

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

Université Abou Bekr Belkaid-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  
**SAB**

« Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité biologique »

Mémoire

Présenté par : M<sup>lle</sup> YOUSFI Sarah Nesrine

En vue de l'obtention du Diplôme de MASTER

*Domaine* : SNV

*Filière* : Sciences biologiques

*Spécialité* : Biochimie



*Thème* :

---

*Evaluation de l'activité antioxydante de quelques extraits des  
feuilles de Morus nigra (mûrier noir)*

---

**Évalué le 12/10/2020 par le jury :**

Examineur	M <sup>r</sup> Azzi R.	Professeur	Université de Tlemcen
Examineur	M <sup>me</sup> Medjdoub H.	MCB	Université de Tlemcen
Encadreur	M <sup>me</sup> Belkacem N.	MCB	Université de Tlemcen

Année universitaire 2019-2020

# Remerciements



*Avant tout j'exprime mes profonds remerciements à Allah le tout puissant, pour m'avoir donné le courage, la volonté, la santé et surtout la patience pour achever ce travail.*

*Mes remerciements les plus sincères à mon encadreur Mme BELKACEM N pour avoir accepté de m'encadrer et diriger ce travail. Merci pour votre compréhension, votre grande gentillesse malgré vos importantes obligations, vous avez toujours été présente pour orienter mes recherches dans la bonne direction et ceci été fondamental dans la bonne réalisation de ce mémoire. Soyez assurée de ma profonde gratitude.*

*Je tiens particulièrement à remercier les membres de jury, ses remarques vont surement enrichir mon travail et lui donneront plus de valeur Mr Azzi R. « Professeur » et Mme Medjdoub H. « Maître de conférences B », d'avoir acceptés d'examiner et d'évaluer le travail.*

*Je remercie tous les doctorants du laboratoire LAPSAB, faculté des sciences de la nature et de la vie : de la terre et de l'univers, Université de Tlemcen qui m'ont aidé durant la réalisation de ce travail ainsi que toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail.*



# Dédicace



*A ma mère,  
qui m'a encouragé et qui a veillé à ce que je  
réussisse à mes études, qui m'a permis de donner le meilleur de moi  
même et me surpasser.*

*A mon père  
Zui s'est tant sacrifié pour moi, qui s'est toujours donné du mal  
pour assurer mon bien être. J'espère que je suis à la hauteur de ce  
qu'il attend de moi.  
Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorde santé, bonheur et longue  
Vie.*

*A mes sœurs et à mon frère  
Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour  
vous. Votre joie me comble de bonheur. Puisse Dieu vous garde,  
éclaire votre route et vos aide à réaliser vos vœux les plus chers.  
A tous mes collègues et mes amies*

*Sarah*



# Résumé

*Morus nigra* est une plante médicinale appartenant à la famille des *Moracées*. Cette espèce connue sous le nom de «Mûrier », il s'agit d'arbres ou arbustes qui sont cultivés pour leurs fruits «mûres» ou leurs feuilles qui servent de nourriture au ver à soie. Connue pour ses multiples propriétés biologiques qui sont principalement dues à sa richesse en éléments essentiels et bénéfiques comme les : vitamines, les minéraux et les composés phénoliques tels que les acides phénoliques, flavonoïdes et tanins condensés. Les feuilles de Mûrier ont fait l'objet de ce présent travail pour extraire et estimer la teneur en composés phénoliques totaux, flavonoïdes et tanins condensés des différentes fractions organiques. Les extraits organiques ont été extraits dans le mélange eau/acétone, chloroforme et acétate d'éthyle. Les rendements respectifs sont : 1,32 %, 2,14 %, et 3,7%.

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu et la teneur la plus élevée ( $193,16 \pm 0,023$  mg EAG/gE) est obtenue dans l'extrait brut eau/acétone préparé par macération. La teneur en flavonoïdes a été évaluée en utilisant la méthode de trichlorure d'aluminium, et la teneur la plus élevée est de l'ordre de  $283,50 \pm 0,011$  mg EQC/gE dans l'extrait brut eau/acétone. Alors, la teneur la plus élevée en tanins condensés, estimée par la méthode à vanilline est de  $54,74 \pm 0,008$  mg EQC/gE dans l'extrait de chloroforme.

**Mots clés :** *Morus nigra*, *Moracées*, polyphénols, extraits organiques, activité antioxydante.

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Feuilles et fruits du murier .....	6
<b>Figure 2:</b> Formation en cascade des différentes ERO à partir du radical superoxyde .....	12
<b>Figure 3:</b> Mécanisme en chaine de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et la nature des produits formés .....	14
<b>Figure 4:</b> Réaction de la méthode FRAP .....	19
<b>Figure 5:</b> Oxydo-réduction de l'ABTS en ABTS+ .....	20
<b>Figure 6:</b> Exemples des acides phénoliques.....	24
<b>Figure 7:</b> Structure chimique de base des flavonoïdes.....	25
<b>Figure 8:</b> Exemple de structure d'un tanin condensé (a) et d'un tanin hydrolysable (b) .....	28
<b>Figure 9:</b> Structure de base des stilbènes (tran ou cis).....	29
<b>Figure 10:</b> Structure de lignane .....	29
<b>Figure 11:</b> Structure de coumarine.....	30
<b>Figure 12:</b> Effets biologiques des polyphénols .....	31
<b>Figure 13:</b> Biosynthèse de différentes classes de flavonoïdes .....	31
<b>Figure 14:</b> Piégeage des espèces réactives oxygenées EOA par les flavonoïdes.....	32
<b>Figure 15:</b> Feuilles de <i>M. nigra</i> sèches (A), et broyées (B).....	35
<b>Figure 16:</b> Protocole d'extraction des feuilles de <i>M. nigra</i> .....	37
<b>Figure 17:</b> Droite d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux... 43	43
<b>Figure 18:</b> Teneurs en polyphénols totaux au niveau des extraits des feuilles de <i>M. nigra</i> .... 43	43
<b>Figure 19:</b> Droite d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes .....	44
<b>Figure 20:</b> Teneurs en flavonoïdes au niveau des extraits des feuilles de <i>Morus Nigra</i> ..... 44	44
<b>Figure 21:</b> Droite d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés .....	45
<b>Figure 22:</b> Teneurs en tanins condensé au niveau des extraits des feuilles de <i>M. Nigra</i> ..... 45	45

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1:</b> Classification scientifique de <i>M. Nigra</i> .....	6
<b>Tableau 2:</b> Valeur nutritive du Murier noir.....	7
<b>Tableau 3:</b> Quantité de flavonoïdes et d'anthocyanes trouvée dans <i>M. nigra</i> .....	7
<b>Tableau 4:</b> Principales activités biologiques et pharmacologiques de <i>M. nigra</i> .....	9
<b>Tableau 5:</b> Mécanismes de formation des principales ERO .....	13
<b>Tableau 6:</b> Principales classes des flavonoïdes avec quelques exemples .....	25
<b>Tableau 7:</b> Distribution alimentaire des classes de flavonoïdes. ....	27
<b>Tableau 8:</b> Rendement et caractéristiques des différents extraits de <i>M. Nigra</i> . ....	42
<b>Tableau 9:</b> Teneurs de différents composés phénoliques dans les extraits de <i>M. nigra</i> . ....	46

## *Liste des abréviations*

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ATP** : Adénosine triphosphate
- ERO** : Espèces réactives de l'oxygène
- ERA**: Espèces réactives de l'azote
- Fe<sup>2+</sup>** : Fer ferreux
- Fe<sup>3+</sup>** : Fer ferrique
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène
- DPPH** : 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyl
- O<sub>2</sub>** : Oxygène
- NO**: Monoxyde d'azote
- O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : Anion superoxyde
- UV** : Ultra violet
- HOCl**: Acide hypochloreux
- RLO**: Radicaux libres oxygénés
- NADPH**: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.
- SOD**: Superoxyde dismutase
- CAT**: Catalase
- Zn**: Zinc
- Cu** : Cuivre
- Gpx** : Glutathion peroxydase
- Se**: Sélénium
- NO**: Monoxyde d'azote
- O<sub>3</sub>**: Ozone

# Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

## 1<sup>ère</sup> partie : Synthèse bibliographique

### Chapitre 1 : Les propriétés biologiques de *Morus nigra*

1. La plante des mûriers ( <i>Morus Nigra</i> ) .....	5
1.1. Définition.....	5
1.2. Description botanique.....	5
1.3. Ecologie et répartition géographique.....	6
1.4. Classification taxonomique .....	6
1.5. Composition chimique.....	7
1.6. Les variétés du murier .....	8
1.7. Effet pharmaceutique du murier .....	8
1.8. Usages cosmétiques .....	9

### Chapitre 2 : Le stress oxydant

1.1. Définition.....	11
1.2. Définition d'un radical libre .....	11
1.3. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	11
1.4. Origine des radicaux libres .....	12
1.5. Mécanisme de formation des radicaux libres .....	12
1.6. Rôle physiologique des espèces réactives .....	13
1.7. Les conséquences du stress oxydant.....	14
1.8. Les implications pathologiques des ERO.....	15
1.9. Les antioxydants .....	15
1.9.1. Les antioxydants endogènes .....	15
1.9.2. Les antioxydants exogènes .....	16
1.10. Les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante .....	18

### Chapitre 3: Les composés phénoliques

1. Les polyphénols.....	23
1.1. Généralité.....	23
1.1.1. Les acides phénoliques .....	23
1.1.2. Les flavonoïdes .....	24



1.1.3. Les tanins .....	27
1.1.4. Les stilbénes C6-C2-C6 .....	28
1.1.5. Les lignanes (C6-C3) .....	29
1.1.6. Les coumarines C6-C3.....	29
1.2. Biosynthèse des polyphénols.....	30
1.3. Biosynthèse des flavonoïdes.....	31

## **2<sup>ème</sup> partie: Partie Expérimentale**

### **Chapitre 1: Matériel et Méthodes**

1. Préparation du matériel végétal.....	35
2. Extraction du matériel végétal.....	35
3. Dosage des composés phénoliques .....	38
3.1. Dosage des polyphénols totaux .....	38
3.2. Dosage des flavonoïdes.....	38
3.3. Dosage des tanins condensés.....	39
3.4. Expression des résultats .....	39
4. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH.....	40

### **Chapitre 2: Résultats et interprétation**

1. Rendement d'extraction.....	42
2. Résultats du dosage quantitative .....	42
2.1. Dosage des polyphénols totaux .....	42
2.2. Dosage des flavonoïdes .....	44
2.3. Dosage des tanins condensés.....	45

<b>Discussion</b> .....	48
-------------------------	----

<b>Conclusion</b> .....	52
-------------------------	----

<b>Références bibliographiques</b> .....	54
--	----

---

# *Introduction*

---



Depuis la nuit des temps, l'être humain s'est soigné avec les plantes qu'ils avaient à sa disposition contre divers pathologies. A travers les siècles, l'utilisation de ces plantes médicinales s'est développée a fin de vaincre la souffrance et améliorer la santé humaine (**Iserin, 2001**).

Au cours des dernières années, des études sur les activités antioxydantes des plantes médicinales ont augmenté de façon remarquable due à un intérêt accru pour leur potentiel d'être utilisées en tant que source de métabolites secondaires tels que les poly phénols.

Actuellement, la société scientifique, biologiste et chimiste, met en évidence le rôle tragique du processus oxydatif incontrôlable induit par les espèces réactives oxygénées (ERO) (**Liu Riboli et al., 2003**).

L'accumulation de ces molécules dans l'organisme aboutit à une chaîne réactionnelle radicalaire qui dégrade les molécules vitales biologiques entraînant des maladies chroniques telles que les pathologies du cœur, le cancer, le diabète, l'hypertension, et la maladie d'Alzheimer etc. (**Cole et al., 2005**).

Un grand nombre d'études scientifiques ont été menées pour découvrir les propriétés fonctionnelles des composés d'origine végétale, et principalement les polyphénols qui pourraient être efficaces pour la santé (**Tumbas et al., 2010**).

Les composés phénoliques font partie intégrante de la diète humaine et peuvent même être intentionnellement utilisés comme préparation médicinale. Ils ont la propriété d'éliminer les radicaux libres (**Sellappan et al., 2002**).

C'est dans ce contexte, que notre travail de mémoire s'inscrit, visant à étudier les composés phénoliques de Mûrier noir (*Morus nigra*), et de tester leur pouvoir antioxydant afin d'expliquer la marge thérapeutique de ces métabolites sur l'organisme.

Le Mûrier noir (*Morus nigra*), introduit du Moyen-Orient beaucoup plus tôt en Europe, il est inscrit dans la pharmacopée depuis l'antiquité pour ses vertus astringentes, laxatives, pour lutter contre les maux de gorge, etc. Il est également présent dans la culture méditerranéenne comme aliment, consommé frais ou séché, sous forme de sirop ou en confiture. Il renferme une bonne quantité de vitamines, minéraux, flavonoïdes, anthocyanines et acides phénoliques (**Heinonen et al., 1998**).

De ce fait, la thématique de ce travail porte sur la détermination de la teneur en composés bioactifs à grande valeur antioxydante comme les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins.

Ce travail a été structuré comme suite :

Une première partie qui est une synthèse bibliographique comportant un chapitre consacré à la présentation générale du mûrier noir (*Morus nigra*), les bienfaits biologiques et pharmacologiques de cette espèce végétale, le stress oxydant et les principaux composés phénoliques ainsi que leurs rôles biologiques et pharmacologiques notamment leur activité antioxydante.

Une deuxième partie pratique, consacrée à l'extraction de la matière végétale et le dosage des composés phénoliques dont les polyphénols totaux, les flavonoïdes et les tanins, ainsi que l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante par le test de piégeage du radical libre DPPH.

Cette partie est suivie des résultats obtenus leur discussion et on termine par une conclusion générale.

Partie 1 :

---

# SYNTHÈSE

## BIBLIOGRAPHIQUE

---

Chapitre 1 : les propriétés biologiques de *Morus nigra*.

Chapitre 2 : le stress oxydant

Chapitre 3: les composés phénoliques



# *Chapitre 1 :*

---

## Propriétés biologiques de *Morus nigra*

---



## 1. La plante des mûriers (*Morus Nigra*)

### 1.1. Définition

Le mûrier noir du Moyen-Orient, fait partie, tout comme la vigne, le figuier, le grenadier et l'olivier, de ces plantes de légende appréciées pour leur graphisme et leurs fruits. Excellent arbre d'ombrage d'une grande longévité (**Orwa et Mutua, 2009**).

Le mûrier est une plante arbustive assez voisine de la framboise aux points de vue aspect physique et mode de multiplication. Il s'agit d'arbres ou d'arbustes dont certains sont cultivés pour leurs fruits (les mûres) ou leurs feuilles, qui servent de nourriture au ver à soie (**Louws et Dale, 1994 ; Orwa et Mutua, 2009**).

Le mûrier noir est très connu en médecine traditionnelle chinoise et japonaise. On le rencontre à des altitudes plus hautes, ou encore dans les régions les plus douces de suède. Il peut être consommé comme fruit, sous forme de supplément ou de jus car il est très riche en éléments nutritives. Il renferme des antioxydants puissants qui peuvent renforcer le système immunitaire, aidé à prévenir le cancer, le diabète et les infections. La consommation exagérée peut causer des problèmes rénaux, comme elle peut aggraver la fonction hépatique chez les individus ayant une maladie de foie (**Fazaeli, 2013**).

### 1.2. Description botanique

Le mûrier noir est un arbre à croissance lente qui peut atteindre 20 m de hauteur. C'est une plante, bisannuelle qui peut avoir ou ne pas avoir d'épines. Ses fleurs sont petites, de couleur vert clair, regroupées en épis courts, l'ensemble constitue la mûre. Ses fruits sont portés sur les cannes et composées de plusieurs carpelles. Ils sont plus gros, ovales, de couleur rouge foncé, presque noir, et d'un goût parfum agréable, sucré, légèrement acidulé et arrivent à maturité vers la mi-août. Ses feuilles sont caduques, larges, alternes, cordiformes, et parfois lobées qui peut avoir atteindre de 6 à 12 cm de long. Elles sont plus rugueuses et de couleur plus foncée sur la partie supérieure qui prend une couleur jaune dorée en automne (Fig. 1) (**Louws et Dale, 1994**).



**Figure 1:** Feuilles et fruits du mûrier (Michel, 2006).

### 1.3. Ecologie et répartition géographique

La mûre désigne le fruit d'un arbre fruitier d'origine Asie occidentale qui est cultivée en Europe, aux États-Unis et en Asie pour ses baies, et pour l'élevage du ver à soie.

Elle est très favorisée dans les zones chaudes avec des sécheresses prolongées et les régions subtropicales de l'hémisphère Nord, mais également dans les tropiques de l'hémisphère Sud (Fazaeli, 2013).

C'est une espèce robuste qui est assez résistante au froid mais elle pousse mieux à une basse altitude, à l'abri du vent et dans les zones côtières, tandis que sa culture s'est répandue dans le bassin méditerranéen et s'étend aujourd'hui aux États-Unis (Lucas Heitz, 2013).

### 1.4. Classification taxonomique

La classification de mûrier noir est indiquée dans le Tableau 1.

**Tableau 1:** Classification scientifique de *M. Nigra* (Foucault et Julve, 1991)

Règne	Plante
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Hamamelidæ
Ordre	Urticales
Famille	Moraceæ
Genre	Morus
Espèce	<i>Morus nigra</i>



### 1.5. Composition chimique

Le murier est un arbre rempli de nombreux éléments essentiels et bénéfiques. Ses fruits renferment une bonne quantité de vitamines C, B et E, minéraux, glucides, d'acides organiques, pectine et de composés phénoliques tels que (les anthocyanines, les tanins et les acides phénoliques) (Heinonen *et al.*, 1998).

