

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



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

UNIVERSITE de TLEMCEN
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie
Laboratoire de Produits Naturels « LAPRONA »



THÈSE
Présentée par

KHALDI Darine

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Biologie

Option : Substances Naturelles, Activités Biologiques et Synthèse

Intitulé de la thèse

**Étude Phytochimique Pouvoir Antioxydant Activite Antiulcer
gastrique chez le rat *Wistar D'Osyris Alba. L .Skeel*
(*Santalacées*) De La Région De Tlemcen.**

Soutenue le 11 JUILLET 2023, devant le jury composé de :

Président	CHABANE SARI Daoudi	Pr	Université de Tlemcen
Directrice de thèse	BELARBI Meriem	Pr	Université de Tlemcen
Examinatrice	KAMBOUCHE Nadia	Pr	Université d'Oran-1
Examinatrice	BENDAHMANE Malika	Pr	Université de Sidi Belabbes
Examinateur	NANI Abdelhafid	MCA	Université d'Adrar
Examinateur	CHAOUCHE Mohamed Tarik	MCA	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2022-2023

REMERCIEMENTS

Je remercie Dieu tout puissant de m'avoir donné la volonté, la santé et le courage d'accomplir ce travail

Mes remerciements s'adressent tout d'abord à ma Directrice de thèse, **M^{me} BELARBI MERIEM**, Professeur à l'**université Abou Bakr Belkaïd de Tlemcen**. Tout au long de ce travail, elle a su m'apporter un soutien constant, une disponibilité, une écoute, une confiance et des conseils précieux et avisés à la hauteur de ses compétences et de ses réelles qualités humaines.

Je souhaite remercier **M. CHAABANE SARI DAOUDI**, Professeur à l'**université Abou Bakr Belkaïd de Tlemcen** pour l'honneur qu'il me fait en acceptant d'être Président de ce jury. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude. Merci pour ces enseignements que vous m'avez inculqué depuis la troisième et la quatrième année **CQA** dans les modules de **Physiologie Cellulaire** et **Physiologie des Grandes Fonctions**. Je tiens à remercier **M^{me} KAMBOUCHE NADIA**, Professeur à l'**université d'Oran-1** d'avoir accepté d'être membre de jury pour examiner ce travail scientifique quelle trouve ici mes sincères salutations.

J'exprime également ma profonde gratitude à **M^{me} BENDAHMANE MALIKA**, Professeur à l'**université Djilalli Liabès de Sidi Bel Abbès**, pour son honorable présence et l'hommage qu'elle me fait en participant à ce jury.

Je tiens également à témoigner toute ma reconnaissance à **M. CHAOUICHE MOHAMED TARIK**, Maître de Conférences classe A à l'**université Abou Bakr Belkaïd de Tlemcen**, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant d'être membre de jury pour évaluer ce travail de recherche.

Mes sincères remerciements s'adressent aussi à **M. NANI ABDELHAFID**, Maître de Conférences classe A à l'**université d'Adrar** pour l'honneur qu'il me fait d'être membre de jury pour ce travail de thèse.

Je tiens, tout particulièrement, à témoigner une vive reconnaissance à toute personne m'ayant soutenu physiquement et moralement tout au long de ce

parcours. Je voudrais insister sur la disponibilité et la gentillesse de l'ensemble des amis(es) et collègues que j'ai pu côtoyer tout au long de ce travail.

Je voudrais tout spécialement adresser mes remerciements aux membres du laboratoire **LAPRONA** qui ont accepté de partager avec moi leur temps, leurs idées et leurs motivations sur cette thèse de recherche : **M^{elle} Dr. GHANEMI FATIMA ZOHRA**, **M Dr. ELHACI IMAD** et **M^{elle} Dr. BADID NAÏMA**, je tiens à remercier vivement **M Pr. GHALEM SAÏD** et **M Pr. MERZOUK ABDESSAMAD** pour son aide dans la pratique et son soutien moral qu'il trouve ici mon profond respect.

J'adresse également tous mes remerciements au personnel du Laboratoire de Pharmacognosie faculté de Pharmacie Université de Burjasot à Valencia España et plus particulièrement à **M^{me} Pr. ROSA MARIA GINER PONS** et **M. Pr. JOSE LOUIS RIOS CANAVATE**.

Enfin je renouvelle toute mon amitié et ma sympathie à ceux qui m'ont accordé du temps et m'ont témoigné un soutien constant dans ce long travail de recherche. Merci tout spécialement au **M^{me} Pr. ATIK-BEKKARA Fawzia**. J'adresse un grand Merci à **M^{me} Dr. GAHELM MERIEM** pour ses idées pertinentes, son aide scientifique et son soutien moral durant toute les moments difficiles Merci Infiniment. Mes remerciements les plus distinguées seront adressees au **M^{elle} Dr. BENARRIBA NABILA** pour ses remarques pertinentes et son aide professionnel et à **MR Dr. BETTIOUI REDA** pour son aide dans letude statistique.

DEDICACES

A mes parents,

En témoignage d'un amour profond

A mes enfants,

Qu'ils trouvent dans ce travail un exemple de persévérance, de motivation et de volonté sans limite

A mes Sœurs et Freres fi Allah

Karima Beldegham, Naïma Badid, Wahiba Bousmaha, Djamila Bouhmamam, Sabiha Zerga, Ilhem Zerga, Mourad Zerga, Nabil Taiïbi et Miloud Freouani.

Production scientifique

Communications

2009-2010

1-Journée internationale de Produits Naturels 20 Mai 2009 Tlemcen Algérie

Communication affichée Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant des composés phénoliques extraits du tourteau d'*Argania spinosa* de la region de sud ouest algérien (Tindouf)

2012-2013

1-Forum sur le develeppement des sciences de la vie et de l'univers 14-15 mai 2013 faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences dela terre et de l'univers Tlemcen Algérie

-Communication orale « Contribution à l'étude phytochimique des composés phénoliques *Quercus ilex* une fagacée de la région de Tlemcen »

-Communication affichée « Contribution à l'étude de la composition chimique d'*Osyris alba* une santalacée de la région de tlemcen »

2013-2014

2- IXeme Congrès de physiologie, de pharmacologie et de thérapeutiques 22 au 24 Avril 2014 Faculté demedecine et de pharmacie Poitiers France

Communication affichée « Contribution to the phytochemical study nand antioxydant activity of phenolics compounds of *Quercus ilex* a *Fagaceae* In the region of Tlemcen West North of Algeria

2015 -2016

F E P S 2016 (PARIS) Joint meeting of the Federation of European Physiological Society and the French Physiological society June 29th o July 1st , 2016

Communication affichee« Contribution to the phytochemical study nand antioxydant activity of phenolics compounds of *Cistus salviaefolius* L a *Cistaceae* In the region of Tlemcen West North of Algeria

Publications

2011- 2012

Souad Sour, Meriem Belarbi, Darine Khaldi , Nassima Benmansour , Nassima Sari , Abdelhafid Nani, Farid Chemat and Francesco Visioli (2012) Argan oil improves surrogate markers of CVD in humans. *British Journal Of Nutrition* , Volume 107 , Issue 12 , 28 June 2012, Pp. 1800 - 1805 DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007114511004958>

2017-2018

D. Khaldi · M. Belarbi · I.A. El Hacı · F. Atik · W. Zerouh · F.Z. Ghanemi · A. Nani · A. Hichami (2018) Antioxidant Activity and Determination of Gallic Acid and Quercetin in *Osyris alba* L. Root Extract. The Root Oil Contains Essential Fatty Acids. *PHYTOTHERAPIE PHARMACOGNOSIE* DOI 10.3166/phyto-2018-0072

2021-2022

Fatima Zahra GHANEMI, Abdelhafid NANI, Danish PATOLI, Darine KHALDI, Zoubida MAMI, Meriem BELARBI(2022) Evaluation of the nutritional value and antioxidant activity of *Opuntia ficus indica* seeds in the western region of Algeria
Journal of Natural Product Research and Applications (JNPRA) J Nat Prod Res App 2022, 2 (1): 54-66 DOI: 10.46325/jnpra.v2i1.41

Etude phytochimique et activité antioxydante et antiulcéreuse d'*Osyris alba L Skeel* (Santalacées) de la région de Tlemcen

Résumé

Le travail présenté dans cette thèse contribue à la valorisation de l'écorce des racines de la plante *Osyris alba L Skeel* (Santalacées) en la caractérisant par son étude phytochimique et en recherchant deux activités biologiques qui sont l'effet antioxydant de leur composés phénoliques et l'activité antiulcéreuse de son extrait aqueux. La détermination quantitative des métabolites primaires a révélé des teneurs considérables en protéines brutes (21 ± 0.816 %), moyenne en sucres (13.76 ± 0.175 %) et en lipides (12.26 ± 0.205 %). Le dosage des polyphénols totaux par *Folin Ciocalteu* a donné des teneurs considérables en polyphénols totaux (371.67 ± 3.702 mg EAG /g ES). L'extraction sélective des flavonoïdes a montré que la fraction flavonoïde aqueuse présente le rendement le plus élevé (8.763 ± 0.416 %) et des faibles teneurs de la fraction éther di-éthyle (0.064 ± 0.009 %). L'enrichissement sélectif en tanins donne un bon rendement estimé à $3,98 \pm 0.561$ %. La recherche du profil phénolique par chromatographie à haute performance HPLC a marqué la présence de l'acide gallique et la quercétine. La Chromatographie Gaz Liquide CGL de l'huile a révélé sa richesse en acide oléique oméga 9 et des acides gras essentiels oméga-6 : l'acide linoléique et oméga3 : l'acide linoléique et l'acide eicosatriénoïque. L'évaluation de l'activité antioxydante par la capacité antioxydante totale CAT a montré que l'extrait des polyphénols totaux est les plus riches en espèces antioxydantes (8.815 ± 0.165 mg EAA). Ainsi, une forte capacité de piégeage du radical libre DPPH ($IC_{50} = 2.245 \pm 0.047$ µg/ml), un pouvoir de réduction des ions ferriques important ($IC_{50} = 22.565 \pm 1.108$ µg/ml) qui dépasse la vitamine C. Par ailleurs le test de blanchissement de la beta carotène a montré que la fraction acétate éthyle a présenté une forte capacité de rétention de la beta carotène avec un diamètre= 18.67 ± 0.235 mm suivie de la fraction n butanol (18.4 ± 0.634 mm) contre la Quercétine (21 ± 0.8164 mm). L'effet curatif du décocté sur l'ulcère gastrique, évalué in vivo chez les rats *Wistar* a montré un pouvoir cicatrisant avec un pourcentage d'inhibition PI estimé à 98.67 % qui dépasse la Ranitidine (standard). Ces résultats nous ont permis de valoriser *Osyris alba L Skeel* en tant que plante antioxydante et antiulcéreuse grâce à la présence des composés phénolique (acide gallique et la quercétine). De plus la présence des acides gras oméga-3 et -6 dans l'huile peut être exploité pour l'évaluation de son pouvoir anti-inflammatoire sur des modèles inflammatoires.

MOTS CLES: *Osyris alba L Skeel*, écorces des racines, polyphénols totaux, acide gras essentiel, activité antioxydante, décocté aqueux, pouvoir antiulcèreux, rat *Wistar*

Phytochemical study, Antioxidant and Antiulcer activity of *Osyris alba L Skeel* (Santalaceae) from the Tlemcen

Summary

The work presented in this thesis contributes to the valuation of the root bark of the plant *Osyris alba L Skeel* (Santalaceae) by characterizing it by its phytochemical study and by researching two biological activities which are the antioxidant effect of their phenolic compounds and the antiulcer activity of its aqueous extract. The quantitative determination of the primary metabolites, revealed considerable contents of crude protein ($21 \pm 0.816\%$), average in sugars ($13.76 \pm 0.175\%$) and in lipids ($12.26 \pm 0.205\%$). The determination of the total polyphenols by *Folin Ciocalteu* gave considerable contents of total polyphenols ($371.67 \pm 3.702\text{mg GAE / DE g}$). The selective extraction of the flavonoids showed that the aqueous flavonoid fraction presents the highest yield ($8.763 \pm 0.416\%$) and the low contents of the diethyl ether fraction ($0.064 \pm 0.009\%$). The selective enrichment in tannins gives a good yield estimated at $3.98\% \pm 0.561$. The search for the phenolic profile by *HPLC* indicated the presence of Gallic acid and Quercetin. Oil GPC revealed the presence of omega 9 oleic acid and omega 6 essential fatty acids: linoleic acid and omega 3: linolenic acid and eicosatrienoic acid.

The evaluation of the antioxidant activity by TAC showed that the extract of total polyphenols is the richest in antioxidant species ($8.815 \pm 0.165\text{mg AAE}$). Thus, a strong scavenging capacity of the free radical DPPH ($\text{IC}_{50} = 2.245 \pm 0.047\mu\text{g / ml}$), a significant ferric ion reduction power ($\text{IC}_{50} = 22.565 \pm 1.108\mu\text{g / mL}$) which exceeds vitamin C. Moreover, the bleaching test of β carotene showed that the ethyl acetate fraction exhibited a strong retention capacity of β carotene with a diameter = 18.67 ± 0.235 mm followed by the n butanol fraction ($18.4 \pm 0.634\text{mm}$) against Quercetin ($21 \pm 0.8164\text{mm}$). The curative effect of the aqueous extract on gastric ulcer, evaluated in Wistar rats, showed a wound healing power with an estimated percentage inhibition of 98.67% which exceeds the ranitidine (standard). These results have enabled us to promote *Osyris alba L Skeel* as an antioxidant and antiulcer plant which is due to the presence of phenolic compounds (Gallic acid and Quercetin). In addition, the presence of $\omega 3$ and $\omega 6$ fatty acids in the oil can be exploited for the evaluation of its anti-inflammatory power on inflammatory models.

KEY WORDS: *Osyris alba L Skeel*, root bark, total phenols, essential fatty acids, antioxidant activity, decocted, antiulcer power, rat *Wistar*

دراسة التركيبية الكيميائية والبحث عن القدرة المضادة للتأكسد والنشاط المضاد للتقرح المعدي لجذور نبتة البوحلة

اوزيريس البيا من عائلة الصندليات

تهدف الدراسة الى الكشف عن التركيبية الكيميائية والبحث عن القدرة المضادة للأكسدة للمركبات الفينولية المستخلصة من جذور النبتة وكذلك فعالية مغلي جذور كعلاج للتقرح المعدي المجرب عند الجرذان من فصيلة الوي ستار.

