chélatrice (\%)} = [(Ac - Ae) / Ac] \times 100$$

Où

Ac : absorbance du contrôle négatif.

Ae : Absorbance des solutions de l'extrait.

Pour une caractérisation meilleure de l'efficacité des extraits, la concentration effectrice (IC₅₀) définie comme la concentration de l'échantillon qui produit 50% d'effet chélateur ainsi que l'activité chélatrice exprimée en mg d'équivalent d'EDTA/g d'extrait sont calculées.

4.6.1.4 Test de balayage du radical Galvinoxyl (GOR)

a) Principe du test

Cette méthode est basée sur l'introduction de radical libre stable Galvinoxyl pour mesurer et comparer l'efficacité de la capacité des phénols à donner de l'hydrogène [Shi et Niki, 1998]. Le galvinoxyl est une molécule plutôt instable et tout en acceptant un électron ou radical hydrogène pour devenir une molécule stable et diamagnétique, il peut être réduit irréversiblement. En raison de son électron impair, le galvinoxyl montre une bande d'absorption forte à 428 nm.

b) Procédure

➤ Préparation de l'échantillon

Le protocole de dilution des extraits est celui utilisé pour les activités précédentes sauf pour les deux extraits ActOH et BuOH, grâce à leurs fortes concentrations, nous étions obligés d'établir une gamme de dilution beaucoup plus étendue que celle des autres extraits (2 mg/mL).

➤ Protocole

L'activité Galvinoxyl radical (GOR) scavenging assay est déterminée par la méthode décrite par [Shi et al. 2001], un volume de 40 µL de chaque extrait est déposé dans une plaque à 96 unités suivi par 160 µL de solution de Galvinoxyl (0,1 mM). Parallèlement un contrôle négatif



est préparé en remplaçant l'extrait par le MeOH. Après incubation durant 120 min à température ambiante à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 428 nm par le lecteur Perkin-Elmer. Les deux antioxydants de synthèse BHA et BHT sont utilisés comme contrôle positif.

c) Expression des résultats

Le pourcentage de l'activité anti radicalaire est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(Ac - Ae) / Ac] \cdot 100$$

Où

Ac : absorbance du contrôle

Ae : absorbance de l'extrait

4.6.1.5 Test de la capacité antioxydante par réduction de l'ion cuprique (CUPRAC)

a) Principe du test

La méthode est basée sur l'utilisation de réactif cuivre (II)-néocuproïne (Cu (II)-Nc) comme agent oxydant chromogène, ce dernier est réduit en présence d'un antioxydant qui conduit à la formation d'un chromophore de couleur jaune orangé. Cette réaction est quantifiée avec le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 nm [Apak *et al.* 2004].

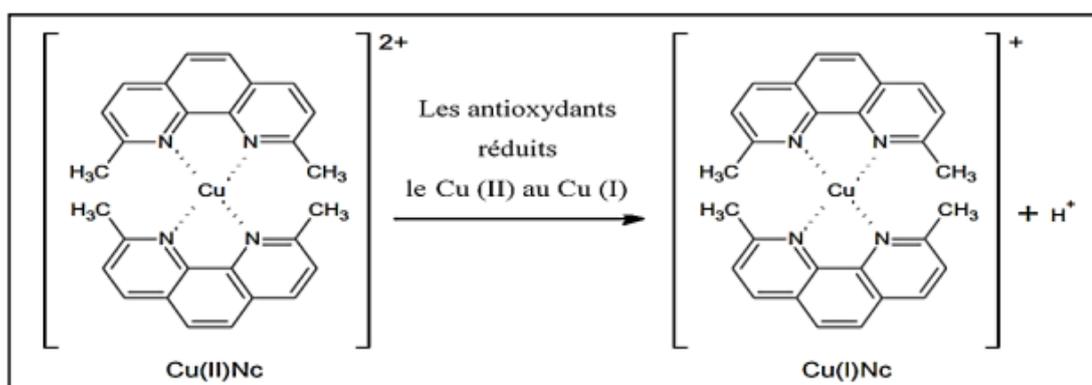


Figure II.10. Réduction du complexe néocuproïne/cuivre (II) [Özyürek *et al.* 2011].

b) Procédure

➤ Préparation de l'échantillon

Le protocole de dilution des extraits est celui utilisé pour les activités précédentes.



➤ Protocole

Selon le protocole décrit par [Apak *et al.* 2004], un volume de 40 μL de chaque extrait et ses concentrations ainsi que 60 μL de tampon NH_4Ac (1 M, $\text{pH} = 7$) puis un volume de 50 μL de néocuproïne (7.5 mM) sont déposés dans chaque puits de la microplaque, 50 μL de la solution aqueuse Cu (II) (10 mM) ont été ajoutés par la suite. La couleur du milieu réactionnel change alors du blanc transparent au jaune orangé. Un blanc a été préparé en parallèle, en remplaçant les extraits par le MeOH. Trois répétitions sont réalisées pour chaque extrait. Après incubation durant 1h à température ambiante à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 450 nm par le lecteur Perkin-Elmer. Le contrôle positif est représenté par deux antioxydants de synthèse BHA et BHT.

c) Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en concentrations (mg/mL) en fonction des absorbances obtenues.

4.6.1.6 Test de la capacité antioxydante par réduction de fer (Pouvoir réducteur)

a) Principe du test

Le test de pouvoir réducteur est déterminé par la méthode décrite par [Oyaizu. M. 1986]. Le principe de cette méthode consiste à évaluer l'aptitude de l'échantillon à donner un électron pour convertir le Fe^{3+} en Fe^{2+} , cette forme est quantifiée par la mesure de la couleur bleu du complexe (bleu de Pruss $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$) qui absorbe à 700 nm. Une absorbance élevée indique que l'échantillon possède un grand pouvoir réducteur.

b) Procédure

➤ Préparation de l'échantillon

Le protocole de dilution des extraits et celui utilisé pour l'activité précédente.

➤ Protocole

Brièvement, 40 μL du phosphate buffer ($\text{pH}=6,6$) et 50 μL de 1% de potassium ferricyanide sont ajoutés à 10 μL des différentes concentrations des extraits. Après 20 min d'incubation à 50°C , 50 μL du tri-chloro acétique acide (TCA) (10%) ; 40 μL d' H_2O et 10 μL de ferrique chlorure sont ajoutés au milieu réactionnel. Le blanc est préparé en parallèle suivant le même protocole en remplaçant l'échantillon par le méthanol. Puis l'absorbance est déterminée à 700 nm.



c) Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en concentrations (mg/mL) en fonction des absorbances obtenues.

4.6.1.7 Test de l'activité phénanthroline

a) Principe du test

Cette méthode a été appliquée pour le dosage des capacités antioxydants de différents antioxydants et leurs mélanges. [Liu et al. 2003]. L'activité de phénanthroline est déterminée par la méthode de Szydłowska-Czerniaka (2008).

b) Procédure

➤ Préparation de l'échantillon

Le protocole de dilution des extraits et celui utilisé pour les activités précédentes.

➤ Protocole

Le test a été effectué dans des microplaques à 96 puits ; 10 μ L de différente concentration des extraits ont été mélangé avec 50 μ L FeCl_3 [0,2%] et 30 μ L phénanthroline [0,5%] plus 110 μ L méthanol. Le blanc est préparé en parallèle suivant le même protocole en remplaçant l'échantillon par le méthanol. Le mélange est laissé à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 20 min ; l'absorbance été mesuré à 510 nm.

c) Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en concentrations (mg/mL) en fonction des absorbances obtenues.

4.6.2 Evaluation de l'activité anti Alzheimer

Cette activité est testée par deux enzymes qui sont l'acétylcholinestérase et le butyrylcholinestérase.

a) Principe du test

Les activités acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BChE) ont été mesurées, avec une modification légère de la méthode spectrophotométrique décrite par [Ellman et al. 1961]. AChE et BChE ont été utilisés, tandis que l'iodure d'acétylthiocholine et le chlorure de butyrylthiocholine ont été employés comme substrats. Le DTNB [5,5-dithio-bis (2-



nitrobenzoïque]) a été utilisé pour la mesure de l'activité du cholinestérase. Le méthanol a été utilisé comme solvant pour dissoudre les composés d'essai 0 et les contrôles.

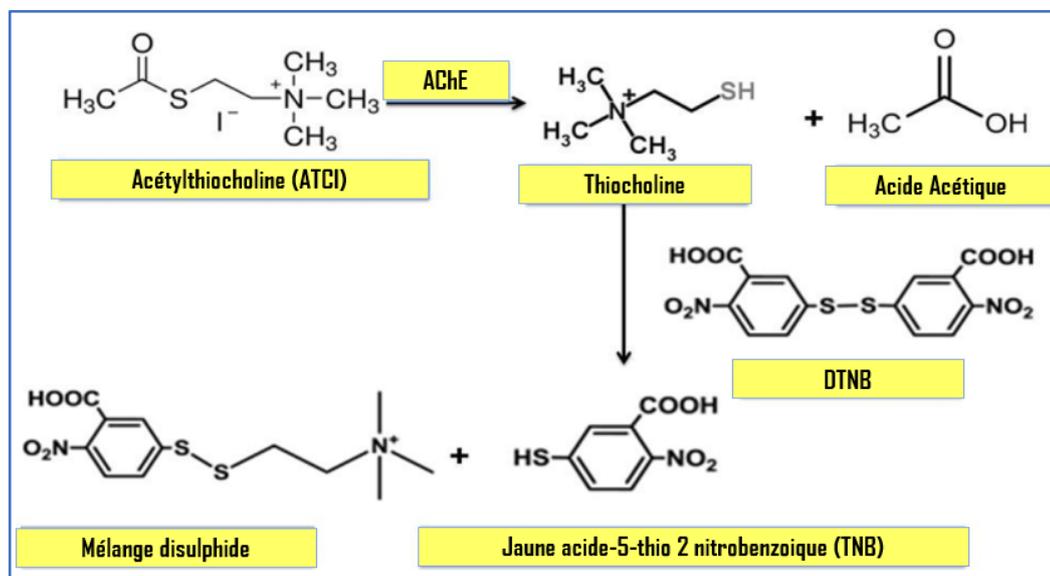


Figure II.11. Mécanisme chimique de la méthode d'Ellman's [Ali-Shtayeh et al. 2014].

b) Procédure

➤ Préparation de l'échantillon

Le protocole de dilution des extraits et celui utilisé pour l'activité précédente.

➤ Protocole

Selon le protocole décrit par [Ellman et al. 1961], des aliquotes de 150 μL de tampon phosphate de sodium (pH=8), 10 μL de solution mère d'extrait avec les différentes concentrations convenables et 20 μL de la solution enzymatique AChE ou BChE ont été induits dans chaque puits. Après une période d'incubation de 15 min à température ambiante 25°C, 10 μL de DTNB ont été ajoutés. La réaction est ensuite initiée par l'addition de 10 μL de substrat AChI (l'iodure d'acétylthiocholine) ou substrat de BChE (le chlorure de Butyrylthiocholine). Après incubation durant 15 min à l'étuve à 37°C, la lecture se fait à t=0 et t=15 min à 412 nm. Un témoin négatif est préparé, la Galantamine dissoute dans le MeOH est utilisée comme référence.

c) Expression des résultats

Le pourcentage d'inhibition de l'AChE ou BChE enzymes est déterminé par rapport au blanc (MeOH avec le phosphate buffer pH 8) par la formule :



$$(E - S) / E * 100$$

Où

E : l'activité de l'enzyme sans extrait.

S : l'activité de l'enzyme avec l'extrait.

4.6.3 Evaluation de l'activité antidiabétique

4.6.3.1 Activité inhibitrice de l' α -amylase

a) Principe

L'activité inhibitrice de l' α -amylase a été réalisée à l'aide de la méthode iode/iodure de potassium (IKI) de [Zengin. G et al. 2014] avec quelques modifications.

b) Procédure

➤ Préparation des échantillons

Le protocole de dilution des extraits est celui utilisé pour les activités précédentes.

➤ Protocole

L'activité inhibitrice de l' α -amylase a été réalisée à l'aide de la méthode de [Zengin. G et al 2014] à l'iode-iodure de potassium, avec quelques modifications. En bref, un extrait de plante (25 μ L) a été mélangé avec une solution d' α -amylase (50 μ L) dans du tampon phosphate (pH 6,9) avec du chlorure de sodium 6 mM dans une microplaque à 96 puits et incubé pendant 10 min à 37 ° C. La réaction a été initiée par addition de solution à 0,1% d'amidon (50 μ L). Le mélange réactionnel a été incubé pendant 10 min à 37 ° C. La réaction a ensuite été arrêtée par addition de HCl 1 M (25 μ L), suivie de l'ajout de la solution d'iode et d'iodure de potassium (100 μ L). Parallèlement un contrôle négatif est préparé en remplaçant l'extrait par le MeOH. L'absorbance a été mesurée à 630 nm. L'acarbose est utilisé comme contrôle positif.

c) Expression des résultats

Le pourcentage d'inhibition de l' α -amylase a été calculé comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition} = 1 - [(A_c - A_e) - (A_s - A_b)] / (A_c - A_e)$$



Où

A_c : absorbance [Amidon+ IKI+ HCl+ Vol du solvant d'extrait+ Vol tampon Enzyme]

A_e : Absorbance [Enzyme+ Amidon+ IKI+ HCl+ Vol du solvant d'extrait]

A_s : Absorbance [Enzyme+ extrait+ Amidon+ IKI+ HCl]

A_b : Absorbance [Extrait+ IKI+ 125 μ l de tampon]

Pour une caractérisation meilleure de l'efficacité des extraits, la concentration effectrice (IC_{50}) définie comme la concentration de l'échantillon qui produit 50% d'effet inhibiteur de l' α -amylase.

4.6.3.2 Activité inhibitrice de l' α -glycosidase

a) Principe du test

L'activité inhibitrice de l' α -glucosidase a été réalisée par la méthode (**Behvar Asghari et al. 2018**) avec quelques modifications.

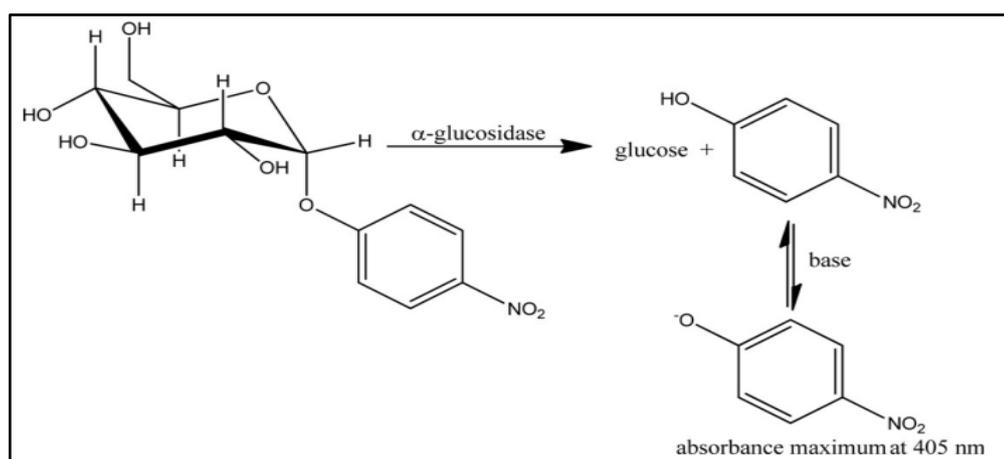


Figure II.12. Principe d'action de l' α -glycosidase.

b) Procédure

➤ Préparation de l'échantillon

Le protocole de dilution des extraits et celui utilisé pour l'activité précédente.

➤ Protocole

Le test a été effectué dans des microplaques à 96 puits ; 100 μ L de la solution d'enzyme et 50 μ L de la solution de substrat sont ajoutés à 50 μ L des différentes concentrations des extraits. Le blanc est préparé en parallèle suivant le même protocole en remplaçant l'échantillon par le méthanol. Dès qu'on termine ces étapes on passe directement au spectrophotomètre pour



effectue la première lecture (0 min) à 405 nm. Après 30 min d'incubation à 37 °C ; Nous faisons une autre lecture.

c) Expression des résultats

Le pourcentage de l'activité antidiabétique est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \left[\frac{Ac - Ae}{Ac} \right] \times 100$$

Où

Ac : absorbance du contrôle négatif

Ae : absorbance d'extrait

4.6.4 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

4.6.4.1 Etude *In vitro* de l'effet anti-thérmodénaturant des extraits

a) Principe du test

L'activité anti-inflammatoire est déterminée par la méthode de [Kandikattu. 2013] avec de légères modifications. Le test consiste à inhiber la dénaturation du BSA (bovine sérum albumine), provoqué par la chaleur, par nos extraits.

b) Procédure

➤ Préparation de l'échantillon

Une quantité de 16 mg de chaque extrait, ont été dissoutes dans 4 mL de l'eau distillé (Solution mère (SM) de 4000 ppm) sauf pour l'extrait méthanolique et de l'éther de pétrole, on a diminué la concentration grâce au fort effet (2 mg/ 4 mL), c'est à partir de cette dernière qu'une série de dilution de 1/2 a été préparé, les dilutions sont préparées en triplicata pour les cinq extraits. Le tableau II.2 présente la série de dilution préparée pour l'extrait méthanolique sachant que tous les extraits ont été préparé de la même manière.



Tableau II.2. Série de dilutions et concentration respectives de l'extrait butanolique.

Extrait butanolique						
Dilution	1/1 (Solution mère)	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
Concentration de la solution (mg/mL)	4 mg/mL (4000 ppm)	2	1	0,5	0,25	0,125
Concentration dans le milieu réactionnel en mg/mL	2	1	0,5	0,250	0,125	0,0655

➤ Protocole

Une solution de 0,2% (p/v) de BSA a été préparée dans une solution saline tampon Tris et le pH a été ajusté à 6,6 en utilisant l'HCl.

À partir de solutions mères, on a préparé cinq concentrations différentes utilisant de l'eau comme solvant. 0,5 mL de chaque extrait ont été transférés dans des tubes. 0,5 mL de BSA à 0,2 % ont été ajoutés à la totalité des tubes. Parallèlement, pour chaque concentration d'extrait un blanc est préparé dans lequel 0,5 mL d'extrait est ajouté à 0,5 de Tris-HCl ainsi, un contrôle positif est préparé contient 0,5 mL de BSA et 0,5 mL du tampon. Ensuite une double incubation, la première à 37 C° pendant 15 min suivie par une deuxième dans le bain marie à 72 C° pendant 5 min. Après refroidissement la turbidité est mesurée à 660 nm dans un spectrophotomètre à cuve. Chaque expérience a été réalisée en triplicata. Les résultats sont comparés par rapport à un standard qui est le Voltarène.

c) Expression des résultats

Le taux d'inhibition de la dénaturation thermique de BSA à 72°C est exprimé par l'expression suivante :

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = (A_c - (A_e - A_b)) / A_c \times 100$$

Où

A_c : l'absorbance du contrôle positif

A_e : absorbance de l'extrait



Ab : absorbance du blanc

5 Analyse statistique

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyennes \pm déviation standard (SD). Les valeurs de IC_{50} a été calculées par le logiciel « GraphPad prisme 6 ». Plus elle est petite, plus l'activité (antioxydante, anti Alzheimer, anti-diabétique et antiinflammatoire) des extraits est grande.

Chapitre III

Résultats et discussion



1 Expression du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction correspond au pourcentage des principes actifs dissouts dans un solvant organique et/ou aqueux utilisé pour l'extraction [Abe et al. 2010].

Le processus de macération nous a permis d'extraire à partir de 100 g (M) des parties aériennes de la plante *Capparis spinosa L* une masse de 24,82 g, qui donne un rendement à l'ordre de 24,82 %. En outre les rendements d'extraction liquide-liquide sont cité dans le tableau suivant :

Tableau III.1. Poids des extraits avec le rendement d'extraction.

Extraits	Masse d'extrait (mg)	Rendement %
EP	450	0,45
CHCl ₃	360	0,36
ActOH	420	0,42
BuOH	310	0,31

La valeur du rendement dépend de plusieurs facteurs tels que : structure et PH du sol, salinité du lieu de récolte, température, air, altitude...etc. Comme elle peut être liée aux conditions expérimentales [Penchev et al. 2010].

2 Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

2.1 Teneurs en polyphénols

Le choix de quantifier les polyphénols parmi les différentes substances phytochimiques, résulte du fait que les polyphénols ont des activités biologiques très importantes. De même pour les flavonoïdes qui sont considérés comme la classe la plus importante des polyphénols.

L'apparition de la couleur bleue foncée indique la présence des polyphénols avec une forte quantité dans les deux extraits ActOH et BuOH de notre plante [Figure III.1].

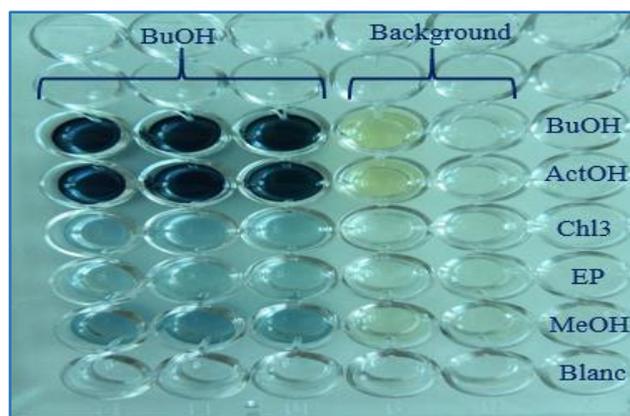


Figure III.1. Illustration du dosage des polyphénols totaux.

La teneur en polyphénols totaux (TPC) de nos cinq extraits de la partie aérienne de *Capparis spinosa L* a été estimée à partir de la courbe d'étalonnage linéaire de l'acide gallique de l'équation $y = 3,8484x$ avec un coefficient $R^2 = 0,984$. La gamme de l'acide gallique est tracée pour des concentrations comprises entre 0 et 0,25 mg/mL [Annexe1]. La spectrophotométrie UV/Visible a permis de quantifier le taux des polyphénols présents dans nos extraits.

La teneur en composés phénoliques totaux est exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg GAE/g dw) [tableau III.2].

Les résultats obtenus montrent que la partie aérienne du *Capparis spinosa L* est très riche en polyphénols avec une teneur en phénols totaux pour toutes les fractions qui varie entre $46,49 \pm 3,77$ et $443,64 \pm 3,64$ (mg GAE/g dw). Cependant, les deux extraits BuOH et ActOH sont les plus concentrés en polyphénols que l'extrait MeOH, celle-ci est plus concentré à celles des deux extraits EP et $CHCl_3$, ces deux derniers ont une concentration proche. Donc le classement de TPC dans ces extraits est comme suit : BuOH > ActOH > MeOH > $CHCl_3$ > EP.

Nos résultats sont supérieurs à ceux trouvés par [Fadili et al. 2017], ayant travaillé sur des extraits méthanolique brut ; chloroformique ; d'acétate d'éthyle ; butanolique ; aqueux des feuilles et des fleurs de *Capparis spinosa L* avec la méthode de Folin Ciocalteu. Ils ont relevé des valeurs de (3,8 ; 0,3 ; 19,76 ; 6,19 ; 4,91 (mg EAG/g)) et (2,89 ; 0 ; 3,33 ; 1,69 ; 1,24 (mg EAG/g)) respectivement. De même, [Meddour et al. 2011] ont obtenus des teneurs en polyphénols des extraits éther de pétrole (Ep), dichlorométhane (DCM), MeOH et aqueux d'un mélange de bourgeons à fleur, fleurs et fruits immatures de l'espèce *Capparis spinosa L* ($5,30 \pm 0,78$; $7,76 \pm 0,41$; $29,01 \pm 0,84$; $25,68 \pm 0,67$ mg EAG/g) respectivement, ces valeurs sont inférieures à ceux trouvés lors de nos études.