Ses feuilles sont riches en flavonoïdes qui comprennent les anthocyanines, qui sont connus pour réduire les maladies coronaires et cancérigènes. Elles sont riches en glucose, pectine, acides aminés, protéines, calcium, manganèse, acides organiques et de vitamine B4 (adénine). Tous ses composés phénoliques font partie de la diète humaine et peuvent être utilisés dans les préparations médicinales vu leurs effets bénéfiques sur la santé (Sellappan *et al.*, 2002) (Tabl. 2, 3).

**Tableau 2:** Valeur nutritive du Mûrier noir (Sellappan *et al.*, 2002).

Valeur nutritive g pour (100g)			
Eau : 87,7	Lipides : 0,39	Glucides : 8,1	Sucre : 8,1
Protéines : 1,44	Acides gras : 0,027	Fibres : 1,7	Valeur énergétique : 30 kcal
Oligo- éléments (mg)			
Calcium : 39	Cuivre : 0,06	Magnésium : 18	Phosphore : 38
Fer : 1,85	Potassium : 194	Sodium : 10	Zinc : 0,12
Vitamines (mg)			
Vitamine C : 36,4	Vitamine B1 : 0,029	Vitamine B2 : 0,1	Vitamine B3 : 0,62
Vitamine B5 : 0,26	Vitamine B6 : 0,05	Vitamine B9 : 6 µg	Vitamine E : 0,87

**Tableau 3:** Quantité de flavonoïdes et d'anthocyanes trouvée dans *M. nigra* (Ercisli et Orhan, 2007)

Total phénoliques (mg GAE/100 g de masse fraîche)	Flavonoïdes totaux (mg QE/100 g de masse fraîche)	Acide ascorbique (mg/100 ml)
1422	276	21,8

## 1.6. Les variétés du mûrier

Sous le nom de "mûre" on distingue :

- ❖ **La mûre sauvage** : que l'on trouve dans les haies de ronces à la fin de l'été : ces baies sauvages sont plus petites que celles des variétés cultivées.
- ❖ **La mûre de culture** : les ronces fruitières sont issues d'une amélioration variétale de la ronce commune. Parmi les variétés de mûres les plus commercialisées en France.
- ❖ **La mûre issue du murier-platane** : qui sert de nourriture au ver à soie. Seul l'arbre femelle donne des fruits. Ces derniers sont particulièrement sucrés (**Michel Caron, 2014**).

## 1.7. Effet pharmaceutique du mûrier

Depuis longtemps la mûre est utilisée pour ses vertus médicinales et nutritionnelles en effet, les Indiens d'Amérique utilisaient les racines de mûre pour soulager l'asthénie des femmes, après leurs grossesses.

Les américains s'en servaient comme remède contre la diarrhée. Durant l'Antiquité, elle servait déjà de traitement contre les maux de gorge des grecs.

Les composés phénoliques du mûrier font partie intégrante de la diète humaine et peuvent même être intentionnellement utilisés comme préparation médicinale (**Sellappan et al., 2002**).

Ils ont la propriété d'éliminer les radicaux libres. Ces derniers sont des molécules très instables et réactives. Ils interagissent dans le processus de vieillissement des gens.

Quant aux flavonoïdes (qui comprennent les anthocyanines), ils sont connus pour réduire les maladies coronaires, sont anticancérigènes et ont des propriétés antioxydantes (**Sellappan et al., 2002**).

Les feuilles du mûrier sont riches en flavonoïdes qui sont parfois employées en infusion contre le diabète afin de diminuer la glycosurie (sucre dans les urines).

Les fruits avant leur maturité sont astringents et très acidulés utilisés, contre la diarrhée et la dysenterie (**Duke et Ayensu, 1985**).

Le tableau suivant résume quelques activités biologiques de *M. nigra*

**Tableau 4:** Principales activités biologiques et pharmacologiques de *M. nigra*

Activité pharmacologique	Model d'étude	Parties utilisées	Références
Antinociceptif	Souris males suisses	Feuilles	<b>Padilha et al., 2009</b>
Anti-inflammatoire	Leucocytes polynucléaires de rat	Pulpes et feuilles	<b>De Pádua Lúcio et al., 2018</b> <b>Giusti-Paiva et al., 2010</b>
Antimicrobien	<i>In vitro</i>	Ecorce fruit et feuilles	<b>Oliveira et al., 2018</b> <b>Aulifa et al., 2018</b> <b>Tahir et al., 2017</b>
Anti-mélanogène (Blanchiment de la peau)	<i>In vitro</i>	Feuilles	<b>De Freitas, 2016</b>
Anti diabétique	Rats mâles Wistar Souris albinos mâle	Feuille	<b>Abd El-Mawla et al., 2011</b> <b>AbouZid et al., 2014</b>
Anti-obésité	Rat Wistar	Feuille	<b>Volpato et al., 2011</b> <b>Zeni et al., 2017</b>
Anti-hyperlipidimique	Souris mâles BALB Souris mâles suisse Rats mâles Wistar	Feuille	<b>Turgut et al., 2016</b> <b>Dalmagro, 2017</b>
Protecteur d'organes	Ligne cellulaire; rats albinos mâles Rats mâles Wistar	Feuille	<b>Tag, 2015</b> <b>Hassanalilou, 2017</b>
Anticancer	Lignée cellulaire de cancer du col de l'utérus humain HeLa	Feuille	<b>Ahmed et al., 2016</b>

### 1.8. Usages cosmétiques

Les feuilles de mûrier noir possèdent des vertus astringentes, reminéralisantes, restructurâtes et tonifiantes. Elles entrent par conséquent dans la composition de :

- Shampoings pour cheveux gras.
- Masques astringents pour peaux grasses.

*Chapitre 2:*

---

*Le stress oxydant*

---



## 1. Stress oxydatif

### 1.1. Définition

Le stress oxydant se forme lorsque l'organisme n'est plus capable de contrôler la production des radicaux libres et que les mécanismes protecteurs sont dépassés donc il est défini comme un déséquilibre de la balance des oxydants et des antis oxydants. Il peut être lié soit à la production excessive des **RL** ou bien à la diminution de la défense anti oxydante. En raison de la capacité à endommager les cellules, les tissus, et les organes, les ERO sont impliqués dans un grand nombre de problèmes tout aigus que chroniques (HTA, diabète, cancer, vieillissement etc.) (Favier, 2003 ; Roede et Jones, 2010).

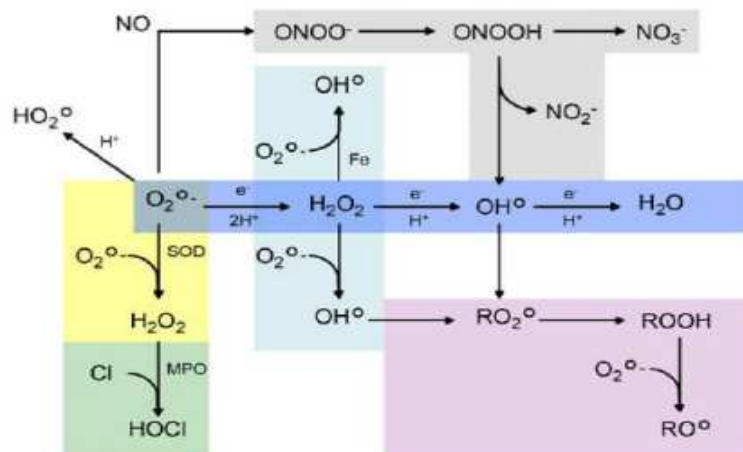
Le stress oxydant touche l'ensemble des tissus et métabolismes et cause des dégâts souvent irréversibles pour la cellule (mutation de l'ADN, destruction des protéines, oxydation des lipides et de glucose).

### 1.2. Définition d'un radical libre

C'est une espèce chimique neutre ou chargée caractérisée par la présence d'un ou plusieurs électrons libres dits célibataires sur son orbitale externe. Ces espèces chimiques sont très réactives et la durée la vie et très courte  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  secondes car elles cherchent à apparier leurs électrons célibataires libres (Favier, 2003).

### 1.3. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Parmi les espèces radicalaires qui se forment dans les cellules, se trouvent les espèces réactives de l'oxygène (**ERO**) qui sont des radicaux libres qui dérivent de l'oxygène, par addition d'un électron. Les espèces réactives les plus intéressantes sont : l'anion superoxyde (**O<sub>2</sub><sup>-</sup>**), le radical hydroxyle (**OH**), radical hydroperoxyde (**HO<sub>2</sub><sup>.</sup>**), et aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dérivées de l'oxygène tels que : le peroxyde d'hydrogène (**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**), acide hypochloreux (**HOCl**), Ozone (**O<sub>3</sub>**). Par ailleurs, pas tous les radicaux libres sont des dérivés de l'oxygène, par exemple le monoxyde d'azote (**NO**) est un radical libre dérivé de l'azote (Fig. 2) (Bonfont-rousselot *et al.*, 2003).



**Figure 2:** Formation en cascade des différents ERO à partir du radical superoxyde (Koechlin-Ramonatxo, 2006)

#### 1.4. Origine des radicaux libres

- **Les facteurs exogènes :**

Des facteurs exogènes liés à l'environnement sont à l'origine d'une augmentation du stress oxydant dans l'organisme ainsi la formation des radicaux libres. Ces facteurs incluent des agents cancérigènes tels que : l'exposition prolongée au soleil et aux radiations UV, la pollution, le tabagisme ; la consommation excessive d'alcool et la prise de certains médicaments. Enfin une alimentation pauvre en vitamines et oligo-éléments peut contribuer à l'apparition d'un stress oxydant dans l'organisme (Pincemail, 2002 ; Chen *et al.*, 2012).

- **Les facteurs endogènes :**

La production des **ERO** dans les cellules humaines est essentiellement d'origine enzymatique par les enzymes : oxydases (NADPH oxydase), déshydrogénases, oxygénases, lipoxygénases, peroxydases et la xanthine oxydase. De même, les radicaux libres sont produits *in vivo* sous l'action de plusieurs systèmes biochimiques tel que, les cellules neuronales, endothéliales et phagocytaires (macrophages). D'autres facteurs endogènes, notamment le stress intellectuel ou thermique influence leur production des radicaux libres (Serteyn *et al.*, 2002 ; Beaudoux, 2006 ; Valko *et al.*, 2006).

#### 1.5. Mécanisme de formation des radicaux libres

L'organisme a besoin d' $O_2$  pour produire de l'énergie au cours des réactions dites de respiration oxydative. Cependant, une faible partie de l'oxygène échappe à sa réduction en eau au niveau de la mitochondrie, donc elle peut être l'origine de la production de radicaux libres oxygénés (**RLO**). Un dérèglement du fonctionnement de la chaîne respiratoire

mitochondriale peut être à l'origine d'une production radicalaire accrue (Chu *et al.*, 2010 ; Budiman *et al.*, 2017).

### 1.6. Rôle physiologique des espèces réactives

Les espèces réactives de l'oxygène **ERO** ou de l'azote **ERA** ne sont pas uniquement toxiques. Ils remplissent un rôle physiologique en agissant à faible concentration comme des messagers secondaires capables d'activer des facteurs de transcription (P38 MAP kinase) eux même responsables de l'activité des gènes impliqués dans la réponse immunitaire (Valko *et al.*, 2004).

- ❖ Moduler l'expression des gènes codant pour les enzymes antioxydants.
- ❖ Réguler le phénomène d'apoptose des cellules tumorales.
- ❖ Détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires.

**Tableau 5:** Mécanismes de formation des principales ERO (Koechlin-Ramonatxo *et al.*, 2006).

Espèces réactives	Réactions de formation	Propriétés
L'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ )	$O_2 + 1e^- \xrightarrow{\text{cytochrome oxydase}} O_2^{\cdot-}$ $2O_2 + NADPH \xrightarrow{\text{NADPH oxydase}} 2O_2^{\cdot-} + NADP^+ + H^+$ $\text{Xanthine} + 2O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{xanthine oxydase}} 2O_2^{\cdot-} + 2H^+ + \text{acide urique}$	C'est le radical le moins réactif mais précurseur des autre ERO
Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )	Formé à partir de l'anion superoxyd réaction catalysée par (SOD) $O_2^{\cdot-} + O_2 \xrightarrow{\text{SOD}} H_2O_2 + O_2$	Il est très réactif capable de générer $OH^\circ$
Le radical hydroxyle $OH^\circ$	Formé par : la réaction de Fenton $H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + OH^\circ + OH^-$ la réaction d'Haber Weiss : $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \longrightarrow OH^- + HO^\circ + O_2$	Le radical ( $OH^\circ$ ) est le plus dangereux

### 1.7. Les conséquences du stress oxydant

La production excessive des **ERO** provoque des dommages cellulaires des molécules biologiques : oxydation de l'ADN, des protéines, de lipides et des glucides.

Le stress sera la principale cause de plusieurs anomalies et maladies comme : le cancer, mutation, carcinogénèse, œdème pulmonaire, malformation des fœtus, fibrose, dépôt de lipides oxydés, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Favier, 2003**). Les principales cibles radicalaires sont :

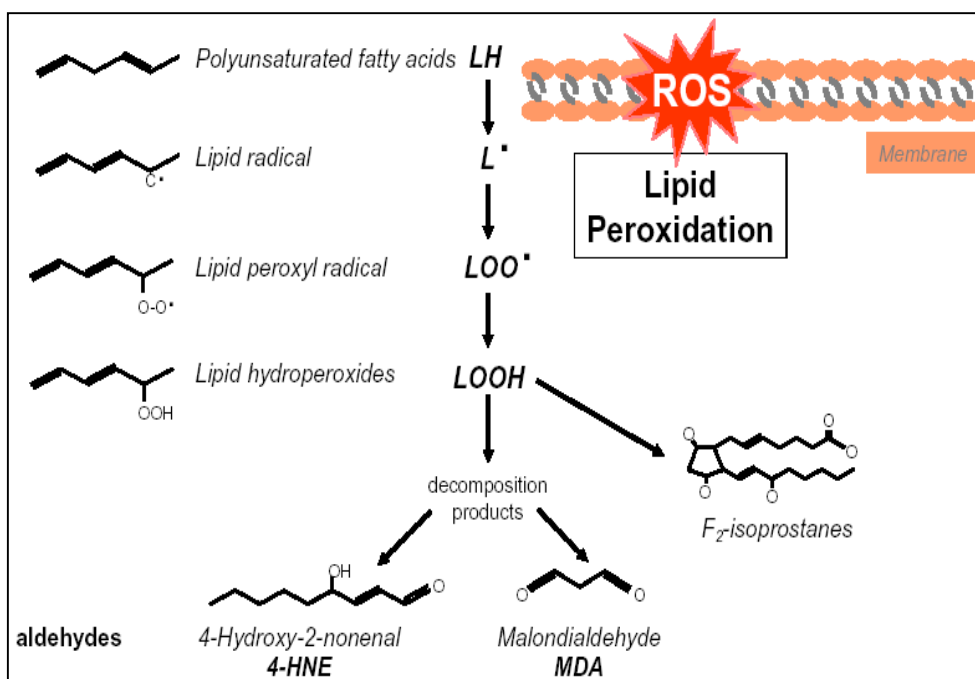
#### • L'oxydation de L'ADN :

Les ERO, en particulier les radicaux hydroxyles, lorsqu'ils sont à grande concentration peuvent induire des effets mutagènes ou l'arrêt de réplifications de l'ADN. Ils agissent en provoquant des altérations au niveau des bases puriques et pyrimidiques.

Parmi les bases transformées : la 8-hydroxy-guanine (marqueur de stress). De graves altérations du matériel génétique sont induites par cette agression comme : mutations carcinogènes, cassures et anomalies des réparations ce qui peut conduire à l'apoptose (**Favier, 2003**).

#### • L'oxydation Les lipides :

Les acides gras polyinsaturés ainsi que les phospholipides membranaires sont les cibles privilégiées des attaques oxydatives par les ERO plus particulièrement par le radical hydroxyle ; ce qui induit des processus de peroxydations en chaîne.



**Figure 3:** Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et la nature des produits formés (**Favier, 2003**).



Ces processus génèrent des hydro peroxydes qui peuvent continuer à s'oxyder et se fragmenter en aldéhydes et en alcane aboutissant à la désorganisation de la membrane, altérant en ses fonctions d'échange, de barrière et d'information (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

• **Oxydation des protéines :**

Les protéines sont les constituants cellulaires les plus abondants et sont des cibles importantes du stress oxydant. Les ERO sont en effet capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes des protéines, altérant également leur fonction. Les plus sensibles à leur action sont le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, la cystéine et la méthionine. Les ERO sont aussi capables de couper des liaisons peptidiques et de former ainsi des fragments protéiques (**Thannickal et Fanburg, 2000**).

### **1.8. Les implications pathologiques des ERO**

Il est bien connu que les ERO induit quelques dommages oxydants aux biomolécules tels que les lipides, des acides nucléiques, des protéines, les hydrates de carbone. Ses dommages causent le vieillissement, le Parkinson, le cancer, l'œdème pulmonaire, rhumatisme, les maladies inflammatoires et cardiovasculaires, l'athérosclérose et le diabète (**Cadenas et Packer, 2002**).

### **1.9. Les antioxydants**

Les antioxydants sont des molécules capables d'inhiber, prévenir, directement la production, et la propagation des oxydants toxiques. Ils peuvent agir en réduisant ces espèces, et les piégeant pour former un composé stable, en séquestrant le fer libre ou en générant du glutathion (**Favier, 2003**).