(12%) (13%) الدسم أظهرت التحاليل غنى الجذور من حيث مركبات الايض الاولي خاصة البيروتين (21%) والسكر في حين اثبت تحليل الطيف الضوئي غناه بالمركبات الفينولية المتعددة وبلغت التركيز (3.702±371.67 مكافئ لحمض الغاليك من غ من وزن المستخلص الجاف) بالنسبة لتحليل الكروماتوغرافيا لمستخلص البوبيفينول اثبتت وجود حمض الغاليك ومادة الفلافونويد من نوع كارسيئين كمركبات سائدة. اثبت تحليل الكروماتوغرافيا للزيت وجود معتبر للأحماض الدسمة الأساسية التي لا يستطيع الجسم تركيبها من نوع اوميغا 6 و اوميغا 3. فيما يخص البحث عن النشاط المضاد وكذلك إمكانية ارجاعها للشوارد للأكسدة اثبتت المركبات البوليفينولية قدرتها العلية لتثبيط الشق الحر الذي بي بي ايش الحديدية بتركيز اقل من تركيز فيتامين ج واثبت أيضا غناه بالمواد المضادة للتأكسد.

بعد اجراء التجارب على الجرذان اثبتت المستخلص المغلي الجذور قدرته الهائلة على شفاء الجروح الناتجة من المادة المستخدمة لأحداث التقرح على مستوى جدار المعدة وذلك اقتربت من 99%. يعزى هاذ النشاط المضاد للتقرح لوجود حمض الغاليك والكارسيئين المعروفين مرجعيا كجزينات مضادة للالتهاب والتقرح.

الكلمات لمفتاحية: التركيبية الكيميائية, متعدد الفينول, الحمض الدسمة, لقدرة المضادة الأكسدة, لقدرة المضادة للتقرح, مستخلص مغلي الجذور.

Liste des figures

Figure 1: Représentation schématique des différentes parties de l'estomac.....	5
Figure 2 : Couches histologiques formant la paroi stomacale gastrique	6
Figure 3 : Types des cellules gastriques sécrétrices	7
Figure 4 : Représentation de l'ulcère gastroduodéal	10
Figure 5 : Classification anatomo-pathologique des pertes de substance gastrique.....	10
Figure 6 : Structure chimique de base des polyphénols	21
Figure 7 : Voie de biosynthèse des composés phénoliques.....	22
Figure 8 Acides phénoliques typiques existant dans les aliments	25
Figure 9 Squelette du diphenylpropane (C6-C3-C6) et principales classes	26
Figure 10 : Structure chimique des tanins hydrolysables.....	28
Figure 11 : Structure chimique des tanins condensés.....	29
Figure 12 : Déséquilibre de la balance entre prooxydants et antioxydants	31
Figure 13 : Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes	32
Figure 14 : Sites de chélation des ions métalliques par les flavonoïdes.....	33
Figure 15 : Les différentes parties d' <i>Osyris alba</i> L	38
Figure 16 : les communes d'Aïn Ghoraba (49) et de Beni -Snouss (17) wilaya de Tlemcen. 42	
Figure 17 : les racines et la poudre des écorces des racines d' <i>Osyris alba</i> . L. Skeel	43
Figure 18 : Diagramme de screening des différentes familles chimiques.....	48
Figure 19: Diagramme de screening des différentes familles chimiques.....	49
Figure 20 : Diagramme de screening des différentes familles chimiques.....	50
Figure 21 : test de blanchissement de la beta carotène par la méthode de gélose.....	73
Figure 22 : A- Gavage ; B- Sacrifice ; C- Prélèvement ; D-sonde de gavage en inox.....	79
Figure 23 : Dosage des métabolites primaires au niveau des écorces.....	83
Figure 24 : Analyse du profil phénolique de l'extrait des polyphénols totaux (PT) des écorces des racines d' <i>Osyris alba</i> L Skeel par HPLC	89
Figure 25 : Composition en acide gras de l'huile extraite des écorces des racines d' <i>Osyris alba</i> L Skeel	91
Figure 26 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique CAT	99
Figure 27 : Courbe du piégeage du radical libre DPPH	101
Figure 28 : Courbe du piégeage du radical libre DPPH par les polyphénols totaux (PT).....	101
Figure 29 : Courbe du piégeage du radical libre DPPH par les tanins (TAN).....	102
Figure 30: Courbe du piégeage du radical libre DPPH par la fraction flavonoïde n-butanol	102

Figure 31 : Courbe du piégeage du radical libre DPPH par la fraction flavonoïde acétate d'éthyle (FVAE).....	103
Figure 32 : Courbe du piégeage du radical libre DPPH par la fraction flavonoïde aqueuse.	103
Figure 33 : Réduction des ions ferrique par les composés phénoliques.....	106
Figure 34 : Courbe de réduction des ions ferriques par l'acide ascorbique (AA).....	106
Figure 35 : Courbe de réduction des ions ferriques par les polyphénols totaux (PT)	107
Figure 36 : Courbe de réduction des ions ferriques par les tanins (TAN).....	107
Figure 37 : Courbe de réduction des ions ferriques par la fraction flavonoïde Acétate éthyl	108
Figure 38 : Courbe de réduction des ions ferriques par la fraction flavonoïde n-butanol.....	108
Figure 39 : Courbe de réduction des ions ferriques par la fraction flavonoïde aqueuse	109
Figure 40 : Rétention de la couleur de la beta carotène autour des puits contenant les antioxydants.....	112
Figure 41 : A- Estomac ulcéré par le mélange alcool/HCl B-Estomac ulcéré et traité par l'extrait des écorces des racines d'Osyris alba L	113
Figure 42 : Sites de liaison de la quercétine dans la structure cristalline de M3, pompe à protons gastrine et récepteur H2 modélisé	118

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Les principales classes des composés phénoliques	23
Tableau 2 : Principales classes et structure des flavonoïdes	27
Tableau 3 : Activités biologiques de quelques composés phénoliques.....	30
Tableau 4 : Résultats des tests phytochimiques des racines d' <i>Osyris alba L Skeel</i> (Santalacée)	82
Tableau 5 : dosage des Teneurs en polyphénols totaux (PT), en flavonoïdes totaux (FT) et en tanins condensés (TC), au niveau des écorces des racines.....	86
Tableau 6 : Extractions selectives des flavonoïdes et des tanins au niveau des écorces des racines d' <i>Osyris alba L Skeel</i>	87
Tableau 7 : Composition en acides gras de l'huile extraite des écorces des racines d' <i>Osyris</i> <i>alba L Skeel</i>	92
Tableau 8 : Capacité. Antioxydante. Totale (C.A.T) des composés phénoliques extraits des écorces des racines d' <i>Osyris. alba L Skeel</i> exprimée en mg EAA/g MS.....	99
Tableau 9 : Piégeage du radical libre D P P H et pouvoir anti radicalaire des composés phénoliques extraits d'EROA exprimée en EC ₅₀	104
Tableau 10 : Pouvoir de réduction des ions ferriques (F.R. A. P) des composés phénoliques extraits d'EROA exprimée en EC ₅₀	110
Tableau 11 : Pouvoir de rétention de la beta carotène par les composés phénoliques extraits des écorces des racines d' <i>Osyris alba L Skeel</i> exprimée en ϕ d.....	111
Tableau 12 : Activité antiulcéreuse de l'extrait aqueux (le décocté) des écorces des racines d' <i>Osyris alba L Skeel</i>	115

Liste des abréviations :

Ab : Absorbance
AE : Acétate Ethyle
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire
ACG : Acide Gallique
AGE : Acide Gras Essentiel
AGIS : Acide Gras Insaturés
AGMI : Acide Gras Mono Insaturés
AGPI : Acide Gras Poly Insaturés
AGS : Acide Gras Saturés
AINS : Antis Inflammatoires Non Stéroïdiens
ALA : Acide α Linoléinique
Aln : Alanine
ANES: The American National Election Studies
AQ : Aqueuse
Asn : Asparagine
ISSFAL: International Society for the Study of Fatty Acid and Lipid
BUT : N-Butanol
C.A.T: Capacité Antioxydante Totale
CAT : Catalase
C-HDL : Cholestérol De Haute Densité
C-LDL : Cholestérol De Faible Densité
CoA: Coenzyme A
COX: Cyclo oxygenase
C-T: Cholesterol Total
DAD: Diode Array Detector
DHA: Acide Docosahexaénoïque
DISC: Death Inducing Signal Complex
D.P.P.H: Diphenyl Picryl Hydrazyl
EAA : Equivalent Acide Ascorbique
EAG : Equivalent Acide Gallique
ECAT : Equivalent Catéchine
ECL: Entero-Chromaffin-Like
ED: Ether Diethyl
EPA: Acide Eicosapentaénoïque
EPII : enzymes de phase deux
ERO: espèces réactives oxygènes
ES: Extrait Sec
ETA: acide eicosatriénoïque
ETH: éthanol
F.R. A. P: Ferric Reducing Antioxidant Power
GLC: Gaz Liquid Chromatography
Glu : Glutamine
GSH : Glutathion
HO-1: Hème Oxygenase-1
HPLC: High Performance Liquid Chromatography
M3 : Récepteur Muscarinique
MS : Matière Sèche
Nrf2 : Facteur Nucléaire de Transcription Erythroïde Reliée Au Facteur 2
OPDQ : Ordre Professionnel Des Diététistes Du Québec
P450: Cytochrome P450
PGE2 : Prostaglandine E2
PI : Pouvoir Inhibition
PR : Pouvoir de Réduction
Pro : Protéines
PT : Polyphénols Totaux

PU : Pouvoir Ulcéreux
QEC : Quercétine
RNS: Reactive Nitrogen Species
ROS: Reactive Oxygen Species
SOD: Super Oxide Dismutase
TAN: Tanins
TC: Tanins Condensés
TNF α : Tumor Necrosis Factor
UG: Ulcère Gastrique
Vitamine C : Acide DL -+Ascorbique

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

DEDICACE

RESUMES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABBREVIATIONS

INTRODUCTION 1

PARTIE I SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : L'estomac et l'ulcère gastrique.....2

I. Généralités..... 2

1. Anatomie..... 2

2. Physiologie..... 7

II. Ulcère gastrique 9

1. Définition 9

2. Epidémiologie 11

3. Symptômes et complications 11

4. Causes 12

5. Physiopathologie..... 14

6. Traitement 17

Chapitre 2 : Les composés phénoliques substances bioactives des plantes 19

1. Généralités 20

2. Biosynthèse des polyphénols..... 21

3. Classification des polyphénols 22

3.1. Acides phénoliques C₆-C₁ / C₆-C₃..... 24

3.2. Flavonoïdes C₆-C₃-C₆ 25

3.3. Les tanins 27

4. Les activités biologiques des polyphénols..... 29

4.1. Activité antioxydante des polyphénols 31

4.2. Activité antiulcéreuse..... 34

Chapitre 3 : Généralités sur la plante étudiée : *Osyris alba L Skeel (Santalacées)*.....

I. Introduction	36
2. Caractère botanique	36
3. Habitat et Caractère édaphique	38
4. Usages.....	39
4.1. Usage thérapeutique	39
4.2. Usage ménager et industriel	39

PARTIE II PARTIE EXPERIMENTALE

I. Matériel biologique étudié.....	42
II. Méthodes d'analyses	44
A. Etude phytochimique.....	44
1.1 Tests phytochimiques	44
2. Dosage des métabolites primaires	51
2.1 L'humidité (teneur en eau).....	51
2.2. Lipides totaux	52
2.3. L'azote total et les protéines brutes.....	52
2.4. Les sucres totaux.....	55
2.5 Les cendres	57
2.6 Les fibres alimentaires	58
3. Dosage des métabolites secondaires.....	60
3.1 Dosage des composés phénoliques	60
3.2 Extraction sélective des tanins	65
4. Analyses chromatographiques	66
4.1. Détermination de la composition en acides gras par chromatographie en phase gaz - liquide (CGL).....	66
4.2. Analyse chromatographique du profil phénolique des extraits des écorces des racines <i>d'Osyris alba L. Skeel</i> par la chromatographie liquide à haute performance HPLC-PDA ..	67
B. Activités Biologiques in vitro/in vivo.....	68
1. Evaluation du pouvoir antioxydant des composés phénoliques <i>in vitro</i>	68
1.1. Capacité Anti-oxydante Totale (CAT).....	68
1.2. Piégeage du radical libre DPPH.....	69
1.3. Réduction des ions ferriques F.R.A.P	71
1.4. Test de blanchiment de la beta carotène	72

2. Activité antiulcéreuse gastrique chez le rat <i>Wista rin vivo</i>	74
2.1. Préparation de l'extrait et de la solution standards	74
2.2. Préparation des animaux d'expérimentation	75
2.2.1. Préparation des animaux	76
2.2.2. Constitution des lots et Induction d'ulcère par gavage	76
2.2.3. Prélèvement des estomacs et cotation des ulcérations	77

PARTIE III RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre I : Etude phytochimique d' <i>Osyris alba L</i> (Santalacées)	81
1. Introduction.....	81
2. Détermination du taux de matière sèche.....	81
3. Tests phytochimiques	82
4. Dosage des métabolites primaires	83
5. Dosages des métabolites secondaires	84
5.1. Rendement et analyse spectrophotométrique des composés phénoliques	84
5.2. Extractions sélectives et rendements des composés phénoliques	87
6. Analyses Chromatographiques	88
6.1. Chromatographie liquide à haute performance HPLC-PDA du profil phénolique....	88
6.2. Détermination de la composition en acides gras par chromatographie en phase gaz-liquide (CGL).....	91
Chapitre II : Activites biologiques des écorces des racines d' <i>Osyris alba L skeel</i>	98
1. Evaluation du pouvoir antioxydant des composés phénoliques(<i>in vitro</i>)	98
1.1 Capacité antioxydante totale CAT	98
1.2. Piégeage du radical libre DPPH.....	100
1.3. Réduction des ions Ferriques F.R.A.P	105
1.4. Test de blanchiment de β -carotène.....	110
2. Pouvoir cicatrisant de l'ulcère gastrique provoqué chez le rat <i>Wistar</i> par le décocté des racines d' <i>Osyris alba L Skeel (in vivo)</i>	113
CONCLUSION GENERALE.....	125
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	129
ANNEXES.....	174

Introduction

L'ulcère gastrique est l'un des désordres gastro-intestinaux ; caractérisé par la rupture de l'intégrité de la muqueuse de l'estomac. Cette altération est favorisée par une diminution des facteurs de défense et de cyto-protection de la barrière muqueuse (mucus, épithélium de surface, bicarbonate, et prostaglandine), en faveur des facteurs d'agression (sécrétion acide et peptique) (**Gimenez et al, 2000**). Il s'agit d'une perte de substance qui se traduit par l'interruption de la muqueuse et de la musculature associée à des lésions vasculaires et à une hypertrophie nerveuse (**Labayle et al, 2001 ; Vinod et al, 2010**).

