

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أبو بكر بلقايد- تلمسان
Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEM
كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de BIOLOGIE



Laboratoire : Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimie :
Synthèse et activités biologiques



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en sciences biologiques

Option : Biochimie appliquée

Thème :

Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des extraits préparés des feuilles de *Tetraclinis articulata L.*

Présenté par :

M^{elle} OUASTI Amel

Soutenu le 14-06-2023 devant les membres de jury :

Présidente	BENARIBA Nabila	MCA	Univ. Tlemcen
Encadrant	AZZI Rachid	Pr	Univ. Tlemcen
Examineur	CHAOUICHE Mohammed Tarik	MCA	Univ. Tlemcen
Co-Encadreur	ABBOU Fayza	Docteur	Univ. Tlemcen

Année universitaire 2022-2023



Remerciement

En premier lieu, je remercie Allah le tout puissant de m'avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements, ma vive reconnaissance et ma sincère gratitude à **Mr. AZZI Rachid**, Professeur au département de Biologie, Faculté du SNV-STU, Université Abou Bakr Belkaid - Tlemcen, pour avoir accepté de diriger ce travail, pour son aide, ses encouragements, ses précieux conseils, sa patience, tout au long de la réalisation de ce mémoire.

J'adresse mes sincères remerciements à **Melle Benariba Nabila**, maitre de conférences classe A au Département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen pour l'honneur qu'elle me fait de présider le jury.

J'exprime également mes remerciements à **Mr CHAUCHE Mohammed Tarik**, Maître de conférences classe A au département de Biologie Faculté SNV-STU, Université Abou Bekr Belkaïd - Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Mes remerciements vont également à **M^{elle} ABBOU Fayza**, docteur en biochimie pour son soutien et son aide.

C'est un grand merci que j'adresse à tous les membres du laboratoire Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimiques, Synthèse et activité biologique de l'Université de Tlemcen pour leurs gentilleses et leurs conseils.

Enfin, je remercie gracieusement toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.





Dédicace

Je dédie ce modeste travail ;

À mes chères personnes au monde qui m'ont permis de continuer mes études dans les meilleures conditions et qui m'ont apprises à ne jamais baisser les bras.

Mes chers parents :

À ma très chère mère

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

À mon cher père

Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consenti pour mon éducation et ma formation

*À mes chères sœurs «Khira, Soumia, Rahma Douaa» et mon Frère
«Mourad»*

À toute ma famille Ouasti et Mehiaoui

*À mes amis RAIS Hachim, Ramdane Bouchra, Benallal Soumia, Heddi
Hafsa, Hassaine Houda*

Pour leur amour, soutien et encouragements, qui m'ont soutenue et sur tout m'ont supporté au moment difficile, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout-puissant, vous protège et vous garde.

الملخص

الكثير من الأبحاث الحالية تهتم بدراسة المواد المضادة للأكسدة ذات مصادر طبيعية.

ركزنا في هذا العمل على دراسة التحليل الكيميائي النباتي، وتحديد تركيز إجمالي البوليفينول والفلافونويد، بالإضافة إلى البحث عن النشاط المضاد للأكسدة، لمستخلصات الخام الهيدروميثانولية المحضرة بالغليان أو النقع البارد وأجزاء أسيتات الإيثيل المستخرجة من المستخلصات لأوراق شجرة العرعار *Tetraclinis articulata*، التي تم جمعها في منطقة المعازيز، ولاية تلمسان، الجزائر.

أظهر الفحص الكيميائي النباتي النوعي الذي تم إجراؤه على مستخلصات الخام الهيدروميثانولية المحضرة بالغليان والنقع البارد، ثراء أوراق العرعار من الألكلويدات، التانينات، الفلافونويد، الكينونات الحرة، الأنتراكينون، الصابونين، التربينويد والمركبات المرجعية.

تم تسجيل أعلى مستويات إجمالي البوليفينول والفلافونويد لأجزاء أسيتات الإيثيل حيث قدرت ب 693.26 ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك لكل ملغ من المستخلص الجاف و 313.74 ميكروغرام مكافئ كاتيشين لكل ملغ من المستخلص الجاف، على التوالي، للجزء المسترجع من المستخلص الخام المحضر بالغليان. وبنسبة 635.62 ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك لكل ملغ من المستخلص الجاف و 220.51 ميكروغرام مكافئ كاتيشين لكل ملغ من المستخلص الجاف، على التوالي، بالنسبة للجزء المستخرج من المستخلص الخام المحضر بالنقع البارد.

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة لمستخلصات أوراق *T. articulata* بطريقتين تثبيط الجذر الحر DPPH[•] وإرجاع الحديد FRAP. ولقد سجل جزء أسيتات الإيثيل المستخلص من مستخلص الهيدروميثانول الخام الذي تم إعداده بالغليان أعلى نشاط تثبيط الجذور الحرة DPPH[•] وإرجاع الحديد FRAP، بتركيز مثبط 50 قدره 0.095 ميليغرام/ مل و بتركيز الفعال 50 قدره 0.20 ميليغرام/ مل على التوالي، مقارنة بالمستخلصات الأخرى التي تمت دراستها. تظل هذه الأنشطة قريبة من تلك الخاصة بالجزئيات القياسية (حمض الأسكوربيك، BHA، BHT).

الكلمات المفتاحية: *Tetraclinis articulata*، الاستخلاص، الاختبارات الكيميائية النباتية، المركبات الفينولية، النشاط المضاد للأكسدة، DPPH[•]، FRAP.

Résumé

Une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude des molécules antioxydantes d'origine naturelle.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressées à l'étude phytochimique et le dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes ainsi que la recherche d'activité antioxydante, des extraits bruts hydrométhanolique préparés par décoction ou macération et leurs fractions acétate d'éthyle des feuilles de *Tetraclinis articulata* récoltées dans la région de Maaziz, wilaya de Tlemcen-Algérie.

L'examen phytochimique qualitatif réalisé sur les extraits bruts hydrométhanolique préparés par décoction et macération, a montré la richesse des feuilles de *T. articulata* en alcaloïdes, tanins, flavonoïdes, quinones libres, anthraquinones, saponines, terpénoïdes et en composés réducteurs.

Les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux et en flavonoïdes ont été enregistrées pour les fractions acétate éthyle de l'ordre de 693,26 $\mu\text{g Eq AG/mg ES}$ et 313,74 $\mu\text{g Eq C/mg ES}$, respectivement, pour la fraction récupérée de l'extrait brut préparé par décoction et de l'ordre de 635,62 $\mu\text{g Eq AG/mg ES}$ et 220,51 $\mu\text{g Eq C/mg ES}$, respectivement, pour la fraction récupérée de l'extrait brut préparé par macération.

L'activité antioxydante des extraits des feuilles de *T. articulata* a été évaluée par deux méthodes : le piégeage de radical libre DPPH[•] et le pouvoir réducteur du fer (FRAP).

La fraction acétate d'éthyle récupérée de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction a enregistré l'effet du piégeage du radical libre DPPH[•] et le pouvoir réducteur de Fer les plus élevés, avec des CI_{50} de l'ordre de 0,095 mg/ml et EC_{50} de l'ordre de 0,20 mg/ml, respectivement, par rapport aux autres extraits étudiés. Ces activités restent proches par rapport à celles des molécules standard (acide ascorbique, BHA, BHT).

Mots clés : *Tetraclinis articulata*, extraction, tests phytochimiques, composés phénoliques, activité antioxydante, DPPH[•], FRAP.

Abstract

Much of the current research interest is focused on the study of antioxidant molecules of natural origin.

In this work, we were interested in the phytochemical study and the determination of total polyphenols, flavonoids as well as the research of antioxidant activity, of the hydromethanolic crude extracts prepared by decoction or maceration and their ethyl acetate fractions of the leaves of *Tetraclinis articulata* harvested in the region of Maaziz, wilaya of Tlemcen-Algeria.

The qualitative phytochemical examination carried out on the hydromethanolic crude extracts prepared by decoction and maceration, showed the richness of the leaves of *T. articulata* in alkaloids, tannins, flavonoids, free quinones, anthraquinones, saponins, terpenoids and reducing compounds.

The highest contents of total polyphenols and flavonoids were recorded for the ethyl acetate fractions in the range of 693.26 $\mu\text{g Eq GA/mg DW}$ and 313.74 $\mu\text{g Eq C/mg DW}$, respectively, for the fraction recovered from the crude extract prepared by decoction. And in the range of 635.62 $\mu\text{g Eq GA/mg DW}$ and 220.51 $\mu\text{g Eq C/mg DW}$, respectively, for the fraction recovered from the crude extract prepared by maceration.

The antioxidant activity of *T. articulata* leaf extracts were evaluated by two methods: DPPH[•] free radical scavenging and iron reducing power (FRAP).

The ethyl acetate fraction recovered from the crude hydromethanolic extract prepared by decoction recorded the highest DPPH[•] free radical scavenging effect and Iron reducing power, with IC₅₀ in the range of 0.095 mg/ml and EC₅₀ in the range of 0.20 mg/ml, respectively, compared to the other extracts studied. These activities remain close to those of the standard molecules (ascorbic acid, BHA, BHT).

Key words: *Tetraclinis articulata*, Extraction, phytochemical tests, phenolic compounds, antioxidant activity, DPPH[•], FRAP.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Rendements, aspects et couleurs et solubilité des extraits des feuilles <i>T. articulata</i>	34
Tableau 2 : Résultats de screening phytochimique des différents extraits brut eau-méthanol préparés des feuilles de <i>T. articulata</i>	35
Tableau 3 : Teneurs en composés phénoliques dans les extraits des feuilles de <i>T. articulata</i>	38
Tableau 4 : les valeurs des CI_{50} pour le test de DPPH [•] des différents extraits préparés des feuilles de <i>T. articulata</i> et des molécules standard	41
Tableau 5 : Les valeurs des EC_{50} pour le test de FRAP des différents extraits préparés des feuilles de <i>T. articulata</i> et des molécules standard	44

Liste des figures

Figure 1 : Différentes partie de l'arbre <i>Tetraclinis articulata</i>	7
Figure 2 : Les feuilles de <i>Tetraclinis articulata</i> séchées et broyées	24
Figure 3 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux	37
Figure 4 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes	37
Figure 5 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH [•] en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique(A), le BHA(B), le BHT (C), FAED (D) et EBD (E), FAEM (F) et EBM(G)	40
Figure 6 : Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique(A), BHA (B), BHT(C), FAED(D), EBD(E), FAEM(F), EBM(G) selon la méthode de FRAP	43

Liste des abréviations

µg Eq AG/mg ES : Microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait sec

A_{cont} : Absorbance du contrôle négatif

ADN : Acide désoxyribonucléique

A_{éch} : Absorbance de l'échantillon testé

ATP : Adénosine triphosphate

BHA : Hydroxyanisole butylé

BHT : Hydroxytoluène butylé

CAT: Total Antioxidant Capacity

CI₅₀: Concentration inhibitrice à 50%

CO₃^{•-}: Radical de carbonate

CUPRAC: Cupric Reducing Antioxidant Capacity

DPPH[•]: 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl

EBD : Extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction

EBM : Extrait brut hydrométhanolique préparé par macération

EC₅₀: Concentration efficace à 50%

ERN : Espèces réactives de l'azote

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

FAED : Fraction acétate d'éthyle de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction

FAEM : Fraction acétate d'éthyle de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération

FRAP: Ferric reducing antioxidant power

GPx : Ensemble de glutathion peroxydases

GSH: Glutathion

HO₂[•] : Le radical hydroperoxyde

I (%) : Pourcentage d'inhibition.

LAPSAB : Laboratoire Antibiotique Antifongique : physico-chimie, synthèse et activité biologique

NO[•] : Monoxyde d'azote

O₂^{•-} : anion superoxyde

OH[•] : Radical hydroxyle

ONOO[•] : Peroxynitrite

PG : gallate de propyle

PHGPX : phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase

R% : rendement

R² : coefficient de corrélation

RO[•] : Alcoxyle

RO₂[•] : Radical peroxy

rpm : Rotation par minute

SH : composé thiol

SNV : Naturelles Sciences et de la Vie

SOD : superoxyde dismutase

STU : Sciences de la Terre et de l'Univers

TBHQ : tert-butylhydroquinone

TCA : acide trichloracétique

UV : rayons ultraviolets

µg Eq C/mg ES : microgramme équivalent catéchine par milligramme d'extrait sec

Table des matières

Remerciement	
Dédicaces	
Résumé	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	1

Première partie : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Présentation de la plante

1. Historique	5
2. Description botanique	5
3. Etymologie	7
4. Systématique.....	7
5. Distribution géographique	8
6. Composition chimique	8
7. Utilisations de <i>Titraclinis articulata</i>	9
8. Activités biologiques.....	10

Chapitre II : Le stress oxydatif

1. Définition.....	12
2. Origine de stress oxydatif.....	12
3. Les radicaux libres	12
4. Les espèces réactives d'oxygène (ERO)	13
4.1 Les espèces oxygénées réactives radicalaires.....	13
4.2 Les espèces oxygénées non radicalaires.....	14
5. Les espèces réactives azotées	15
5.1 Les Espèces réactives radicalaires azotées	15
5.2 Espèces non radicalaires azotées	15
6. Les conséquences de stress oxydatif.....	15
7. Les antioxydants	16
7.1 Définition.....	16
7.2 Classification des antioxydants.....	16
7.2.1 Les antioxydants naturels	16

7.2.2	Les antioxydants synthétiques	20
8.	Les maladies liées au stress oxydant.....	20

Deuxième partie : Partie Expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

1.	Matériel végétal	23
2.	Préparation des extraits	24
2.1	Préparation des extraits bruts par Extraction Solide-Liquide.....	24
2.1.1	Macération.....	24
2.1.2	Extraction sous reflux (décoction).....	25
2.2	Fractionnement de l'extrait brut par Extraction Liquide-Liquide	25
2.3	Conservation des extraits préparés.....	26
2.4	Détermination du rendement d'extrait	26
3.	Tests phytochimiques.....	26
4.	Dosage des composés phénoliques	28
4.1	Dosage des polyphénols totaux	28
4.2	Dosage des flavonoïdes	29
5.	Evaluations de l'activité antioxydante	29
5.1	Test de Piégeage du radical libre DPPH [•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)	29
5.2	Test de pouvoir réducteur de fer (FerricReducingAntioxidant Power ; FRAP).....	31
6.	Analyse statistique	32

Chapitre II : Résultats et interprétations

1.	Caractéristiques et les rendements d'extractions	34
2.	Tests phytochimiques.....	35
3.	Dosage des composés phénoliques	36
4.	Evaluation de l'activité antioxydante.....	38
4.1	Test Piégeage du radical libre DPPH [•]	39
4.2	Test de pouvoir réducteur de fer (FRAP).....	41
	Discussion	45
	Conclusion	51
	Références bibliographiques	54

Introduction



Depuis des milliers d'années, l'homme a utilisé les plantes trouvées dans la nature, pour traiter et soigner des maladies (**Sanogo, 2006**).

Les plantes médicinales, dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses, sont utilisées pour leurs propriétés particulières bénéfiques pour la santé humaine. En effet, elles sont utilisées de différentes manières, décoction, macération et infusion (**Dutertre, 2011**). Elles renferment de nombreux principes actifs où certains sont issus du métabolisme secondaire (**Chaabi, 2008**).

Plusieurs recherches scientifiques, ont montré que de nombreuses pathologies humaines sont causées ou favorisées par le stress oxydant (**Gutteridge, 1993**).

Le stress oxydant est défini comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces réactives de l'oxygène (ERO), suite à un déséquilibre lié, soit à une production accrue d'ERO, soit à une diminution de la capacité de défense antioxydante (**Sies, 1991**).

Ces dommages oxydatifs sont obtenus par l'attaque des radicaux libres sur diverses biomolécules, en particulier les protéines, les lipides et l'ADN, ce qui conduit finalement à la dégradation et à la mort des cellules (**Moon et Shibamoto, 2009**). Ils peuvent conduire à de nombreuses maladies inflammatoires et des maladies multifactorielles comme le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Reuter et al., 2010 ; Bidie et al., 2011**).

Les antioxydants peuvent arrêter ou ralentir les réactions en réduisant les radicaux libres et en inhibant leurs actions (**Halliwell, 1990**). Les plantes renferment de nombreuses substances bioactives qui présentent des propriétés antioxydantes (**El-Haci et al., 2012**).

