

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université Abou Bekr Belkaïd -Tlemcen-
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie



Laboratoire de recherche
« Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique »

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention d'un diplôme de Master

Domaine : SNV

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

Thème :

Etude phytochimique et activité antioxydante des feuilles de *Punica granatum* et *Prunus cerasus*

Présentée par :

M^{elle} MOKHTARI Mebarka

Soutenue devant le jury

M ^r AZZI R.	MCA	Président	Université de Tlemcen
M ^{elle} MEZOUAR D.	MAB	Examinatrice	Université de Tlemcen
M ^{me} BELKACEM N.	MCB	Promotrice	Université de Tlemcen

Année Universitaire 2018-2019

Remerciements

Nous remercions le Dieu, notre créateur de nous avoir donné la forces, la volonté et le courage afin d'accomplir ce travail.

*Tout d'abord je tiens surtout à adresser mes plus vifs remerciements à M^{me} **BELKACEM, N.** Maître de conférences **B** au Département de Biologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie, qui m'a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, pour sa grande patience, pour sa disponibilité et ses conseils judicieux.*

*Je tiens à remercier profondément Monsieur **AZZI, R.** Maître de Conférences **A** au département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen- d'avoir accepte de presider le jury.*

*J'exprime ma profonde gratitude et mes remerciements à M^{elle} **MEZOUAR, D.** maître assistante classe **B** au Département de Biologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen- D' avoir accepté d'examiner mon travail.*

Liste des tableaux

Tableau n°1: Les principales espèces réactives de l'oxygène.....	5
Tableau °2 : Rendement, aspect, couleur et solvant de solubilités des extraits étudiés.....	30
Tableau °3 : Résultat de l'analyse phytochimique réalisé sur les feuilles de <i>P. granatum</i> et <i>P. granatum</i>	31
Tableau °4 : Teneurs de différents composés phénoliques dans les extraits de <i>P. granatum</i> et <i>P. cerasus</i>	32
Tableau °5 : Valeurs des IC ₅₀ des différents extraits et des molécules de référence.....	37
Tableau °6 : Valeurs des EC ₅₀ des différents extraits et des molécules de référence.....	41

Liste des figures

Figure n°1: Déséquilibre de la balance entre antioxydants et prooxydants.....	3
Figure n°2 : Origine extracellulaire et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène.....	4
Figure n°3 : Les principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.....	5
Figure n°4: Structure de l'acide ascorbique.....	8
Figure n°5 : Structure de la vitamine E.....	8
Figure n°6: Les structures chimiques des différents acides phénoliques	9
Figure n°7 : Structure de base des flavonoïdes.....	9
Figure n° 8: Structure des tanins hydrolysables (A): tanin gallique, (B) : tanin éllagique ...	10
Figure n°9 : Modification du DPPH•par molécule d'hydrogène.....	11
Figure n°10 : Feuilles (A), Fleurs (B), Fruits et Graine (C) et Ecorce (D) de <i>P. granatum</i> ...	15
Figure n°11: Feuilles (A), Fleurs (B), Fruits de <i>Prunus cerasus</i>	18
Figure n°12: Schéma récapitulatif du protocole d'extraction et expérimental réalisé sur les feuilles de <i>P. granatum</i> et <i>P. cerasus</i>	23
Figure n°13 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Dosage des polyphénols totaux)...	31
Figure n°14: Courbe d'étalonnage de la catéchine (Dosage des flavonoïdes) (n=3).....	31
Figure n°15 : Courbe d'étalonnage de la catéchine (Dosage des tanins condensés) (n=3)...	32
Figure n° 16 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par l'extrait brut eau/méthanol des feuilles de <i>P. granatum</i> (n=3).....	33
Figure n°17 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par l'extrait brut eau/acétone des feuilles de <i>P. granatum</i> (n=3).....	34
Figure n°18: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par l'extrait brut eau/méthanol des feuilles de <i>P. cerasus</i> (n=3).....	34
Figure n°19 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par l'extrait brut eau/acétone des feuilles de <i>P. cerasus</i> (n=3).....	35
Figure n° 20 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par l'acide ascorbique, BHA et BHT (n=3).....	36
Figure n°21 : Activité antiradicalaire des différents extraits et des molécules de références.	37
Figure n°22 : Pouvoir réducteur du fer de l'extrait brut eau/méthanol des feuilles de <i>P. granatum</i> (n=3).....	38

Figure n°23 : Pouvoir réducteur du fer de l'extrait brut eau/acétone des feuilles de <i>P. granatum</i> (n=3).....	38
Figure n°24 : Pouvoir réducteur du fer de l'extrait eau/méthanol des feuilles de <i>P. cerasus</i> (n=3).....	39
Figure n°25: Pouvoir réducteur du fer de l'extrait eau/acétone des feuilles <i>P. cerasus</i> (n=3).	39
Figure n°26 : Pouvoir réducteur du fer par l'acide ascorbique, BHA et BHT (n=3).....	40

Liste des abréviations

AAR: Activité anti radicalaire
ABTS: Acide 2,2_ azino _bis_ ethyl benzothiaziline_6_ sulfonique.
A_cA_s: Acide ascorbique
BHA: Hydroxyanisol butylé
BHT: Hydroxytoluène butylé
CAT: Catalase
DPPH: 2-2-diphénylepicécyldiazyl
EC₅₀ : Concentration efficace médiane
ERN: Espèces réactives de l'azote.
ERO: Espèces réactives de l'oxygène.
fe²⁺: Fer ferreux
Fe³⁺: Fer ferrique
FRAP: Ferric reducing antioxidant power.
FTC : Thiocyanate ferrique.
GPx: Glutathion peroxydase.
GSH: Glutathion réduit
GSSG: Glutathion oxydé
IC₅₀: Concentration inhibitrice a 50%
O^{•-}₂: Radical anion superoxyde
OH[•]: Radical hydroxyle
ORAC: Oxygen radical absorbance capacity
ROO[•]: Radicaux libres peroxydes
SOD: Superoxyde dismutase
TAC: Capacité antioxydante total
TEAC: Trolox équivalent antioxidant capacity.
TRAP: Total radical-trapping antioxidant parameter

Sommaire

Introduction	01
Synthèse bibliographique.....	03
Chapitre I : Le stress oxydatif.....	03
1. Le stress oxydatif	03
1.1. Définition	03
1.2. Origine du stress oxydant	03
2. Les radicaux libres	04
2.1. Définition	04
2.2. Types de radicaux libres	04
2.2.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)	04
2.2.2. Les espèces réactives d'azote (ERN)	05
3. Conséquences du stress oxydant	06
4. Systèmes de défense antioxydants	06
4.1. Définition des antioxydants	06
4.2. Les différents types des antioxydants	06
4.2.1. Les antioxydants endogènes enzymatiques	06
4.2.2. Les antioxydants exogènes non enzymatiques	07
5. Méthodes de détermination de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	10
5.1. Test de ABTS ou TEAC	10
5.2. Test de piégeage de DPPH•	11
5.3. Test de réducteur des ions ferriques FRAP	11
5.4. Le test de blanchissement ou de décoloration du bêta-carotène	11
5.5. Le test ORAC	11
5.6. Méthode de TRAP	12
5.7. Teste de Capacité antioxydant totale (TAC)	12
5.8. Teste de Piégeage du radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)	12
Chapitre II : Les plantes d'étude.....	13
1. Généralités	13
2. <i>Punica granatum</i> (grenadier)	13
2.1. Description botanique de la plante	13
2.2. Classification	15

2.3. Composition chimique de <i>P. granatum</i>	16
2.4. Activités thérapeutiques de <i>P. granatum</i>	16
2.5. Activité antioxydante de <i>P. granatum</i>	17
3. <i>Prunus cerasus</i> (cerisier).....	17
3.1. Description botanique de la plante.....	17
3.2. Classification.....	18
3.3. Composition chimique de <i>Prunus cérasus</i>	19
3.4. Activités thérapeutiques de <i>P. cérasus</i>	19
3.5. Activité antioxydant de <i>P. cérasus</i>	19

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal.....	21
1.1. Récolte et préparation du matériel végétal.....	21
1.2. Extraction du matériel végétal	21
1.3. Calculs des rendements d'extraction.....	22
1.4. Les extraits étudiés	22
2. Analyses phytochimiques.....	24
3. Dosage des composés phénoliques.....	25
3.1. Dosage des polyphénols totaux.....	25
3.2. Dosage des flavonoïdes.....	26
3.3. Dosage des tanins condensés	26
3.4. Expression des résultats.....	27
4. Evaluation de l'activité antioxydante.....	27
4.1. Piégeage du radical libre DPPH•.....	27
4.2. Réduction du fer par la méthode FRAP.....	28
Résultats et interprétation.....	30
Discussion	43
Conclusion et Perspectives.....	47
Références bibliographiques.....	49

Résumé

Dans le cadre des études portant sur la recherche d'antioxydants naturels, l'objectif de ce travail est l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante de différents extraits des feuilles de *Punica granatum* et *Prunus cerasus*.

L'étude phytochimique des extraits des feuilles de ces plantes, montre la présence des flavonoïdes des tanins et des sucres réducteurs. Les résultats de dosage de polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés, montrent que les extraits eau /MeOH et eau /Acétone sont très riches en composés polyphénoliques ($835,62 \pm 0,063$ et $405,52 \pm 0,56$ mg EAG/gE, respectivement pour *P. granatum*) ; ($548,24 \pm 2,12$ et $502,12 \pm 5,74$ mg EAG/gE, respectivement pour *P. cerasus*) , alors que flavonoïdes et les tanins condensés, sont très abondants au niveau des extraits de *P. cerasus* ($202,50 \pm 0,56$ et $206,89 \pm 1,28$ mgEQC/gE) ; ($118,72 \pm 0,062$ et $133,83 \pm 0,035$ mgEQC/gE).

Les résultats obtenus des tests réalisés in vitro sur l'activité antioxydante ont montré que l'extrait organique de feuilles de *P. granatum* et de *P. cerasus* ont une capacité de réduction de fer et de piégeage du radical DPPH• relativement importante.

La méthode FRAP révèle que l'extrait eau/MeOH de feuilles de *P. granatum* présente la plus puissante capacité à réduire le fer avec une $EC_{50}=0,127$ mg/mL suivi de l'extrait eau/Acétone de la même plante avec une $EC_{50}=0,333$ mg/mL. Cette capacité à réduire le fer est nettement supérieure à celle de l'acide ascorbique ($EC_{50}=0,53$ mg/mL). Vis-à-vis du radical DPPH•, les extraits eau/MeOH eau/Acétone de *P. granatum* présentent des IC_{50} de 5,24 et 5,80 μ g/mL, respectivement. Cette activité est directement corrélée avec le taux de polyphénols.

Mots Clés : polyphénols, l'activité antioxydante, *Punica granatum* et *Prunus cerasus*

Introduction

Le monde scientifique est envahi par un nouveau concept, celui du stress oxydant, une situation où la cellule ne contrôle plus la quantité de radicaux libres qu'elle produit soit de type espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou espèces réactives de l'azote (ERN) (**Pincemail et al., 2002 ; Halliwell et Whiteman, 2004 ; Szabo, 2003**).

Les radicaux libres sont en général très instables et vont donc réagir rapidement avec les molécules biologiques qui se trouvent à proximité. Par conséquent, ils sont capables d'interagir avec les lipides, l'ADN, les protéines ainsi que sur le système immunitaire entraînant la plupart des maladies telle que les maladies cardiovasculaire, neurodégénératives et le cancer (**Haleng et al., 2007 ; Sahnoun, 1997**).

Ce problème de stress oxydant ; nécessite un système de défense antioxydant enzymatique endogène par des enzymes tel que le superoxyde dismutase (SOD), la catalase, et la glutathion peroxydase (GPx) ainsi que des antioxydants non enzymatiques exogènes naturels tel que la β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) et les polyphénols (**Iserin, 2001 ; Jaques et André, 2004 ; Gardés-Albert et al., 2003**).

Le stress oxydant peut être traité par différents médicaments tel que les antioxydants de synthèses cependant ils peuvent causer des effets indésirable ce qui pousse les scientifiques a tourner vers la phytothérapie; c'est-à-dire par la consommation ou l'utilisation en voie externe de produits préparés à partir de plantes sans passer par une étape de sélection des molécules, donc elle désigne la médecine fondée sur les extraits de plantes et les principes actifs naturels comme les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins (**Iserin, 2001**) .

Punica granatum et *Prunus cerasus* sont des plantes connues par ses fruits comestibles. Ces plants sont riches en métabolites secondaires tel que les polyphénols, les flavonoïdes, et les tanins ce qui lui donnent un rôle important dans la traitement de plusieurs maladies qui ont une relation avec le stress oxydatif comme le cancer et le diabète (**Bekir et al., 2013 ; Potter et al., 2007 ; Ferretti et al., 2010 ; Jacques Fleurentin, 2013**).

Notre travail vise à effectuer une analyse phytochimique et à évaluer l'activité antioxydante de différents extraits des feuilles de *Punica granatum* et *Prunus cerasus* récoltées de la Wilaya de Tlemcen.

Ce document est initié en première partie, par une synthèse bibliographique dont le premier chapitre définit le stress oxydant, les radicaux libres, les antioxydants, et les différentes méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante. Le deuxième chapitre donne des

Introduction

généralités sur les deux plantes étudiées : *P. granatum* et *P. cerasus*, leur composition chimique et leur effet thérapeutique.

La seconde partie qui est la partie expérimentale regroupe le matériel et les méthodes utilisés pour l'analyse phytochimique des extraits des plantes et pour évaluer l'activité antioxydante par deux méthodes : Piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) et la réduction du fer par la méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power). Les résultats obtenus sont suivis d'une discussion puis une conclusion finale de ce travail.

1. Le stress oxydatif

1.1. Définition

Le stress oxydant peut-être défini comme un déséquilibre de la balance des espèces pro-oxydantes et des systèmes de défense dits antioxydants avec comme conséquence l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule (**Stern, 1991**).

En 1991, Sies a défini la notion de stress oxydant comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces réactifs d'oxygène (ERO), suite à un déséquilibre lié, soit à une production accrue de ERO, soit à une diminution de la capacité de défenses antioxydantes (Fig n°1) (**Lusis, 2000**).

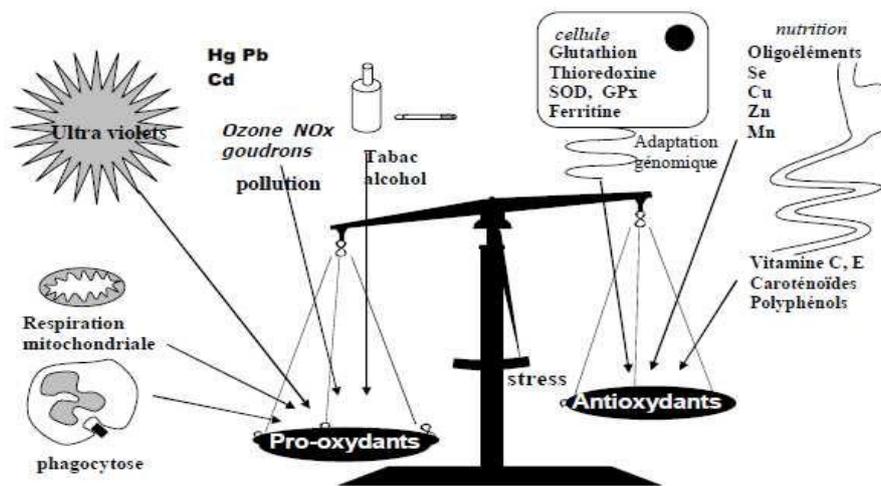


Figure n°1: Déséquilibre de la balance entre antioxydants et prooxydants (Favier, 2006)

1.2. Origine du stress oxydant

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable. Cette production physiologique est maîtrisée par des systèmes de défense. Dans ces circonstances normales, la balance antioxydants/prooxydants est en équilibre. Si elle n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydant ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux libres, l'excès de ces radicaux est appelé « stress oxydant ». Donc le stress oxydant peut avoir diverses origines, parmi eux la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs prooxydants (Tabac, alcool, médicaments, rayons ultraviolets, pesticides, ozones, pollution, contact avec des agents cancérogènes) (Fig. n°2) (**Favier, 2003 ; Magder, 2006**).

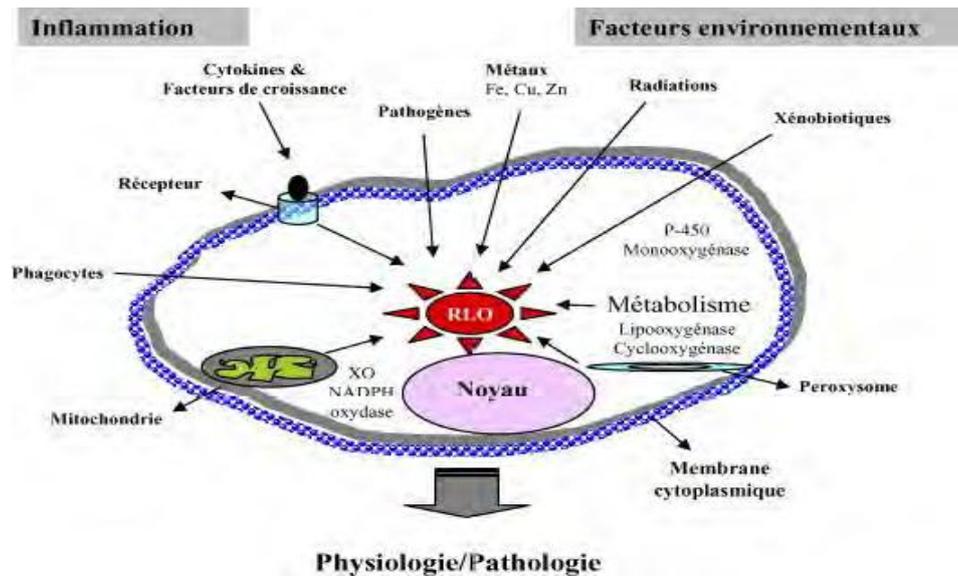


Figure n°2 : Origine extracellulaire et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène (Afonso *et al.*, 2007).