L'incidence de l'ulcère gastro-duodéal est augmentée en raison de divers facteurs notamment le stress, le tabagisme, l'alcool, l'infection par *Helicobacter pylori*, et l'ingestion de médicament anti-inflammatoire non stéroïdiens (**Marieb, 2008 ; Ignatius et al., 2012 ; Makhlouf, 2014**). Cette pathologie est de plus en plus fréquente en Algérie, selon une étude menée par **Metoughi (2008)**, 90% d'Algériens risquent un ulcère de l'estomac. A ce stade, il s'agit carrément d'un problème de santé publique. Les spécialistes en gastro-entérologie tirent la sonnette d'alarme, car selon eux, cette pathologie pourrait devenir la maladie du siècle.

Selon la littérature, l'abondance des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'autres radicaux libres dans le corps déclenche le développement de cette maladie de façon grave. Les concentrations intracellulaires de ROS sont généralement modulées et piégées par le système de défense antioxydant des cellules gastriques (**Bland, 1995 ; Yildirim et al, 2007 ; Tohma et Glucin, 2010**).

Plusieurs médicaments ont été utilisés pour le traitement de l'ulcère gastrique tels que les inhibiteurs de la pompe à protons, les antagonistes des récepteurs H₂, les anti-acides, l'éradication de *H.pylori* et les analogues des prostaglandines (**Viana et al, 2013**).

L'échec du traitement pharmaceutique conventionnel de l'ulcère gastrique par les pansements gastriques, les antiacides, les anti-sécrétoires et les antibiotiques et de la forte incidence des effets secondaires indésirables qui leur sont associés font qu'une large tranche de la population des ulcéreux dépend essentiellement des plantes médicinales connue sous le nom de la médecine douce naturelle complémentaire ou parallèle (**Gordon et al 2002 ; Marc, 2007; Lawrance et al, 2009**).

Pour cette raison que les plantes médicinales ont rapidement émergées comme un traitement alternatif aux médicaments antiulcéreux conventionnels (**Jothi et al, 2012**).

Ainsi, les extraits végétaux font partie des sources les plus attrayantes pour la production de nouveaux médicaments plus efficaces et moins toxiques (**Alkofahi et Atta, 2002**). De même, il a été démontré qu'ils produisent des résultats prometteurs pour le traitement de l'ulcère gastrique (**Chopra et al, 1956 ; Pillai et al, 1978 ; Garg et al, 1993 ; Akhtar et Ahmed, 1995**). Ces effets sont dus principalement aux antioxydants synthétisés par les plantes, dont les composés phénoliques qui représentent l'une des familles majeures à savoir, les acides phénoliques, les flavonoïdes, les anthocyanes, et les tanins (**Lee et al, 2004a**). Aussi, certaines études ont montré que les propriétés anti-inflammatoires et anti-ulcéreuses des médicaments traditionnels à base de plantes médicinales (préparé sous forme de *TISANE*) étaient souvent liées à la présence de composés phénoliques (**Dawidowicza et al, 2006**).

Dans le but de la recherche de plantes dotées de propriétés biologiques intéressantes notamment : le pouvoir antioxydant et l'activité antiulcéreuse, le choix des plantes à étudiées est basé sur leur emploi en médecine traditionnelle. Une plante de la famille des *Santalacées*, à intérêt thérapeutique confirmé (**Iwashina, 2008**), a été choisie :

Le Rouvet blanc *Osyris alba*. *L Skeel* connue chez les habitants de la région montagneuse de Eyn Ghoraba et de Béni Snouss au niveau de la Wilaya de *Tlemcen* sous le nom de *Gossatt Elmeiza* ou *Temertghit*. Les écorces des racines de cette plante sont consommées sous forme de tisanes pour traiter les inflammations de tube digestif et pour le traitement de la faiblesse générale et l'anémie.

Compte tenu du caractère héli-parasitaire d'*Osyris alba*, de nombreux ouvrages ont évoqué le mécanisme parasitaire ainsi que l'anatomie de la partie responsable de son comportement semi-parasitaire (**Quezel et Santa ,1963 ; Ozenda ,1991**).

Dans le présent manuscrit, nous commençons par une synthèse bibliographique présentant l'anatomie et la physiologie de l'estomac ainsi que l'ulcère gastrique, son épidémiologie, ses symptômes, ses causes et éventuellement son traitement. Nous poursuivons en décrivant l'intérêt des composés phénoliques et les substances bioactives des plantes. Enfin, nous présentons la plante étudiée *Osyris alba* et nous mettons en exergue les travaux faits sur ses usages thérapeutiques. Les parties matériels et méthodes, résultats et discussion, seront présentées respectivement dans les chapitres suivants. Nous terminons par une conclusion générale et nous proposerons des perspectives à ce modeste travail.

Synthèse Bibliographique

I. Généralités

L'estomac est un renflement du tube digestif en forme de J majuscule. Il est situé directement sous le diaphragme dans la région gauche de l'abdomen. Il est relié à son entrée à l'œsophage et à sa sortie au duodénum, qui est le premier segment de l'intestin grêle (**Tortora et Derrickson, 2010**). Il constitue, toutefois, la partie la plus large du tube digestif et peut recevoir une quantité considérable de nourriture (**Sherwood, 2000**). Ses dimensions varient en fonction des individus et des repas mais en moyenne il mesure 25 cm de long, 10-15 cm de large et peut contenir 2 à 4 litres de nourriture et de liquide quand il est au maximum (**Silverthorn, 2007 ; Marieb, 2008**).

L'estomac joue le rôle d'une zone de stockage de la nourriture où elle est retenue et malaxée (**Tortora et Derrickson, 2010**). C'est à son niveau que s'initie le processus de digestion notamment des protéines grâce à la sécrétion de *pepsine*. Une fois arrivée à l'estomac, le bol alimentaire est transformé en bouillie appelée *chyme* qu'il évacuera dans le duodénum selon un débit contrôlé (**Marieb, 2008**).

1. Anatomie

D'un point de vue anatomique l'estomac comprend cinq grandes régions : le *Cardia*, le *Fundus*, le *Corps de l'estomac*, l'*Antre pylorique*, et le *Pylore* (**Tortora et Derrickson, 2010**). Le *Cardia* (ainsi nommée en raison de sa proximité avec le cœur) entoure son orifice. Le *Cardia* permet l'entrée des aliments, provenant de l'œsophage, dans l'estomac, il est muni d'un système anti-reflux (**Sherwood, 2000 ; Marieb, 2008**). Il possède une activité contractile et sécrétrice très faible (**Canon, 2016**).

L'estomac se recourbe ensuite vers le haut, la partie qui se situe à gauche et au-dessus du cardia, en forme de dôme, est le *Fundus*. Au-dessous de ce dernier se trouve la partie centrale et la plus volumineuse de l'organe, le *Corps de l'estomac* (**Lacour et Belon, 2015**).

Le *Fundus* et le *Corps de l'estomac*, partie verticale, servent de réservoir des aliments et constituent la principale zone sécrétrice de l'estomac (**Canon, 2016**).

L'*Antre pylorique*, partie horizontale, constitue la principale zone contractile où se produisent le broyage et le mélange des aliments avec les sécrétions gastriques.

La région étroite au bas, qui fait la jonction avec le duodénum, est le *Pylore* (*pylê*: porte; *ourôs*: gardien). Ce dernier communique avec le duodénum par le sphincter pylorique. La face latérale convexe de l'estomac est appelée *grande courbure de l'estomac* et sa face médiale

concave, *petite courbure de l'estomac* (Tortora et Derrickson, 2010 ; Canon, 2016) (Figure 1)

A quelques particularités histologiques près, la paroi de l'estomac comprend de la lumière gastrique vers l'extérieur, les mêmes quatre grandes couches caractéristiques du tube digestif ; la muqueuse, le sous-muqueuse, la musculuse, et la séreuse (Tortora et Derrickson, 2010) (Figure 2).

La muqueuse, la couche la plus profonde, est une membrane humide qui tapisse la cavité, ou la lumière de l'organe. Elle est formée d'un *épithélium de revêtement*, ainsi que d'une quantité de tissu conjonctif appelée le *chorion (lamina propria)* contenant des capillaires sanguins permettant de nourrir l'épithélium et d'absorber les nutriments (Marieb, 2008 ; Tortora et Derrickson, 2010). Il contient également des fibres nerveuses, ainsi que des vaisseaux lymphatiques et d'une mince couche de cellules musculaires lisses (*muscularis mucosæ*), qui par sa contraction crée des replis au niveau de la muqueuse, ce qui augmente la surface de digestion et d'absorption (Marieb, 2008 ; Tortora et Derrickson, 2010).

Ce qui caractérise la muqueuse de l'estomac du reste de tube digestif, est la présence de millions d'invaginations appelés *cryptes* de l'estomac (Figure 2), qui se prolongent jusqu'aux glandes gastriques dans lesquelles sont présentes des cellules sécrétrices, spécialisées sécrétant différentes enzymes et hormones (Canon, 2016).

En effet, les glandes gastriques contiennent trois types de cellules exocrines, dont les sécrétions se jettent dans la lumière de l'estomac (Figure 3).

Les cellules à mucus superficielles et les cellules à mucus du collet secrètent du mucus qui couvre et protège la cavité de l'estomac contre l'acidité (Marieb, 2008 ; Canon, 2016).

Les cellules principales secrètent une enzyme digestive inactive appelée pepsinogène.

Les cellules pariétales produisent de l'acide chlorhydrique qui est sécrété par des digitations, les canalicules sécrétoires, comprenant des pompes à protons (Silverthorn, 2007). L'acide chlorhydrique tue de nombreux microorganismes présents dans les aliments et aide à convertir la pepsinogène en sa forme active la pepsine. Les cellules pariétales secrètent également le facteur intrinsèque (une glycoprotéine) indispensable à l'absorption de la vitamine B₁₂ par l'intestin grêle (Marieb, 2008).

Les cellules endocrines des glandes gastriques sont représentées principalement par les *cellules G* sécrétant la *gastrine* dans la circulation sanguine (**Figure 3**) ; cette hormone influe sur plusieurs aspects de l'activité gastrique et stimule encore d'avantage les glandes gastriques (**Lacour et Belon, 2015**) ; elle active les *cellules entérochromaffines ECL* (*entérochromaffin-like*) qui libèrent l'histamine, principal stimulant de la sécrétion d'acide gastrique, via les cellules pariétales (**Beaugerie et al, 2014**).

Les cellules D existantes dans l'antra pylorique et le fundus (**Figure 3**) sécrètent la *somatostatine* ; un puissant inhibiteur de la pepsine et de la gastrine, de plus la somatostatine est responsable du rétrocontrôle et de l'inhibition des cellules pariétales productrices de HCl (**Pearson et Hutton, 1998 ; Rhoades et Tanner, 2005 ; Marieb, 2008 ; Balas, 2010 ; Bazin et Lamarque, 2018**).

Ensemble, les sécrétions des différentes cellules de la muqueuse gastrique forment *le suc gastrique* (**Marieb, 2008**).

La sous-muqueuse, relie la muqueuse à la musculuse, est située juste à l'extérieur de la muqueuse. C'est une couche de tissu conjonctif lâche contenant des vaisseaux sanguins, des neuro-fibres, des follicules lymphatiques et des vaisseaux lymphatiques (**Tortora et Derrickson, 2010**).

La musculuse possède trois couches de tissu musculaire lisse, une couche oblique interne permettant le brassage et le pétrissage du chyme, une couche circulaire permettant par leur contraction, la diminution du diamètre du tube, et une couche longitudinale externe.

La séreuse ou péritoine est la tunique externe de la paroi, elle est formée de tissu conjonctif lâche, recouvert d'une seule couche de cellules aplaties composant le péritoine viscéral. Celui-ci est réuni au péritoine pariétal, lisse et luisant (**Marieb, 2008 ; Tortora et Derrickson, 2010**) (**Figure 1, Figure 2**).