Selon **Valko *et al.* (2006)**, un antioxydant devrait à la fois :

- ❖ Agir de manière spécifique sur les radicaux libres.
- ❖ Chélater les métaux de transition.
- ❖ Agir à des concentrations physiologiques relativement faibles.

#### **1.9.1. Les antioxydants endogènes**

L'organisme possède des enzymes qui peuvent métaboliser les ERO (**Morena *et al.*, 2002**). Les plus connues sont :

- **La superoxyde dismutase (SOD) :**

La SOD constitue la première ligne de protection contre les dérivés radicalaires de l'oxygène. Il existe deux types de SOD, l'une dont le site actif contient du cuivre et du zinc (Cu, Zn-SOD) et qui est essentiellement localisée dans le cytosol, tandis que l'autre contient du manganèse (Mn-SOD). Le rôle majeur du SOD est d'accélérer la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire (**Gardès-Albert, 2003**).

- **La catalase (CAT) :**

Cette enzyme est formée de quaternaires chaînes polypeptidiques comportant chacune un groupement hème qui constitue le site catalytique de Catalase (**Fe**). Elle est présente dans les peroxysomes, le cytosol et en fortes concentrations dans les érythrocytes et le foie.

Son rôle est de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (**Goudable et al., 2000**).

- **La glutathion peroxydase (Gpx), et Glutathion réductase :**

Le GPx est une enzyme formée de quatre sous unités contenant chacune un atome de sélénium (**Se**). Il est localisé dans le cytosol et la matrice mitochondriale, Il réduit le **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** en molécule d'eau et les hydro-peroxydes lipidiques en alcool. Cette réaction demande l'intervention de deux molécules de glutathion qui se transforment en glutathion disulfure. Ce système ne fonctionne que si le GSSG formé est continuellement réduit en GSH, ce qui est assuré par le glutathion réductase, en présence de NADPH (**Jurkovic, 2008**).

- **La thioredoxine :**

C'est un antioxydant responsable du maintien des protéines à l'état réduit, elle est régénérée par le NADPH sous l'action de la thioredoxine réductase. Elle intervient dans la dégradation des peroxydes lipidiques et des peroxydes d'hydrogène, ainsi que dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique (**Galvani et al., 2008**).

### 1.9.2. Les antioxydants exogènes

C'est la troisième ligne de défense qui permet la réduction des RL. Elle comprend des molécules apportées par l'alimentation et autres molécules dont dispose l'organisme (endogènes). Parmi les antioxydants apportés par l'alimentation on retrouve : les vitamines, les minéraux, et poly phénols (flavonoïdes).

Ce système de protection peut être à la fois membranaire (vitamines E, A), cytosolique et extracellulaire (glutathion, vitamine C, acide urique...).

Les micronutriments sont aussi des éléments indispensables à l'activité d'enzymes antioxydantes) (**Defraigne et al., 2005**).

- **Le glutathion :**

C'est une protéine tripeptidique (acide glutamique-cystéine-glycine) produite naturellement et composée de trois acides aminés sous sa forme réduite (**GSH**) agit comme un antioxydant : assure le maintien des thiols des protéines, ainsi que la forme réduite des vitamines C et E en réduisant la peroxydation des lipides. Il piège le peroxyde d'hydrogène, réagit avec l'oxygène singlet et le radical peroxy (**Flora et al., 2008**).

De nombreuses maladies ont maintenant été associées à une déficience en glutathion (cancer, diabète, maladies cardiovasculaires, etc.) (**Delattre et al., 2005**).

- **La vitamine E :**

L' $\alpha$ - et le  $\gamma$ -tocophérol est un antioxydant qui protège contre les dommages associés aux radicaux libres. Cette vitamine joue un rôle principal dans l'agrégation de la  $\beta$ -amyloïde. Elle est rencontrée surtout dans les huiles végétales, les noix et les germes des graines (**Mohemmedi, 2013 ; Thomas, 2016**).

- **La vitamine C :**

La vitamine C ou acide ascorbique est une molécule hydrosoluble présente dans la plupart des fruits et légumes. Elle ne peut être synthétisée par l'homme et il doit donc la trouver dans l'alimentation. Elle est très dispersée dans tout l'organisme. Elle est absorbée principalement à travers l'intestin grêle. Elle permet la captation de l'anion superoxyde, de radical hydroxyle et peroxyde, l'inhibition de la peroxydation lipidique et la régénération de vitamine E oxydée (**Valko et al., 2006 ; Sarubin et Thomson, 2007**).

- **La vitamine A :**

Est une vitamine liposoluble stockée au niveau du foie. Elles interagissent avec l'oxygène singlet et peuvent empêcher l'oxydation de plusieurs substrats biologiques dont les acides gras polyinsaturés. Il existe 02 types : les rétinoïdes et les provitamines A ( $\beta$  carotène) cette dernière peut inhiber la peroxydation lipidique (**Birben et al., 2012**).

- **Les caroténoïdes :**

Ils constituent les membranes des chloroplastes. Ils contribuent à la coloration jaune, rouge, orange des légumes et des fruits. Ils interagissent avec l'oxygène singlet et les radicaux peroxydes en capturant les radicaux libres (**Djemoui, 2012**).

- **Les minéraux :**

Les minéraux jouent un rôle très important dans la lutte contre le stress oxydant en agissant comme des cofacteurs des enzymes antioxydantes parmi ces éléments :

✓ **Le sélénium :**

C'est un constitutif de glutathion peroxydase, il joue un rôle protecteur contre certains cancers, il s'opposerait aux effets toxiques des RL sur l'ADN (**Birben *et al.*, 2012**).

✓ **Le cuivre :**

C'est l'un des cofacteurs du superoxyde dismutase cytosolique, il est impliqué dans la lutte contre les RL (**Pincemail, 2004**).

✓ **Le manganèse :**

C'est un cofacteur de la SOD mitochondriale, il participe à la dépollution de l'organisme et protège les cellules contre les attaques de radicaux libres (**Pincemail, 2004**).

✓ **Le zinc :**

C'est un des constituants de superoxyde dismutase cytoplasmique. Il protège les groupements thiols des protéines de l'oxydation. Il peut inhiber partiellement les réactions de formation d'espèces oxygénées induites par le fer ou le cuivre (**Pincemail, 2004**).

✓ **Le fer :**

Le fer reste un élément indispensable pour une bonne oxygénation musculaire et pour les échanges sanguins. En effet, de nombreuses enzymes de défense contre les radicaux libres, comme la catalase et l'hème oxygénase II, ont besoin de fer. Les principales sources de fer dans les aliments, sont le foie, la viande, les céréales complètes, le jaune d'œuf et les légumes verts (**Devriese *et al.*, 2006**).

✓ **L'acide urique :**

Le tissu humain ne possède pas l'enzyme nécessaire à la dégradation de l'acide urique en allantoiné c'est-à-dire l'urate oxydase. En conséquence, l'acide urique s'accumule comme produit final du catabolisme des purines et est présent en quantité importante dans le plasma avant d'être éliminé par voie rénale. L'acide urique possède une fonction de piègeur (**Souchard *et al.*, 2002**).

### **1.10. Les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante**

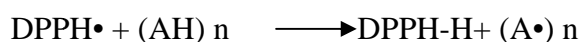
Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination de l'activité antioxydante, nommées d'après le nom de la substance utilisée comme source de radicaux libres. Il est à indiquer que différentes méthodes donnent des résultats assez différents et devraient être appliquées préférentiellement pour la comparaison de produits similaires (**Georgieva *et al.*, 2010**).

### 1.10.1. Méthode de DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl)

Le DPPH est un radical libre, stable ou accepteur d'hydrogène de couleur violet intense. Ce radical perd sa coloration native quand il se lie avec des substances anti oxydantes (AH), qui lui transfèrent des électrons ou des protons. La forme réduite du DPPH confère à la solution une couleur jaune (**Gadow et al., 1997 ; Cavar et al., 2009**).

Le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration découle, de la nature, de la concentration et de la puissance des principes actifs présents (**Kroyer et al., 2007**).

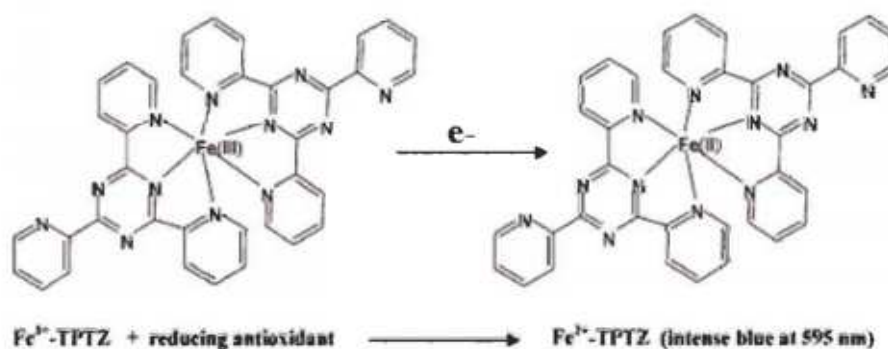
La réaction peut se résumer de la façon suivante



### 1.10.2. Méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

C'est une méthode de dosage colorimétrique du transfert d'électrons, basée sur la capacité des produits testés à réduire le fer. Originellement conçue pour mesurer le potentiel antioxydant du sang, la méthode FRAP a pour avantage d'être adéquate pour mesurer le potentiel de composés purs. De plus, elle est simple, rapide et peu couteuse (**Pellegrini et al., 2003 ; Prior et al., 2005**).

Elle consiste à observer après 4 minutes le changement d'absorbance à 593 nm dû à la réduction du complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ (fer 2, 4,6-tripyridyls-triazine) et l'apparition d'une couleur bleue (**Benzie et Strain, 1996 ; Roginsky et Lissi, 2005**) (Fig. 4).



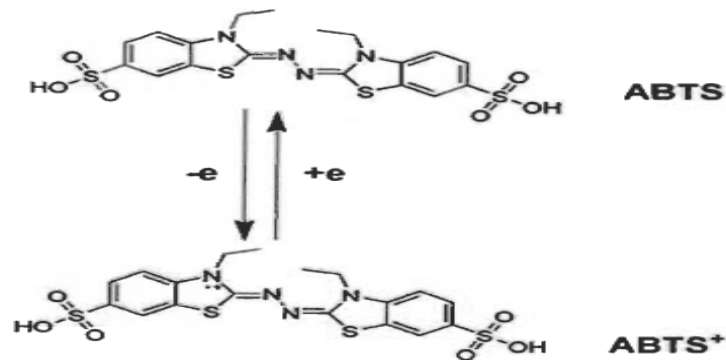
**Figure 4:** Réaction de la méthode FRAP (**Prior et al., 2005**).

### 1.10.3. Méthode TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) avec ABTS

Cette méthode est basée sur la capacité antioxydante (CA) à neutraliser le radical ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)).

La CA est mesurée comme la capacité des composés tests à diminuer l'intensité de la coloration obtenue à partir de l'ABTS en la comparant avec un antioxydant de référence, le Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique).

La réduction de l'ABTS (Fig. 5) conduit à une décoloration du bleu de la solution ABTS mesurée à 645-734 nm de la solution (Re *et al.*, 1999).



**Figure 5:** Oxydo-réduction de l'ABTS en ABTS<sup>•+</sup> (Christopher *et al.*, 2014).

#### 1.10.4. La méthode ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)

Elle mesure la capacité d'un antioxydant à prévenir les dommages oxydants d'une molécule cible par des radicaux peroxydes générés par l'AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride) (Crichton *et al.*, 2002).

Cette méthode consiste à la dégradation de la molécule cible lorsqu'elle est oxydée par les radicaux peroxydes (Ou *et al.*, 2001).

Elle a un avantage d'être adaptée aux antioxydants hydrophiles et lipophiles. Elle peut être applicable pour évaluer la capacité antioxydante des aliments ainsi que les solutions biologiques tels que le plasma sanguin (Cao *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996; Prior *et al.*, 2003; Prior *et al.*, 2005).

#### 1.10.5. 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 (Nur alam *et al.*, 2013).

#### 1.10.6. Test de blanchiment du $\beta$ -carotène

Dans ce test l'activité antiradicalaire des extraits est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du  $\beta$ -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique (**Kouamé *et al.*, 2009**).

#### 1.10.7. Méthode de la xanthine oxydase

Elle est basée sur l'inhibition de la xanthine oxydase qui conduit une diminution de la production d'acide urique, qui a été déterminée par spectrophotométrie. (**Oskoueian *et al.*, 2011**)

#### 1.10.8. Méthode de DEPG (N,N-dimethyl-p-phenylene diaminedihydrochloride)

Elle est basée sur la réduction de couleur de la solution tamponnée de DEPG dans un tampon acétate et le chlorure ferrique. La procédure implique la mesure de la diminution de l'absorbance de DEPG en présence d'accepteurs avec maximum d'absorption de 505 nm (**Nur alam *et al.*, 2012**).

#### 1.10.9. Piégeage du radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ )

Le radical réduit le  $NBT^{2+}$  (Nitro-Blue Tétrazolium) de couleur jaune, en bleu de formazan de couleur pourpre qui absorbe à 560 nm.

Un 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.

Une courbe représentant le logarithme du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de composé testé, permet de déterminer la  $CI_{50}$  (concentration inhibant 50% de l'activité) du composé (**Parejo *et al.*, 2002**).

#### 1.10.10. Piégeage du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ scavenging activity)

Le peroxyde d'hydrogène est considéré comme toxique pour les cellules car il permet la formation des radicaux hydroxyles (**Shrinivas *et al.*, 2011**).

L'évaluation de la capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène est basée sur son absorption dans le domaine de l'UV. Comme la concentration de  $H_2O_2$  diminue par les composés piègeurs, la valeur d'absorbance de ce dernier à 230 nm diminue également (**Malgalhae *et al.*, 2008**).

*Chapitre 3 :*

---

*Les composés phénoliques*

---





## 1. Les polyphénols

### 1.1. Généralité

Ces métabolites à poids moléculaire élevé, sont caractérisés par une structure de base, ayant comme point commun la présence d'au moins un cycle aromatique porteur d'une ou de plusieurs fonctions hydroxyles qui peuvent être méthylés, acylés ou glycosylés, et comportant au moins 8000 structures connues différentes, allant de molécules phénoliques simples tels que, les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tanins (**Bahorun, 1997, Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

Les flavonoïdes représentent plus de la moitié des polyphénols, les lignanes, les coumarines ainsi que les stilbènes qui se divisent en plusieurs composés (**Manach et al., 2004; Erdman et al., 2007**).

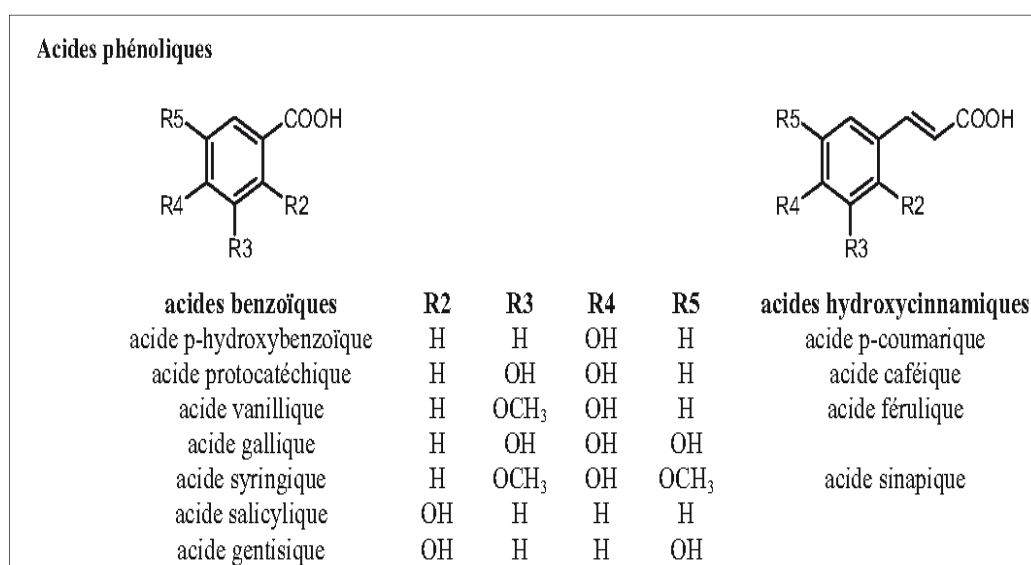
Ils se trouvent dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Ces composés jouent un rôle essentiel dans la croissance et la survie des végétaux. En effet, ils constituent un mécanisme de défense contre les agents pathogènes, les parasites, les prédateurs ainsi que les rayons UV du soleil (**Tapiero et al., 2002 ; Yusuf, 2006**).

#### 1.1.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont les principaux polyphénols retrouvés dans l'alimentation sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un groupe hydroxyle et ils sont représentés par deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique (Fig. 6) (**El Gharras, 2009**).

Les acides hydroxybenzoïques sont des dérivées de l'acide benzoïque de structure (C6-C1) possédant au moins une fonction carboxyle et un hydroxyle phénolique. L'acide gallique l'un des acides phénols le plus courant ainsi que son dimère, l'acide hexahydroxydiphénique sont des éléments hydrolysables constitutifs de tanins. Ils sont abondants dans les fruits et légumes (**Bruneton, 2009 ; Legrand, 2015**).

Les acides hydroxycinnamiques sont des dérivés de l'acide cinnamique aussi connus sous le nom de phénylpropanoïde. Leur structure en (C6-C3) est caractérisée par un squelette de base constitué d'un noyau benzénique et d'une chaîne aliphatique à 3 carbones avec un ou plusieurs groupements hydroxyles. La réactivité de cette classe de molécules est déterminée par le degré d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires (**Chira et al., 2008 ; Legrand, 2015**).