2. Les radicaux libres

2.1. Définition

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique. Ils ont tendance à être réactifs et à participer dans des réactions en chaîne, dans lesquelles l'évènement d'initiation radicalaire peut être propagé et peut endommager plusieurs molécules (Delattre *et al.*, 2005).

2.2. Types de radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être divisés en espèces réactives de l'oxygène (ERO) comme l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et des espèces réactives de l'azote (ERN) tels que le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) et le peroxydinitrite (ONOO^{\bullet}) (Halliwell et Whiteman, 2004 ; Szabo, 2003).

2.2.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

- **L'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) :** La molécule d'oxygène, mise en présence d'une quantité d'énergie suffisante, peut acquérir un électron supplémentaire et former ainsi l'anion superoxyde. Cet anion intervient comme facteur oxydant dans des nombreuses réactions (Halliwell et Whiteman, 2004).
- **Le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) :** Il est très réactif vis-à-vis des structures organiques et joue un rôle initiateur dans l'auto-oxydation lipidiques (Haton, 2005).
- **Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 :** Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui n'est pas un radical libre peut être formé Secondairement à la dismutation de ($\text{O}_2^{\bullet-}$) par la

superoxyde-dismutase ou produit par réduction bivalente de l'oxygène grâce à un grand nombre de déshydrogénases (Halliwell et Whiteman, 2004).

Le tableau suivant englobe Les principales espèces réactives de l'oxygène.

Tableau n°1: Les principales espèces réactives de l'oxygène (Halliwell et Whiteman, 2004)

Radicaux libres	Espèces réactives non radicalaires
Anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)	Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)
Hydroxyle (OH^{\cdot})	Acide hypochlorique ($HOCl$)
Hydroperoxyde (HO_2^{\cdot})	Ozone (O_3)
Peroxyde (RO_2^{\cdot})	Oxygène singulet (1O_2)
Alkoxyde ((RO_2^{\cdot}))	Peroxydes organiques ($ROOH$)
Dioxyde de carbone ($CO_2^{\cdot-}$)	Peroxynitrites ($ONOO^-$)

2.2.2. Les espèces réactives d'azote (ERN)

- **Le monoxyde d'azote (NO^{\cdot})** : L'oxyde nitrique est un radical libre synthétisé par trois iso formes de l'oxyde nitrique synthétase (NOS). Il se combine aisément avec l' $O_2^{\cdot-}$ pour former le peroxynitrite ($ONOO^-$) (Roncon *et al.*, 2005 ; Moussard, 2006).
- **L'anion peroxynitrite ($ONOO^-$)** : La régénération simultanée de l'oxyde nitrique et de superoxyde favorise la production de l'anion peroxynitrite, ce dernier est un puissant oxydant qui peut initier la peroxydation lipidique ainsi que l'oxydation des protéines et de l'ADN (Szabo, 2003).

La figure suivante représente, les principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.

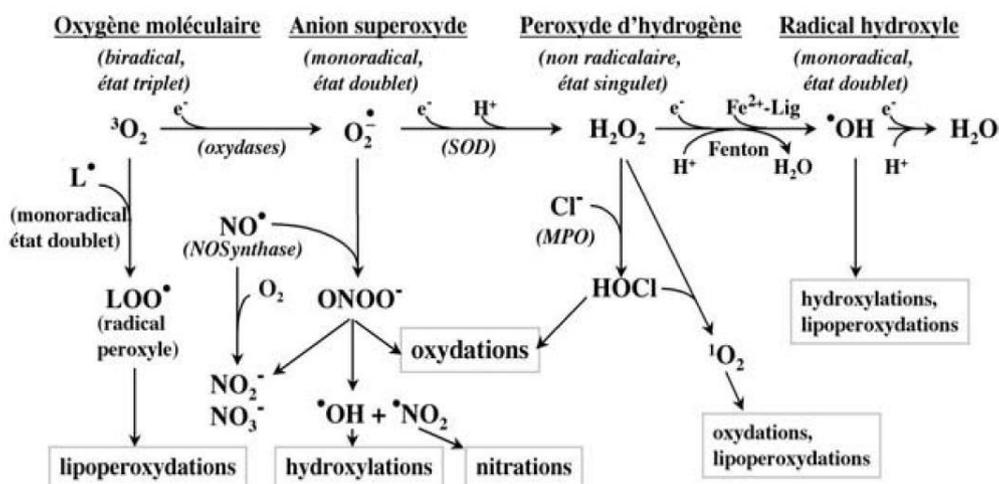


Figure n°3 : Les principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (Debydupont *et al.*, 2002).

3. Conséquences du stress oxydant

Les ERO réagissent avec de nombreuses molécules, ce qui entraîne certaines modifications de ces dernières. Elles perdent alors leur activité au sein de la cellule et cela a un impact sur le fonctionnement cellulaire physiologique.

Des concentrations élevées en ERO peuvent être un important médiateur de dommages des structures cellulaires, des acides nucléiques, des lipides et des protéines.

Le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies comme le cancer, syndrome de détresse respiratoire aigue, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré...etc. Il est aussi l'un des facteurs potentialisant l'apparition des maladies plurifactorielles tel que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Favier, 2003 ; Valko *et al.*, 2006).

4. Systèmes de défense antioxydants

4.1. Définition des antioxydants

Les antioxydants sont des composés qui peuvent atténuer, inhiber ou prévenir l'oxydation des matières oxydables en éliminant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif (Kim et Lee, 2004).

4.2. Les différents types des antioxydants

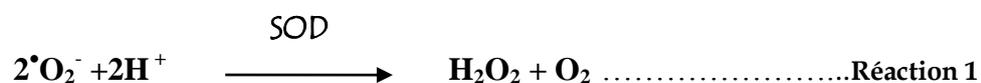
Les antioxydants peuvent être divisés en deux grandes classes : les antioxydants endogènes (enzymatiques) et les antioxydants exogènes (non enzymatiques), selon qu'ils soient produits ou non par l'organisme (Jacques et André, 2004 ; Gardès-Albert *et al.*, 2003).

4.2.1. Les antioxydants endogènes enzymatiques

Les antioxydants endogènes se retrouvent sous forme d'enzymes produites par l'organisme telle que le superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase, toutes trois présentes dans le cytoplasme, le milieu extracellulaire et la mitochondrie. Ces enzymes jouent un rôle très important dans le maintien de la santé (Baba et McGrath, 2008).

- **Le superoxyde dismutase (SOD)**

Elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en hydrogène peroxyde (H_2O_2) et en oxygène selon la réaction 1.



- **La catalase (CAT)**

Cette enzyme est localisée essentiellement dans les peroxysomes (**Valko *et al.*, 2006**). Elle permet de convertir deux molécules de H₂O₂ en H₂O et O₂ selon la réaction 2.



- **La glutathion peroxydase (GPx)**

C'est une enzyme a cofacteur le sélénium, se localise dans le cytosol et la matrice mitochondriale. Elle a pour activité la dégradation des peroxydes organiques (ROOH) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) selon la réaction 3 et 4 (**Valko *et al.*, 2006**).



4.2.2. Les antioxydants exogènes non enzymatiques

Ils sont fournis par l'alimentation. Il y a principalement le β-carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) et les polyphénols. Il y a aussi divers minéraux tels que le zinc, le sélénium, le cuivre, le manganèse et le fer (**Kohen et Nyska, 2002**).

a. Le β-carotène : vitamine A

Le précurseur de la vitamine A est le β-carotène. Les caroténoïdes piègent les molécules d'oxygène singulet formées par les radiations solaires. Grace à leur longue chaîne carbonée, riche en doubles liaisons, ils sont également de bons piègeurs de radicaux peroxydes. Une molécule de caroténoïde peut piéger plusieurs espèces radicalaires avant d'être détruite (**Stahl et Sies, 1997 ; Stahl et Sies, 2002**).

b. L'acide ascorbique : vitamine C

La vitamine C est un antioxydant puissant (Fig. n°4). Elle participe dans les réactions avec la vitamine E et l'enzyme glutathion peroxydase pour neutraliser des radicaux libres. La vitamine C agit principalement en piégeant directement les ERO (majoritairement l'•O₂⁻, ONOO⁻). Il est présent dans les légumes, le chou, le poivron, les agrumes. Elle joue un rôle

important dans la régénération de la vitamine E (Bossokpi, 2002 ; Colette, 2003 ; Cheick Traore, 2006 ; Belkheiri, 2010).

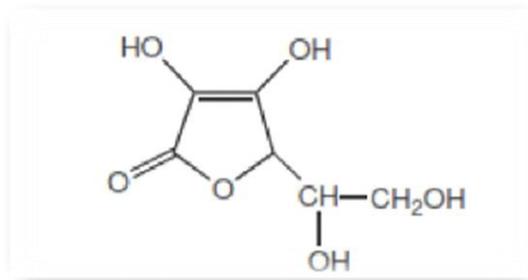


Figure n°4: Structure de l'acide ascorbique (Diallo, 2005).

c. Le tocophérol : Vitamine E

La vitamine E, prévient la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en captant les radicaux peroxydes. Elle est présente dans les huiles végétales (huiles d'arachide, de soja, de chardon, de tournesol et d'olive pressées à froid) ainsi que dans les noix, les amandes, les graines, le lait, les œufs, et les légumes à feuilles vertes (Fig. n°5) (Ahamet, 2003).

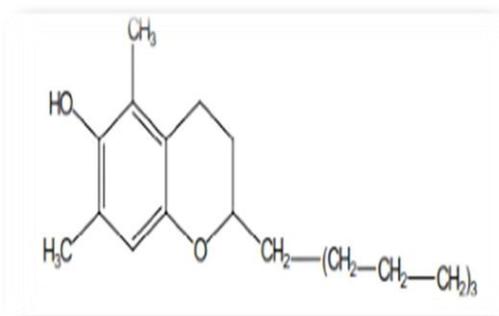


Figure n°5 : Structure de la vitamine E (Diarra, 2006).

d. Les polyphénols

• Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont divisés en deux sous classes (Fig. n°6):

- ✓ Les dérivés de l'acide cinnamique ou les hydroxycinnamiques qui comprennent les acides pcoumarique, caféique, ferulique et sinapique qui sont des précurseurs d'anthocyanines.
- ✓ Les dérivés de l'acide benzoïque ou les acides hydroxybenzoïques Tels que l'acide gallique, les gallotanins et les ellagitanins (Manach *et al.*, 2004).

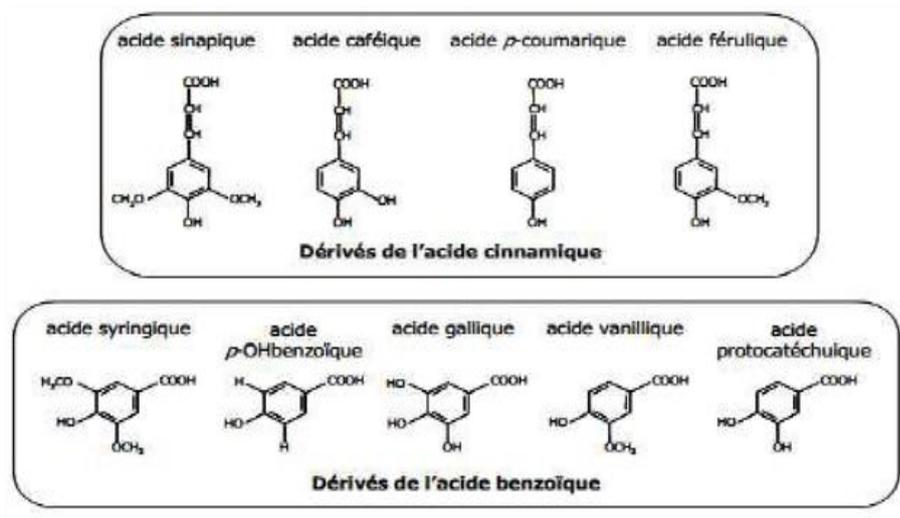


Figure n°6: Les structures chimiques des différents acides phénoliques (Anne-Laure *et al.*, 2007).

- **Les flavonoïdes**

Le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composé naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Ils sont particulièrement présents dans l'épiderme des feuilles ainsi que dans la peau des fruits et donnent des couleurs allant du jaune clair au jaune or. Ils sont stockés sous forme libre ou conjuguée mais leur localisation cellulaire est encore incertaine, bien que certains résultats favorisent le stockage dans la vacuole et/ou dans le réticulum endoplasmique. Les flavonoïdes peuvent être libres ou glycosylés. Ils sont constitués de deux noyaux benzéniques aromatiques (A et B) liés par trois carbones en chaîne C6-C3-C6, (Fig. n°7) (Ghedira, 2005 ; Lilou *et al.*, 2008).

Selon le degré d'oxydation, les flavonoïdes sont classés en six classes : anthocyane, flavonol, flavone, flavanone, isoflavone, flavanol (Richard *et al.*, 2014).

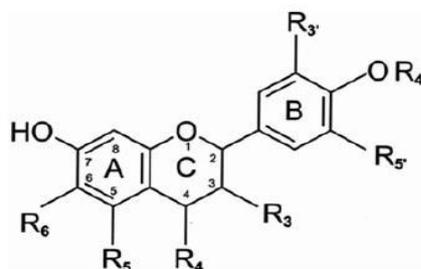


Figure n°7 : Structure de base des flavonoïdes (Lovegrove *et al.*, 2017).

- **Les tanins**

Les tanins sont des molécules à poids moléculaire élevé qui constituent le troisième groupe important des composés phénoliques. Ainsi, les tanins se réfèrent à l'acide tannique,

il est composé d'un glucose centrale et 10 groupes galloyl, ce sont des polyphénols solubles dans l'eau et sont présents dans les écorces des fruits de quelques plantes (**Gulçin et al., 2010**). Les tanins sont classés en deux grandes classes :

✓ **Les tanins hydrolysables** : sont des esters d'un sucre et d'un nombre variables d'acide phénoliques (Fig. n°8). Ce dernier peut être soit l'acide gallique qui forme les tanins galliques, soit l'acide hexahydroxydiphénique qui forme les tanins éllagiques (**Bruneton, 1999**).

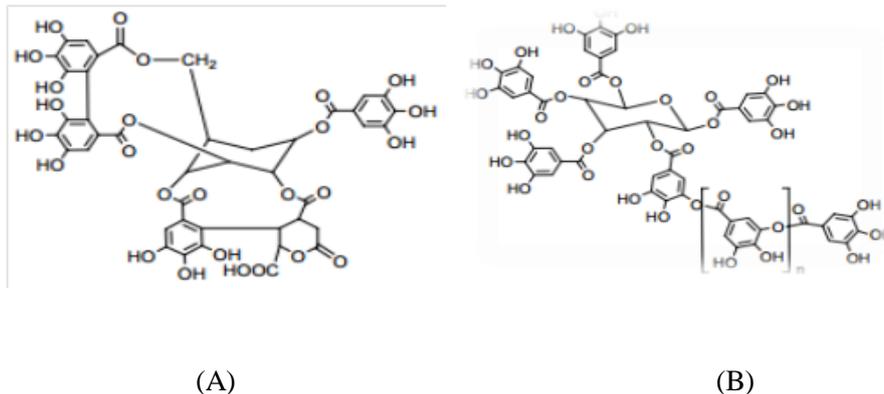


Figure n° 8 : Structure des tanins hydrolysables

(A): tanin gallique, (B) : tanin éllagique (**Peronny, 2005**).

✓ **Les tanins condensés** : Les tanins condensés sont des polymères d'unités flavaniques, le plus souvent liés par des liaisons C4-C8. Les précurseurs sont des flavan-3-ols (catéchine et épicatechine) et des flavan-3,4 diols (**Zimmer et Cordesse, 1996**).

- **Les stilbènes (C6-C2-C6)**

Les stilbènes se différencient par le nombre et les positions des fonctions hydroxyles sur les cycles phénoliques, la conjugaison avec des sucres et des groupements fonctionnels divers (méthyles, méthoxyes...) et la formation d'oligomères résultant de la condensation oxydative des monomères.

5. Méthodes de détermination de l'activité antioxydante *in vitro*

Il existe plusieurs méthodes qui facilitent la détermination de l'activité antioxydante d'une substance ou d'un extrait *in vitro*.

5.1. Test ABTS (acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique)

Cette méthode est basée sur la réduction du radical ABTS⁺ «2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique acide)» utilisé comme un radical libre pour évaluer l'activité antioxydant des échantillons (**Ozgen et al., 2006**).

5.2. Test de piégeage de 2,2-diphényl picrylhydrazyl (DPPH•)

Ce test est basé sur la mesure de l'aptitude d'un antioxydant à exercer un effet réducteur sur le radical libre DPPH• (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl). Le radical DPPH• est réduit en son hydrazine correspondant lorsqu'il réagit avec un donneur d'hydrogène. L'efficacité d'un antioxydant peut être mesurée par sa capacité à réduire le radical. Ceci s'observait historiquement par le changement de couleur allant du bleu-violet (forme oxydée) au jaune (forme réduite) (Milardovic *et al.*, 2006).

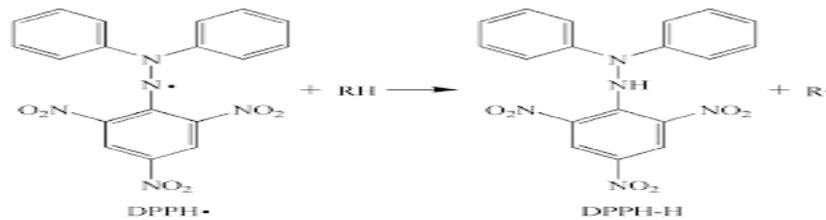


Figure n°9 : Modification du DPPH• par molécule d'hydrogène (Milardovic *et al.*, 2006).

5.3. Test de réducteur de fer (FRAP) : Ferric Reducing Antioxidant Power

Le test FRAP est une méthode basée sur le changement de coloration lors de la réduction du fer, de l'ion ferrique (Fe^{3+}) à l'ion ferreux (Fe^{2+}) par transfert d'électrons. De par la nature de la réaction de réduction, l'antioxydant doit présenter une capacité de donneur d'électron. Le transfert d'atome d'hydrogène ne sera pas le mécanisme privilégié. L'absorbance est mesurée à 593 nm (Topçu *et al.*, 2007).