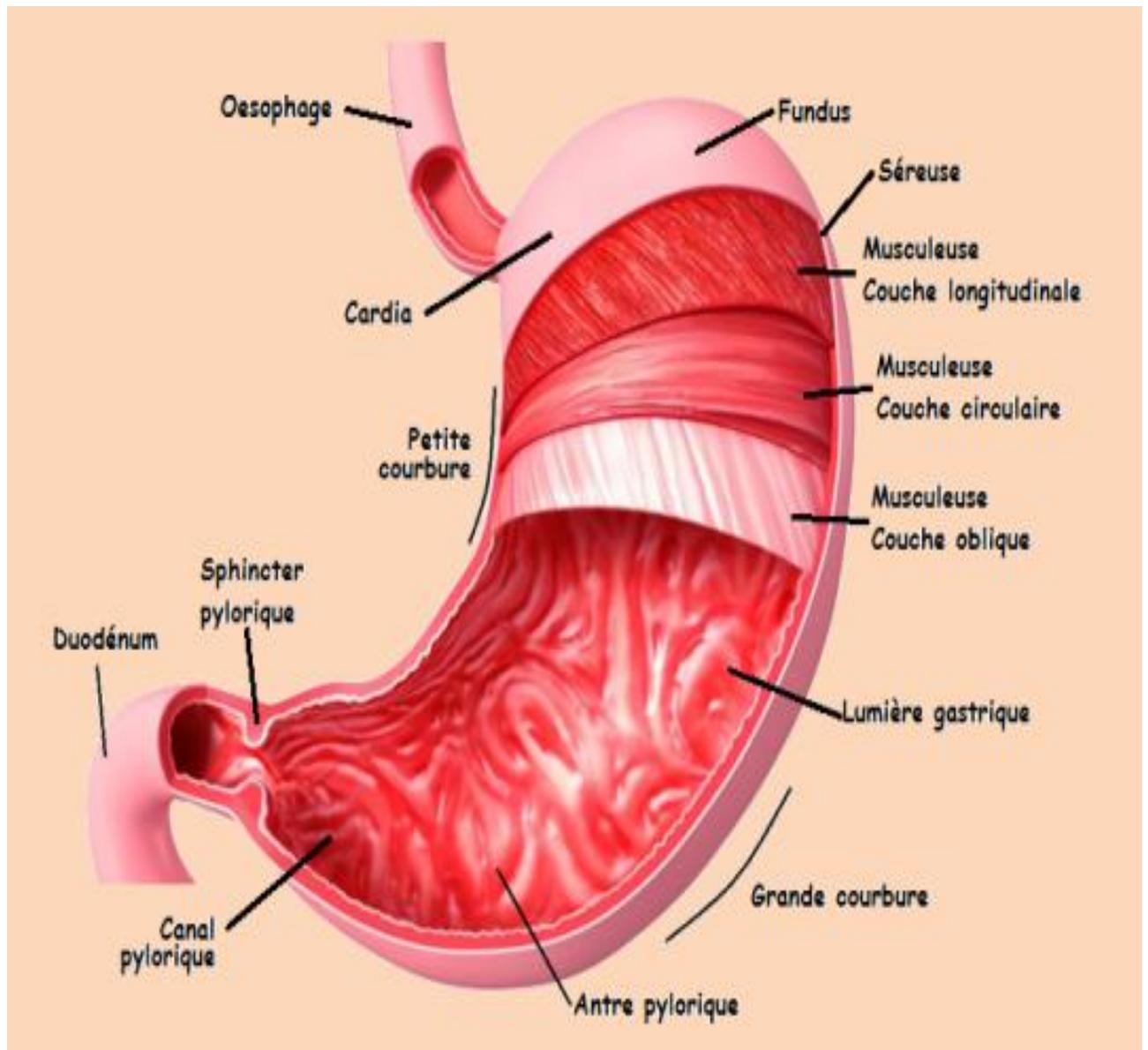


FIGURE 1: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES PARTIES DE L'ESTOMAC
(CANON, 2016)

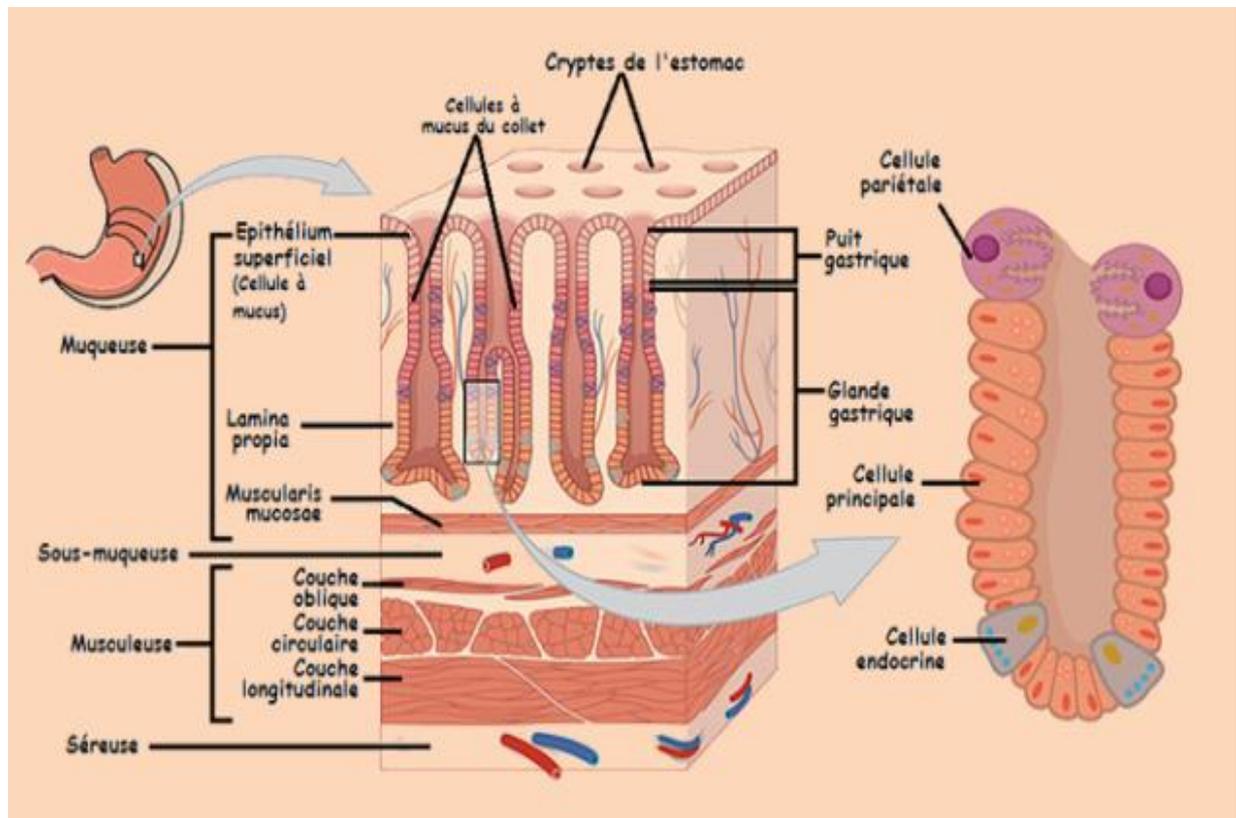


FIGURE 2 : COUCHES HISTOLOGIQUES FORMANT LA PAROI STOMACALE GASTRIQUE
(CANON, 2016)

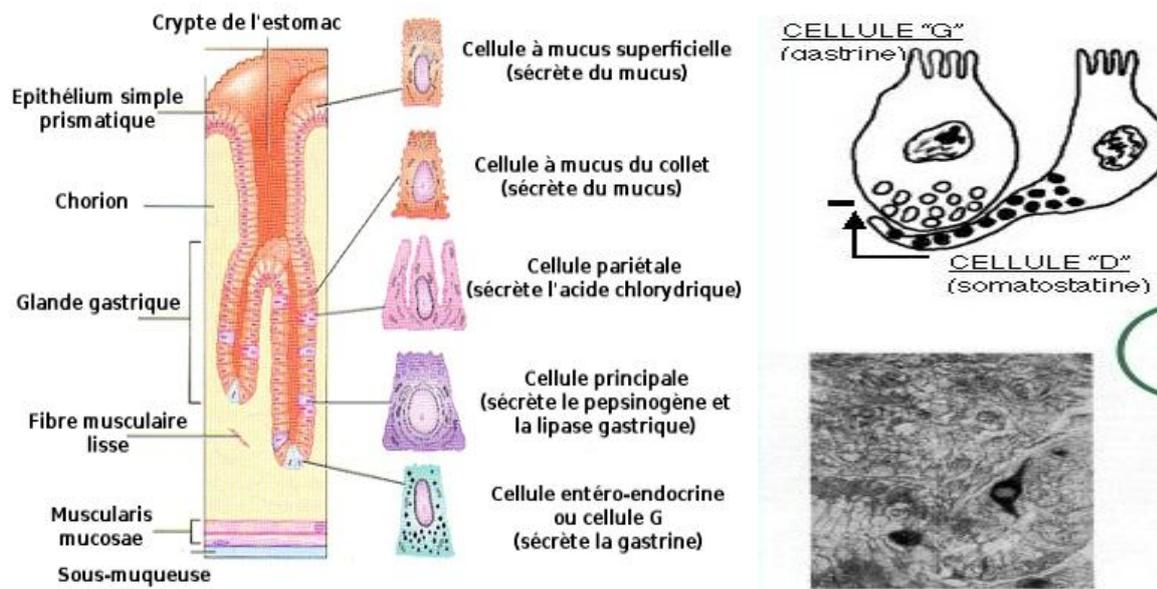


FIGURE 3 : TYPES DES CELLULES GASTRIQUES SECRETRICES (BALAS, 2010)

2. Physiologie

L'estomac est responsable de la sécrétion quotidienne de 1 à 3 litres de suc gastrique. Ce dernier est un liquide incolore, limpide et acide (pH compris entre 1,5 et 2,5) (**Lacour et Belon, 2015**) et il est principalement constitué de substances minérales et organiques.

L'activité sécrétrice de l'estomac est liée, à la présence de différents types de cellules au niveau des glandes gastriques existantes dans la muqueuse gastrique (**Silverthorn, 2007 ; Canon, 2016**).

Il y a deux zones sécrétrices :

La zone glandulaire gastrique, située au niveau du *Fundus*, qui est le territoire de la sécrétion acide et de la présence de nombreux composés notamment : la pepsinogène, la pepsine ; le mucus couche muco-protectrice protégeant et recouvrant de la muqueuse gastrique et favorisant le glissement du bol alimentaire ; l'acide chlorhydrique produit par la membrane apicale des cellules pariétales, via l'ATPase H^+/K^+ ou pompe à protons (**Silbernagl et Despoulos, 2001**). L'acide chlorhydrique agit comme désinfectant contre les bactéries et les phénomènes de vomissement ; les prostaglandines produites par les cyclo-oxygénases des cellules immunitaires, ayant une action protectrice de l'estomac contre les agressions de sécrétion acide ; la motiline agissant au niveau de la mobilité de l'estomac, et l'histamine agent conduisant à la sécrétion acide (**Scherwood, 2000 ; Salena et Hunt, 2005**).

La zone glandulaire pylorique qui est le territoire de la sécrétion non acide dont la gastrine (enzyme protéolytique) est le principal composé sécrété (**Scherwood, 2000**).

La régulation de la sécrétion de suc gastrique est régie par des facteurs nerveux et hormonaux. La vue, l'odeur, et le goût des aliments déclenchent des réflexes de la partie parasympathique du système nerveux autonome, qui induisent l'inhibition ou la stimulation de la sécrétion gastrique (**Chevallier, 2005 ; Marieb et Hoehn, 2010**).

Le nerf pneumogastrique, l'acétylcholine, la gastrine et l'histamine interviennent dans la stimulation de la sécrétion gastrique. Par contre, les prostaglandines, la somatostatine et la sécrétine sont des inhibiteurs de la sécrétion gastrique (**Martin, 2001 ; Kierszenbaum, 2006 ; Lacour et Belon, 2015**).

La muqueuse gastroduodénale saine est capable de résister à des agressions tant endogènes qu'exogènes. Cette tolérance est le fait de protection naturelle grâce à un système de défense connu sous le nom de la barrière muqueuse (**Keita, 2005**).

La barrière muqueuse est constituée de l'association du film de mucus et de la sécrétion de bicarbonates. Le mucus empêche le passage des enzymes protéolytiques et la diffusion des ions H⁺ de la lumière dans la muqueuse gastrique, se présente sous forme d'un gel insoluble et adhérent à l'épithélium superficiel. La sécrétion des bicarbonates permet de maintenir la quasi-neutralité à la surface des cellules. Les cellules épithéliales superficielles ont une durée de vie de trois à quatre jours et doivent se renouveler continuellement pour maintenir l'intégralité du revêtement (**Gimenez et al, 2000**).

La barrière muqueuse est protégée par les prostaglandines qui assurent la cytoprotection de la muqueuse par le biais de récepteurs spécifiques, participant au maintien du flux sanguin muqueux, en conservant l'intégrité de la barrière muqueuse gastrique et l'adaptation des cellules épithéliales en réponse aux agents agressifs (**Keita, 2004 ; Dine et al, 2008**). Elles diminuent la sécrétion acide, elles favorisent la sécrétion mucus et des bicarbonates, elles augmentent les capacités de ré-épithélialisation de la muqueuse gastrique.

Un déséquilibre de cette balance envers l'un des plateaux, qui est causé par une augmentation de l'agression acide ou une diminution de la résistance de la muqueuse gastrique, pourrait être responsable de l'apparition d'une ulcération. Ainsi, l'ulcère gastrique (UG) se produit quand les facteurs agressifs dominent les facteurs protecteurs (**Gimenez et al, 2000**).

II. Ulcère gastrique

1. Définitions

L'ulcère gastrique est une pathologie évolutive qui désigne un ensemble d'affections ulcéreuses de la partie supérieure du tube digestif touchant essentiellement l'estomac, et dans lesquels la participation de l'acide et de la pepsine dans leur pathogénie est fondamentale (**Gimenez et al, 2000 ; Marieb, 2008**). Constituant une affection très fréquente, il a été individualisé par Cruveilhier en 1829 (**Morain, 1969**).

Dans 98% des cas, les ulcères gastriques apparaissent dans la partie pylorique (**Figure 4**) de l'estomac, et qui sont souvent localisés au niveau de la petite courbure gastrique (*angélus*). (**Gimenez et al, 2000 ; Marieb, 2008**).

L'ulcère gastrique est l'un des désordres gastro-intestinaux ; caractérisé par la rupture de l'intégrité de la muqueuse de l'estomac évoluant par des poussées séparées et par des périodes de rémission plus ou moins longues (**Ferec, 2008**). Cette altération est favorisée par une diminution des facteurs de défense et de cyto-protection de la barrière muqueuse (mucus, épithélium de surface, bicarbonate, et prostaglandine), en faveur des facteurs d'agression (sécrétion acide et peptique) (**Gimenez et al, 2000**). De plus, il s'agit d'une perte de substance qui se traduit par l'interruption de la muqueuse et de la musculature associée à des lésions vasculaires et à une hypertrophie nerveuse (**Labayle et al, 2001**). Cette perte de substance est de taille variable (2 à 20 mm), généralement de forme ovalaire ou arrondie (**Bigard, 1999**), creusant la paroi gastrique atteignant en profondeur la musculature qui est tapissée par un enduit fibrino leucocytaire ou cruorique reposant sur un bloc scléro-inflammatoire d'aspect différent selon l'âge de l'ulcère, et pouvant atteindre la séreuse (perforation) (**Salducci et al, 2005 ; Ferec, 2008**).

L'ulcère se manifeste par des abrasions (**Figure 5**) qui détruisent la partie superficielle des cryptes et l'érosion détruisant les cryptes et les glandes, ce sont des lésions limitées à la muqueuse, et des ulcérations qui atteignent la sous muqueuse; bien que l'ulcère ne soit pas une maladie mortelle, il peut mener à des complications plus sérieuses comme saignement gastro-intestinal, perforation, sténose du pylore, hémorragie ulcéreuse, douleurs abdominales aiguës, inhibition de la respiration (**Louvet, 2010**), conduisant à l'ulcère chronique (**Figure 5**) qui est induit par l'exposition de la muqueuse altérée à l'acide chlorhydrique et de la pepsine et/ou par la prédominance des anomalies de défense et de réparation de la muqueuse (**Oberdiaca et Mineur, 2010**).