Ces différences peuvent être attribuées à plusieurs facteurs dont la méthode d'extraction et d'analyse, l'origine géographique, le degré de maturité et les conditions de stockage. La concentration en composés phénoliques est aussi influencée par la saison, selon [Bachir Bey. M et al. 2014] la lumière stimule la biosynthèse des polyphénols chez les plantes par l'amplification de certaines activités enzymatiques, dont l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) qui convertit la phénylalanine en acide coumarique, qui est le précurseur des molécules impliquées dans la synthèse des composés phénoliques.

2.2 Teneurs en flavonoïdes totaux

Les premiers résultats obtenus sont représentés par la réaction colorimétrique [Figure III.2].

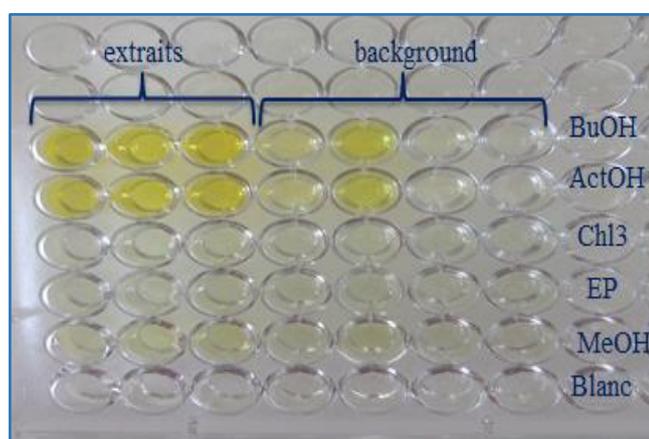


Figure III.2. Illustration de dosage des flavonoïdes totaux.

La couleur jaune produite indique la présence des flavonoïdes dans les mélanges réactionnels. L'analyse de la [figure III.2] montre que la couleur et l'absorbance sont plus fortes dans les extraits BuOH et ActOH que les extraits MeOH, CHCl₃ et EP. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes présentée dans nos extraits.

La quantité de flavonoïdes totaux des extraits testés à une concentration fixe (1 mg/mL) est alors estimée à l'aide de la droite d'étalonnage de la quercétine à partir des valeurs d'absorbances mesurées [Annexe 2]. A partir de la courbe d'étalonnage, la concentration des flavonoïdes totaux des cinq extraits de *Capparis spinosa L* a été estimée par l'équation de la courbe : $y = 4,5548x$ avec un coefficient $R^2 = 0,9972$.

La teneur en flavonoïdes totaux contenues dans les échantillons de *Capparis spinosa L* (fraction butanolique ; fraction acétate ; fraction chloroformique ; fraction éther de pétrole et fraction méthanolique), a été énumérée dans [Tableau III.2], et est exprimée en mg équivalent en quercétine par g de l'extrait sec (mg EQ/g d'extrait).



Les résultats obtenus montrent que la partie aérienne du *Capparis spinosa L* est très riche avec une teneur en flavonoïdes pour toutes les fractions qui varie entre 14,21±6,62 mg EQ/g et 432,45±67,97 mg EQ/g. D'après les résultats nous observons que le taux de flavonoïdes le plus élevé est détecté dans les extraits butanolique 432,45±67,97 mg EQ/g et acétate d'éthyle 358,90±32,73 mg EQ/g ; il est presque six fois supérieur à celui relevé dans les extraits méthanolique 47,25±2,80 mg EQ/g ; chloroformique 15,49±0,16 mg EQ/g et éther de pétrole 14,21±6,62 mg EQ/g.

Ces résultats restent largement supérieurs à ceux trouvés par [Fadili et al 2017] (7,85 ; 0 ; 0,05 ; 1,96 ; 0) pour les extraits méthanolique brut ; chloroformique ; d'acétate d'éthyle ; butanolique ; aqueux, respectivement. En outre, [Medour et al. [2011] ont rapportés une TFC des extraits Ep ; DCM ; MeOH ; H₂O des fruits du *C. spinosa L* sont de 0,08 ± 0,03 ; 0,15 ± 0,05 ; 5,97 ± 0,42 ; 11,82 ± 0,38 mg RUE/g d'extrait, respectivement, ces valeurs sont extrêmement inférieures à ceux de nos cinq extraits (MeOH ; EP ; CHCl₃ ; ActOH et BuOH).

Ces différences peuvent être attribuées à plusieurs facteurs dont la méthode d'extraction et d'analyse, la nature et le standard utilisé, l'origine géographique, le degré de maturité et les conditions de stockage.

Tableau III.2. Teneur des différents Extraits de *Capparis spinosa* en Polyphénols Totaux et en flavonoïdes.

Extrait	Teneur en polyphénols totaux (mg GAE/g dw)	Teneur en flavonoïdes totaux (mg RUE/g dw)
BuOH	443,64 ± 3,64	432,45 ± 67,97
ActOH	413,68 ± 17,02	358,90 ± 32,73
CHCl ₃	63,29 ± 3,08	15,49 ± 0,16
EP	46,49 ± 3,77	14,21 ± 6,62
MeOH	112,47 ± 8,73	47,25 ± 2,80

3 Analyses HPLC des composés phénoliques

Au fur et à mesure de la détermination du TPC et du TFC, l'identification et la quantification du profil phénolique des cinq extraits de *C. spinosa L* ont été effectuées par HPLC utilisant un détecteur à barrette de diodes (DAD). Les chromatogrammes représentatifs sont présentés à la [Figure III.3]. Les classes des composés phénoliques ont été facilement identifiées par



comparaison avec les temps de rétention (T_R) et les spectres UV d'échantillons standards authentiques d'acides gallique ($T_R = 4,2$ min) et caféique ($T_R = 13,4$ min), et de rutine ($T_R = 28,2$ min). Longueurs d'onde d'absorption maximales de 280, 325 et 350 nm, respectivement [Annexe 3].

L'analyse des flavonoïdes, qui ont été présents en quantités très significatives dans les extraits ActOH et BuOH [chromatogrammes D et E ; figure III.3], étaient encore retrouvés avec des bons rendements dans les extraits de MeOH et de $CHCl_3$, alors qu'ils n'étaient pas présents dans l'extrait EP. En ce qui concerne l'analyse des dérivés hydroxycinnamiques, ils étaient présents avec un bon rendement dans l'extrait ActOH et avec des faibles quantités dans les extraits MeOH, EP et $CHCl_3$, alors qu'ils n'étaient pas présents dans l'extrait BuOH [chromatogramme E ; figure III.3]. Les dérivés hydroxybenzoïques sont apparus comme des constituants mineurs, avec des faibles quantités ou même se forme des traces dans les extraits MeOH, EP, $CHCl_3$, ActOH et BuOH.

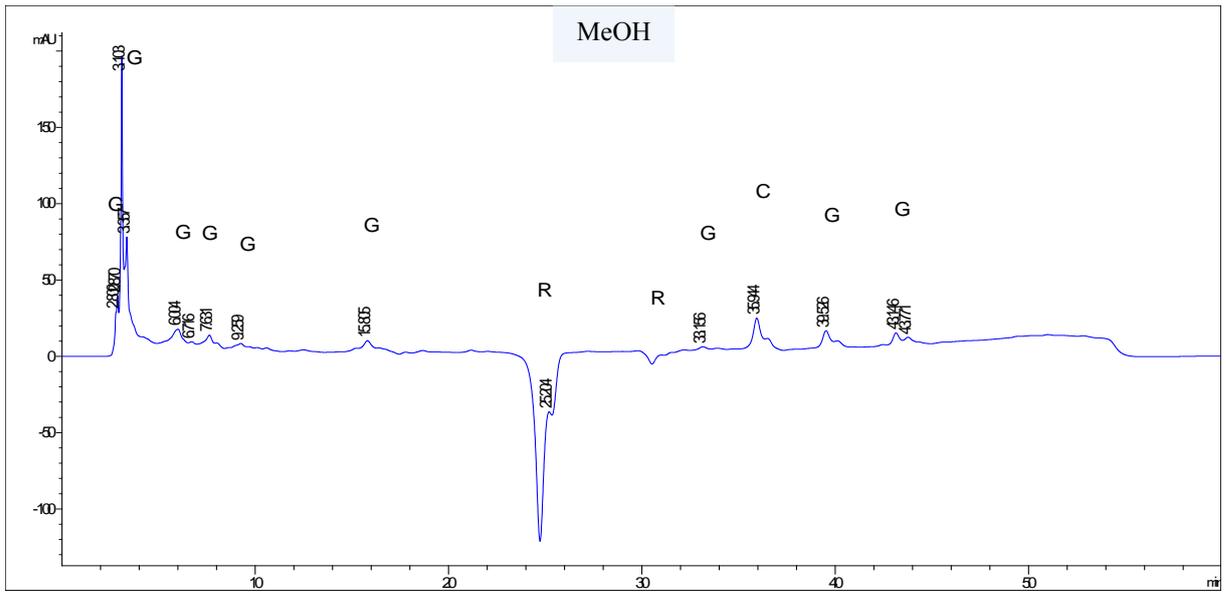
L'extrait de ActOH et de BuOH a montré des profils HPLC-DAD proches, ne différant que par les dérivés hydroxycinnamiques. Ils sont les plus riches en composés phénolique et surtout les flavonoïdes.

Tableau III.3. Concentrations de composés phénoliques dans les extraits de *Capparis spinosa L* détectées par HPLC.

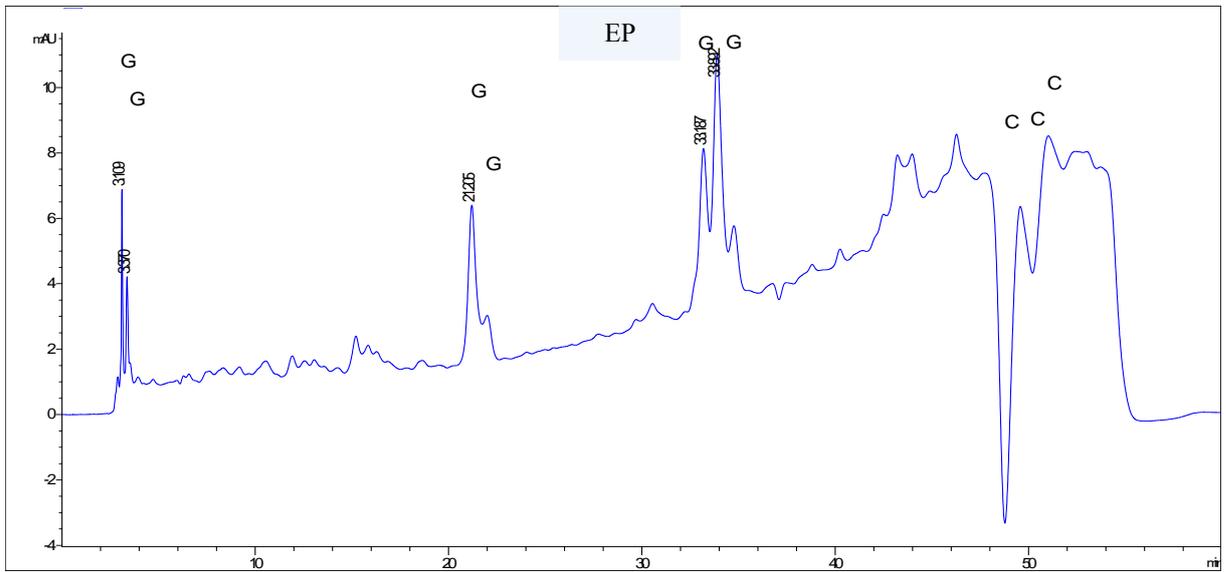
Extraits	Principaux composés phénoliques		
	Dérivés hydroxy-benzoïques (mg GAE/g)	Dérivés hydroxy-cinnamiques (mg CAE/g)	Flavonoïdes (mg RUE/g)
MeOH	5,565±0,095	0,545±0,015	103,045±0,105
EP	0,4585±0,0085	2,04±0,06	ND
$CHCl_3$	3,745±0,065	4,445±0,125	24,28±0,11
ActOH	9,02±0,16	28,565±0,805	666,965±3,025
BuOH	5,415±0,095	ND	491,065±2,225

- GAE : équivalents d'acide gallique ; RUE : équivalents de rutine ; CAE : équivalents d'acide caféique.

- ND : non-détecté



Chromatogramme A



Chromatogramme B



Figure III.3. Chromatogrammes A, B, C, D et E représentant les composés phénoliques de cinq échantillons de *Capparis spinosa L* analysés par HPLC et détectés à 280nm. G : acide gallique, C : acide caféique, R : rutine

4 Résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante

4.1 Test de piégeage du radical 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH)

L'activité anti radicalaire DPPH des extraits MeOH, EP, CHCl₃, ActOH et BuOH a été évaluée par leur activité inhibitrice sur une solution méthanolique de DPPH, mesurée à 517 nm. Les résultats obtenus ont permis de tracer la courbe de pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des extraits et des standards (α -Tocophérol, BHA et BHT) [Figure III.4].

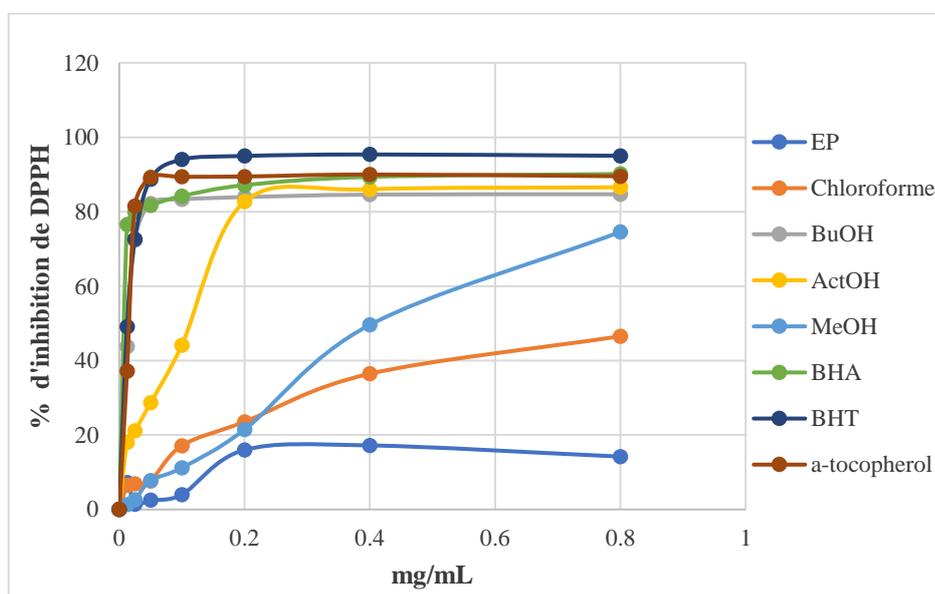


Figure III.4. Courbe de pourcentage d'inhibition du DPPH par différents extraits de plante.

Les résultats révèlent que nos extraits (MeOH, ActOH et BuOH) possèdent une activité antiradicalaire dose dépendante c'est-à-dire le piégeage des radicaux libres DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits et par conséquent l'augmentation de l'activité antiradicalaire. Alors que les deux extraits EP et CHCl₃ exhibent une faible activité antiradicalaire n'a pas atteint à 50 % d'inhibition.

➤ Détermination de l'IC₅₀

La valeur de l'IC₅₀ exprimée en mg/mL a été déterminée graphiquement en utilisant le logiciel « GraphPad prisme 6 » à partir des courbes de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration pour chaque échantillon testé. Plus la valeur de IC₅₀ est faible plus l'activité antioxydante de l'échantillon est forte.

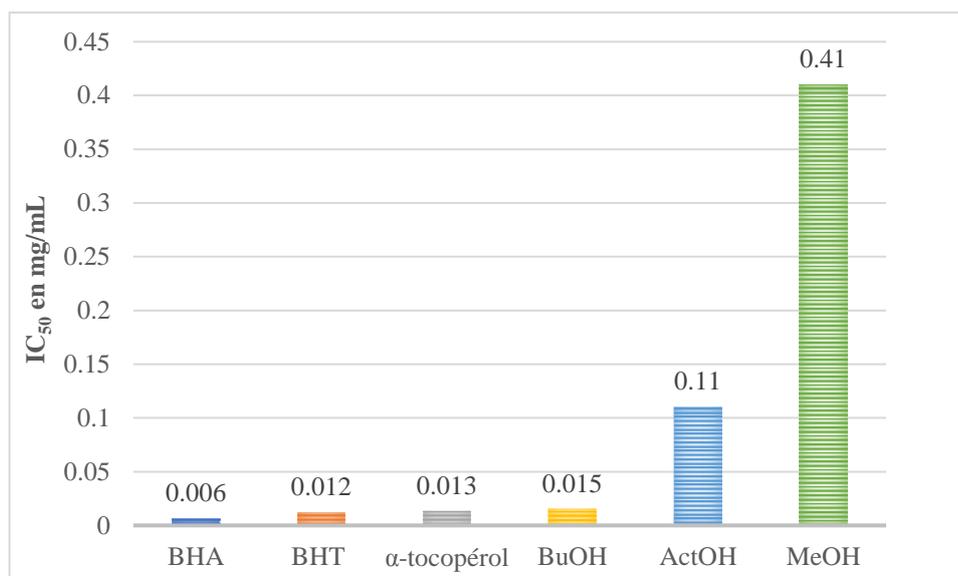


Figure III.5. Valeurs des IC₅₀ des échantillons étudiés classer en ordre croissant.

Les résultats d'IC₅₀, inversement proportionnelles à l'activité anti radicalaire, sont compatibles avec le niveau de décoloration de la solution DPPH [Figure III.6].

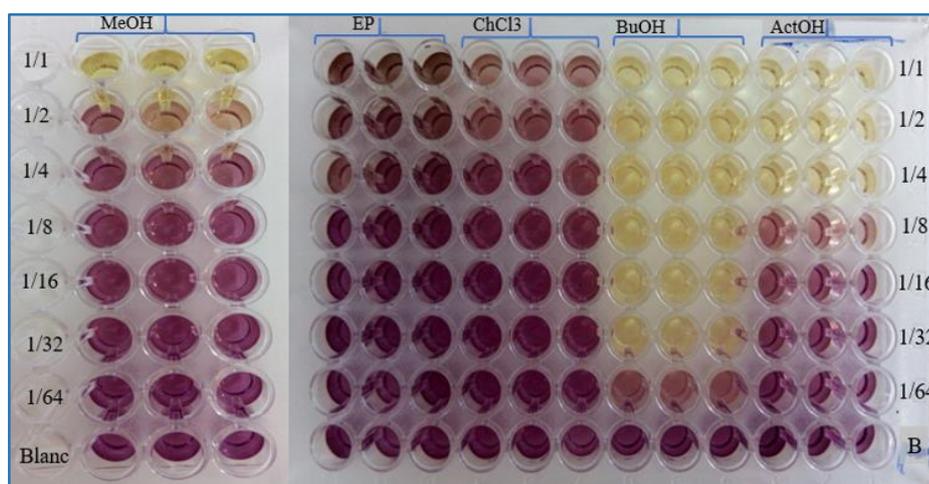


Figure III.6. Schéma de la plaque de dosage de l'activité antiradicalaire (DPPH).

➤ Discussion des résultats

A partir des valeurs d'IC₅₀, on constate que trois échantillons testés possèdent un potentiel antioxydant intéressant vis-à-vis du DPPH•. Parmi les extraits testés, l'extrait BuOH représente l'extrait le plus actif avec une IC₅₀ de l'ordre de 0,015±0,001 mg/mL, suivi par l'ActOH avec une IC₅₀ de 0,11 ± 0,013 mg/mL. Cependant l'extrait MeOH présente un IC₅₀ peu élevée de l'ordre de 0,41±0,11 mg/mL. En comparaison avec les standards, tous les extraits testés s'avèrent moins actifs, mais l'extrait ActOH est très proche de l'α-tocopérol (0,013±0,005



mg/mL) et même de BHT qui présentent une IC_{50} égales à $0,012 \pm 0,0004$ mg/mL, respectivement.

L'activité antioxydante de notre extrait ActOH est assez mieux à celle obtenue par [Fadili et al. 2013] pour leurs études de la plante *Capparis spinosa L (fruits et feuilles)* dont l' IC_{50} égale à $6,18 \pm 0,70$ mg/mL et $11,57 \pm 0,50$ mg/mL, respectivement. Également l'extrait MeOH avait présenté une activité anti radicalaire de l'ordre de $0,41 \pm 0,11$ mg/mL, encore plus important à celle de [Meddour et al. 2011].

L'activité antioxydante des extraits pourrait s'expliquer par leur richesse en substances poly phénoliques et plus particulièrement les composés flavoniques surtout pour les extraits ActOH et BuOH qui sont les plus riches en ces composés [figure III.3 et Tableau III.4]. Ces résultats sont en accord avec les résultats de plusieurs publications, qui ont rapporté une corrélation positive entre tout le contenu phénolique et l'activité antioxydant [Kadri et al. 2011. Ghedadba et al. 2014].

En se basant sur ces résultats, on peut conclure que la variation de la capacité antioxydante de ces extraits comparativement à celle des témoins (α tocophérol, BHA et BHT) pourrait être principalement due à la présence des composés phénoliques, et de leurs taux dans ces extraits notamment dans l'extrait butanolique et ActOH.

4.2 Test par piégeage du radical ABTS^{•+}

L'activité scavenger des extraits est également étudiée en utilisant l'ABTS. Ce dernier réagit avec le persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$) pour donner le radical ABTS^{•+}. La génération du radical avant l'ajout des extraits est nécessaire afin d'éviter l'interférence des composés dans la formation du radical ce qui conduit à une surestimation de la capacité antioxydante [Katalinic et al. 2006]. L'ajout de l'extrait entraîne une décoloration de la solution indiquant l'existence d'une activité scavenger des échantillons.

Après avoir mesuré l'absorbance à 734 nm, les résultats enregistrés ont permis de calculer le pourcentage d'inhibition des différents extraits selon la même formule précédemment utilisée pour l'activité DPPH et de tracer les courbes des extraits ainsi des standards (BHA et BHT) en fonction des concentrations des d'extraits et des standards [Figure III.7].