Tetraclinis articulata est une espèce résineuse, de la famille des Cupressacées. C'est une plante endémique des régions montagneuses d'Afrique du Nord (au Maroc, en Algérie et en Tunisie), mais aussi dans d'autres parties de l'Europe, comme Malte et l'Espagne (**Quezel et Santa, 1963 ; Tassin, 2012**). Différentes parties de cette espèce ont été utilisées dans la médecine traditionnelle, en raison de la présence de plusieurs molécules bioactives précieuses. Les feuilles et les rameaux sont principalement utilisés dans le traitement des infections intestinales et respiratoires, maladies gastriques, rhumatismes, diabète, hypertension et pour traiter les maladies de la peau (**Jouad et al., 2001**).

Le but de ce travail consiste à réaliser une étude phytochimique basée sur des tests phytochimiques, dosage des composés phénoliques, et une étude biologique, *in vitro*, basée sur l'évaluation de l'activité antioxydante par deux tests, le piégeage du radical libre DPPH[•] et la réduction du fer FRAP, des extraits bruts hydrométhanolique des feuilles de *Tetraclinis articulata*, préparés par décoction ou macération et leurs fractions acétate d'éthyle.

Notre travail est reparti en deux parties :

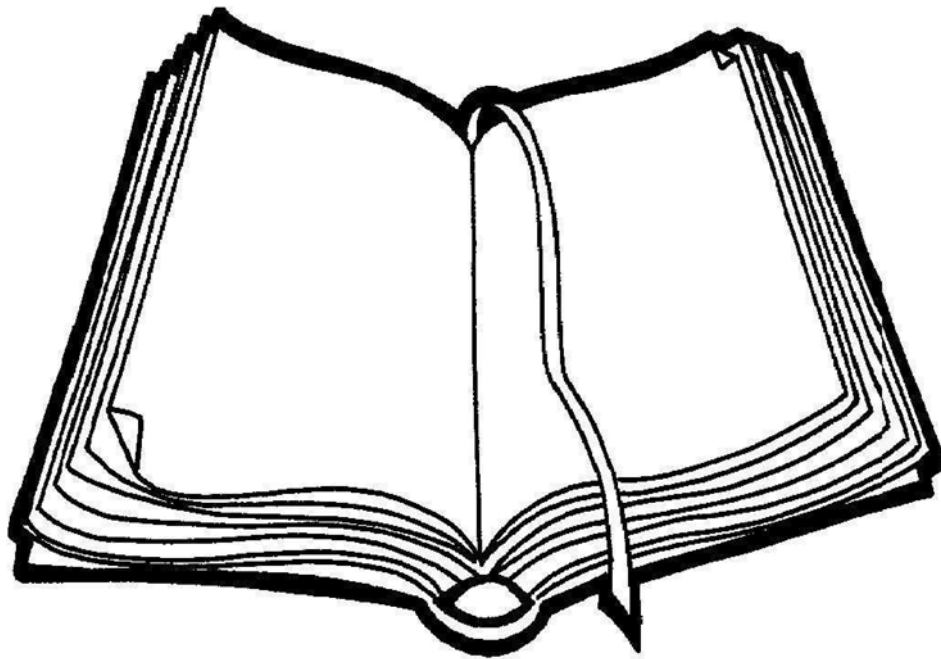
✓ **La première partie** : une synthèse bibliographique qui comporte deux chapitres :

1. Présentation de la plante
2. Stress oxydatif et activité antioxydante

✓ **La deuxième partie** : le matériel végétal et les méthodes qui ont été exploitées dans ce travail, ainsi que les résultats obtenus et leurs discussions.

Le travail se termine par une conclusion.

Première partie :
Synthèse bibliographique



Chapitre I :
Présentation de la plante

1. Historique

Le thuya de Berbérie (*Tetraclinis articulata*), a été décrit par Vahl en 1791, sous le nom de *Thuya articulata* ou *Callitris articulata* (Vahl) Link ; et par la suite il a été reporté au genre *Tetraclinis* par Maire en 1926.

Tetraclinis articulata est connu sous le nom d'arbre Araar, source de son nom à Malte (Gharghar). Il est également largement connu sous le nom de thuya de Berbère, gommier de Sandarac, arbor-vitae de Barbarie, alerce, genévrier africain.

Tetraclinis est un arbre célèbre dans le commerce historique. C'était le bois préféré pour la construction et les artefacts de l'Empire grec et romain (Cunningham et al., 2005).

Tetraclinis articulata est une espèce résineuse qui appartient à la famille des Cupressacées. Elle est endémique de la Méditerranée occidentale (Rikli, 1943 ; Quezel, 1980) et presque exclusivement de l'Afrique du Nord (Quezel, 2000). Elle présente un grand intérêt, d'une part dans la protection des sols contre l'érosion, et d'autre part comme moyen de subsistance des populations qui le considèrent comme une espèce précieuse dans son bois très apprécié dans le travail de marqueterie et la fabrication d'objets décoratifs (Boudy, 1952 ; Bellakhdar, 1997).

2. Description botanique

Tetraclinis articulata est un arbre atteignant 6-8 m de haut, persistant, monoïque avec tronc monopodial ou multitronc et une circonférence de 1 m à la base du tronc (Figure 1.a) (Aljos, 2010).

Le fût est droit avec une écorce brun grisâtre striée longitudinalement (Figure 1.b).

Le système racinaire est profond et peu ramifié. La couronne n'est pas dense avec une forme pyramidale, conique ou ovale, qui tend à devenir en forme de parapluie avec l'âge chez les arbres isolés.

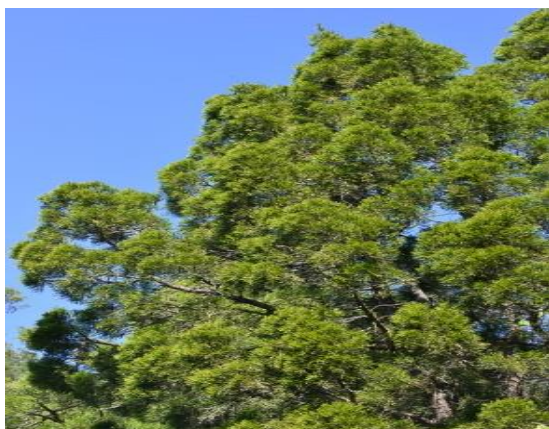
Les branches sont dressées, fines et courbées vers le haut. Les jeunes branches sont vertes, aplaties, fines et souples, mais fragiles lorsqu'elles sont sèches et articulées en raison de la disposition des feuilles.

Les feuilles cotylédonaire sont aciculaires, glauques et mesurent environ 2 à 3 cm de long. Au cours de la première année, Les feuilles juvéniles apparaissent. Elles sont en forme d'aiguille, décurrentes, glauques, d'environ 5-10 cm de long. Dès la deuxième année, les vraies

feuilles apparaissent. Celles-ci sont persistantes, décurrentes, subverticillées et dotées de plusieurs glandes épaisses (**Figure 1.c**).

Les fleurs sont monoïques ; les fleurs mâles sont à l'extrémité des branches et les fleurs femelles sont latérales. Les premiers sont ovoïdes ou cylindriques avec des étamines en forme d'écailles. Chacun a quatre sacs polliniques. Les cônes ovulifères sont composés de quatre écailles décussées, aiguës, glauques et révolutes, qui s'épaississent à leur base après la fécondation (**Figure 1. d,e**) (**Bajaj, 1996**).

La graine est petite, avec des poches de résines et deux ailes latérales (**Rached, 2009**).



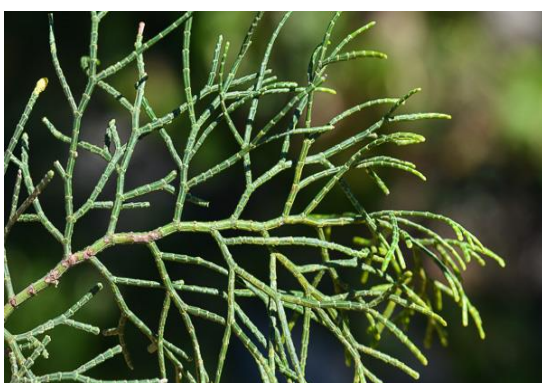
a. Arbre de *T. articulata*

(https://www.florealpes.com/fiche_tetraclisarticulat.php?lightforce=1)



b. Ecorce de *T. articulata*

(<https://www.flickr.com/photos/heliconcus/10697>)



c. Feuilles *T. articulata*

(<https://www.florealpes.com>)



d. Fleur femelle de *T. articulata*

(<https://www.monaconatureencyclopedia.com>)



e. Cône mâle de *T. articulata*
(<https://www.monaconatureencyclopedia.com>)

Figure 1 : Différentes partie de l'arbre *Tetraclinis articulata*

3. Etymologie

Tetraclinis articulata a plusieurs noms à travers le monde :

- ❖ **Noms scientifiques :** *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters ; *Callitris vulgaris* Schrader ; *Callitris quadrivalvis* Vent. ; *Callitris articulata* (Vahl.) Mirbel ; *Callitris articulata* Murb ; *Thuja articulata* Vahl ; *Cupressus articulata* (Vahl.) J. Forbes ; *Thyia articulata*.
- ❖ **En Arabe :** Araar (عرعار) ; Sandarus (سننروس) ; Araar berbous (عرعار برپوش) ; Shajrat el-hayat (شجرة الحياة).
- ❖ **En anglais:** Arar tree ; Sandarach tree ; Thyia ; Sandarac tree ; Sandarac Gum Tree ; Juniper gum tree ; Alerce ; Thuja ; Gharghar ; thuya from Berberie.
- ❖ **En Français :** Thuya de Berbérie ; Thuya ; Callitris ; Thuya articulé ; Thuya à la sandaraque.
- ❖ **Berbère :** Azouka ; Imijad ; Tazout (Lamnauer et Batanouny, 2005).

4. Systématique

D'après Quézel et Santa (1962), le thuya fait partie de :

- Règne : végétale
- Embranchement : Spermaphytes
- Sous- Embranchement : Gymnospermes

- Classe : Conifères
- Ordre : Coniférales
- Famille : Cupressacées
- Genre : *Tetraclinis*
- Espèce : *Articulata*
- Nom binomial : *Tetraclinis articulata*

5. Distribution géographique

T. articulata est une espèce quasiment endémique de l'Afrique du Nord. Elle est surtout présente au Maroc, dans les zones de piémont des chaînes atlasiques et sur le plateau central. Le thuya de Berbérie est assez largement répandu en Oranie littorale et dans quelques stations isolées du littoral à l'ouest d'Alger. En Tunisie, cette espèce est bien présente entre Bizerte et Djbel Zaghouane. En dehors de cette zone, le thuya de Berbérie se trouve dans quelques petites localités au sud de l'Espagne et dans l'île de Malte. Elle se développe dans les zones semi-arides (Quezel et Medail, 2003).

6. Composition chimique

Dans le monde végétal, les molécules naturellement synthétisées peuvent être classifiées en deux grandes catégories. En premier lieu, il y a des composés qui sont produits dans toutes les cellules et qui jouent un rôle central dans le métabolisme et la reproduction de ces cellules. Ces molécules comprennent les acides nucléiques, les acides aminés communs, les acides gras et les sucres. Ils sont connus sous le nom de métabolites primaires. En second lieu, il y a des molécules qui peuvent être parfois caractéristiques de certaines familles et/ou espèces végétales et qui ne sont pas indispensables à la survie de la plante. Ces molécules correspondent aux métabolites secondaires qui peuvent être classés en trois grands groupes : les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes, tanins, coumarines, quinones, anthraquinones...), composés azotés (alcaloïdes) et composés terpéniques (terpènes) (Guignard, 2006).

Les études phytochimiques antérieures montrent que les huiles essentielles des différents organes du *T. articulata* sont composées en majorité de monoterpènes, sesquiterpènes et

diterpènes. Quant à la fraction non volatile, elle est composée de tanins catéchiques, de flavonoïdes (flavones, flavanones et flavonols) (Djouahri, 2013).

Les huiles essentielles des bois de *T. articulata* sont riches en thymol, 3-tert-butyl-4-méthoxyphénol, cédrool et α -cédrène. L'huile du bois du tronc de *T. articulata* contient des phénols tels que l' α - et le β -acorénol, le cédrool et le totarol, ainsi que des terpènes tels que l' α -cédrène qui peuvent protéger ce bois de la décomposition fongique (El Moussaouiti et al., 2010).

7. Utilisations de *Titraclinis articulata*

Plusieurs préparations des différentes parties de *T. articulata* sont utilisées pour traiter ou soulager les différentes maladies, nous citons :

- ❖ Un mélange de feuilles et de cônes de *T. articulata*, associé au lait écrémé, peut être utilisé comme émétique dans les cas d'intoxication et pour le traitement des diarrhées sévères et des douleurs gastriques. Il est également utilisé comme expectorant.
- ❖ Les Feuilles écrasées en cataplasme sur les deux côtés ou sur le sommet de la tête sont utilisées contre les vertiges, les maux de tête, les douleurs cervicales et la fièvre chez les enfants.
- ❖ La poudre de feuilles est utilisée en externe sur les plaies ou appliquée sur la plaie ombilicale du nouveau-né pour la cicatrisation.
- ❖ Les feuilles sont utilisées pour soigner le diabète.
- ❖ Les feuilles en poudre sont utilisées pour traiter les cheveux (application sur les cheveux environ une heure avant de les laver).
- ❖ En fumigation, *T. articulata* est utilisé pour faciliter et accélérer l'accouchement chez les femmes.
- ❖ La résine est utilisée pour combler les trous dans les dents.
- ❖ La sandaraque humidifiée avec de l'eau de rose est appliquée sur la paupière contre l'inflammation des yeux.
- ❖ Le goudron produit à partir de vieux bois est appliqué pour les maladies dermiques, notamment en médecine vétérinaire (Lamnauer et Batanouny, 2005).

T. articulata contient également certains éléments nutritionnels tels que des composés minéraux, du sucre et des protéines qui pourraient indiquer son utilisation potentielle dans le domaine nutraceutique.

Toutes ces propriétés de *T. articulata* ont un intérêt économique majeur qui est effectivement utilisé dans la fabrication de vernis de luxe, de produits pharmaceutiques et dans d'autres usages industriels, il est généralement utilisé sous forme de poudre pour préparer la surface de certains papiers (**Hadjadj et Letreuch Belarouci, 2017**).

8. Activités biologiques

L'espèce *T. articulata* possède plusieurs propriétés en activités biologiques à savoir, les activités anti-inflammatoires, antioxydantes et antitumorales et activités antimicrobiennes y compris l'activité antibactérienne contre un ensemble des bactéries pathogènes présentant une résistance aux antibiotiques et une activité antifongique contre une gamme de phytopathogènes (**Zahir et al., 2020**) ainsi que des activités immunostimulant, cytotoxiques, anti-diarrhéiques et antiulcéreuses (**Saber et al., 2021**).

Chapitre II :
Le stress oxydatif

1. Définition

L'oxygène est indispensable à la vie des organismes aérobies où les mitochondries, qui en utilisent la majeure partie comme substrat de la chaîne respiratoire pour la production de l'énergie sous forme d'ATP. Ce métabolisme induit la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN) en équilibre avec les systèmes antioxydants (**Roede et Jones, 2010**).

La perturbation de l'équilibre endogène entre les radicaux libres et les antioxydants de courte ou longue durée, provoque des effets délétères dus, soit à une défense antioxydante défailante, soit à un état pro-oxydatif accru, nommé stress oxydant (**Biesalski et al., 1997**). Le mot pro-oxydant désigne toute espèce réactive de l'oxygène et de l'azote, radicalaire ou non radicalaire (**Achach, 2006**).

2. Origine de stress oxydatif

Les causes essentielles du stress oxydatif sont d'origine :

- Nutritionnelle : la rupture d'équilibre peut être à l'origine d'une défaillance nutritionnelle ou de la carence en un ou plusieurs des antioxydants apportés par la nutrition comme les vitamines ou les oligo-éléments.

- Accidentelle : la surcharge en facteurs pro-oxydants (fer, acides gras) par exemple dans le cas d'inflammation ou l'exposition à des xénobiotiques pro-oxydants.

- Génétique : des anomalies génétiques peuvent être responsables d'un mauvais codage d'une protéine enzymatique antioxydante, synthétisant un antioxydant ou régénérant un antioxydant (**Deshmukh et al., 2013**).