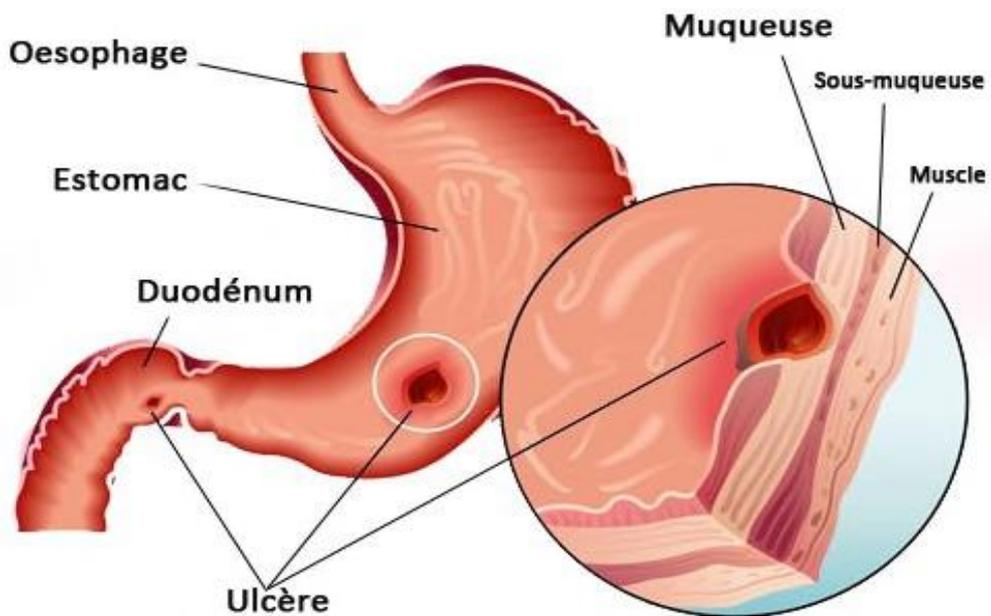


FIGURE 4 : REPRESENTATION DE L'ULCERE GASTRODUODENAL (LACOUR ET BELON, 2015)

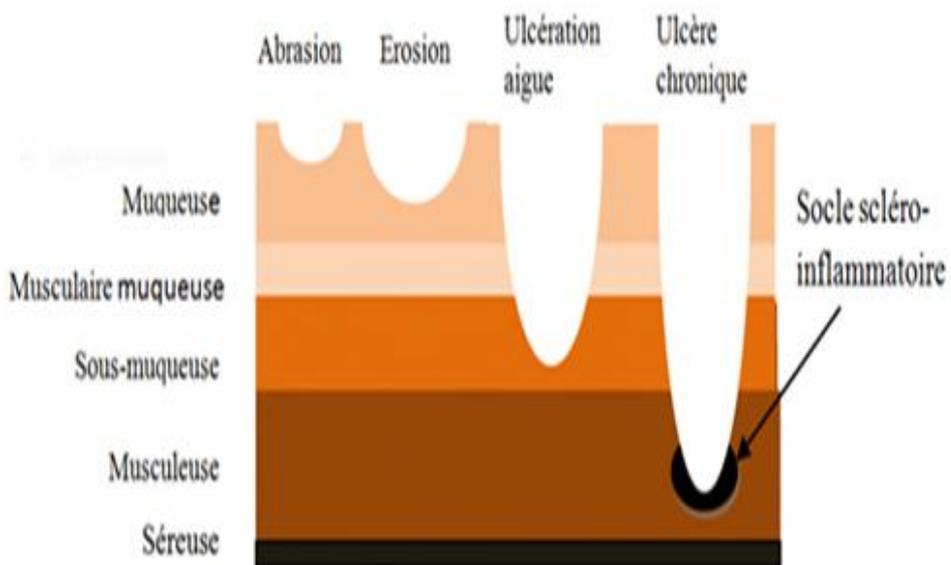


FIGURE 5 : CLASSIFICATION ANATOMO-PATHOLOGIQUE DES PERTES DE SUBSTANCE GASTRIQUE

(AZIZ ET AL, 2012)

2. Epidémiologie

L'ulcère gastrique est l'un des problèmes gastro-intestinaux les plus largement reconnus, qui a une prévalence élevée chez l'homme, en particulier chez les habitants des pays en développement (**Lavanya et al ,2012**). L'ulcère gastro-duodéal, avec ses rémissions et ses exacerbations, représente un problème de santé publique (**Smith et al 2002 ; Tanih et al, 2010**). Selon la littérature, il a été reporté qu'environ 10 % de la population adulte dans le monde développera un ulcère peptique (**Marieb, 2008 ; Porth et Grossman, 2013 et Makhloof, 2014**).

Certains auteurs admettent que 2 à 5% des hommes en sont atteints à un moment quelconque de leur existence. Dans certaines professions, Nous avons pu déceler la présence d'ulcère chez 18% des sujets (**Morain, 1969**). De plus, c'est une affection chronique récidivante, extrêmement fréquente, à nette prédominance masculine (**Safar et al, 1985**).

Selon l'**OPDQ (2016)** l'ulcère de l'estomac apparaît en général après 60 ans, chez la femme en majorité. Les ulcères du duodénum apparaissent, eux, entre 30 et 50 ans et touchent davantage les hommes. La survenue à long terme d'ulcères gastro-intestinaux ou duodénaux présente un risque maximal de cancer de l'estomac. Il a été rapporté que l'ulcère gastrique est plus fréquente chez les patients atteints de cirrhose du foie, de diabète sucré de type 2 et de troubles de santé mentale.

Ce mal est de plus en plus fréquent en Algérie, selon une étude menée en **2008**, 90% d'Algériens risquent un ulcère de l'estomac. A ce stade, il s'agit carrément d'un problème de santé publique. Les spécialistes en gastro-entérologie tirent la sonnette d'alarme, car selon eux, cette pathologie pourrait devenir la maladie du siècle (**Metoughi ,2008**).

3. Symptômes et complications

Le syndrome ulcéreux typique est représenté de façon caractéristique par une douleur épigastrique, violente, à type de crampe, de brûlures, parfois sourde à type de tension abdominale, de barre gastrique et de pesanteur ou de sensation de faim. Elle survient après le repas en « postprandiale » semi-précoce (1h à 1 heure 30min) ou tardive (3h à 5 heures), et réveille parfois le patient la nuit. Cette douleur a pour caractéristique d'être soulagée en quelques minutes par l'alimentation et les antiacides. Des formes atypiques sont possibles et se caractérisent par une différenciation dans l'intensité de la douleur, son caractère, sa localisation et sa périodicité (**Keita, 2005 ; Marieb, 2008**).

Les autres symptômes de l'ulcère comprennent le manque d'appétit, les éructations, les nausées et les vomissements. Cependant, l'ulcère ne se manifeste pas toujours par ces symptômes et peut même demeurer asymptomatique (**Marieb, 2008**). Les ulcères gastroduodénaux peuvent entraîner de graves complications dont la plus courante est l'hémorragie et l'anémie (**Tortora et Derrickson, 2010**). Dans environ 20% des cas, le sang s'écoule des vaisseaux sanguins endommagés et se répand dans le tube digestif, causant une hématomèse (vomissement de sang) et un méléna (évacuation du sang noir par l'anus) ce qui provoque une anémie si la perte est importante (**Marieb, 2008**). Dans les cas aigus, les ulcères gastroduodénaux peuvent provoquer l'état de choc et la mort (**Tortora et Derrickson, 2010**). Dans 5 à 10% des cas, en outre, le tissu cicatriciel obstrue le pylore et entrave la digestion. Environ 5% des ulcères gastroduodénaux perforent la paroi de l'organe atteint, de sorte que son contenu se répand dans la cavité péritonéale. Cette complication peut entraîner une péritonite potentiellement fatale (**Marieb, 2008**).

De plus, la maladie ulcéreuse peut se compliquer par une sténose qui peut entraîner une dégénérescence dans le cas de localisation gastrique aboutissant à un symptôme néoplasique (**Mignon, 1990**).

4. Causes

Même après des années de recherches assidues, les causes directes des ulcères gastroduodénaux ne sont pas encore complètement et parfaitement connues (**Marieb, 2008**). Les ulcères surviennent en raison d'un déséquilibre entre les facteurs agressifs (pepsine, acide et *Helicobacter pylori*) et les facteurs défensifs (les jonctions serrées entre les cellules épithéliales, la microcirculation sanguine vasculaire, la sécrétion de bicarbonate, disponibilité des prostaglandines et de l'oxyde nitrique, la sécrétion du mucus gastrique et la résistance innée des cellules muqueuses) (**Tripathi, 1999**).

En effet, les données disponibles font ressortir le rôle essentiel de l'acide et de la pepsine et le rôle central de l'*Helicobacter pylori* (*Hp*) (**Constance et Graham, 2003 ; ACC, 2005**). En effet, l'ulcère est lié principalement à la prolifération d'une souche de bactéries, *Helicobacter pylori*, résistante à l'acidité qui envahit la couche de mucus qui protège normalement l'estomac de l'acidité. Elle perturbe alors le mécanisme protecteur, de la barrière muqueuse, chez certaines personnes. La couche de mucus disparaît puis l'ulcère entraîne des lésions inflammatoires de la paroi interne de l'estomac (**Magnin, 2016**).

De plus, chez certaines personnes, l'hypersécrétion de l'acide chlorhydrique au niveau gastrique cause l'ulcère, alors que les gens qui ont une sécrétion normale n'ont jamais souffert d'ulcère gastrique (**Marieb, 2008**). Par ailleurs, des facteurs génétiques ont été décrits. En effet des antécédents familiaux d'ulcères gastroduodénaux chez un sujet augmentent les risques de développer un ulcère. Les personnes dont un des proches souffre ou a souffert d'ulcère gastro-duodéal ont trois fois plus de risques de développer un ulcère (**Keita, 2005**). Il existe une prédominance masculine, et le risque d'ulcères gastroduodénaux se révèle plus élevé chez les personnes du groupe sanguin O que chez les sujets des groupes A, B ou AB. Les études récentes n'ont pas permis d'établir un lien direct entre le stress et les ulcères, mais il semble que le stress aggrave les ulcères existants (**Samsong, 1980 ; Marieb, 2008**).

Le mode de vie, le tabac, l'alcool, et les anti-inflammatoires non stéroïdiens, sont depuis longtemps considérés comme facteurs de risques ; Il a été démontré que le tabac semble également augmenter le risque d'ulcère en retardant la vitesse de cicatrisation spontanée et en favorisant les récives (**Gimenez, 2000 ; Marieb, 2008**).

Par ailleurs, l'alcool est un puissant agent ulcérogène, sa consommation excessive provoque des lésions hémorragiques aiguës, l'exfoliation de l'épithélium, infiltration de cellules inflammatoires et des érosions gastriques (**Chen et al, 2015 ; Jeon et al, 2015**).

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens, comme l'aspirine et l'ibuprofène, comptent parmi les médicaments les plus prescrits dans le monde en raison de leurs remarquables propriétés anti-inflammatoire, antalgique et antipyrétique (**Karoui et al, 2014**). Toutefois, la toxicité de la plupart de ces médicaments pour la muqueuse gastro-duodénale se manifeste par l'apparition des érosions hémorragiques aiguës, potentialisation de la réponse ulcérogène gastrique, l'exagération de la colite et la dépréciation de la guérison des ulcères préexistants (**Brzozowski et Konturek, 2008 ; Mignon, 1992**).

L'alimentation aussi joue un rôle dans la formation de l'ulcère gastroduodéal, ainsi les ulcères étaient plus fréquents chez les personnes dont le régime est pauvre en fibres alimentaires solubles ; De plus, la consommation de certains aliments irritants pour l'estomac qui pourraient exacerber la douleur (**Keita, 2005**) ; des boissons : le café, le thé, le chocolat, et les colas, des agrumes, des produits sucrés, des mauvaises graisses insaturées surtout de nature trans, des épices, qui peuvent réveiller les douleurs.

Autres aliments sont déconseillés comme les fritures, les plats en sauce, les crèmes et fromages gras et les charcuteries, et tous les aliments qui demeurent longtemps dans l'estomac et qui augmentent la production de sucs gastriques **(Keita, 2005 ; OPDQ, 2016)** ; En effet, une alimentation trop riche en énergie comme les graisses prolonge le temps de vidange gastrique, ce qui augmente le temps de sécrétion de la gastrine et par conséquent, la sécrétion acide de l'estomac , qui génère les ulcères **(Boisseau, 2005)**.

5. Physiopathologie

Bien que l'étiologie de l'ulcère soit encore inconnue et complexe, la physiopathologie de base des ulcères gastriques, comme nous avons déjà cité au-dessus, résulte d'un déséquilibre entre les mécanismes de défense de la muqueuse (mucus, bicarbonates, flux sanguin muqueux, cytoprotection) et l'attaque de celle-ci par la sécrétion chlorhydro-pepsique de l'estomac. Elle est caractérisée par une évolution cyclique : ulcère, puis guérison, puis récurrence au même siège ou en autre endroit sur le duodénum ou l'estomac **(Gimenez et al, 2000 ; Araujo et al, 2011)**. En effet, la défaillance des mécanismes de défense de la barrière muqueuse se traduit par sa faiblesse anormale, par une réduction du flux sanguin, en particulier en cas de troubles hémodynamiques systémiques et de ce fait un ralentissement du renouvellement cellulaire, une diminution de la production de bicarbonates et d'hexosamine, composant essentiel du mucus **(Raynard et Nitenberg, 1999)**. Ainsi, par une diminution de sa résistance aux agents agressifs endogènes, représentés essentiellement par l'acide chlorhydrique, la pepsine, et les espèces réactives de l'oxygène (ERO), et aux agents agressifs exogènes, qui sont les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), l'alcool, le tabac, l'infection à *Helicobacter pylori* et le stress **(Dive et al, 1990 ; Martins et al, 2014)**.

