



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences
de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire :

Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

MEMOIRE

Présenté par

M^{elle} **KHIAL Fadila**

Diplôme de MASTER

En science biologie

Option : Biochimie Appliquée

Thème :

Évaluation de l'activité antioxydante des différentes parties des fruits de *Celtis australis* (micocoulier de Provence) de Tlemcen

Soutenu le : 12/07/2017

devant le jury composé de :

Mme	Boucherit-Otmani Z.	Professeur	Présidente
Mme	KaziTani-Baba Ahmed Z.Z.	M.C.B	Examinatrice
Mme	Merghache-Bouhafsi D.	M.C.B	Promotrice

Année universitaire : 2016 - 2017

Résumé

L'objectif de ce travail vise à réaliser une étude biologique basée sur la recherche d'activité antioxydante, des extraits hydroéthanoliques (écorce, partie charnue et graine) de *Celtis australis*, récoltée dans la région d'Ain fezza, wilaya de Tlemcen.

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH (2,2 diphenyle-1-Picrylhydrazyle), a montré que l'extrait hydroéthanolique préparé par macération possède le pouvoir le plus puissant parmi les trois extraits avec une IC₅₀ de 0,50µg/ml. L'effet inhibiteur de la peroxydation des lipides a montré que les taux d'inhibition de l'écorce, de la partie charnue et des graines sont de 97,5%, 80,52% et (95,9%), respectivement, ces valeurs sont comparable à celle de l'acide ascorbique (87,45%). Ces résultats suggèrent que *Celtis australis* pourrait servir comme source alternative d'agents antiradicalaires pour la protection des êtres humains contre les dommages oxydatifs causés par les radicaux libres.

Mots clés : *Celtis australis*, activité antioxydante, DPPH, activité inhibitrice de la peroxydation lipidique.

Summary

The objective of this work aims at carrying out a biological study based on the search for antioxydant activity, of the extracts hydroethanolic (bark, fleshy and granulates) of *Celtis australis*, collected in the area of Ain fezza wilaya of Tlemcen. The evaluation of the activity antioxydant by the method of DPPH (2.2 diphenyl-1-Picrylhydrazyle), showed that the extract hydroethanolic prepared by maceration has the most powerful power among the three extracts with IC₅₀ of 0.50 µg/ml. The inhibiting effect of the peroxidation of the lipids showed that the rates of inhibition of the bark (97.5%), the fleshy part (80.52%) and granulates (95.9%), these values are comparable with that of the ascorbic acid (87.45%). These results suggest that *Celtis australis* could be useful like alternative source of agents antiradicalaires for protection of the human beings against the oxydative damage caused by the free radicals.

Keywords: *Celtis australis*, antioxydant activity, DPPH, inhibiting activity of the lipidic peroxidation.

ملخص

يهدف هذا العمل إلى انشاء دراسة بيولوجية تعتمد على البحث عن نشاط مضاد للأكسدة للمستخلصات (اللحاء، سمين، البذور) للميس الجنوبي التي تم جمعها من منطقة عين فزة ولاية تلمسان.

كما تعتمد دراسة النشاط المضاد للأكسدة لمختلف المستخلصات بواسطة تثبيط الجذر الحر DPPH ، حيث أن المستخلص الكحولي المائي للأجزاء المحضرة بالنقع البارد يمثل النشاط الأكبر بالنسبة للمستخلصات الثلاثة $IC_{50} = 0,50$ مكغ /ملل.

وقد أظهرت نتائج تأثير مثبت البيروكسيد بأن معدل اللحاء هو 97,5% وجزء سمين هو 80,52% والبذور هو

95,9 %.

تشير هذه النتائج إلى أن نبات الميس الجنوبي بإمكانه أن يكون بمثابة مصدر بديل لمضادات الأكسدة لحماية الإنسان ضد الأمراض المعدية والضرر التأكسدي الذي تسببه الجذور الحرة.

الكلمات المفتاحية: الميس الجنوبي، النشاط المضاد للأكسدة، DPPH، بيروكسيد الدهون.

Table des matières

Première partie : Synthèse bibliographique.....	1
Deuxième partie : Matériel et méthodes.....	6
1. Préparation du matériel végétal.....	7
1.2. Extraction du matériel végétal.....	8
2. Evaluation de l'activité antioxydante de différentes parties des fruits de <i>Celtis australis</i>	8
2.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).....	8
2.1.1. Principe.....	8
2.1.2. Mode opératoire.....	9
2.1.3. Calcul des IC ₅₀ et de l'activité antiradicalaire.....	9
2.2. Inhibition de la peroxydation lipidique par la méthode au thiocyanate ferrique (FTC).....	10
2.2.1. Mode opératoire.....	10
Troisième partie : Résultats et discussion.....	11
1. Résultats.....	12
1.1. Les rendements des extraits de 3 parties de fruits de <i>Celtis australis</i>	12
2. Evaluation de l'activité antioxydante.....	12
2.1. Etude de l'activité antioxydante par la méthode de piégeage du radical libre DPPH.....	12
2.2. Calcul des IC ₅₀	14
2.3. Activité inhibitrice de la peroxydation lipidique.....	15
Discussion	16
Quatrième partie : Conclusion générale	19
Cinquième partie : Références bibliographiques.....	21

Remerciement

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force, le courage, la volonté et surtout la patience pour pouvoir réaliser ce travail.

Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance et gratitude à Madame **Mme Merghache-Bouhafsi D.**, maître de conférences classe B au département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen. D'avoir accepté de diriger ce travail, pour ses conseils et ses encouragements.

J'adresse également ma profonde reconnaissance et mes respects à Madame **Boucherit-Otmani Z.**, professeur au département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen, et directrice de Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, sa disponibilité, sa grande patience, sa gentillesse et ses conseils judicieux tout au long de mon cursus et pour avoir accepté de présider le jury.

Je tiens à remercier **Mme KaziTani-Baba Ahmed Z.Z.**, maître de conférences classe B au département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen, qui m'a fait l'honneur d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier tous les enseignants du Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen, qui ont veillé sur notre formation.

Mes vifs remerciements s'adressent également aux dirigeants et aux personnels du laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique, qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

J'exprime, enfin et surtout, ma plus profonde gratitude et toute ma famille, qui a su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances, ainsi qu'à tous mes proches amis qui m'ont toujours soutenu et encouragé même dans les périodes les plus difficiles.

Dédicaces

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...?.

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

Ainsi, c'est tout simplement que Je dédie ce mémoire :

- *A mes très chers parents, les prunelles de mes yeux.*

- *A ma mère **Fatima** qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau. Ni sacrifices, ni privatisations ne l'ont empêché d'accomplir son devoir de mère soucieuse de l'avenir de ces enfants.*

- *A mon cher papa **Mouhammed** qui a su se montrer patient, compréhensif et encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort. Veuillez trouver ici, le témoignage de mon amour éternel. Que dieu vous procure santé, prospérité et bonheur...*

- *A ma sœur **Latifa** et mon frère **Abdelhafid** que dieu vous garde et vous protège que votre chemin soit plein succès.*

- *A toute ma famille*

- *A mes chéries **Wahiba, Imane, Samia, Samia, Nadia, faiza, Amina**, pour leur aide et leur soutien que dieu vous protège et vous préserve.*

- *A toutes les personnes qui m'ont aidée à réaliser ce travail.*
- *A mes collègues de promotion Master Biochimie appliquée*

Liste des abréviations

ABTS	:	2, 2'-Azinobis (3-ethylbenzotriazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt
AlCl ₃	:	Chlorure d'aluminium.
CHCl ₃	:	Chloroforme.
DMSO	:	Diméthylsulfoxyde.
DPPH	:	2, 2'- diphenyl-1- picrylhydrazyle.
ERO	:	Espèces réactives de l'oxygène.
FeCl ₂	:	Chlorure de fer(II).
FTC	:	Thiocyanate ferrique.
GPx	:	Glutathion peroxydases.
HCl	:	Acide chlorhydrique.
H ₂ SO ₄	:	Acide Sulfurique.
IC ₅₀	:	Concentration inhibitrice à 50%.
Na ₂ CO ₃	:	Carbonate de sodium NH ₄ OH : Ammoniaque.
NaNO ₂	:	Nitrate de sodium.
NaOH	:	Soude.
NH ₄ OH	:	Ammoniaque.
OMS	:	Organisation mondiale de santé.
ORAC	:	Oxygen Radical Absorbance Capacity.
Rdt	:	Rendement.
SOD	:	Super oxyde dismutases.

Première partie
Synthèse bibliographique

L'oxygène est un élément primordial pour les organismes multicellulaires car il permet de produire de l'énergie en oxydant la matière organique mais, nos cellules transforment une partie de l'oxygène en métabolites toxiques, nommés radicaux libres organiques **(Meziti, 2007)**.

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, pour laquelle, il est possible d'avoir une existence indépendante en absorbant un ou plusieurs électrons non appariés dits électrons célibataires. Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte **[(Goudable et Favier, 1997) ; (Durand et coll., 2013)]**.

En effet, le radical libre essaiera toujours de remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se rétracter en oxydant un autre composé **(Favier, 2003)**.

Dans l'organisme, et aussi sous l'action de facteurs environnementaux (la pollution, le tabagisme, les rayons UV, ...), plusieurs mécanismes biochimiques peuvent s'activer en produisant des espèces réactives de l'oxygène (ERO), qui vont, immédiatement, submerger très rapidement toutes nos défenses antioxydantes. Une production excessive de ces molécules ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut déséquilibrer la balance pro-oxydant (ERO)/antioxydant. Ce déséquilibre provoque des dysfonctionnements directs des biomolécules tel que l'oxydation de l'ADN (acide désoxyribonucléique), des protéines, des lipides et des glucides **[(Belaïchet coll., 2015) ; (Boujraf et Belaïch, 2016)]**.

Il y a donc, apparition d'un stress oxydant qui conduit à des dégâts cellulaires souvent irréversibles. Ce phénomène est impliqué dans le développement de plus de 200 pathologies (maladies cardiovasculaires, dégénératives et inflammatoires, cancer, diabète, ...) **(Heim et coll., 2002)**.

Face à cette situation, l'organisme réagit constamment à la production permanente des radicaux libres et a développé de puissants systèmes de défense antioxydants permettant de contrôler et de maîtriser le stress oxydatif **(Karelson et coll., 2006)**.

Ces antioxydants sont capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir des concentrations non cytotoxiques des ERO au niveau de la cellule **(Favier, 2003)**.

Deux lignes de défense sont impliquées pour détoxifier la cellule : la voie enzymatique et la voie non enzymatique **(Wassmann et Nickenig, 2004)**.