- Environnementale : il peut être à l'origine d'une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants, tels que le tabac, alcool, médicaments, rayons ultraviolets (UV), pesticides, ozone, amiante, métaux toxiques et la pollution (**Magder, 2006**).

3. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des entités moléculaires rebelles qui causent des destructions dans tout le corps. Ce sont des molécules instables qui ont perdu un électron, les rendant hautement réactives. Dans leur recherche de l'équilibre, ils attirent les électrons des molécules voisines.

Dans le processus, ces autres molécules deviennent à leur tour des radicaux libres, qui à leur tour attaquent les molécules avoisinantes, arrachant leurs électrons. Une réaction en chaîne se produit affectant des centaines et même des milliers de molécules.

Une fois qu'une molécule devient un radical libre, ses propriétés physiques et chimiques changent et leurs fonctionnements normaux sont perturbés de façon permanente, affectant toute la cellule dont elles font partie. Une cellule vivante attaquée par les radicaux libres dégénère et perd sa fonctionnalité normale. Les radicaux libres peuvent attaquer nos cellules, arrachant entièrement leur membrane protectrice **(Bruce Fife et al., 2012)**.

4. Les espèces réactives d'oxygène (ERO)

Les ERO peuvent être produits à partir des substances endogènes et des substances exogènes. Les sources endogènes potentielles comprennent les mitochondries, le métabolisme du cytochrome P450, les peroxysomes et l'activation des cellules inflammatoires **(Inoue et al., 2003)**.

Plusieurs espèces de radicaux libres sont produites dans le corps pour remplir des fonctions spécifiques. $L'O_2^{\bullet}$, H_2O_2 et NO^{\bullet} sont trois espèces réactives de l'oxygène (ERO) des radicaux libres qui sont cruciales pour la physiologie du corps. Cependant, ils peuvent accélérer le processus de vieillissement, médier la dégénérescence cellulaire dans les états pathologiques et produire de l'oxygène singulet hautement actif, des radicaux hydroxyles et du peroxy-nitrite qui peut attaquer les protéines, les lipides et l'ADN. Les antioxydants en donnant au moins un atome d'hydrogène à un radical libre peuvent entraîner l'arrêt des réactions radicalaires en chaîne. La production supplémentaire de radicaux libres peut provoquer un stress oxydatif **(Vincent et al., 2003)**.

On distingue deux grands groupes de molécules réactives impliquées dans le stress oxydant : les espèces radicalaires et les espèces non-radicalaires **(Delattre et al., 2005)**.

4.1 Les espèces oxygénées réactives radicalaires

- L'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$

Le superoxyde est beaucoup moins réactif que (OH^{\bullet}) , en effet il ne réagit pas avec la plupart des molécules biologiques en solution aqueuse. Cependant, il réagit rapidement avec plusieurs autres radicaux, tels que NO^{\bullet} , les clusters fer-soufre de certaines enzymes et certains radicaux phénoxyyles, tels que celui formé en extrayant l'hydrogène du -OH groupe de tyrosine **(Moller**

et al., 2012), Il en résulte un hydroperoxyde de tyrosine, qui peut ensuite subir une cyclisation et une perte du groupe peroxyde (Halliwell et John, 2015).

- **Radical hydroxyle OH^\bullet**

Le radical hydroxyle peut être produit par réaction d'ions métalliques avec H_2O_2 . En laboratoire, la génération en régime permanent d' OH^\bullet à partir de H_2O_2 peut être réalisée à l'aide d'une source UV de faible longueur d'onde (environ 254 nm). Des radicaux hydroxydes peuvent également être générés à partir d'ozone et de peroxydinitrite (Bielski, 1995 ; Fukuto, 2012).

- **Radical peroxyde RO_2^\bullet et alcoxyde RO^\bullet**

L'oxydation de la membrane cellulaire par le radical hydroxyle conduit à la formation de radicaux peroxydes RO_2^\bullet . La dégradation de ces derniers suivant la réaction de Fenton conduit à la formation de radicaux alcoxydes RO^\bullet hautement réactifs (Thomas, 2016).

- **Radical de carbonate $\text{CO}_3^{\bullet-}$**

Le radical carbonate est également produit lorsque l' ONOO^- réagit avec le CO_2 et lorsque le Mn^{2+} réagit avec le H_2O_2 en présence de HCO et de CO_2 (Liochev, 2004).

4.2 Les espèces oxygénées non radicalaires

- **L'oxygène singulet O_2**

L'oxygène singulet (O_2) est une espèce oxygénée non-radicalaire qui peut être générée par un apport d'énergie qui réarrange les électrons. Il est plutôt doux et non toxique pour les tissus des mammifères (Salman et Ashraf, 2013). Il se forme par des processus chimiques, tels que la décomposition spontanée du trioxyde d'hydrogène dans l'eau ou la réaction de H_2O avec l'hypochlorite (Foote et al., 1985).

- **Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2**

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est une molécule neutre, qui est la molécule la moins réactive parmi les ERO et qui est stable sous pH et température physiologiques en l'absence d'ions métalliques. Il est hautement diffusible et traverse facilement la membrane plasmique. H_2O_2 est formé dans notre corps par un grand nombre de réactions et produit des espèces puissantes (Salman et Ashraf, 2013). H_2O_2 peut-être produit à partir de l'anion superoxyde par le superoxyde dismutase (SOD) par une réaction de dismutation. L'acide aminé oxydase et

la xanthine oxydase peuvent également produire du H_2O_2 à partir de l'anion superoxyde (Lee et al., 2004 ; Barbusinski, 2009).

- **Acide hypochlorique (HOCl)**

La myéloperoxydase convertit le peroxyde d'hydrogène en acide hypochlorique (HOCl) à des concentrations physiologiques. Ce dernier peut réagir avec les fonctions aminées des protéines pour former des chloramines (Sumaya Martinez, 2004).

5. Les espèces réactives azotées

5.1 Les espèces réactives radicalaires azotées

- **Monoxyde d'azote NO^\bullet**

L'oxyde nitrique (officiellement appelé monoxyde d'azote) est un gaz incolore, modérément soluble dans l'eau et plus soluble dans les solvants organiques. Par conséquent, le NO^\bullet peut traverser les membranes et se diffuser facilement entre les cellules et à l'intérieur de celles-ci (Fukuto, 2012 ; Koppenol, 2012 ; Toledo, 2012).

5.2 Espèces non radicalaires azotées

- **Peroxynitrite ONOO**

NO réagit avec O_2 avec une constante de vitesse élevée pour donner du peroxynitrite (Beckman, 1990 ; Barbusiński, 2009) qui peut se décomposer spontanément pour donner NO , et un radical hydroxyle (OH) (Radi et al., 1993). Au pH physiologique, l'ONOO est un oxydant plus fort que l' O_2 ou le NO , et il oxyde les lipides, les protéines, les acides aminés nitrés et l'ADN (Crow, 1995 ; Pryor, 1995).

- **Dioxyde d'azote NO_2**

Le dioxyde d'azote (NO_2) est formé à partir de la réaction du radical peroxy et du NO . Le NO_2 initie la peroxydation des lipides pour la production des radicaux libres et oxyde également l'acide ascorbique (Lee et al., 2004).

6. Les conséquences de stress oxydatif

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des

lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (**Favier, 2003**).

Les conséquences du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane entraînant des lyses immédiates. D'autres perturbations biologiques sont observées à la suite d'un stress oxydant : baisse de la fluidité des membranes, anomalies de récepteurs, diminution de la sensibilité à l'insuline, perturbation de l'immunité cellulaire, fibrose, dépôts de lipides, affaiblissement musculaire, voire mort neuronale ou apparition de mutations. De nombreuses anomalies pathologiques sont également induites par le stress oxydant : mutations, carcinogénèse, malformations des fœtus, dépôts de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôts de lipides oxydés, immunosuppression (**Favier, 2003**).

7. Les antioxydants

7.1 Définition

Les antioxydants sont définis comme tout composé qui peut donner au moins un atome d'hydrogène à un radical libre afin qu'il puisse entraîner l'arrêt des réactions radicalaires en chaîne (**Vincent et al., 2003**). Ils peuvent également inhiber ou retarder les dommages oxydatifs et protègent contre de nombreuses maladies (**Shrikanta et al., 2015**).

Ce sont des molécules produites naturellement par l'organisme ou par l'alimentation ou soit issus d'une synthèse chimique (**Kalander et al., 2012**).

7.2 Classification des antioxydants

7.2.1 Les antioxydants naturels

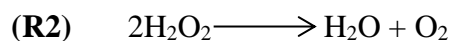
Les tocophérols/tocotriénols, l'acide ascorbique, les caroténoïdes et les polyphénols sont les antioxydants naturels traditionnels, qui sont concentrés dans les fruits, les légumes et les céréales (**Resat et al., 2018**).

✓ **Système de défense enzymatique**• **Superoxyde dismutase (SOD)**

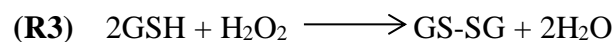
Les superoxydes dismutases (SOD) sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation des ions superoxydes en molécules de peroxyde d'hydrogène et d'oxygène. Ces enzymes sont ubiquitaires chez les eucaryotes et on distingue trois isoenzymes (SOD1, à cuivre et à zinc cytosolique, SOD2, à manganèse, mitochondriale, et SOD3, à cuivre et à zinc, extracellulaire) qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire **(R1) (Beaudeau et Durand, 2008)**.

• **Catalase**

La catalase est une enzyme héminique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes, les érythrocytes, les hépatocytes **(R2) (Beaudeau et Durand, 2008)**.

• **Glutathion peroxydases**

L'ensemble des glutathion peroxydases (GPx) catalysent la réduction des hydroperoxydes minéraux (peroxyde d'hydrogène) ou organiques (hydroperoxydes lipidiques) en molécule d'eau ou alcool couplée à l'oxydation d'un substrat comportant une fonction thiol (glutathion). On distingue cinq isoenzymes de la GPX chez les eucaryotes : la GPx1 cytoplasmique et mitochondriale, la GPX2 gastrointestinale, la GPx3 plasmatique, la GPX4 ou PHGPX (phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase) localisée à l'interface de la membrane interne du cytoplasme et la GPX5 épидидymaire **(R3) (Beaudeau et Durand, 2008)**.

✓ **Système de défense non enzymatique**

Divers piègeurs de radicaux libres non enzymatiques (antioxydants) peuvent prendre en charge la détoxification d'un grand nombre de radicaux libres et notamment celle du radical hydroxyle contre lequel aucun système enzymatique n'existe **(Halliwell, 1997)**.

Cette classe regroupe des composés endogènes comprennent le glutathion, les protéines à groupements thiols, la bilirubine, les hormones sexuelles (œstrogènes), l'acide urique, le

coenzyme Q, la mélanine, la mélatonine et l'acide lipoïque, et des molécules exogènes tels que vitamine E, vitamine C, caroténoïdes (**Beaudeux et Durand, 2008**).

- **Les tocophérols**

Les tocophérols et les tocotriénols appartiennent à la famille de la vitamine E. Les tocophérols sont généralement présents dans les noix (amandes) et les huiles végétales (germe de blé, tournesol), tandis que les tocotriénols sont généralement présents dans les céréales (orge, avoine et seigle) et certaines huiles végétales (huile de palme et huile de bran). La vitamine E et les homologues de tocotriénols et de tocophérol possèdent une forte activité antioxydante et se protéger contre les maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose et certains cancers. Les tocophérols se composent de quatre types différents appelés α -tocophérol (vitamine E), β -tocophérol, γ -tocophérol et δ -tocophérol (**Charles et Denys, 2012**).

- **Acide ascorbique**

L'acide ascorbique ou vitamine C se trouve principalement dans les fruits et légumes et a la capacité de régénérer l' α -tocophérol. L'acide ascorbique est un antioxydant soluble dans l'eau et son mécanisme d'inhibition de l'oxydation repose principalement sur son potentiel réducteur. De plus, l'acide ascorbique peut agir comme un piègeur d'oxygène, piéger les radicaux libres générés dans la phase aqueuse et maintenir les composés de fer dans un état non catalytique réduit (**Erickson, 2002**).

- **Caroténoïdes**

Les caroténoïdes (carotènes et xanthophylles) sont des antioxydants liposolubles, qui éteignent principalement l'oxygène singulet dans les systèmes *in vitro* et *in vivo*. Les caroténoïdes sont constitués de longs systèmes à double liaison conjugués, qui servent de chromophores absorbant la lumière et sont généralement composés de huit unités isoprène (C_4H_6). Les caroténoïdes existent principalement dans l'exosquelette d'animaux marins (par exemple les crustacés), les algues et les fruits et légumes colorés tels que les épinards, le chou frisé, les pois, les haricots verts, les asperges, le maïs jaune, les tomates, les poivrons rouges et les carottes (**Resat et al., 2018**).

- **L'ubiquinone**

L'ubiquinone ou la coenzyme Q est une phénolique conjuguée à une chaîne isoprénoïde et se trouve principalement dans les mitochondries (**Zubay, 1983**). La coenzyme Q10, également connue sous le nom de coenzyme Q, d'ubidécarnone et d'ubiquinone, se trouve dans toutes

les cellules humaines, avec des concentrations les plus élevées dans le cœur, le foie, les reins et le pancréas (Wyman et al., 2010). Elle fonctionne également comme une antioxydante lipidique soluble des espèces réactives de l'oxygène et est impliquée dans de multiples aspects du métabolisme cellulaire (Turunen et al., 2004).

- **Glutathion et composés à groupements thiols**

Le glutathion est un tripeptide qui, sous sa forme réduite (GSH), agit comme antioxydant. Les fonctions du GSH incluent le maintien des thiols des protéines, ainsi que le maintien de certains composés sous leur forme réduite comme les vitamines C ou E. Le GSH est un composé piègeur pouvant réagir avec l'hydroxyle ou un peroxyde pour donner un radical thiyl, pouvant lui-même réagir avec l'oxygène et entraîner une série de réactions, les radicaux formés pouvant se recombinaison en disulfure de glutathion stoppant ainsi la réaction radicalaire en chaîne. D'autres composés porteurs de groupement thiols, non protéiques ou protéiques comme l'albumine, présents en quantité importante dans le plasma, pourraient jouer un rôle important de protection, bien que les réactions impliquées soient beaucoup plus lentes que celles observées avec le glutathion (Jane-Lise et al., 2007).

- **Chélateurs de métaux**

Les métaux de transition comme le fer ou le cuivre sont souvent impliqués dans de nombreuses réactions radicalaires, produisant des espèces très réactives. C'est pour- quoi les formes de stockage et de transport de ces métaux peuvent être considérées comme des défenses antioxydantes. Ainsi, la formation de complexes de certaines molécules (transferrine, céruloplasmine, lactoferrine, métallothionéines...) avec les métaux de transition permet d'inhiber les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss, évitant la formation du radical hydroxyle très réactif (Jane-Lise et al., 2007).

- **Les polyphénols**

Les polyphénols constituent une famille importante d'antioxydants présents dans les végétaux. L'alimentation fournit environ 1g de polyphénols par jour principalement par l'apport en fruits et dans une moindre mesure en légumes et en céréales. Ils sont présents sous forme d'anthocyanine dans les fruits rouges, sous forme de flavonoïdes dans les agrumes, l'huile de lin et sous forme d'épicatéchine dans le thé, le chocolat, les pommes, les oignons et les algues brunes. Globalement, ce sont d'excellents piègeurs des ERO et de très bons chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre (Haleng et al., 2007).

7.2.2 Les antioxydants synthétiques

Les antioxydants synthétiques, à savoir l'hydroxyanisole butylé (BHA), l'hydroxytoluène butylé (BHT), le gallate de propyle (PG) et la tert-butylhydroquinone (TBHQ), sont les plus largement utilisés dans les aliments pour empêcher les radicaux libres dans une réaction d'oxydation. Il a été démontré que le BHA contrôle l'oxydation des acides gras dans les huiles de noix de coco et de palmiste qui sont généralement utilisées dans les céréales. Il a été rapporté que la combinaison de BHT avec 3-BHA présente une activité antioxydante plus élevée que l'un ou l'autre utilisé individuellement dans l'huile de soja et l'oléate de méthyle. De même, il a été démontré que le TBHQ présente une plus grande activité antioxydante dans les huiles marines raffinées, blanchies. Il a été montré que la PG inhibe la xanthine oxydase et supprime les ERO intracellulaires dans une lignée cellulaire de leucémie promyélocytaire humaine (Resat et al., 2018).