Parmi ces facteurs agressifs nous citons les plus incriminés :

- *Les anti-inflammatoires non stéroïdiens*

La physiopathologie des lésions gastroduodénales induites par les anti-inflammatoires non stéroïdiens passent d'abord par une diminution du flux sanguin muqueux, conséquence de l'inhibition de la cyclo-oxygénase (COX) qui produit des prostaglandines vasodilatatrices. Les lésions endothéliales accentuent la baisse du débit sanguin muqueux et favorisent le processus inflammatoire dans la muqueuse digestive **(Lamarque, 2004)**.

Selon l'étude menée par **Roth (1974)**, il a été démontré l'existence de dommages sur les surfaces gastriques des rats après l'administration orale de l'acide acétyle ou de l'alcool. L'acide acétyle salicylique est une substance non ionisée liposoluble, capable de modifier la structure glucoprotéique du mucus, et la lésion initiale serait une rupture de la barrière lipoprotéine de la surface cellulaire qui permettrait une retro- diffusion des ions H⁺ de la lumière gastrique dans les cellules. Une libération d'histamine s'en suivrait et aggraverait les lésions cellulaires par l'effet vasodilatateur au niveau des capillaires sous muqueuse.

Le mécanisme de l'augmentation de l'acidité titrable est une inhibition par l'acide acétyle salicylique de la production des prostaglandines par la voie de la cyclo-oxygénase signalé par **Robert (1979)**.

- *Les anti-inflammatoire stéroïdiens*

De même, les anti-inflammatoires stéroïdiens sont à l'origine d'une diminution de la sécrétion des bicarbonates, ce qui empêche la neutralisation des ions H⁺ au voisinage du revêtement épithélial de surface dans les cellules.

- *L'acide chlorhydrique*

L'hyper-sécrétion de l'acide chlorhydrique endogène dénature les protéines dans la membrane plasmique, et catalyse les groupements polysaccharidiques des protéoglycanes dans la couche de la muqueuse protectrice, recouvrant la surface luminale de l'estomac, induisant ainsi la fragilité de la muqueuse (**Havsteen, 2002**).

- *Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)*

Pour se protéger des effets toxiques des espèces oxygénés actives (ERO), l'organisme a développé des systèmes de défense antioxydants composés d'enzymes (la glutathion peroxydase), de vitamines (A, C, E), d'oligoéléments (ex : le sélénium), de protéines (ex : la ferritine). En situation physiologique, ces systèmes antioxydants ont la capacité de réguler parfaitement la production des ERO (**Pincelmail et al, 2002**). Un stress oxydant surviendra lorsqu'il y aura un déséquilibre dans cette balance prooxydants/antioxydants en faveur des ERO (**Pincelmail et al, 2002**). En effet, la participation des radicaux libres oxygénés comme le superoxyde (O₂⁻), peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le radical hydroxyle (OH•) sont bien établis dans la pathogenèse des lésions ischémiques de la muqueuse gastro-intestinale

(**Bigoniaya et Singh, 2014**). Aussi il joue un rôle central dans l'hémorragie gastrique et le développement des ulcères (**Boligon et al, 2014**).

- *L'alcool*

La consommation excessive d'alcool peut être à l'origine de l'ulcère gastrique (**Kadjo et al, 1999**). En outre, l'éthanol provoque des ulcères gastriques par abaissement des facteurs de protection de la muqueuse gastrique (**Choi et al, 2009**). En effet, il a été rapporté que l'alcool induit un stress oxydatif par augmentation de la synthèse des ERO qui provoquent la peroxydation lipidique (**Boligon et al, 2014**). L'alcool est caractérisé par une pénétration rapide dans la muqueuse gastrique en induisant l'épuisement des défenses non enzymatiques tels que les composants sulfhydriles non protéiques (NPSH)* et l'inhibition des enzymes anti-oxydantes (CAT, SOD) ainsi qu'en réduisant le taux du glutathion (GUT) (**Boligon et al, 2014**).

*Les composants sulfhydriles (NP-SH) ont un effet gastro-protecteur. Leur groupement SH forme une sorte de bridge avec le mucus et le rend plus épais ce qui fait que la baisse de leur concentration rend le mucus plus soluble. Ce type de molécules joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la muqueuse gastrique en se liant aux radicaux libres générés par les agents ulcérogènes, fonctionnant ainsi comme antioxydants, en contrôlant la production et la nature du mucus (**Rozza et al, 2012 ; Boligon et al, 2014**).

- *Le tabac*

Bien que le tabac déprime la synthèse des prostaglandines endogènes par la muqueuse gastrique, il augmente la masse cellulaire pariétale et la capacité sécrétoire gastrique, et diminue la sécrétion du bicarbonate (**Dive et al, 1990**).

- *L'infection par l'Helicobacter pylori (HP)*

L'*H. pylori* sécrète une enzyme « uréase » qui lui permet de survivre aux sucs gastriques en les neutralisant (**Astridle, 1998**). L'uréase hydrolyse l'urée présente dans le liquide gastrique en libérant l'ammoniac tamponnant l'environnement de la bactérie et la protégeant ainsi de l'acidité gastrique (**Flandrois et al, 1997**). L'*H. pylori* agit de deux façons : en augmentant et stimulant la sécrétion des sucs gastriques et en affaiblissant la muqueuse gastro-duodénale, ce qui permet aux acides d'attaquer la paroi de l'estomac ou du duodénum et de provoquer un ulcère. Ce pathogène induit une inflammation qui aboutit à la synthèse des chimiokines pro inflammatoires (**Beaugerie et al, 2014**). Cette réaction inflammatoire va se traduire sur le

plan anatomopathologique par la survenue d'une gastrite chronique active définie par la présence de polynucléaires et de monocytes. *H. pylori* va par ailleurs induire une augmentation de la gastrinémie basale qui est stimulée (produite par les cellules G antrales) par baisse de la sécrétion de somatostatine par les cellules D antrales (**Bigard, 1999**).

6. Traitement

Le diagnostic de l'ulcère doit toujours être établi avant d'entreprendre tout traitement ; la fibroscopie est indispensable pour confirmer le diagnostic, préciser le siège de l'ulcère et affirmer la bénignité de l'ulcère gastrique grâce aux biopsies (**Keita, 2005**).

Le traitement antiulcéreux idéal devrait atteindre quatre objectifs qui sont comme suit : Soulager la douleur, accélérer la cicatrisation, prévenir les complications, et diminuer la fréquence de récurrences. Ainsi la thérapeutique de l'ulcère a considérablement évolué au cours de ces dernières années. La maladie ulcéreuse est aujourd'hui reconnue comme une maladie infectieuse, liée à la présence d'un germe, *Helicobacter pylori*, dans l'estomac (**Labayle et al, 2001**).

L'action du traitement médicamenteux anti-ulcères est différente selon le médicament. Certaines ont une action inhibitrice sur la pompe à proton, d'autres ont une action cicatrisante sur la blessure. Pour la plupart, ces médicaments antiulcéreux sont associés aux antibiotiques pour éliminer *H. pylori* (**Fokou, 2011**).

Les antiulcéreux englobent l'ensemble des médicaments antisécrétoires, les antiacides, et les médicaments à effet muco-protecteur qui favorisent la synthèse de la prostaglandine. Les inhibiteurs des récepteurs H₂ à l'histamine qui inhibent fortement la sécrétion gastrique acide, basale et stimulée par un repas ou par différents stimulants pharmacologiques (**Grima, 2005**).

Les inhibiteurs de la pompe à protons qui sont des antisécrétoires gastriques qui agissent en inhibant l'activité enzymatique de l'ATPase H⁺/K⁺ au niveau de la cellule pariétale gastrique. Leur activité antisécrétoire est puissante et prolongée.

Le sucralfate à effet cyto-protecteur qui est un sel d'aluminium de sucrose octo-sulfate, agit localement sur l'ulcération par un effet protecteur et topique. Il stimule la synthèse des prostaglandines endogènes gastriques (**Grima, 2005**).

Les antiacides, ne diminuent pas la sécrétion d'acide, mais neutralisent l'acide présent dans l'estomac, ce qui soulage la douleur. Ils prennent plus de temps pour agir que les bloqueurs H₂ et les inhibiteurs de la pompe à protons (**Couroucé-Malblanc, 1957**).

L'éradication d'*H. pylori* est obtenue avec plus de succès par l'association de certains anti-sécrétoires à certains antibiotiques. Le principe de l'éradication repose sur l'association d'un anti-sécrétoire et de deux antibiotiques. Après cette trithérapie, il convient de poursuivre le traitement anti-sécrétoire seul afin d'obtenir la cicatrisation de l'ulcère (**Grima, 2005**).

En cas d'échec du traitement médicamenteux ou en cas de complications, telle une perforation complète de la paroi digestive par l'ulcère ou une obstruction gastro-intestinale réfractaire aux médicaments, le recours à la chirurgie est exigé. Dans d'autres cas, la vagotomie ou section du nerf vague s'opère (**Sherwood, 2006**). À la fin du traitement, on peut s'assurer de la cicatrisation de l'ulcère par une endoscopie (visualisation en direct du tube digestif faite au moyen d'un fibroscope) (**Samsong, 1980**).

Malgré l'efficacité des traitements médicamenteux, cependant, une grande partie de ces médicaments produisent plusieurs effets indésirables, y compris des toxicités et peuvent même altérer les mécanismes biochimiques du corps en cas d'utilisation chronique (**Ariyphisis, 1986**). La phytothérapie reste la source alternative à base de plantes qui est de plus en plus utilisée dans de telles situations lorsque les médicaments doivent être utilisés pendant de longues périodes. Plusieurs plantes médicinales ont été signalées comme possédant une activité antiulcérogène, notamment, ceux appartenant aux familles des *Astéracées*, suivies des familles des *Combrétacées* et des *Fabacées* auraient une activité antiulcérogène prometteuse via l'inhibition de la sécrétion gastrique et l'amélioration de la sécrétion de mucus) (**Lakshmi Srinivas et al, 2013 ; Sharifi-Rad et al, 2018**).

La phytothérapie est un art très ancien et connaît actuellement un regain d'intérêt auprès des scientifiques, des industriels et du grand public (**Marc, 2007 ; Ness et Powels, 1997**). Malgré le développement phénoménal de l'industrie pharmaceutique et chimique, les plantes médicinales restent et durent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Ces dernières sont vues comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (**Maurice, 1997**). De plus, l'échec du traitement pharmaceutique conventionnel de l'ulcère gastrique par les pansements gastrique, les antiacides, les anti-sécrétoires et les antibiotiques, de la forte incidence des effets secondaires indésirables qui leur sont associés, à savoir les troubles digestifs, les éruptions cutanées, les céphalées, les arythmies, et les modifications hématopoïétiques (**Ariypshi et al, 1986 ; Gordon et al 2002 ; Marc, 2007 ; Lawrance et al, 2009**), font qu'une large tranche de la population des ulcéreux dépend essentiellement des plantes médicinales, connue sous le nom de la médecine douce naturelle complémentaire ou parallèle pour se soigner (**Gordon et al 2002 ; Lawrance et al, 2009**).

Ainsi, les extraits végétaux font partie des sources les plus attrayantes pour la création de nouveaux médicaments plus efficaces et moins toxiques (**Alkofahi et Atta, 2002**). De même, il a été démontré qu'ils produisent des résultats prometteurs pour le traitement de l'ulcère gastrique (**Chopra et al, 1956 ; Pillai et al, 1978 ; Garg et al, 1993 ; Akhtar et Ahmed, 1995**). Ces effets sont dus principalement aux antioxydants synthétisés par les plantes, dont les composés phénoliques représentent l'une des majeures familles à savoir, les acides phénoliques, les flavonoïdes, les anthocyanes, et les tanins (**Lee et al, 2004a**). Aussi, certaines études ont montré que les propriétés pharmacologiques des médicaments traditionnels à base de plantes médicinales (préparé sous forme de thé) étaient souvent liées à la présence de composés phénoliques antioxydants (**Dawidowicza et al, 2006**).

1. Généralités

Les polyphénols sont les produits naturels les plus répandus du règne végétal et font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale, ces molécules chimiques sont synthétisées par les végétaux lors du métabolisme secondaire (**Guignard, 2000 ; Amiot et al, 1989 ; Chira et al, 2008**). En effet, ils sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures, depuis les racines jusqu'aux fruits (**Mompon et al, 1998 ; Middleton et al, 2000**).

Leur répartition tant qualitative que quantitative dans la plante varie selon les espèces, les organes, les tissus ou encore les différents stades de développement de la plante (**Guignard, 2000**). A ce jour, plus de 8000 structures ont été identifiées (**Waksmundzka-Hajnos et Sherma, 2011**), allant de simples molécules comme les acides phénoliques à des substances hautement polymérisées comme les tanins (**Dai et Mumper, 2010**). Dans la nature, les polyphénols se trouvent souvent conjugués avec les sucres et les acides organiques (**Crozier et al, 2006**).

Les principales sources alimentaires sont les fruits et légumes, les boissons notamment le thé, le café, le chocolat et les jus de fruits, les céréales complètes, les graines oléagineuses et les légumes secs. Les fruits et légumes contribuent environ pour moitié à notre apport en polyphénols, les boissons telles que jus de fruits et surtout le thé et le café apportant le reste (**Middleton et al, 2000 ; Tsao, 2010**).

Ces métabolites secondaires donnent un rôle de défense contre les prédateurs et les pathogènes, et empêchent les dommages oxydatifs dans la plante (**Lee et al, 2004b ; Nićiforovic et al, 2010**). En effet, ils participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques (agents pathogènes, blessures, symbiose) ou abiotiques (lumière, rayonnements UV, faible température, carences). De plus, ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines et la maturation des fruits, mais les plus évoqués sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins (**Boizot et Charpentier, 2006**).

Les polyphénols contribuent aussi, à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume) (**Visioli et al, 2000**).

Sur le plan structural, l'élément fondamental qui définit les polyphénols est la présence d'au moins un noyau phénolique à 6 carbones, auquel est directement lié au moins un groupe

hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside (Balasundram et al, 2006) (Figure 6).

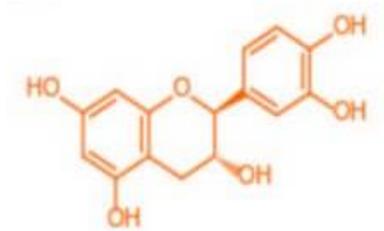


FIGURE 6 : STRUCTURE CHIMIQUE DE BASE DES POLYPHENOLS (DAL-ROS, 2009)

2. Biosynthèse des polyphénols

Les grandes lignes des voies de biosynthèse des principaux composés phénoliques sont maintenant bien connues (Knaggs, 2001 ; Tsao, 2010). Les polyphénols sont principalement synthétisés à partir des hydrates de carbone via deux grandes voies métaboliques : **Figure 7**.