5.4. Test de blanchissement du bêta-carotène

L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, ces radicaux libres provoquent par la suite l'oxydation du β -carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge qui absorbe à 490 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène (Barros *et al.*, 2007).

5.5. Test ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity

Le test ORAC est une méthode de mesure de la capacité antioxydante des échantillons biologiques *in vitro*. Cette méthode mesure la dégradation oxydative d'une molécule fluorescente après ajout d'un générateur de radicaux libres, le 2,2'-azobis (2-amidinopropane) (AAPH). La dégradation thermique de cette molécule en présence d'oxygène va provoquer la génération de radicaux libres de façon régulière qui vont pouvoir attaquer la membrane des globules rouges (OU *et al.*, 2001).

5.6. Méthode de TRAP (Total radical-trapping antioxidant parameter)

Cette méthode est basée sur la protection fournie par les antioxydants sur la décroissance de la fluorescence de la R-phycoérythrine (R-PE) au cours d'une réaction de peroxydation contrôlée. La fluorescence de R-phycoérythrine est désactivée par ABAP (2,2'-azo-bis (2-amidino- propane) de chlorhydrate en tant que générateur de radicaux. Le potentiel antioxydant est évalué en mesurant la décroissance de la décoloration selon (Nur Alam *et al.*, 2013).

5.7. Test de Capacité antioxydant totale (TAC)

La capacité antioxydante totale (TAC) des extraits des plantes est évaluée par la méthode de Phosphomolybdène. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdène Mo(V) MoO^{2+} en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/Mo(V) à pH acide (Prieto *et al.*, 1999).

5.8. Test de Piégeage du radical superoxyde ($\text{O}_2\cdot^-$)

Cet essai évalue la capacité d'un produit à capter un radical libre, l'anion superoxyde $\text{O}_2\cdot^-$. Ce radical est généré *in vitro* par le système hypoxanthine/xanthine oxydase. Dans cette méthode, le radical réduit le NBT^{2+} (Nitro-Blue Tétrazolium) de couleur jaune, en bleu de formazan de couleur pourpre qui absorbe à 560 nm. Ainsi un composé antioxydant capable de capter l'anion superoxyde empêchera la formation du bleu de formazan et la solution restera jaune. Les absorbances obtenues permettent de calculer un pourcentage d'inhibition de la réduction du NBT^{2+} par rapport à un témoin constitué du milieu réactionnel dépourvu de composé antioxydant (Parejo *et al.*, 2002).

1. Généralités

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme. Elles sont utilisées aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie, elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus.

La définition d'une plante médicinale est très simple. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (Farnsworth *et al.*, 1986).

Dans un état de stress l'apport d'un système de défense antioxydant est nécessaire, ainsi les antioxydants de synthèses ou naturels assurent la protection et la prévention contre les espèces oxygénées actives. Cependant, les antioxydants synthétiques sont susceptibles de causer des effets indésirables, de ce fait, les scientifiques se tournent vers les soins à base de plantes qui sont moins agressifs et bien acceptés par l'organisme. En effet, les plantes représentent une source inépuisable de principes actifs (Iserin, 2001 ; Adida *et al.*, 2016).

L'activité biologique des plantes est due principalement à leur aptitude à synthétiser des métabolites secondaires, ces derniers sont dotés de pouvoir analgésique, antifongique, anticancéreux, anti-inflammatoire et antiviral, en plus de leur propriété antioxydante (capture de radicaux ou chélation des métaux). L'évaluation de ses activités et principalement l'activité antioxydante demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études (Jaccot et Campillo, 2003 ; Ghedira, 2005 ; Benhammou, 2012 ; Kabera *et al.*, 2014).

Parmi les espèces végétales les plus utilisées pour leurs propriétés thérapeutiques, les feuilles de *Punica granatum* et *Prunus cérasus*.

2. *Punica granatum* (grenadier)

2.1. Description botanique de la plante

Le grenadier, famille des puniacées, est un arbre ou arbuste des régions méditerranéennes qui peut atteindre 2 à 5 m de hauteur, légèrement épineux, au feuillage caduc opposées luisantes et mesurent de « 7 cm de long sur 2 cm de large », Ses fleurs rouge vif mesurent 3 cm de diamètre. Ses fruits (les grenades), contiennent en moyenne 600 graines pulpeuses (Bridel *et al.*, 2004 ; Lairini *et al.*, 2014).

a. Les feuilles

Les feuilles du grenadier sont caduques, opposées, et disposées sur les rejets. Caractérisées par la couleur verte foncée de la face supérieure et à nervure médiane nettement déprimée. La face inférieure, vert clair, montre une nervure médiane très saillante (Fig. n°10, A). Ces feuilles entières, brillantes, lancéolées, assez coriaces, présentent un limbe elliptique allongé, de 3 à 8 cm de long, de sommet obtus ou allongé, munies d'un court pétiole rougeâtre (Sheets *et al.*, 1994).

b. Les fleurs

Les fleurs axillaires, solitaires ou parfois disposées par deux, présentent un calice épais, coriace, tubuleux et turbiné à 6 lobes triangulaires. La corolle d'un rouge éclatant est formée de 5 à 7 pétales. Les fleurs sans odeur sont sèches, de saveur astringente et donnent à la salive une teinte violacée. Elles sont très ornementales, de couleur grenade, pourpre ou rouge, portés par un court pédoncule réunis au sommet des branches ou plus par groupe de deux ou trois, et s'ouvrent de mai à juillet (Fig. n°10, B) (Sheets *et al.*, 1994).

c. Le fruit**• La baie**

Le fruit du grenadier nommé grenade, est une baie ronde à écorce dur, sa taille est d'une pomme ou d'une orange, son diamètre varie entre de 2 à 12 cm, elle est divisée en neuf loges dont les cloisons membraneuses partent du réceptacle et renferment des semences entourées d'une pulpe succulente, ordinairement rougeâtre (Sheets *et al.*, 1994 ; Iserin, 2001; Fabre et Ermosilla, 2008).

• Les graines

C'est la partie comestible du fruit. Cette baie renferme de nombreuses graines contenues dans des loges, séparées par des cloisons ténues et membraneuses. Toutes ces graines possèdent un mésocarpe charnu et gélatineux, acidulé et sucré composé d'un tégument externe pulpeux et très succulent, et un tégument interne dur et coriace, courtement funiculées, deviennent plus ou moins anguleuses par compression réciproque (Fig. n°10, C) (Bärtels, 1998 ; Iserin, 2001; Fabre et Ermosilla, 2008).

d. L'écorce

L'écorce du fruit de grenadier est la partie externe et dure du fruit. La couleur de la face extérieure dépend de la variété, brillants, la face intérieure généralement jaunâtre, concave, portant l'empreinte des graines qui y étaient appliquées, de saveur amère et astringente (Sheets *et al.*, 1994).



(A)



(B)



(C)

Figure n°10 : Feuilles (A) Fleurs (B), Fruits et Graine (C) de *P. granatum* (Wikipedia, 2018)

2.2. Classification

Punica granatum est classée selon la systématique suivante :

- × **Règne:** Végétale
- × **Embranchement:** Phanérophytes
- × **Sous Embranchement:** Angiospermes
- × **Classe:** Dicotylédones
- × **Sous classe:** Gamopétales
- × **Ordre:** Myrtiflorales
- × **Famille:** Punicacées (*Lythracées*)
- × **Genre:** *Punica*
- × **Espèce:** *Punica granatum* (Quezel et Santa, 1963 ; Bridel et *al.*, 2004; Spichiger et *al.*, 2009).

2.3. Composition chimique de *P. granatum*

La grenade est très proche de la figue fraîche et de la mangue par sa valeur énergétique et sa teneur en glucides. Elle est très sucrée, mais la présence d'acide citrique la rend également acidulée. La grenade est aussi une source non négligeable de vitamine C et de nombreuses vitamines du groupe B, et plus particulièrement de la vitamine B6, également connue sous le nom de pyridoxine.

P. granatum est riche aussi en polyphénols (tanins, flavonoïdes, anthocyanes...) et d'autres composés tels que les alcaloïdes ainsi que les acides organiques, les acides aminés, les stéroïdes, et de nombreux oligo-éléments et minéraux, tels que le potassium, phosphore, calcium, magnésium, fer, zinc et cuivre (**Lansky et Newman, 2007 ; Syed et al., 2007 ; Bekir et al., 2013**).

Les feuilles de cette plante sont riches en polyphénols, flavonoïdes, tanins elles contiennent également des glycosides d'apigénine, une flavone à progestatif. Elle contiennent aussi des gallotannins, le 1,2,4-tri-O-galloyl- β -glucopyranose et le 1,3,4-tri-O-galloyl- β -glucopyranose ainsi que les ellagitannins jusqu'alors inconnus, 1, Le 4-di-O-galloyl-3,6-(R)-hexahydroxydiphényl- β -glucopyranose et le sulfate de 10-monopotassium de l'acide brevifoline carboxylique (**Sahara et al., 1997 ; Zand et al., 2000**).

2.4. Activités thérapeutiques de *P. granatum*

Le grenadier a été utilisé depuis des siècles pour ses vertus thérapeutiques. Toutes les parties de grenadier (fruits, écorce, racines, feuilles, tronc...) semblent avoir des propriétés thérapeutiques bénéfiques. En médecine Ayurvedique, le grenadier est considéré comme «une pharmacie en soi », il a été utilisé comme agent antiparasitaire, un « tonique sanguin », pour traiter les aphtes, les diarrhées et les ulcères. Le grenadier a servi aussi de remède pour le diabète dans le système Unani de la médecine pratiquée au moyen orient et en Inde. Les propriétés thérapeutiques potentielles du grenadier sont très variées et incluent le traitement et la prévention du cancer, les maladies cardiovasculaires, le diabète, le dysfonctionnement érectile et protection contre les radiations ultraviolettes. Ces activités thérapeutiques sont attribuées à différents mécanismes. La plupart des recherches se sont concentrées sur les propriétés antioxydantes, anticarcinogénique, anti-inflammatoire et antidiabétique du grenadier (**Jurenka, 2008**).

2.5. Activité antioxydante de *P. granatum*

Des études *in vitro* ont montré que le jus de grenade a une capacité antioxydante 2 à 3 fois supérieur que celle du thé vert ou du vin rouge en piégeant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif des macrophages et la peroxydation lipidique chez les animaux. Dans le jus de grenade, les principaux polyphénols antioxydants sont les ellagitannins et les anthocyanines. Les ellagitannins comptent pour 92% de l'activité antioxydante du jus de grenade et sont concentrés dans l'écorce, les membranes et les moelles du fruit (**Seeram et al., 2004 ; Basu et Penugonda, 2009**).

D'autres études ont montré aussi que les feuilles de *P. granatum* ont une forte capacité antioxydante. Les activités biologiques importantes des feuilles pourraient constituer une source potentielle de molécules actives destinées à des applications dans l'industrie pharmaceutique (**Bekir et al., 2013**).

3. *Prunus cerasus* (cerisier)

3.1. Description botanique de la plante

Prunus cerasus est un arbre de petite taille ne dépassant pas 10 m, produisant des cerises acides. Elle appartient à la famille des rosacées. Cette espèce est originaire de la région de la mer Caspienne, de l'Asie Mineure et d'Europe. On distingue les cerises plus ou moins tendres à jus coloré [griottes, morelles (griotte du Nord...)], et les cerises molles à jus clair [amarelles (cerise de Montmorency...)] (**Claverie, 2005 ; Tavaud, 2002**).

a. Feuilles

Les feuilles sont caduques, simples et alternes et présentent un pétiole court sur toute la longueur des tiges. Elles mesurent de 5 à 18 cm de longueur, et sont étroitement ovales à lancéolée et à une extrémité aiguë. Les bordures comportent de nombreuses dentelures fines, pointant vers l'avant et incurvées vers l'intérieur (Fig n°11, A) (**Coutenceau, 1962**).

b. Fleurs

Les fleurs blanches à cinq pétales sont verticillées en grappes lâches composées de nombreuses fleurs à court pédoncule de chaque côté d'une tige centrale à l'extrémité de nouvelles pousses feuillues (Fig n°11, A) (**Fauré et Bretaudeau, 2008**).

c. Fruits

Le fruit du cerisier est une drupe, c'est-à-dire un fruit charnu à noyau qui dérive d'un ovaire infère à un carpelle, situé dans un conceptacle caduc. La partie externe du péricarpe (mésocarpe) est charnue, la partie interne (endocarpe) est lignifiée (noyau) (Fig n°11, B) (**Coutenceau , 1962**).



(A)



(B)

Figure n°11: Feuilles, Fleurs (A) et Fruits (B) de *Prunus cerasus* (Wikipedia, 2018)

3.2. Classification

Prunus cerasus est classée selon la systématique suivante :

- × **Règne** : Végétale
- × **Embranchement** : Spermatophytes (plantes à graine)
- × **Sous embranchement** : Angiospermes (plantes à fleurs)
- × **Classe** : Dicotylédones
- × **Sous classe** : Rosidae
- × **Ordre** : Rosales
- × **Famille** : Rosacée
- × **Genre** : *Prunus*
- × **Espèces** : *Prunus cerasus* (Potter *et al.*, 2007 ; Blamey et Grey-Wilson, 2003)

3.3. Composition chimique de *Prunus cerasus*

Les cerises acide (*P. cerasus*) sont une source importante de fer et de vitamine A et riche en fructose, glucose (sucres) et de la lutéine. La douceur de la cerise est principalement due à sa teneur en glucose et fructose, alors que son acidité est le résultat de sa concentration en acide chlorogénique, avec notamment l'acide malique.

Parmi les polyphénols identifiés dans la cerise (douce ou acide), il y a des hydroxycinnamates (acide néochlorogénique et acide p-coumaroyquinique), des flavonols, des flavan-3-ols (catéchine, épicatechine, quercétine 3-glucoside, quercétine 3-rutinoside et kampférol 3-rutinoside). L'analyse des différents extraits des feuilles de *P. cerasus* a révélé deux groupes principaux de polyphénols: les acides phénoliques et les flavonoïdes, y compris l'épigallocatechine et les glycosides de la quercétine et du kaempférol. Quatre nouveaux glycosides de flavonols provenant de feuilles et de fruits frais de cerises aigres-douces (*Prunus avium* et *P. cerasus*) sont considérés comme des flavonoïdes mineurs: le 3-O-rutinosyl-7,3'-O-bisglucoside de la quercétine; deux 3-O-rutinosyl-4'-di-O-glucosides de quercétine; le kaempférol 3-O-rutinosyl-4'-di-O-glucoside (**Henning et Herrmann, 1980 ; Ferretti et al., 2010 ; Agnieszka Nowak et al., 2016**).

3.4. Activités thérapeutiques de *P. cerasus*

En phytothérapie *P. cerasus* est une plante qui améliore le fonctionnement intestinal (léger effet laxatif) et hépatique (antioxydant et anti-inflammatoire), elle offre une action diurétique (élimination des urines grâce à sa richesse en potassium).

Cette plante facilite la digestion (présence de fibres en quantité importante dans la pulpe), soulage les malades souffrant de problèmes cardiovasculaires (réduit l'inflammation et permet la récupération musculaire) et aussi les douleurs liées à l'arthrite, de plus elle ralentit la croissance des cellules cancéreuses (action des composés phénoliques), prévient l'apparition de tumeurs cancéreuses (actions des anthocyanes contenus dans la pulpe) et inhibe l'oxydation du mauvais cholestérol (LDL) de 70 à 99% (**Dr Jörg Grüwald et Christof Jänicke , 2004 ; Jacques Fleurentin, 2013**).

3.5. Activité antioxydante de *P. cerasus*

Les queues (pédoncules) de cerises sont utilisées depuis des siècles en phytothérapie pour leur action diurétique sans effets secondaires. Les queues de cerises permettent de nettoyer l'ensemble de l'organisme, en éliminent les toxines accumulées dans le corps. Cette action s'obtient grâce aux antioxydants naturels (flavonoïdes) et aux sels de potassium

contenus dans les pédoncules qui favorisant l'élimination aussi bien urinaire que digestive et combattent par ce fait l'effet des « jambes lourdes ». Les antioxydants présents dans les cerises sont aussi plus puissants que les vitamines E et C. Les feuilles de cette plante présente aussi une bonne activité antioxydante grâce a sa composition en polyphénols et surtout en anthocyanes (**Federica Blando et al., 2004 ; Ferretti et al., 2010**).

Notre étude expérimentale est réalisée au sein du laboratoire de recherche « Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique » de la faculté SNV-STU, département de biologie, université de Tlemcen.

Cette étude comporte trois parties (Fig. n°12) :

- ✗ **Partie 1** : Préparation et extraction du matériel végétal à partir des feuilles de *P. granatum* et de *P. cerasus*;
- ✗ **Partie 2** : Analyse photochimique et dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et des tanins condensés des différents extraits ;
- ✗ **Partie 3** : Etude de l'activité antioxydante des différents extraits par deux méthodes : la méthode de piégeage du radical DPPH• et la méthode de réduction du fer FRAP.

1. Matériel végétal

1.1. Récolte et préparation du matériel végétal

Les feuilles de *Punica granatum* sont récoltées à maturité le mois d'Octobre dans le village de TAGMA, commune de Ain-Fezza, alors que les feuilles de *Prunus cerasus* sont récoltées dans le village de TIZZI de la même commune, Wilaya de Tlemcen.

Les feuilles de ces deux plantes sont séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière, puis conservées jusqu'à leur utilisation.

Ces feuilles sont broyées juste avant leur utilisation jusqu'à l'obtention d'une poudre fine nécessaire pour la préparation de différents extraits.