**Figure 6:** Exemples des acides phénoliques (Chira *et al.*, 2008).

### 1.1.2. Les flavonoïdes

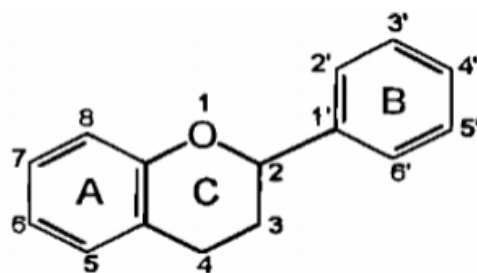
Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires qui représentent une large gamme des composés phénoliques (Seleem *et al.*, 2017).

Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Ils sont présents dans l'épiderme des feuilles ainsi que dans la peau des fruits et donnent des couleurs qui varient du jaune clair au jaune or (Ghestem *et al.*, 2001).

À l'état naturel les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides, mais leur localisation cellulaire est encore incertaine bien que certains résultats favorisent le stockage dans la vacuole ou dans le réticulum endoplasmique (Lilou *et al.*, 2008).

#### ▪ Structure chimique

Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phényl chromone leur structure de base est à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), constitué de deux cycles phényles A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, que désigne la lettre C portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides (Dacosta, 2003 ; Milane, 2004) comme le montre la figure 7.



**Figure 7:** Structure chimique de base des flavonoïdes (**Krishna et al., 2001**).

▪ **Classification**

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et possèdent le même élément structural de base.

Ils peuvent être subdivisés en plusieurs classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central, dont les plus importantes sont : flavones, isoflavandiols, flavanols, flavandiols, aurones, chalcones, anthocyanins (**Effendi et al., 2008**) (Tabl. 6).

**Tableau 6:** Principales classes des flavonoïdes avec quelques exemples (**Aruoma et al., 2003**).

Classes	Structure chimique	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH <sub>3</sub>	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidzeine

Des substituants des cycles A et B donnent naissance à des composés différents à l'intérieur des flavonoïdes. Ces substitutions peuvent impliquer l'oxygénation, l'alkylation, la glycosylation, l'acylation et la sulfatation (**Balasundram *et al.*, 2006**).

- **Localisation et distribution des flavonoïdes dans la plante**

Les flavonoïdes sont largement répartis dans le monde végétal, ils sont distribués dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs des plantes (**Medic *et al.*, 2003**).

Ils se trouvent dans les vacuoles des cellules sous forme glycosylées ce qui permet d'augmenter leur solubilité et de limiter leur toxicité pour la cellule. Ils sont abondants dans les légumes (salade, choux, épinards, etc.), les agrumes : (citrons, orange, pamplemousses) et les fruits : (abricots, cerises, mûres et raisins). Ils se trouvent également en quantité importante dans de nombreuses plantes médicinales et très spécifiquement dans les herbes aromatiques comme le thym, le persil, le romarin et le céleri (**Manach *et al.*, 2004**).

Sur le plan cellulaire, ils sont synthétisés dans les chloroplastes puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles (**Piquemal, 2008**).

On trouvera par exemple, les flavanones dans les agrumes, les isoflavones dans le soja, les anthocyanes et les flavonols ont eu une large distribution dans les fruits et les légumes tandis que les chalcones qui se retrouvent fréquemment dans les pétales des fleurs (Tabl. 7). (**Piquemal, 2008**).

**Tableau 7:** Distribution alimentaire des classes de flavonoïdes (Erdman *et al.*, 2007).

Flavonoïdes	Aliments	Caractéristiques
<b>Flavonols</b>	Oignon, thé, pommes.	Groupe le plus abondant. Les composés les plus représentatifs sont le kaempferol et la quercétine possèdent un très fort pouvoir antioxydant.
<b>Flavones</b>	Persil, céleri.	Les moins abondantes dans les fruits et légumes. Les flavones se diffèrent des flavonols par le manque d'un <b>OH</b> libre en C3
<b>Flavanones</b>	Fruits du genre Citrus.	Les principaux aglycones sont la naringénine dans le pamplemousse, l'héspéridine dans l'orange et l'ériodictyol dans le citron.
<b>Isoflavones</b>	Graines de soja et dérivants	Variabilité structurale. Présents dans les plantes sous forme libre ou glycosylée.
<b>Flavanols</b>	Thé, cacao, chocolat	Sous forme de monomères, dont l'unité la plus simple est la catéchine, et sous forme polymérique appelés les proanthocyanidines
<b>Anthocyanes</b>	Raisins et céréales.	Groupe le plus important des substances colorées, contribuent à la coloration des plantes.

### 1.1.3. Les tanins

Les tanins sont des composés phénoliques complexes, capables de se lier aux protéines en solution et de les précipiter. Ils sont naturellement produits par les plantes, et se caractérisent par leur facilité à se combiner aux protéines. Ils sont solubles dans l'eau H<sub>2</sub>O et présents dans les écorces des fruits de quelques plantes (Makkar, 2003).

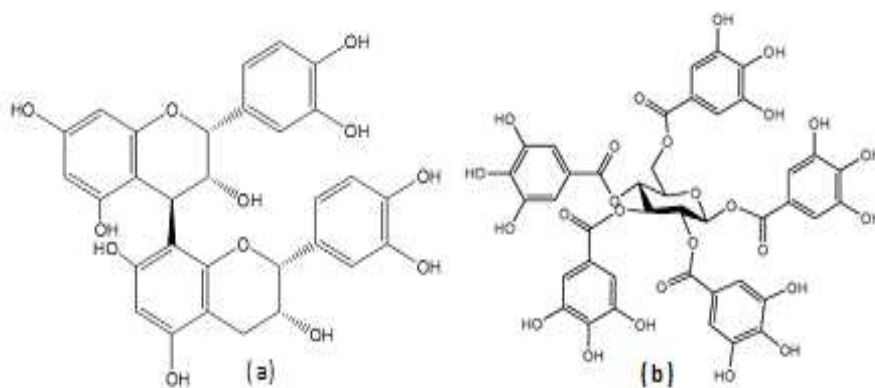
Selon la structure, on a deux types de tanins : les tanins hydrolysables et les tanins condensés, dits aussi : proanthocyanidines (Fig. 8) (Vermerris *et al.*, 2006).

- **Les tanins hydrolysables**

Ce sont des esters de glucose et d'acide gallique facilement hydrolysables par voie chimique ou voie enzymatique. Ils libèrent alors une partie non phénolique et une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique, soit un dimère de ce même acide (Jiménez *et al.*, 2014).

- **Les tanins condensés**

Sont des oligomères ou des polymères de flavan-3-ol reliés par des liaisons entre les carbones C4 et C8 ou C4 et C6. Ce sont des molécules hydrolysables, leur structure est voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absence de sucre. Leur hydrolyse ne donne pas de composés simples comme le glucose ou les acides phénols comme le cas pour les tanins hydrolysables, mais plutôt des anthocyanidines (**Andersen et Markham, 2006 ; Klongsiriwet *et al.*, 2015**).



**Figure 8:** Exemple de structure d'un tanin condensé (a) et d'un tanin hydrolysable (b) (**Vermerris *et al.*, 2006**).

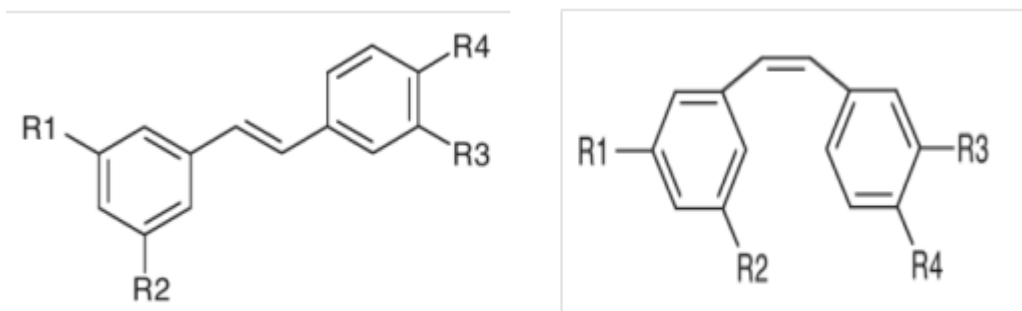
- **Les propriétés pharmacologiques des tanins**

Plusieurs observations, chez les humains comme chez les animaux de laboratoires suggèrent que les tanins possèdent un large spectre de propriétés pharmaceutiques ; thérapeutiques et chimio protectrices dues à leur propriété antiradicalaire (**Tohge *et al.*, 2005**).

En effet, les tanins protègent contre les toxicités induites par différents agents (hydrogène peroxyde, acétaminophène, extraits contenus dans le fumé du tabac...), contre l'hypercholestérolémie. L'action cytoprotectrice des proanthocyanidines est supérieure à celle des vitamines C, B et bêta-carotène (**Ray *et al.*, 2000**).

#### 1.1.4. Les stilbénes C6-C2-C6

Ce sont un groupe très vaste des polyphénols. Ils sont présents dans toutes les sources végétales. La structure chimique de base est composée de deux cycles aromatiques liés par un pont méthylène (C6-C2-C6) (Fig. 9). (**Leray, 2010 ; Collin & Crouzet, 2011**).



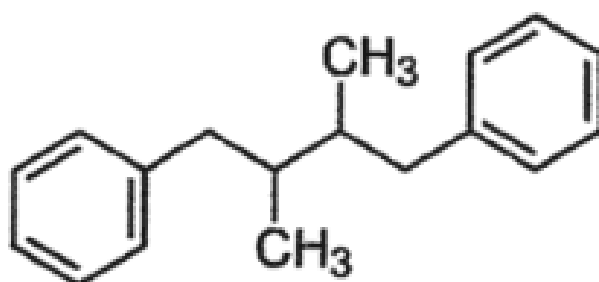
**Figure 9:** Structure de base des stilbènes (tran ou cis)  
(Collin & Crouzet, 2011).

Ils jouent un rôle important dans les mécanismes de défense constitutifs et inductibles, y compris des activités antibactériennes et antifongiques. Les stilbènes possèdent un large spectre d'effets pharmacologiques et thérapeutiques tels que l'effet anti-épileptique, anti-oxydant, anticancéreux (Leray, 2010).

#### 1.1.5. Les lignanes (C6-C3)

Ce sont des composés dimères formés par le couplage de deux fragments (C6-C3) monomères dérivées de la voie des phénylpropanoïdes (Fig. 10) (Gilani & Anderson, 2002).

En fonction de la structure, les lignanes peuvent être classés en cinq familles de composés : proper lignanes, néolignanes, sesquilignanes, dineolignanes, norlignans et des lignanes hybrides (Calvo-Flores *et al.*, 2015).



**Figure 10:** Structure de lignane (Jost et Jost-Tse, 2016).

#### 1.1.6. Les coumarines C6-C3

Les coumarines ont une structure de base (C6-C3) (Fig. 11) dérivant des acides orthohydrocinnamiques. Différents dérivés coumariniques ont été isolés, habituellement, les

substituants sont dans les positions C5, C6, C7 et C8 (par ex : l'ombelliférone, L'hierniarine, l'aesculétine, la scopolétine, l'osthenol, l'osthol...) (Cazes, 2001 ; Collin et Crouzet, 2011).

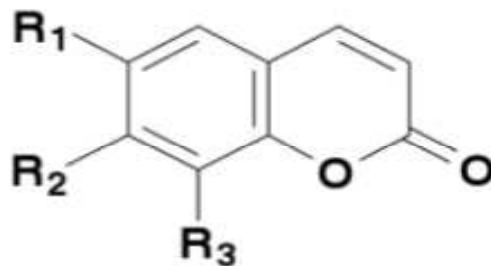


Figure 11: Structure de coumarine (Bruneton, 2009).

## 1.2. Biosynthèse des polyphénols

Les polyphénols sont synthétisés par deux voies biosynthétiques

- La voie de l'acide shikimique
- La voie de l'acide malonique

De plus la diversité structurale des composés polyphénoliques est due à cette double origine biosynthétique. Elle est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte : les flavonoïdes (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

### ➤ Propriétés biologique et intérêt des polyphénols

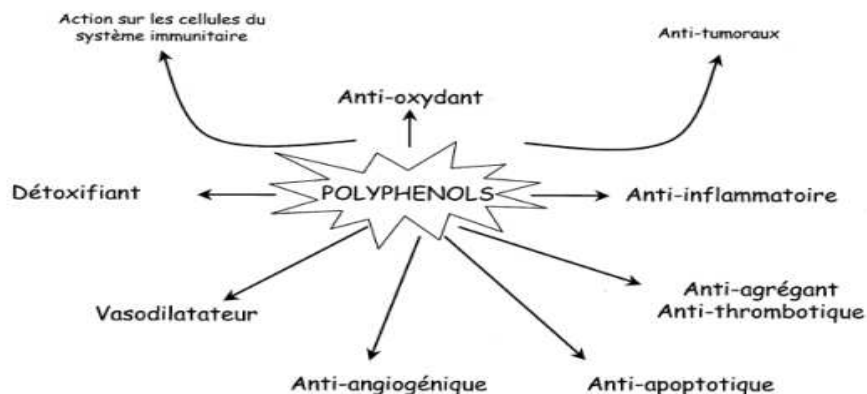
Les composés phénoliques exercent une activité antioxydante via plusieurs mécanismes: piégeage direct des ERO ; inhibition des enzymes génératrices d'EOR, chélation des ions de métaux de transitions et induction de la biosynthèse d'enzymes antioxydantes (Fki *et al.*, 2005).

Les polyphénols constituent une importante famille d'antioxydants dans les plantes, les fruits et les légumes. Ils ont également un rôle dans le contrôle de la croissance des plantes. Ils permettent aussi aux végétaux de se défendre contre les rayons UV.

Certains d'entre eux jouent le rôle des isoflavonols permettant de lutter contre les infections causées par les champignons, et les bactéries (Makoi et Ndakidemi, 2007).

Ces composés montrent aussi des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux anti-allergènes, vasodilatateurs et antioxydants (Fig. 12) (Gomez-Caravaca *et al.*, 2006 ; Babar Ali *et al.*, 2007 ; Falleh *et al.*, 2008).



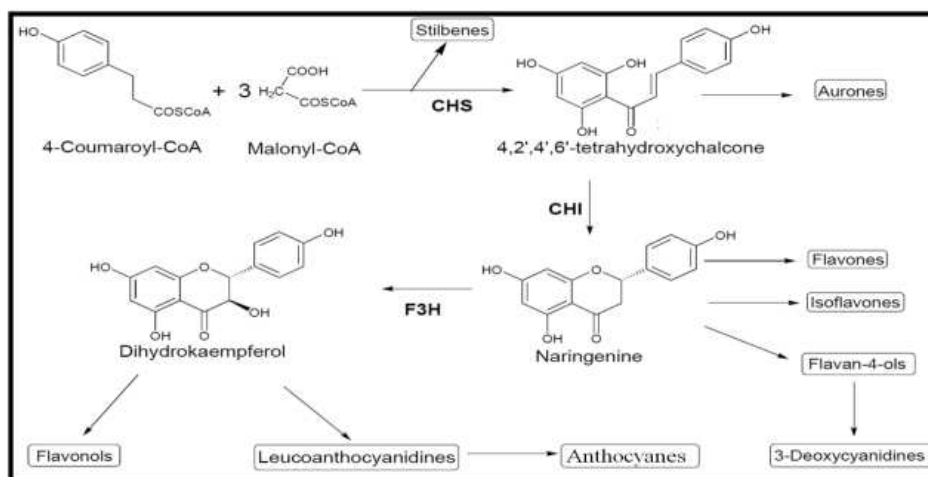


**Figure 12:** Effets biologiques des polyphénols (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

### 1.3. Biosynthèse des flavonoïdes

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et, possèdent le même élément structural de base.

La biosynthèse des flavonoïdes (Fig. 13) se fait par la condensation de trois molécules de malonyl-CoA (voie des malonates) avec le 4-coumaroyl-CoA (voie du shikimate via la phénylalanine) produisant une chalcone ou la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone sous l'action de la chalcone synthase. Cette chalcone peut se cycliser sous l'action de la chalcone isomérase en flavanone : naringénine. Cette dernière est métabolisée en différentes classes de flavonoïdes (Hashimoto *et al.*, 2004).



**Figure 13:** Biosynthèse de différentes classes de flavonoïdes (Subsamanian *et al.*, 2007).

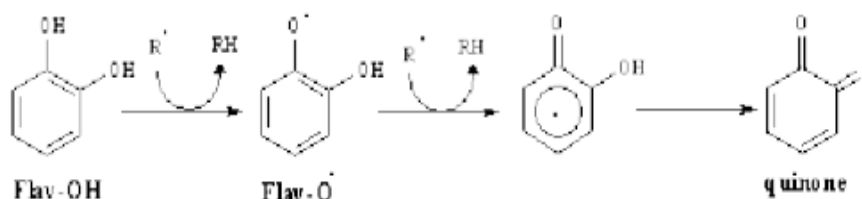
### ➤ Propriétés biologiques des flavonoïdes

#### ✓ L'activité antioxydante

Les flavonoïdes ont suscité l'intérêt scientifique depuis des décennies à cause de leur importance dans la physiologie des plantes et de leurs rôles dans la pigmentation, la croissance et la reproduction. Ils sont impliqués chez les plantes dans le transport d'électrons lors de la photosynthèse (Fig. 14) (Manach *et al.*, 2004).