8. Les maladies liées au stress oxydant

Le stress oxydant provoque des dommages sur tout l'organisme (Sivanandham, 2011), en accélérant le vieillissement et l'apparition de plusieurs maladies (Siti et al., 2015 ; Csányi et Miller, 2014). Il est associé à l'athérosclérose, l'asthme, l'arthrite, l'hyperoxie, l'hépatite, l'attaque cardiaque, les vasospasmes, les traumatismes, les accidents vasculaires cérébraux, les pigments d'âge, les dermatites, les dommages de la rétine, les parodontites et les cancers (Cohen et al., 2000 ; Kramer, 2001).

Deuxième partie :

Partie Expérimentale

Chapitre I :
Matériel et méthodes

Notre étude expérimentale est réalisée au sein du laboratoire Antibiotique Antifongique : physico-chimie, synthèse et activité biologique (LAPSAB), Département de Biologie, Faculté des Sciences Naturelles et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers, université Abou-Bekr-Belkaïd, Tlemcen, Algérie.

Le but de ce travail est l'étude phytochimique et la recherche d'activité antioxydante, par la technique de piégeage du radical libre (DPPH[•]) et la réduction du fer (FRAP), des extraits bruts hydrométhanolique des feuilles de *Tetraclinis articulata*, préparés par décoction ou macération et leurs fractions acétate d'éthyle.

Il comprend :

- 1- Extraction du matériel végétal à partir des feuilles de *Tetraclinis articulata*
- 2- Tests phytochimiques
- 3- Dosage des composés phénoliques :
 - Dosage des polyphénols totaux
 - Dosage des flavonoïdes
- 4- Evaluations de l'activité antioxydante des extraits obtenus par deux méthodes :
 - Piégeage du radical : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•])
 - Réduction du fer : Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est les feuilles de *Tetraclinis articulata* récoltées durant le mois de novembre 2022 dans la région de Maaziz, wilaya de Tlemcen–Algérie. La plante est identifiée par un botaniste du département d'écologie environnement, faculté SNV-STU, université de Tlemcen.

Le matériel végétal récolté est lavé et séché à l'ombre, dans un endroit sec, afin de préserver au maximum l'intégrité de sa composition chimique. Ensuite, il est broyé et conservé à l'abri de la lumière et loin de l'humidité jusqu'à utilisation (**Figure 2**).

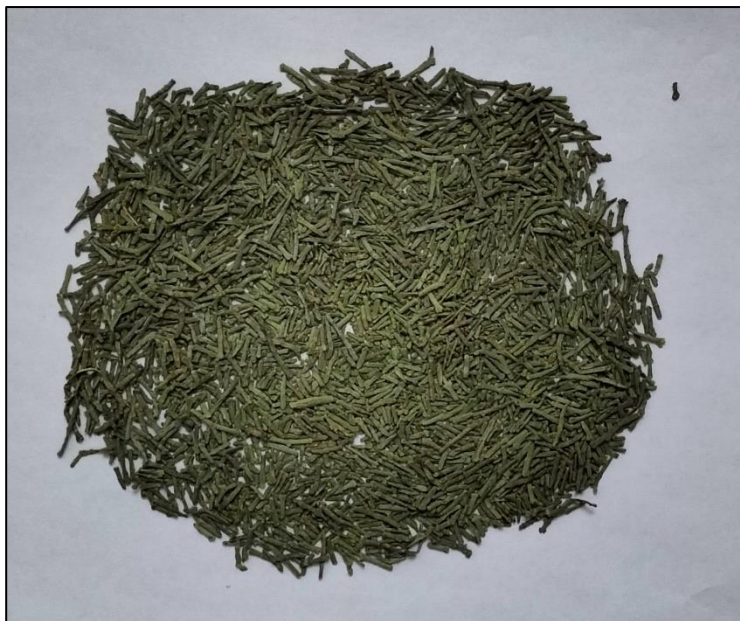


Figure 2 : Les feuilles de *Tetraclinis articulata* séchées et broyées (photo personnelle).

2. Préparation des extraits

L'extraction des extraits bruts des feuilles est effectuée en deux étapes :

- ✓ Préparation des extraits bruts hydrométhanolique par Extraction Solide-Liquide : réalisée par deux méthodes d'extraction : macération (48 h), et décoction hydrométhanolique (45 min).
- ✓ Fractionnement de l'extrait brut hydrométhanolique par Extraction Liquide-Liquide à partir de l'extrait évaporé obtenu par macération ou décoction.

2.1 Préparation des extraits bruts par Extraction Solide-Liquide

2.1.1 Macération

Dans un erlenmeyer, 10 g de la matière végétale (feuilles) séchée et broyée sont mélangées avec 150 ml d'un mélange de solvants méthanol-eau (70/30). L'extraction est réalisée à température ambiante à l'obscurité pendant 48 heures.

A la fin de la macération, le macérât est filtré sur papier filtre, puis concentré sous pression réduite à l'aide d'un Rotavapor à une température de 60 °C.

Après l'évaporation, 10 ml d'extrait de macération sont récupérés pour réaliser les tests phytochimiques et le reste sont séchés dans une étuve à 35 °C.

- Une deuxième macération est réalisée afin de mettre en œuvre une série d'extractions liquide-liquide par des solvants pour fractionnement.

2.1.2 Extraction sous reflux (décoction)

Dans un ballon rodé, surmonté d'un réfrigérant (sous reflux), 10 g du matériel végétal sont mélangés avec 200 ml de mélange méthanol-eau (70/30).

- le mélange est laissé bouillir pendant 45 minutes.
- le mélange est filtré.
- le filtrat est concentré à l'aide d'un Rotavapor à 60 °C.
- 10 ml sont récupérés pour le screening phytochimique et le reste est séché dans une étuve à 35°C.
- Une deuxième décoction est réalisée afin de mettre en œuvre une série d'extractions liquide-liquide par des solvants pour fractionnement.

Dans cette étape, deux extraits bruts hydrométhanolique sont récupérés pour des analyses phytochimiques et biologiques : Extrait brut hydrométhanolique préparé par macération (**EBM**) et extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction (**EBD**).

2.2 Fractionnement de l'extrait brut par Extraction Liquide-Liquide

Dans l'optique de séparer les deux extraits bruts hydrométhanolique en fractions de polarités différentes des solvants, nous avons opté pour un fractionnement liquide-liquide, à l'aide d'une ampoule à décanter.

La solution aqueuse des extraits bruts, récupérée après évaporation de méthanol, ont subi une extraction liquide-liquide par deux solvants organiques à polarité croissante.

L'extrait brut est fractionné, au début, avec le *n*-hexane (v/v) pour se débarrasser des lipides et de la chlorophylle :

- ✓ Boucher l'ampoule à décanter.
- ✓ Agiter énergiquement l'ampoule à décanter et dégazé régulièrement.
- ✓ Laisser reposer le mélange (décantation), jusqu'à ce que l'un des liquides surnage entièrement.
- ✓ Récupérer les deux phases (organique et aqueuse)

Avec la même démarche, la phase aqueuse obtenue est soumise à un autre fractionnement deux fois par l'acétate d'éthyle.

La phase organique acétate éthyle récupérée est évaporée à sec à l'aide d'un Rotavapor à 60°C.

Dans cette étape, deux fractions sont récupérées pour des analyses phytochimiques et biologiques : Fraction acétate d'éthyle de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération (**FAEM**) et Fraction acétate d'éthyle de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction (**FAED**).

2.3 Conservation des extraits préparés

Les quatre extraits sont conservés dans des tubes Eppendorf, protégés avec du papier aluminium pour éviter toute dégradation des molécules par la lumière, puis conservés dans le réfrigérateur à 4 °C pour une utilisation ultérieure.

2.4 Détermination du rendement d'extrait

Le rendement extrait (R) est le rapport entre la masse de l'extrait sec résultant (M) et la masse du matériel végétal à traiter (M'). Il est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$\mathbf{R\% = (M/M') \times 100}$$

- ✓ R : Rendement exprimé en %.
- ✓ M : Masse en gramme de l'extrait sec résultant.
- ✓ M' : Masse en gramme du matériel végétal à traiter.

3. Tests phytochimiques

Dans le but de mettre en évidence la présence des métabolites secondaires dans les extraits des feuilles de la plante étudiée, nous avons effectué une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration, de précipitation. Cette analyse est réalisée selon les techniques décrites par (**Harbone, 1998 ; Bruneton, 1999**).

1.1. Les composés azotés

➤ Les alcaloïdes

Dans deux tubes à essai, introduire 0,5 ml d'extrait à analyser. Acidifier le milieu par quelques gouttes d'HCl (1 %) et ajouter 0,5 ml de réactif de Mayer dans le premier tube et 0,5

ml de réactif de Wagner dans le second tube. L'apparition d'un précipité blanc ou brun, respectivement révélé la présence d'alcaloïdes.

1.2. Les composés phénoliques

➤ Les tanins

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

➤ Les flavonoïdes

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait à analyser et ajouter 1 ml de HCl concentré et quelques copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rose ou rouge ou jaune prouvé la présence des flavonoïdes.

➤ Les quinones libres

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

➤ Anthraquinones

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

1.3. Les composés terpéniques

➤ Les saponines : test de mousse

Dans un tube à essai, introduire 10 ml d'extrait à analyser, agiter pendant 15 secondes et laisser le mélange au repos pendant 15 min. Une hauteur supérieure à 1 cm de mousse indiquée la présence de saponines.

➤ Terpénoïdes

Test de Slakowski : dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait à analyser, ajouter 0,4 ml de chloroforme et 0,6 ml d'acide sulfurique concentré. La formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase indiqués la présence des terpénoïdes.

1.4. Les composés réducteurs

Dans un tube à essai, ajouter 1 ml de liqueur de Fehling (0,5 ml réactif A et 0,5 ml réactif B) à 1 ml d'extrait à analyser et incuber l'ensemble 8 min dans un bain marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique indiqué la présence des composés réducteurs.

4. Dosage des composés phénoliques

4.1 Dosage des polyphénols totaux

➤ Principe

La teneur phénolique totale est habituellement déterminée par méthode colorimétrique en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Cette méthode est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_4$) de réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers ont présenté un maximum d'absorption à 760 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (Georgé et al., 2005).

➤ Mode opératoire

Les polyphénols totaux sont déterminés par méthode spectrophotométrique suivant le protocole décrit par Vermerius et Nicholson (2006) :

- ✓ Mélanger 0,1 ml d'extrait (1mg/ml) avec 2 ml de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (2 %) ;
- ✓ Agiter et incuber pendant 5 minutes ;
- ✓ Ajouter 0,1 ml de réactif Folin-Ciocalteu à 1N ;
- ✓ Incuber pendant 30 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante ;
- ✓ Mesurer l'absorbance à 760 nm contre un blanc.

En parallèle, une gamme d'étalonnage est préparée dans les mêmes conditions à partir d'acide gallique à différentes concentrations de 30 à 500 $\mu g/ml$.

Les résultats sont exprimés en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait sec (μg Eq AG/mg ES).

4.2 Dosage des flavonoïdes

➤ Principe

Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par des solutions incolores de nitrite de sodium (NaNO_2 , 15 %) et de chlorure d'aluminium (AlCl_3 , 10 %), en milieu alcalin, ce qui entraîne la formation d'un complexe rose qui absorbe à 510 nm. La comparaison de l'absorbance est mesurée à celle obtenue par un étalon de catéchine de concentration connue permet d'évaluer la teneur totale en flavonoïdes (Nsemi, 2010).

➤ Mode opératoire

La teneur en flavonoïdes totaux est déterminée selon la méthode décrite par **at et al., (1999)**.

- ✓ Mélanger 250 μl de l'extrait (1mg/ml) avec 1 ml d'eau distillée et 75 μl du NaNO_2 à 15 % ;
- ✓ Laisser incuber pendant 6 min à température ambiante puis ajouter 75 μl du chlorure d'aluminium AlCl_3 à 10 % ;
- ✓ Après 6 min, ajouter 1 ml d'hydroxyde de sodium NaOH (4 %) ;
- ✓ Compléter le volume total à 2,5 ml d'eau distillée ;
- ✓ Agiter le mélange et laisser incuber à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30 min ;
- ✓ Mesurer l'absorbance à 510 nm.

Une gamme d'étalonnage est préparée dans les mêmes conditions avec la catéchine à différentes concentrations de 1, 25 à 500 $\mu\text{g/ml}$.

Les résultats obtenus sont exprimés en microgramme équivalent catéchine par milligramme d'extrait sec ($\mu\text{g Eq C/mg ES}$).

5. Evaluation de l'activité antioxydante

5.1 Test de Piégeage du radical libre DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

➤ Principe

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH[•] (2.2 diphenyl 1 picrylhydrazyl) de couleur violette se réduit en 2.2 diphenyl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (Maataoui et al., 2006).

Ce radical est un oxydant qui peut être réduit par l'antioxydant (AH) selon la réaction suivante :



➤ **Mode opératoire**

La recherche de l'activité antiradicalaire des extraits préparés est réalisée selon le protocole décrit par **Atoui et al., (2005)**.

- ✓ 50 µl des solutions d'extraits à différentes concentrations de (0,2 à 2mg/ml) sont ajoutés à 1950 µl DPPH[•] (0,0025 g fraîchement préparé dans du méthanol).
- ✓ Pour chaque concentration un blanc est préparé contenant 50 µl de chaque concentration d'extraits et 1950 µl du méthanol.
- ✓ Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1950 µl de DPPH[•].

La lecture de l'absorbance est faite à 517 nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante.

Les molécules standard (acide ascorbique, BHA, BHT) sont utilisées comme contrôles positifs, dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que les extraits.

Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois.

➤ **Calcul des pourcentages d'inhibition**

$$I (\%) = [(A_{\text{cont}} - A_{\text{éch}}) / A_{\text{cont}}] \times 100$$

I (%) : Pourcentage d'inhibition.

A_{cont} : Absorbance du contrôle négatif.

A_{éch} : Absorbance du l'échantillon testé.

➤ **Calcul des CI₅₀**

La CI₅₀ est définie comme étant la concentration de l'extrait qui provoque l'inhibition de 50% du radical libre DPPH[•].

Elle est calculée graphiquement par les régressions logarithmiques des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits étudiés ou des molécules standard

(acide ascorbique, BHA, BHT). Elle permet de déterminer l'extrait le plus efficace avec la valeur la plus faible en CI_{50} .

5.2 Test de pouvoir réducteur de fer (Ferric Reducing Antioxidant Power ; FRAP)

➤ Principe

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique est développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}). En effet, le Fe^{3+} participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel déterminée à 700 nm (Oyaizu, 1986).

➤ Mode opératoire

Le pouvoir réducteur est déterminé selon la méthode décrite par Karagözler et al., (2008):

- ✓ Mélanger 100 μ l de l'extrait à différentes concentrations (de 0,2 à 2 mg/ml) avec 250 μ l d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 250 μ l d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ (1%) ;
- ✓ Incuber l'ensemble à 50°C pendant 20 minutes dans l'étuve ;
- ✓ Laisser le mélange refroidit ;
- ✓ Ajouter 250 μ l de l'acide trichloracétique TCA (10%) pour stopper la réaction ;
- ✓ Centrifuger l'ensemble à 3000 rpm pendant 10min ;
- ✓ Combiner 500 μ l de surnageant avec 500 μ l d'eau distillée et 100 μ l d'une solution aqueuse de chlorure de fer $FeCl_3$ (0,1%) ;
- ✓ Mesurer l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre à 700 nm contre un blanc, préparé en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée.
- ✓ Pour chaque concentration, le test répété trois fois.

Les molécules standard (acide ascorbique, BHA, BHT) sont utilisées comme contrôles positifs à différentes concentrations (0,01 à 0,4 mg/ml), dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que les extraits.

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

➤ **Expression des résultats d'EC₅₀**

L'EC₅₀ est définie comme étant la concentration efficace de l'extrait qui donne une réponse demi-maximale.

L'EC₅₀ est calculée à partir de l'équation de la courbe de régression linéaire des absorbances obtenus en fonction des différentes concentrations utilisées pour les différents extraits de la plante étudiée ou des molécules standard (acide ascorbique, BHA, BHT). Permettant de déterminer l'extrait le plus efficace avec la valeur la plus faible en EC₅₀.