1.2. Extraction du matériel végétal

L'extraction de la matière végétale est réalisée selon deux modes d'extraction (Fig. n°12):

a. Extraction sous reflux

- ✓ 5 g des feuilles broyées de *P. granatum* et *P. cerasus* sont mis séparément en contact avec 100 mL d'une solution aqueuse de méthanol (30/70: v/v) ;
- ✓ Les deux mélanges sont portés à une extraction sous reflux et sous agitation pendant 1heure ;
- ✓ Après refroidissement, les mélanges obtenus sont filtrés ;
- ✓ Les filtrats sont évaporés à sec à l'aide d'un rotavapeur à 40°C ;
- ✓ Les extraits secs récupérés sont conservés jusqu'à leur utilisation.

b. Extraction par macération

- ✓ 5 g des feuilles broyées de *P. granatum* et *P. cerasus* sont mis séparément en contact avec 100 mL d'une solution aqueuse d'acétone (30/70: v/v) ;
- ✓ Les deux mélanges sont laissés macérer sous agitation discontinue pendant 48 heures ;
- ✓ Les mélanges obtenus sont filtrés ;
- ✓ Les filtrats sont évaporés à sec à l'aide d'un rotavapeur à 50°C ;
- ✓ Les extraits secs récupérés sont conservés jusqu'à leur utilisation.

1.3. Calculs des rendements d'extraction

La quantité d'extraits secs obtenus à partir de la matière végétale exprime le rendement d'extraction calculé selon la formule :

$$Rdt (\%) = [(m_1 - m_2) / m_3] \times 100$$

Rdt : Rendement

*m*₁ : Poids du ballon rempli d'extrait (g);

*m*₂ : Poids du ballon vide (g);

*m*₃ : Poids de la matière végétale (g).

1.4. Les extraits étudiés

Les extraits testés dans ce travail sont :

- ✓ Extrait brut eau/méthanol de *P. granatum* (PGEM)
- ✓ Extrait brut eau/acétone de *P. granatum* (PGEAc)
- ✓ Extrait brut eau/méthanol de *P. cerasus* (PCEM)
- ✓ Extrait brut eau/acétone de *P. cerasus* (PCEAc)

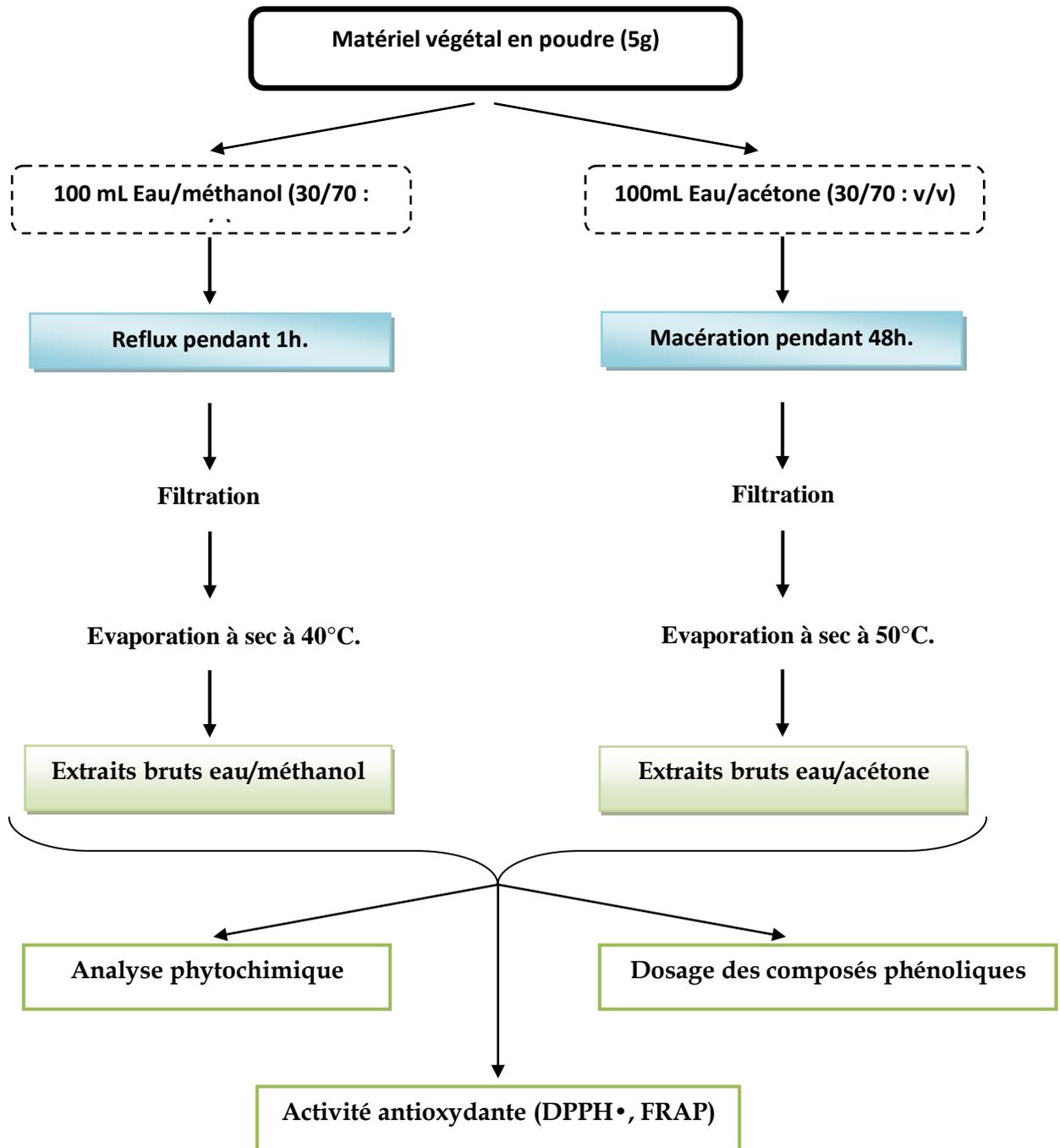


Figure n°12: Schéma récapitulatif du protocole d'extraction et expérimental réalisé sur les feuilles de *P. granatum* et *P. cerasus*

2. Analyses phytochimiques

Afin de connaître la composition globale des extraits étudiés, une série des tests phytochimiques à été réalisé en présence de certains réactifs spécifiques pour chaque classe de constituant.

✓ **Les tanins**

Dans un tube à essai, introduire 1 mL d'extrait à analyser et ajouter 0,25 mL d'une solution aqueuse de FeCl_3 (1%), le mélange est incubé pendant 15 min à température ambiante. La présence des tanins est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre (**Karumi et al., 2004**).

✓ **Les flavonoïdes**

Dans un tube à essai, introduire 1 mL d'extrait à analyser et ajouter 1 mL de HCl concentré et quelques copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rose ou rouge ou jaune prouve la présence des flavonoïdes (**Karumi et al., 2004**).

✓ **Les quinones**

Dans un tube à essai, introduire 1 mL d'extrait à analyser et ajouter 0,1 mL d'hydroxyde de sodium (NaOH à 1%). L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres (**Oloyede, 2005**).

✓ **Anthraquinones**

Dans un tube à essai, introduire 1 mL d'extrait à analyser et ajouter 1 mL de NH_4OH (10%) puis agiter. L'apparition d'une coloration violette indique la présence des anthraquinones (**Oloyede, 2005**).

✓ **Les coumarines**

Introduire 1 mL de l'extrait à analyser dans deux tubes à essai, prendre le premier comme témoin et ajouter à l'autre 0,1 mL de NH_4OH (10%). Mettre deux taches sur un papier filtre et examiner sous la lumière UV à 366 nm. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines.

✓ **Les saponines : test de mousse**

Dans un tube à essai, introduire 10 mL de l'extrait à analyser, agiter fortement et laisser le mélange au repos pendant 15 min. Une hauteur supérieure à 1 cm de mousse indique la présence de saponines (**N'Guessan et al., 2009**).

✓ **Terpénoïdes : Test de Slakowski**

Dans un tube à essai, introduire 1 mL de l'extrait à analyser, ajouter 0,4 mL de chloroforme et 0,6 mL d'acide sulfurique concentré. La formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase indique la présence des terpénoïdes (**Edeoga et al., 2005**).

✓ **Les alcaloïdes**

Dans deux tubes à essai, introduire 0,5 mL de l'extrait à analyser. Acidifier le milieu par quelques gouttes d'HCl (1%) et ajouter 0,5 mL de réactif de Mayer dans le premier tube et 0,5 mL de réactif de Wagner dans le second tube. L'apparition d'un précipité blanc ou brun, respectivement, révèle la présence d'alcaloïdes (**Majob, 2003**).

✓ **Les composés réducteurs**

Ajouter 1 mL de liqueur de Fehling (0,5 mL réactif A et 0,5 mL réactif B) à 1 mL d'extrait à analyser et incubé l'ensemble 8 min dans un bain marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs. (**Edeoga et al, 2005**).

3. Dosage des composés phénoliques

3.1. Dosage des polyphénols totaux

a. Principe

La méthode utilisée est celle utilisant le réactif de Folin-ciocalteu .Ce dernier est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène. La coloration produite dont l'absorption maximum est comprise entre 725et 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans le milieu (**Boizot et Charpentier, 2006 ; Vermerius et Nicolson, 2006**).

b. Mode opératoire

- ✓ 0,1 mL de chaque extrait à une concentration de 1 mg/mL est mélangé avec 2 mL d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 2% ;
- ✓ Les tubes sont agités puis incubés pendant 5 min ;
- ✓ 100 μ L de réactif de Folin-Ciocalteu (1N) sont ajoutés au mélange ;
- ✓ Les tubes sont incubés pendant 30 min à température ambiante ;
- ✓ La lecture des densités optiques est réalisée contre blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 700 nm.
- ✓ Une gamme d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à différentes concentration (0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 mg/mL).

3.2. Dosage des flavonoïdes

a. Principe

Le dosage des flavonoïdes est effectué selon la méthode utilisant le trichlorure d'aluminium (AlCl_3) et la soude (NaOH). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes. En milieu basique le complexe donne une couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm (Zhishen *et al.*, 1999 ; Ardestani et Yazdanparast, 2007).

b. Mode opératoire

- ✓ 500 mL de chaque extrait à une concentration de 1 mg/mL sont dilués avec 2 mL d'eau distillée ;
- ✓ 150 μL d'une solution de nitrite de sodium (NaNO_2) à 15% sont ajoutés au mélange ;
- ✓ Les tubes sont incubés pendant 6 min à température ambiante ;
- ✓ 150 μL de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) à 10% sont ajoutés ;
- ✓ Les tubes sont incubés pendant 6 min à température ambiante ;
- ✓ 2 mL d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4% sont ajoutés immédiatement et le volume total est ajusté à 5 mL avec l'eau distillée ;
- ✓ Les tubes sont agités, puis incubés pendant 15 min ;
- ✓ La lecture des densités optiques est réalisée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 510 nm.
- ✓ Une gamme d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différentes concentrations (0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 mg/mL).

3.3 Dosage des tanins condensés

a. Principe

Les quantités des tanins condensés sont estimées par la méthode utilisant la vanilline. En milieu acide, les tanins condensés se dépolymérisent et, par réaction avec la vanilline, se transforment en anthocyanidols de couleur rouge mesurable par spectrophotomètre à 500 nm (Sun *et al.*, 1998).

b. Mode opératoire

- ✓ 50 μL de chaque extrait à une concentration de 10 mg/mL sont mélangés avec 1500 μL d'une solution méthanolique de la vanilline (4%) ;
- ✓ Après agitation, un volume de 750 μL d' HCl concentré est additionné ;

- ✓ Le mélange est laissé réagir à température ambiante pendant 20 min ;
- ✓ La lecture de l'absorbance est réalisée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 550 nm ;
- ✓ Une gamme d'étalonnage est réalisée dans les mêmes conditions en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différentes concentrations (0,05 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1 mg/mL).

3.4. Expression des résultats

Les teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés, sont calculées selon la formule suivante :

$$T = a \cdot f / b$$

T : Teneur

a : Concentration à partir de la courbe d'étalonnage respective ;

f : Facteur de dilution ;

b : Concentration initiale de l'extrait.

4. Evaluation de l'activité antioxydante

4.1. Piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)

a. Principe

C'est une méthode largement utilisée dans l'étude de l'activité antioxydante. Le DPPH• (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. La présence de ces radicaux donne à la solution une coloration violette foncée qui absorbe aux environs de 517 nm. La réduction des radicaux DPPH• par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution (couleur jaune) et par conséquent une diminution de l'absorbance (Atoui *et al.*, 2005).

b. Mode opératoire

- ✓ 1950 µL de la solution méthanolique de DPPH• ($6,34 \cdot 10^{-5}$ M), sont ajoutée à 50 µL de chaque extrait à différentes concentrations ;
- ✓ Pour chaque concentration, un blanc est préparé contenant 50 µL de chaque concentration d'extrait et 1950 mL de méthanol ;
- ✓ Pour le contrôle négatif, 50 µL du méthanol est mélangé avec 1950 µL de la solution de DPPH• ;
- ✓ Les séries des tubes sont incubés à l'obscurité pendant 30 min à température ambiante ;
- ✓ La lecture des densités optiques est réalisée contre les tubes blancs à l'aide d'un spectrophotomètre à 515 nm ;

- ✓ L'acide ascorbique, le BHA et le BHT sont utilisés comme contrôles positifs dans les mêmes conditions expérimentales à différentes concentrations (0,025 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 et 0,5 mg/mL).

c. Expression des résultats

- ✓ **Calcul des pourcentages d'inhibition**

Les résultats du test DPPH• sont exprimés en pourcentage d'inhibition calculé à partir de la formule suivante :

$$\% I = [(AC - AE) / AC] \times 100$$

% I: Pourcentage d'inhibition.

AC: Absorbance du contrôle.

AE: Absorbance de l'échantillon.

- ✓ **Calcul des IC₅₀ et de l'activité antiradicalaire**

L'IC₅₀ (concentration inhibitrice de 50%) est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH•.

Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions logarithmiques ou linéaires des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés. Ainsi, l'activité antiradicalaire (AAR) est déterminée en calculant l'inverse des valeurs des IC₅₀ (Maisuthisakul *et al.*, 2007 ; Fabri *et al.*, 2009 ; Scherer *et al.*, 2009).

$$AAR = 1/IC_{50}$$

4.2. Réduction du fer par la méthode FRAP (ferric Reducing Antioxydant Power)

a. Principe

Le pouvoir réducteur détermine la capacité des antioxydants présents dans les extraits de plantes à réduire le fer ferrique du complexe ferricyanure (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺). Cette réduction se traduit par une coloration verte dont l'intensité est proportionnelle au pouvoir réducteur. L'absorbance est lue à 700 nm (Topçu *et al.*, 2007).

b. Mode opératoire

- ✓ 2,5 mL de l'extrait à différentes concentrations, sont mélangés avec 2,5 mL du tampon phosphate (0,2M ; pH 6,6) ;
- ✓ 2,5 mL de ferricyanure de potassium à 10% sont ajoutés au mélange précédent ;
- ✓ Le mélange obtenu est incubé à 50°C pendant 20 min ;

Matériel et méthodes

- ✓ Ensuite, 2,5 mL d'acide trichloroacétique (TCA) à 10% sont ajoutés ;
- ✓ Après centrifugation pendant 10 min à 3000 rpm, un aliquote de 2,5 mL du surnageant est mélangé avec 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL d'une solution aqueuse de FeCl₃ à 0,1%.
- ✓ La lecture des absorbances du milieu réactionnel est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à 700 nm contre un blanc.
- ✓ L'acide ascorbique, le BHA et le BHT sont utilisés comme contrôles positifs dans les mêmes conditions expérimentales à différentes concentrations (0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 et 1 mg/mL).

d. Expression des résultats

Pour la méthode FRAP, une augmentation de l'absorbance indique l'augmentation du pouvoir réducteur du fer par les échantillons testés (extraits ou contrôle positif).

A fin de comparer entre ces échantillons, le paramètre calculé est l'EC₅₀ (Efficience Concentration) ou concentration efficace qui indique la concentration de l'échantillon nécessaire pour obtenir une absorbance de 0,5 sur les graphes [Absorbances=f(concentrations)] à 700 nm (Ferreira *et al.*, 2007 ; Tamuly *et al.*, 2014).

1. Rendements des extractions

Le tableau n°2 représente le rendement, l'aspect, la couleur ainsi que le solvant de solubilité des différents extraits des feuilles de *P. granatum* et *P. cerasus*.

Tableau n°2: Rendements et quelques caractéristiques des extraits étudiés

	Extraits des feuilles de <i>P. granatum</i>		Extraits des feuilles de <i>P. cerasus</i>	
	Eau/MeOH	Eau /Acétone	Eau/MeOH	Eau /Acétone
Rendement	36%	36%	16%	21%
Aspect	Pâte	Pâte	Pâte	Pâte
Couleur	Jaune	Jaune	Marron	Marron
Solubilité	Méthanol	Méthanol	Méthanol	Méthanol

D'après le tableau n°2, on remarque que les deux extraits, eau /MeOH et eau /Acétone des feuilles de *P. granatum* donnent des rendements identiques (36%) et aussi les mêmes caractéristiques de couleur (jaune) et d'aspect (pâte).

Pour les feuilles de *P. cerasus*, l'extrait eau/Acétone donne un rendement élevé par rapport à celui de l'extrait eau /MeOH. Par ailleurs les deux extraits ont la même couleur (marron) et le même aspect.

Ainsi, les quatre extraits étudiés sont solubles dans le méthanol.

2. Analyses phytochimiques

En présence des réactifs spécifiques, la détection des différentes familles de composés, se traduit par l'apparition d'une turbidité, floculation, précipitation ou changement de couleur qui nous renseigne sur la nature chimique des constituants existants dans la plante.

Les résultats de l'analyse phytochimique réalisée sur les différents extraits des plantes étudiées donnent les résultats indiqués dans le tableau n°3.

D'après le tableau n°3, on remarque que les extraits bruts eau /MeOH et eau /Acétone de *P. granatum* sont très riches en tanins, flavonoïdes et en composés réducteurs. Par contre, sont dépourvus d'alcaloïdes, quinones libres, coumarine, anthraquinones, terpénoïdes et en saponines.

Par ailleurs, les extraits bruts eau /MeOH et eau /Acétone de *P. cerasus* sont très riches en tanins, flavonoïdes, quinones libres, terpénoïdes et en composés réducteurs mais sont dépourvus d'alcaloïdes, coumarines, anthraquinones et des saponines.