La défense contre ces ERO par les systèmes enzymatiques fait intervenir des enzymes à savoir le superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) **[(Leverve, 2009) ; (Favier, 2006)]**.

La seconde voie de défense antioxydante repose sur plusieurs molécules issues de notre alimentation. Il s'agit des vitamines (la vitamine E, l'acide ascorbique, le β -carotène, ...), des oligoéléments (le cuivre, le zinc, le manganèse, le sélénium, ...), et des métabolites secondaires (flavonoïdes, acides phénoliques, tannins, coumarines, huiles essentielles, ...) **(Gardès-Albert et coll., 2003)**.

Les végétaux produisent et accumulent les métabolites secondaires qui présentent une remarquable originalité et diversité structurale. Ces molécules possèdent des propriétés multiples : effet répulsif, protection contre les UV et d'autres dont les rôles physiologiques restent parfois à déterminer. En plus de leur rôle avéré au sein de la plante, ces composés ont également une valeur inestimable pour l'homme en raison de leurs propriétés nutritionnelles, pharmaceutiques et industrielles **(Bruneton, 2009)**.

La composition d'une plante médicinale en métabolites secondaires peut varier fortement selon des facteurs intrinsèques (différentiation tissulaire, ontogénétique ou génétique) et extrinsèques (environnementale et climatique). Ces derniers dépendent en premier lieu de la répartition géographique de la plante **[(Unesco, 1960) ; (Douguedroit, 1976)]**.

Par ses contrastes géographiques, l'Algérie dispose d'une gamme variée de bioclimats méditerranéens permettant une flore riche constituée de plus de 4000 espèces et d'une végétation variée, à endémisme très marqué **[(Cheriti, 2002) ; (Gonzalez-Tejero, 2007)]**.

Avec un climat très diversifié, les plantes Algériennes poussent en abondance dans les régions côtières, montagneuses et également sahariennes. Ces espèces constituent des remèdes naturels potentiels et peuvent être utilisées en traitement curatif et préventif **[(Cheriti, 2002) ; (Gonzalez-Tejero, 2007)]**.

Le micocoulier de Provence appelé aussi *Celtis australis*, est une espèce originaire des régions tempérées et méditerranéennes **(Sattarian, 2006)**.

En Algérie, cette espèce peut être assez commune dans les forêts humides de l'Atlas Tellien et rencontrée à l'état spontané dans les cours, les garrigues et en basse montagne. Le micocoulier est souvent connu sous les noms de *Ncham* et *Tegzar* dans l'Est algérien et *Toghzaz* au niveau de la région (**Messaïli, 1995**).

Il s'agit d'une espèce vigoureuse, thermophile, à comportement héliophile et exige la lumière pour son développement. Elle prospère dans les terrains légers et frais, mais non humide et tolère bien les sols secs rocailleux et alcalin (**Brosse, 2000**).

Celtis australis qui fait partie de la famille d'Ulmacées, est un grand arbre de 25 à 30 m de long avec une écorce lisse et grise (**figure N°1**). Il peut vivre de 500 à 600 ans (**Rameau et coll., 2008**).

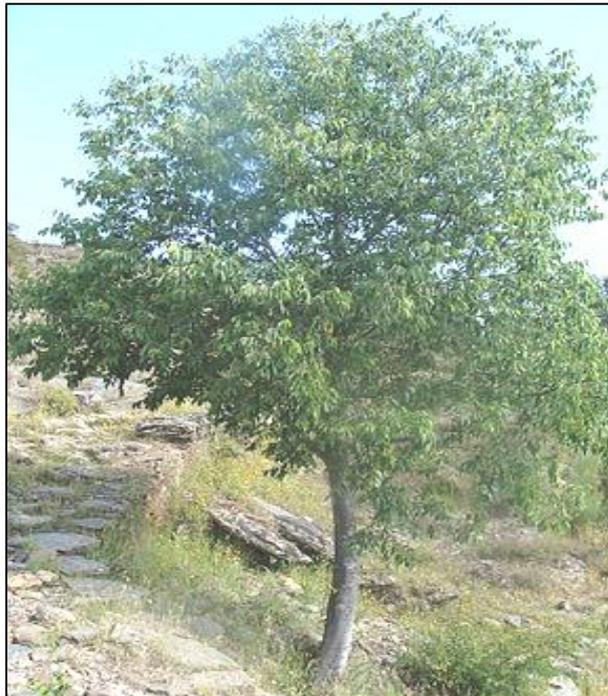


Figure N°1 : Arbre de *Celtis australis* (le micocoulier).

Les fleurs de cette espèce sont caducifoliées, d'une couleur verdâtre. Les fruits appelés aussi micocoules, sont des drupes marrons ou noirs d'une taille moyenne de 10mm **(figure N°2) (Rameau et coll., 2008)**.



Figure N°2 : Feuilles et les fruits de *Celtis australis*.

La pulpe farineuse des micocoules est sucrée, consommée crue, souvent utilisée pour la préparation des confitures et des bonbons **[(Becker et coll., 1983) ; (Crouzy, 2004) ; (Tonelli et Gallouin, 2013)]**.

En effet, les fruits de cette espèce sont fréquemment utilisés en médecine. Ils sont conseillés pour le traitement de l'aménorrhée, les perturbations du cycle menstruel, les diarrhées et l'ulcère gastrique **[(Chevalier, 1996) ; (Demir et coll., 2002)]**.

La problématique de notre travail s'inscrit dans une thématique plus générale, développée au sein du laboratoire de recherche Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique, visant à caractériser un extrait de plante et à évaluer l'activité antiradicalaire.