6. Analyse statistique

Les teneurs en composés phénoliques et l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits étudiés sont réalisées en trois répétitions et les résultats sont présentés en moyenne et en écart type :

❖ Moyenne

$$\bar{x} = \frac{(x_1 + x_2 + \dots + x_n)}{(n)} = \frac{1 \sum x_j}{n}$$

❖ Écart-type

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Chapitre II :
Résultats et interprétations

1. Caractéristiques et les rendements d'extractions

Les extraits de feuilles de *T. articulata* récupérés après évaporation à sec sont pesés pour déterminer le poids sec obtenu. Les rendements sont calculés à partir de la masse de la matière végétale sèche initiale et de la masse de la matière végétale extraite. Les résultats sont exprimés en pourcentage massique.

Les caractéristiques ainsi que les rendements de chaque extrait utilisé dans notre travail sont mentionnées dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Rendements, aspects, couleurs et solubilité des extraits préparés des feuilles *T. articulata*

Les extraits	Rendement (%)	Aspect	Couleur	Solubilité
EBD	10,62	Cristallisé	Marron	Méthanol et eau distillé
EBM	3,12	Caramélisé	Marron	Méthanol et eau distillé
FAED	0,61	Poudre	Jaune	Méthanol
FAEM	0,78	Poudre	Jaune	Méthanol

EBD : extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction ; **EBM** : Extrait brut hydrométhanolique préparé par macération ; **FAED** : Fraction acétate d'éthyle de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction ; **FAEM** : Fraction acétate d'éthyle de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération

Nous pouvons remarquer à partir de ces résultats que l'EBD a enregistré le rendement le plus élevé estimé à 10,62%, suivi l'EBM estimé à 3,12 %. Les autres fractions FAED et FAEM ont représenté les rendements les plus faibles à savoir 0,61 % et 0,78% respectivement.

L'EBD a présenté un aspect cristallisé, contrairement à l'extrait EBM qui a montré un aspect caramélisé. Ces deux extraits ont présenté la même couleur (marron).

D'autre part, les deux fractions FAED et FAEM sont identiques en apparence (poudre) et en couleur (jaune).

De plus, tous les extraits préparés ont montré une bonne solubilité dans le méthanol, à l'exception de l'EBD et l'EBM, qui sont solubles dans l'eau distillée.

2. Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques se limitent à la détection de quelques groupes chimiques étudiés par des réactions qualitatives, via des réactifs spécifiques à chaque famille de composés. Ces tests sont fondus sur des réactions de coloration, précipitations et de solubilités.

Les résultats obtenus des tests phytochimiques effectués sur les extraits bruts hydrométhanolique préparés par décoction et macération sont regroupés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Résultats de screening phytochimique des différents extraits bruts eau-méthanol préparés des feuilles de *T. articulata*

Métabolites secondaires		EBD	EBM
Alcaloïdes	Mayer	+	++
	Wagner	++	++
Tanins		++	++
Flavonoïdes		+	+
Quinones libres		++	++
Anthraquinones		+	+
Saponines		++	++
Terpénoïdes		++	++
Composés réducteurs		++	++

(++) : Test fortement présent ; (+) : test moyennement présent ; **EBD** : extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction ; **EBM** : Extrait brut hydrométhanolique préparé par macération

Les résultats mentionnés dans le tableau 2 ont montré la richesse des feuilles de *T. articulata* en métabolites secondaires. Elles contiennent des composés azotés (Alcaloïdes), des composés phénoliques (Tanins, Flavonoïdes, Quinones libre, Anthraquinones), des composés terpéniques (Saponines, Terpénoïdes) et des composés réducteurs.

3. Dosage des composés phénoliques

Les extraits préparés sont analysés quantitativement par spectrophotomètre UV-visible, pour leurs contenus en polyphénols totaux, en flavonoïdes.

- Les dosages des polyphénols totaux sont déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu. L'absorbance est lue par une longueur d'onde de 760 nm, L'acide gallique est utilisé pour tracer la courbe d'étalonnage.

Les résultats obtenus, sont exprimés en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait sec ($\mu\text{g Eq AG/ mg ES}$).

Ils sont déterminés à partir de la formule de la régression linéaire est de $y = 0,0018x$ avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,9973$ (**Figure 3**).

- Les dosages des flavonoïdes sont réalisés par des réactions chimiques en milieu alcalin avec le nitrite de sodium (NaNO_2) et le chlorure d'aluminium (AlCl_3) ayant une absorbance maximale à 510 nm. Le composé de référence utilisé pour l'établissement de courbe étalonnage est la catéchine.

La teneur en flavonoïdes est exprimée en microgramme équivalent de catéchine par milligramme d'extrait sec ($\mu\text{g Eq C/mg ES}$).

Les teneurs sont obtenues à partir de la courbe de régression linéaire, ayant l'équation de $y = 0,0026x$ avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,9988$ (**Figure 4**).

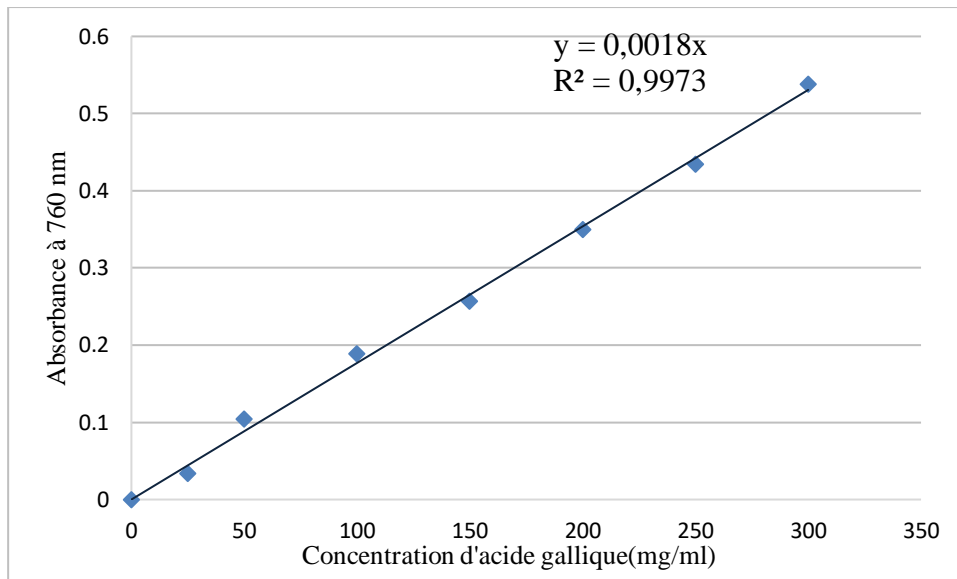


Figure 3 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

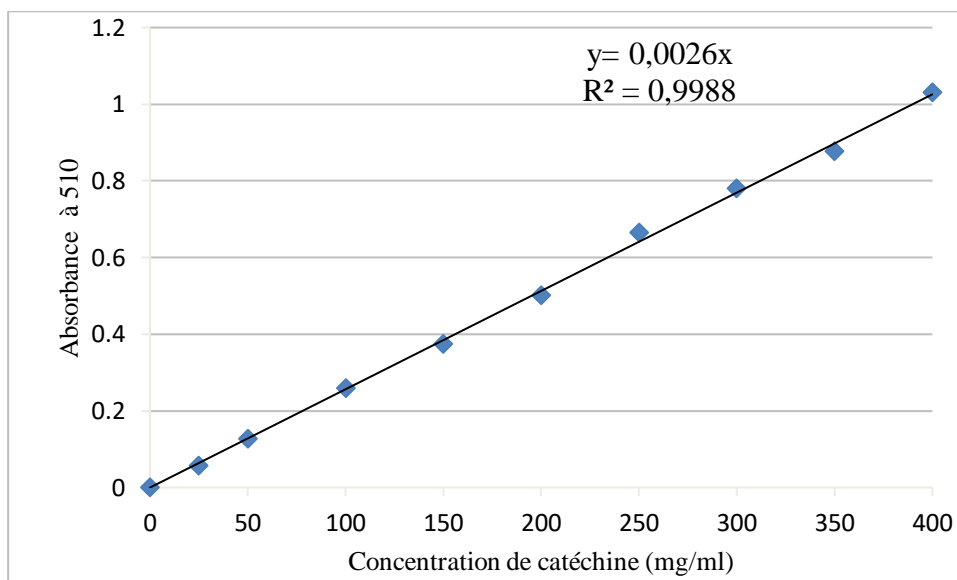


Figure 4 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes

Les résultats des dosages des composés phénoliques sont regroupés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Teneurs en composés phénoliques dans les extraits préparés des feuilles de *T. articulata*

Extraits préparés	Moyenne \pm écarte type (n=3)	
	Polyphénols totaux ($\mu\text{g Eq AG/ mg ES}$)	Flavonoïdes ($\mu\text{g Eq C/mg ES}$)
EBD	406,57 \pm 71,03	207,05 \pm 13,42
EBM	355,98 \pm 22,40	80,20 \pm 23,51
FAED	693,26 \pm 44,15	313,74 \pm 58,18
FAEM	635,62 \pm 45,55	220,51 \pm 20,25

EBD : extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction ; **EBM** : Extrait brut hydrométhanolique préparé par macération ; **FAED** : Fraction acétate d'éthyle de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction ; **FAEM** : Fraction acétate d'éthyle de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération.

Les résultats obtenus (**Tableau 03**) ont révélé une variabilité des teneurs en composés phénoliques, entre les quatre extraits préparés.

Nous avons remarqué que les fractions acétate d'éthyle FAED et FAEM préparées à partir des extraits bruts préparés par décoction ou macération sont plus riche en polyphénols totaux (693,26 et 635,62 $\mu\text{g Eq AG/ mg ES}$, respectivement) et en flavonoïdes (313,74 et 220,51 $\mu\text{g Eq C /mg ES}$, respectivement).

L'EBD et l'EBM contiennent aussi des teneurs considérables en polyphénols totaux de l'ordre de 406,57 et 355,98 $\mu\text{g Eq AG/ mg ES}$, respectivement et en flavonoïdes de l'ordre de 207,05 et 80,20 $\mu\text{g Eq C /mg ES}$, respectivement.

4. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits des feuilles de *T. articulata* est évaluée par deux méthodes : le test DPPH \cdot et le test de FRAP.

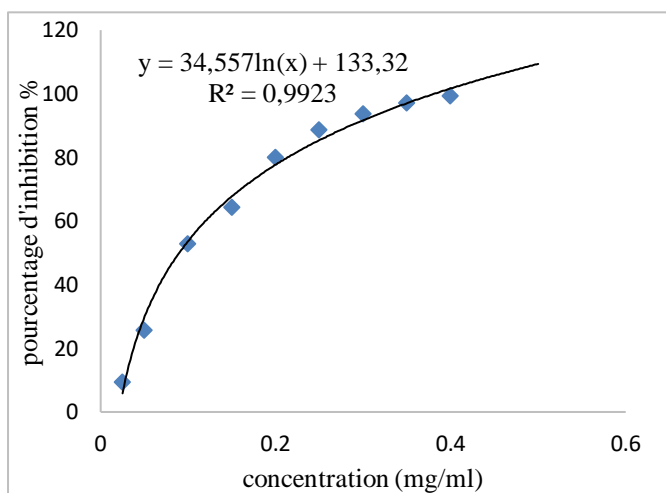
Ces tests sont basés sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel :

4.1 Test Piégeage du radical libre DPPH[•]

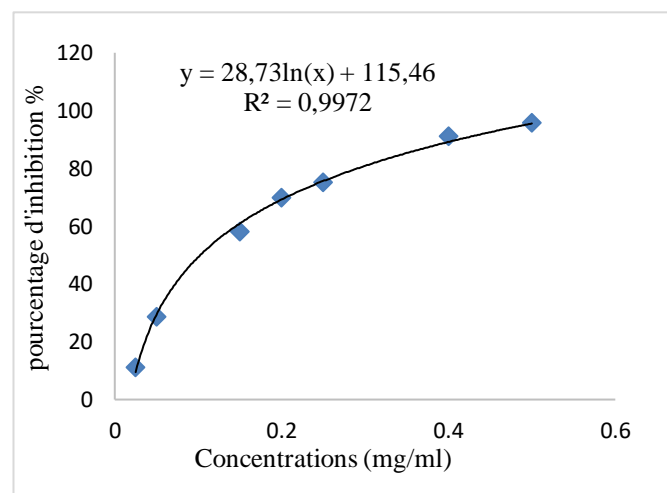
Nous avons étudié l'activité antiradicalaire des extraits préparés de feuilles *T. articulata* par le test de piégeage du radical DPPH[•].

L'absorbance est mesurée à l'aide d'un colorimètre à une longueur d'onde de 520 nm. A partir des valeurs obtenues, nous avons calculé les pourcentages d'inhibitions et les comparés aux molécules de références (acide ascorbique, BHA et BHT).

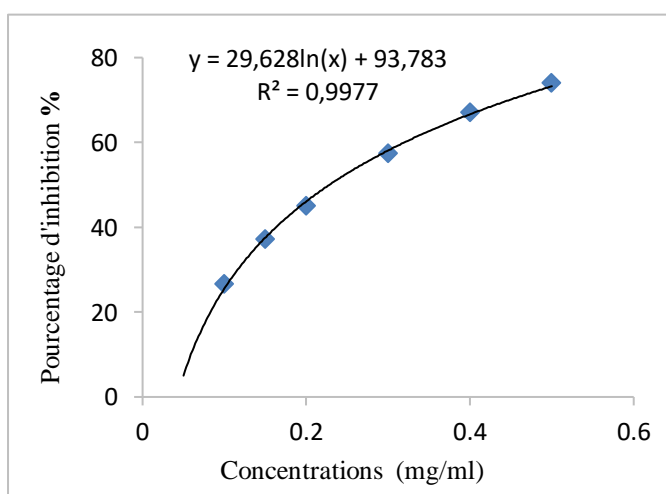
Les résultats sont présentés sous forme de graphe de pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH[•] en fonction des concentrations des extraits (EBD, EBM, FAED, FAEM) ou des molécules de référence (acide ascorbique, BHA, BHT) (**Figure 5**).