Résultats et interprétation

Tableau n°3 : Résultat de l'analyse phytochimique réalisé sur les feuilles de *P. granatum* et *P. granatum*

	Extraits des feuilles de <i>P. granatum</i>		Extraits des feuilles de <i>P. cérasus</i>	
	Eau/MeOH	Eau /Acétone	Eau/MeOH	Eau /Acétone
Tanins	+++	+++	+++	+++
Flavonoïdes	+++	+++	+++	+++
Quinone libre	-	-	++	++
Coumarines	-	-	-	-
Anthraquinones	-	-	-	-
Terpénoïdes	-	-	++	++
Saponines	-	-	-	-
Alcaloïdes Mayer	-	-	-	-
Wagner	-	-	-	-
Composés réducteurs	+++	+++	+++	+++

(+++): Test fortement positif ; (++) : Test moyennement positif ; (-) Test négatif

3. Teneurs en composés phénoliques

Les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés des différents extraits sont calculées à partir des courbes d'étalonnage représentées sur les figures n°13,14 et 15.

Les teneurs en composés phénoliques sont exprimées en milligramme équivalent acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/gE) pour les polyphénols totaux et en milligramme équivalent catéchine par gramme d'extrait (mg EQC/gE) pour les flavonoïdes et les tanins condensés. Les teneurs obtenues sont données dans le tableau n°4.

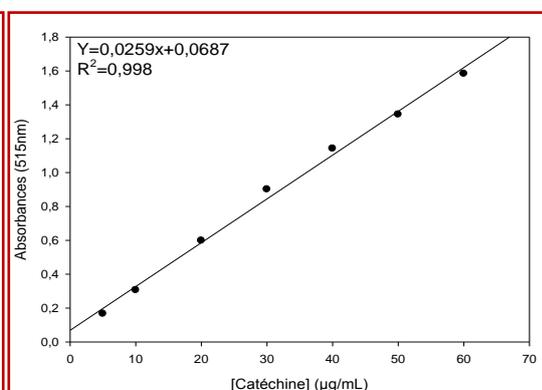
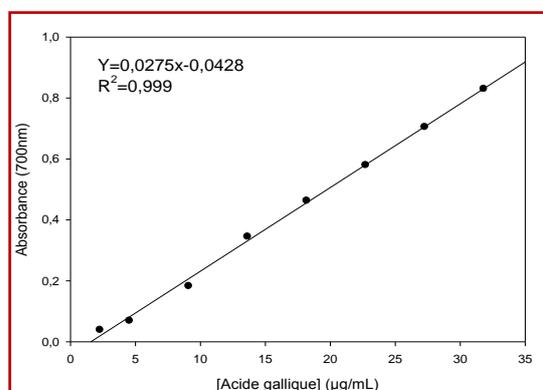


Figure n°13 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Dosage des polyphénols totaux) (n=3) Figure n°14: Courbe d'étalonnage de la catéchine (Dosage des flavonoïdes) (n=3)

Résultats et interprétation

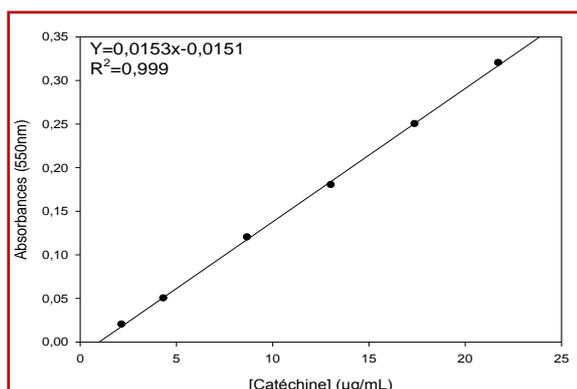


Figure n°15 : Courbe d'étalonnage de la catéchine
(Dosage des tanins condensés) (n=3)

Tableau n°4: Teneurs de différents composés phénoliques dans les extraits de *P. granatum* et *P. cerasus*

	Extraits des feuilles de <i>P. granatum</i>		Extraits des feuilles de <i>P. cerasus</i>	
	eau/MeOH	eau/Acétone	eau/MeOH	eau/Acétone
Polyphénols totaux (mg EAG/gE)	835,62 ± 0,063	405,52 ± 0,56	548,24 ± 2,12	502,12 ± 5,74
Flavonoïdes (mg EQC/gE)	50,47 ± 0,31	30,10 ± 0,68	202,50 ± 0,56	206,89 ± 1,28
Tanins condensés (mg EQC/gE)	16,56 ± 0,00	13,56 ± 0,00	118,72 ± 0,062	133,83 ± 0,035

Chaque valeur représente la Moyenne ±ESM (n=3)

D'après le tableau n°4, l'extrait hydrométhanolique des feuilles de *P. granatum* préparé sous reflux, présente le taux le plus élevé en polyphénols totaux (835,62 ± 0,063 mg EAG/gE), alors que l'extrait hydroacétonique préparé par macération, présente la moitié de la teneur précédente (405,52 ± 0,56 mg EAG/gE).

L'extrait hydrométhanolique des feuilles de *P. cerasus* préparé sous reflux, contient une quantité assez importante de polyphénols totaux de 548,24 ± 2,12 mg EAG/gE proche à celle de l'extrait eau/acétone préparé par macération (502,12 ± 5,74 mg EAG/gE).

Le dosage des flavonoïdes donne des teneurs importantes et presque identiques au niveau des extraits hydrométhanolique et hydroacétonique des feuilles de *P. cerasus* de l'ordre de 202,50 ± 0,56 et 206,89 ± 1,28 mg EQC/gE, respectivement. Ces extraits présentent aussi des teneurs assez importantes en tanins condensés de l'ordre de 118,72 ± 0,062 et 133,83 ± 0,035 mg EQC/gE, respectivement. Alors que, les extraits des feuilles de *P. granatum* présentent des teneurs très faibles en flavonoïdes et en tanins condensés par rapport aux extraits précédents.

4. Activité antioxydante des extraits de *P. granatum* et *P. cerasus*

4.1 Piégeage du radical libre DPPH^{*}

La solution de DPPH^{*} sous forme radicalaire, présente une couleur violacée. Lorsqu'il réagit avec un agent réducteur (extraits, molécules de référence), la solution perd sa couleur initiale. Cette décoloration qui indique une activité de piégeage du composé testé, est dépendante du nombre d'électron récupérés par le radical.

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition et comparés aux molécules de références (acide ascorbique, BHA et BHT).

4.1.1. Piégeage du radical DPPH^{*} par les extraits des feuilles *P. granatum*

Les figures n° 16 et 17 représentent graphiquement les pourcentages d'inhibition des extraits bruts eau/méthanol et eau/acétone des feuilles de *P. granatum*, respectivement.

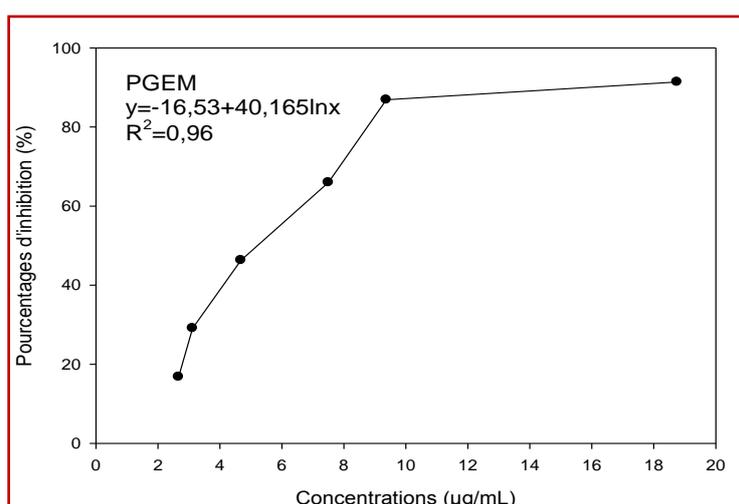


Figure n° 16 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH^{*} par l'extrait brut eau/méthanol des feuilles de *P. granatum* (n=3)

D'après la figure n°16, le pourcentage d'inhibition du radical DPPH^{*} augmente proportionnellement avec la concentration de l'extrait eau/méthanol et donne une allure logarithmique bien corrélée ($R^2=0,96$).

A une concentration de 3 µg/mL, le pourcentage d'inhibition est de l'ordre de 29%, alors qu'à une concentration supérieure à 9 µg/mL, le pourcentage d'inhibition augmente considérablement pour atteindre une valeur de 87% et passe à 91% à une concentration de 19 µg/mL.

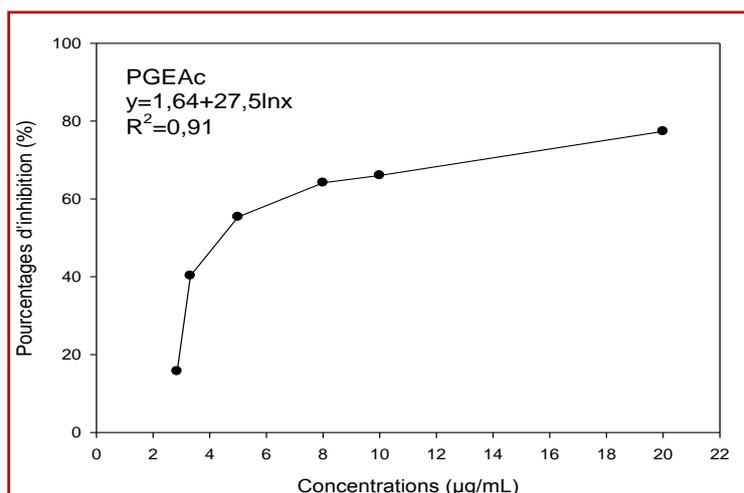


Figure n°17 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par l'extrait brut eau/acétone des feuilles de *P. granatum* (n=3)

D'après la figure n°17, les concentrations de l'extrait eau/acétone, donnent des pourcentages d'inhibition importants avec une régression logarithmique nettement corrélée ($R^2=0,91$). A une concentration de 3 µg/mL, le pourcentage d'inhibition est de l'ordre de 40% et passe à 66% à une concentration 10 µg/mL. Alors à la plus forte concentration (20 µg/mL), le pourcentage d'inhibition est de l'ordre de 77% contre 91% pour l'extrait précédent à 19 µg/mL.

4.1.2. Piégeage du radical DPPH• par les extraits bruts des feuilles de *P. cerasus*

Les représentations graphiques des pourcentages d'inhibition en fonctions des différentes concentrations des extraits bruts eau/méthanol et eau/acétone des feuilles de *P. cerasus*, sont données, respectivement dans les figures n° 18 et 19 .

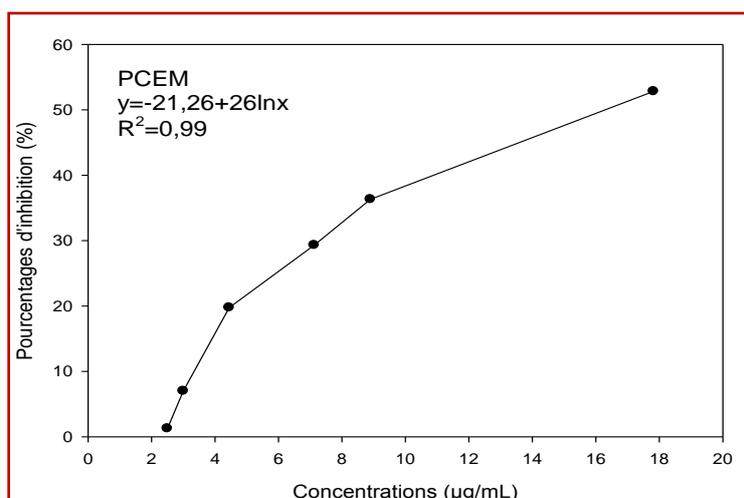


Figure n°18: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par l'extrait brut eau/méthanol des feuilles de *P. cerasus* (n=3)

Résultats et interprétation

Selon cette figure (18), l'extrait eau/méthanol à une concentration de 2,5 µg/mL présente un faible pourcentage d'inhibition du radical DPPH[•] (1,3%). Ce pourcentage augmente progressivement avec la concentration de l'extrait et passe à 20% pour une concentration supérieure à 4 µg/mL et 53% pour une concentration de 18 µg/mL à la fin de l'expérience.

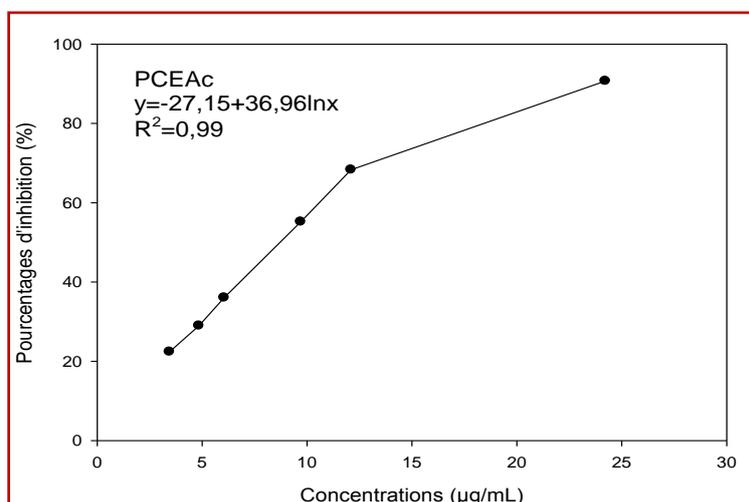


Figure n°19 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH[•] par l'extrait brut eau/acétone des feuilles de *P. cerasus* (n=3)

Les différentes concentrations de l'extrait eau/acétone, donnent des pourcentages d'inhibition importants par rapport au premier extrait.

Un pourcentage de 22% est donné à la plus faible concentration (3,45 µg/mL). Ce pourcentage augmente proportionnellement avec une régression logarithmique et passe à 36% à une concentration de 6 µg/mL, ensuite 91% de à la plus forte concentration (24 µg/mL).

4.1.3. Piégeage du radical libre DPPH[•] par les molécules de références

Les trois molécules de références (acide ascorbique, BHA et BHT), utilisées pour piéger le radical libre DPPH[•], donnent des pourcentages d'inhibition représentés sur la figure n°20 avec des régressions logarithmiques nettement corrélées.

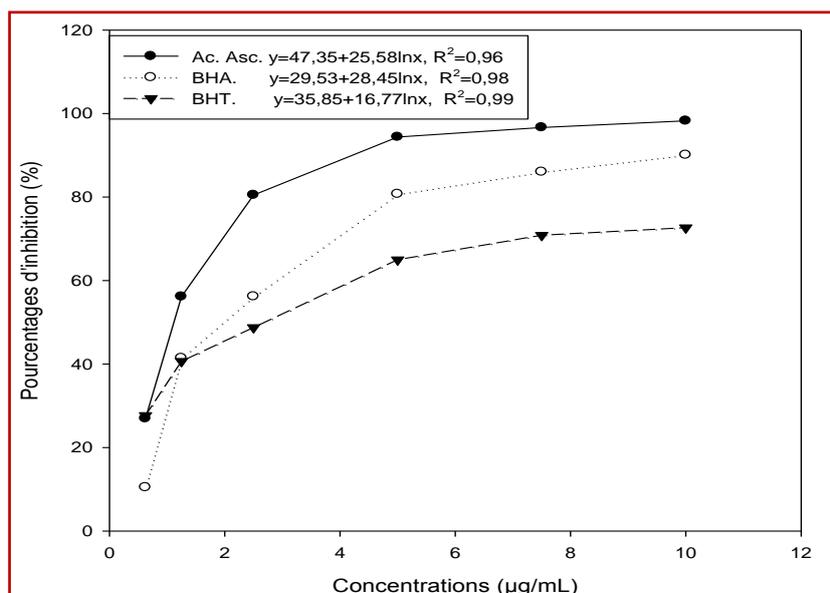


Figure n° 20 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par l'acide ascorbique, BHA et BHT (n=3)

D'après cette figure l'acide ascorbique présente la meilleure activité antioxydante reflétée par les pourcentages d'inhibition les plus élevés suivi de BHA et de BHT.

A la plus faible concentration (0,625 µg/mL), l'acide ascorbique et le BHT présentent des pourcentages d'inhibition très proches au alentour de 27%, alors que le BHA donne un pourcentage de 10%.

A une concentration moyenne de 5 µg/mL, le BHT donne le pourcentage d'inhibition le plus faible (65%), tandis que l'acide ascorbique et le BHA, donnent des pourcentages assez importants de 94% et 81% respectivement. A la fin de l'expérience, les pourcentages passent (98% et 90% et 73%) pour l'acide ascorbique, BHA et BHT respectivement

4.1.4. Calcul des IC₅₀ et de l'activité antiradicalaire

Afin de comparer entre l'activité antioxydante des extraits étudiés et les molécules de références, un paramètre couramment utilisé est l'IC₅₀, qui est la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH• dans une période de temps de 30 min.

Ces IC₅₀ sont calculées à partir des équations des régressions logarithmiques indiquées sur les graphes des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des échantillons (tableau n°5).

Résultats et interprétation

Tableau n°5 : Valeurs des IC₅₀ des différents extraits et des molécules de référence

Extraits	IC ₅₀ (µg/mL)
PGEM	5,24
PGEAc	5,80
PCEM	15,49
PCEAc	8,06
Acide ascorbique	1,10
BHA	2,02
BHT	2,33

Une valeur d'IC₅₀ faible correspond à une activité antioxydante élevée, ce qui indique, d'après le tableau n°5, que l'acide ascorbique présente la puissante activité antioxydante (IC₅₀=1,10 µg/mL) suivi de BHA (IC₅₀=2,02 µg/mL) et de BHT (IC₅₀=2,33 µg/mL).

Les extraits étudiés présentent des IC₅₀ importantes, ce qui signifie une activité antioxydante élevée, mais qui restent légèrement inférieures à celles des molécules des références.

En comparaison entre les différents extraits, l'extrait eau/méthanol des feuilles de *P. granatum* (PGEM), présente la meilleure activité antiradicalaire (IC₅₀=5,24 µg/mL) suivi de l'extrait eau/acétone de la même plante (PGEAc) (IC₅₀=5,80 µg/mL), alors que l'extrait eau/méthanol de *P. cerasus* (PCEM) présente la plus faible activité (IC₅₀=15,46 µg/mL).