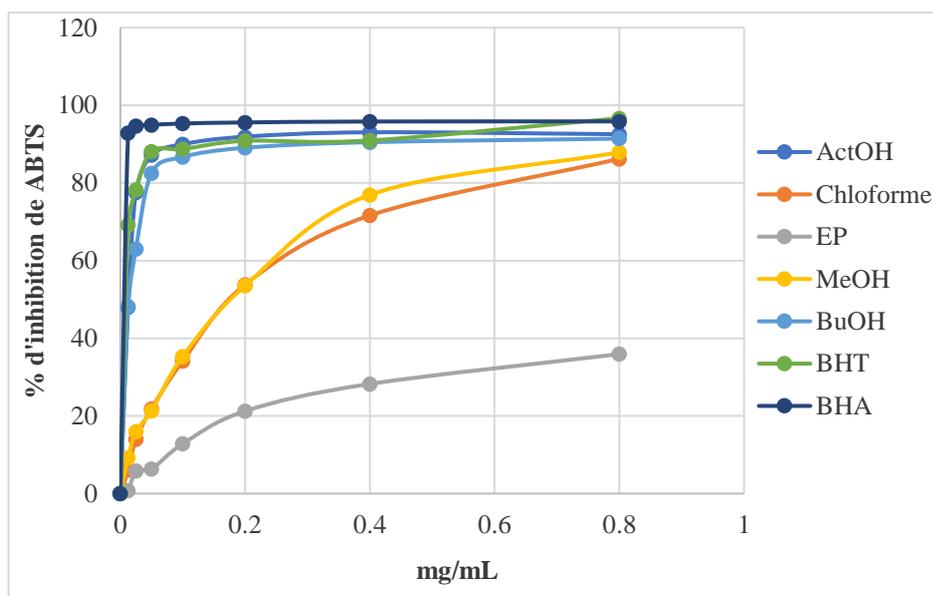


Figure III.7. Courbes de pourcentage d'inhibition en fonction de concentration du radicale l'ABTS.

D'après les courbes de la [figure III.7] et le changement de coloration au cours de la réaction [figure III.9], on remarque que tous les extraits de la partie aérienne de *Capparis spinosa L* (MeOH, CHCl₃, ActOH et BuOH) possèdent une activité antiradicalaire dose dépendante sauf l'extrait EP qui exhibe une faible inhibition a atteint seulement à 35% d'inhibition.

➤ Détermination de l'IC₅₀

Les résultats obtenus ont permis également de déterminer la valeur de l'IC₅₀ (la valeur qui correspond à 50 % d'inhibition) avec le logiciel « GraphPad prisme 6 » afin de pouvoir évaluer l'activité des extraits vis-à-vis des standards.

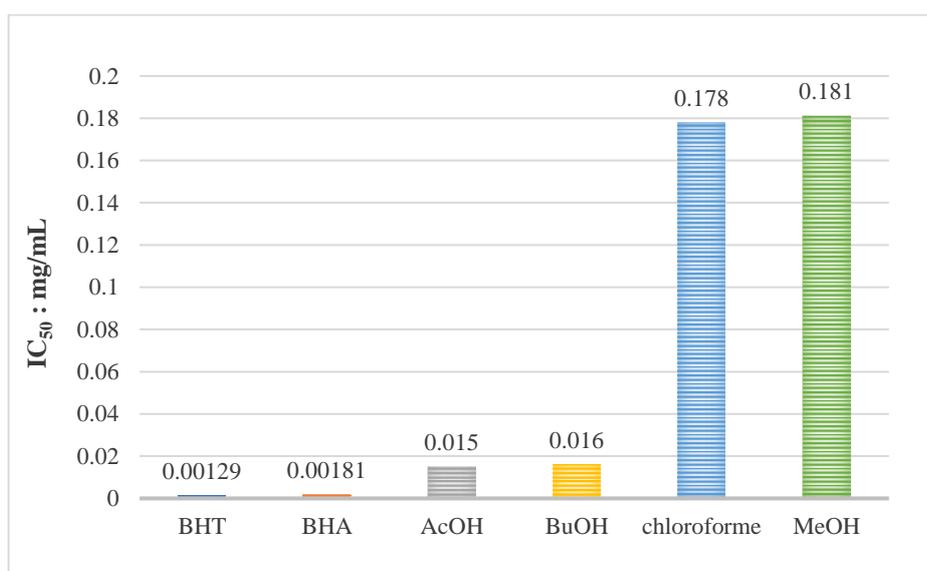


Figure III.8. Les IC₅₀ des échantillons testés classés par ordre croissant (ABTS).



Les résultats obtenus indiquent qu'il y a un changement de la couleur du milieu réactionnel du bleu au blanc transparent, ce qui montre qu'il présente une capacité antioxydante plus importante dans les extraits BuOH et ActOH et moyenne dans les extraits MeOH et CHCl₃.

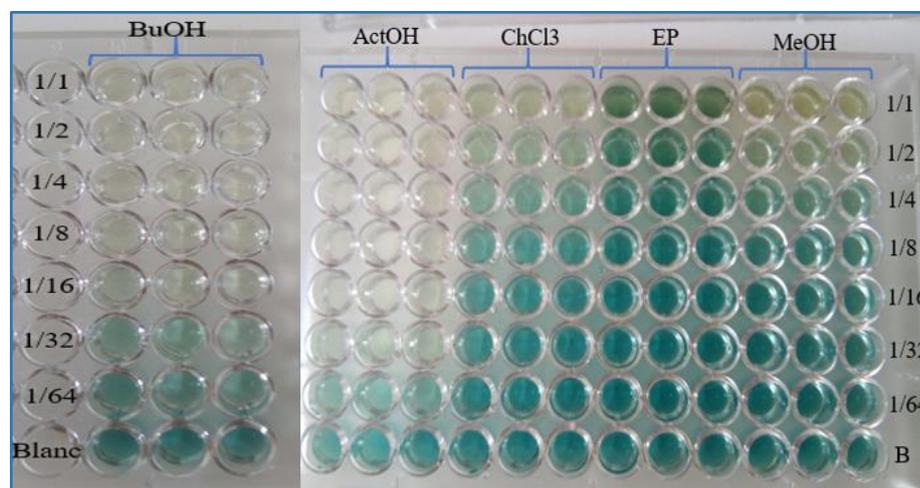


Figure III.9. Schéma de la plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (ABTS).

➤ Discussion des résultats

Le pourcentage d'inhibition de l'ABTS est proportionnel à la concentration des extraits et des standards. Le test a montré que les quatre extraits (MeOH, CHCl₃, ActOH et BuOH) testées possèdent un pouvoir antioxydant intéressant. Ce pouvoir est confirmé par des valeurs d'IC₅₀ faibles et des pourcentages d'inhibition importants. Alors, on constate que les deux extraits ActOH et BuOH sont les plus actifs avec une IC₅₀ proche de l'ordre de 0,015 ± 0,002 et 0,016 ± 0,003 mg/mL respectivement, inférieur à celle du BHA (0,00181 ± 0,10 mg/mL) et du BHT (0,00129 ± 0,30 mg/mL). Pour ce qui est des extraits CHCl₃ et MeOH, ils exhibent des IC₅₀ proches peu élevées de l'ordre de 0,178 ± 0,001 et 0,181 ± 0,02 mg/mL, qui sont loin à celles du BHA et BHT. Plus la valeur d'IC₅₀ est petite, plus l'extrait est considéré comme antioxydant puissant.

L'activité de piégeage des radicaux libres observée pourrait s'expliquer par la forte teneur en composés phénoliques surtout les deux extraits ActOH et BuOH qui sont plus riches en composés phénoliques précisément les flavonoïdes, ainsi les hydroxy cinnamiques pour l'ActOH comme nous avons précédemment montré avec l'analyse de l'HPLC [figure III.3 ; tableau III.4].

Cependant, ce potentiel antioxydant de nos extraits est fortement supérieur à ceux obtenus par [Allaith. 2014] qui ont trouvé un potentiel antiradicalaire (ABTS+•), avec un IC₅₀ aux environs de 0,55 ± 0,31 mg/mL pour l'extrait méthanolique des fruits de *Capparis spinosa* L.



A la fin, il faut signaler que la variabilité des résultats obtenus pour plusieurs espèces et dans des régions multiples est bien évidemment liée à la différence dans la composition chimique des espèces et à des facteurs saisonniers.

4.3 Test de chélation des Ions ferreux (métal chélate)

L'effet chélateur des extraits de *C. spinosa L* a été déterminé par la méthode la plus utilisée décrite par [Decker et al. 1990]. La férrozine, acide 3-(2-pyridyl)-5,6-bis (4-phényl)-sulfonique, forme un complexe avec le fer (II) de couleur violette intense permettant un dosage colorimétrique avec un maximum d'absorption à 562 nm. La formation de ce complexe est perturbée en présence d'agents chélateurs aboutissant à une diminution de la couleur violette, qui est suivie par spectrophotométrie.

Les résultats enregistrés ont permis de calculer le pourcentage d'inhibition des différents extraits selon la même formule précédemment utilisée pour les activités DPPH et ABTS [tableau III.4].

Tableau III.4. Pourcentage d'inhibition d'activité antioxydante par le test de chélation aux ions ferreux.

Extraits	% Inhibition in Ferrous ions Chelating assay							
	0,0125 mg	0,025 Mg	0,05 mg	0,1 mg	0,2 Mg	0,4 Mg	0,8 Mg	IC ₅₀ mg/mL
MeOH	-23,80 ±1,37	-13,42 ±2,51	-6,33 ±1,31	-3,12 ±0,86	-1,57 ±0,58	-1,93 ±0,59	-1,51 ±0,46	/
EP	0,92 ±2,62	1,43 ±2,50	-3,23± 3,14	-4,59 ±0,38	-12,53 ±0,24	-28,63 ±3,47	-72,22 ±2,92	/
CHCl ₃	4,00 ±1,55	-1,45 ±1,57	-3,26 ± 1,34	-8,17± 0,96	-19,91 ±2,74	-37,92 ±2,86	-55,94 ±5,52	/
ActOH	4,37 ±3,09	-1,60 ±9,08	-1,42± 2,54	-1,02 ±2,69	-5,29 ±1,70	-13,49 ±2,76	-34,99 ±15,21	/
BuOH	2,07 ±4,18	0,46 ±3,98	1,91 ±0,71	-1,14 ±2,41	4,00 ±3,78	4,09 ±1,09	10,48 ±4,07	/
EDTA	73,00 ±1,59	73,60 ±1,20	73,80 ±1,51	95,78 ±0,10	95,80 ±0,06	95,84 ±0,22	95,87 ±0,06	8.80 ±0.47

La figure III.10 c'est dessous présente la coloration obtenue dans le milieu réactionnel après incubation (pas de changement de la couleur), ce qui montre l'absence de l'activité anti-radicalaire chélatrice de fer pour tous les extraits de notre plante.

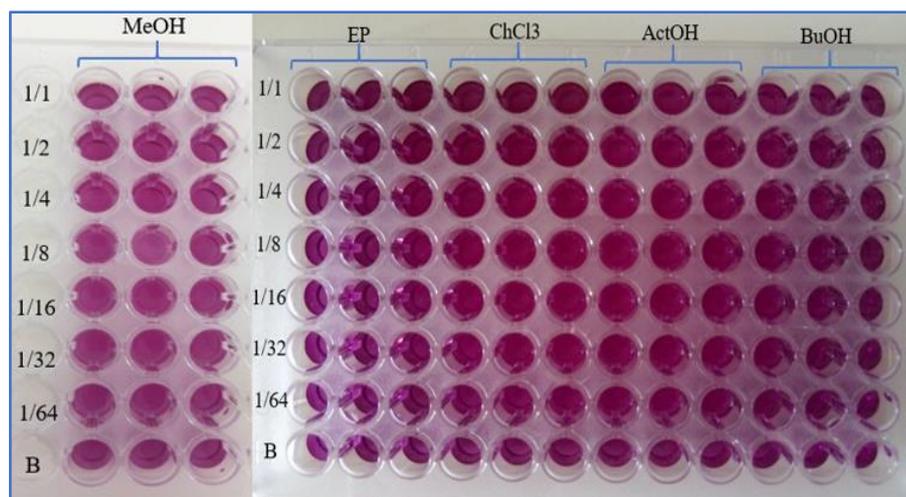


Figure III.10. Schéma de la plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (métal chélate).

➤ Discussion des résultats

L'étude de l'activité chélatrice des extraits de *C. spinosa L* a révélé une non activité chélatrice de nos extraits sauf l'extrait BuOH qui exhibent une très faible inhibition inconsiderable [tableau III.5]. Ceci s'explique par le fait que nos extraits ne contiennent pas de composés à effet chélateur c'est-à-dire ne possèdent aucune affinité pour le fer, en concurrence avec la Férozine [Benzidane N. 2014]. Dépend des études antérieures qui ont montré que les polyphénols (quercétine) peuvent piéger les métaux par affinité avec ceux-ci et éviter des réactions générant des radicaux libres. En outre, ces résultats étaient en contraste avec les composés phénoliques totaux dans les extraits étudiés.

Dans une étude faite par [Bounatirou et al. 2007], ils ont constaté que les huiles- essentielles de *Thymus capitalus* Hoff et Link, n'ont pas démontré une activité chélatrice, le même constat a été fait avec [Sarikurkcu et al. 2010] en étudiant les huiles essentielles de *Thymus longicaulis* C. Presi subsp. *Longicaulis* var. *longicaulis*.

Par contre, des études antérieures sur notre plante faites par [Benzidane. 2014] ont montré que les extraits méthanoliques de différentes parties de la plante *C. spinosa L* (feuilles, racines, câpres, fleurs et graines) ont une activité chélatrice des ions ferriques avec une IC_{50} Allant de 0.017 ± 0.001 jusqu'à 4.261 ± 0.111 mg/mL.

4.4 Test de balayage du radical Galvinoxyl (GOR)

Le galvinoxyle, un radical stable, permet de mesurer la capacité de génération d'hydrogène de composés phénoliques pouvant former des radicaux phénoxye stabilisés par résonance dans leur groupe hydroxyle actif [Shi et autres. 2001].



L'activité de piégeage du radical Galvinoxyl a été évaluée de la même manière que DPPH, où le BHA et le BHT ont été utilisés comme standards et l'absorbance a été mesurée à 428 nm en utilisant le spectre de microplaques de Perkin Elmer.

Après avoir mesuré l'absorbance à 428 nm, les résultats enregistrés ont permis de calculer le pourcentage d'inhibition des différents extraits selon la même formule précédemment utilisée pour les activités DPPH et ABTS et de tracer les courbes en fonction des concentrations des d'extraits et des standards [Figure III.11].

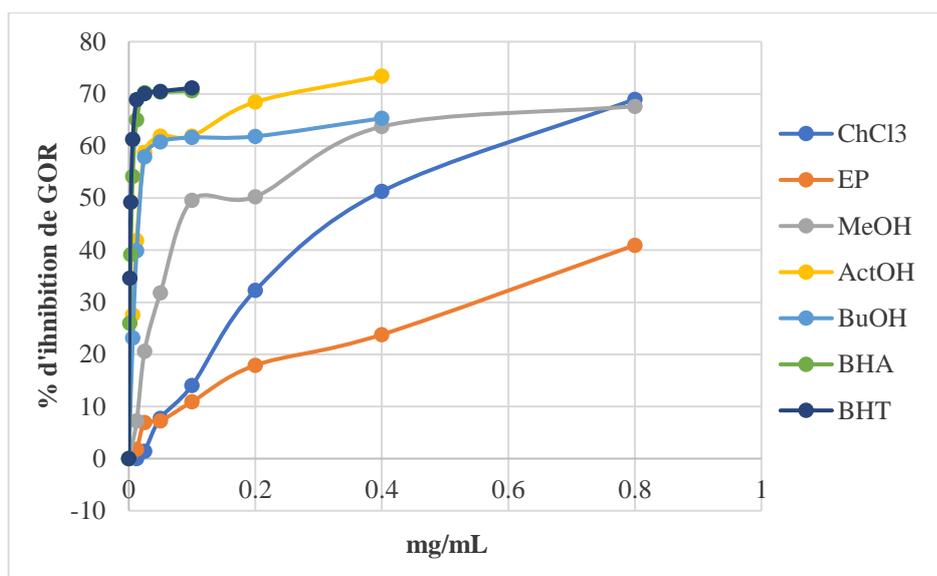


Figure III.11. Courbes de pourcentage d'inhibition en fonction de concentration du radical Galvinoxyl.

Les résultats des pourcentages d'inhibition montrent que les extraits (MeOH, CHCl₃, ActOH et BuOH) de la partie aérienne de *Capparis spinosa L* possèdent une activité antiradicalaire dose dépendante au contraire à l'extrait EP, qui exhibe une faible activité pour piéger le radical Galvinoxyl.

➤ Détermination de l'IC₅₀

Les résultats obtenus ont permis également de déterminer la valeur de l'IC₅₀ avec le logiciel « GraphPad prisme 6 » afin de pouvoir évaluer l'activité des extraits vis-à-vis des standards.

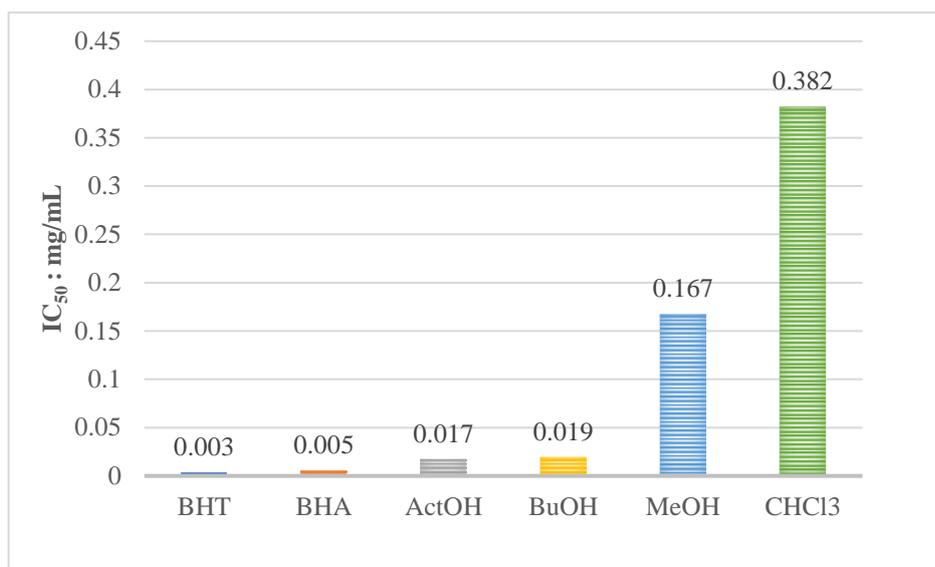


Figure III.12. Les IC₅₀ des échantillons testés classés par ordre croissant (GOR).

Les résultats obtenus indiquent que l'intensité de la couleur est proportionnelle avec la capacité de l'extrait de piéger le radicale Galvinoxyl, ce qui montre qu'il présente une capacité antioxydante plus importante dans les extraits BuOH et ActOH et moyenne dans les extraits MeOH et CHCl₃.

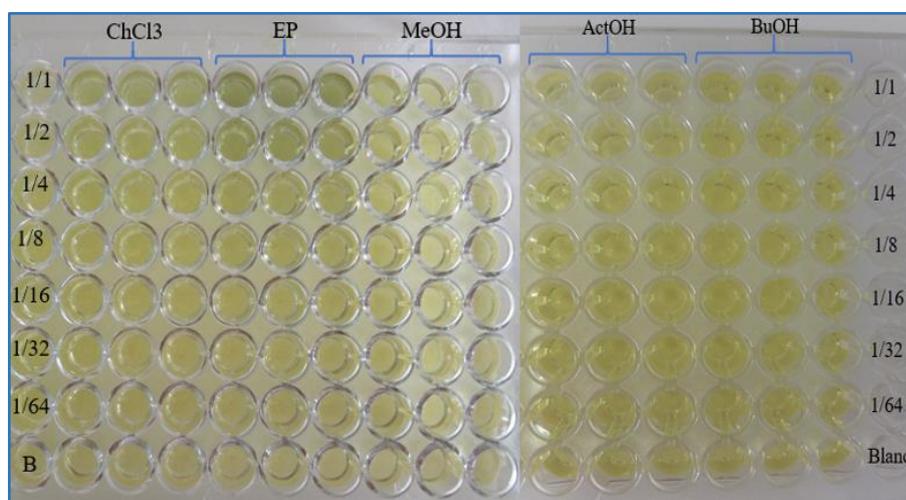


Figure III.13. Schéma de la plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (GOR).

➤ Discussion des résultats

L'activité antiradicalaire est confirmée par les faibles valeurs de IC₅₀ calculées et les pourcentages d'inhibition importantes des extraits.

Parmi les extraits testés, le BuOH et ActOH représentent les extraits les plus actifs avec des IC₅₀ de l'ordre de 0,017 ± 0,0025 et 0,019 ± 0,024 g/mL, respectivement ; suivi par le MeOH avec une IC₅₀ de 0,167 ± 0,058 mg/mL. Cependant l'extrait CHCl₃ a présenté une IC₅₀ peu



élevée de l'ordre $0,382 \pm 0,0151$ mg/mL. En comparaison avec le standard, tous les extraits testés s'avèrent moins actifs, par exemple l'activité antiradicalaire de l'extrait CHCl_3 est six fois moins importante de celle de BHT et trois fois de celle de BHA qui présentent des IC_{50} égale à $0,003 \pm 0,001$ et $0,005 \pm 0,006$ mg/mL respectivement.

On constate que la capacité antioxydante par le piégeage des radicaux libres tel que Galvinoxyl est en relation avec les teneurs des extraits en polyphénols, cependant nous avons déjà montré la richesse de nos extraits aux composés phénoliques par l'HPLC [tableau III.4], donc on constate que le piégeage de Galvinoxyl est dû à la présence des hydroxy benzoïques, hydroxycinnamique et flavonoïdes en quantité considérable dans les extraits et beaucoup plus dans ces deux, ActOH et BuOH.

4.5 Test de l'activité réductrice de l'ion cuprique (CUPRAC)

Le potentiel antioxydant de différents extraits a été estimé par la méthode CUPRAC dans cette étude. La réaction de cette méthode est basée sur la conversion par oxydation des groupes hydroxyles phénoliques en quinones à travers la réduction du réactif Cu^{2+} -Nc, produisant ainsi un complexe chromogène de Cu^+ -Nc de couleur jaune-orangée [Apak *et al.* 2013]. L'intensité de cette couleur est proportionnelle à la diminution des groupes (-OH) des polyphénols et parallèlement à l'augmentation des quinones et alors des complexes Cu^+ -Nc dans les milieux réactionnels. Le développement de la couleur peut être évalué par la mesure de l'absorbance à 450 nm.

L'activité antiradicalaire (CUPRAC) des extraits a été évaluée par leurs activités réductrices de cuivre. Les résultats obtenus on permit de tracer la courbe des absorbances en fonction des concentrations des d'extraits et des standards (BHT et BHA) [Figure III.14].