Dans ce contexte, l'objectif de cette recherche s'est focalisé sur l'évaluation de l'activité anti-oxydante des différentes parties des fruits de *Celtis australis* de Tlemcen.

Deuxième partie

Matériel et méthodes

Notre étude expérimentale est réalisée au sein du laboratoire de recherche «Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique» du département de Biologie comporte deux grandes parties :

Partie I : préparation et extraction du matériel végétal à partir des différentes parties de *Celtis australis* (écorces, partie charnue et graines) ;

Partie II : évaluation de l'activité antioxydante des extraits obtenus par deux méthodes :

- Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).
- Thiocyanate Ferrique (peroxydation lipidique) (FTC).

1. Préparation du matériel végétal

Celtis australis est collectée au mois de novembre 2016 dans la région d'Ain fazza (wilaya de Tlemcen).

Le matériel végétal est séché à l'abri de la lumière et de l'humidité, à température ambiante afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules. Après séchage, les différentes parties des fruits (écorce, partie charnue et graines) et stockés soigneusement dans un endroit sec (**Figure N°3**).



Figure N°3 : Différentes parties des fruits du *Celtis australis* L. (A) : écorce ;
(B) : Partie charnue ;(C) : graine.

1.2. Extraction du matériel végétal

10g de la matière végétale des 3 parties des fruits de *Celtis australis* sont mises en contact avec 100 mL d'un mélange Eau/Ethanol (20:80 ; v/v). La préparation est laissée macérer à température ambiante pendant 3 heures à l'abri de la lumière. Après filtration sur papier filtre, les extraits hydroéthanoliques sont évaporés à sec à l'aide d'un rotavapeur. Les résidus secs obtenus sont pesés et conservés dans des tubes à une température de + 4°C et à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

Les rendements des trois extraits secs obtenus sont calculés en utilisant la formule suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{P1-P2}{P3} \times 100$$

Où:

P1 : poids du ballon après évaporation (g) ;

P2 : poids du ballon avant évaporation (g) ;

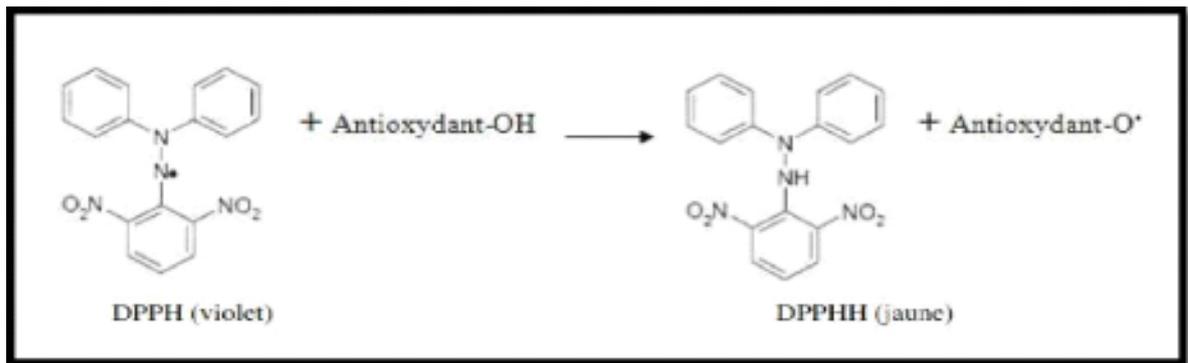
P3 : poids de la matière végétale (g).

2. Evaluation de l'activité antioxydante des différentes parties des fruits de *Celtis australis*

2.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

2.1.1. Principe

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) qui est un radical libre instable, en acceptant un électron ou un radical hydrogène, devient une molécule stable. L'effet des antioxydants sur ce radical se traduit par leurs capacités à lui donner un radical hydrogène. Cette capacité de réduction est déterminée par la diminution des absorbances à 517 nm, qui est induite par l'antioxydant. Ceci est visualisé par le changement de couleur du violet au jaune (**Mighri et coll., 2010**).



Structure chimique du radical libre DPPH• (2,2 Diphényle-1-Picryl-Hydrazyle)
(Popovici et coll., 2009).

2.1.2. Mode opératoire

Une solution éthanolique de 0,005 mM du DPPH est mélangée avec différentes concentrations des extraits des trois parties des fruits de *Celtis australis* (1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001 mg/mL). 1 mL de la solution éthanolique du DPPH est ajouté à 1 mL de chaque solution éthanolique des différents extraits des fruits de *Celtis australis*, le mélange est vigoureusement agité, puis les tubes sont incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes. Un témoin négatif composé d'1 mL de la solution éthanolique de DPPH et 1 mL de l'éthanol. Le blanc renferme uniquement 2 mL d'éthanol. La lecture est effectuée à 517 nm (Sanchez-Moreno, 2002).

L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif aux mêmes concentrations des extraits des différentes parties des fruits de *Celtis australis*.

2.1.3. Calcul des IC₅₀ et de l'activité antiradicalaire

La concentration inhibitrice à 50 % (aussi appelée EC₅₀ pour Efficient Concentration 50%), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH.

Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires ou logarithmiques des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations de chacun des extraits testés [(Scherer et Godoy, 2009) ; (Fabri et coll., 2009)].