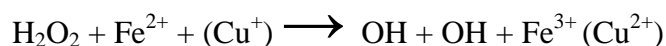
Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries. Leur action antioxydante ne s'exerce pas seulement par l'inhibition des radicaux libres, elle se manifeste par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation d'ions métalliques responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène (Cotelle, 2001 ; Marfak, 2003).

A cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (Fl-OH) sont capables de réduire les radicaux libres (R•), comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle, par transfert d'hydrogène et le flavonoxy (Fl-O•) qui en résulte peut réagir avec un autre radical pour former une structure stable (Jovanovic *et al.*, 1998).



**Figure 14:** Piégeage des espèces réactives oxygénées EOA par les flavonoïdes (Marfak, 2003).

Les flavonoïdes sont aussi considérés comme de bons chélateurs d'ions métalliques, comme le fer ( $\text{Fe}^{2+}$ ) et du cuivre ( $\text{Cu}^+$ ) qui sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques, mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  selon la réaction suivante : (Dacosta, 2003)



#### ✓ L'inhibition enzymatique

Afin de préciser le mécanisme d'action de l'activité inhibitrice des flavonoïdes, des études ont été réalisées sur l'effet de la quercétine sur l'oxydation de l'acide linoléique par

une lipoxygénase. Le mécanisme d'inhibition des lipoxygénases par la quercétine ne serait pas dû à une complexation ou à une oxydation du  $\text{Fe}^{2+}$ , mais plutôt à une inhibition irréversible résultant de liaisons covalentes entre l'enzyme et les dérivés oxydés de la quercétine (quinone ou radical phénoxy) (**Chebil, 2006**).

#### ✓ L'emploi thérapeutique des flavonoïdes

L'utilité thérapeutique de ces composés a été démontrée dans les hémorragies gastro-intestinales, avortement habituel, ménorragie, tuberculose hémoptysie, la maladie de Meniere, épistaxis, rétinopathie, hémorroïdes et syndrome de Raynaud.

Ils jouent un rôle important dans la prévention de l'homme vis-à-vis de certaines maladies liées au stress oxydatif tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives à cause leurs propriétés anti oxydantes (**Hodek et al., 2002**).

Ils ont une action antitumorales, anti-inflammatoires, vasodilatatrices, antidiabétiques, et antiallergiques (**Sharma et al., 2008**).

Ils sont aussi hépato-protecteurs, antispasmodiques, hypocholestérolémiant, antibactériens, et antiviraux (**Petti et Scully., 2009**).

*2<sup>ème</sup> partie : Partie  
expérimentale*

chapitre1 :

---

*Matériel et méthodes*

---



Nos travaux ont été réalisés au sein de laboratoire de recherche : Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité biologique « LAPSAB » de la faculté SNV-STU, Université de Tlemcen.

### 1. Préparation du matériel végétal

Notre étude a été portée sur les feuilles d'une plante de la famille de *Moracées*, *Morus nigra*, connue sur le nom mûrier noir, récoltées dans la Wilaya de Tlemcen durant le mois de juin 2019. Les feuilles matures, sont séchées à température ambiante dans un endroit aéré et à l'abri de la lumière. Les feuilles sèches sont bien stockées jusqu'à leur utilisation ensuite broyée à l'aide d'un broyeur électrique, afin d'obtenir une poudre fine, cette dernière a été conservée dans des flacons en verre à température ambiante à l'abri de la lumière pour éviter la photo oxydation des substances actives dans la poudre.



**Figure 15:** Feuilles de *M. nigra* sèches (A), et broyées (B),  
(Photo prise au laboratoire)

### 2. Extraction du matériel végétal

Les extraits des feuilles de *M. nigra* ont été préparés à partir de 25 g de broyat, et qui ont été mise à macérer dans 500 ml d'un mélange eau/acétone sous agitation discontinue à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 24 heures.

Le macérât (eau/acétone) est filtré deux fois successivement.

- La première filtration est réalisée avec le coton.
- La deuxième filtration est réalisée par le papier filtre Whatman.

Le filtrat obtenu est ensuite évaporé à l'aide d'un rotavapeur à 50°C jusqu'à l'évaporation complète de l'acétone et l'obtention d'une phase aqueuse.

La phase aqueuse obtenue subit une extraction liquide-liquide dans trois solvants organiques différents (Chloroforme, acétate d'éthyle, n-butanol) successivement. Les phases organiques obtenues sont évaporées à sec. La figure 16 montre le protocole extractif de la matière végétale.

Le rendement des extractions défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenu et la masse de la matière végétale sèche, est calculé selon la formule

$$\mathbf{Rdt\ (\%) = (Me / Mv) \times 100}$$

**Rdt%** : Le rendement d'extraction en%

**Me** : masse de l'extrait sec après évaporation

**Mv**: masse de la matière végétale initiale

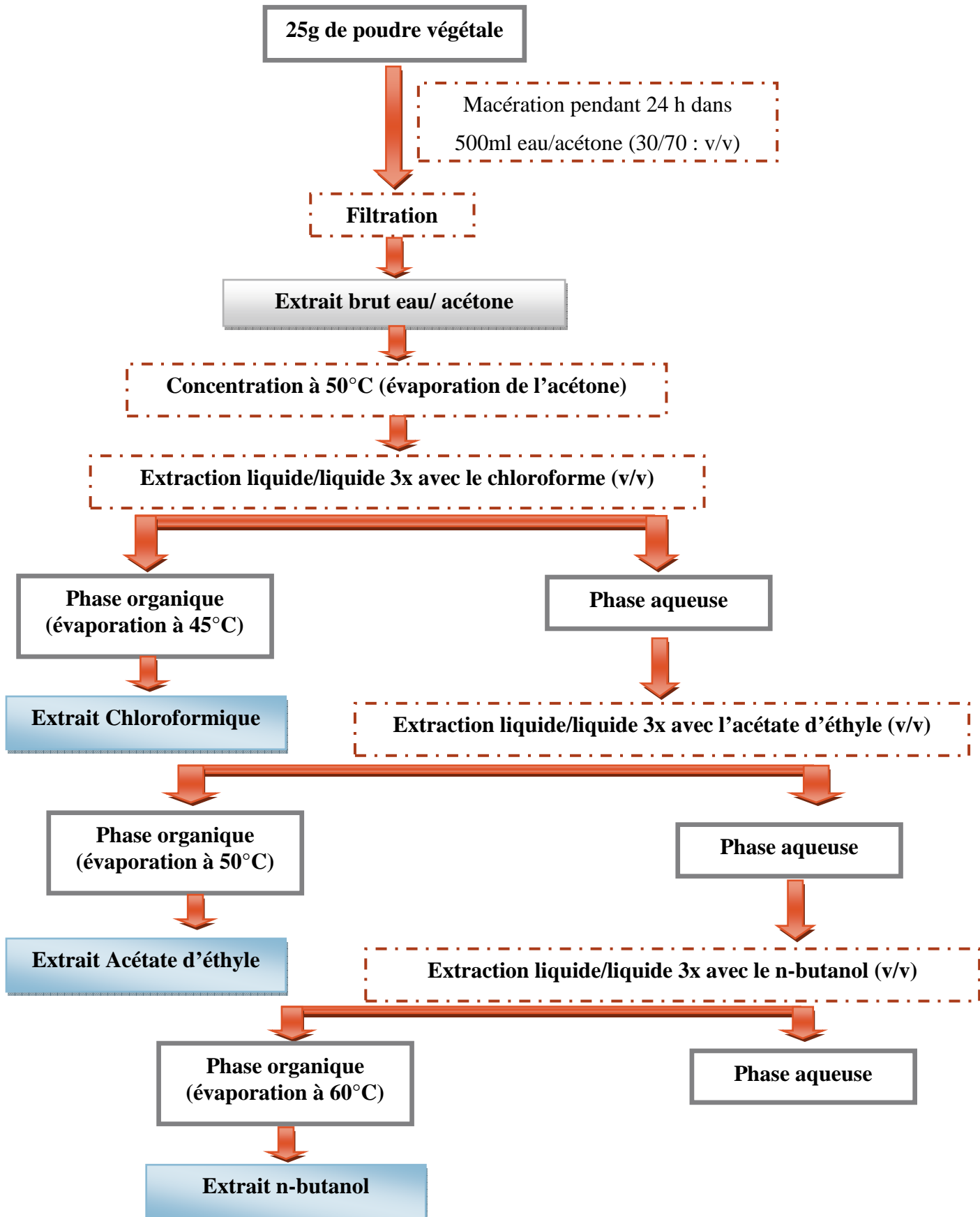


Figure 16: Protocole d'extraction des composés phénoliques (Parejo *et al.*, 2002).

### 3. Dosage des composés phénoliques

#### 3.1. Dosage des polyphénols totaux

Les composés phénoliques totaux sont déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et phosphomolibdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) de couleur jaune. Cette méthode est basée sur la réduction d'un complexe jaune de molybdotungstane par les composés phénoliques entraînant la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleu qui absorbe à 725 nm (**Boligon et al., 2009**).

##### ➤ Mode opératoire

- 0,1 ml de chaque extrait à 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  $\mu$ l de réactif Folin-Ciocalteu (1N) sont ajoutés au mélange ;
- Les tubes sont ensuite incubés pendant 30 min ;
- La lecture des densités optique est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc à 700nm ;
- Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à différentes concentrations (0,05; 0,1; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 mg/ml).

Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/gE).

#### 3.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode décrite par Ardestani Yazdanparast en 2007. C'est une méthode spectrophotométrique utilisant le trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) et la soude NaOH.

Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm.

##### ➤ Mode opératoire

- 500  $\mu$ l de chaque extrait à 1 mg/ml sont mélangés avec 2ml d'eau distillé ;
- Les tubes sont ensuite incubés pendant 6 min à température ambiante ;



- 150 µl de trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) à 10% sont ajoutés ;
- Les tubes sont incubés pour la deuxième fois pendant 6 min à température ambiante
- 2 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4% sont ajoutés immédiatement ;
- Le volume totale est ajusté à 5 ml avec l'eau distillé ;
- La lecture des densités optiques est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc à 510 nm.
- Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoire en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différents concentrations (0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 mg/ml).

Les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme d'extrait (mg EQC/gE).

### 3.3. Dosage des tanins condensés

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

#### ➤ Mode opératoire

- 50 µl d'extrait à 10 mg/ml sont mélangés avec 1500µl de la solution vanilline/méthanol (4%, m/v) ;
- Les tubes sont agités ensuite 750 µl d'HCl concentré est additionnés ;
- Le mélange est laissé réagir à température ambiante pendant 20min ;
- Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différentes concentrations (0,05; 0,2 ; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg/ml)

Les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme d'extrait (mg EQC/gE).

### 3.4. Expression des résultats

Les teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés sont calculés selon la formule suivante :  $T = a*f/b$

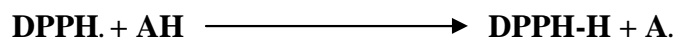
*a* : concentration à partir de la courbe d'étalonnage respective

*f* : facteur de dilution

*b* : concentration initiale de l'extrait

### 4. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre instable accepteur d'hydrogène (Mohcen et Ammar, 2009)



Le test consiste à mettre une solution méthanolique de DPPH de couleur violette à une concentration connue, de différentes concentrations des molécules testées donnant la forme réduite de couleur jaune, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à une longueur d'onde de 515nm (Atoni *et al.*, 2005 ; Majhenic *et al.*, 2007).

#### ➤ Mode opératoire

- 50µl de chaque extrait a différentes concentrations (allant de 0,05 à 3,5 mg/ml) sont ajoutés à 1950µl d'une solution méthanolique de DPPH a  $6,34 \cdot 10^{-5}$  M ;
- Pour chaque concentration un blanc est préparé contenant 50µl de chaque extrait et 1950µl de méthanol ;
- Le control négatif est préparé ; en mélange 50 µl de méthanol avec 1950µl d'une solution méthanolique de DPPH ;
- Après incubation a l'obscurité pendant 30 min à température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée a 515nm a l'aide d'une spectrophotométrie ;

#### ➤ Calcul des pourcentages d'inhibition

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

$$\text{I\%} = (\text{Ac} - \text{Ae} / \text{Ac}) \times 100$$

**Ac** : absorbance du contrôle négatif ;

**Ae** : absorbance de l'échantillon ;

**I%** : pourcentage inhibition.

**Cependant, cette activité n'a pas été achevée à cause des conditions sanitaires et le confinement dû au Covid-19 qui touche le monde entier.**

*Chapitre 2:*

---

*Résultats et interprétation*

---



## 1. Rendement d'extraction

Après extraction on obtient trois extraits différents à partir des feuilles de *M. nigra*: extrait brut, extrait chloroformique et extrait d'acétate d'éthyle, représentés selon leur rendement, couleur et solubilité dans le Tableau 8.

**Tableau 8:** Rendement et caractéristiques des différents extraits de *M. Nigra*.

Extraits	Couleur	Rendement%	Solubilité
Extrait brut	Verte	1,32%	Eau/éthanol
Extrait chloroformique	Brune	2,14%	Ethanol
Extrait d'acétate d'éthyle	Verte	3,7%	Ethanol
Extrait n-butanol	ND	ND	ND

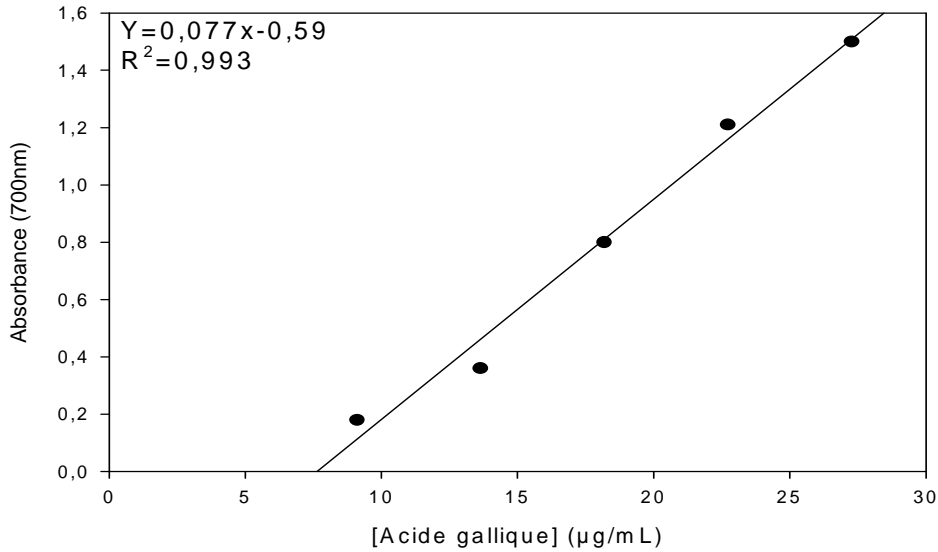
(ND) : non déterminé

Le rendement obtenu à partir de chaque extrait est exprimé en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse des feuilles, le rendement le plus élevé a été observé avec l'extrait de l'acétate d'éthyle (3,7 %), suivi de l'extrait chloroformique (2,14%), et enfin l'extrait brut possède le plus faible rendement (1,32%). Les extraits obtenus sont de couleurs et des rendements différents.

## 2. Résultats du dosage quantitative

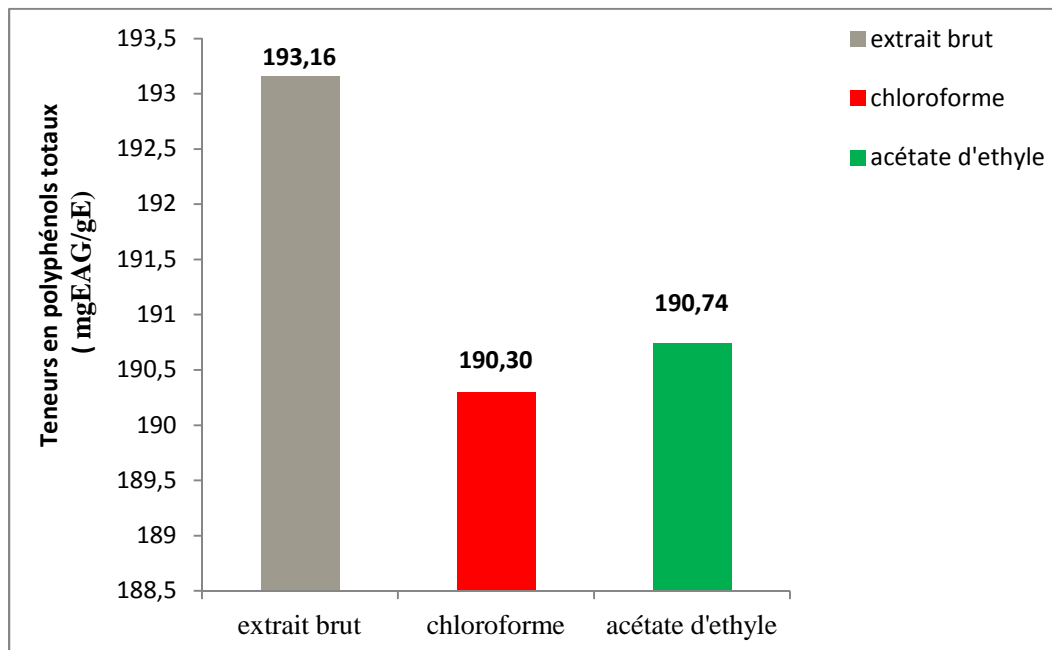
### 2.1. Dosage des polyphénols totaux

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits sont déterminées à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique ( $Y = 0,077x - 0,59$  ;  $R^2 = 0,993$ ), (Fig. 17).