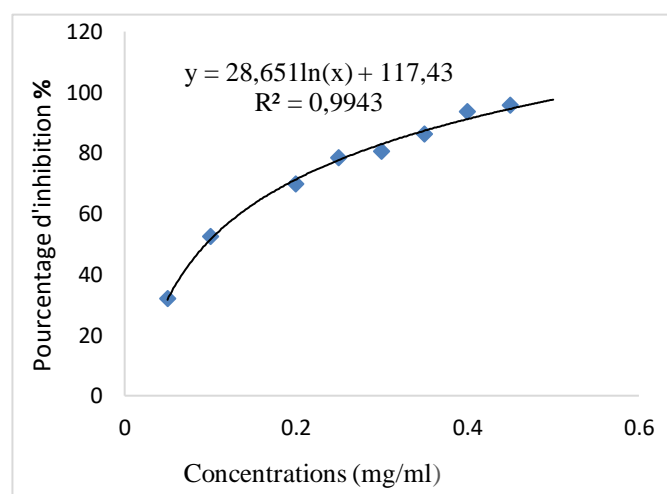
(A)



(B)



(C)



(D)

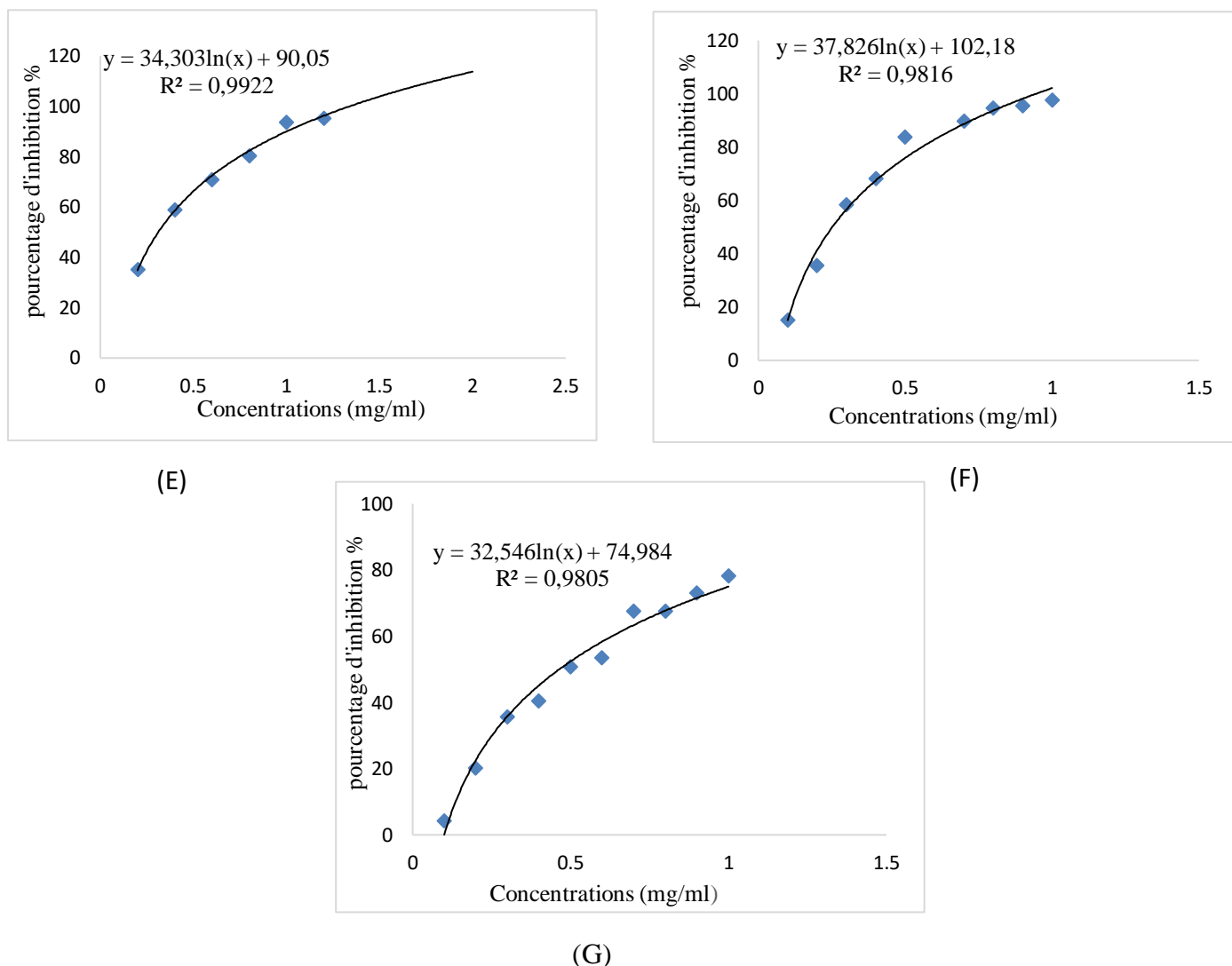


Figure 5 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH[•] en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique(A), le BHA(B), le BHT (C), FAED (D) et EBD (E), FAEM (F) et EBM(G)

BHA : Hydroxyanisole butylé ; **BHT :** Hydroxytoluène butylé ; **FAED :** Fraction acétate d'éthyle de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction ; **EBD :** extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction ; **FAEM :** Fraction acétate d'éthyle de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération ; **EBM :** Extrait brut hydrométhanolique préparé par macération.

➤ **Calcul des CI₅₀ : concentrations inhibitrices à 50%**

A partir des équations de régressions logarithmiques des courbes représentés dans la figure 5, nous avons calculé les CI₅₀, qui représentent les concentrations nécessaires pour inhiber 50% du radical libre DPPH[•] (mg /ml), des molécules de référence et des extraits préparés.

Les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau 4.

La CI_{50} lié à la capacité antioxydante d'un composé, Elle représente la quantité d'antioxydant requise pour diminuer (neutraliser) 50% de la concentration du radical libre, plus la CI_{50} est faible plus l'extrait a un potentiel antioxydant puissant.

Tableau 4 : les valeurs des CI_{50} pour le test de DPPH^{*} des différents extraits préparés des feuilles de *T. articulata* et des molécules standard.

Extrait/ standard	CI_{50} (mg/ml) \pm Ecarte type
EBD	0,31 \pm 0,02
EBM	0,46 \pm 0,01
FAED	0,095 \pm 0,003
FAEM	0,25 \pm 0,01
Acide ascorbique	0,089
BHA	0,1
BHT	0,22

EBD : extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction ; **EBM** : Extrait brut hydrométhanolique préparé par macération ; **FAED** : Fraction acétate d'éthyle de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction ; **FAEM** : Fraction acétate d'éthyle de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération ; **BHA** : Hydroxyanisole butylé ; **BHT** : Hydroxytoluène butylé.

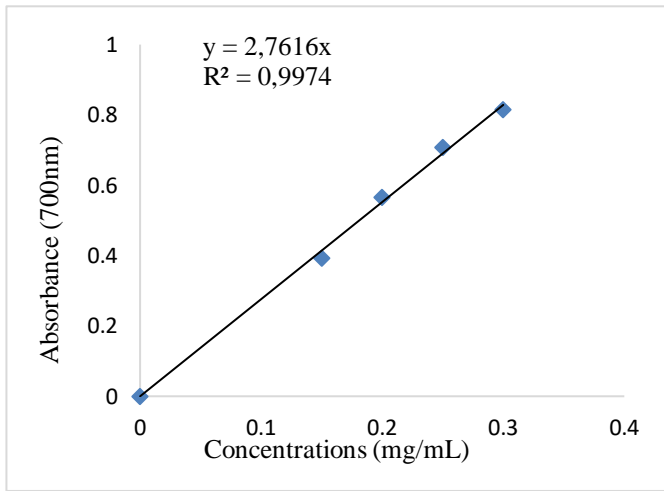
D'après les résultats obtenus, nous avons constaté que la fraction FAED présente l'activité antiradicalaire la plus puissante avec une CI_{50} estimé à 0,095 mg/ml par rapport aux autres extraits (FAEM, EBD, EBM) qui ont noté des valeurs de CI_{50} de l'ordre de 0,25 mg/ml, 0,31mg/ml et 0,46 mg/ml respectivement.

Cette activité de FAED est supérieure par rapport à celle du BHT qui a noté une CI_{50} égale à 0,22 mg/ml et proche à celle d'acide ascorbique et du BHA qui ont enregistré des CI_{50} de l'ordre de 0,089 mg/ml et 0,1 mg/ml respectivement.

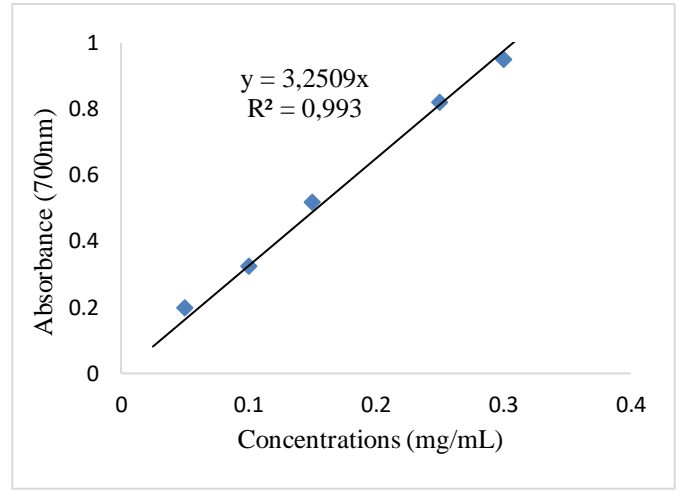
4.2 Test de pouvoir réducteur de fer (FRAP)

Nous avons déterminé le pouvoir réducteur des extraits préparés par la méthode de FRAP. Cette technique est développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}). L'intensité de la coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm.

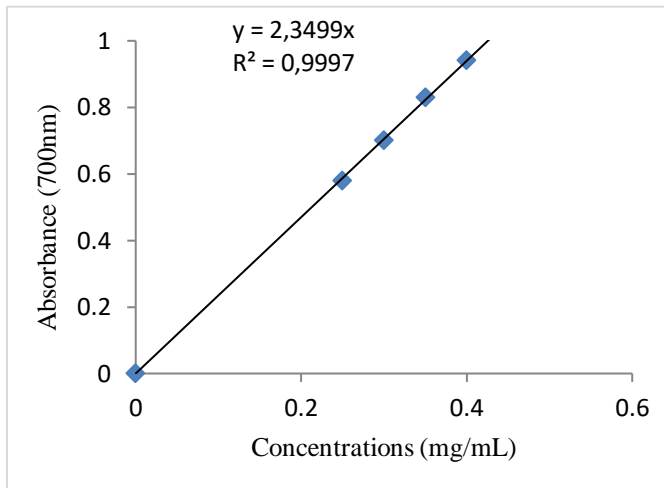
Les résultats sont présentés sous forme de graphes de l'absorbance en fonction des concentrations des extraits ou des molécules standard (acide ascorbique, BHA, BHT) (Figure 6).



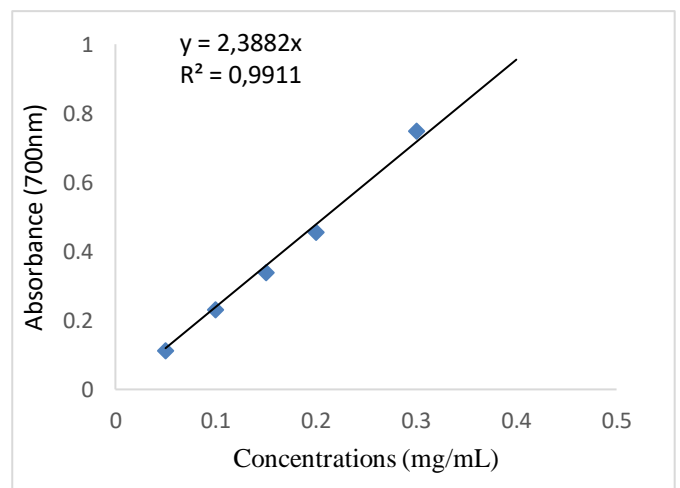
(A)



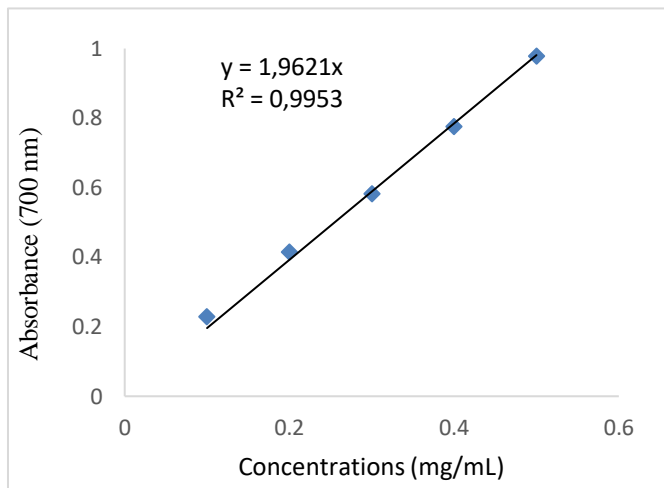
(B)



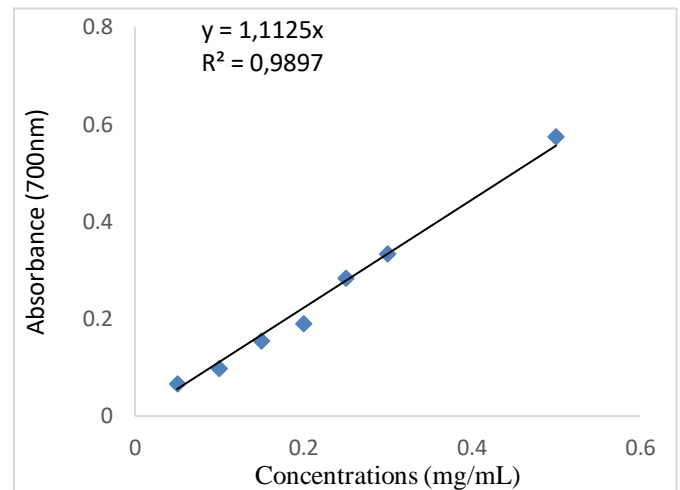
(C)



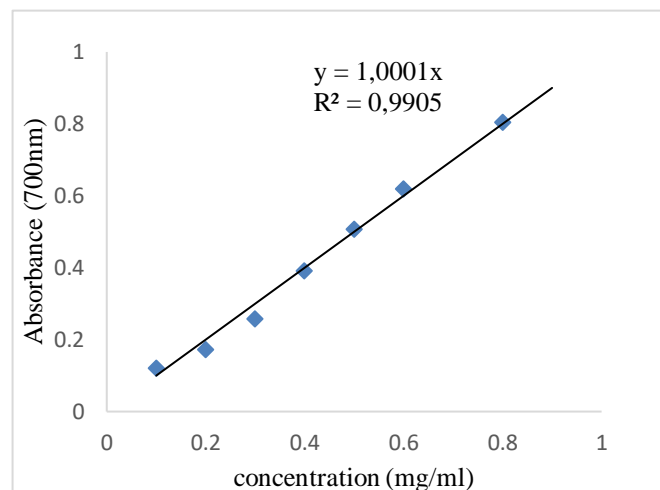
(D)



(E)



(F)



(G)

Figure 6 : Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique(A), BHA (B), BHT(C), FAED (D), EBD(E), FAEM(F), EBM(G) selon la méthode de FRAP

BHA : Hydroxyanisole butylé ; **BHT** : Hydroxytoluène butylé ; **FAED** : Fraction acétate d'éthyle de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction ; **EBD** : extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction ; **FAEM** : Fraction acétate d'éthyle de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération ; **EBM** : Extrait brut hydrométhanolique préparé par macération.

➤ Calcul des EC₅₀ :

La valeur EC₅₀ est la concentration efficace dans laquelle l'absorbance égale à 0,5 et déterminée graphiquement par la régression linéaire.

Tableau 5 : Les valeurs des EC₅₀ pour le test de FRAP des différents extraits préparés des feuilles de *T. articulata* et des molécules standard.

Extrait/ standard	EC ₅₀ (mg/ml) ± Ecarte type
EBD	0,25 ± 0,01
EBM	0,49 ± 0,02
FAED	0,20 ± 0,01
FAEM	0,44 ± 0,03
Acide ascorbique	0,18
BHA	0,15
BHT	0,21

EBD : extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction ; **EBM** : Extrait brut hydrométhanolique préparé par macération ; **FAED** : Fraction acétate d'éthyle de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction ; **FAEM** : Fraction acétate d'éthyle de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération ; **BHA** : Hydroxyanisole butylé ; **BHT** : Hydroxytoluène butylé.

Selon les résultats obtenus, nous avons constaté que la fraction acétate d'éthyle FAED préparée à partir de l'extrait brut préparé par décoction des feuilles de *T. articulata* est la plus active avec une EC₅₀ estimé à 0,20 mg/ml par rapport aux autres extraits (EBD, FAEM, EBM) qui ont enregistré des valeurs d'EC₅₀ de l'ordre de 0,25 mg/ml et 0,44 mg/ml, 0,49 mg/ml, respectivement.

L'activité réductrice de FAED est proche à celle de BHT (EC₅₀ estimé à 0,21 mg/ml) et inférieure à celle de BHA et d'acide ascorbique (EC₅₀ d'ordre de 0,15 mg/ml et 0,18 mg/ml respectivement).

Discussion

Une grande partie de la recherche actuelle porte sur l'étude et évaluations des activités biologiques des plantes médicinales telle que l'activité antioxydante, antimicrobiennes et anti-inflammatoires...

L'activité antioxydante d'un composé capable de prévenir ou de ralentir l'oxydation d'autres molécules. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène, l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques (**Rice-Evans, 1995 ; Bartosz, 2003**)

Dans ce travail, nous sommes intéressés à l'étude phytochimique, le dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits bruts hydrométhanoliques des feuilles de *Tetraclinis articulata*, préparés par décoction ou macération (EBD, EBM) et leurs fractions acétate d'éthyle (FAED, FAEM), récoltées dans la région de Maaziz, wilaya de Tlemcen.

T. articulata est un arbre qui appartient à la famille des Cupressacées. Il est largement utilisé en médecine traditionnelle en raison de ses multiples effets thérapeutiques. En effet, différentes parties de Thuya sont utilisées pour traiter les infections intestinales, les douleurs gastriques, les maladies respiratoires, le diabète, les diarrhées sévères, l'hypertension artérielle et la fièvre (**Sbai-Jouilil et al., 2017 ; Teixidor-Toneu et al., 2017**).