Ainsi, l'activité antiradicalaire (AAR) qui présente l'inverse des IC₅₀ montre clairement la meilleure activité antioxydante sur la figure n°21.

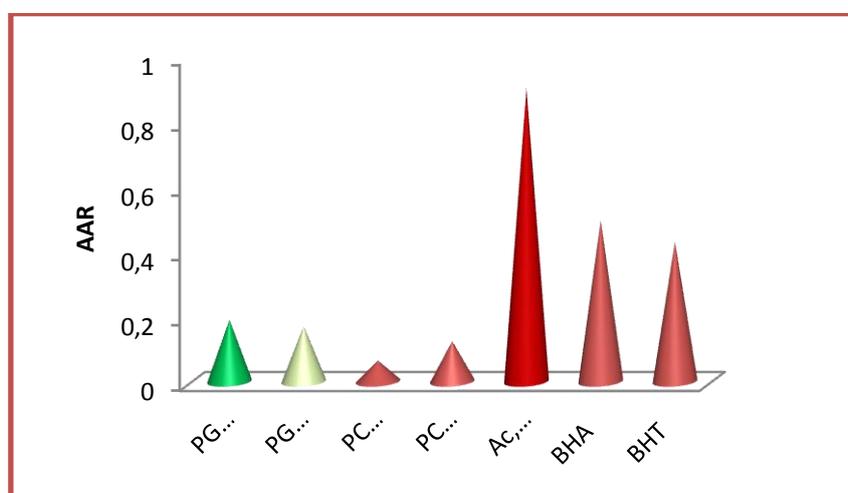


Figure n°21 : Activité antiradicalaire des différents extraits et des molécules de références

4.2. Pouvoir réducteur du fer (méthode FRAP)

4.2.1. Réduction du fer par les extraits bruts des feuilles de *P. granatum*

La figure n°22 et 23 présentent, respectivement l'évolution de la densité optique du milieu réactionnel en présence des concentrations croissantes des extraits bruts eau/méthanol et eau/acétone des *P. granatum*.

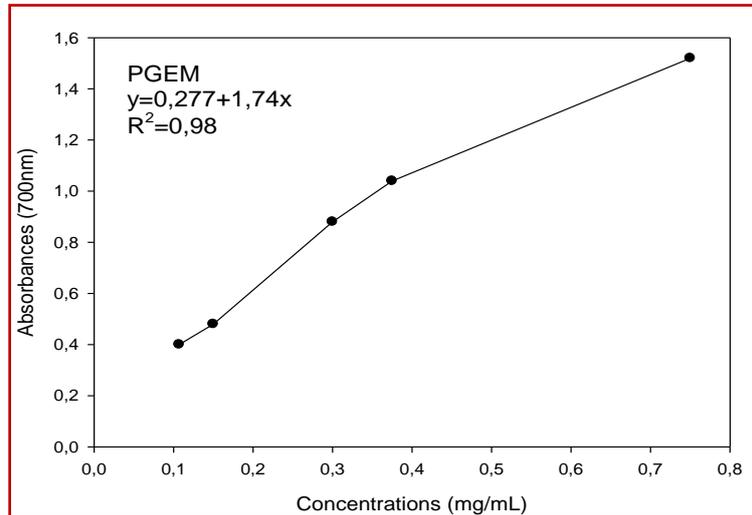


Figure n°22 : Pouvoir réducteur du fer de l'extrait brut eau/méthanol des feuilles de *P. granatum* (n=3)

Selon cette figure, on observe que les densités optiques et selon une régression linéaire augmentent proportionnellement avec les concentrations de l'extrait.

A une concentration de 0,10 mg/mL la densité obtenue est de 0,4 et qui passe à 0,88 puis 1,52 à une concentration de 0,30 et 0,75 mg/mL, respectivement.

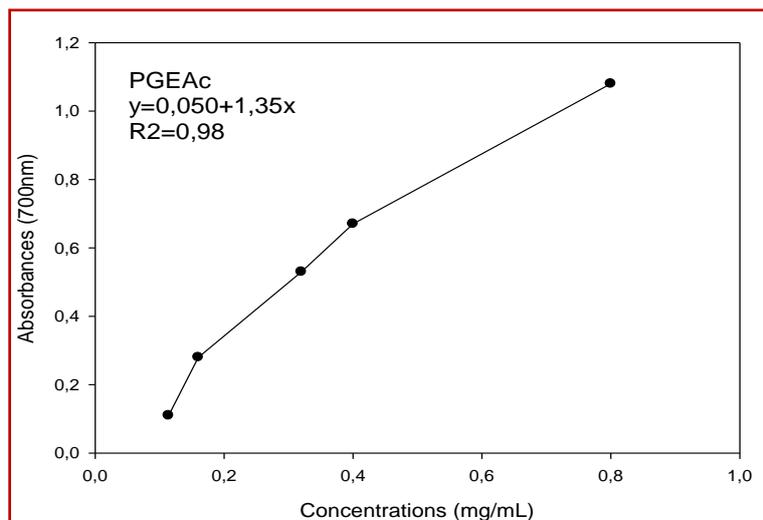


Figure n°23 : Pouvoir réducteur du fer de l'extrait brut eau/acétone des feuilles de *P. granatum* (n=3)

Résultats et interprétation

D'après la figure n° 23, des densités optiques relativement faibles par rapport au premier extrait, sont données par l'extrait eau/acétone des feuilles de *P. granatum* préparé par macération. A une concentration de 0,11 mg/mL la densité optique obtenue est de 0,11 et qui passe à 0,52 puis 1,08 à une concentration de 0,32 et 0,80 mg/mL, respectivement.

4.2.2. Réduction du fer par les extraits bruts des feuilles de *P. cerasus*

La figure n°24 et 25 présentent, respectivement l'évolution des densités optiques en fonction des concentrations croissantes des extraits bruts eau/méthanol et eau/acétone des *P. cerasus*.

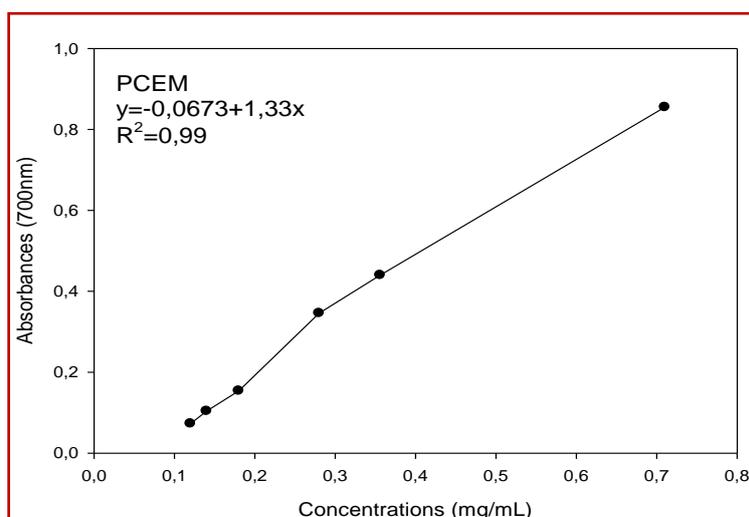


Figure n°24 : Pouvoir réducteur du fer de l'extrait eau/méthanol des feuilles de *P. cerasus* (n=3)

D'après la figure précédente de *P. cerasus*, des densités relativement faibles sont données par l'extrait eau/méthanol préparés sous reflux. Elles passent de 0,073 à 0,855 à des concentrations de 0,12 et 0,71 mg/mL, respectivement.

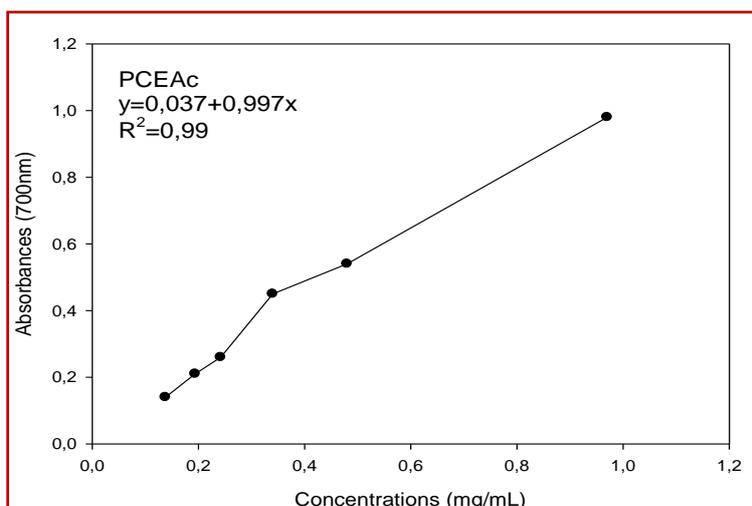


Figure n°25: Pouvoir réducteur du fer de l'extrait eau/acétone des feuilles *P. cerasus* (n=3)

Résultats et interprétation

D'après les résultats de la figure n°25, l'extrait eau/acétone dans les feuilles de *P. cerasus* présente aussi des densités qui ne dépassent pas la valeur de 1,00. Elles donnent une valeur de 0,14 à une concentration de 0,14 mg/mL au début de l'expérience et 0,98 à une concentration de 0,97 mg/mL à la fin de l'expérience.

4.2.3. Réduction du fer par les molécules de référence

Les trois molécules de références (acide ascorbique, BHA et BHT) utilisées pour réduire le fer donnent les résultats représentés sur la figure n°26.

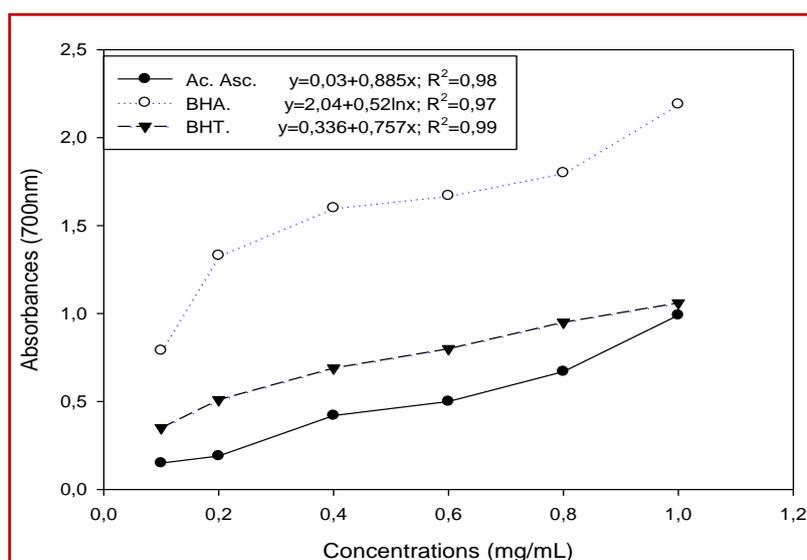


Figure n°26 : Pouvoir réducteur du fer par l'acide ascorbique, BHA et BHT (n=3)

Selon cette figure, on observe que le BHA présente le pouvoir réducteur le plus fort. Ce résultat est expliqué par les densités optiques relativement élevées par rapport à celles obtenues par le BHT et l'acide ascorbique.

4.2.4. Calcul des EC₅₀

Les EC₅₀, ou concentrations efficaces pour une densité de 0,5, sont calculées à partir des équations des régressions linéaires indiquées sur les graphes du pouvoir réducteur du fer et sont données dans le tableau suivant :

Résultats et interprétation

Tableau n°6 : Valeurs des EC₅₀ des différents extraits et des molécules de référence

Extraits	EC ₅₀ (mg/mL)
PGEM	0,127
PGEAc	0,333
PCEM	0,426
PCEAc	0,464
Acide ascorbique	0,53
BHA	0,05
BHT	0,21

D'après ce tableau, l'extrait eau/méthanol de *P. granatum* (PGEM), présente la plus faible EC₅₀ (0,127 mg/mL), par conséquent, le pouvoir réducteur le plus élevé. Cette capacité à réduire le fer est nettement supérieure à celle de BHT (EC₅₀=0,21 mg/mL) et de l'acide ascorbique (EC₅₀=0,53 mg/mL).

Le deuxième extrait qui présente un pouvoir réducteur élevé, est l'extrait eau/acétone de *P. granatum*, dont l'EC₅₀=0,333 mg/mL. Cette valeur est inférieure à celle de l'acide ascorbique (EC₅₀=0,53 mg/mL), ce qui indique une meilleure activité réductrice de cet extrait.

Les deux extraits de *P. cerasus* (PCEM et PCEAc), présentent des EC₅₀ très proches l'une de l'autre (0,426 et 0,464 mg/mL, respectivement). Ces valeurs sont inférieures à celle de l'acide ascorbique (EC₅₀=0,53 mg/mL), par conséquent un pouvoir réducteur élevé.

D'autre part, on note que le BHA (EC₅₀=0,05 mg/mL), présente le meilleur pouvoir à réduire le fer par rapport à l'acide ascorbique, le BHT et les extraits étudiés.

4.3. Comparaison entre les deux méthodes

D'après les résultats obtenus dans cette étude des extraits

Pour DPPH :

PGEM > PGEAc > PCEAc > PCEM

Pour FRAP :

PGEM > PGEAc > PCEM > PCEAc

Les molécules de référence

Pour DPPH

Ac. As > BHA > BHT

Pour FRAP :

BHA > BHT > Ac. As

P. granatum présente la plus forte teneur en polyphénols donc il ya une corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité antioxydante.

Discussion

Punica granatum et *Prunus cerasus* sont des plantes médicinales très répandues dans le bassin méditerranéen notamment en Algérie. Les fruits de ces deux plantes sont utilisés depuis des centaines d'années en médecine traditionnelle vu sa richesse en composés bioactifs.

Plusieurs parties de ces plantes ont été étudiées et différents types de phytoconstituants ont été identifiés dont la classe majoritaire sont les polyphénols (tanins, flavonoïdes, anthocyanes,...). Ces derniers sont des composés ubiquitaires des plantes répartis dans différents organes du fait de leur rôle dans la plante et occupant une place prépondérante dans le groupe des métabolites secondaires.

L'objectif de notre étude est porté sur une étude phytochimique des extraits des feuilles de *P. granatum* et de *P. cerasus* et aussi sur l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits précédents par la méthode de piégeage du radical DPPH• et la méthode FRAP.

L'analyse phytochimique des extraits eau/MeOH et eau /Acétone des feuilles de *P. granatum* révèle sa richesse en flavonoïdes, tanins et composés réducteurs dans les différents extraits, tandis qu'elle révèle sa pauvreté en alcaloïdes, quinone, coumarines et terpénoïdes. Ces résultats sont en accord avec les données bibliographiques qui montrent que les feuilles de grenadier sont une source de composés phénoliques (Wang *et al.*, 2013). Aussi les résultats de Zand *et al.* (2000), montrent que les feuilles de cette plante contiennent également des glycosides et des flavones. Ainsi, l'épicarpe de *P. granatum* est très riche en composés phénoliques et que la teneur de ces composés atteint un pourcentage de 42% (Chidambara *et al.*, 2002 ; Afaq *et al.*, 2005 ; Jaiswal, 2010). Par ailleurs, l'extrait de fruit entier de *P. granatum* est très riche en composés phénoliques et de sucres réducteurs (Vidal *et al.*, 2003).

L'analyse phytochimique des feuilles de *P. cerasus* révèle sa richesse en tanins, flavonoïdes, quinones libres, terpénoïdes et composés réducteurs mais ils sont dépourvus des alcaloïdes, coumarines, anthraquinones et saponines.

L'étude de Jan et Aneta, (2014) sur la même partie révèle sa richesse en flavonoïdes. Dans une autre étude de Jiping et ses collaborateurs, (2015), les fruits de *P. cerasus* sont riches en polyphénols (flavonoïdes et tanins) et en anthocyanes, en parallèle les fruits de *P. pseudocerasus* sont riches en flavonols.

L'analyse quantitative des polyphénols, flavonoïdes et des tanins condensés au niveau des extraits étudiés, donne des taux variables d'un extrait à un autre selon la plante et le

Discussion

solvant utilisé. Le taux maximal de polyphénols est obtenu au niveau de l'extrait eau/MeOH des feuilles de *P. granatum* préparé sous reflux ($835,62 \pm 0,063$ mg EAG/gE), alors que l'extrait eau/Acétone préparé par macération présente la moitié de la teneur précédente. Par contre ces extraits présentent les teneurs les plus faibles en flavonoïdes ($50,47 \pm 0,31$ mg EQC/gE et $30,10 \pm 0,68$ mg EQC/gE) et en tanins condensés ($16,56 \pm 0,00$ mg EQC/gE et $13,56$ mg $\pm 0,00$ EQC/gE).

Les travaux de Bekir *et al.* (2013), sur la même partie de cette plante montrent que la teneur en polyphénols totaux varie entre 8,8 à 127,3 mg EAG/g poids sec, en flavonoïdes entre 1,2 à 76,9 mg EQC/g de poids sec. Ces teneurs sont relativement faibles par rapport à nos résultats à l'exception des tanins qui donnent des valeurs entre 63,70 à 260,80 mg EQC/gE. Toujours dans les travaux de Bekir et ces collaborateurs sur le grenadier de Li *et al.* (2006) qui présente un taux de polyphénols de 249,40 mg EAG/gE /g. La teneur en flavonoïdes des graines et des écorces de grenade sont respectivement $17,2 \pm 3,3$ et $59,1 \pm 4,8$ mg EQ routine/g MS. Alors que l'extraction éthanolique des fleurs de grenadier donne un taux de polyphénols de 321,00 mg EAG/g (Kaur *et al.*, 2006).

D'autre part, les feuilles de *P. cerasus* donnent des taux de polyphénols très proches entre les deux extraits eau/MeOH et eau/Acétone de l'ordre de $548,24 \pm 2,12$ et $502,12 \pm 5,74$, respectivement. De même, les teneurs en flavonoïdes et en tanins condensés, sont assez importantes et presque identiques entre les deux extraits étudiés ($202,50 \pm 0,56$ et $206,89 \pm 1,28$ mg EQC/gE pour les flavonoïdes, respectivement) et ($118,72 \pm 0,062$ et $133,83 \pm 0,035$ EQC/gE pour les tanins, respectivement).