2.2. Inhibition de la peroxydation lipidique par la méthode au thiocyanate ferrique (FTC)

L'activité antioxydante des extraits de plantes est mesurée par l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique en utilisant la méthode au thiocyanate ferrique (**Bidie et coll., 2011**).

2.2.1. Mode opératoire

Afin de mesurer l'activité antioxydante des extraits de cette plante il est nécessaire d'utiliser les méthodes dites au thiocyanate ferrique, méthode de **Takao et ses collaborateurs (1994)**.

Dans un tube à essai nous avons introduit 0,4 mL de l'extrait, 0,4 mL d'acide linoléique (2,52 % dans l'éthanol absolu) et 0,8 mL de tampon phosphate (pH 7,4). Ce mélange doit être incubé dans un bain marie pendant 1 heure à 40 °C.

0,1mL de cette solution sont mélangés à 5 ml d'éthanol et 0,1 mL de thiocyanate d'ammonium.

Après 3 minutes, 0,1mL de FeCl₂ combiné dans 3,5% de HCl sont ajoutés au milieu réactionnel.

La densité optique de la solution est lue toutes les 24 heures à une longueur d'onde de 500 nm pendant 7 jours contre un contrôle négatif, préparé en remplaçant les extraits par de l'eau distillée. Le coefficient d'inhibition de la peroxydation lipidique est alors calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = (1 - (\text{DO essai} / \text{DO blanc})) \times 100$$

Troisième partie

Résultats et discussion

1. Résultats

1.1. Les rendements des extraits des trois parties des fruits de *Celtis australis*

Les extraits bruts récupérés après évaporation à sec sont pesés pour déterminer le poids sec résultant. Le rendement est déterminé par rapport à 10g du matériel végétal sec. Les résultats sont exprimés en pourcentage massique (p/p).

Le rendement obtenu à partir de la partie charnue est le plus élevé (3,7078%) par rapport à l'écorce et les graines qui représentent des rendements de 2,19% et 0,037%, respectivement (**Tableau N°1**).

Tableau N° 1 : Rendements des extraits bruts de trois parties de *Celtis australis*.

Extraits	Rdts (%)
Ecorce	2,19
Partie charnue	3,7078
Graines	0,037

2. Evaluation de l'activité antioxydante

2.1. Étude de l'activité antioxydante par la méthode du piégeage du radical libre DPPH

Le radical DPPH[•] est généralement l'un des composés les plus utilisés pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse (**Bozin et coll., 2008**). Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH[•] et comparés antioxydant de référence (acide ascorbique).

Les résultats du piégeage du radical libre DPPH sont représentés dans la figure N°4. Les courbes ont une allure logarithmique, à partir de cela nous avons déterminé les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des concentrations

utilisées ainsi la valeur de l'IC₅₀ de l'acide ascorbique et des trois extraits (écorce, la partie charnue, graine).

Les résultats obtenus du pouvoir antiradicalaire pour des concentrations différentes des extraits de *Celtis australis* et de l'acide ascorbique déterminé sur le DPPH, montrent une dose réponse entre le pourcentage de réduction augmenté et la concentration des extraits.

Nous avons remarqué que l'extrait hydroéthanolique de l'écorce de *Celtis australis* à une concentration de 1 mg/mL enregistre le pourcentage d'inhibition le plus important de l'ordre de 89,33% comparativement à l'extrait de la graine et de la partie charnue (85,97% ; 15,71% respectivement).

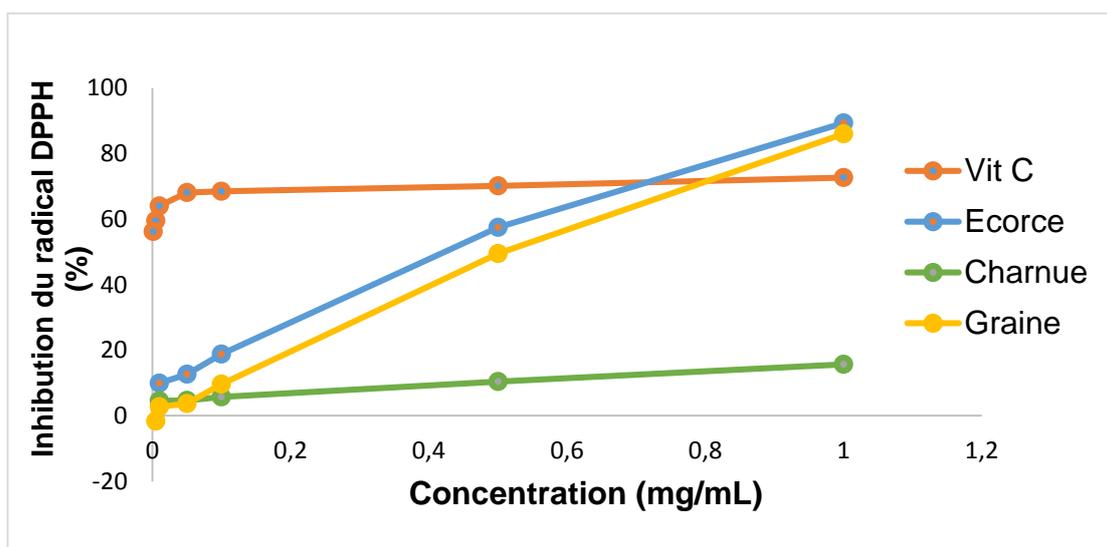


Figure N°4 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations d'acide ascorbique et des extraits hydroéthanoliques de *Celtis australis*.