Le rendement d'extraction de l'extrait brut préparé par décoction EBD (10,62%) obtenu dans cette étude est supérieur à celui des autres extraits (EBM, FAEM, FAED), qui ont enregistré des pourcentages d'ordre de 10,62%, 3,12%, 0,78% et 0,61%, respectivement.

Ces résultats sont différents à ceux obtenus dans :

Les travaux de **Saber et al., (2021)** sur les cônes de *T. articulata* récoltées dans la région de Khemisset (Maroc), qui ont montré un rendement estimé à 13,22% pour l'extrait méthanolique et 2,46% pour l'extrait hexanique.

Le travail de **Benyamina., (2019)**, effectué sur les feuilles, les rameaux et les cônes de *T. articulata* récoltés dans la montagne des lions (près de la ville Oran), a présenté des rendements d'ordre de 56,40%, 33,60% et 18,60%, respectivement, pour les extraits éthanoliques préparés par macération.

Les travaux de **Biaz et Bella., (2022)** sur les feuilles de *T. articulata* récoltées dans la région de Sidi- Bakhti, wilaya de Tiaret, ont obtenu un rendement de 46,9 % pour l'extrait

méthanolique suivi par l'extrait éthanolique avec un rendement de 42,9%, et l'extrait aqueux avec un rendement de 35,2 %.

Cette variation dans le rendement peut être due à plusieurs facteurs notamment : la période de récolte, la partie de la plante utilisée, la durée de séchage, la méthode d'extraction, et la polarité de solvants utilisés (**Salminen, 2003**).

Les résultats des tests phytochimiques que nous avons réalisé sur les extraits bruts hydrométhanoliques (EBD et l'EBM) ont révélé la richesse des feuilles de *T. articulata* en alcaloïdes, tanins, flavonoïdes, quinones libres, anthraquinones, saponines, terpénoïdes et composés réducteurs.

Ces résultats sont en accord avec ceux qui sont rapportés dans la littérature dans les travaux de **Harouak et al., (2021)** qui ont détecté la présence des tanins, des flavonoïdes, des terpénoïdes, des composés réducteurs et anthraquinones dans les extraits aqueux des feuilles de *T. articulata*.

Une étude récente réalisée par **Zerkani et al., (2022)**, a montré aussi la présence des alcaloïdes, des flavonoïdes, des tanins, stéroïdes et triterpènes, dans les extraits organiques et aqueux des feuilles de *T. articulata*.

L'étude de **Saber et al., (2021)** a révélé la présence des flavonoïdes, saponines, alcaloïdes dans l'extrait méthanolique préparé à partir des cônes de *T. articulata*.

Nous avons réalisé des dosages quantitatifs par des réactions chimiques pour la détermination des composés phénoliques, en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu pour le dosage des polyphénols totaux et le nitrite de sodium et chlorure d'aluminium pour le dosage des flavonoïdes.

Les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux et en flavonoïdes ont été enregistrées pour la fraction acétate éthyle FAED d'ordre de 693,26 µg Eq AG/ mg ES et 313,74 µg Eq C /mg ES, respectivement ; suivi de la fraction FAEM avec des teneurs de l'ordre de 635,62 µg Eq AG/ mg ES et 220,51 µg Eq C /mg ES, respectivement.

Ces teneurs restent nettement supérieures à celles reportées dans la littérature par :

El Jemli et al., (2016b) qui ont noté des teneurs estimées à 175.67 µg Eq AG/mg ES pour le dosage des phénoliques totaux, et 11,78 µg Eq C/mg ES pour le dosage des flavonoïdes dans l'extrait aqueux des feuilles de *T. articulata*.

Djouahri, (2013) a enregistré des teneurs variables en composés phénoliques dans les extraits méthanolique et dichlorométhanes préparés à partir de poudre des feuilles de *T. articulata*. Il a noté des valeurs estimées à 125,95 µg Eq AG/mg ES et 24,12 µg Eq AG/mg ES pour le dosage des polyphénols et des valeurs estimées à 49,95 µg Eq C /mg et 12,12 µg Eq C /mg pour le dosage des flavonoïdes, respectivement.

Saber et al., (2021) ont révélé une teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes dans l'extrait méthanolique préparé à partir des cônes de *T. articulata*, avec des valeurs de l'ordre de 78,54 µg Eq AG/mg ES et 41,11 µg Eq C/mg ES.

Il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie car l'utilisation de différentes méthodes d'extraction et des solvants utilisés réduisent la fiabilité de la comparaison entre les études (**Trabelsi, 2010**).

Nous avons utilisé deux méthodes pour évaluer l'activité antioxydante de nos extraits, La méthode du radical de DPPH[•], qui est une procédure commune par laquelle l'activité antioxydante de l'échantillon étudié est estimée par le degré de décoloration de la solution de DPPH[•] (**Gulcin et al., 2010**) et la méthode de FRAP, qui est déterminé par la transformation de Fe⁺³ en Fe⁺² en présence des extraits ou des fractions (**Kodjio et al., 2016**).

Dans la méthode de DPPH[•], nous avons noté que la fraction FAED a présenté une meilleure activité antioxydante avec une CI₅₀ égale à 0,095 mg/ml, par rapport aux autres extraits (FAEM, EBD, EBM) qui ont enregistré des valeurs de CI₅₀ d'ordre de 0,25 mg/ml et 0,31mg/ml, 0,46 mg/ml respectivement. Cette activité antiradicalaire est inférieure à celle des molécules standard (acide ascorbique, BHA, BHT) qui ont noté des CI₅₀ d'ordre de 0,089 mg/ml et 0,1 mg/ml et 0,22 mg/ml, respectivement.

Pour la méthode de FRAP, la fraction FAED a présenté le pouvoir réducteur le plus élevé pour réduire le fer, suivi de l'extrait EBD et FAEM, EBM avec des valeurs d'EC₅₀ d'ordre de 0,20 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,44 mg/ml et 0,49 mg/ml, respectivement. Cette activité reste relativement inférieure à celle des molécules standard (BHA, acide ascorbique, BHT) qui ont présenté des EC₅₀ d'ordre de 0,15 mg/ml, 0,18 mg/ml et 0,21 mg/ml, respectivement.

Ces résultats sont différents avec ceux trouvés par **Zerkani et al., (2022)** qui ont évalué l'activité antioxydante des extraits préparés à partir des feuilles de *T. articulata* par les méthodes DPPH[•] et FRAP. Ils ont noté une CI₅₀ de l'ordre de 0,07 mg/ml pour l'extrait hydrométhanolique et une EC₅₀ de l'ordre de 0,1 mg/ml pour extrait butanolique.

El Jemli et al., (2016a) ont étudié le pouvoir antioxydant des huiles essentielles des feuilles de *T. articulata* par deux tests DPPH[•] et FRAP. Ces huiles essentielles ont présenté une faible activité antioxydante, avec une CI₅₀ obtenue par le test de DPPH[•], de l'ordre de 12,05 mg/ml, nettement inférieure à celle du standard (BHT) avec une CI₅₀ de 0,0042 mg/ml. Le résultat du pouvoir antioxydant obtenu par FRAP a montré une activité très faible, avec une valeur d'EC₅₀ de 0,15 mg /ml, en comparaison à la molécule standard (BHT), qui a noté avec une valeur d'EC₅₀ égale à 0,007 mg/ml.

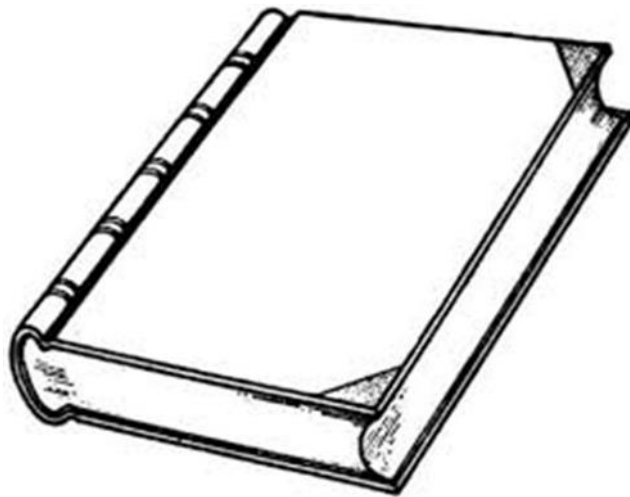
El jemli et al., (2016b) ont rapporté que la CI₅₀ de l'extrait aqueux de feuilles de *T. articulata* obtenu par la méthode DPPH[•] est égale à 27,38 µg/ml et cette valeur est supérieure à celle de BHT (CI₅₀ égale à 4,20 µg/ml). Ils ont noté, pour la méthode de FRAP, une EC₅₀ égale à 47,12 µg/ml, supérieure à celle de BHT (EC₅₀ estimé à 7,02 µg/ml).

Cependant les travaux de **Rached et al., (2018)** ont indiqué, dans le test DPPH[•], que la fraction acétate d'éthyle a présenté une activité antioxydante plus élevée par rapport aux autres extraits étudiés (fraction butanol et l'extrait aqueux) avec des valeurs de CI₅₀ d'ordre de 4,51 µg/ml, 8,65 µg/ml et 12,68 µg/ml. Cette activité est très élevée par comparaison au composé de référence (Trolox) avec une CI₅₀ de 42 µg/ml. Ils ont noté, aussi, que la capacité de réduction ferrique (FRAP) est similaire à celle obtenue par le test DPPH[•], où la fraction d'acétate d'éthyle a enregistré la capacité antioxydante la plus élevée avec une EC₅₀ de 3,84 µg/ml, suivi la fraction butanol et l'extrait aqueux avec des EC₅₀ d'ordre 7,6 µg/ml et 12,9 µg/ml.

Selon les résultats obtenus, nous avons suggéré que l'activité antioxydante des extraits est relativement dépendante de la teneur en composés phénoliques. La fraction FAED qui a présenté la teneur élevée en polyphénols totaux et en flavonoïdes, a présenté le pouvoir antioxydant le plus élevé par rapport aux autres extraits.

Plusieurs études ont montré que les composés phénoliques sont les principaux constituants antioxydants des plantes, et qu'il existe des relations directes entre l'activité antioxydantes et la teneur totale en composés phénoliques (**Heim et al., 2002 ; Loizzo et al., 2012**). L'activité antioxydante des polyphénols dépend de la structure et de leurs groupes fonctionnels (**Hussain, et al., 2016**). Ils sont principalement attribués à la capacité d'inhibition des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, de transférer des électrons vers les radicaux libres, en plus d'activer des enzymes antioxydantes et de réduire le stress oxydatif (**De Araújo et al., 2020**).

Conclusion



Dans notre travail, nous sommes intéressées à l'étude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des extraits bruts hydrométhanolique des feuilles de *T. articulata*, préparés par décoction ou macération et leurs fractions acétate d'éthyle.

A la lumière des résultats obtenus, nous avons tiré les conclusions suivantes :

- ✓ L'extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction a présenté le rendement le plus élevé suivi l'extrait brut préparé par macération.
- ✓ Les fractions acétate d'éthyle récupérées des extraits bruts préparés par décoction ou macération ont présenté les rendements les plus faibles.
- ✓ Les tests phytochimiques sur les extraits bruts ont révélé la présence des alcaloïdes, tanins, flavonoïdes, quinones libres, anthraquinones, saponines, terpénoïdes et composés réducteurs.
- ✓ L'analyse quantitative des composés phénoliques ont montré la richesse des extraits préparés en polyphénols totaux et en flavonoïdes. La fraction acétate d'éthyle récupérée de l'extrait brut préparé par décoction a présenté les teneurs les plus élevées en ces constituants par rapport aux autres extraits, avec des teneurs de l'ordre de 693,26 µg Eq AG/mg ES et 313,74 µg Eq C/mg ES, respectivement.

L'activité antioxydante des extraits étudiés sont évalués par deux méthodes : piégeage de radical libre DPPH[•] et la réduction du fer FRAP.

Pour le test de piégeage de radical libre DPPH[•], la fraction acétate d'éthyle récupérée de l'extrait brut préparé par décoction a présenté l'activité antioxydante la plus élevée avec une CI₅₀ de l'ordre de 0,095 mg/ml. Cette activité est proche à celle d'acide ascorbique et du BHA avec des valeurs de CI₅₀ de l'ordre de 0,089 mg/ml et 0,1 mg/ml, respectivement.

Pour le test de FRAP, la même fraction acétate d'éthyle récupérée de l'extrait brut préparé par décoction a présenté l'activité la plus élevée pour réduire le fer avec une EC₅₀ de l'ordre de 0,20 mg/ml par rapport aux autres extraits étudiés. Cette activité est plus proche à celle du BHT qui a enregistré une EC₅₀ d'ordre de 0,21 mg/ml.

En comparaison, nous avons constaté que la fraction acétate d'éthyle récupérée de l'extrait brut préparé par décoction est la plus riche en composés phénoliques et possède le pouvoir antioxydant le plus intéressant, par rapport aux autres extraits étudiés.

L'ensemble de ces résultats obtenus restent préliminaires et ne constituent qu'une première étape de recherche. Des études complémentaires, précises et approfondies, seraient nécessaires, qui se résument dans les points suivants :

- ✓ Réaliser d'autres méthodes d'extraction ;
- ✓ L'étude *in vivo* de l'activité antioxydante ;
- ✓ Séparation et l'isolement, l'identification des principes actifs responsables de l'activité antioxydante en utilisant des techniques chromatographiques et spectrales ;
- ✓ Évaluations d'autres activités biologiques, hémolytiques, antidiabétiques, antimicrobiennes, anti-inflammatoires ;
- ✓ L'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante par d'autres méthodes : CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity), CAT (Total Antioxidant Capacity) et le blanchiment de β -carotènes.

Références bibliographiques



- **Achach, N. (2006).** Stress oxydatif et angor instable (Mémoire de fin d'études pharmaceutiques. Faculté de pharmacie de Monastir Tunisie.
- **Aljos, F. (2010).** A Handbook of the World's Conifers. Amazon France: Brill
- **Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G., Kefalas, P. (2005).** Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. Food Chemistry, 89 (1), 27- 36.
- **Bajaj, Y. P. S. (1996).** Biotechnology in agriculture and forestry, 35. Berlin Heidelberg: Springer.
- **Barbusinski, K. (2009).** Fenton reaction controversy concerning the chemistry. Ecological Chemistry and Engineering Science, 16(3), 309-314.
- **Bartosz, G. (2003).** Generation of reactive oxygen species in biological systems. Comments on Toxicology, 9(1), 5-21.
- **Beaudeau, J-L., Durand, G. (2008).** Biochimie médicale marqueurs actuels et perspectives. Paris : Médecine sciences.
- **Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A. (1990).** Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proceedings of the National Academy of Science, 87(4), 1620-1624.
- **Bellakhdar, J. (1997).** La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Paris : Ibis press.
- **Benyamina, A. (2019).** Étude ethnopharmacologique et caractérisation des composés phénoliques des organes aériens du *Tetraclinis articulata* (vahl) masters de l'ouest algérien. (Thèse de doctorat). Université Djilali Liabès Sidi-Bel-Abbès-Algérie.
- **Biaz, S., Bella, F. (2022).** Etude phytochimique des extraits de *Tetraclinis articulata* de la région de Tiaret (Dosage des polyphénols) (Mémoire de maîtrise). Université de Tissemsilt.
- **Bidie, A.P., N'Guessan, B.B., Yapo, A.F., N'Guessan, J.D., Djaman, A.J. (2011).** Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. Sciences et Nature, 8(1), 1-11.
- **Bielski, B.H.j., Cabelli, D.E. (1995).** Superoxide and hydroxyl radical chemistry in aqueous solutions. In: Foote CS, Valentine JS, Greenberg A, Liebman JF, editors. Active oxygens in chemistry. London: Blackie Academic and Professional.
- **Biesalski, H.K., Böhles, H., Esterbauer, H., Fürst, P., Gey, F., Hundsdörfer, G., Kasper, H., Sies, H., Weisburger. (1997).** Antioxidant vitamins in prevention. Clin Nutr, 16(3), 151–155.