Les résultats obtenus sont comparables à ceux de Jan et Aneta, (2014) sur la même partie de cette plante et qui révèlent sa richesse en polyphenols. Le taux des composés phénoliques dans l'extrait des feuilles vertes est de 8737,13 mg, par contre dans les feuilles jaunes est de 10058,00 mg/100 g de MS. Ainsi, l'étude de Silivia *et al.* (2010), montre que le rendement en polyphénols totaux des deux extraits des fruits des deux variétés de cerise est plus élevé avec le méthanol par rapport à l'acétone et les teneurs sont comprises entre $70,6 \pm 8,46$ et $241,4 \pm 7,26$ mg EAG/100 g MS.

La richesse des feuilles de *P. granatum* et *P. cerasus* en composés phénoliques donne à ces plantes le pouvoir à exercer un effet antioxydant très importante selon les résultats obtenus dans cette étude.

Dans la méthode « FRAP », le profil de réduction de fer change d'un extrait à un autre, mais nous avons remarqué une augmentation proportionnelle de la réduction du fer

Discussion

avec l'augmentation des concentrations utilisées. De même les extraits eau/MeOH et eau/Acétone des feuilles de *P. granatum* présentent le meilleur pouvoir à réduire le fer ($EC_{50}=0,127$ et $0,333$ mg/mL, respectivement) par rapport aux extraits de *P. cerasus* ($EC_{50}=0,426$ et $0,464$ mg/mL, respectivement). En parallèle les quatre extraits étudiés présentent un pouvoir réducteur supérieur à celui de l'acide ascorbique.

Dans méthode « DPPH• », le profil de piégeage de ce radical change d'un extrait à un autre. De même les extraits eau/MeOH et eau/Acétone des feuilles de *P. granatum* présentent la meilleure activité antioxydante ($IC_{50}=5,24$ et $5,80$ µg/mL, respectivement) par rapport aux extraits de *P. cerasus* ($IC_{50}=15,49$ et $8,06$ µg/mL, respectivement). En parallèle les quatre extraits étudiés présentent une activité antioxydante inférieure à celle de l'acide ascorbique, BHA et BHT.

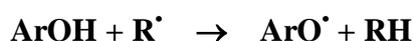
L'extrait méthanolique des feuilles de grenadier testé contre le radical DPPH• présente une IC_{50} de $5,62$ mg/L d'après l'étude de Bekir *et al.* (2013). Par ailleurs, l'étude de El-Fellah *et al.* (2009) sur la même partie de la plante et par la même méthode d'évaluation de l'activité antioxydante, donne une IC_{50} de $3,58 \pm 0,38$ µg/mL. D'autre part, les résultats de Wang *et al.* (2013), montrent des bonnes capacités de piégeage des radicaux DPPH• et ABTS par les feuilles de *P. granatum*. Ainsi, Negi et Jayaprakasha (2003), Zahin *et al.* (2010), ont rapporté que l'extrait d'écorce de la grenade présente une forte activité antioxydante par le test de DPPH•.

Des études précédentes de Silvia *et al.*, (2010), montrent que le pourcentage d'inhibition du radical DPPH• des extraits (Méthanol et Acétone) des fruits de cerises acides est de $5,4$ et $9,9\%$, respectivement.

D'après les résultats obtenus dans cette étude, il y a une bonne corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en polyphénols totaux. Ces derniers agissent comme des antioxydants **par la désactivation des radicaux libres dans les milieux biologiques via trois mécanismes (Boubekri, 2014) :**

✓ **Transfert d'atome d'hydrogène (HAT, hydrogen atom transfer)**

L'antioxydant phénolique agit avec le radical libre par transfert d'un atome d'hydrogène *via* la rupture homolytique de la liaison O-H.



Discussion

Les produits de cette réaction sont la forme réduite (RH) du radical néfaste, et le radical $\text{ArO}\cdot$ (forme oxydée de l'antioxydant). Bien que cette réaction donne naissance à un autre radical libre, celui-ci est moins réactif.

✓ Transfert mono-électronique d'électron (*SET, single electron transfer*)

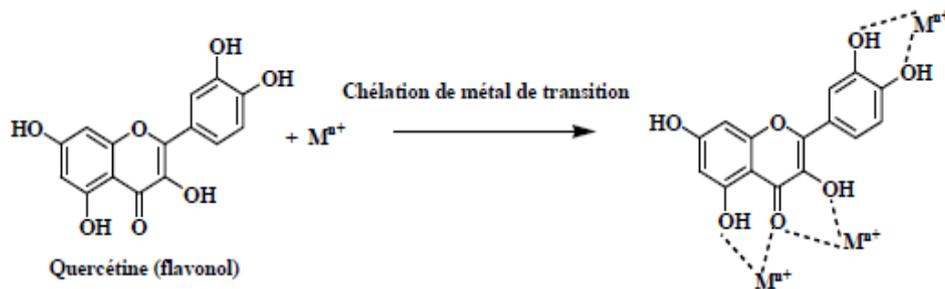
Dans ce mécanisme, un électron est transféré au radical libre $\text{R}\cdot$. L'anion R^- et le cation radical $\text{ArOH}^{+\cdot}$ ainsi formés sont généralement des entités stables.



Le potentiel d'ionisation est le facteur déterminant du pouvoir piègeur d'électrons. Un potentiel bas implique un arrachement facile d'électron et en conséquence une réaction avec le radical libre.

✓ La chélation des métaux de transition

C'est un mécanisme indirect. Il consiste à la chélation des métaux de transition tels que le fer ou le cuivre. Cette chélation sert à empêcher la réaction de Fenton dans les milieux biologiques.



Conclusion et perspectives

D'après les résultats obtenus dans cette étude, nous pouvons conclure que les feuilles de *P. granatum* et *P. cerasus* sont riches en composés phénoliques (polyphénols, flavonoïdes, tanins).

La teneur la plus élevée en polyphénols est obtenue dans l'extrait eau /MeOH des feuilles de *P. granatum* ($835,62 \pm 0,063$ mg EAG/gE), alors que celle des flavonoïdes et des tanins est obtenue dans l'extrait eau/Acétone des feuilles de *P. cerasus* ($206,89 \pm 1,28$ mg EQC/gE et $133,83 \pm 0,035$ mg EQC/gE, respectivement).

Concernant l'activité antioxydante, les résultats montrent que les extraits des feuilles de *P. granatum* présentent une activité antioxydante très puissante indépendante des tests (DPPH• et FRAP). L'extrait eau/MeOH de cette plante présente une IC_{50} de $5,24\mu\text{g/mL}$ vis-à-vis du radical DPPH• et une EC_{50} de $0,127$ mg/mL vis-à-vis du fer. Cette activité est bien corrélée avec la teneur en polyphénols totaux.

Ce travail ne constitue qu'une partie de la valorisation des plantes médicinales à activité antioxydante, cependant des études complémentaires sont nécessaires pour compléter ce travail notamment :

- Le changement du mode ainsi que du solvant d'extraction ;
- Une étude phytochimique approfondie afin de caractériser les différents constituants présents dans les feuilles de *P. granatum* et *P. cerasus* ;
- Séparation et identification de principes actifs par des techniques chromatographiques et spectrales telle que l'HPLC, à partir de ces deux plantes ;
- Une étude *in vivo* des molécules bioactives isolées serait souhaitable pour rechercher leurs mécanismes d'action au niveau tissulaire et moléculaire.

Référence bibliographiques

1. **Adida, H., Benariba, N., Bechiri, A., Chekroun, E., et Djaziri, R. (2016).** Étude phytochimique et évaluation du pouvoir antiradicalaire des extraits de *Pituranthos scoparius*, *Phytothérapie*, 14, 207-212.
2. **Afaq, f., Saleem, M., Krueger, C.G., Reed, J.D., et Mukhtar, H. (2005).** Anthocyanin-and hydrolysable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and FK-kappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *International Journal of Cancer*, 113, 423-33.
3. **Afons, V., Champy, R., Mitroic, D., Collin P et Lomri, A. (2007).** Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutase : rôle dans les maladies rhumatismales. *revue du rhumatisme*, 74, 636-643 .
4. **Agnieszka, N., Agata, C., Magdalena, E., et Lucjan, K. (2016).** Polyphenolic extracts of cherry (*Prunus cerasus* L.) and blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves as natural preservatives in meat products. *Food Microbiology*, 59, 142-149.
5. **Ahame, S. (2003).** Etude phytochimique et des activités biologiques de *Balanites aegyptiaca* L. (*Balanitaceae*). Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako : 117 P.
6. **Anne-Laure ,B., Vessela ,A-P., Jacques ,G., Barreau, C., et Forget-Richard ,F. (2007).** Analyse de facteur biochimique interagissant dans le processus de biosynthèse des TCTB. *Colloque Fusariotoxines des Céréales-Arcachon*.
7. **Ars.usda.gov. (2016).** USDA Special Interest Databases on Flavonoids. *USDA ARS*. [online] Available at: <https://www.ars.usda.gov/northeast-area/beltsville-md/beltsville-human-nutrition-research-center/nutrient-data-laboratory/docs/usda-special-interest-databases-on-flavonoids>.
8. **Atoui, A.K., Mansouri, A., Boskou, G., Kefalas, P. (2005).** Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89, 27-36.
9. **Ba, K., Tine, E., Destain, J., Cissé, N., et Thonart, P. (2010)** étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorghosénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnologie Agronomie Sociale et Environnement*, 14, 131-139.
10. **Baba, L., et McGrath, IM. (2008).** Oxygen free radicals: effects in the newborn period. *Advances in Neonatal Care & Journal*, 256-264
11. **Bärtels, A. (1998).** Guide des plantes du bassin méditerranéen - . *Editions Ulmer*, 352.
12. **Basu, A., et Penugonda, K. (2009).** Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice. *NutrRev*, 67, 49-56.

Référence bibliographiques

13. **Beaudeau, J.L., Delattre, J., Therond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Legrand, A. et Peynet, J. (2006).** Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 21, 144–150.
14. **Bekir, J., Mars, M., Souchard, JP., et Bouajila, J. (2013).** Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 470-475.
15. **Bekir, J., Mars, M., Vicendo, P., Ftterich, A., et Bouajila, J. (2013).** Chemical composition and antioxidant, anti-inflammatory, and antiproliferation activities of pomegranate (*Punica granatum*) flowers. *J Med Food*, 16, 544-550
16. **Belkheiri, N. (2010).** Derives phenoliques à activite antiatherogenes. *Thèse de doctorat en Chimie-Biologie-Santé .Université Toulouse III*, 34.
17. **Benhammou, N. (2012).** Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. *Université Abou beker belkayed tlemcem*, 34-38.
18. **Bidie, P.H., N'guessan, B., Yapou, F., N'guessan, J., et Djaman, A. (2011).** Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences & Nature*, 8, 5.
19. **Blamey, M., et Grey-Wilson, C. (2003).** La flore d'Europe Occidentale. *Flammarion, Paris*, 544.
20. **Bossokpip, L. (2002).** Etude des activités biologiques de *Fagara zanthoxyloides* Lam (Rutaceae). *Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako* 9.
21. **Boubekeri, C. (2014).** Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Salanum melongena* par des techniques électrochimiques. *Thèse doctorat : université Mohamed kheider .BISKRA*.
22. **Bridel, F., Bailly, C., Dion, N., Patiny, A., Guimarães, O., et Geirnaert, E. (2004).** Guide visual des espèces. *ABCopus. GNU F.D.L.* 85.
23. **Bruneton, J., (1999)** Pharmacognosie . phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} Ed Paris, Lavoisier Tech & Doc
24. **Caiyun, W., Lingling, S., Litong, F., Youfang, D., Shan, Z., Yujun., et Liu, C.M. (2013).** Optimization of extraction and enrichment of phenolics from pomegranate (*Punica granatum* L.) leaf. *Industrial Crops and Products*, 42, 587-594.

Référence bibliographiques

25. **Cheick traore, M. (2006)**. Etude de la phytochimie et des activites biologiques de quelques plantes utilisees dans le traitement traditionnel de la dysmenorrhée au mali. *Universite de Bamako*, 72.
26. **Chidambara Murthy, K.N., Jayaprakasha, G.K., et Singh, R.P. (2002)**. Studies on Antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) Peel extract using *in vivo* models. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 4791-4795.
27. **Claverie, B. (2005)**. De la taille à la conduite des arbres fruitiers. *Edition Rouergue*, 60-70 .
28. **Colette, E. (2003)**. Etude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. *Thèse de doctorat en Pharmacie. Université de Bamako*, 147.
29. **Coutanceau, M. (1962)**. Arboriculture fruitière. *Technique et économie des cultures de rosacées fruitières ligneuses. Edition J. B. BAILLIERE et Fils*, 575.
30. **Debydupont, G., Deby, C., et Lamy, M. (2002)**. Données actuelles sur la toxicité de l'oxygène : Current data on the toxicity of oxygen. *Réanimation*, 28-39.
31. **Delatre, J., Beaudoux, J-L., et Bonnefont-Rousselot, D.(2005)**. Radicaux libres et stress oxydant .Aspect biologique et pathologique .Edition tec &dec .Edition medicinales internationales .La voisier,paris .
32. **Diallo, A. (2005)**. Etude de la phytochimie et des activités biologiques de syzygium guineense willd (*myrtaceae*). *Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako*,13-14.
33. **Diarra, Y. (2006)**. Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *acanthospermum hispidum* dc. (astraracea) et *curculigo pilosa* schum et thonn.(hypoxidaceae), deux plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'hypertrophie benige de la prostate(hbp). *Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako*, 47.
34. **Donovan, J.L ., Meyer, A.S., et Waterhouse, A.L. (1998)**. Phenolic composition and antioxidant activity of prune and prune juice (*Prunus domestica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.46: 1247-1252.
35. **Dr Jörg, G., et Christof, J.(2004)**. Guide de phytothérapie .édition Marabout p417
36. **Evreinoff ,V. (1957) .** Contribution à l'étude du Grenadier . *Journal d'agriculture tropicale et de botanique appliquée*. 124-138.
37. **Fabre, B., et Ermosilla, V. (2008)**. Utilisation d'un extrait de grenadier pour le maintien de la coloration capillaire. *Fascicule de brevet européen*.

Référence bibliographiques

38. Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D. D., et Guo, Z. (1986). Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé*, 64 , 159-164 .
39. Faure, Y., et Bretaudeau, J. (2008). L'atlas de l'arboriculture fruitière. *éditions tec et doc / lavoisier*, 4, 133-173.
40. Favier, A. (2003). Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique* ,108-115 .
41. Federica, B., Carmela, G., et Isabella, N. (2004) . Sour Cherry (*Prunus cerasus* L) Anthocyanins as Ingredients for Functional Foods. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5 , 253–258.
42. Ferreira, H., Flaus, A., et Owen-Hughes, T. (2007). Histone modifications influence the action of Snf2 family remodeling enzymes by different mechanisms. *J Mol Biol*, 374, 563-79.
43. Ferretti, G., Bacchetti, T., Belleggia, A., et Neri, D. (2010). Cherry antioxidants: from farm to table. *Molecules*, 15, 6993-7005
44. Fonti Forcada, C., Gogorcena, Y., et Ángeles Moreno, M. (2014). Agronomical Parameters, Sugar Profile and Antioxidant Compounds of “Catherine” Peach Cultivar Influenced by Different Plum Rootstocks. *Int. J. Mol. Sc.*, 15, 2237-2254.
45. Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, Zohreh Abedinzadeh, Z. et Daniel Jore D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène: Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*, 91-96.
46. Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3, 162-169.
47. Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3, 162-169.
48. Godet, J. (1991). Arbres et arbustes aux quatre saisons . *Les guides pratiques du naturaliste . Editions Delachaux et Niestlé*, 96 et 170.
49. Gulçin, I., Huyut, Z.B., Elmastas, M., Hassan, Y., et Aboul-Eein, D. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of chemistry*, 3, 43- 53.
50. Halliwell, B., et Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *Br J Pharmacol*, 142, 231-255.