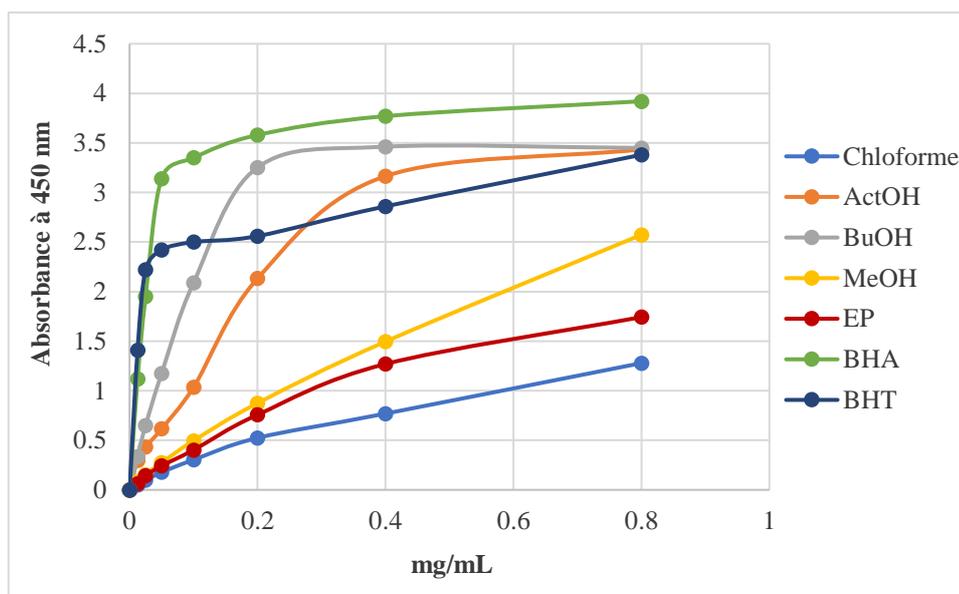


Figure III.14. Courbes des absorbances en fonction des concentrations (CUPRAC).

D'après les résultats, on constate que l'extrait de BuOH présente l'activité antioxydante la plus élevée parmi les cinq extraits testés à toutes les concentrations, mais son pouvoir reste inférieur à celles des standards BHA et BHT, suivi par ActOH qui exhibent ainsi une forte activité. Tandis que les trois restes extraits arrivent par l'ordre MeOH > EP > CHCl₃.

Les résultats obtenus indiquent qu'il y a un changement de la couleur du milieu réactionnel du transparent à l'orangé, ce qui montre qu'il présente une capacité antioxydante plus important dans les extraits BuOH et ActOH et moyenne dans l'extrait MeOH.

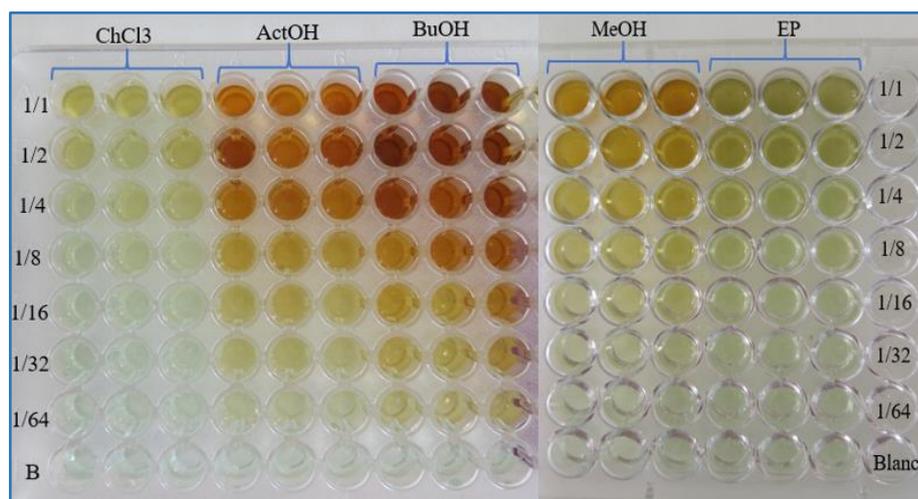


Figure III.15. Illustration de la réaction colorimétrique du test CUPRAC des extraits.



➤ Discussion des résultats

Nous remarquons qu'à une concentration de 0,4 mg/mL, l'extrait BuOH présente une absorbance maximale (3,46) qui reste stable jusqu'à la concentration finale 0,8 mg/mL, ce dernier diffère aux deux extraits ActOH et MeOH qui exhibent des absorbances de 3,16 et 1,49, respectivement à la concentration 0,4 mg/mL. Lorsque celle-ci est augmentée, les absorbances augmentent jusqu'à elles arrivent à une valeur maximale égale à 3,46 et 2,57 respectivement à une concentration finale de 0,8 g/mL. Alors que le BHA et le BHT présentent une DO de 3,38 et 3,92, respectivement à la même concentration. Nous remarquons qu'à la concentration finale (0,8 mg/mL), la DO pour chacun des deux extraits BuOH et ActOH est presque similaire. Nous pouvons noter que l'extrait BuOH a présenté une activité plus importante pour réduire le cuivre (Cu) par rapport aux deux autres extraits, mais nettement inférieure à celles de BHA et BHT, reflétée par les densités optiques élevées obtenues à différentes concentrations de celles-ci.

Ces résultats peuvent montrer un lien direct entre la présence de composés phénoliques et la capacité réductrice. En fait, la capacité réductrice des composés phénoliques a déjà été rapportée [Sowndhararajan et al. 2012] et certains chercheurs ont mis l'accent sur un lien étroit entre les composés phénoliques et les capacités réductrices [Limmongkon et al. 2017]. Donc, il faut signaler que la réduction du cuivre dû à la richesse de notre plante beaucoup plus en flavonoïdes [figure III.3 ; tableau III.4]

4.6 Test de la capacité antioxydante par réduction de fer (Pouvoir réducteur)

La capacité réductrice des échantillons a été également étudiée à partir de la transformation du Fe^{3+} en Fe^{2+} . Cette méthode est souvent utilisée comme un indicateur de l'activité donneuse d'électrons, qui est un mécanisme important de l'action antioxydante phénolique et peut être fortement corrélée avec d'autres propriétés antioxydants [Dorman et al. 2003].

Les résultats obtenus ont permis de tracer la courbe des absorbances en fonction des concentrations des extraits et des standards (BHT et BHA) [Figure III.16].

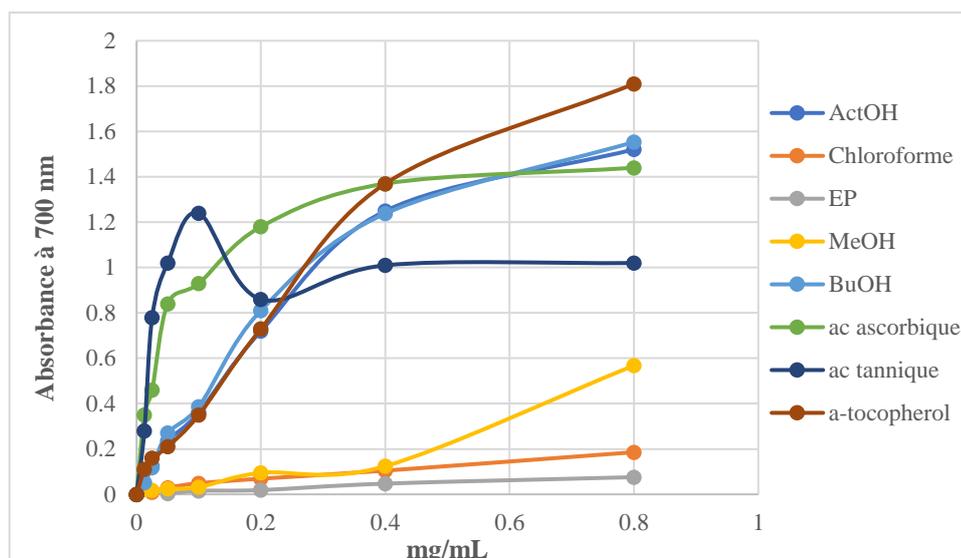


Figure III.16. Courbes des absorbances en fonction des concentrations (Pouvoir Réducteur).

L'analyse statistique des résultats manifestent une proportionnalité entre les absorbances des échantillons et leurs concentrations respectives [Figure III.16]. Plus l'absorbance est élevée, plus le pouvoir réducteur est important. On constate que l'extrait de BuOH et ActOH présentent les activités antioxydantes similaires, les plus élevées parmi les cinq extraits testés à toutes les concentrations, mais leurs activités restent inférieures à celles des standards BHA et BHT. Tandis que les restes extraits suivi par ordre ; MeOH > CHCl₃ > EP avec des faibles absorbances.

Les résultats obtenus indiquent qu'il y a un changement de la couleur du milieu réactionnel du jaune au bleu-vert, ce qui montre qu'il présente une capacité antioxydante plus important dans les extraits butanolique et ActOH et des traces dans l'extraits MeOH [figure III.17].

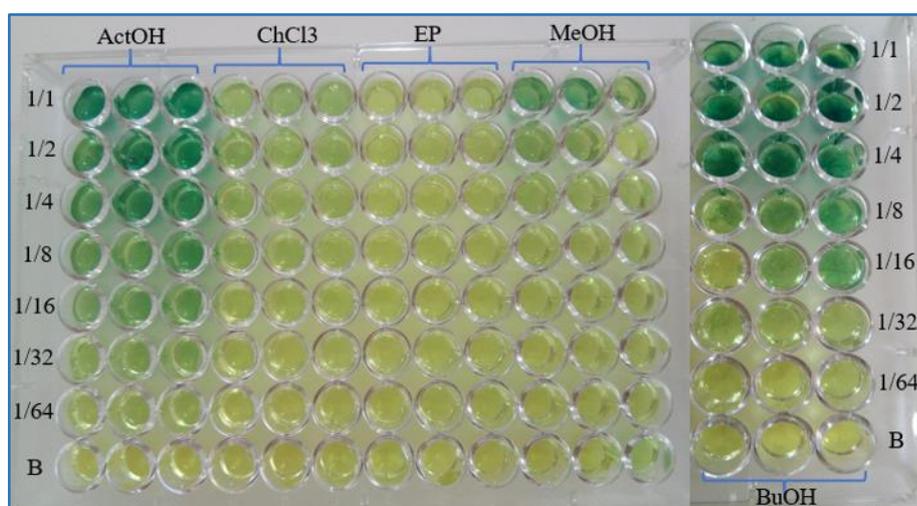


Figure III.17. Illustration de la réaction colorimétrique du test du pouvoir réducteur des extraits.



➤ Discussion des résultats

D'après les résultats, nous remarquons qu'à une concentration de 0,0125 mg/mL, les extraits présentent des absorbances de 0,05 ; 0,05 ; 0,02 ; 0,00 ; 0,00 pour les extraits BuOH, ActOH, MeOH, CHCl₃ et EP en comparant avec les standards Ac ascorbique, Ac tannique et l' α -Tocophérol qui exhibent des DO élevés de l'ordre de 0,84 ; 1,02 ; 0,21 respectivement. Lorsqu'on augmente la concentration, les absorbances augmentent. À une concentration finale de 0,8 mg/mL, le BuOH et l'ActOH présentent les DO les plus élevées de 1,55 et 1,52 respectivement. Suivis par le MeOH avec une DO de l'ordre de 0,56. Alors que les trois standards (Ac ascorbique, Ac tannique et α -Tocophérol) présentent des DO de 1,44 ; 1,02 et 1,81 respectivement à la même concentration. Nous remarquons qu'à une concentration finale (0,8 mg/mL), la DO pour chacun des deux extraits BuOH et ActOH est très proche. Nous pouvons noter que ces deux ont présentés le plus d'activité pour réduire le Fer (Fe³⁺), mais nettement inférieure à celles des standards, reflétée par les densités optiques élevées obtenues à différentes concentrations de celles-ci.

Notre résultat pour l'extrait ActOH et CHCl₃ (1,52 ; 0,18) respectivement s'avère moins faible que celui obtenu par [Kalantari et al. 2017] pour les mêmes extraits avec des valeurs d'absorbances égale à 15,90 et 3,90 respectivement.

Le pouvoir réducteur de la plante *C. Spinosa L* est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés flavoniques qui peuvent servir comme donneur d'électron [figure II.11]. Des travaux antérieurs ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydant potentielle [Jeong et al. 2004 ; Kumaran. 2007].

4.7 Test de l'activité phénanthroline

La réaction de cette méthode est basée sur la réduction de Fe⁺³ en Fe⁺² :

Fe (III)-L + antioxydant → Fe (II)-L + antioxydant oxyde. Pour que L : est le ligand 1,10 phénanthroline sélectif pour l'ion Fe (II). Le complexe de Fe (II)-L formé a une couleur rouge-orangée [figure III.18]. La quantité de complexe formé est en corrélation avec la quantité d'antioxydant dans l'échantillon. Les valeurs d'absorbance sont mesurées à 510 nm après 20 min.

Les résultats obtenus on permit de tracer la courbe des absorbances en fonction des concentrations des d'extraits et des standards (BHT et BHA).

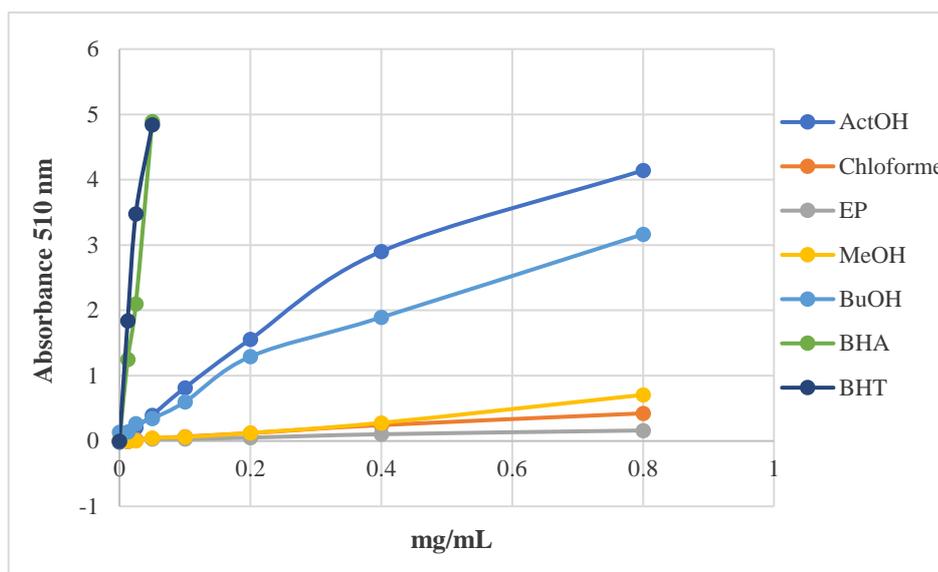


Figure III.18. Courbes des absorbances en fonction des concentrations.

L'analyse statistique des résultats manifestent une proportionnalité entre les absorbances des échantillons et leurs concentrations respectives. Plus l'absorbance est élevée, plus l'activité phénanthroline est importante.

Les résultats obtenus indiquent qu'il y a un changement de la couleur du milieu réactionnel de l'incolore au rouge-orangée, ce qui montre qu'il présente une capacité antioxydant plus important dans les extraits ActOH ainsi BuOH.

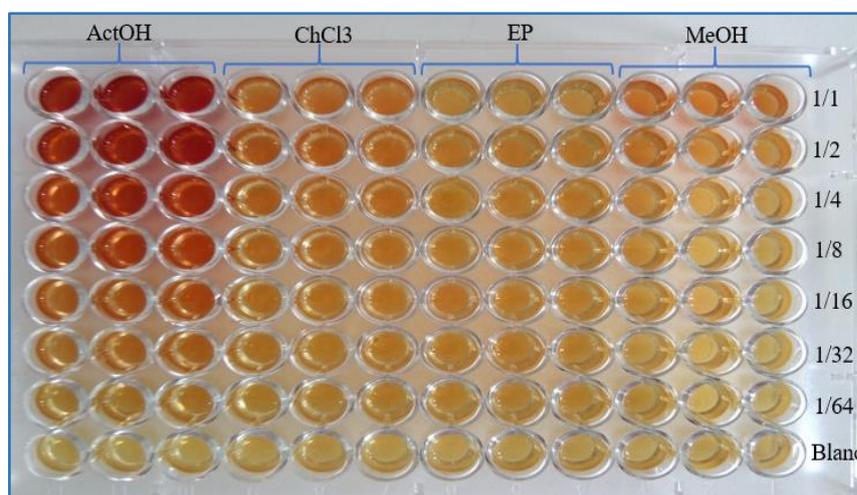


Figure III.19. Illustration de la réaction colorimétrique du test phénanthroline des extraits.

➤ Discussion des résultats

Il ressort de ces résultats, qu'à part les deux extraits ActOH et BuOH qui possèdent une activité réductrice de fer avec des valeurs d'absorbance de 4,14 et 3,16 respectivement à une concentration finale de 0,8 mg/mL. Les autres extraits représentent, pour la même



concentration, des valeurs d'absorbance très faibles de 0,70 ; 0,42 ; 0,16 pour MeOH, CHCl₃ et EP, respectivement. Par comparaison avec les standards (BHA ; BHT), qu'ils exhibent des valeurs d'absorbances plus significatives (4,48 pour les deux standards) à une très faible concentration de 0,05 mg/mL, nous pouvons remarquer que tous les extraits sont moins faibles. Ceci dû à la pureté des standards utilisés.

En partant de ces résultats, on peut déduire que les variations de la capacité antioxydante des différents échantillons testés comparativement à celles des témoins (BHA et BHT) pourrait être principalement due à la teneur des hydroxy benzoïques, hydroxy cinnamiques et notamment les flavonoïdes qui étaient très présents dans les extraits BuOH et ActOH.

5 Evaluation de l'activité anti Alzheimer

L'activité anti Alzheimer a été étudiée par la méthode d'inhibition de deux enzymes qui sont l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase.

5.1 Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase

Les valeurs de l'absorbance obtenues ont permis de calculer le pourcentage d'inhibition des différents extraits selon la même formule précédemment utilisée pour les activités précédentes [tableau III.5].

Tableau III.5. Valeurs de pourcentages d'inhibition de l'acétylcholinestérase selon les concentrations effectuées de chaque extrait.

Extracts	Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase							
	0,0031 mg	0,0062 mg	0,0125 mg	0,025 mg	0,05 mg	0,1 Mg	0,2 Mg	IC ₅₀ mg/mL
MeOH	4,32 ±1,04	14,10 ±9,16	17,11 ±10,12	9,78 ±3,24	18,28 ±5,16	-1,07 ±0,31	0,53 ±0,15	/
EP	-3,92 ±1,83	-5,46 ±2,05	-4,32 ±3,10	5,73 ±1,16	7,46 ±2,99	4,88 ±2,50	-17,08 ±7,69	/
CHCl ₃	-16,60 ±3,14	-5,54 ±3,95	-11,57 ±8,52	10,23 ±9,15	10,77 ±8,29	8,77 ±3,33	3,94 ±2,84	/
ActOH	-16,92 ±5,93	-12,55 ±5,2	-10,47 ±6,55	-17,75 ±8,3	-31,64 ±14,8	-25,75 ±8,10	-32,73 ±5,75	/
BuOH	-39,81 ±4,06	-28,9 ±15,4	-27,89 ±11,3	-96,54 ±24,9	-25,17 ±19,1	-34,63 ±23,2	-40,64 ±20,8	/
Galantamine (Standards)	35,93 ±2,28	43,77 ±0,00	68,50 ±0,31	80,69 ±0,41	85,78 ±1,63	91,80 ±0,20	94,77 ±0,34	0,00627 ±1.15



Les résultats obtenus indiquent qu'il n'y a aucun changement de la couleur du milieu réactionnel, ce qui montre l'absence de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase pour tous les extraits de notre plante.

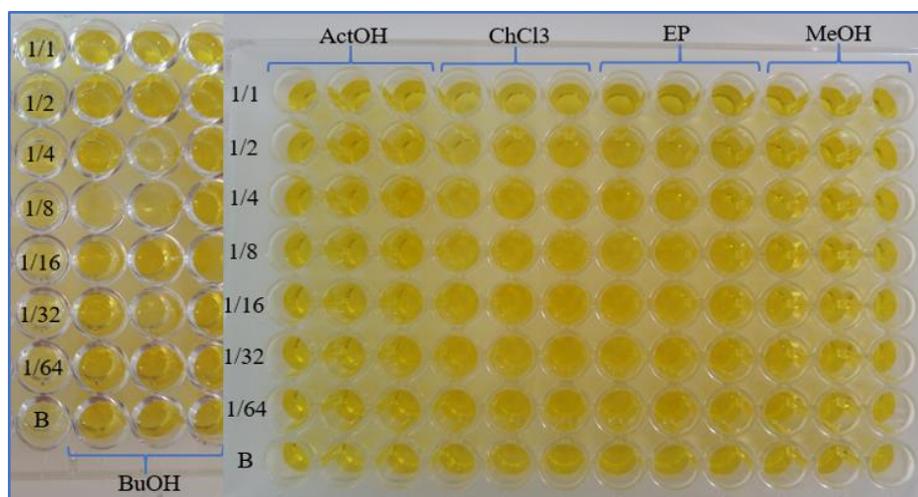


Figure III.20. Illustration de la réaction colorimétrique de l'activité anticholinestérase.

➤ Discussion des résultats

D'après les résultats mentionnés dans le tableau ci-dessus, il est constaté que l'extrait BuOH et ActOH n'a aucun effet inhibiteur sur l'enzyme acétylcholinestérase à toutes les concentrations effectuées. Cependant, l'extrait CHCl_3 semble avoir une très petite activité inhibitrice à la concentration de 0,2 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,05 mg/mL et 0,025 mg/mL ; ainsi que l'extrait EP a aussi une petite activité aux concentrations suivantes : 0,1 mg/mL ; 0,05 mg/mL et 0,025 mg/mL. Mais ils restent sans effet à toutes les autres concentrations avec des pourcentages d'inhibitions négatifs. Enfin l'extrait MeOH reste sans effet à la concentration 0,1 mg/mL mais avec une petite activité inhibitrice à toutes les autres concentrations, mais elle reste négligeable.

5.2 Activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase

Les valeurs de l'absorbance obtenues ont permis de calculer le pourcentage d'inhibition des différents extraits selon la même formule précédemment utilisée pour les activités précédentes [tableau III.6].



Tableau III.6. Valeurs des pourcentages d'inhibition de butyrylcholinestérase selon les concentrations effectuées de chaque extrait.

Extracts	Activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase							
	0,0031 mg	0,0062 mg	0,0125 mg	0,025 mg	0,05 mg	0,1 Mg	0,2 mg	IC ₅₀ mg/mL
MeOH	-27,9 ±14,46	-2,38 ±1,7	-14,01 ±6,03	-8,87 ±3,34	19,82 ±5,15	-2,23 ±1,71	-4,49 ±2,61	/
EP	-22,16 ±2,65	-21,86 ±16,99	-34,24 ±8,06	-29,56 ±8,6	-16,57 ±3,96	-21,40 ±10,88	5,78 ±2,61	/
CHCl ₃	-29,26 ±13,2	-17,86 ±7,75	-17,78 ±11,93	-35,60 ±9,76	-15,82 ±10,73	-11,59 ±9,63	6,98 ±4,11	/
ActOH	-38,47 ±13,36	-40,43 ±13,96	-41,34 ±10,24	-41,94 ±18,54	-46,32 ±9,09	-45,72 ±7,22	-28,8 ±15,62	/
BuOH	-38,47 ±13,36	-40,43 ±13,96	-41,34 ±10,24	-41,94 ±18,54	-46,32 ±9,09	-47,43 ±10,92	-45,44 ±14,88	/
Galantamine (Standard)	3,26 ±0,62	6,93 ±0,62	24,03 ±2,94	45,13 ±2,60	63,87 ±2,85	73,57 ±0,77	78,95 ±0,58	0.03 ±1.99

Les résultats obtenus indiquent qu'il n'y a aucun changement de la couleur du milieu réactionnel (la couleur reste jaune), ce qui montre l'absence de l'activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase pour tous les extraits de notre plante.