**Figure 16:** Droite d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

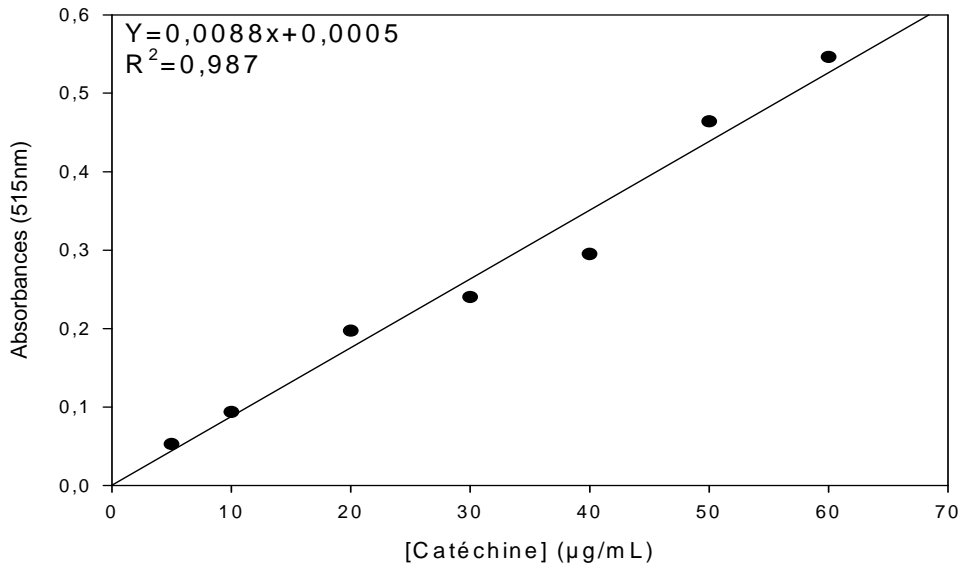
Les résultats du dosage des composés phénoliques totaux, représentés dans la figure 18, montre que le taux des composés phénoliques le plus élevé a été détecté dans l'extrait brut avec une teneur de  $193,16 \pm 0,023$  mgEAG/gE, suivi par la fraction d'acétate d'éthyle avec une teneur de  $190,74 \pm 0,006$  mgEAG/gE, et la plus faible teneur a été enregistrée dans la fraction chloroformique avec une teneur de  $190,30 \pm 0,009$  mgEAG/gE.



**Figure 17:** Teneurs en polyphénols totaux au niveau des extraits des feuilles de *M. nigra*

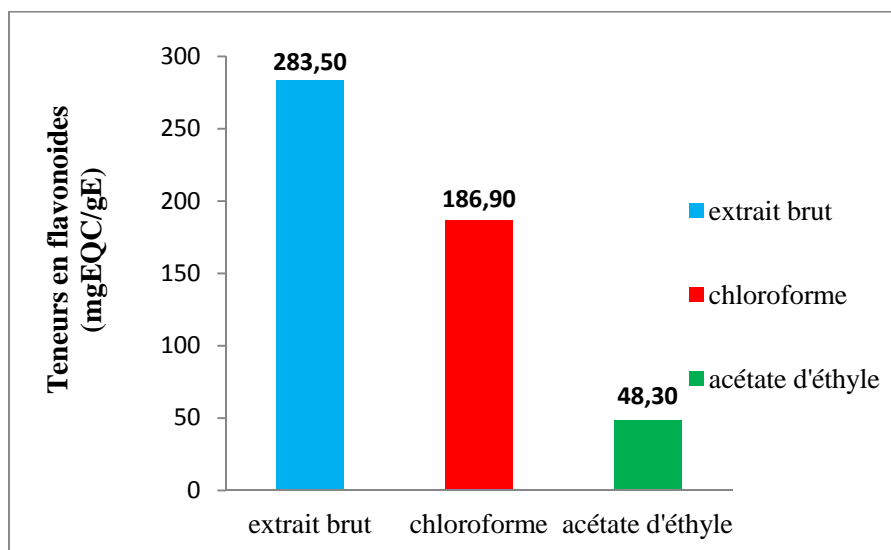
## 2.2. Dosage des flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes des extraits sont déterminées à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de la catéchine ( $Y = 0,0088x + 0,0005$  ;  $R^2 = 0,987$ ), (Fig. 19)



**Figure 18:** Droite d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes

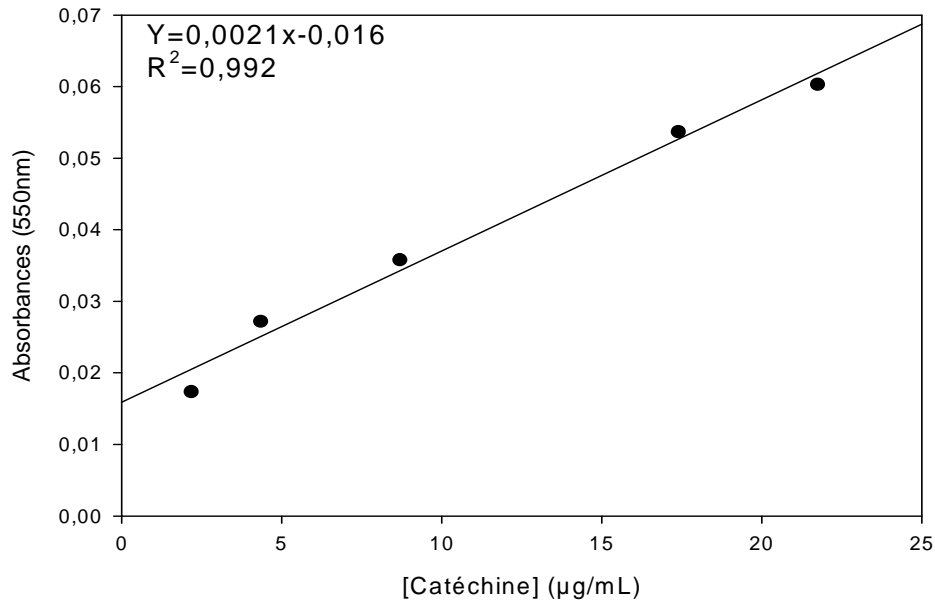
Les résultats du dosage des flavonoïdes, représentés dans la figure 20, montre que le taux des flavonoïdes le plus élevé a été détecté dans l'extrait brut avec une teneur de  $283,50 \pm 0,011$  mgEQC/gE, suivi de la fraction chloroformique avec une teneur de  $186,90 \pm 0,058$  mgEQC/gE. La plus faible teneur a été enregistrée dans la fraction acétate d'éthyle avec une teneur de  $48,30 \pm 0,008$  mgEQC/gE.



**Figure20:** Teneurs en flavonoïdes au niveau des extraits des feuilles de *Morus Nigra*.

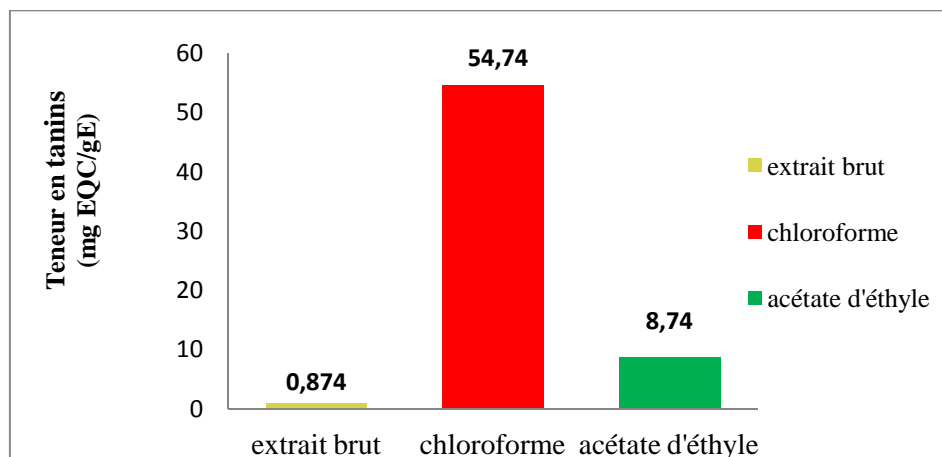
## 2.3. Dosage des tanins condensés

Les teneurs en tanins condensés des extraits sont déterminées à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de la catéchine ( $Y = 0,0021x - 0,016$  ;  $R^2 = 0,992$ ), (Fig. 21).



**Figure 19:** Droite d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés

Selon les résultats obtenus, le chloroforme a permis d'obtenir la teneur la plus élevée en tanins de l'ordre de  $54,74 \pm 0,008$  mgEQC/gE. Cependant une très faible teneur a été trouvée dans l'extrait brut avec une valeur de  $0,874 \pm 0,004$  mgEQC/gE (Fig. 22).



**Figure 20:** Teneurs en tanins condensés au niveau des extraits des feuilles de *M. Nigra*.

Les teneurs de différents composés phénoliques dans les feuilles de *M. nigra* sont regroupées dans le tableau 9.

**Tableau 9:** Teneurs de différents composés phénoliques dans les extraits de *M. nigra*.

Composés phénoliques	Extrait brut	Chloroforme	Acétate d'éthyle
Polyphénols (mgEAG/gE)	193,16±0,023	190,30±0,009	190,74±0,006
Flavonoïdes (mgEQC/gE)	283,50±0,011	186,90±0,058	48,30±0,008
Tanins (mgEQC/gE)	0,874±0,004	54,74±0,008	8,74±0,00

Selon le tableau ci-dessus, les teneurs en composés phénoliques varient d'un extrait à l'autre.

Les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux et en flavonoïdes sont trouvées dans l'extrait brut préparée par macération et qui sont de l'ordre de 193,16±0,023 mgEAG/gE et 283,50±0,011 mgEQC/gE, respectivement.

Ces teneurs sont suivies par celles de la fraction chloroformique avec des teneurs de 190,30±0,009 mgEAG/gE en polyphénols totaux et 186,90±0,058 mgEQC/gE en flavonoïdes et 54,74±0,008 mgEQC/gE en tanins condensés comme valeur maximale.

Par ailleurs, la fraction acétate d'éthyle renferme le taux le plus faible en flavonoïdes (48,30±0,008 mgEQC/gE). Tandis que la teneur la plus faible en tanins est obtenue dans l'extrait brut eau/acétone (0,874±0,004 mgEQC/gE).



---

# *Discussion*

---



Le mûrier est une plante médicinale, elle est depuis longtemps utilisée pour son action favorable sur la santé grâce à son contenu en vitamines, acides organiques, minéraux, sucres et principalement les composés phénoliques (**Ercisli et Orhan, 2007**).

Diverses études avaient montré que les flavonoïdes et les polyphénols étaient les principaux composants végétaux bioactifs et avaient des propriétés biologiques et pharmacologiques d'extraits, de fractions et de constituants actifs isolés de différentes parties de la plante (**Thomas, 2016**).

De nombreux chercheurs s'intéressent à l'étude de ces ingrédients naturels, les molécules phytochimiques qui possèdent une variété de propriétés biologiques, y compris une activité antioxydante (**Li et al., 2014**).

Il a également été largement rapporté que les mûres sont riches en constituants anthocyaniques ayant des activités anti radicalaires remarquables et d'autres avantages pour la santé (**Tahir et al., 2017**).

Dans cette étude, et dans un premier temps, l'extraction des feuilles de *Morus nigra* donne des rendements variables d'un extrait à l'autre.

L'extrait acétate d'éthyle donne le rendement le plus élevé (3,7%), suivi de l'extrait chloroformique (2,14 %) et l'extrait brut (1,32%).

Ces résultats sont inférieurs à ceux trouvés par **Lahmar et al. (2017)**, où les rendements d'extraction des feuilles du mûrier sauvage sont 20,67% pour l'extrait méthanolique et 12,92 % pour l'extrait aqueux.

L'étude réalisée sur le mûrier sauvage par **Asnaashari et al. (2015)**, sur l'extrait méthanolique et aqueux donne des rendements relativement importants de l'ordre de 15,43% et 11,87%, respectivement. Alors que l'étude faite par **Mahroune et Boulebtina (2017)**, les rendements sont 20,67% et 12,92% dans les mêmes solvants précédents.

Ces différences s'expliquent par le contenu en polyphénols qui varie selon le type des solvants et la variété de la plante ainsi que la méthode d'extraction utilisée. Ces facteurs jouent un rôle important dans le rendement des extraits (**Lahmar et al., 2017**).

Ainsi, nous avons réalisés des dosages des composés phénoliques au niveau des extraits étudiés et qui révèlent que ces extraits sont très riches en composés phénoliques avec une

prédominance au niveau de l'extrait brut ( $193,16 \pm 0,023$  mgEAG/gE en polyphénols et  $283,50 \pm 0,011$  mgEQC/gE en flavonoïdes).

Les teneurs en polyphénols totaux obtenues dans notre étude sont de l'ordre de  $193,16 \pm 0,023$  mgEAG/gE dans l'extrait brut,  $190,30 \pm 0,009$  mgEAG/gE dans l'extrait chloroformique, et  $190,74 \pm 0,006$  mgEAG/gE dans l'acétate d'éthyle.

Dans une étude portant sur l'extraction des feuilles de mûrier sauvage, les auteurs rapportent des teneurs en polyphénols totaux de l'ordre de  $268,53 \pm 0,021$  mg EAG/gE dans l'extrait méthanolique, et de  $87,058$  mg EAG/gE dans l'extrait aqueux (**Mahroune et Boulebtina, 2017**).

Alors que d'autres résultats réalisés par **Asnaashari et al. (2015)**, montre que les teneurs en polyphénols totaux dans l'extrait méthanolique et aqueux des feuilles de mûrier sauvage sont  $108,64$  mg EAG/gE et  $86,88$  mg EAG/gE, respectivement.

Les résultats obtenus par ces études sur les feuilles de mûrier sauvage ont révèlent que le meilleur solvant d'extraction est le méthanol (**Aitfella, 2010**). Par contre, les solvants utilisés dans notre étude sont : eau/acétone, chloroforme et acétate d'éthyle.

Puisque, la plupart des phénols simples présents dans les vacuoles peuvent facilement être extraits par les alcools. Ces composés sont abondants dans les feuilles en générale (**Sellappan et al., 2002**).

Par ailleurs, la teneur en flavonoïdes trouvée dans l'étude de **Mahroune et Boulebtina (2017)**, est de  $53,11 \pm 0,002$  mg EQ/gE dans l'extrait méthanolique, et  $51,74 \pm 0,003$  mg EQ/gE dans l'extrait aqueux. Néanmoins les proportions sont relativement proches, ceci s'explique par le fait les hétérosides sont hydrosolubles et également solubles dans les alcools (**Grotenwold, 2006**), expliquent les auteurs précédents.

Ces résultats sont nettement inférieurs à ceux trouvés dans notre étude ( $283,50 \pm 0,011$  mgEQC/gE dans l'extrait brute,  $186,90 \pm 0,058$  mg EQC/gE dans le chlorofome).

D'autre étude réalisée par **Mustafa et al. (2008)** ont trouvé dans *M. nigra* des teneurs moyennes de  $2737$  mg EAG/gE en polyphénols totaux et une quantité importante d'anthocyane avec une moyenne de  $571$  mg Eq. cyanidin/gE.

Les résultats obtenus à partir de l'analyse quantitative de **Pawlowska et al. (2008)**, montrent une quantité totale plus élevée en flavonoïdes dans les fruits de *M. nigra* de 37,8 mg/10 g.

Des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes ont été observées par **Sezai Ercisli et al., (2006)**, dans le mûrier (1422 mg EAG/100 g de matière fraîche et 276 mg Eq. quercétine/100 g de matière fraîche).

Ces résultats ne concordent pas complètement à ceux trouvés dans notre étude dont les valeurs sont moins élevées. Ces différences dans la composition des flavonoïdes et de polyphénols dépendaient non seulement de l'espèce mais aussi des conditions de croissance, telles que le sol, les conditions géographiques et environnementales pendant le développement, et les différences génétiques ainsi que la nature de solvant et les conditions d'extraction (**Nkhili et al., 2009**).

Autres études menées par **Ercisli et Orhan, (2007)**, révèlent que la quantité en flavonoïdes totaux dans le mûrier noir (276 mg QE / 100 g) était plus élevée que celle du mûrier blanc (29 mg QE / 100 g) et du mûrier rouge (219 mg QE / 100 g).

De nombreuses recherches ont prouvé les propriétés antioxydantes de *M. nigra* par différentes méthodes, y compris le piégeage du radical DPPH (**Kalkan Yildirim et al., 2006 ; Mustafa, 2008 ; Mazimba et al., 2011 ; Chen et al., 2016 ; Budiman et al., 2017 ; Souza et al., 2018**).

Nous avons démontré que les feuilles du mûrier noir sont riches en flavonoïdes, polyphénols et tanins. Ces résultats suggèrent que les feuilles du mûrier noir sont une source précieuse en composés bioactifs à pouvoir antioxydant naturel et constituent un traitement alternatif pour divers pathologies.

---

# *Conclusion*

---



De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et agriculture.

L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un très grand intérêt dans la recherche des substances bioactives naturelles. De ce fait plusieurs travaux ont été faits sur les plantes médicinales dont la présente étude qui est consacrée au dosage de quelques composés phénoliques des feuilles de *Morus nigra*.

L'extraction des feuilles de mûrier a permis d'obtenir des rendements qui diffèrent en fonction des solvants utilisés, alors que la teneur en composés phénoliques, flavonoïdes et tanins condensés était conséquente.

L'analyse quantitative montre que les extraits des feuilles de *Morus nigra* sont très riches en métabolites secondaires et principalement en composés phénoliques, et que la teneur de ces composés varie d'un extrait à un autre, avec une prédominance au niveau de l'extrait brut ( $193,16 \pm 0,023$  mgEAG/gE en polyphénols totaux et  $283,50 \pm 0,011$  mgEQC/gE, en flavonoïdes). De ce fait, dans les conditions expérimentales de notre étude, l'extrait brut est l'extrait qui donne les teneurs en composés phénoliques les plus élevées.