- Celle de l'*acide shikimique* qui est la voie la plus importante pour la biosynthèse des composés aromatiques dans les plantes et les micro-organismes, aboutissant après transamination et désamination aux acide cinnamique et ses dérivés et aux acide benzoïque et ses dérivés (Chira et al, 2008).
- Celle de l'*acétate/malonate* conduisant aux poly-cétoesters ou polyacétates (malonate) (Chira et al, 2008).

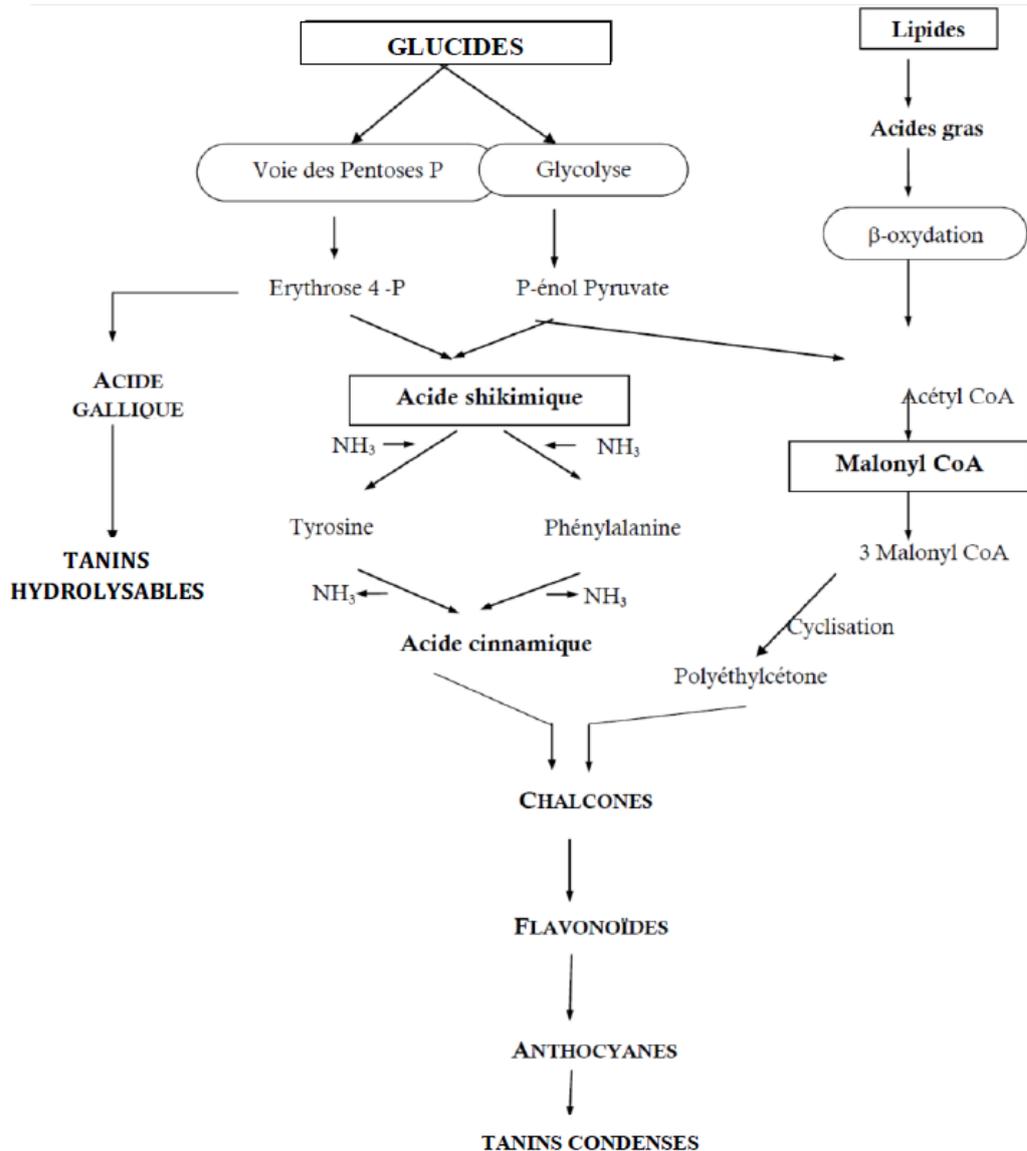


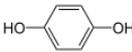
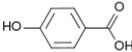
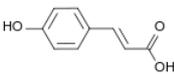
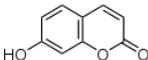
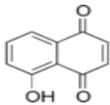
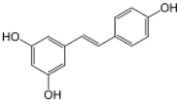
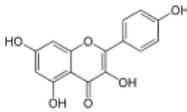
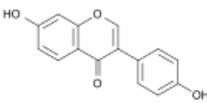
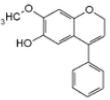
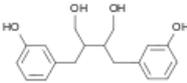
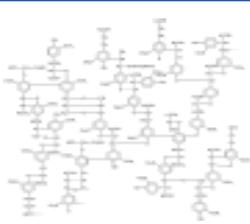
FIGURE 7 : VOIE DE BIOSYNTHESE DES COMPOSES PHENOLIQUES (RICHTER, 1993)

3. Classification des polyphénols

La diversité et la large distribution des polyphénols dans les plantes ont conduit à différentes manières de catégoriser ces composés naturels (Tsao, 2010).

En effet, les composés phénoliques peuvent être classés selon la complexité, le degré et les liaisons possibles du squelette de base avec d'autres molécules (Tableau1) (Tsao,2010).

Tableau 1 : Les principales classes des composés phénoliques (Tsao, 2010)

Squelette carboné	Classe	Exemple	Structure	Source
C ₆	Phénols simples	Hydroquinone		Busserole
C ₆ -C ₁	Acides hydroxy-benzoïques	Acide parahydroxy-benzoïque		Épices, fraises
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques	Acide paracoumarique		Tomates, ail
	Coumarines	Ombelliférone		Carottes, coriandre
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglon		Noix
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbénoides	Trans-resvératrol		Raisin
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes <i>lato sensu</i>	Kaempférol		Fraises
	Isoflavonoïdes	Daidzéine		Graines de soja
	Anthocyanes	Dalphinol		<i>Dalbergia sissoo</i> , petits fruits rouges
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Entérodiol		Bactéries intestinales, lin
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines			Bois, fruits à noyau
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanins condensés	Procyanidine		Raisins, kaki

Vue la large gamme des polyphénols, on s'est intéressé à la présentation des classes les plus importantes qui sont les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins.

3.1. Acides phénoliques C6-C1 / C6-C3

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques (Fatland et al, 2004). Ces composés sont universellement rencontrés chez les plantes (Andersen et Markham, 2006 ; Bruneton, 2009).

Deux sous-groupes peuvent être distingués :

- *Acides hydroxybenzoïques (C6-C1)*

Ces composés répondent à une représentation structurale de type (C6-C1), dont les plus répandus sont l'acide salicylique, l'acide vanillique, et l'acide gallique qui est un élément principal de la structure des tanins hydrolysables (Figure 8) (Andersen et Markham, 2006 ; Bruneton, 2009). Ces acides sont particulièrement représentés chez les Gymnospermes et les Angiospermes sous forme libre ou combinée à l'état d'esters ou d'hétérosides (Macheix, 2005). En effet, l'acide gallique et l'acide *p*-hydroxybenzoïque se trouvent en quantité importante dans le thé, la pomme de terre, les baies, ainsi que les fraises. Tandis que les céréales comme le blé et l'avoine contiennent de l'acide vanillique, de l'acide salicylique et de l'acide hydroxy benzoïque.

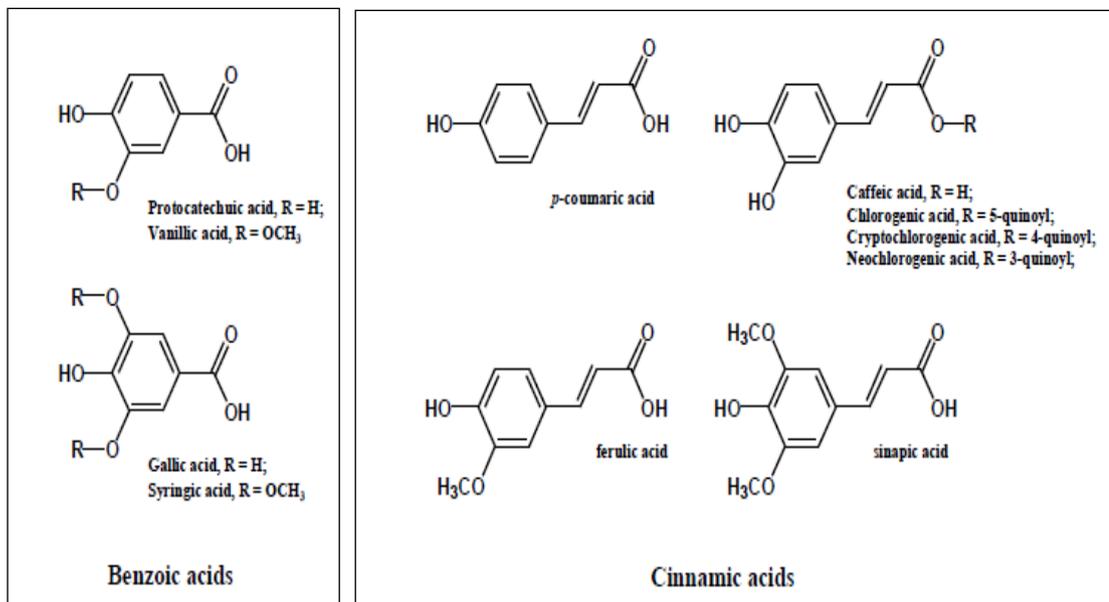
Certains condiments (herbes et épices) peuvent également contenir des acides hydroxybenzoïques (Chanforan, 2010).

- *Acides hydroxycinnamiques*

Ces composés répondent à une représentation structurale de type (C6-C3), dont les plus abondants sont les acides caféique, l'acide coumarique et l'acide sinapique (Figure 8) Ils sont à l'origine des voies de biosynthèse de nombreuses substances telles que les lignines, les flavonoïdes et les stilbènes (Andersen et Markham, 2006 ; Bruneton, 2009).

Les acides hydroxycinnamiques sont retrouvés dans toutes les parties des fruits et des légumes, quoique les concentrations les plus élevées soient observées dans la partie externe du fruit mûr. Les laitues, les carottes, les myrtilles, les patates douces (entières, cuites, et crues), les pommes de terre, les pêches, le jus d'orange, les pommes, les tomates et le raisin sont les sources les plus riches en acides hydroxycinnamiques (Dal Ros, 2009). L'acide

chlorogénique est la forme combinée de l'acide caféique, il est retrouvé en forte concentration dans le café (Crozier, 2008).



-Série benzoïque-

-Série cinnamique-

FIGURE 8 ACIDES PHENOLIQUES TYPIQUES EXISTANT DANS LES ALIMENTS (TSAO, 2010)

3.2. Flavonoïdes C₆-C₃-C₆

Par définitions, les flavonoïdes sont le groupe le plus parlementaire des composés phénoliques, avec une grande diversité structurale, en effet, plus de 5000 flavonoïdes ont été identifiées dans les plantes et la liste ne cesse de croître à cause des réactions de substitutions qui aboutissent parfois à des structures très complexes et présentant des propriétés de solubilités différentes influençant ainsi leurs extraction (Alothmane et al, 2009 ; D'Archivio, 2007).

Le terme flavonoïde provient du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange (Piquemal, 2008), encore le nom flavonoïde est dérivé du mot "Flavus" en latin, qui signifie jaune, qui ont été isolés par le scientifique Cervreul en 1814, mais l'intérêt nutritionnel pour les flavonoïdes date de la découverte à la vitamine C par Szen Gyorgyi en 1938 (Szen-Gyorgyi, 1938 ; Bruneton, 1993).

Sur le plan structural, tous les flavonoïdes possèdent en commun le même squelette : le diphenyl propane (C₆-C₃-C₆), ils contiennent quinze atomes de carbone dans leur structure de base : deux cycles aromatiques A et B à six atomes de carbones liés avec une unité de trois

atomes de carbone qui peut ou non être une partie d'un troisième hétérocycle oxygéné C (Tapas *et al* ,2008) (Figure 9)

Les principales classes des flavonoïdes sont : les chalcones et aurones, les flavonols les flavones, les flavanones, les flavan-3-ols, les isoflavones, les néoflavonoïdes et les anthocyanes (Sadasivam et Thayumanavan, 2003), (Figure 9) (Tableau 2).

Pour la localisation et distribution , les flavonoïdes se répartissent volontiers dans les organes aériens jeunes (jeunes feuilles, boutons floraux) ou ils sont localisés dans les tissus superficiels (Milane, 2014) également sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs surtout les plantes vasculaires, des nombreux fruits, graines, légumes, ainsi que dans les téguments externe des fruits .Ils peuvent aussi être rencontrés dans certains boissons (thé, cacao, vin...) et chez certains fourrages (ex: trèfle). On trouvera par exemple, les flavanones dans les agrumes, les isoflavones dans le soja, les anthocyanes et les flavonols ont eu une large distribution dans les fruits et les légumes tandis que les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs, sont considérés comme des pigments naturels au même titre que les chlorophylles et les caroténoïdes (Marfak, 2003).