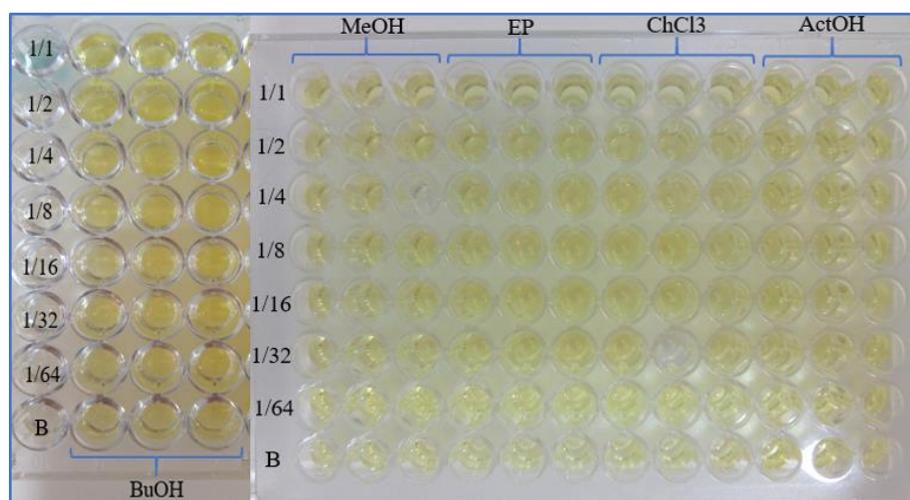


Figure III.21. Illustration de la réaction colorimétrique de l'activité anti-butylcholinestérase.

D'après les résultats mentionnés dans le tableau ci-dessus, il est constaté que l'extrait BuOH et ActOH n'a aucun effet inhibiteur sur l'enzyme acétylcholinestérase à toutes les concentrations effectuées. Cependant, l'extrait CHCl₃ ; EP et MeOH semble avoir une très petite activité inhibitrice à la concentration de 0,2 mg/mL et 0,05 mg/mL, respectivement, mais ils restent sans effet à toutes les autres concentrations avec des pourcentages d'inhibitions négatifs.



Donc, on peut constater que l'activité inhibitrice des enzymes, anti Alzheimer, n'a pas en relation avec la richesse en composés phénoliques.

6 Evaluation de l'activité antidiabétique

L'hyperglycémie peut être caractérisée par une glycémie élevée, en particulier après le jeûne et la prise de repas. La glucosidase et l'amylase pancréatiques jouent un rôle important en raison de leur hydrolyse de l'amidon et des oligosaccharides. Ainsi, une stratégie importante pour gérer l'hyperglycémie consiste à inhiber la glucosidase et l'amylase [Gray, 1995 ; Krentz et Bailey, 2005].

6.1 Activité inhibitrice de l' α -amylase

Dans cette étude, un effet inhibiteur *in vitro* de différents extraits de *C. spinosa L* sur l' α -amylase, a été étudiée. Le test a été fait dans une microplaque de 96 puits.

Les résultats enregistrés ont permis de calculer le pourcentage d'inhibition des différents extraits selon la même formule précédemment utilisée pour les activités précédentes et de tracer les courbes en fonction des concentrations des extraits et du standard (Acarbose) [Figure III.22].

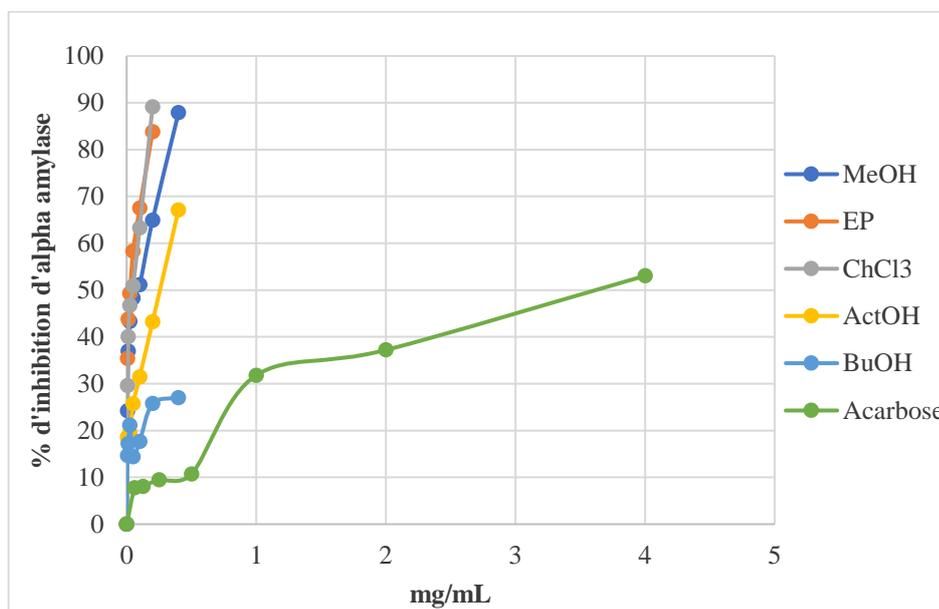


Figure III.22. Courbe de pourcentage d'inhibition de α -amylase à différentes concentrations des extraits et du standard.

Le test d'inhibition enzymatique a montré une forte activité d'inhibition de l' α -amylase qui intervient dans le métabolisme du glucose, les deux extraits EP et CHCl_3 exhibent l'activité inhibitrice de l' α -amylase la plus élevée était supérieur à celui du MeOH et d'ActOH. Cependant,



l'extrait BuOH testé dans cette étude exhibent une faible inhibition l'enzyme α -amylase n'a pas atteint à 50% d'inhibition.

➤ **Détermination de l'IC₅₀**

Les résultats obtenus ont permis également de déterminer la valeur de l'IC₅₀ avec le logiciel « GraphPad prisme 6 » afin de pouvoir évaluer l'activité des extraits vis-à-vis des standards.

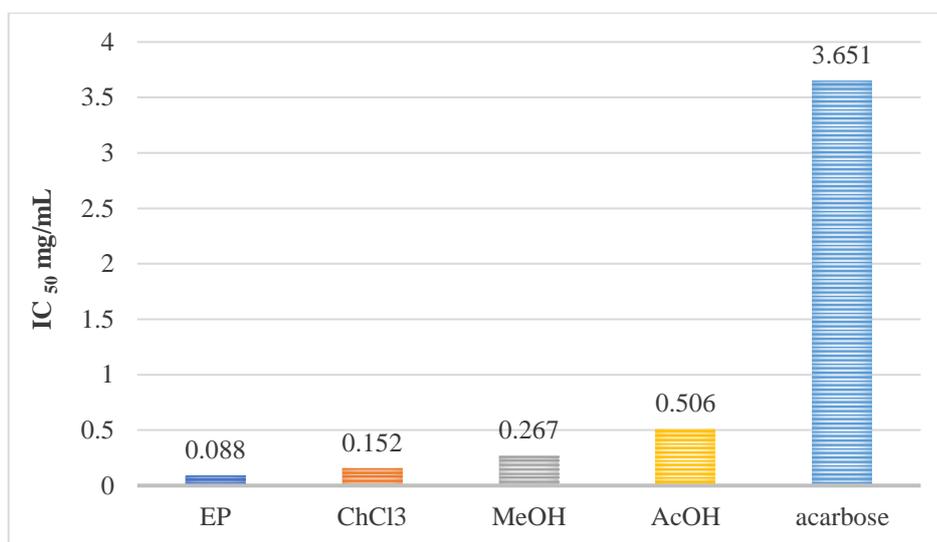


Figure III.23. Les IC₅₀ des échantillons testés classés par ordre croissant (α -amylase).

La figure suivante montre l'intensité de coloration qui est proportionnel avec la capacité de l'extrait pour inhiber l'enzyme.

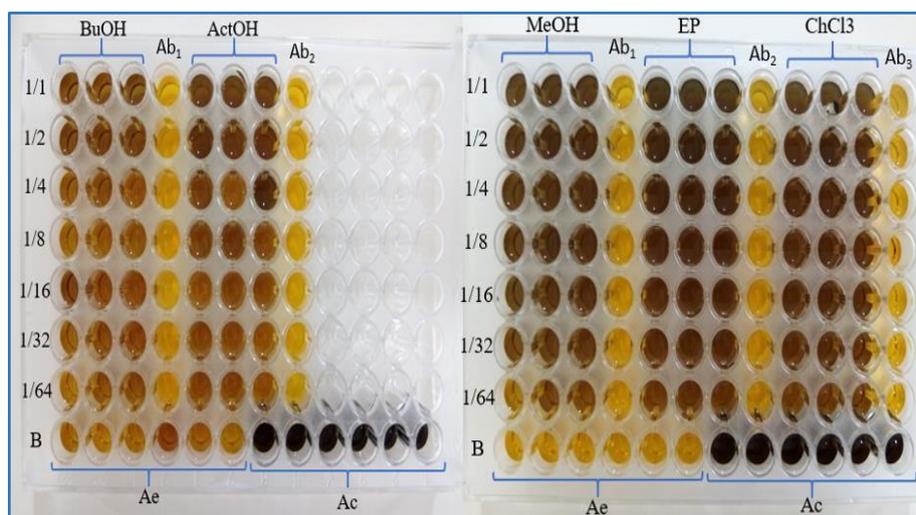


Figure III.24. Illustration de la réaction colorimétrique du test d'inhibition de l' α -amylase des extraits.



➤ Discussion des résultats

D'après les résultats obtenus, les extraits EP et CHCl₃ ont révélé le plus grand effet inhibiteur sur l'α-amylase, avec des IC₅₀ de 0,088 ± 0,003 et 0,152 ± 0,0165 mg/mL, respectivement. Suivi par le CHCl₃ avec une IC₅₀ de 0,152 ± 0,0165 mg/mL, et elle était supérieure à celles du MeOH (0,267 ± 0,007 mg/mL) et d'ActOH (0,5060 ± 0,07 mg/mL). En comparant avec le standard (l'acarbose) (3,651 ± 10,70 mg/mL) nos extraits montraient des valeurs de IC₅₀ nettement supérieures à celle de l'acarbose et pouvaient donc être potentiellement utiles comme traitement efficace de l'hyperglycémie post-prandiale avec effets secondaires minimales. En outre, ces résultats étaient en contraste avec les composés phénoliques totaux dans les extraits étudiés.

Fait intéressant, est celui de l'extrait EP qui avait le plus haut niveau de composés qui prennent la place du substrat et empêchent le site actif de l'enzyme « α-amylase ». De même, des études antérieures sur certains extraits de plantes ont montré que les extraits riches en composés phénoliques plus particulièrement la rutine [Fernandes *et al.* 2010] possédaient une bonne activité inhibitrice sur la l'α-amylase [De Sales *et al.* 2012 ; Salehi *et al.* 2013].

Nos résultats sont très élevés en comparant à ceux trouvés par [Mostafa Selfayan et Foroogh Namjooyan. 2016], qu'ont trouvés des valeurs de l'IC₅₀ de 5,93 et 3,89 mg/mL pour les racines et les feuilles, respectivement.

6.2 Activité inhibitrice de l'α-glycosidase

Les activités antidiabétiques des extraits MeOH, CHCl₃, EP, ActOH et BuOH ont été évaluée par leur activité inhibitrice sur l'enzyme alpha glucosidase, l'absorbance a été mesurée à 405 nm. Le standard utilisé est l'acarbose.

Les résultats enregistrés ont permis de calculer le pourcentage d'inhibition des différents extraits selon la même formule utilisée pour les activités précédentes et de tracer les courbes en fonction des concentrations des d'extraits et de standard [Figure III.25].

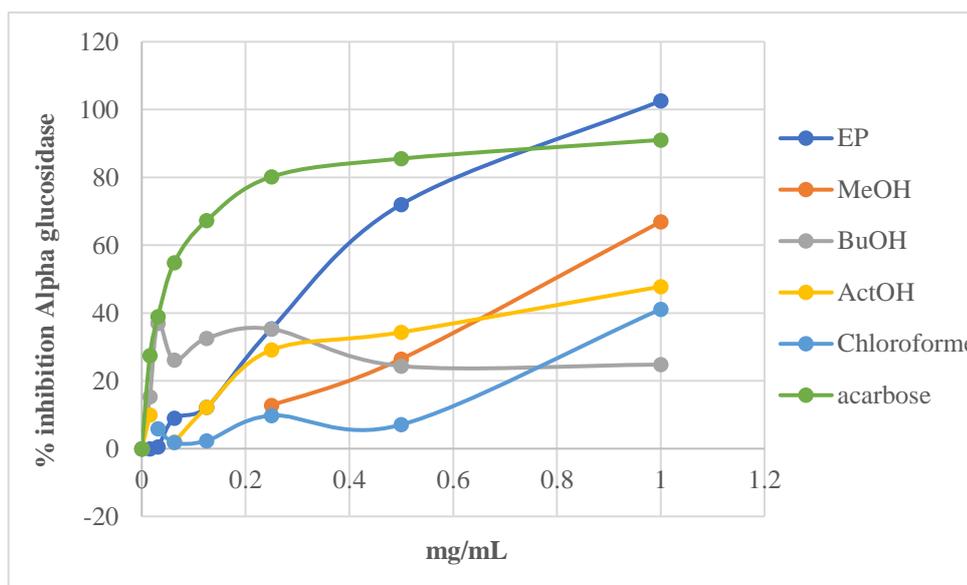


Figure III.25. Courbe de pourcentage d'inhibition de l'a-glucosidase par différents extraits de plante.

Les résultats révèlent que nos extraits (MeOH, CHCl₃, EP, ActOH et BuOH) possèdent une activité antidiabétique dose dépendante c'est-à-dire l'inhibition de l'α-glucosidase augmente avec l'augmentation de la concentration des cinq extraits et par conséquent l'augmentation de l'activité antidiabétique.

➤ **Détermination de l'IC₅₀**

Les résultats obtenus ont permis également de déterminer la valeur de l'IC₅₀ afin de pouvoir évaluer l'activité des extraits vis-à-vis du standard.

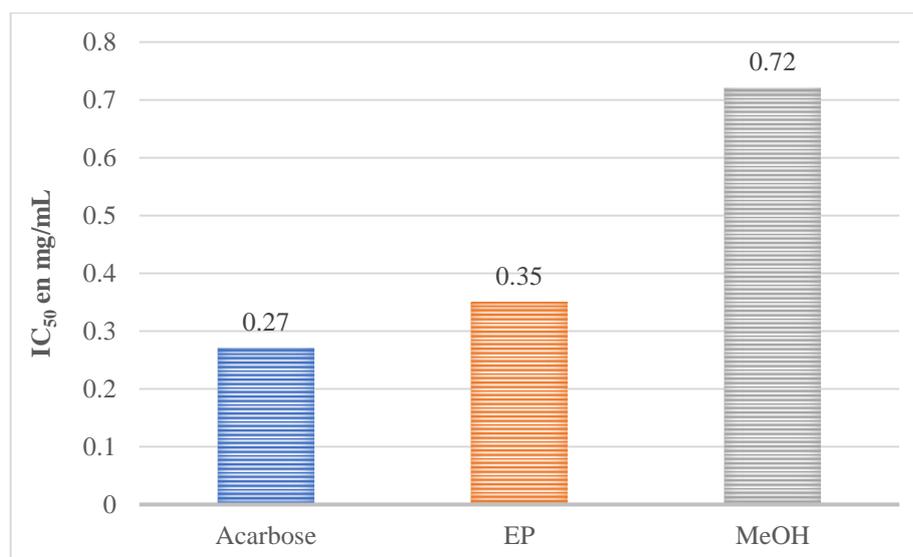


Figure III.26. Valeurs des IC₅₀ exprimés en mg/mL des échantillons étudiés classés en ordre croissant.



La figure III.27 montre l'intensité de la coloration qui est proportionnel avec la capacité d'extrait pour inhiber l'enzyme.

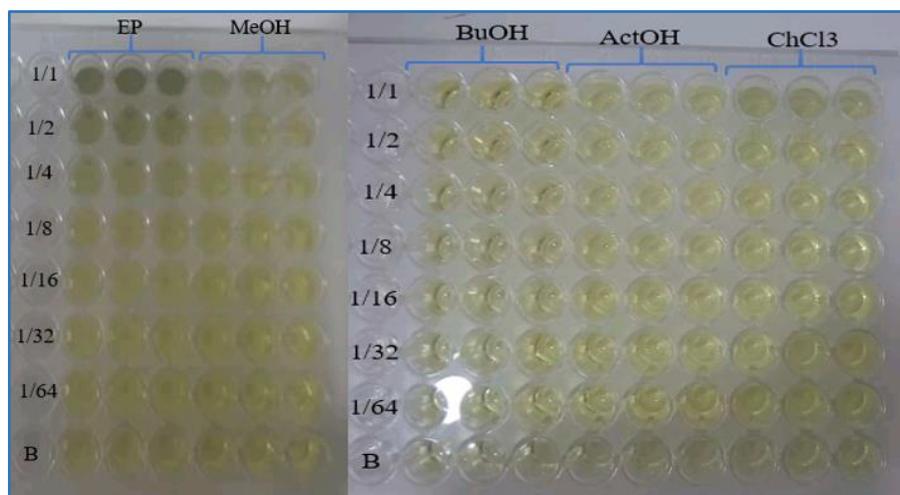


Figure III.27. Illustration de la réaction colorimétrique du test d'inhibition de l' α -glycosidase des extraits.

➤ Discussion des résultats

Il ressort de ces résultats que le test d'inhibition enzymatique a montré une forte inhibition sur l'alpha glucosidase qu'est une enzyme clé impliqué dans le métabolisme du glucose.

Parmi les extraits testés, l'extrait EP et MeOH représentent les extraits les plus actifs avec une IC_{50} de l'ordre de $0,35 \pm 0,04$ et $0,72 \pm 0,07$ mg/mL respectivement. Les extraits qui restent (ActOH ; BuOH et $CHCl_3$) sont inférieurs au seuil de l' IC_{50} . En comparaison avec le standard, tous les extraits testés s'avèrent moins actifs, par exemple l'activité antidiabétique de l'extrait MeOH est trois fois moins importante de celle de l'acarbose qui présente une IC_{50} égale à $0,27 \pm 0,001$ mg/mL.

Les effets inhibiteurs de l'enzyme peuvent être expliqués par la teneur la plus élevée de rutine. Ces résultats ont été appuyés par certains chercheurs, **Fernandes et al. (2010)** a suggéré que la rutine pourrait être un agent précieux pour la prévention du diabète sucré. Mais nos résultats étaient en contraste avec cette étude, cependant les extraits qui sont riches aux composés phénoliques, exhibent une faible activité inhibitrice de l' α -glycosidase.



7 L'activité anti-inflammatoire

7.1 Etude *In vitro* de l'effet anti-thérmodénaturant des extraits

Pour évaluer l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits (MeOH, EP, CHCl₃, ActOH, BuOH) de la partie aérienne de *Capparis spinosa L*, nous avons utilisé le test d'inhibition de la dénaturation de BSA (sérum albumine bovine). Les taux d'inhibition obtenus à différentes concentrations des extraits sont représentés dans la [figure III.28].

En effet la conformation d'une protéine est liée à la structure secondaire, tertiaire et quaternaire, elle est réalisée par l'intermédiaire de liaisons faible énergie (hydrogène, électrostatiques, hydrophobes et les ponts disulfures) donc fragiles. La dénaturation résulte d'une modification de ces structures sans fragmentation de la chaîne peptidique sous l'effet de divers agents chimiques (acide, base, détergent) ou physiques (chaleur, PH) [Karthik et al. 2013].

Le test d'inhibition de la dénaturation des protéines utilisés *in vitro* est un test d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire. La dénaturation d'une protéine provoque l'induction de la réaction inflammatoire par la production des auto-antigènes, facteurs importants pour développer une inflammation chronique [Karthik et al. 2013]. Ce test est dans le but de mesurer le pouvoir inhibiteur de la dénaturation thermique de protéine par les extraits MeOH, EP, CHCl₃, ActOH et BuOH de *Capparis spinosa L* et l'albumine sérique humaine (BSA) est la protéine utilisée comme model pour ce test.

Après avoir mesuré l'absorbance à 660 nm, les résultats enregistrés ont permis de calculer le pourcentage d'inhibition des différents extraits selon la même formule utilisée pour les autres activités et de tracer les courbes des extraits ainsi des standards (BHA et BHT) en fonction des concentrations des d'extraits et des standards [Figure III.28].

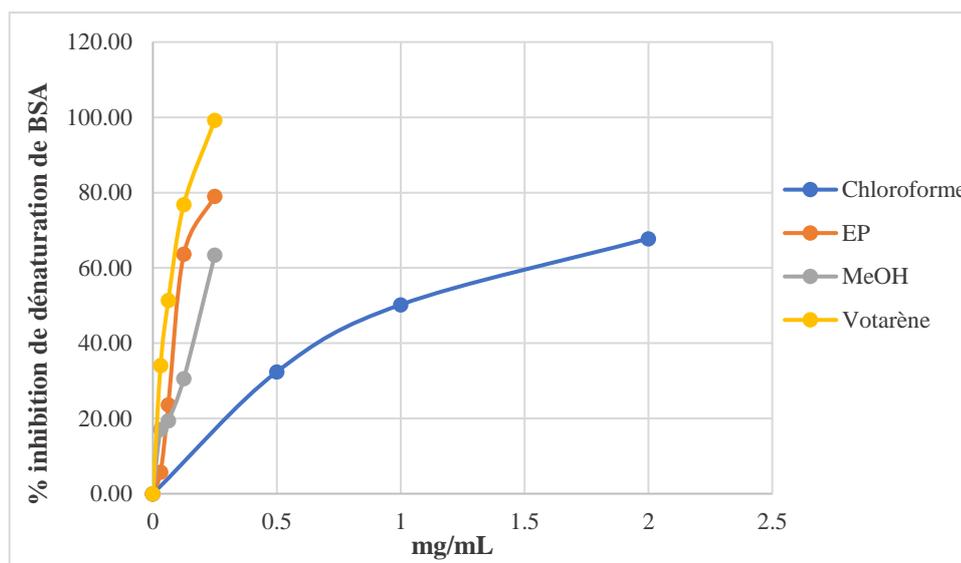


Figure III.28. Courbe de pourcentage d'inhibition de la dénaturation de BSA à différentes concentrations des extraits.

Les résultats révèlent que parmi les cinq échantillons testés, les trois extraits qui sont MeOH, CHCl_3 et EP possèdent une activité inhibitrice de dénaturation de BSA dose dépendante avec un espacement différent dans son taux d'inhibition de la dénaturation entre l'anti inflammatoire standard (Voltarène) et les extraits étudiés de la plante avec les différentes doses testées. Ça peut être dû à la pureté du standard utilisé.

➤ Détermination de l'IC₅₀

Les résultats obtenus ont été également utilisés pour la détermination de la valeur de IC₅₀ avec le logiciel « GraphPad prisme 6 » ce qui permettra par la suite une évaluation de l'activité des échantillons vis-à-vis du standard.