Les résultats obtenus dans cette étude, montre la richesse des feuilles de *Morus nigra* en substances chimiques, qui pourraient représentée une nouvelle source potentielle de principe actif et thérapeutique. De ce fait, d'autres études seront nécessaires pour compléter ce travail et qui se résume dans les points suivants :

- ✓ Achever le travail en analysant l'activité antioxydante des extraits préparés.
- ✓ Utiliser les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante comme la méthode FRAP, décoloration du bêta-carotène et le test ABTS+.
- ✓ Effectuer les analyses chimiques (CCM, CPG, HPLC et RMN...) pour l'identification de la composition chimique de la plante.
- ✓ Rechercher l'activité antioxydant *in vivo*.
- ✓ Recherche d'autres activités biologiques comme l'activité antidiabétique, antimicrobienne, anticancéreuse ...et d'autres.

---

*Références  
bibliographiques*

---



- ❖ **Abd El-mawla, A.M.A., Mohamed, K.M., & Mostafa, A.M.** (2011). Induction of Biologically Active Flavonoids in Cell Cultures of *Morus nigra* and Testing their Hypoglycemic Efficacy. *Sci. Pharm*, 79, 951-962.
- ❖ **Agata, K., & Umesono, Y.** (2008). Brain regeneration from pluripotent stem cells in planarian. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci*, 363, 2071-2078
- ❖ **Ahmed, A., Ali, M., El-Kholie, E., El-Garawani, I., & Sherif, N.** (2016). Anticancer activity of *Morus nigra* on human breast cancer cell line (MCF-7): The role of fresh and dry fruit extracts. *J. Biosci. Appl. Res*, 2, 352–361.
- ❖ **Ait Fella, R.**, (2010). Les activités biologiques du genre *Lavandula* (La lavande). Univ. Ferhat Abbas Sétif. 35p.
- ❖ **Anne-Laure, B., Vessela, A.P., Jacques, G., Barreau, C., & Forget-Richard, F.** (2007). Analyse de facteurs biochimiques interagissant dans le processus de biosynthèse des TCTB. Colloque Fusariotoxines des Céréales-Arcachon.
- ❖ **Andersen, M., & Markham, K.R.** (2006). Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications. Taylor & Francis, London.
- ❖ **Aruoma, O.I., Bahorun, T., & Jen, L.S.** (2003). Neuroprotection by bioactive components in extracts of medicinal and food plants. *Mutational Research*, 544, 203-215.
- ❖ **Ardestani A., & Yazdanparast R.** (2007). Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chem*, 104, 21-29
- ❖ **Asnaashari, M., Tajik, R., & Khodaparast, M.H.H.** (2015). Antioxidant activity of raspberry (*Rubus fruticosus*) leaves extract and its effect on oxidative stability of sunflower oil. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 5180–5187. Doi: <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1564-7>
- ❖ **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.
- ❖ **Aulifa, D.L., Fitriansyah, S.N., Ardiansyah, S.A., Wibowo, D.P., Julata, Y.A., & Christy, D.S.** (2018). Phytochimique Dépistage, activité antibactérienne et mode d'action sur *Morus nigra*. *Pharmacogn*, 10, 167-171.
- ❖ **Babar Ali, M., Hahn, E.J., Paek, K.Y., Methyl Jasmonate., & Salicylic Acid.** (2007). Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root. Suspension Cultures. *Molecules*, 12, 607-621.
- ❖ **Bahorun T.** (1997). Substances naturelles actives, la flore mauricienne, une source



- d'approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research. Conseil Mauritus, Amas.
- ❖ **Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S.** (2006). Phenolic compounds in plant and agri-industrial byproducts: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem*, 99, 191-203
  - ❖ **Bandoniene, D., Murkovic, M., Pfannhauser, W., Venskutonis, P.R., Gruzdiene, D.** (2002). Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and on-line HPLC-DPPH methods. *Eur. Food Res. Technol*, 214, 143–147.
  - ❖ **Beaudeau, J.L., Delattre, J., Therond, P., Bonnefont-rousselot, D., Legrand, A., & Peynet, J.** (2006). Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immunol. Biol. Spec*, 21, 144-150.
  - ❖ **Benzie, I.F.F., & Strain, J. J.** (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem*, 239, 70– 76.
  - ❖ **Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O.** (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*, 5, 9-19.
  - ❖ **Boizot, N., & Charpentier, J.P.** (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra*, pp 79-82.
  - ❖ **Boligon, A.A., Pereira, R.P., Feltrin, A.C., Machado, M.M., Janovik, V., Rocha, J.B.T., & Athayde, M.L.** (2009). Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. *Biores Technol*, 100, 6592-6598.
  - ❖ **Bonnefont-Rousselot, D.** (2003). Produits de glycation avancée. Production et signification physiopathologique. *Cah. Nutr. Diét*, 38, 122-129.
  - ❖ **Bruneton, J.** (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*, 4<sup>ème</sup> édition Lavoisier, 1292 pages. d'antagonisme sur l'activité antioxydante.
  - ❖ **Budiman, A., Aulifa, D.L., Kusuma, A.S.W., & Sulastri, A.** (2017). Antibacterial and Antioxidant Activity of BlackMulberry (*Morus nigra*L.) Extract for Acne Treatment. *Pharmacogn*, 9,611–614.
  - ❖ **Calvo-Flores, F.G., Dobado, J.A., Isac-Garcia, J., & Martin-Martinez, F. J.** (2015). *Lignin and Lignans as Renewable Raw Materials*. Edition Wiley, Chemistry, Technologie and Application. Edition *john wiley & sons ,ltd*, p 315

- ❖ **Cao, G., Sofic, E., & Prior, R.L.** (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agr. Food Chem*, 44,3426–343
- ❖ **Cavar, S., Maksimovic, M., Vidic, D., & Paric, A.** (2009). Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Aetemisia annua* L. From Bosnia. *Industrial Crops and Products*, 37, 479-485.
- ❖ **Cazes, J.** (2001). *Encyclopedia of Chromatography* (Print). Edition *Marcel Dekker*.p 206.
- ❖ **Chebil, L.** (2006). Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle. *Thèse de doctorat* de l'institut national polytechnique de Lorraine. INPL, Nancy.
- ❖ **Chen, H., Pu, J., Liu, D., Yu, W., Shao, Y., Yang, G., Xiang, Z., & He, N.** (2016). Anti-Inflammatory and Antinociceptive Properties of Flavonoids from the Fruits of Black Mulberry (*Morus nigra*L.).*PLoS ONE*,11, e0153080.
- ❖ **Chen, J.M., Li, L.J., & Ma, Q.** (2009) .Determination of total flavonoids of mulberry juice, cornus officinalis juice and sea buckthorse juice. *China Brewing*, pp 153–155
- ❖ **Chen, L., HU, J.Y., & Wang, S.Q.** (2012) The rôle of antioxidants in photoprotection : a critical review. *Journal of American Academy of Dermatology*, 67(5), 1013-1024.
- ❖ **Chira, k., saucier, C., suhj-h., & tiessedre, P.L.** (2008). Phytonutrition fondamentale : les polyphénols du raisin, *phytotherapy recherche*, 6, 75-82
- ❖ **Christopher, R., Nyandoro, S.S., Chacha, M., & De Koning, C.B.** (2014). A new cinnamoyl glycot flavonoid, antimycobacterial and antioxidant constituents from *Heritiera littoralis* leaf extracts. *Natural Product Research*, 28(6), 351-358.
- ❖ **Chu, W.L., Lim, Y.W., & Radhakrishnan Ahand, P.E.** (2010). Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals , *BMC complementary and Alternative Medicine*, 10 (53), 2-8
- ❖ **Cole, S.W., Yan, W., Galic, Z., Arevalo, J., & Zack, J.A.** (2005). Expression-based monitoring of transcription factor activity: the TELiS database *Bioinformatics*, 21(6), 803-810.
- ❖ **Crichton, R.R., Wilmet, S., Legssyer, R., & Ward, R.J.** (2002). Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *Journal of Inorganic*

- Biochemistry, 91(1), 9-18.
- ❖ **Collin, S., & Crouzet, J.** (2011). Polyphénols et procédés. *Edition Lavoisier TEC & DOC*, 5 (13), 16-235
  - ❖ **Cotelle, N.** (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr. High. Med. Chem*, 1, 569-590.
  - ❖ **Dacosta, Y.** (2003) Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris. 317 p.
  - ❖ **Defraigne, J.O.** (2005). Un mécanisme physiopathologique central à l'origine des complications du diabète ? *Rev Med Liege*, 60, 472-478.
  - ❖ **De Freitas, M.M., Fontes, P.R., Souza, P.M., William Fagg, C ., Neves Silva Guerra, E., de Medeiros Nóbrega, Y.K., Silveira, D., Fonseca-Bazzo, Y ., Simeoni, L.A; Homem-de-Mello, M ., & coll.** (2016). Extraits de feuilles de *Morus nigra* L. Standardisé en acide chlorogénique, rutine et isoquercitrine: inhibition de la tyrosinase et cytotoxicité. *PLoS ONE*. 11, e0163130.
  - ❖ **Delattre, J., Beaudoux, J.L., & Bonnefont, D.** (2005). Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques, pp 87-108.
  - ❖ **De Pádua Lúcio, K., Rabelo, A.C.S., Araújo, C.M., Brandão, G.C., de Souza, G.H.B., da Silva, R.G., de Souza, D.M.S., Talvani, A., Bezerra, F.S., Cruz Calsavara, A.J., & coll.** (2018). Anti-inflammatoire et antioxydant Propriétés du mûrier noir (*Morus nigra* L.) dans un modèle de septicémie induite par le LPS. *Oxid. Med. Cell Longev*
  - ❖ **Devriese, S., Huybrechts, I., Moreau, M., & Van Oyen, H.** (2006). Enquête de consommation alimentaire Belge. *Epidémiologie. Institut scientifique de Santé publique, ISP/EPI REPORTS N 2006 – 014. Bruxelles (Belgique).*
  - ❖ **Djemoui, D.** (2012). Contribution à l'étude de l'activité antioxydants et antimicrobienne de quelques coumarines synthétisées .Mémoire de master académique en science et de latechnologie des sciences de la matière .Université Kasdi Merbah Ouargla.
  - ❖ **Duke, J.A., & Ayensu, E.S.** (1985). *Medicinal Plants of China 2, Strichzeichnungen* Reference Publ Inc Algonac Michigan
  - ❖ **Ecisli, S., & Orhan, E.** (2007). Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chemistry*, 103(4), 1380-1384.

- ❖ **Effendi, L., Yajun, Y. & al.** (2008). Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.*, 8, 172-181.
- ❖ **ElGharras, H.** (2009). Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12), 2512–2518.
- ❖ **Erdman, J., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Hollman, P., Keen, C.L., Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita, J., Williamson, G., & Burrowes, J.** (2007). Flavonoids and Heart Health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop May 31-June 1, Washington, DC 1–4. *Journal of Nutrition*, 137, 718-737.
- ❖ **Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdely, C.** (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies*, (331), 372-379.
- ❖ **Favier, A.** (2003). Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique l'actualité chimique - novembre-décembre, pp 108-115.
- ❖ **Fazaeli, R., Saadi, Z., & Saadi, R.** (2013) *Journal of Nanostructure in Chemistry*, Fixed-bed adsorption dynamics of Pb (II) adsorption from aqueous solution using nanostructured  $\gamma$ -alumina.
- ❖ **Fki, I., Allouche, N., & Sayadi, S.** (2005). The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4- dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chemistry*, 93, 197-204.
- ❖ **Flora, S.J., Mittal, M., & Mehta, A.** (2008). Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J. Med. Res.*, 128, 501-523
- ❖ **Foucault, B., Julve, P.H., & Gillet, F.** (1991). La phytosociologie synusiale intégrée: Objets et concepts. *Candollea*, 46, 315–340.
- ❖ **Gadow Von, A., Joubert E., & Hansmann C.F.** (1997). Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), x-tocopherol, BHT, and BHA *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 632-638

- ❖ **Galvani, S., Coatrieux, C., Elbaz, M., Grazide, M.H., Thiers, J.C., Parini, V., Uchida, N., Kamar, L., Rostaing, M., Baltas, R., Salvayre, A., & Nègre-Salvayre.** (2008). *Free Radic. Biol. Med.* 45,1457-1467.
- ❖ **Gardes-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., & Jore, D.** (2003) Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique. L'actualité chimique. n°269-270, pp 91-96.
- ❖ **Gazi, M.R., Kanda, K., Yasuda, M., & Kato, F.** (2004). Optimisation of cultural conditions and some properties of radical scavenging substances from *sporobolomyces salmonicolor*. *Pak. J. Biol. Sci*, 7, 1365–1370.
- ❖ **Georgieva, S., Boyadzhiev, L., & Angelov, G.** (2010). Caractérisation des vins bulgares par leur capacité antioxydant. *Revue de génie industriel*, 5,124-132
- ❖ **Ghestem, A., Seguin, E., Paris, M., & Orecchioni, A.M.** (2001). Le préparateur en pharmacie dossier 2èmeEd TEC&DOC. Paris, pp275
- ❖ **Gilani, G.S., & Anderson, J.J.B.** (2002). *Phytoestrogens and health*. Edition *Aocs Press*, p 405.
- ❖ **Giusti-Paiva, A.** (2010). Propriétés anti-inflammatoires des feuilles de *Morus nigra*. *Phytother. Res*, 24, 1496.
- ❖ **Goudable, J., Bertin-Maghit, M., Dalmas, E., Steghens, J.P., Bouchard, C., Gueugniaud, P.Y., & Delafosse, B.** (2000). Time course of oxidative stress after major burns. *Intensive care medicine*, 26(6), 800-803.
- ❖ **Gómez-Caravaca, A.M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A.** (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in bee derived products. *J. Pharm. Biomed. Anal*, 41, 1220-1234.
- ❖ **Grotenwold, E.** (2006). *The Science of Flavonoids*. New York, NY: Springer: 10.1007/978-0-387-28822-2
- ❖ **Gülçin, I., Bursal, E., Bilsel, M., & Gören, A.C.** (2010a). Polyphenol content and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food Chem. Toxicol*, 48 (8-9), 2227-2238.

- ❖ **Hassanalilou, T., Rad, A.H., Abbasalizadeh, S., Vazifekhah, S., Abbasalizadeh, F., Bastani, P., Ejtahed, H.S., & al.** (2017). The future of diabetes management by healthy probiotic microorganisms. *Curr. Diabetes Rev*, 13(6), 582–9
- ❖ **Hashimoto, F., Jamal Uddin, A.F.M., Shimizu, K., & Sakaba, Y.** (2004). Multiple allelism in the hydroxylation of flavonoids in *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. *Flowers. J. Japan Soc. Hort. Sci.*, 73(3), 235-240.
- ❖ **Havsteen, B.H.** (2002). The Biochemistry and Medical Significance of the Flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96, 67-202.
- ❖ **Heinonen, I., Meyer, A., & Frankel, E.** (1998a). Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 25-31
- ❖ **Hodek, P., Trefil, P., & Stiborova, M.** (2002). Potent and versatile flavonoids biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*.
- ❖ **Hosseini, H., & al.** (2016). Early dissemination seeds metastasis in breast cancer *Nature*. Doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nature20785>
- ❖ **Iserin, P.** (2007). *Larousse des plantes médicinales, identification, préparation, soins.* (ed). Larousse, 54, 14-15.
- ❖ **Jiménez, N., Esteban-Torres, M., Mancheño, J.M., de las Rivas, B., & Muñoz, R.** (2014). Tannin degradation by a second tannase enzyme presents in some *Lactobacillus plantarum* strains. *Appl Environ Microbiol*, 80, 2991-2997. 10.1128/AEM.00324-14.
- ❖ **Jost, J.P., & Jost-Tse, Y.C.** (2016). *L'automédication chez les animaux dans la nature.* Editions *connaissances & savoirs.* p 23
- ❖ **Jovanovic, S.V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., & Simic M.G.** (1998). Flavonoids antioxidants *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 4846-4851.
- ❖ **Jurkovic, S., Osredkar, J., & Marc, J.** (2008). Molecular impact of glutathione peroxidases in antioxidant processes. *Biochem Med*, 18, 162–74
- ❖ **Kalkan Yildirim, H.** (2006) Evaluation of colour parameters and antioxidant activities of fruit wines. *Int. J. FoodSci. Nutr.*, 57, 47–63.
- ❖ **Krishna, D., Chaluvadi, M., Raj, N., & Sripal, R.** (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol.*