2.2. Calcule des IC₅₀

L'IC₅₀, paramètre qui définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH^{*}, Plus la valeur de l'IC₅₀ est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant.

Les IC₅₀ calculées à partir des équations des régressions logarithmiques données précédemment, ainsi que les valeurs de l'activité antiradicalaire sont données dans le tableau N°2.

Tableau N° 2 : IC₅₀ de réduction du DPPH par les extraits de *Celtis australis* et l'acide ascorbique.

Extraits	IC ₅₀ µg/MI
Ecorce	0,50
Partie charnue	2,79
Graine	0,54
Acide ascorbique	0,52

Les résultats des IC₅₀ présentés dans le tableau N°2 montrent que la molécule de référence : l'acide ascorbique possède une activité antiradicalaire (IC₅₀ = 0,52µg/mL) comparable à celle de l'écorce (IC₅₀ = 0,50µg/mL) et des graines (IC₅₀ = 0,54µg/mL). Tandis que la partie charnue semble avoir l'effet réducteur le moins puissant (IC₅₀ = 2,79µg/mL).

2.3. Activité inhibitrice de la peroxydation lipidique

Nous avons évalué l'effet inhibiteur des extraits hydroéthanoliques de l'écorce, de la partie charnue, et de la graine des fruits de *Celtis australis* par la peroxydation des lipides selon la méthode au thiocyanate ferrique (FTC) (Figure N°5).

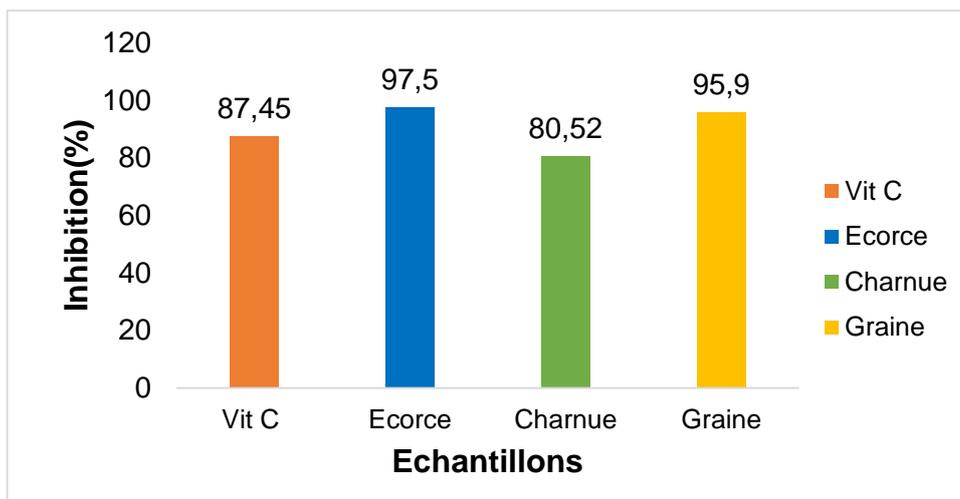


Figure N° 5 : Taux d'inhibition de la peroxydation lipidique par les Différents extraits des fruits de *celtis australis* et par l'acide ascorbique en utilisant la méthode FTC.

Les résultats indiquent que l'écorce et les graines des fruits de *Celtis australis* présentent les taux d'inhibition les plus élevés (97,5% et 95,9 %, respectivement) comparé à l'acide ascorbique (87,45%). Par contre, l'efficacité de la partie charnue à inhibe la peroxydation lipidique est moindre avec un taux de 80,52 %.

Discussion :

En Algérie, les plantes médicinales n'ont jamais été totalement abandonnées et les gens n'ont jamais cessé de faire appel à la médecine traditionnelle, ce qui conduit à maintenir une tradition thérapeutique vivante malgré le développement spectaculaire de la médecine moderne **(Dellile, 2013)**.

Des enquêtes ethnobotaniques récentes effectuées dans le but de répertorier les plantes médicinales utilisées par la population de l'Est et l'Ouest Algérien, soulignent l'importance qu'occupe ce patrimoine végétal dans la pharmacopée traditionnelle **[(Allali et coll., 2008) ; (Azzi et coll., 2012)]**.

Celtis australis ou communément appelée Micocoulier de provence, une plante qui appartient à la famille des ulmées, est caractérisée par ses propriétés thérapeutiques diverses : antidiabétique, antioxydante, et anti-inflammatoire... **[(Bellouad, 2001) ; (Dellile, 2013) ; (Halimi, 2014)]**.

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante, dans cette étude nous avons utilisé deux méthodes DPPH (2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyle) et FTC (Thiocyanate ferrique).

Il ressort des résultats du test DPPH qu'à une concentration de 1mg/mL, l'extrait hydroéthanolique de l'écorce des fruits de *Celtis australis* exerce un pouvoir de piégeage du radical libre DPPH à 89,32 %. Tandis qu'à la même concentration, la vitamine C inhibe ce radical libre à 72,67%. Par ailleurs, l'extrait hydroéthanolique de la partie charnue du fruit à cette même concentration exerce un pouvoir de piégeage de l'ordre 15,70 %, pour l'extrait de la graine du fruit l'inhibition du DPPH est de 85,97%.

Les résultats des IC₅₀ montrent que l'extrait de l'écorce présente la meilleure activité antiradicalaire avec une IC₅₀ de 0,50 µg/mL.