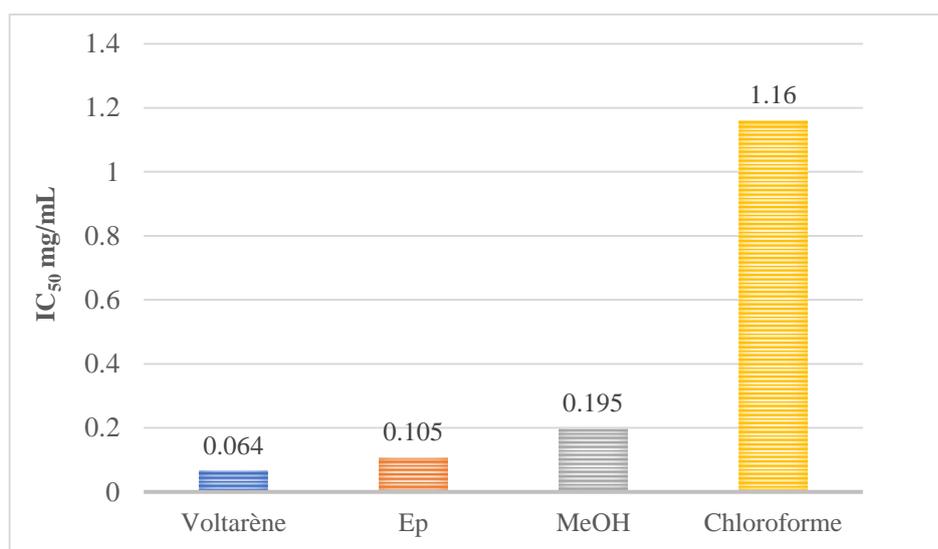


Figure III.29. Les IC₅₀ des échantillons testés classées par ordre croissant (dénaturation de BSA).

➤ Discussion des résultats

Le pourcentage d'inhibition de dénaturation de BSA est proportionnel à la concentration des extraits et des standards. Comme on a déjà dit, le test a montré que les trois extraits (MeOH, CHCl₃ et EP) testées possèdent un pouvoir d'inhiber la dénaturation de BSA. Ce pouvoir est confirmé par des valeurs d'IC₅₀ faibles et des pourcentages d'inhibition importants. Alors, on constate que l'extrait EP est le plus actif suivi par le MeOH avec IC₅₀ de l'ordre de $0,105 \pm 8,628$ et $0,195 \pm 4,103$ mg/mL, respectivement. Ces résultats sont inférieurs à celle du Voltarène ($0,064 \pm 0,73$ mg/mL) qui possède un effet inhibiteur significatif. Pour ce qui est l'extrait CHCl₃, il représente un IC₅₀ élevée de l'ordre de $1,16 \pm 53,742$ mg/mL, qui est très loin à celle du Voltarène. Concernant les deux extraits ActOH et BuOH, ils ne possèdent aucun pouvoir inhibiteur de dénaturation de BSA ce qui est constaté à partir des pourcentages d'inhibition négatifs. En outre, ces résultats étaient en contraste avec les composés phénoliques totaux dans les extraits étudiés.

En comparant nos résultats avec des études inférieurs sur *Capparis spinosa L* qui ont été réalisées par [Aichour R et al. 2018], ont montré l'effet de cette plante sur l'inhibition de la dénaturation de BSA, ils ont trouvé que l'extrait méthanolique de fruits et des feuilles à la concentration de 0,4 mg/mL présentaient une inhibition de la dénaturation de l'albumine de 61,78 % et 60,12% respectivement. Comparable à celle du standard (acide acétylsalicylique), avec un taux de protection de 64,85 % à 0,1 mg/mL. Il est bien évident que notre extrait MeOH détient une forte inhibition qui a atteint 63,42% à la concentration de 0,25 mg/mL. De même pour l'extrait EP qui a atteint une inhibition significative de 79,06 % dans la même



concentration. Enfin l'extrait CHCl_3 ainsi exhibe une inhibition significative de 67,79 % à une concentration un peu élevée 2 mg/mL.

L'inflammation est la réponse principale de l'organisme à une agression. La dénaturation des protéines est l'une des causes de la polyarthrite rhumatoïde qui a été bien documentée, donc la production d'auto-antigène dans certaines maladies arthritiques peut être due à la dénaturation d'une protéine [De S et al. 2016]. D'après nos résultats, on constate que les trois extraits MeOH, EP et CHCl_3 de *Capparis spinosa L* sont capables de contrôler la production d'auto-antigène par l'inhibition de la dénaturation de BSA. Selon [Ghedira. 2005], l'activité inhibitrice de la dénaturation de la protéine est peut-être attribuée à la présence de différents composés bioactifs tels que les flavonoïdes, mais nos résultats étaient en contraste avec cette étude.

Conclusion générale



Notre travail a été motivé d'abord, par le souci de valoriser et de promouvoir les plantes médicinales de l'Algérie afin de faciliter l'accès des populations à des remèdes traditionnels améliorés à moindre coût.

Dans l'optique de valider l'utilisation traditionnelle de l'espèce végétale *Capparis spinosa L.*, de chercher des alternatives aux substances chimiques de synthèse, notre recherche s'est articulée autour de détermination (quantitative et qualitative) de la teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux et l'évaluation des propriétés antioxydants, anti Alzheimer, antidiabétique et anti inflammatoire de la plante appartenant à la famille des *Capparidaceae*. Celle-ci est particulièrement connue par sa richesse en divers métabolites secondaires.

Au terme de ce travail de recherche, le dosage des composés phénoliques et des flavonoïdes totaux a montré la richesse de notre plante par ces composés, ce qui a été confirmé par l'analyse chromatographique HPLC, celle-ci qui a identifié et a quantifié les dérivés hydroxy benzoïques, les dérivés hydroxy cinnamiques et les flavonoïdes.

L'étude de l'activité antioxydante en utilisant sept méthodes complémentaires (le test de DPPH, ABTS⁺, CUPRAC, GOR, pouvoir réducteur, phénanthroline et métal chélate) a démontré que la plante étudiée est dotée d'un pouvoir antioxydant considérable probablement due à sa richesse en polyphénols et flavonoïdes, ceci est confirmé par l'évaluation de la teneur en ces deux composés donnant des valeurs assez importantes. Ce potentiel antioxydant est plus intense avec l'extrait BuOH et ActOH qui ont une grande teneur en polyphénols et en flavonoïdes.

Ainsi, les cinq extraits de la plante étudiée n'avaient pas pu inhiber les enzymes acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase. Par conséquent, notre plante ne possède aucune activité enzymatique anti Alzheimer.

En effet, les tests antidiabétiques des extraits réalisés *in vitro* par la méthode d'inhibition de l' α -amylase et l' α -glycosidase ont démontré que les extraits MeOH, EP, CHCl₃ et ActOH se sont avérés actifs sur l' α -amylase. En revanche, l'extrait BuOH n'avait aucune activité inhibitrice. Ainsi les deux extraits MeOH et EP sont avérés actifs sur l' α -glycosidase en revanche des trois restes extraits qui n'avaient pas une activité inhibitrice.

En outre, le test anti-inflammatoire des extraits (MeOH, EP, CHCl₃, ActOH et BuOH), réalisés *in vitro* par la méthode d'inhibition de la dénaturation du BSA provoquée par la chaleur



(72°C) par les extraits, a montré un effet à dénaturer le BSA par les trois extraits EP, CHCl₃ et MeOH. En revanche de deux extraits ActOH et BuOH qui n'avaient aucune activité.

Les effets de cette plante sont dû à ses richesses en composés phénoliques et flavoniques et autres métabolites secondaires, fait de cette plante une source prometteuse pour le traitement de beaucoup de maladies.

Enfin l'ensemble de ces résultats obtenus ouvre des perspectives d'utilisation de *Capparis spinosa L* pour différents usages et ne constitue qu'un début dans le domaine de la recherche des substances naturelles biologiquement actives. Des essais complémentaires seront nécessaires afin de pouvoir confirmer les activités mises en évidence à savoir :

- ✓ Valoriser le potentiel de *Capparis spinosa L* par des études approfondies sur la pharmaco-cinétique et la pharmacodynamique.
- ✓ Elargir le travail pour d'autres activités biologiques tel que : l'activité cytotoxique, l'activité anti bactérienne, anti tumorale et hépato protectrice.
- ✓ Isoler le ou les principe (s) actif (s) responsables des différentes activités.
- ✓ Etudier le mode d'action et les facteurs influençant leur efficacité.
- ✓ Employer cette plante pour la fabrication des *phyto*-médicaments.

Références bibliographiques

(A)

- Abdul Ameer A. Allaith. **2014**. Assessment of the antioxidant properties of the caper fruit (*Capparis spinosa L*) from Bahrain. Department of Biology, College of Science, University of Bahrain, PO Box 32038 – Building S41, Sakheer Campus, Bahrain
- Abe, E., Delyle, S.G., Alvarez, J.C. **2010**. Liquid-liquid extraction : theory, applications and difficulties. *Annales de Toxicologie Analytique.*, 22 (2), pp 51-59.
- Abreu I.A. et Cabelli D.E. **2010**. Superoxide dismutases-a review of the associated mechanistic variations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804 : 263-274 p.
- Adewusi E. A., Moodley N., Steenkamp V. **2010**. Medicinal plants with cholinesterase inhibitory activity : A review. *African Journal of Biotechnology*. 9(49) : 8257-8276.
- Aichour R et al. **2018**. Activités hépatoprotectrices et anti-inflammatoires de *Capparis spinosa* algérien. L. Laboratory of Applied Biochemistry, Faculty of Nature and Life Sciences, University Ferhat Abbas Setif 1, 19000, Algeria.
- Aighewi, B.A., Akoroda, M., Asiedu, R. **1998**. Preliminary studies of seed yam production from minisettts with different thicknesses of cortex parenchyma in white yam (*Dioscorea rotundata*), 6th Symposium of the ISTRC-AB, Lilongwe (Malawi), pp 22-28.
- Alencar J., Gosset G., Rahmouni H., Culcasi M., Robin M., Reynier J. P., Piccerelle P., & Pietri S. **2008** Development of spray- and freeze-dried high-concentration sesamol emulsions and antioxidant evaluation in fibroblasts and UV-exposed rat skin slices. *Drug Dev.Res* 69 : 266.
- Ali-Shtayeh M. S., Jamous R. M., Abu Zaitoun S Y., Qasem I. B. **2014**. In-vitro screening of acetylcholinesterase inhibitory activity of extracts from Palestinian indigenous flora in relation to the treatment of Alzheimer's disease. *Functional Foods in Health and Disease*. 4(9) : 381-400.
- Ali-Shtayeh SM and Abu Ghdeib SI. **1999**. Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses*. 42(11-12) :665-672.
- Alkurd A., Hamed T. R., Al-Sayyed H. **2008**. Tannin Contents of Selected Plants Used in Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 4 : 265 - 274.
- Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T. M. **1993**. Oxidants, antioxydants, and the degenerative diseases of aging. Review : *Product Natural Academic Science of USA*, 90 : 7915- 7922.
- Andrade, D., Gil, C., Breitenfeld, L., Domingues, F., Duarte, A.P. **2009**. Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo*. *Industrial Crops and Products.*, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.1001.1009>.
- Angelini G, Vena GA, Filotico R, Foti C, Grandolfo M. **1991**. Allergic contact dermatitis from *Capparis spinosa L*. applied as wet compresses. *Contact Dermatitis*, 24(5) : 382-383.
- Annaházi, A., Mracsó, E., Süle, Z., Karg, E., Penke, B., Bari, F. & Farkas, E. **2007**. Pre-treatment and post-treatment with α -tocopherol attenuates hippocampal neuronal damage in experimental cerebral hypoperfusion. *European Journal of Pharmacology* 571, 120–128.

Antwerpen P. V. **2006**. Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique : Ciblage du système myclopéroxydase / Peroxyole d'hydrogène / Clilorure. Thèse de Doctorat en Science Pharmaceutiques Bruxelles.

Apak R, Güçlü K, Özurek M, Karademir S. **2004**. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine : CUPRAC Method, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(26) : 7970-7981.

Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K.M., Özyürek, M., Güçlü, K. **2013**. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry., 85(5), pp 957-998. <http://dx.doi.org/10.1351/PAC-REP-12-07-15>.

Atamer, A. **2008**. The importance of paraoxonase 1 activity, nitric oxide and lipid peroxidation in hepatosteatosis. J. Int. Med. Res, 36 : 771-776 p.

(B)

Bachir Bey M., Louaileche H., Mouhoubi Z. **2014**. Antioxidant activity of eight tomato (*Lycopersicon Esculentuml.*) varieties grown in Algeria. Journal of Food Technology Research. 1 (2) : 133-145.

Bammou M., Sellam K., & ElRhaffari L. **2015**. Bioactivity of *Anvillea radiata* Coss & Dur. Collected from the southeast of Morocco. Eur.Sci.J. 11 : 233-244.

Barbera, G. **1991**. Programme de recherche Agrimed : le Câprier (*Capparis spp.*). Commission des Communautés Européennes. Série Agriculture. EUR 13614. FR. Office des Publications Officielles. Luxembourg. 62 p.

Barouki R. **2006**. Stress oxydant et vieillissement. Médecine/Sciences, 22 : 266-72 p.

Barton, G. **2008**. A calculated response : control of inflammation by the innate immune system. J Clin Invest, 118 : 413-420.

Behvar Asghari, Gokhan Zengin, Mir Babak Bahadori, Mahdi Abbas-Mohammadi, Leila Dinparast. **2018**. Amylase, glucosidase, tyrosinase, and cholinesterases inhibitory, antioxidant effects, and GC-MS analysis of wild mint (*Mentha longifolia* var. *calliantha*) essential oil: A natural remedy. European Journal of Integrative Medicine 22; 44–49.

Belaïch, R., & Boujraf, S. **2016**. Facteurs inflammatoires et stress oxydant chez les hémodialysés : effets et stratégies thérapeutiques. Médecine des Maladies Métaboliques, 10, 38-42.

Benazedine S. **2010**. Activité insecticide de cinq huiles essentielles vis à vis de *Sitophilusoryzae* (coleoptera ; Curculionidae) et *Triboliumconfusum* (Coleoptera ; Tenebrionidae). Ecole nationale supérieure agronomique El Harrach Algérie

Benhamou N. **2009**. La résistance chez les plantes. Lavoisier (ed.). Paris. P376.

Benseghir, L., Séridi, A. **2005**. Détermination des techniques efficaces sur la dormance des graines d'une plante médicinale *Capparis spinosa* L. 1er Colloque Euro-méditerranéen en Biologie Végétale et Environnement. Laboratoire de recherche en Biologie Végétale et Environnement. Département de Biologie. Faculté des Sciences. Université Badji Mokhtar Annaba (Algérie)

- Benseghir-Boukhari L.A. 2015.** Biofacteurs de développement du Câprier épineux (*Capparis spinosa* L.) en Algérie. Thèse de doctorat. Faculté Des Sciences, Département De Biologie. Université Badji Mokhtar – Annaba.
- Benseghir-Boukhari, L.A., Seridi, R. 2007.** Le câprier, une espèce arbustive pour le développement rural durable en Algérie. Méditerranée : 109 ; pp. 101-105.
- Bensouici Chawki. 2015.** Etude phytochimique et évaluation des activités biologiques de deux plantes du genre *Sedum* (Crassulaceae). Thèse ; Phytochimie.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Marin, F.R., Ortuno, A., Del Rio, J.A., 1997.** Uses and properties of Citrus flavonoids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, pp 4505-4515.
- Benzidane Nadia. 2014.** Effets antioxydant, vasoactif, bronchorelaxant et cytotoxique des extraits de *Capparis spinosa*. Thèse de doctorat. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Ferhat Abbas Sétif 1.
- Beserra Almeida M. M., Machado de Sousa P. H., Campos Arriaga A. M., Matias do Prado G., De Carvalho Magalhães E.M., Arraes Maia G., Gomes de Lemos T. L. 2011.** Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International* 44 : 2155–2159.
- Blois M. S. 1958.** Antioxydant determination by the use of a stable freeradical. *Nature*, 4617 (181) ; 1119- 1200.
- Boizot N., Charpentier J. P. 2006.** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*. Vol : 79-82.
- Bonina F, Puglia C, Ventura D, Aquino R, Tortora S, Sacchi A, Saija A, Tomaino A, Pellegrino ML and Caprariis P. 2002.** In vitro antioxidant and in vivo photoprotective effects of a lyophilized extract of *Capparis Spinosa* L. buds. *J. Cosmet. Sci.* 53 : 321-335.
- Bonnefont-Rousselot D, Beaudoux J, Therond P, Perynet J, Legrand A, Delattre J. 2004.** Diabète sucré, stress oxydant et produits de glycation avancée. *Ann Pharm, Fr*, 62 : 147-157.
- Bonnefont-Rousselot D., Théron P., Delattre J. 2003.** Radicaux libres et antioxydants. En : Delattre J., Durand G., Jardillier J-C. *Biochimie pathologique*. Flammarion, Paris, 317 p.
- Bonnet, C., Alamigeon, F. & Micheels, P. 2010.** Guide complet des soins esthétiques : du coté de ma vie. Edition Eyrolles, p 14.
- Bounatirou S., Smiti S., Miguel M.G., Faleiro L., Rejeb M.N., Neffati M., Costa M.M., Figueiredo A.C., Barroso J.G. and Pedro L.G. 2007.** Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitalus* Hoff. *Et Link. FoodChemistry* 105 :146-155.
- Bruneton J. 1987.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Technique & documentation, Lavoisier 1ère Édition, Paris.
- Bruneton J. 1993.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Paris : éditions médicales internationales. Editions Tec et Doc Lavoisier.409-417.
- Bruneton J. 2009.** Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4ème éd., revue et augmentée, Tec et Doc. Éditions médicales internationales, Paris : 1288.

Bruneton, J. **1999**. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. (3). Paris.

(C)

Cano, N., Barnoud, D., Schneider, S., Vasson, M.P., Hasselmann, M., Leverve, X. **2007**. Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Paris : Springer-Verlag.

Carocho, M., & Ferreira, I. C. **2013**. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy : natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and futures perspectives. Food and Chemical Toxicology, 51, 15-25.

Carr A., Frei B. **1999**. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions ? The FASEB Journal, 13(9) :1007-1024 p.

Causse C. **2005**. Les secrets de santé des antioxydants, Alpen Edition s.a.m. 95p.

Causse, M., & Renard, C. **2008**. 2. Les sources de variabilité des qualités nutritionnelles des fruits et légumes. Combris P. et al. Les fruits et légumes dans l'alimentation, enjeux et déterminants de la consommation. Paris : Ed Quae, 43-60.

Cavaillon, J. **1993**. Cytokines et inflammation. Veterinary Research. BioMed Central, 24 (4), pp.368-369.

Chanforan, C. **2010**. Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation : études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate. Thèse de Doctorat : Université d'Avignon et des PAYS de Vaucluse.

Chen K., Suh J., Carr A.C., Morrow J.D., Zeind J., Frei B. **2000**. Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. Am J Physiol Endocrinol Metab, vol, 279(6) : 1406-1412 p.

Chun O.K., Kim D O., Moon H Y., Kang H G., Lee C Y. **2003**. Contribution of individual polyphenolics to total antioxidant capacity of plums. J. Agric. Food Chem, 51 : 7240 -7245 p.

Cindrova-Davies, T. **2014**. The therapeutic potential of antioxidants, ER chaperones, NO and H₂S donors, and statins for treatment of preeclampsia. Frontiers in pharmacology, 5.

Cowan, M.M. **1999**. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews, 12 (4), pp 564- 582.

Cristina Popovici, Ilonka Saykova, Bartek Tylkowski. **2009**. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH, Revue de génie industriel, 4, 25-39.

Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. **2006**. Plant Secondary Metabolites : Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd.

(D)

D. Huang, B. Ou, R. L. Prior. **2005**. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J. Agric & Food Chem., 53, 1841-1856.

De Rijke E., Out P., Niessen W M A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U A T. **2006**. Analytical separation and detection methods for flavonoids. Journal of Chromatography A 1112 : 31 - 63.

De S, Das DC, Mandal T. **2016**. *In vitro* antiinflammatory and anti-diabetic activity of methanolic extract of *Cardanthera difformis* druce. International Research Journal of Pharmacy ;7(12) :56-60.

De Sales, P.M., De Souza, P.M., Simeoni, L.A., Magalhaes, P.D., Silveira, D. **2012**. Alphaamylase inhibitors : a review of raw material and isolated compounds from plant source. J. Pharm. Pharm. Sci. 15, 141–183.

Decker A and Welch B. **1990**. Role of ferritin as lipid oxidation catalyst in muscle food. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 36 : 674-677.

Delattre, J., Beaudoux, J. L., Bonnefont-Rousselot, D. **2005**. Radicaux libres et stress oxydant (aspects biologiques et pathologiques). Tec & doc.

Dinis, P., Pineda, M., Aguilar, M. **1999**. Spectrophotometric quantity of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of Vitamin E. Anal. Biochem. 269, 337–341.

Dorman, HJD., Peltoketo, A., Hiltunen, R., Tikkanen, M.J. **2003**. Characterization of the antioxidant properties of deodorized aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. Food Chemistry.83, pp 255-262.

Durand, D., Damon, M., Gobert, M. **2013**. Le stress oxydant chez les animaux de rente : principes généraux. Cahiers de Nutrition et de Diététique, 48, 218-224.

(E)

Eddouks M, Lemhadri A and Michel JB. **2004**. Caraway and caper : Potential anti-hyperglycaemic plants in diabetic rats. J Ethnopharmacol. 94 : 143–148.

Eddouks M, Lemhadri A and Michel JB. **2005**. Hypolipidemic activity of aqueous extract of *Capparis Spinosa* L. in normal and diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology. 98 : 345–350.

Ellis, G.P. **2009**. The chemistry of heterocyclic compounds, chromenes, chromanones, and chromones. John Wiley & Sons, USA.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherston, R.M. **1961**. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88–95.

Encyclopédie Larousse des plantes médicinales. **2001**. Ed. Larousse, HongKong, 7-52.

Epifano, F., Genovese, S., Menghini, L., Curini, M. **2007**. Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry*, 68, 939-953.

(F)

Fain, O. **2004**. Mise au point : Carences en vitamine C. La revue de médecine interne 25, 872–880.

Favier, A. **1997**. Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. In Annales de biologie clinique. 55, 9-16

Favier, A. **2003**. Le stress oxydant. L'actualité chimique, 108.

Fernandes, A. A. H., Novelli, E. L. B., Okoshi, K., Okoshi, M. P., Di Muzio, B. P., Guimarães, J. F. C., & Junior, A. F. **2010**. Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. Biomedicine & Pharmacotherapy, 64(3), 214–219.

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

François Nsemi MUANDA, **2010**. Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. HAL :47-49. <https://hal.univ-lorraine.fr>

Frantisek, S., **1992**. Plantes medicinales : Ed Grund Paris (5p).

(G)

Gadgoli C and Mishra SH. **1999**. Antihepatotoxic activity of p-methoxy benzoic acid from *Capparis Spinosa*. *J. Ethnopharmacol.* 66 :187–192.

Gardès-Albert M. et Jore D. **2005**. "Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l'oxygène." Radicaux libres et stress oxydant. Paris, Lavoisier, 1-23 p.

Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D. **2003**. Espèce réactive de l'oxygène. L'actualité Chimique. 91-96.

Gaussen, H., Leroy, H.F. **1982**. Précis de botanique, végétaux supérieurs, 2eme Ed., 426.

Geissamn, T.A. **1972**. Biosynthesis. Royal Society of Chemistry, England.

Ghazghazi H., Aouadhi C., Maaroufi A., Hasnaoui B. **2013**. Comparaison des contenus en polyphénols et de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques de quatre plantes collectées du Nord de Tunisie. *Microbiol. Hyg. Alim.* 25 (73) : 37-41.