- ❖ **Klongsiriwet, C., Quijada, J., Williams, A.R., Mueller-Harvey, I., Williamson, E.M., & Hoste, H.** (2015). Synergistic inhibition of haemonchus contortus exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *International Journal of Parasitology Drugs and Drug Resistance*, 5, 127-134.
- ❖ **Koechlin-Ramonatxo, C.** (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20, 165–177.
- ❖ **Kouamé, J., Gnoula, C., Palé, E., Bassolé, H., Guissou, I.P., Simporé, J., & Nikiéma, J.B.** (2009). Etude des propriétés cytotoxiques et anti-radicalaires d'extraits de feuilles et de galles de *Guiera senegalensis* J. F. Gmel (Combretaceae). *Science et technique, Sciences de la santé*. 32 (1 et 2) :14p.
- ❖ **Kroyer, G.T.** (2003). Red clover extract as antioxidant active and functional food ingredient innovative. *Food Science and Emerging Technologies*, 5, 101-105
- ❖ **Kim, D.O., Chun, O.K., Kim, Y.J., Moon, H.Y., & Lee, C.Y.** (2003). Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6509–6515
- ❖ **Lahmar, A.** (2017). Médecine des Voyages et m-santé : quelles sont les fonctionnalités attendues d'une application mobile de conseil en santé du voyageur ? (thèse de doctorat non publiée, Université de Strasbourg, France).
- ❖ **Legrand, G.** (2015). Contribution à la caractérisation du métabolisme des acides chlorogéniques chez la chicorée : approches biochimique et moléculaire. Thèse de doctorat. Université de Lille1. France. pp 35-60.
- ❖ **Leray, C.** (2010). Les lipides dans le monde vivant. Edition *Lavoisier TEC & DOC*, p 5.
- ❖ **Lhuillier, A.** (2007). Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook. f. ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa Trichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae). Thèse de doctorat. Toulouse.
- ❖ **Li, A.N., Li, S., Zhang, Y.J., Xu, X.R., Chen, Y.M., & Li H.B.** (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6, 6020-6047
- ❖ **Lillo, C., Uunis., & 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.
- ❖ **Lindman Svensk, C.A.M. (1926).** fanerogamflora / "2. upplagan." / Stockholm : P.A. Norstedt & söners förlag .
  - ❖ **Liu, R.H. (2003).** Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr*, 78, 517S –520S.
  - ❖ **Louws, F.J., & Dale, A. (1994).** La culture des mûres et des framboises noires et pourpres. AGDEX 234/20. Ministère de l’Agriculture, de l’Alimentation et des Affaires rurales. Ontario. 5 pages.
  - ❖ **Mahroune, N., & Boulebtina, F. (2017).** Extraction des polyphénols ou des flavonoïdes des feuilles de mûres sauvage (*Rubus fruticosus*) par le méthanol ou dans un milieu aqueux : Test de tolérance au glucose et activité antioxydante. Mémoire de Master. Faculté SNV. Université des frères Mentouri Constantine.
  - ❖ **Majhenic, L., Kerget, M.S., & Knez, Z. (2007).** Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chem*, 104, 1258-1268.
  - ❖ **Makkar, H.P.S. (2003).** Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Rum. Res*, 49 (3), 241-256
  - ❖ **Makoi, J.H., & Ndakidemi, P.A. (2007).** Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes. *African Journal of Biotechnology*, 6(12), 1358-1368.
  - ❖ **Malgalhae, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., & Lima, J. (2008).** Methodological aspects about vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chemical Acta*, (613), 1-19.
  - ❖ **Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Re´me´sy, C., & Jime´nez, L. (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727–747.
  - ❖ **Marfak, A. (2003).** Thèse de doctorat Radiolyse Gamma des flavonoïdes ; Etude de leur réactivité avec des radicaux issus des alcools, pp: 6-7-10.
  - ❖ **Martin, S., & Andriantsitohaina, R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l’endothélium. *Annales de Cardiologie*, 51,304–315.



- ❖ **Mazimba, O., Majinda, R.R.T., & Motlhanka, D.** (2011). Antioxidant and antibacterial constituents from *Morus nigra*. *Afr. J. Pharm. Pharmacol*, 5, 751–754
- ❖ **Medic– Saric, M., Jasprica, I., SmolicBubalo A., & Momar, A.** (2003). Optimization of chromatographic conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids. *CroaticaChemicaActa*, 77 (1-2), 361-366.
- ❖ **Michel Caron., & Raymonde Joubert-Caron.** (2014). Proteomics in hematologic malignancies, *Expert Review of Proteomics*, 10.1586/14789450.2.4.567, 2, 4, (567-576)
- ❖ **Milane, H.** (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur, pp 13-36.
- ❖ **Mohammedi, Z.** (2013). Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales de La région nord et sud ouest de l'Algérie .Thèse de doctorat en biologie.Université Abou Bekr Belkaid . Tlemcen. p170.
- ❖ **Mohcen, S.M., & Ammar A.S.M.** (2009). Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food chemistry*, 112, 595-598
- ❖ **Michel, J.** (2006). *Pratique de la greffe de Morus kagayamae aux pépinières MICHEL à Velleron* (84), Communication personnelle.
- ❖ **Morena, M., Martin-mateo, M., Cristol, J.P., & Canoud, B.** (2002). Stress oxydant, hémoincompatibilité et complication de la dialyse au long cours. *Néphrologie*.
- ❖ **Nkhili, E.** (2009). Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de l'Université Cadi Ayyad, Mrrakach.
- ❖ **Nur Alam, M., Bristi, N., & Rafiquzzaman, M.** (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity, (21),145-149.
- ❖ **Oliveira, AP., Pacheco, A.G.A., Silva, M.G., Moraes-Filho, M.O., & coll.** (2018). Évaluation de l'antibactérien, activités cytotoxiques et antioxydantes de *Morus nigra* L. (Moraceae). *Braz. J. Biol*, 78, 248–254.
- ❖ **Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., & Anthony, S.** (2009). Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0. World Agroforestry Centre, Kenya

- ❖ **Oskoueian, E., Abdullah, N., Saad, W.Z., Omar, A.R., Ahmad, S., Kuan, W.B., Zolkifli, N.A., Hendra, R., & Ho, Y.W.** (2011). Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Jatropha curcas* Linn. *J. Med. Plants Res*, 5, 49–57
- ❖ **Ou, B., M. Hampsch-Woodill., & 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(10), 4619-4626.
- ❖ **Padilha, M.M., Vilela, F.C., da Silva, M.J., dos Santos, M.H., Alves-da-Silva, G., & Giusti-Paiva, A.** (2009). Effet antinociceptif de l'extrait de feuilles de *Morus nigra* chez la souris. *J. Med. Food*, 12, 1381–1385.
- ❖ **Parejo, I., Francece Viladomat., Jaume Bastida., Alfredo Rosace-Romeron., Nadin flerlage., Jesuce burillo., & Carl codina.** (2002).comparaison between the radical scavenging activité of six distilled and nodistilled mediterranean Herbs aromatic.plants. *Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6882-6890
- ❖ **Pawłowska Anna, M., Palinska Katarzyna, A., & Halina Piekarek-Jankowska.** (2008). Colonisation and bioerosion of marine bivalve shells from the Baltic Sea by euendolithic cyanobacteria: An experimental study
- ❖ **Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., & al.** (2003). 133: 2812 –2819.
- ❖ **Petti, S., & Scully, C.** (2009). Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of phenolic compounds. Molecular Aspects of Medicine*, 31, 446–467.
- ❖ **Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., & Defraigne, J.O.** (2002) Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16, 233-239.
- ❖ **Pincemail, J.** (2004). Comment évaluer votre état de stress oxydant. *J santé*. P: 2.
- ❖ **Piquemal, G.** (2008). Les flavonoïdes (en ligne) : [http://www.detoursante.com/index.php?Option=com\\_content&view=article&id=166&Itemid=215](http://www.detoursante.com/index.php?Option=com_content&view=article&id=166&Itemid=215)
- ❖ **Prior, R.L., Wu, X., & Schaich, K.** (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem*, 53, 4290–4302.
- ❖ **Ray, S.D., Wong, V., Rinkovsky, A., Bagchi, M., Raje, R., & Bagchi, D.** (2000). Unique organoprotective properties of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract

- on cadmium chloride-induced nephrotoxicity, dimethylnitrosamine (DMN)-induced splenotoxicity and mocap-induced neurotoxicity in mice. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol*, 107, 105-128.
- ❖ **Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C.** (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med*, 26, 1231-1237.
  - ❖ **Riboli, E., & Norat, T. (2003).** « Epidemiologic Evidence of the Protective Effect of Fruit and Vegetables on Cancer Risk ». *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 559S-569S.
  - ❖ **Roede, J.R., & Jones, D.P.** (2010). Reactive species and mitochondrial dysfunction: mechanistic significance of 4-hydroxynonenal. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51, 380-390.
  - ❖ **Roginsky, V., & Lissi, E.A.** (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92, 235–254
  - ❖ **Ropiak, H.M., Peter Lachmann, P., Aina Ramsay, A., Rebecca, J., Green, R.J., & Mueller-Harvey, I.** (2017). Identification of structural features of condensed tannins that affect protein aggregation. *PLOS ONE journal*, pp1-36.
  - ❖ **Roux, D., & Catier, O.** (2007). *Botanique, pharmacognosie, phytothérapie. collection du cahier du préparateur en pharmacie*, pp141-14
  - ❖ **Saleem, F., Khan, M.T.J., Saleem, H., & al.** (2017). Phytochemical, antimicrobial and antioxidant activities of *Pteris cretica* L. (Pteridaceae) extracts. *Acta Poloniae Pharmaceut Drug Res*, 73, 1397-1404.
  - ❖ **Sarubin, F.A., & Thomson, C.** (2007). *The health professional's guide to popular dietary supplements (3<sup>rd</sup> Ed)*. American Dietetic Association Chicago, USA ,682pp.
  - ❖ **Savini, I., Catani, M. V., Evangelista, D., Gasperi, V., & Avigliano, L.** (2013). Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 10497–10538. doi: 10.3390/ijms140510497.
  - ❖ **Sellappan, S., & al.** (2002) Phenolic compounds and antioxidant capac.... *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2432-2438.
  - ❖ **Serteyn, D., Mouithys-Mickalad, A., Franck, T., Grulke, S., Lamy, M., Deby, C., &**

- Deby-Dupont, G.** (2002). La nature chimique et la réactivité de l'oxygène. *Annale de Médecine Vétérinaire*, 146, 137-53.
- ❖ **Sharma, B., Viswanath, G., Salunke, R., & Roy, P.** (2008). Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. *Food Chem*, 110, 697-705.
  - ❖ **Shrinivas, B., & Suresh, R.N.** (2011). Identification of 3-carotene and 3-sitosterol in methanolic extract of *Dipteracanthus patulus* (Jacq) nees and their role in antimicrobial and antioxidant activity. *International Journal of Phytomedicine*, (3), 20.
  - ❖ **Souchard, J.P., Arnal, J.F., & Rochette, L.** (2002). Les radicaux Libres et le Stress Oxydatif Radicalaire.
  - ❖ **Souza, G.R., Oliveira-Junior, R.G., Diniz, T.C., Branco, A., Lima-Saraiva, S.R.G., Guimarães, A.L., Oliveira, A.P., Pacheco, A.G.M., Silva, M.G., Moraes-Filho, M.O., & al.** (2018). Assessment of the antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Morus nigra* L. (Moraceae). *Braz. J. Biol*, 78, 248–254.
  - ❖ **Subsamanian, S., Stacey, G., & Yu, O.** (2007). Distinct crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends in plant science*, 12 (7), 282-283.
  - ❖ **Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. M., & Spranger, I.** (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4267-4274
  - ❖ **Tag, H.M.** (2015). Hepatoprotective effect of mulberry (*Morus nigra*) leaves extract against methotrexate induced hepatotoxicity in male albino rat. *BMC Compl Alt Med*, 15, 252
  - ❖ **Tahir, L., Aslam, A., & Ahmed, S.** (2017). Activités antibactériennes de *Diospyros blancoi*, *Phoenix dactylifera* et *Morus nigra* contre les caries dentaires causant des agents pathogènes: une étude in vitro. *Pak. J. Pharm. Sci*, 30, 163-169.
  - ❖ **Tapiero, H., Tew, K.D., Nguyen, B.G., & Mathé, G.** (2002). Polyphenol do they play a role in the prevention, of the human pathologies? *Biomed.pharmacother*, 56, 200-207.
  - ❖ **Thannickal, V.J., & Fanburg, B.L.** (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, L1005-1028
  - ❖ **Thomas, E.** (2016). The never-ending war against vitamin C, March 14.

- ❖ **Tohge, T., Matsui, K., Ohme-Takagi, M., Yamazaki, M., & Saito, K.** (2005). Enhanced radical scavenging activity of genetically modified Arabidopsis seeds. *Biotechnol.Lett*, 27, 297-303.
- ❖ **Tumbas, V.T., Četkovic, G.S., Djilas, S.M., Canadanovic-Brunet, J.M., Vulic, J.J., & Knez, Z.** (2010). Antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata*) peel. *Biblid*, 40, 195-203.
- ❖ **Turgut, N.H., & al.** (2016). Effect of black mulberry (*Morus nigra*) extract treatment on cognitive impairment and oxidative stress status of d-galactose-induced aging mice. *Pharmaceutical Biology*, 54, 1052-1064.
- ❖ **Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., & Telser, J.** (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Mol. Cell .Biochem*, 266(1-2), 37-56
- ❖ **Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M.** (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1-40.
- ❖ **Vermerris, W., & Nicholson, R.** (2006). Phenolic compound Biochemistry. *Ed, Springer*. 230 p.
- ❖ **Volpato, G.T., Calderon, I.M., Sinzato, S., Campos, K.E., Rudge, M.V., & Damasceno D.C.** (2011). Effect of *Morus nigra* aqueous extract treatment on the maternal-fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 138, 691-696
- ❖ **Wang, H., Cao, G., & Prior, R.L.** (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agr. Food Chem*, 44, 701–705.
- ❖ **Yusuf, Y.** (2006). *Trends Food Sci. Tech.* P 17, 6471

---

# Résumés

---



## Résumé

*Morus nigra* est une plante médicinale appartenant à la famille des *Moracées*. Cette espèce connue sous le nom de «Mûrier », il s'agit d'arbres ou arbustes qui sont cultivés pour leurs fruits «mûres» ou leurs feuilles qui servent de nourriture au ver à soie. Connu pour ses multiples propriétés biologiques qui sont principalement due à sa richesse en éléments essentiels et bénéfiques comme les : vitamines, les minéraux, et les composés phénoliques tels que les acides phénoliques, flavonoïdes et tannins condensés. Les feuilles de Mûrier a fait l'objet de ce présent travail pour extraire et estimer la teneur en composés phénoliques totaux, flavonoïdes et tanins condensés des différentes fractions organiques. Les extraits organiques ont été extraits dans le mélange eau/acétone, chloroforme et acétate d'éthyle. Les rendements respectifs sont : 1,32 %, 2,14 %, et 3,7%.

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu et la teneur la plus élevée ( $193,16 \pm 0,023$  mg EAG/gE) est obtenue dans l'extrait brut. La teneur en flavonoïdes a été évaluée en utilisant la méthode de trichlorure d'aluminium, et la teneur la plus élevée est de l'ordre de  $283,50 \pm 0,011$  mg EQC/g E dans l'extrait brut. Alors la teneur la plus élevée en tanins condensés, estimées par la méthode à vanilline, est de  $54,74 \pm 0,008$  mg EQC/g E dans l'extrait de chloroforme.

**Mots clés :** *Morus nigra*, *Moracées*, polyphénols, extraits organiques, activité antioxydante.

## Abstract

*Morus nigra* is a medicinal plant belonging to the *Moraceae* family. This species known under the name of "Mûrier", those trees or shrubs are cultivated for their fruits or leaves which serve as food for the silkworm. Known for its multiple biological properties which are mainly due to its richness in essential and beneficial elements such as: vitamins, minerals, and phenolic compounds such as phenolic acids, flavonoids and condensed tannins. Murier leaves were the subject of this present work to extract and estimate the content of total phenolic compounds, flavonoids and condensed tannins of the different organic fractions. The organic extracts were extracted into a mixture of water / acetone, chloroform and ethyl acetate. The respective returns are: 1,32%, 2,14%, and 3,7%. The content of total polyphenols was determined using the Folin-Ciocalteu reagent and the highest content ( $193.16 \pm 0.023$  mg EAG / gE) is obtained in the crude extract. The flavonoid content was assessed using the aluminum trichloride method, and the highest content is on the order of  $283.50 \pm 0.011$  mg EQC / g E in the crude extract. Then the highest content of condensed tannins, estimated by the vanillin method, is  $54.74 \pm 0.008$  mg EQC / g E in the chloroform extract.

**Key words:** *Morus nigra*, *Moraceae*, polyphenols, organic extracts, antioxidant activity.

## ملخص

هو نبات طبي ينتمي إلى عائلة موراسيه. تعرف هذه الأنواع باسم "مورييه هذه الأشجار أو الشجيرات التي تزرع من أجل ثمارها "الناضجة" أو أوراقها التي تغذي دودة القز معروف بخصائصه البيولوجية المتعددة والتي ترجع أساساً إلى غناه بالعناصر الأساسية والمفيدة مثل: الفيتامينات " والمعادن والمركبات الفينولية مثل الأحماض الفينولية والفلافونويدات والتانينات المكثفة. كانت أوراق مورييه موضوع هذا العمل الحالي لاستخراج وتقدير محتوى المركبات الفينولية الكلية والفلافونويد والعصم المكثف للكسور العضوية المختلفة. تم استخلاص المستخلصات العضوية في خليط من الماء / الأستيون والكلوروفورم وخلات الإيثيل. عائدات كل منهما هي 1.32% ،  $193,16 \pm 0,023$  mg EAG/gE) في المستخلص الخام. تم تقييم محتوى الفلافونويد 2.14% ، 3.7%. تم تحديد محتوى البوليفينول الكلي باستخدام كاشف Folin-Ciocalteu وأعلى محتوى (EAG/gE) وكان أعلى محتوى في  $283,50 \pm 0,011$  mg EQC باستخدام طريقة ثلاثي كلوريد الألومنيوم في المستخلص الخام. ثم أعلى محتوى من العصم المكثف ، حسب طريقة الفانيلين  $54,74 \pm 0,008$  mg EQC/g E في مستخلص الكلوروفورم .

**الكلمات المفتاحية:** *Morus nigra* ، *Moraceae* ، بوليفينول ، مستخلصات عضوية ، نشاط مضاد للأوكسدة.