En comparant les IC₅₀ des deux extraits (la partie charnue et graine) testés par rapport à celle de l'antioxydant de référence (Acide ascorbique), nous remarquons que la capacité de piégeage du radical libre DPPH (2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyle) de ce dernier est similaire à celle de nos extraits. Ces activités antiradicalaires sont probablement dues au contenu phénolique.

Une étude réalisée par **Maatallah (2016)** sur le pouvoir antioxydant de quelques extraits des fruits de *Celtis australis* a montré que l'extrait hydroéthanolique de

cette dernière inhibe le DPPH à 90,48% à une concentration de 10mg/mL et l'huile fixe du même fruit à 1mg/mL a un pourcentage d'inhibition de 96,94%. Une autre étude réalisée par **El-alfy** et ses collaborateurs (**2011**) ont montré que l'extrait hydroalcoolique des feuilles de *Celtis australis* de l'Égypte a la capacité de piéger le radical libre DPPH jusqu'à 67,2% à une concentration de 0,1mg/mL. Cette inhibition est comparable à celle obtenue avec les antioxydants de référence (l' α -tocophérol et le BHT).

En ce qui concerne la technique FTC, les résultats indiquent que les trois parties des fruits de *Celtis australis* présentent de forts taux d'inhibition. Cette constatation a été affirmée par plusieurs études qui ont montré que les extraits aqueux des plantes médicinales ont une activité antioxydante la plus élevée contre la peroxydation des lipides avec la méthode de FTC [(**Al-Naqeeb et coll., 2009**) ; (**Rezaeizadeh et coll., 2011**)].

Cette activité est probablement due au contenu phénolique de ces extraits (les quinones, les terpénoïdes et les alcaloïdes) que **Maatallah (2016)** a démontré leur présence dans les extraits éthers et hydroalcooliques des fruits de *Celtis australis*.

La structure chimique, le nombre et la distribution des groupements hydroxyles de ces composés phénoliques peuvent piéger et neutraliser les radicaux libres, inhiber les enzymes responsables de la formation des radicaux libres ou chélater les ions métalliques [(**Perron et Brumaghin, 2009**) ; (**Spridon et coll., 2011**)].

Quatrième partie

Conclusion

Un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possèdent des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir la médecine, la pharmacie, la cosmétologie et l'agriculture. Ce regain d'intérêt vient d'une part, du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part, les effets secondaires induits par les médicaments inquiétant les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme (**Houghton, 2000**).

Dans le présent travail, l'activité antioxydante de différents extraits de *Celtis australis* (écorce, la partie charnue, graine) est étudiée par deux méthodes : DPPH (2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyle) et FTC (Thiocyanate ferrique).

L'étude du pouvoir antioxydant des différents extraits de *Celtis australis* (écorce, la partie charnue, graine) par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, a montré que l'extrait hydroéthanolique de l'écorce des fruits de *Celtis australis* est le plus actif, avec une valeur d'IC₅₀ de l'ordre de 0,50 µg/mL, comparable à celle de l'acide ascorbique (IC₅₀ = 0,52 µg/mL). C'est le même résultat qui est obtenu avec la méthode FTC. Il s'est révélé que l'écorce a le meilleur effet inhibiteur de la peroxydation lipidique (97,5%) comparé à celui de la vitamine C (87,45%). Ce qui reflète une bonne activité antioxydante qui peut être due à la richesse de cette plante en composés phénoliques actifs.

Ces résultats restent préliminaires. Des études complémentaires, précises et approfondies, seraient nécessaires, qui se résument dans les points suivants :

- ✚ Réaliser d'autres méthodes d'extraction par changement du solvant et du temps d'extraction ;
- ✚ Réaliser une étude phytochimique approfondie qui consiste à la purification, l'identification, et la caractérisation des principes actifs par des techniques chromatographiques et spectrales ;
- ✚ Tester *in vitro* l'activité antioxydante par d'autres méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) et le blanchissement de β-carotènes ;

Références bibliographiques

Allali H., Benmahdi H., Dib M. A., Tabli B., Ghalem S. and Benabadji N. (2008) Phytotherapie of Diabetes in West Algeria. *Asian Journal of chemistry*; 20 (04): 2710

Al-Naqeeb G., Ismail M. S. and Al-Zuba A. (2009) Fatty acid profile, α -Tocopherol content and total antioxidant activity of oil extracted from *Nigella sativa* seeds. *Int. J. Pharmacol*, 5(4) : 244-250.

Azzi R., Djaziri R., Lahfa F., Sekkal F. Z., Benmehdi H. and Belkacem N. (2012) Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research*; 6 (10) : 2041- 2050.

Becker M., Timbal J. et Picard J. F. (1983) Les arbres. Edition Masson, Paris, 140.

Belaïch R., Boujraf S., Housni A., Maaroufi M., Batta F., Magoul R. and Tizniti S. (2015) Assessment of hemodialysis impact by polysulfone membrane on brain plasticity using BOLD-fMRI. *Neuroscience*, 288: 94-104.

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

Belouad A. (2001) Plantes médicinales en Algérie. Office des publications nationales. Algérie : 122.

Bidie P. H., N'guessan B., Yapo F., N'guessan J. et Djaman A. (2011) Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences & Nature*. 8 (1) : 5p.

Bozin B., Mimica-Duric N., Samojlik I., Goran A. and Igic R. (2008) *Phenolics as antioxidants in garlic (Allium sativum L. Alliaceae)*.

Brosse J. (2000) Larousse des arbres et des arbustes. Edition Larousse. Canada, 576.