Ghedadba N, Bousselsela H, Hambaba L, Benbia S, Mouloud Y. **2014**. Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Phytothérapie* 12 : 15–24.

Ghedira, K. **2005**. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 4 : 162-169.

Goto M., Ueda K., Hashimoto T., Fujiwara S., Matsuyama K., Kometani T., Kanazaw K. **2008**. A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2'-déoxythymidine. *Free Radical Biology and Medicine*, 45 : 1318-1325 p.

Goudable, J. & Favier, A. **1997**. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 11,115-120.

Gray, D.M. **1995**. Carbohydrate digestion and absorption – role of small intestine. *N. Engl. J. Med.* 29, 1225–1230

Gülçin İlhami. **2012**. Antioxidant activity of food constituents : an overview. *Arch Toxicol* 86 :345–391.

(H)

Hadbaoui, Z. **2012**. Evaluation de l'activité antioxydante des fractions lipidiques, protéiques et phénoliques de sorgho et de mil locaux. Thèse de Doctorat : Université de Kasdi Merbah Ouarglaalgerie.

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 : Université de Lorraine.

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. **2007**. Le stress oxydant. *Revue Medicale de Liege*, 62, 628-38.

Halliwell B., J. M. C. Gutteridge. **2008**. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Fourth Edition. Oxford University Press. Citer dans la Thèse de Doctorat (2015) : Implication du stress oxydant dans plusieurs affections du cheval athlète : revue bibliographique, 44-61 p.

Hamilton Raven P., Franklin Evert R., et Eichhorn S. E. **2000**. *Biologie Végétale*, Paris, 944 p

Hanson, J. R. **2003**. *Natural products : the secondary metabolites* (Vol. 17). Royal Society of Chemistry.

Harborne, J.B. **1980**. Secondary Plant Products. *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol 8, Bell EA, Charlwood BV, eds, *Springer-Verlag, Berlin*, pp.329-402. In : Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique.

Hartmann, T. **2007**. From waste products to ecochemicals : fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68, 2831-2846

Heller R., Esnault R., Lance C. **2011**. *Physiologie végétale*. Dunod (ed.). Paris. P323.

Hemingway, R.W., Laks., P.E., Branham., S.J. **1992**. *Plant polyphenols : Synthesis, properties, sinificance*. Springer Science & Busines Media, Germany.

Herrera, E., & Barbas, C. **2001**. Vitamin E : action, metabolism and perspectives. *Journal of physiology and biochemistry*, 57, 43-56.

Higashi, Y., Noma, K., Yoshizumi, M. et Kihara, Y. **2009**. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ. J*, 73 : 411-418 p.

Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M., 2002. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions.*, 139, pp 1-21.

Huang D, Ou B and Prior R L **2005**. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistiy*, 53, 1841-1856.

Huang, T.T. **2001**. Genetic modification of prenatal lethality and dilated cardiomyopathy in Mn superoxide dismutase mutant mice. *Free Radic. Biol. Med* 31 : 1101-1110 p.

(I)

Ibrahim A. Y., Youness E. R., Shalaby A. S., Magd El-Din M. **2016**. Anti-acetylcholinesterase, anti-inflammatory and anti-oxidant activities of *Mentha longifolia* for treating Alzheimer disease. *Scholars Research Library Der Pharmacia Lettre*. 8 (7) : 34-39.

Inocencio C, Rivera D, Alcaraz F and Tomás-Barberán FA. **2000**. Flavonoid content of commercial capers (*Capparis Spinosa*, *C. sicula* and *C. orientalis*) produced in mediterranean countries. *Eur Food Res Technol*. 212 : 70–74.

(J)

Jacob, L. **2007**. *L'insuffisance rénale aiguë*. Edition Springer, p 88.

Jacobson RL and Schlein Y. **1999**. Lectins and toxins in the plant diet of *Phlebotomus papatasi* Diptera : Psychodidae) can kill *Leishmania major* promastigotes in the sandfly and in culture. *Ann Trop Med Parasitol*. 93(4) : 351-356.

Jacques-Paul, B., Jean-Claude, M., Georges, B. **1988**. Inflammation, collagène et radicaux libres oxygénés. Laboratoire de biochimie, UA Cnrs 610, faculté de médecine, 51, rue Cognacq-Jay, 51095 Reims, France. Médecine/sciences, 19 88 ; 5 : 304-310.

Jarald E, Balakrishnan S, Chandra J. **2008**. Diabetes and Herbal Medicines. Iranian J. pharmacology et therapeutics, p : 97-106.

Jauniaux, E., & Burton, G. J. **2016**. Le rôle du stress oxydant dans les pathologies placentaires de la grossesse. Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction, 45, 775-785.

Jeong SM, Kim SY, Kim DR, et al. **2004**. Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from Citrus peels. J Agric Food Chem 52 :3389–93.

Jiang, H.E., Li, X., Ferguson, D.K., Wang, Y, F., Liu, C, J., Li, C.S. **2007**. The discovery of *Capparis spinosa* L. (*Capparidaceae*) in the Yanghai Tombs (2800 years b.p.), NW China, and its medicinal implications. Journal of Ethnopharmacology : 113 ; pp 409-420.

Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. **2002**. Botanique systématique : une perspective phylogénétique. De Boeck Supérieur

Jutiviboonsuk A., Zhang H., Tan T.G., Ma C., Van Hung N., Cuong N.M., Bunyapraphatsara N., Soejarto D., Fong H S. **2005**. Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis*. Phytochemistry 66 : 2745 - 2751.

(K)

Kadik, B. **1986**. In : Biofacteurs de développement du Câprier épineux (*Capparis spinosa* L.) en Algérie. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar ; Annaba.2015, 212 p.

Kadri Adel, Zarai Zied, Békir Ahmed, Gharsallah Néji, Damak Mohamed, Gdoura Radhouane. **2011**. Chemical composition and antioxydant activity of *Marrubium vulgare* L essential oil from Tunisia. Afr J Biotechnol 10(19) : 3908–14.

Kalantari H, Hossein Foruozaandeh, Mohammad Javad Khodayar, Amir Siahpoosh, Najmaldin Saki, Parvin Kheradmand. **2017**. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Capparis spinosa* L. fractions and quercetin on tert-butyl hydroperoxide- induced acuteliver damage in mice. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Ahvaz Jundishapur University of Medical Science, Ahvaz, Iran.

Kamal Fadili ; Hannou Zerkani ; Smail Amalich et Touriya Zair. **2017**. Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des feuilles et des fruits du *Capparis spinosa* L. American Journal of Innovative Research and Applied Sciences. ISSN 2429-5396 I.

Kandikattu K, Bharath Rathna Kumar P, Venu Priya R, Sunil Kumar K, Ranjith Singh. B. Rathore. **2013**. Evaluation of anti-inflammatory activity of *canthium parviflorum* by in-vitro method. Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology; 1(5): 729-730.

Kandouli C, Mathieu Cassien, Anne Mercier, Caroline Delehedde, Emilie Ricquebourg, et al. **2017**. Antidiabetic, antioxidant and anti inflammatory properties of water and n-butanol soluble extracts from Saharian *Anvillea radiata* in high-fat-diet fed mice. Journal of Ethnopharmacology, Elsevier.

Kandouli, C. **2018**. Etude des propriétés antidiabétiques, antioxydantes et antiinflammatoires des extraits hydrosolubles d'*Anvillea radiata* Coss. & Dur. Sur le diabète de type 2 expérimental induit par le régime (high fat) chez la souris C57/BL6J.

Karnouf, N. **2009**. Effet des extraits de *Capparis spinosa* L. sur la dégranulation et le chimiotactisme des neutrophiles humains. Mémoire de magister. Université de Farhat Abbas ; Sétif. 2010, 99p.

Karthik, K., Bharath, R.P., Venu Priya, R., Sunil Kumar, K., Ranjith Singh, B., Rathore. **2013**. Evaluation of anti-inflammatory activity of *canthium parviflorum* by *in vitro* method. Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology 2320 – 3471.

Katalinic V, Milos M, Kulisic T, Jukic M. **2006**. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. Food Chemistry, 94 : 550–557.

Kemassi Abdellah. **2014**. Toxicité comparée des extraits d'*Euphorbia guyoniana* (Stapf.) (Euphorbiaceae), *Cleome arabica* L. (Capparidaceae) et de *Capparis spinosa* L. (Capparidaceae) récoltés de la région de Ghardaïa (Sahara septentrional) sur les larves du cinquième stade et les adultes de *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Orthoptera-Cyrtacanthacridinae). Thèse de doctorat. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Département des Sciences Biologiques. Université Kasdi Merbah-Ouargla.

Kloutusos, G., Balatsouras, D.G., Kaberos, A.C., Kandiloros, D., Ferekidis, E., Economou, C. **2001**. Upper airway edema resulting from use of Ecballium elaterium, Laryngoscope :111 ; pp 1652-1655.

Koleva I. I., van Beek T. A., Linssen J. P., de G. A., & Evstatieva L. N. **2002**. Screening of plant extracts for antioxidant activity : a comparative study on three testing methods. Phytochem.Anal. 13 : 8-17.

Kovacs, P., Stumvoll, M. **2005**. Fatty acids and insulin resistance in muscle and liver. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 19(4), 625-635.

Krentz, A.J., Bailey, C.J. **2005**. Oral antidiabetic agents : current role in type 2 diabetes mellitus. Drugs 65, 385–411.

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

Kumaran A, Karunakaran RJ. **2007**. *In vitro* antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from india. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie 40 :344–52.

(L)

Lacolley, P. **2007**. Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux. Edition John Libbey Eurotext, p 312.

Lambert J., Heath S., Even G., Champion D., Sleegers K., Hiltunen M., Combarros O., et al. **2009**. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. Nature Genetics, 41 : 1094–1099 p.

Lee, Y. M., Gweon, O. C., Seo, Y. J., Im, J., Kang, M. J., Kim, M. J., Kim, J. I. **2009**. Antioxidant effect of garlic and aged black garlic in animal model of type 2 diabetes mellitus. Nutrition research and practice, 3, 156-161.

Lemhadri A, Eddouks M, Sulpice T and Burcelin R. **2007**. Anti-hyperglycaemic and anti-obesity effects of *Capparis spinosa* and *Chamaemelum nobile* aqueous extracts in HFD mice. Am. J. Pharmacol. Toxicol. 2(3) : 106–110.

Lemmi Cenna, T., Rovesti, P. **1979**. Ricerche sperimentali sull'azione cosmetologica delcappero. Rivista italiana di Essenze, Profumi. Piante officinali, Aromatizzanti, Syndets, Cosmetici, aerosols : 1 ; pp 2-9.

Letonturier, P. **2002**. "Growing old gracefully." Pour un vieillissement réussi. 31,1173.

Levrant, J., Iwase, H., Shao, Z. H., Hoek, T. L. V., Schumacker, P. T. **2003**. Cell death during ischemia : relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 284, 549-558

Limmongkon, A., Janhom, P., Amthong, A., Kawpanuk, M., Nopprang, P., Poohadsuan, J., Somboon, T., Saijeen, S., Surangkul, D., Srikummool, M. **2017**. Antioxidant activity, total phenolic, and resveratrol content in five cultivars of peanut sprouts. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.

Lisu, W., Jui-Hung, Y., Hsiao-Ling, L., Ming-Jiuan, W. **2003**. Antioxidant effect of methanol extracts from Lotus Plumage and Blossom (*Nelumbo nucifera* Gertn), Journal of food and drug analysis, 11, 60-66.

Liu X, J. Zhao, R. Zheng, Mutat. Res. 539. **2003** 1.

(M)

Macheix JJ, Fleuriet A., Billot J. **1990**. Fruit phenolics. CRC Press, Boca Raton.

Macheix, J.-J., Fleuriet, F. & Jay-Allemand, C. **2005**. Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes pp 121-216

Mahmoudi, Y. **1992**. La thérapeutique par les plantes : Ed Palais du livre. Blida (128p).

Maire, R. **1965**. Flore de l'Afrique du Nord, Volume XII, Encyclopédie biologique.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jime'nez L. **2003**. Polyphenols : food sources and bioavailability. American Journal of Clinical Nutrition. 79 : 727-47.

Meddour. A ; Yahia. M ; Benkiki. N ; a. Ayachi. A. **2011**. Étude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *Capparis spinosa* L. Lebanese Science Journal, Vol. 14, N° 1.

Merghem R. **2009**. Eléments de biochimie végétale. Edition Bahaeddine : 111-132.

Mohammedi Z. **2013**. Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie.

Mostafa Selfayan et Foroogh Namjooyan. **2016**. Inhibitory Effect of Capparis spinosa Extract on Pancreatic Alpha-Amylase Activity. Zahedan J Res Med Sci ; 18(4):e6450.

(N)

Nabavi et al. **2016**. Pharmacological Effects of Capparis spinosa L. Phytotherapy research. Phytother Res.

Naidu, K. A. **2003**. Vitamin C in human health and disease is still a mystery ? An Overview. Nutrition Journal 2 (7), 1-10.

Nakajima, K., Nakano, T., Tanaka, A. **2006**. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis : the comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. *Clinica Chimica Acta*, 367, 36-47.

Nicholls, P. **2012**. Classical catalase : Ancient and modern. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 525, 95–101.

Nicolas AMELOT. **2010**. Couplage entre signalisation calcique et modulation du transcriptome en réponse à la cryptogène chez des cellules de tabac. Thèse :42-43

Noailles MC. **1965**. L'évolution Botanique. Ed. Du Seuil, Le Rayon De La Science, France. 73 P.

(O)

Orban, J. C. **2010**. Oxygène, stress oxydant. Désordres métaboliques et réanimation. Springer, 427-437.

Orhan I., Kartalb M., Kanc Y., Senner B. **2004**. Activity of essential oils and individual components against acetyl and butyrylcholinesterase. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*. 63 : 547-553.

Ortuño, A., Báidez, A., Gómez, P., Arcas, M. C., Porras, I., García-Lidón, A., Del Rio, J. A. **2006**. Citrus paradisi and Citrus sinensis flavonoids : Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry*, 98, 351-358.

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

Ozenda P. **1991**. Flore et végétation du Sahara. Ed. CNRS, 3ème édition augmentée, Paris : 662 p.

Ozenda, P. **1977**. Flore du Sahara, Ed. CNRS., Paris, France, pp 250-259.

Ozenda, P. **1983**. Flore du Sahara, 2è Ed. De CNRS, Paris, 624 p.

Özyürek Mustafa, Kubilay Güçlü, Tütem Esmâ, Kevser Sözgen Başkan, Erol Erçag, S. Esin çelik, Baki Safa, Yildiz Leyla, Karaman Seyda, Apak Resat. **2011**. A comprehensive review of CUPRAC methodology, *CRITICAL REVIEW*, 3, 2439.

(P)

Packer, J. E., Mahood, J. S., Mora-Arellano, V. O., Slater, T. F., Willson, R. L. & Wolfenden, B. S. **1981**. Free radicals and singlet oxygen scavengers : reaction of a peroxy-radical with bêta-carotene, diphenyl furan and 1,4-diazobicyclo (2,2,2)-octane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98, 901-906.

Panico AM, Cardileb TV, Garufia F, Pugliaa C, Bonina F and Ronsisvalle G. **2005**. Protective effect of *Capparis Spinosa* on chondrocytes. *Life Sciences*. 77 : 2479–2488.

Paredi P., Kharitonov S.A., Barnes P.J. **2002**. Analysis of expired air for oxidation products. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 166, (supplement 1), 31–37 p.

Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Saavedra, G., Murcia, M. A., Codina, C. **2003**. Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life Sciences*, 73, 1667-1681.

Park, H. H., Lee, S., Son, H. Y., Park, S. B., Kim, M. S., Choi, E. J., Hyun, M. C. **2008**. Flavonoids inhibit histamine release and expression of pro inflammatory cytokines in mast cells. *Archives of pharmacal research*, 31, 1303-1311.

- Penchev, P., Angelov, G., Condoret, J.S. **2010**. Extraction des agents antioxydants (acide rosmarinique) à partir de la mélisse (*Melissa officinalis* L.). *Revue de Génie Industriel*, 5, pp 115- 123.
- Pereira Nunes X, Souza Silva F., Alneida J.R.G. et al. **2012**. Biological Oxidations and Antioxidant Activity of Natural Products. Chapter1. In “phytochemicals as Nutraceuticals Global Approaches to Their Role in *Nutrition and Health*”. 1ère édition Venketeshwer Rao : 1-20
- Pernet, R. **1972**. Les Capparidacées. *Plantes Médicinales et phytothérapie* : 6 (1) : pp 68- 77.
- Picchi A. **2006**. Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome. *Circ. Res*, 99 : 69-77 p.
- Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne J. **1999**. L'évaluation du stress oxydatif d'un individu, une réalité pour le médecin : *Vaisseaux, Coeurs, Poumons*. Edition : CRC PRESS, 4(5) : 12-23.
- Pincemail J. et Defraigne J.O. **2004**. Les antioxydants : un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène, Symposium « antioxydant et alimentation » institut Danone. 23/10/2004. Cité dans le Mémoire de Doctorat (2015) Etude chimique et bibliographique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de Côte D'ivoire, 17-18 p.
- Pincemail, J. & Defraigne, J.-O. **2003**. Le CoEnzyme Q10 ou ubiquinone : un antioxydant particulier. *Vaisseaux, Coeur, Poumons* 18 (2), 55-60.
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O. **2008**. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydant. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16, 233-239.
- Powers S. K., Jackson M. J. **2008**. Exercise-induced oxidative stress : cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Reviews*, 88(4) : 1243-1276 p.

(R)

- Raman, Arjun V., and Marla J. Berry. **2011**. Selenoproteins in cellular redox regulation and signaling. *Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates : Molecular Aspects of Cell Signaling*, 195-208 p.
- Ramirez DC. Gomez-Mejiba SE. Corbett JT., Deterding LJ. Tomer KB. Mason RP. **2008**. Cu/Zn-Superoxide Dismutase-driven Free Radical Modifications : Copper- and Carbonate Radical Anion-initiated Protein Radical Chemistry. *Biochemical Society*, 10 : 1-25 p.
- Rao, C. V., & Vijayakumar, M. **2008**. Effect of quercetin, flavonoids and α -tocopherol, an antioxidant vitamin on experimental reflux oesophagitis in rats. *European journal of pharmacology*, 589, 233-238.
- 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 Bio. Med.* 26, 1231–1237.
- Roberts, J.C. **1996**. *The chemistry of paper*. Royal Society of Chemistry, England.
- Roden, M., Price, T. B., Perseghin, G., Petersen, K. F., Rothman, D. L., Cline, G. W. & Shulman, G. I. **1996**. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *Journal of Clinical Investigation*, 97(12), 2859-2865.
- Rodriguez-Amaya, D. B. & Kimura, M. **2004**. *Harvestplus handbook for carotenoid analysis*. Technical Monograph Series, p 3.
- Roméo V, Ziino M, Giuffrida D, Conduro C and Verzera A. **2007**. Flavour Profile Of Capers (*Capparis Spinosa* L.) From The Eolian Archipelago By HS-SPME/GC-MS. 101(3) : 1272-1278.

Ross, R. **2014**. Polyphenols in plants : Isolation, purification and extract preparation. Academic Press, USA.

Roux D. et Catier O. **2007**, Botanique, pharmacognosie, phytothérapie, France, 141p.

(S)

Salehi, P., Asghari, B., Esmaeili, M.A., Denghan, H., Ghazi, I. **2013**. Glucosidase and amylase inhibitory effect and antioxidant activity of ten plant extracts traditionally used in Iran for diabetes. *J. Med. Plants Res.* 75, 257–266.

Sánchez-Moreno, C. **2002**. Review : Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Revista de Agaroquímica y Tecnología de Alimentos*, 8, 121-137.

Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., Saura-Calixto, F. **1998**. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276.

Santhakumar A. B., Battino M., Alvarez-Suarez J. M. **2018**. Dietary polyphenols : Structures, bio-availability and protective effects against atherosclerosis. *Food and Chemical Toxicology*. 113 : 49-65.

Sarikurkcü C., Ozer M. S., Eskici M., Tepe B., Can S. and Mete E. **2010**. Essential oil composition and antioxidant activity of *Thymus longicaulis* C. Presl subsp. *Longicaulis* var. *longicaulis*. *Food and Chemical Toxicology*, 48 : 1801-1805.

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

Satyanarayana T, Anjana AM and Vijetha P. **2008**. Phytochemical and Pharmacological Review of Some Indian *Capparis* Species. *Pharmacognosy Reviews [Phcog Rev.]*. 2 (4) : 36-45.

Scalbert, A. **1991**. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30, pp 3875-3883. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83426-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83426-L).

Segnou, F.C.A., Akoroda, M., Hahn, S. **1992**. Studies on the reproductive biology of white yam (*Dioscorea rotundata*). *Euphytica*, 64 (3), p 197.

Shi H and E. Niki, **1998**. *Lipids* 33 ,365.

Shi H, Noguchi N, Niki E. **2001**. Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity. *Methods Enzymol* ; 335 :157-66.

Shulman, G. **2000**. Cellular mechanism of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 106(2), 171-176.

Shulman, G., Rothman, D., Shulman, R. & Brindle, K. **1990**. ¹³C NMR studies of glucose disposal in normal and non-insulin-dependent diabetic humans [and discussion]. *Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London. Series A : Physical And Engineering Sciences*, 333(1632), 525-529.

Singleton V. L., Orthofer R., & Amuela-Raventos R. M. **1999**. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299 : 178.

Sowndhararajan, K., Joseph, J.M., Rajendrakumaran, D. **2012**. *In vitro xanthine oxidase* inhibitory activity of methanol extracts of *Erythrina indica* Lam. Leaves and stem bark. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2, S1415-S1417.

Stalikas C. D. **2007**. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* 30 : 3268-3295.

Stickel, F., Schuppan, D., Seitz, HK. **2000**. Herbal medicine in the treatment of liver diseases. *Digestive and Liver Disease* : 862 ; pp 120-849.

Strang, C. **2006**. Larousse médical : Ed Larousse (26p).

Szydłowska-Czerniaka A, Dianoczki C, Recseg K, Karlovits G, Szlyk E. **2008**. Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*; 76: 899-905.

(T)

Talbi H., Boumaza A., El-mostafa K., Talbi J., Hilali A. **2015**. Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L.). *Mater. Environ. Sci.* 6 (4) : 1111-1117.

Thanan, R., et al. **2014**. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *International journal of molecular sciences*, 16, 193-217.

Topçu G., Ay A., Bilici A., Sarıkürkcü C., Öztürk M., and Ulubelen A. **2007**. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry* 103: 816–822.

(U)

Ulanowska, K., Tkaczyk, A., Konopa, G., Węgrzyn, G. **2006**. Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Archives of Microbiology*, 184, 271-278.

Usher-Smith JA, Thompson M, Ercole A, Walter FM. **2012**. Variation between countries in the frequency of diabetic ketoacidosis at first presentation of type 1 diabetes in children : a systematic review. *Diabetologia*, **55**(11) :2878–94.

(V)

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M., Telser J. **2007**. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39 (1) : 44-84.

Valko M., Omova K.J. **2011**. Free Radicals, Signal Transduction, and Human Disease. *Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates : Molecular Aspects of Cell Signaling*, 17-32 p.