Référence bibliographiques

- 51. Hanton, C. (2005).** Effet des rayonnements ionisants sur la structure de la fonction de la cellule épithéliale intestinale. *these de doctorat de l'université de paris ,France ,43 .*
- 52. Iserin, P. (2001).** Encyclopédie des Plantes Médicinales : identification, préparation, soin. 2^{ème} édition, Larousse, 335, 2-03-560252-1.
- 53. Iserin, P. (2001).** Larousse Encyclopédie des plantes médicinales, Identification, Préparation, Soins. *Dorling Kindersley Limited 2^{ème} édition, Londres, 10.*
- 54. Jaccot, B., et Campillo, B. (2003).** nutrition humaine. *Masson, Paris, 311.*
- 55. Jacques et André, (2004).** Biochimie métabolique. *Ed ellipses. Paris: 217-219-220-223- 225*
- 56. Jacques , F. 2013,** du bon usages des plantes qui soignent , *OUEST-France ,p384*
- 57. Jaiswal, V., Der Marderosian, A., et Porter, J.R. (2010).** Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (*Punica granatum L.*). *Food Chemistry, 118, 11-16.*
- 58. Jan, O., et Aneta, W. (2014).** Influence of cherry leaf-spot on changes in the content of phenolic compounds in sour cherry (*Prunus cerasus*) leaves. *Physiological and molecular plant pathology, 86, 28, 34.*
- 59. Jinping, C., QING, J., Juaning, L., Xian, L., Changde, S., et kunsong, C. (2015).** *physiochemical characterisation of four cherry species (Prunus spp) grown in China. Food Chemistry, 137, 855, 863.*
- 60. Jurenka, J.S. (2008).** Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum L.*): a review. *Altern Med Rev Jun, 13, 128-44.*
- 61. Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R., et He, X. (2014).** Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2, 377-392.*
- 62. Kaur, G., Jabbar, Z., Athar, M., et Alam, M. S. (2006).** *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology, 44, 984-993.*
- 63. Kim, D. k., Lee, C.Y. (2004).** Comprehensive Study on Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Various Polyphenolics in Scavenging a Free Radical and its Structural Relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44, 253-273.*
- 64. Kirsh, M., et DeGroot, H. (2002).** Formation of peroxynitrite from reaction of nitroxyl anion with molecular oxygen. *Journal of Biological Chemistry 277(16), 13379-13388.*

Référence bibliographiques

65. **Koechlin- Ramonatxo, C.(2006)**. Oxygen ,stress oxydant et supplementation antioxydante ou un aspest different de la nutrition dans les maladies respiratoires . *Nutrition clinique et metabolisme* ,213-276.
66. **Koffi, E., Sea, T., Dodehe, Y., et Sore, S. (2010)**. Effect of solvent type on extraction of polyphénols from twenty three Ivorian plants. *journal of animal and plant sciences*,5, 550-558.
67. **Kohen, R., et Nyska, A. (2002)**. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology: SAGE Journals*, 30, 620-650.
68. **Kulkarni, A. P. et Aradhya, S. M. (2005)**. Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. *Food Chemistry* ,93, 319–324.
69. **Lairini, R., Bouslamti, F., Zerrouq, A., et Farah ,A.(2014)**. Valorisation de l'extrait aqueux de l'écorce de fruit de *Punica granatum* par l'étude de ses activités antimicrobienne et antioxydante. *J. Mater.Environ. Sci*, 2314-2318, ISSN : 2028-2508
70. **Lansky, E.P., et Newman, R.A. (2007)** . *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 177-206.
71. **Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., et Cheng, S. (2006)**. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with the pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96,254-260.
72. **Lillo, C., Uuni, S., et Peter, R. (2008)**. Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant, Cell and Environment*, 31,787-601.
73. **Liu, B., et Zhu, Y. (2007)**. Extraction of flavonoids from flavonoid-rich parts in tartary buckwheat and identification of the main flavonoids. *Journal of Food Engineering*, 78, 584-587.
74. **Lovegrove, J. A., Stainer, A., et Hobbs, D. A. (2017)**. Role of flavonoids and nitrates in cardiovascular health. *Proceedings of the Nutrition Society*, 1-13.
75. **Lusis, A. J. (2000)**. Atherosclerosis. *Nature* 407, 233–241.
76. **Magder, S.(2006)**.reactive oxygen species .*toxic molecules or spark oflife?crit care* .208-216.
77. **Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., et Amenez, L. (2004)**. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.

Référence bibliographiques

- 78. Miladovic, S., Ivekovic, D., et Bozidar, S.G. (2006).** A novel amperometric method for antioxydant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, 68,175-180.
- 79. Moorthy, K., Punitha, T., Vinodhini, R., Sureshkumar, B.T., Vijayalakshmi, P., et Thajuddin, N. (2013).**Antimicrobial activity and qualitative phytochemical analysis of *Punica granatum* Linn. (PERICARP). *Journal of Madicinal Plants research*, 7, 474-479.
- 80. Morena, M., Martin-mateo, M., Cristol, J., et Canaud, B.(2002).**stress oxydant .*heno-incompatibilité et complication de la dialyse au long cours 23n)5* ,201-208.
- 81. Mousavinejad, I., Emam-Djomeh, Z., Rezaei, K. et Khodaparast M. H. H. (2009).** Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars.*Food Chemistry*, 115, 1274–1278.
- 82. Moussard, C. (2006).** Biochimie structurale et métabolique, *Edition De Boeck Supérieur*, 336.
- 83. Muthiah, P.L., Umamaheswari, M., et Asokkumar, K. (2012).** In vitro antioxidant activities of leaves, fruit and peel extracts of citrus. *International Journal of Phytopharmacy*, 2, 13-20.
- 84. Negi, P., et Jayaprakasha, J. (2003)** .Antioxidant and Antibacterial Activities of *Punica granatum* Peel extracts. *Journal of Food Science*, 68, 1473-1477.
- 85. Nuralam, M., Bristi N., et Rafiquzzaman, M. (2013).** Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity, 21,145-149.
- 86. Ou, B., Hampsch-Woodill, M., et PRIOR R L. (2001).** Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,49, 4619-4626
- 87. Ozgen, M., Reese, R.N., Tulio JR, A. Z., Scheerens J.C., et Miller, A.R. (2006).** Modified 2, 2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) Method to Measure Antioxidant Capacity of Selected Small Fruits and Comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2, 2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. *J. Agric. Food Chem.*54, 1151-1157.
- 88. Paladini, A.C., Marder, M., Viola, H., Wolfman, C., Wasowski, C., et Medina, J.H. (1999).** Flavonoids and the central nervous system: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*,51, 519–526.

Référence bibliographiques

- 89. Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J., et Codina, C. (2002).** Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and non distilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J Agric Food Chem*, 5, 6882-6884.
- 90. Pérez-jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., et Scalbert A. (2010).** Systematic Analysis of the Content of 502 Polyphenols in 452 Foods and Beverages: An Application of the Phenol-Explorer Database. *J. Agric. Food Chem*, 58, 4959-4969.
- 91. Peronny, S., (2005).** La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (*Lemur Catta*). *Thèse de Doctorat en Eco-Ethologie. Muséum national d'histoire naturelle.*
- 92. Pinemail, J., Karine, B., Karine, C. et Jean-Olivier, D. (2002).** Mécanismes Physiologiques de la défense Antioxydante. Physiological Action of Antioxydant Defences. *Nutritio Clinique et métabolisme*, 16, 233-239.
- 93. Planchon, G., et Collin, E. (1875).** Traité pratique de la détermination des drogues simples d'origine végétale. *Librairie F. Savy Tome*, 235-236 et 307-308..
- 94. 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 genie industriel*, 25-39.
- 95. Potter, D., Eriksson, T., Evans, R.C., Oh, S., Smedmark, J.E., Morgan, D.R., Kerr, M., Robertson, K.R., Arsenault, M., Dickinson, T.A., et Campbell, C.S. (2007).** Phylogeny and classification of *Rosaceae*. *Plant Systematics and Evolution* 266,1-2 -5-43.
- 96. Prieto, P., Pineda, M., et Aguilar, M. (1999).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem*, 269, 337-341
- 97. Quezel, P., et Santa, S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *Centre National de la Recherche Scientifique*, 7, 1170.
- 98. Richar, T., Tamsamani, H., Delaunay, J., Krisa, S., et Mérillon, J. (2014).** Stilbènes : de la chimie à la neuroprotection. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 49, 173-180.
- 99. Roncone, R., Barbieri, M., Monzani, E., et Casella, L. (2006).** Reactive nitrogen species generated by heme proteins: Mechanism of formation and targets. *Coordination Chemistry Reviews*.
- 100. Sahar, A.M., Hussein, H., Barakat, H., Irmgard, M., et Mahmoud,**

Référence bibliographiques

- A.M.N.(1997).Tannins from the leaves of *Punica granatum*. *Phytochemistry*, 45, 819-823.
101. Seeram, N.P., Lee, R., et Heber, D. (2004). Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. *Clin Chim Acta* ,348, 63-68.
102. Sheets, M.D., Du Bois, M.L., et Williamson, J.G. (1994). The Pomegranate. HS Horticultural Sciences Department, Florida Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Original publication date April 1994. Revised April 2004. Reviewed December 2008, 44, 1-3.
103. Silvia, M., Mária T., Judita, B., Alena, V., et Juraj, Č.(2010) . *Acta agriculturae Slovenica*, 95,21 – 28.
104. Stahel ,W., Sies, H. (1997).Antioxydant défense : vitamine E ,and C and carotenoids. *Diabetes*, 46,14 -18.
105. Stahel, W., Sies, H.(2002).Carotenoids and protection against solar uv radiation .*Skin pharmacol.Appl.Skin physical*,15 ,292-296.
106. Stern, RM. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *American Journal of Medicine*, 91, 31-38
107. Syed, D.N., Afaq, F., et Mukhtar, H. (2007). Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. *Seminar in Cancer Biology*, 17, 377-385.
108. Szabo, C. (2003). Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicology Letters*, 140-141,105-112.
109. Tamuly, C., Hazarika, M., Bordoloi, M., Bhattacharyya. PK., et Kar, R .(2014). Biosynthèse de nanoparticules d'Ag utilisant le pédicellamide et son activité photocatalytique : une approche respectueuse de l'environnement .*spectrochim Acta A Mol Biomol spectrosc*,132,687,-691
110. Tavaud, M. (2002). Diversité génétique du cerisier doux (*Prunus avium* L.) sur son aire de répartition : comparaison avec ses espèces apparentées (*P. cerasus* et *P. x gondouinii*) et son compartiment sauvage. *ENSA Montpellier* .
111. Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarikurkcu, C., Ozturk, M., et Ulubelen, A. (2007) .A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*,103, 816-822.
112. Valko, M, Rhodes, CJ., et Moncol, J. 2006. free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress –induced cancer.*Chemico-biol Inter*, 160,1-40.

Référence bibliographiques

113. Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. et Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1-40.
114. Vidal, A., Fallarero, A., Pena, B.R., Medina, M.E., Gra, B., Rivera, F., Gutierrez, Y., et Vuorela, P.M. (2003). Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 295-300.
115. Voravuthikunchai, S.P., Sririrak, T., Limsuwan, S., Supawita, T., Iida, T., et Honda, T. (2005). Inhibitory effects of active compounds from *Punica granatum* pericarp on verocytotoxin production by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Health Science*, 51, 590-596.
116. Werner, H., et Karl, H. (1980). Flavonol tetraglycosides from the leaves of *Prunus cerasus* and *P. Avium*. *Phytochemistry*, 19, 2727-272.
117. Xiaoyong, Z., Wenna, Z., Xueren, Y., Mingshen, S., Chongde, S., Xian, L., et Kunsong, Ch (2015). Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Different Peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] Cultivars in China. *Int. J. Mol. Sci*, 16, 5762-5778.
118. Zahin, M., Aqil, F., et Ahmad, I. (2010). Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of *Punica granatum* L. peel extracts. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 703, 99-107.
119. Zand, R.S., Jenkins, D.J., et Diamandis, E.P. (2000). Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds. *Breast Cancer Research and Treatment*, 62, 35,49.
120. Zheng, W., et Wang, S-Y. (2001). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5165-5170.
121. Zimmer, N., et Cordesse, R. (1996). Influence des tannins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *INRA productions animales*, 9, 167-179.
122. [Wikipedia.org/wiki/Punica granatum](https://fr.wikipedia.org/wiki/Punica_granatum) (2018)
123. [Wikipedia.org/wiki/Prunus cerasus](https://fr.wikipedia.org/wiki/Prunus_cerasus) (2018)

INTRODUCTION

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Stress oxydatif

MATERIEL ET METHODES

*RESULTATS ET
INTERPRETATION*

DISCUSSION

CONCLUSION

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre 2 : Les plantes d'études

ملخص :

في إطار البحوث المتعلقة بمضادات الأكسدة الطبيعية ، يهدف هذا العمل إلى دراسة التركيبات الكيميائية وتقييم النشاط المضاد للأكسدة لمختلف مستخلصات أوراق نبات الرمان والكرز على حدة المقطوفة من مزارع في تلمسان . أثبت التحليل الكيميائي للنبتين إحتواها على بعض المكونات الفينولية كالفلافونويد والعص (Tanins) ، كما أثبتت هذه الدراسة من خلال التحليل الكمي لهذه المكونات في مستخلص (ماء / ميثانول) و (ماء / أسطون) للنبتين أنها غنية بالمركبات الفينولية .
(502,12±5,74 mg EAG/gE ; 548,24±2,12 mg EAG/gE) , (405,52± 0,56 mg EAG/gE ;835,62± 0 ,063 mg EAG/gE)
على الترتيب ، بالنسبة للفلافونويد (30,10± 0,68 mg EQC/gE ; 50,45 ±0,31 mg EQC/gE) , (202,50±0,56 mg EQC/gE ; 206 ,89 ±1,28 mg EQC/gE) أما عن العنصر (Tanins) فقد قدرت كميته بـ (118,72±0,062 mg EQC/gE ; 133,83± 0,035 mg EQC/gE) على الترتيب .
أثبتت نتائج النشاط المضاد للأكسدة المحققة *in vitro* أن مستخلصات أوراق نبات الرمان والكرز لها قدرة عالية على إرجاع الحديد وعزل الـ DPPH مقارنة بالجزيئات الشاهدة (حمض الأسكربيك BHA ، BHT) . كشفت تقنية FRAP أن مستخلص (ماء / ميثانول) لأوراق الرمان لها أكبر قدرة لإرجاع الحديد الثلاثي (EC₅₀ =0,121mg/ml) وهي أكبر قدرة من (BHT (EC₅₀ =0,21mg/ml) وحمض الأسكربيك (EC₅₀ = 0,53 mg/ml) يليه مستخلص (ماء / ميثانول) لنفس النبتة (EC₅₀ =0, 333 mg/ml) وبعده مستخلصات (ماء / ميثانول) و (ماء / أسطون) للكرز والتي قيمتها تقريبا متطابقة . أما النسبة لتقنية عزل DPPH فإن IC₅₀ لمستخلصات (ماء / ميثانول) و (ماء / أسطون) للنبتين الرمان والكرز على الترتيب (5,8 , 2,33 µg/ml) و (8,06 µg/ml ; 15,49µg/ml) تظهر نشاطات أقل من نشاط حمض الاسكربيك (1,10µg/ml) ، (2,02µg/ml) و BHT (2,33 µg/ml) هذا النشاط مرتبط مباشرة بقيمة البوليفينول في النبتة والمحلول المستخدم

الكلمات المفتاحية البوليفينول ، النشاط المضاد للأكسدة ، الرمان الكرز

Résumé

Dans le cadre des études portant sur la recherche d'antioxydants naturels, l'objectif de ce travail est l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante de différents extraits des feuilles de *Punica granatum* et *Prunus cerasus*.

L'étude phytochimique des extraits des feuilles de ces plantes, montre la présence des flavonoïdes des tanins et des sucres réducteurs. Les résultats de dosage de polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés, montrent que les extraits eau /MeOH et eau /Acétone sont très riches en composés polyphénoliques (835,62 ± 0,063 et 405,52 ± 0,56 mg EAG/gE, respectivement pour *P. granatum*) ; (548,24 ± 2,12 et 502,12 ± 5,74 mg EAG/gE, respectivement pour *P. cerasus*) , alors que flavonoïdes et les tanins condensés, sont très abondants au niveau des extraits de *P. cerasus* (202,50 ± 0,56 et 206,89 ± 1,28 mgEQC/gE) ; (118,72 ± 0,062 et 133,83 ± 0,035 mgEQC/gE).

Les résultats obtenus des tests réalisés *in vitro* sur l'activité antioxydante ont montré que l'extrait organique de feuilles de *P. granatum* et de *P. cerasus* ont une capacité de réduction de fer et de piégeage du radical DPPH• relativement importante.

La méthode FRAP révèle que l'extrait eau/MeOH de feuilles de *P.granatum* présente la plus puissante capacité à réduire le fer avec une EC₅₀=0,127 mg/mL suivi de l'extrait eau/Acétone de la même plante avec une EC₅₀=0,333 mg/mL. Cette capacité à réduire le fer est nettement supérieure à celle de l'acide ascorbique (EC₅₀=0,53 mg/mL). Vis-à-vis du radical DPPH•, les extraits eau/MeOH eau/Acétone de *P.granatum* présentent des IC₅₀ de 5,24 et 5,80 µg/mL, respectivement. Cette activité est directement corrélée avec le taux de polyphénols.

Mots Clés : polyphénols, activité antioxydante, *P.granatum*, *Prunus cerasus*

Abstract

The objective of this work is to study phytochemicals and to evaluate the antioxidant activity of deferent extracts (water / MeOH) and (water / acetone) of *punica granatum* and *prunus cerasus* leaves separately.

For this evaluation using the free radical DPPH •, and the reduction of FRAP iron. The phytochemical study shows the presence of certain phenolic compounds such as flavonoids, tannins, reducing sugars. Results of total polyphenol, flavonoid and tanins assays show that (water / MeOH) and (water / acetone) extracts of *punica granatum* and *prunus cerasus* leaves are rich with polyphenolic compounds (835.62 ± 0.063 mg EAG/gE and 405.52 ± 0.56 mg EAG/gE) , (548.24 ± 2.12 mg EAG/gE and 502.12 ± 5.74 mg EAG/gE) , respectively, with flavonoids (50.47 ± 0.31 mg EQC/gE and 30.10 ± 0.68 mg EQC/gE) , (202.50 ± 0.56 mg EQC/gE and 206.89 ± 1.28 mg EQC/gE) ,and tannins (16.56 ± 0.00 mg EQC/gE and 13.56 ± 0.00 mg EQC/gE) , (118.72 ± 0.062 mg EQC/gE and 133.83 ± 0.035 mg EQC/gE).

The results obtained from tests carried out *in vitro* on the antioxidant activity showed that (*P.granatum*) and *prunus cerasus* leaves organic extract have a relatively high capacity for iron reduction and trapping (scavenging)of the DPPH radical compared to control molecules (ascorbic acid, BHA, BHT).

FRAP method reveals that the water / MeOH extract of (*P.granatum*) leaves is the most potent EC₅₀ (0.127 mg / mL). This ability to reduce iron is significantly greater than that of BHT (EC₅₀ = 0.21 mg / mL) and ascorbic acid (EC₅₀ = 0.53 mg / mL) , followed by the water / acetone extract of the same plant EC₅₀ = 0.333 mg / mL then the water / MeOH and water / acetone extract of *prunus cerasus* which are almost identical.

In comparison with ascorbic acid (1.10 µg / mL) , BHA (2.02 µg / mL) and BHT (2.33 µg / mL)the deferents extracts water / MeOH water / acetone of (*P.granatum*) and (*prunus cerasus*) leaves have lower antioxidant activity to scavenge DPPH• free radical than ascorbic acid (5.24 µg / mL, 5.80 µg / mL, 15.49 µg / mL, 8.06 µg / mL) respectively. These results indicated that the antioxidant activity was correlated with the compisitionof of the two plants with total phenolics and flavonoids

key words : polyphénols, antioxidant activity, *P.granatum* and *Prunus cerasus*