- Bruneton J. (2009)** Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. Quatrième Edition Lavoisier. *Tec et Doc*. Paris, 1269.
- Cheriti A. (2002)** Plantes médicinales de la région de Bechar, sud-ouest Algérie : Etude Ethnopharmacologique. Rapport CRSTRA (Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides) Algérie, 3-11.
- Chevalier A. (1996)** The Encyclopedia of Medicinal Plants. Dorling Kindersley limited Edition. London, 336.
- Crouzy L. (2004)** Arbres et arbustes d'ornement des régions tempérées et méditerranées. Edition *Lavoisier*. *Tec et Doc*. Paris, 600.
- Dellile A. (2013)** les plantes médicinales d'Algérie. 3^{ème} Ed. Berti : 6-11-144.
- Demir F., Dogan H., Ozcan M. and Haciseferogullari H. (2002)** Nutritional and physical properties of Hackberry. *Journal of Food Engineering* ; 54 : 241-247.
- Douguedroit A. (1976)** Les paysages forestiers de Haute- Provence et des Alpes-Maritimes. Géographie – Ecologie - Histoire, Ed. Edisud, Aix-en-Provence, 550.
- Dugas A. J., Castaneda-Acosta J. and Bonin G. C. (2000)** Evaluation of the total peroxy radical scavenging capacity of flavonoids: structure- activity relationships. *J Nat Prod*, 63, 31-327.
- Durand D., Damon M. et Gobert M. (2013)** Le stress oxydant chez les animaux de rente : principes généraux. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 48 : 218-224.
- EL-Alfy T. S., EL-Gohary H., Sokkar N. M., Hosny M. and AL-Mahdy D. A. (2011)** A New Flavonoid C-Glycoside from *Celtis australis* L. and *Celtis occidentalis* L. Leaves and Potential Antioxidant and Cytotoxic Activities. *Scientia Pharmaceutica* ; 79: 963–975.

Fabri R. L., Nogueira M. S., Braga F. G., Coimbra E. S. and Scio E. (2009) *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial and antioxidant effects, *Bioresource Technolog* ; 100 : 428-433.

Favier A. (2003) Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Actualité chimique* ; 6 : 108-115.

Favier A. (2006) Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr* ; 64: 390-396.

Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z. et Jore D. (2003) Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*; 11 (12): 91-96.

Gonzalez-Tejero. (2007) Medicinal plants in the mediterranean area: synthesis of the results of the project rubia. *J. Ethnopharmacol* ; 116 : 341-357.

Goudable J. et Favier A. (1997) Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme* ; 11:15-120.

Halimi A. K. (2014) **Les** plantes médicinales en Algérie. 2ème Ed. BERTI, Alger : 6-148-149.

Heim E. K., Tagliaferro A. R. and Bobilya D. J. (2002) Flavonoid antioxidants : chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional biochemistry*, 13(10): 572-584

Houghton P. J. (2000) Use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sources. *Phytotherapy Research*, 14 : 419-423.

Karelson E., Bogdanovic N. and Garlind A. (2006) The cerebrocortical areas in normal brain aging and in Alzheimer disease: noticeable differences in the lipid peroxidation level and in antioxidant defense. *Neurochem. Res* ; 26 : 353-361.

Leverve X. (2009) Stress oxydant et antioxydants. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 5 (44) : 219–224.

Messailli B. (1995) Botanique : systématique des Spermaphytes. OPU Edition. Alger, 91p.

Meziti A. (2007) Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L Etude *in vitro* et *in vivo*. Mémoire de Magister Université de Batna. 30-35-49-67p.

Mighri H., Hajlaoui H., Akrouf A., Najjaa H. and Neffati M. (2010) Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone. *Comptes Rendus Chimie*; 13: 380-386.

Organisation des Nations Unies pour l'éducation, la science et la culture (Unesco) (1960) Les Plantes Médicinales Des Régions Aride, septième Edition, Paris.

Perron N. R. and Brumaghim J. L. (2009) A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem. Biophys*, 53 : 75 – 100.

Popovici C., Saykova I. et Tylkowski B. (2009) Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*. (4) :8p.

Rameau J. C., Mansion D., Dum2 G., Gauberville C., Bardat J., Bruno E. et Keller R. (2008) Flore forestière française guide écologique illustré 3 régions méditerranéennes Edition.Paris, 24-26.

Rezaeizadeh A., ABZ Z., Abdollahi M., Goh Y. M., Noordin M. M., Hamid M. and Azmi1 T. I. (2011) Determination of antioxidant activity in methanolic and chloroformic extracts of *Momordica charantia*. *African Journal of Biotechnology*, 10(24): 4932-4940.

Sanchez-Moreno C. (2002) Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Int. J. of Foods Sci. Tech.* 8:121-137.

Sattarian A. (2006) Contribution to the biosystematics of *Celtis* (Celtidaceae) with special emphasis on the African species. Thesis Wageningen University, Wageningen, 142.

Scherer R. and Godoy H. T. (2009) Antioxidant Activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry* ; 112 : 654-658.

Spiridon I., Bodirlau R. and Teaca C. A. (2011) Total phenolic content and antioxidant activity of plants used in traditional Romanian herbal medicine. *Cent. Eur J Biol*, 6, 388-396.

Tonelli N. et Gallouin F. (2013) Des fruits et des graines comestibles du monde entier. Edition Lavoisier. 736.

Wassmann S. and Nickenig K. G. (2004) Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hyperten*; 44: 381-386.