Vertuani, S., Angusti, A. et Manfredini, S. **2004**. The antioxidants and pro-antioxidants network : an overview. *Curr. Pharm. Des* 10 : 1677-1694 p.

Virally, M., Blicklé, J.-F., Girard, J., Halimi, S., Simon, D. & Guillausseau, P.-J. **2007**. Type 2 diabetes mellitus : epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. *Diabetes & Metabolism*, 33(4), 231-244.

Viuda-Martos M., Navajas Y. R., Zapata E. S., Fernández-López J. and Pérez-Álvarez J. A. **2010**. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *FlavourFragr. J.*, 25 : 13-19.

Vladimir-Knežević S., Blažeković B., Kindl M., Vladić J., Lower-Nedza A. D., Brantner A. H. **2014**. Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the Lamiaceae Family. *Molecules*. 19 : 767-782.

Volak. J et Stodola, J. **1983**. Plantes médicinales : Ed Artia Prague (2,312p).

(W)

Wassmann, S., Wassmann, K. et Nickenig, G. **2004**. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*, 44 : 381-386 p.

Wiell, B & Batteux, F. **2003**. "Immunologie et réactions inflammatoire". 1ère édition Bruxelles, p : 12-24.

Yaniv Z, Dafni A, Friedman J and Palexitch D. **1987**. Plants Used For The Treatment Of Diabetes In Israel. *Journal Of Ethnopharmacology*. 19 : 145-151.

(Y)

Yoshimoto, M., Sakamoto, H., Yoshimoto, N., Kuboi, R., Nakao, K. **2007**. Stabilization of quaternary structure and activity of bovine liver : Catalase through encapsulation in liposomes. *Enzyme and Microbial Technology*. 41, 849–858.

(Z)

Zeggwagh NA, Michel JB, Sulpice T and Eddouks M. **2007**. Cardiovascular Effect of *Capapris spinosa* Aqueous Extract in Rats. Part II : Furosemide-like Effect of *Capparis Spinosa* Aqueous Extract in Normal Rats. *Am. J. Pharmacol. Toxicol*. 2(3) : 130–134.

Zeghad N. **2008**. Etude du contenu poly phénolique de 2 plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Thèse de magister. Université Mentouri Constantine.

Zengin G et al. **2014**. A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products* 53, 244–251.

Zhang, H., & Forman, H. J. **2012**. Glutathione synthesis and its role in redox signaling. In *Seminars in cell & developmental biology*. 23, 722-728.

Sites web consultés

<https://www.google.com/intl/fr/earth/>. Consulté le 2/06/2019.

Anneves

Annexe 1

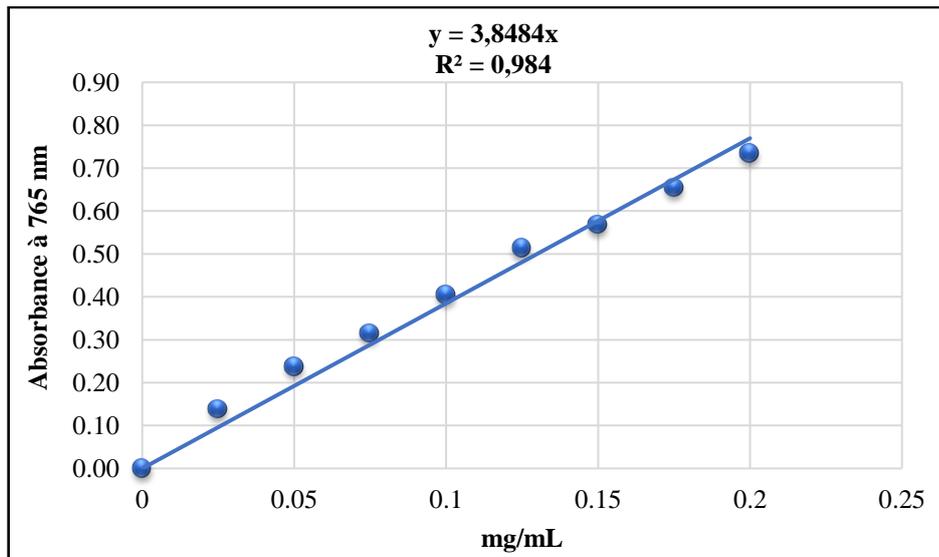


Figure : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

Annexe 2

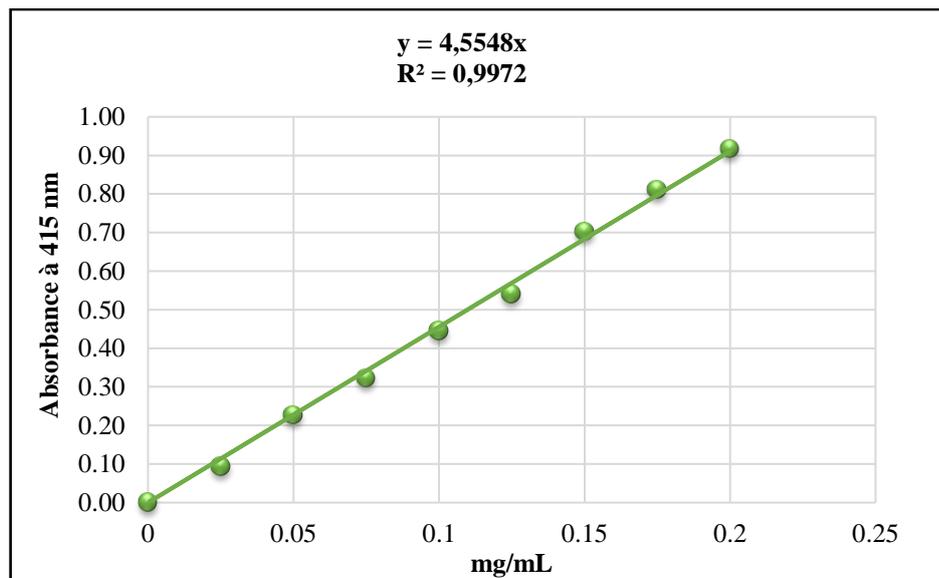


Figure : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.

Annexe 3

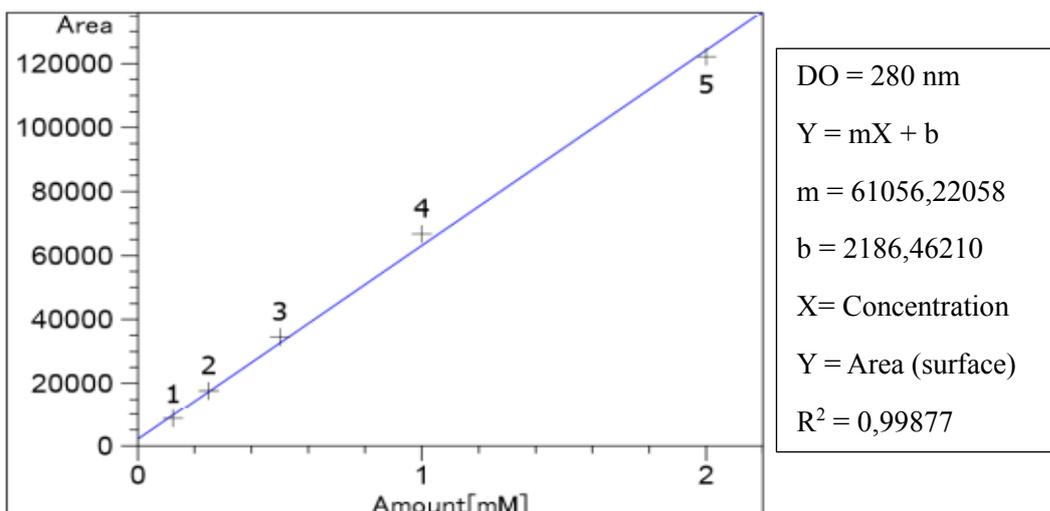


Figure : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des dérivés hydroxybenzoïques.

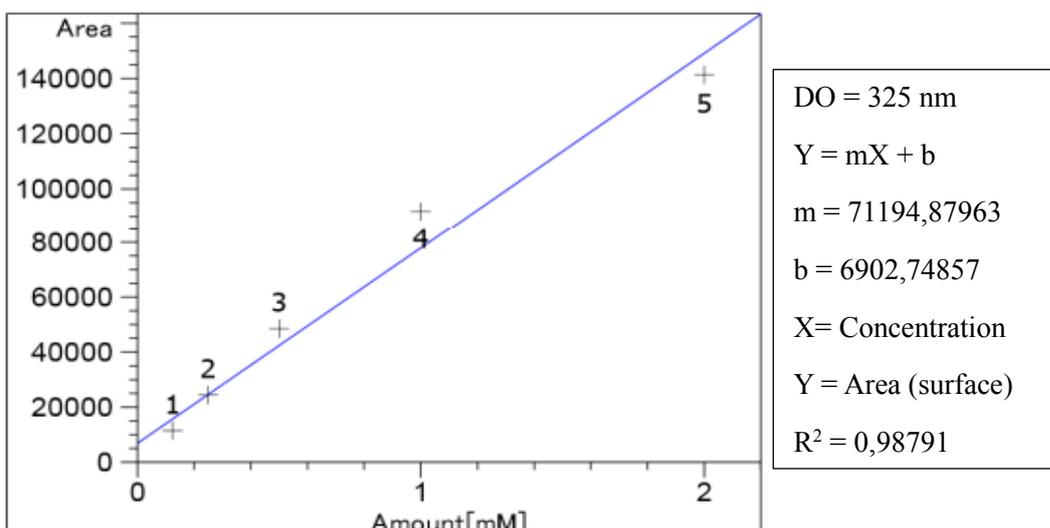


Figure : Courbe d'étalonnage de l'acide caféique pour le dosage des dérivés hydroxycinnamique.

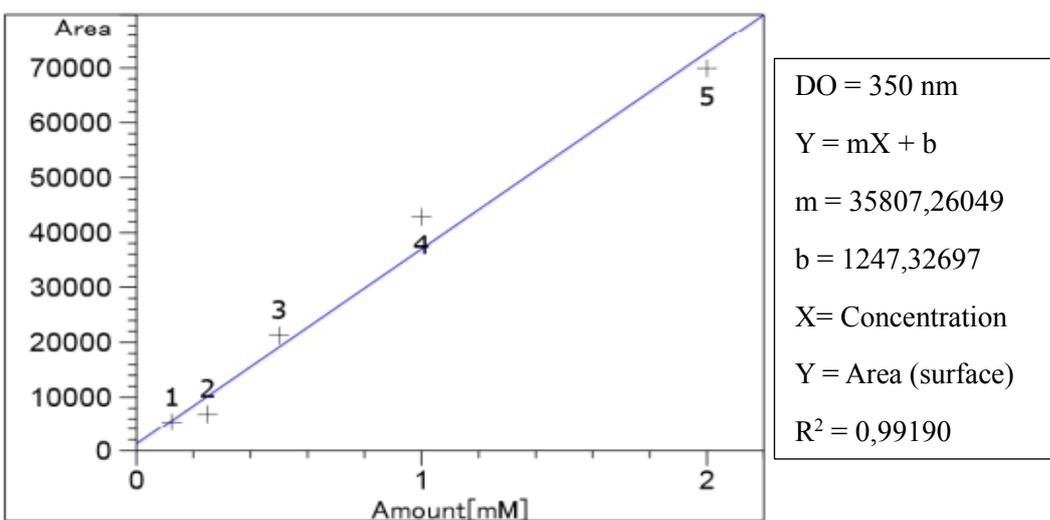


Figure : Courbe d'étalonnage de la rutine pour le dosage des flavonoïdes.

Annexe 04 : Préparation de la DPPH

Dissoudre 6 mg de DPPH 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.

Annexe 05 : Préparation des Solutions de l'activité anti diabétique

Solution de l'HCl 1M : Ajouter doucement à 45.83 ml d'eau, un volume de 4.17 ml d'HCl pure.

Solution IKI : Dissoudre 3 gr de KI dans 100 ml d'eau ; puis ajouter 127 mg d'iode (5mM) nous avons agité jusqu'à la dissolution complète.

Annexe 06 : Préparation des Solutions de l'activité anti diabétique

Solutions d'enzyme de l'alpha-glucosidase (0.1 U/ml) : Dissoudre 1 mg d'enzyme alpha-glucosidase dans 10 mL de tampon phosphate 100 mM, pH 6,9 (Solution stock) et aliquoter chaque 01 mL dans un Eppendorf.

Solution de substrat (5 mM) : Dissoudre 15.06 mg de substrat dans 10 mL de tampon phosphate, 100 mM, pH 6,9.

Annexe 07 : Préparation de la Solution tampon de l'activité Anti cholinestérase

Dissoudre 8,89 g de ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$) dans 500 mL de H_2O pour obtenir la solution v1, puis dissoudre 1,56 g de ($\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$) dans 100 mL de H_2O pour obtenir la solution V₂, ensuite nous avons mélangé les solutions pour obtenir la solution tampon final.

Annexe 08 : Préparation de DTNB (5,5'-Dithiobis (2-nitro-benzoic acid))

Dissoudre 16 mg DTNB dans 1mL (PH=7), puis nous avons ajouté 7,5 mg NaHCO_3 plus 1 mL (PH=7), 2 ml (ph=7) et 4 mL (ph=8) respectivement.

Annexe 09 : préparation de solution de substrat Aci (Acetylthiocholine iodide)

Dissoudre 16 mg Aci dans 4 mL H_2O et 4 mL tampon (PH=8).

Annexe 10 : préparation des solutions de l'activité CUPRAC

Solution 01 : dissoudre 1,927 g acétate d'ammonium dans 25 mL H_2O .

Solution 02 : dissoudre 0,042625 g de ($\text{CuCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$) dans 25 mL H_2O .

Solution 03 : dissoudre 0,039 g Neocupronin dans 25 mL éthanol.

Annexe 11 : préparation des solutions de l'activité métal chelating

Solution 01 : dissoudre 4mg de (Fe^{+2}) [$0,2 \text{ Mm FeCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$] dans 100 mL H_2O .

Solution 02 : dissoudre 0,5 mL de ferrozinin dans 9,5 mL H_2O .

Annexe 12 : préparation des solutions de l'activité phenanthroline

Solution 01 phenanthroline (0,5%) : 0,05 g de 1,10 phenanthroline dans 10 mL de MeOH.

Solution 02 ferrique chloride (0,2%) : 0,02 g de FeCl_3 dans 10 mL de H_2O .

Annexe 13 : préparation des solutions de dosage des flavonoïdes

Solution 01 : Pour 1 M Potassium acétate (CH_3COOK) on dissolvé 9.80 g de (CH_3COOK) dans 100 mL d'eau distillé.

Solution 02 : Pour 10% nitrate d'aluminium ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3, 9\text{H}_2\text{O}$) on pèse 10 g de ce produit dans 100 mL d'eau distillée.

Annexe 14 : préparation des solutions de dosage des TPC

Préparation de Carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5% : 7,5 g de Na_2CO_3 et sont dissouts dans 100 mL d'eau distillé.

Résumé

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales de la flore algérienne et méditerranéenne, on s'est intéressé à l'étude de l'espèce *Capparis spinosa L.*

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique de l'espèce *Capparis spinosa L* de la famille *Capparidaceae* ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante, anti Alzheimer, anti diabétique et anti-inflammatoire des extraits végétaux obtenus.

L'extraction de différentes fractions (extrait méthanolique, d'éther de pétrole, chloroformique, éthanolique et butanolique) de la partie aérienne du câprier a été accomplie par différents protocoles expérimentaux. L'analyse phytochimique qualitative, réalisée par le dosage total, a confirmé la présence de plusieurs molécules tels que : les polyphénols, les flavonoïdes. L'évaluation quantitative et qualitative par HPLC du contenu en celles-ci dans les extraits de la plante indique la présence de teneurs variables en polyphénols totaux et des flavonoïdes. L'estimation de l'activité antioxydante des différents extraits de *Capparis spinosa L* a indiqué que les deux extraits d'acétate d'éthyle et butanolique de la plante présentent la plus grande activité antioxydante. L'évaluation de l'effet anti Alzheimer des extraits a révélé que les extraits n'avaient aucune activité anticholinestérase. Les extraits EP et MeOH possèdent un pouvoir antidiabétique dose dépendant sur l' α -glycosidase significatif et très significative pour les extraits MeOH, EP, CHCl₃ et ActOH sur l' α -amylase. Nos résultats indiquent également que les extraits MeOH, EP et CHCl₃ de la plante possèdent une activité anti-inflammatoire très significative.

Les résultats obtenus sont très promoteurs pour une utilisation de cette plante dans la médecine moderne.

Mots clés : *Capparis spinosa L*, *Capparidaceae*, antioxydante, anti Alzheimer, anti diabétique, anti-inflammatoire, polyphénols, flavonoïdes, HPLC, α -amylase, α -glycosidase.

Abstract

In the framework of the valorization of the medicinal plants of the Algerian and Mediterranean flora, we were interested in the study of the species *Capparis spinosa L.*

This work is devoted to the phytochemical study of the species *Capparis spinosa L.* of the family *Capparidaceae* as well as of the evaluation of the antioxidant, anti-Alzheimer, anti-diabetic and anti-inflammatory activity of the plant extracts obtained.

The extraction of different fractions (methanolic extract, petroleum ether, chloroformic, ethanolic and butanolic extract) from the aerial part of the plant was performed by different experimental protocols. Qualitative phytochemical analysis, performed by the total assay, confirmed the presence of several molecules such as : polyphenols, flavonoids. The quantitative and qualitative evaluation by CHPL of the content in these extracts of the plant indicates the presence of variables contents of total polyphenols and flavonoids. The estimated antioxidant activity of the various extracts of *Capparis spinosa L.* indicated that the two, ethyl acetate and butanol extracts of the plant had the highest antioxidant activity. The evaluation of the anti-Alzheimer's effect of the extracts revealed that the extracts had no anticholinesterase activity. The EP and MeOH extracts have an antidiabetic dose dependent on the α -glycosidase significant and very significant for the MeOH, EP, CHCl_3 and ActOH extracts on α -amylase. Our results also indicate that the plant's MeOH, EP and CHCl_3 extracts have a very significant anti-inflammatory activity.

The results obtained are very promising for the use of this plant in modern medicine.

Key words : *Capparis spinosa L.*, *Capparidaceae*, antioxidant, anti-Alzheimer, anti-diabetic, anti-inflammatory, polyphenols, flavonoids, HPLC, α -amylase, α -glycosidase.

ملخص

كجزء من تطوير النباتات الطبية من بينها النباتات الجزائرية ونباتات البحر الأبيض المتوسط ، كنا مهتمين بدراسة النوع

Capparis spinosa L.

يُكرس هذا العمل للدراسة الكيميائية النباتية للنوع *Capparis spinosa L* من عائلة *Capparidaceae* وكذلك تقييم النشاط المضاد للأكسدة ومضاد الزهايمر ومضاد السكري ومضاد الالتهابات للمستخلصات النباتية التي تم الحصول عليها.

تم استخراج المستخلصات المختلفة (الميثانول، الأثير البترولي، الكلوروفورميك، الإيثانول واليوتانوليك) من الجزء الهوائي من الكُبار بواسطة بروتوكولات تجريبية مختلفة. بيّن التحليل الكيميونباتي النوعي، الذي أجراه الفحص الكلي، وجود العديد من الجزيئات مثل: البوليفينول والفلافونويد. وقد أكد التقييم الكمي والنوعي بواسطة HPLC للمحتوى الموجود في هذه المستخلصات من النبات إلى وجود محتويات متغيرة من مجموع البوليفينول والفلافونويد. أشار النشاط المضاد للأكسدة المقدر للمستخلصات المختلفة من *Capparis spinosa L* إلى أن المُستخلصين أسيتات الإيثيل واليوتانول في النبات لهما أعلى نشاط مضاد للأكسدة. كذلك، كشف تقييم تأثير مضادات الزهايمر من المقتطفات أن المستخلصات لم يكن لها نشاط مضادات الكولين. أيضا وجد أن مستخلصات EP و MeOH تحتوي على جرعة معتبرة مضادة لمرض السكر تعتمد على كبح α -glycosidase. وكبح مهم للغاية بالنسبة لمستخلصات EP, MeOH, CHCl₃ و ActOH على α -amylase. تشير نتائجنا أيضا أن مستخلصات النبتة CHCl₃, MeOH و EP لديها نشاط كبير جدا مضاد للالتهابات.

النتائج التي تم الحصول عليها واعدة للغاية لاستخدام هذا النبات في الطب الحديث.

الكلمات المفتاحية : *Capparis spinosa L*، *Capparidaceae*، مضادات الأكسدة، مضادات الزهايمر، مضادات السكري، مضاد للالتهابات، البوليفينول، الفلافونويد، HPLC ، ألفا الأميليز، ألفا جليكوسيداز

Année universitaire : 2018 – 2019

Présenté par : - BOUZIANE Khaoula.

- ROUIBAH Loubna.

Titre : Etude des propriétés antioxydantes, antidiabétiques et anti-inflammatoires *in vitro* des extraits de la plante médicinale *Capparis spinosa L (Capparidaceae)*.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du Diplôme de Master en *Biochimie Appliquée*.

Résumé

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales de la flore algérienne et méditerranéenne, on s'est intéressé à l'étude de l'espèce *Capparis spinosa L*.

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique de l'espèce *Capparis spinosa L* de la famille *Capparidaceae* ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante, anti Alzheimer, anti diabétique et anti-inflammatoire des extraits végétaux obtenus.

L'extraction de différentes fractions (extrait méthanolique, d'éther de pétrole, chloroformique, éthanolique et butanolique) de la partie aérienne du câprier a été accomplie par différents protocoles expérimentaux. L'analyse phytochimique qualitative, réalisée par le dosage total, a confirmé la présence de plusieurs molécules tels que : les polyphénols, les flavonoïdes. L'évaluation quantitative et qualitative par HPLC du contenu en celles-ci dans les extraits de la plante indique la présence de teneurs variables en polyphénols totaux et des flavonoïdes. L'estimation de l'activité antioxydante des différents extraits de *Capparis spinosa L* a indiqué que les deux extraits d'acétate d'éthyle et butanolique de la plante présentent la plus grande activité antioxydante. L'évaluation de l'effet anti Alzheimer des extraits a révélé que les extraits n'avaient aucune activité anticholinestérase. Les extraits EP et MeOH possèdent un pouvoir antidiabétique dose dépendant sur l' α -glycosidase significatif et très significative pour les extraits MeOH, EP, CHCl₃ et ActOH sur l' α -amylase. Nos résultats indiquent également que les extraits MeOH, EP et CHCl₃ de la plante possèdent une activité anti-inflammatoire très significative.

Les résultats obtenus sont très promoteurs pour une utilisation de cette plante dans la médecine moderne.

Mots clés : *Capparis spinosa L*, *Capparidaceae*, antioxydante, anti-Alzheimer, anti-diabétique, anti-inflammatoire, polyphénols, flavonoïdes, HPLC, α -amylase, α -glycosidase.

Laboratoire de recherche : CRBT et laboratoire de biochimie (Constantine 1).

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr. KITOUNI Rachid. **(M-C-B-UFM Constantine1)**.

Rapporteur : Mr. BOUANIMBA Nour **(M-C-A-UFM Constantine1)**.

Examineur : Mr. HAROUNI Soufiane **(M-A-A-UFM Constantine1)**.

Date de soutenance : 24/07/2019.