- **Boudy, P. (1952).** Guide du forestier en Afrique du Nord. Paris : La maison rustique.
- **Bruce Fife, N.D., Conrado, S., Dayrit, M.D. (2012).** Cures de noix de coco : Prevenir et guerir les problemes de sante usuels avec la noix de coco. Colorado spring, CO, USA: piccadilly Books, Ltd.
- **Bruneton, J. (2009).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Paris, France : Ed Lavoisier.
- **Celiktas, O.Y, Bedir, E., Vardar Sukan, F. (2007).** In vitro antioxidant activities of Rosmarinus officinalis extracts treated with supercritical carbon dioxide. Food Chem, 101(4), 1457-1464.
- **Chaabi, M. (2008).** Étude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : Euphorbia stenoclada Baill. (Euphorbiaceae), Anogeissus leiocarpus Guill. Et Perr. (Combretaceae), Limoniastrum feei (Girard) Batt. (Plumbaginaceae) (Thèse de doctorat en pharmaco chimie). Université de Louis Pasteur et Université MENTOURI de Constantine (Alger).
- **Charles, D.J. (2012).** Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources. New York: Springer.
- **Cohen, J.H., Kristal, A.R., Stanford, J. L. (2000).** Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. Journal of the National Cancer Institute, 92(1), 61-68.
- **Crow, J.P., Beckman, J.S. (1995).** The role of peroxynitrite in nitric oxide-mediated toxicity. Current Topics in Microbiology and Immunology, 196, 57-73.
- **Csányi, G., Miller, J. F. J. (2014).** Oxidative stress in cardiovascular disease. International Journal of Molecular Sciences, 15(4), 6002-6008.
- **Cunningham, A.B., Campbell, B.M., Belcher, B. (2005).** Carving Out a Future: Forests, Livelihoods and the International Woodcarving Trade. Amazon France: Earthscan.
- **De Araújo, F. F., De Paulo Farias, D., Neri-Numa, I. A., Pastore, G. M. (2020).** Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. Food chemistry, 338, 127535.
- **Delattre, J., Beaudeau, J-L., Bonnefont- Rousselot, D. (2005).** Radicaux libres et stress oxydant-aspects biologiques et pathologiques. Paris, Londres, New-York : médicales internationales.
- **Deshmukh, L., Rode, S., Wagh, P., Thakur, P., Bandawane, D. (2013).** Oxidative stress and antioxidants in focus : a review. Inventi Impact : Molecular Pharmacology.

- **Djouahri, A. (2013).** Etude Phytochimique du *Tetraclinis articulata* Algérien et Valorisation des Activités Biologiques des Extraits (Thèse de doctorat). Université des sciences et de la technologie Houari Boumediene, Alger.
- **Durand, K. (2018).** Diabètes et stress oxydant .Université de pharmacie de Marseille.
- **Dutertre, J. (2011).** Enquête prospective au sein de la population consultant dans les cabinets de médecine générale sur l'île de la Réunion : à propos des plantes médicinales, utilisation, effets, innocuité et lien avec le médecin généraliste (Thèse. Doctorat). Université de Bordeaux 2 - Victor Segalen.
- **El Jemli, M., Kamal, R., Marmouzi, I., Doukkali, Z., Boudida, El-H., Touati, D., Nejari, R., El Guessabi, L., Cherrah, Y., Alaoui, K. (2016a).** Chemical composition, acute toxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of Moroccan *Tetraclinis articulata* L. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7(3), 1-7.
- **El Jemli, M., Kamal, R., Marmouzi, I., Zerrouki, A., Cherrah, Y., Alaoui, K. (2016b).** Radical-Scavenging Activity and Ferric Reducing Ability of *Juniperus thurifera* (L.), *J. oxycedrus* (L.), *J. phoenicea* (L.) and *Tetraclinis articulata* (L.). Hindawi Publishing Corporation *Advances in Pharmacological Sciences*.
- **El Moussaouiti, M., Talbaoui, A., Gmouh, S., Aberchane, M., Benjouad, A., Bakri, Y., Kamdem ,D.P. (2010).** Chemical composition and bactericidal evaluation of essential oil of *Tetraclinis articulata* burl wood from Morocco. *Journal of the Indian Academy of Wood Science*, 7(1-2), 14-18.
- **El-haci, IA., Atik-Bekkara, F., Didi, A., Gherib, M., Didi, M.A. (2012).** Teneurs en polyphénols et pouvoir antioxydant d'une plante médicinale endémique du Sahara algérien. *Phytothérapie*, 10(5), 280-285.
- **Erickson, M.C. (2002).** Lipid oxidation of muscle foods. New York: Marcel Dekker.
- **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108(10): 863-832.
- **Favier, A., Cadet, J., Kalaryanaman, R., Fontecave, M., Pierre, J.L. (1995).** Analysis of Free Radicals in Biological Systems. New York: Birkhauser.
- **Foote, N., Peterson, J., Gadsby, P.M., Greenwood, C., Thomson, A.J. (1985).** Redox-linked spin- state changes in the di-haem cytochrome c-551 peroxidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical Journal*, 230(1), 227-237.
- **Fukuto, J.M., Carrington,S.J., Tantillo,D.J., Harrison,J.G., Ignarro, L.J., Freeman,B.A., Chen, A., Wink,D.A. (2012).** Small molecule signaling agents : the integrated chemistry and biochemistry of nitrogen oxides, oxides of carbon ,O₂ ,H₂S, and their derived species. *Chem Res Toxicol*, 25(4), 769-793.

- **Georgé, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, M. J. (2005).** Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and foodchemistry*, 53(5), 1370-1373.
- **Guignard, J.L. (2006).** *Biochimie végétale*. Paris: Dunod.
- **Gulcin, I., Huyut, Z., Elmastas, M., Aboul-Enein, H. Y. (2010).** Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(1), 43-53.
- **Gutteridge, J.M.C. (1993).** Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun*, 19(3), 141–158.
- **Hadjadj, K., Letreuch Belarouci, A. (2017).** Synthèse bibliographique sur le thuya de Berbérie (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast.). *Geo-Eco-Trop*, 41 (1), 13-27.
- **Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J-O., Charlier, C., Chapelle, J-P. (2007).** Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-638.
- **Halliwell, B. (1990).** How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun*, 9(1), 1-32.
- **Halliwell, B. (1997).** Antioxidants: the basics-what they are and how to evaluate them. *Advances in Pharmacology*, 38, 3-20.
- **Halliwell, B. (2012).** Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews*, 70(5), 257-265.
- **Halliwell, B., John, M.C.G. (2015).** *Free Radicals in Biology and Medicine*. Amazon France: Oxford University Press.
- **Harbone, J. B. (1998).** *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. Londres, Angleterre: Ed chapman et hall Thomson science.
- **Harouak, H., Ibijbjen, J., Nassiri, L. (2021).** Chemical profile of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters, and *Juglans regia* L. and *Olea europaea* L. var. *Sylvestris* used against oral diseases: in vitro analysis between polyphenolic content and aqueous extraction optimization. *Heliyon*, 7(5).
- **Heim, k.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D. J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572–584.
- **Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M.C, Rahu, N. (2016).** Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev*.

- **Inoue, M., Sato, E.S., Nishikawa, M., Park, A-M., Kira, Y., Imada, K., Utsumi, K.(2003).** Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem*, 10(23), 2495–2505.
- **Jane-Lise, S., Dominique, B., Chantal, B., Bijan, G., Gervoise, L., Florence, P. (2007).** *Biologie et pathologie de cœur et des vaisseaux*. Paris : John Libbey Eurotext.
- **Jouad, H., Haloui, M., Rhiouani, H., El Hilaly, J., Eddouks, M. (2001).** Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane). *J Ethnopharmacol*, 77(2-3), 175–182.
- **Kalander, Y., Kayaa, S., Durakb, D., Uzuma, F.G., Demira, F. (2012).** Protective effects of catechin and quercetin on antioxidant status, lipid peroxidation and testis-histoarchitecture induced by chlorpyrifos in male rats. *Environmental toxicology and pharmacology*, 33(2), 141- 148.
- **Kodjio, N., Atsafack, S.S., Fodouop, P.C., Kuate, J-R., Gatsing, D. (2016).** In vitro Anti salmonellal and Antioxidant Activities of Extracts and Fractions of *Curcuma longa* L. Rhizomes (Zingiberaceae). *International journal of Biochemistry Research and Review*, 11(3), 1-14.
- **Koppenol, WH., Bounds, P.L., Nauser, T., Kissner, L., Rügger, H. (2012).** Peroxynitrous acid: controversy and consensus surrounding an enigmatic oxidant. *Dalton Transactions*, 41(45), 13779 - 13787.
- **Karagözler, A.A., Erdag, B., Emek, Y.G., Uygum, D.A. (2008).** Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*, *Food Chemistry*, 111, 400-407.
- **Kramer, K., Hoppe, P-P., Packer, L. (2001).** *Nutraceuticals in health and disease prevention*. New York: Marcel Dekker.
- **Lamnauer, D., Batanouny, K. (2005).** *A guide to medicinal plants in North Africa*. Malaga : IUCN.
- **Lee, J., Koo, N., Min, D.B. (2004).** Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(1), 21-33.
- **Liochev, S.I, Fridovich, I. (2004).** CO₂ mediates Mn(II)-catalyzed decomposition of H₂O₂ and peroxidation reactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(34), 12485-12490.
- **Loizzo, M.R., Tundis, R., Bonesi, M., Menichini, F., Mastellone, V., Avallone, L., Menichini, F. (2012).** Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of

- Annona cherimola* Mill. (cherimoya) peel and pulp in relation to their total phenolic and total flavonoid contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25(2), 179–184.
- **Maataoui, B. S., Hmyene, A., Hilali, S. (2006).** Activites anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*, 7, 3-8.
 - **Magder, S. (2006).** Reactive oxygen species: Toxic molecules or spark of life, *Crit care*, 10(1), 208-216.
 - **Maire, R. (1926).** Principaux groupements de végétaux d'Algérie. Station centrale de recherche en Ecologie forestière, CNREF, I.N.R.A. d'Algérie.
 - **Moller, M.N., Hatch, D.M., Kim, H-Y.H., Porter, N.A. (2012).** Superoxide reaction with tyrosyl radicals generate para-hydroperoxy and para-hydroxyderivatives of tyrosine. *J. Am. chem. Soc.*, 134(40), 16773-16780.
 - **Moon, J. K., Shibamoto, T. (2009).** Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 1655-1666.
 - **Nsemi, M.F. (2010).** Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques (Thèse de doctorat inédite). École doctorale SESAMES.
 - **Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44(6), 307-315.
 - **Pryor, W.A., Squadrito, G.L. (1995).** The chemistry of peroxynitrite: A product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *American Journal of Physiology*, 268, 699-722.
 - **Quezel, P. (1980).** Biogéographie et écologie des conifères sur le pourtour Méditerranéen. Paris : Madras.
 - **Quezel, P. (2000).** Réflexion sur l'évolution de la flore et de la végétation, au Maghreb Méditerranéen. Paris : Ibis Press.
 - **Quezel, P., Medail, F. (2003).** Ecologie et biogéographie des forêts du bassin méditerranéen. Paris : Elsevier (Collection environnement).
 - **Quézel, P., Santa, S. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris : CNRS.
 - **Rached, W. (2009).** Évaluation du potentiel antioxydant de plantes médicinales et analyses phytochimiques (Thèse de doctorat). Université d'Oran. ES- Sénia.
 - **Rached, W., Zeghadab, F., Bennaceurb, M., Barrosa, L., Calhelha, R., Heleno, S., Alves, M., Carvalho, A., Maroufe, A., Ferreira, I. 2018.** Phytochemical analysis and assessment of antioxidant, antimicrobial, antiinflammatory and cytotoxic properties of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters leaves. *Industrial Crops and Products*, 112, 460-466.

- **Radi, R., Cosgrove, T., Beckman, J.S., Freeman, B. (1993).** Peroxynitrite-induced luminal chemi- luminescence. *Biochemical Journal*, 290(1), 51-57.
- **Resat, A., Fereidoon, S., Esra, C. (2018).** Measurement of antioxidant activity and capacity: recent trends and applications. Canada: WILEY.
- **Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B. (2010).** Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(11), 1603- 1616.
- **Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B. (1995).** The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22(4), 375-383.
- **Rikli, M. (1943).** Das Pflanzenkleid der Mittelmeerländer. Huber Berne, 1, 1-41.
- **Roede, J.R., Jones, D.P. (2010).** Reactive species and mitochondrial dysfunction: mechanistic significance of 4-hydroxynonenal. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51, 380-390.
- **Saber, M., Harhar, H., El Hattabi, L., Zengin, G., Bouyahya, A., Tabyaoui, M. (2021).** Chemical composition and antioxidant activities of essential oils and extracts from cones of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *International Journal of Secondary Metabolite*, 8(4), 352–363.
- **Salman, K.A., Ashraf, S. (2013).** Reactive oxygen species: A link between chronic inflammation and cancer. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 21(2), 42-49.
- **Salminen, J.P. (2003).** Effects of sample drying and storage? and choice of extraction solvent and analysis method on the yield of birch leaf hydrolysable tannins. *Journal of chemical ecology*, 29(6), 1289-1305.
- **Sanogo, R. (2006).** Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université Bamako(Mali).
- **Sbai-Jouilil, H., Fadli, A., Zidane, L. (2017).** Survey of Ethnomedicinal Plants Used for the Treatment of Gastrointestinal Disorders in Seksaoua Region (Western High Moroccan Atlas). *Annual Research and Review in Biology*, 16(5), 1-9.
- **Shrikanta, A., Kumar, A., Govindaswamy, V. (2015).** Resveratrol content and antioxidant properties of underutilized fruits. *Journal of Food Science Technology*, 52 (1), 383-390.
- **Sies, H. (1991).** Oxidative stress: from basic research to clinical application. *American Journal of Medicine*, 91(3), 31-38.

- **Siti, H.N., Kamisah, Y., Kamsiah, J. (2015).** The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascular pharmacology*, 71, 40-56.
- **Sivanandham, V. (2011).** Free radicals in health and diseases-a mini review. *Pharmacologyonline*, 1(1), 1062-1077.
- **Sumaya Martinez, M. (2004).** Valorisation d'hydrolysats de co-produits de crevettes : étude de l'activité antiradicalaire et antioxydante, fractionnement des substances actives et effet de la glycation (thèse de doctorat). Université de Bretagne Occidentale, France.
- **Tassin, C. (2012).** paysages végétaux du domaine méditerranéen. Marseille, IRD Editions.
- **Teixidor-Toneu, I., Martin, G. J., Puri, R. K., Ouhammou, A., Hawkins, J. A. (2017).** Treating infants with frigg: Linking disease aetiologies, medicinal plant use and careseeking behaviour in southern Morocco. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 13(1), 4.
- **Thomas, Desmier. (2016).** Les antioxydants de nos jours : définition et application (Thèse de doctorat). Université de Limoges.
- **Toledo, J.C.Jr., Augusto, O. (2012).** Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide. *Chem Res Toxicol*. 25(5), 975-989.
- **Trabelsi, N., Megdiche, W., Ksouri, R., Falleh, H., Oueslati, S., Bourgou, S., Hajlaoui, H., Abdelly, C. (2010).** Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the African. *Journal of biotechnology*, 7(12),1797-1806.
- **Turunen, M., Olsson, J., Dallner, G. (2004).** Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta*, 1660(1-2), 171-199.
- **Vermerius, W., Nicholson, R., (2006).** Isolation and Identification of Phenolic Compounds. In: *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer, Dordrecht.
- **Vincent, A.M., Russell, J.W., Low, P., Feldman, E.L. (2003).** Oxidative stress in the pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocr Rev*, 25(4), 612-628.
- **Wyman, M., Leonard, M., Morledge, T. (2010).** Coenzyme Q10: a therapy for hypertension and statin- induced myalgia?. *Cleve Clin J Med*, 77(7), 435-442.
- **Zahir, I., Er-Rahmany, A., Es-Sadouny, R., El Hadri, I. (2020).** Activités biologiques de *Tetraclinis articulata* : revue de synthèse. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 89,91-114.
- **Zerkani, H., ZEKRI, N., TAGNAOUT, I., FADILI, K., AMALICH, S., ELAZZOUZI, H., BOUHRIM, M., ZAIR, T. (2022).** Phytochemical analysis and antioxidant activity of twigs and leaves extracts of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters.

Références bibliographiques

- **Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999).** The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 64, 555–559.
- **Zubay, G. (1983).** *Biochemistry*. Amazon France: Addison-Wesley.