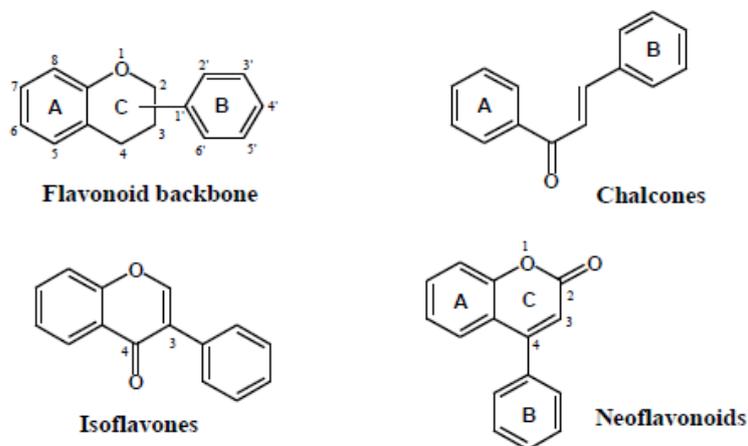
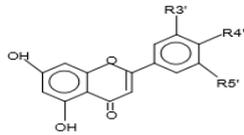
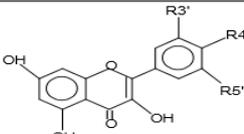
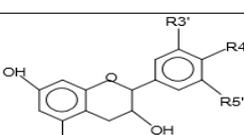
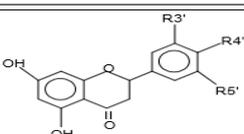
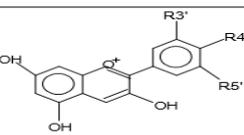
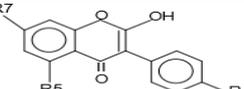


FIGURE 9 SQUELETTE DU DIPHENYLPROPANE (C6-C3-C6) ET PRINCIPALES CLASSES (TSAO,2010)

TABLEAU 2 : PRINCIPALES CLASSES ET STRUCTURE DES FLAVONOÏDES (NARAYANA ET AL, 2001 ; WERDMAN ET AL, 2007)

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidezine

3.3. Les tanins

Les tanins sont des substances phénoliques polymériques et représentent un groupe hétérogène assez difficile à définir de façon rigoureuse car il n'y a pas de structure chimique de base ; Ces polymères sont caractérisés par une saveur astringente et ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible ; en effet, ils peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives. Ils sont des molécules de haut poids moléculaire compris entre 500 et 3000, fortement hydroxylés (Haslam, 1996 ; Cowan, 1999 ; Roux et Catier, 2007). Ces substances sont trouvées dans diverses parties du végétal à savoir l'écorce, le bois, les

feuilles, les fruits et les racines, mais on note une accumulation plus particulièrement dans les tissus âgés ou d'origine pathologique.

Ils sont localisés dans les vacuoles, quelques fois combinés aux protéines et aux alcaloïdes. (Scalbert, 1991 ; Roux et Catier, 2007). Les principales sources alimentaires des tanins sont les fruits, les graines de céréales et diverses boissons notamment le thé (Pénicaud, 2009).

Les tannins sont des macromolécules qui se divisent selon leur structure en deux groupes principaux :

- *Les tanins hydrolysables :*

ou acides taniques sont des esters d'acide gallique ou de son produit de condensation ; l'acide éllagique, qui se lie aux molécules de glucose. Plus précisément, un glucose se lie à plusieurs molécules d'acide gallique dans le cas des tanins galliques, ou d'acide éllagique dans le cas tanins éllagique (Ribéreau-Gayon et Peynaud, 1968 ; 1968 ; Harborne, 1998). Les tanins hydrolysés, essentiellement localisés dans les dicotylédones des angiospermes, Ils ont un poids moléculaire plus faible et précipitent beaucoup moins les protéines que les tanins condensés. Comme leur nom l'indique, ils sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique (Jarrige et Ruckebusch, 1995 ; Collin et Crouzet, 2011) (Figure 10).

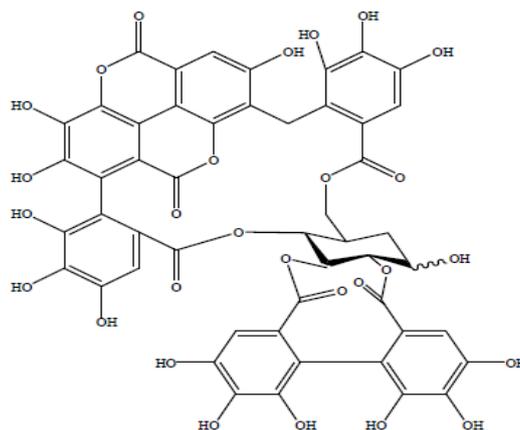


FIGURE 10 : STRUCTURE CHIMIQUE DES TANINS HYDROLYSABLES (VERMIRIS ET AL,2006)

- *Les tanins condensés :*

ou proanthocyanidine, sont des composés phénoliques hétérogènes et forment le groupe le plus important. Ils ne possèdent pas de sucre dans leurs molécules et leur structure est voisine

de celle des flavonoïdes (**Paris et Hurabielle, 1981**). Ce sont des produits de la polymérisation de flavan-3-ols (catéchines) et flavan-3,4-diols (leucoanthocyanidines) (**Vermerris et al, 2006**) (**Figure 11**)

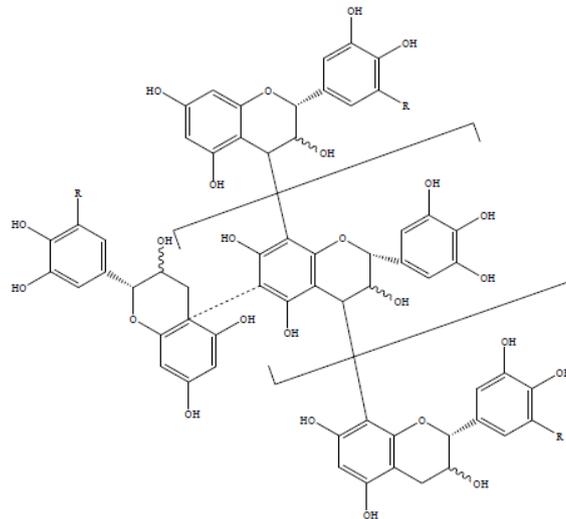


FIGURE 11 : STRUCTURE CHIMIQUE DES TANINS CONDENSES (VERMIRIS ET AL, 2006)

4. Les activités biologiques des polyphénols

Les polyphénols font actuellement l'objet de plusieurs études car ils sont reconnus par leurs activités biologiques nombreuses qui promouvaient des effets bénéfiques de santé (**Tsao, 2010**). Ils présentent une large gamme d'effets biologiques en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et aussi vis-à-vis de leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoire et anti-ulcère (**Tableau 3**), (**Sanchez- Moreno, 2002**). Les polyphénols confèrent également, des effets protecteurs sur l'organisme lorsque ces végétaux sont consommés comme aliment (**Lee et al, 2004a ; Nićiforović et al, 2010**). La relation entre la consommation d'aliments riches en polyphénols et la réduction de la possibilité d'être affecté par certaines maladies a attiré l'intérêt croissant des consommateurs, des fabricants de produits alimentaires et des nutritionnistes (**Nićiforovic et al, 2010 ; Ness et Powels, 1997**). En effet, ils sont largement utilisés en thérapeutique comme vasoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti radicalaires, ils font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures in vivo et in vitro (**Bahorun, 1997**).

TABLEAU 3 : ACTIVITES BIOLOGIQUES DE QUELQUES COMPOSES PHENOLIQUES

Composés phénoliques	Activités biologiques	Références
Acides phénols	Antiparasitaires, antifongiques,antioxydants, antibactériennes,antiulcéreuses	Flores et al,2009 Kim et al, 2010
Coumarines	Analgésiques, antiinflammatoires, protéctrices vasculaires, antiparasitaires,antioedemateuses Antitumorales, soins des hemorroïdes et des varices	Ito et al,2005 Smth et al ,2009
Flavonoïdes	Antitumorales,anticarcinogènes,antiparasitaires antivirales,antibacteriennes, antioxydantes,antiinflammatoires,antiallergiques, antithrombotiques,antitheragéniques,hypotenseurs, analgésiques,osteogènes,diurétiques, antiulcéreuses	Friedman et al,2006 ; Cushnie et al, 2007 ; Batovska et al,2009
Anthocyanes	Protéctrices capillanoveineux, antioxydant	Bruneton et al ,2009
Tanins condensés	Effet stabilisant sur le collagène, antiinflammatoire, antioxydantes, antitumorales,antifongiques	Masquelier et al,1979 ; Zhou et al, 2011
Tanins galliques et catéchiqes	Antioxydantes,antimicrobiennes,antivirales, antiinflammatoires,hypoglycémiant	Okamura et al,1993 ; Kubata et al,2005
Lignanes	Antiinflammatoires, analgésiques	Kim et al,2009

4.1. Activité antioxydante des polyphénols

En raison de leur activité antioxydante, les composés phénoliques peuvent protéger les cellules humaines contre les dommages oxydatifs, conduisant à une réduction du risque de stress oxydatif associé à plusieurs maladies dégénératives, telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, les maladies neuro-dégénératives (**Figure 12**), (**Scalbert et al 2005**).

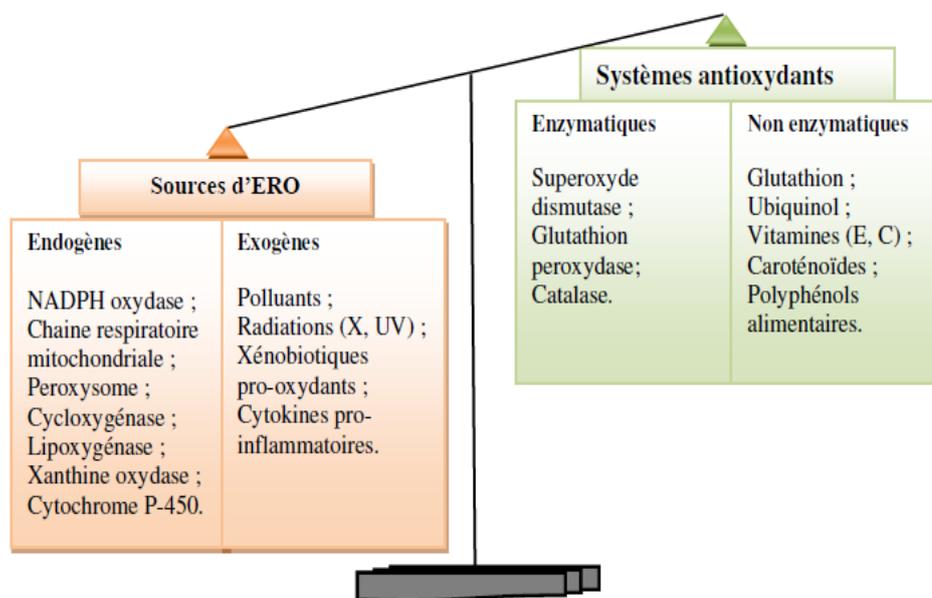
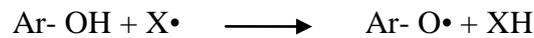


FIGURE 12 : STRESS OXYDATIF (DESEQUILIBRE DE LA BALANCE ENTRE PROOXYDANTS ET ANTIOXYDANTS)(ACHAT, 2014)

Les poly-phénols peuvent agir selon divers mécanismes d'activité antioxydante (**Halliwell, 1994 ; Sanchez-Moreno, 2002 ; Nićiforović et al, 2010**).

- *Piégeage des radicaux libres :*

La réduction de divers radicaux par les polyphénols a été beaucoup étudiée afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. A cause de leur faible potentiel redox (**Jovanovic, 1994**), les polyphénols (Ar-OH), sont capables de réduire rapidement les radicaux libres oxydants comme l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), les peroxydes (ROO^{\bullet}), les alkoxydes (RO^{\bullet}) et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène, selon la réaction générale suivante (**Sherwin, 1976 ; Achat, 2014**) :



X[•] : Représente l'une des ERO mentionnées ci-dessus ; Ar-OH : les polyphénols

Plusieurs travaux ont établi des relations entre la structure chimique des polyphénols, notamment les flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux libres (**Goupy et al ,2003 ; Pietta, 2000 ; Lucarini, 2002**) (**Figure 13**). Les critères sont les suivants : (i) la structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol), (ii) la double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo, (iii) la présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3, (iv) un troisième OH sur le cycle renforce également le caractère antioxydant (ex : acide gallique), (v) l'effet de la glycosylation diminue l'activité des flavones et flavanones (**Goupy et al ,2003 ; Pietta, 2000 ; Lucarini, 2002**).

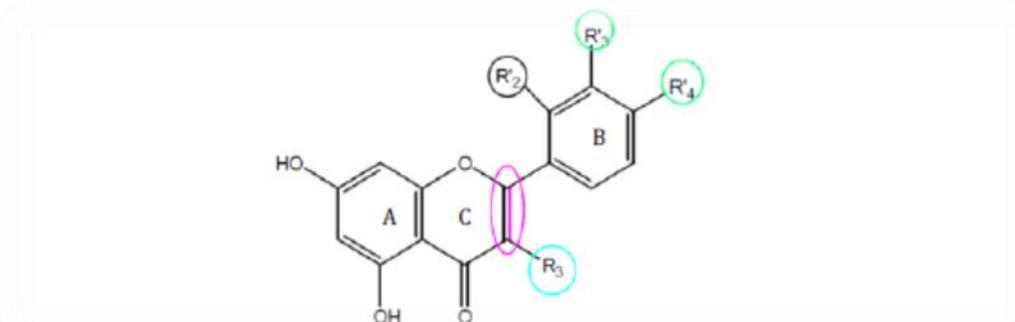
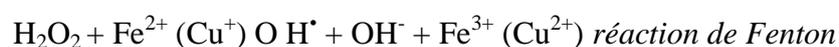


FIGURE 13 : ELEMENTS ESSENTIELS POUR L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES FLAVONOÏDES (MARFAK, 2003)

- *Chélation des ions métalliques*

Les polyphénols contribuent à l'inhibition de la formation des radicaux libres par la chélation de métaux de transition tels que le fer (Fe^{2+}) et le cuivre (Cu^+), qui sont essentiels pour de nombreuses fonctions physiologiques. Ils entrent notamment dans la composition des hémoprotéines et de cofacteurs d'enzymes du système de défense antioxydant (Fe^{2+} pour la catalase et Cu^+ pour la superoxyde dismutase). Cependant, ils peuvent aussi être responsables de la production du radical $\text{OH}\cdot$ par la réduction de H_2O_2 lors de la réaction de Fenton (**Pietta ,2000 ; Heim, 2002**).



En outre, l'autoxydation des ions Fe^{2+} et Cu^+ est une source des ERO notamment l'anion superoxyde O_2^- et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Ainsi, complexer les ions du fer et du cuivre sous une forme qui bloque leur activité redox est un mécanisme d'action antioxydante. Les polyphénols abondants dans l'alimentation, notamment les flavonoïdes, séquestrent ces ions métalliques au niveau de différents sites (**Figure 14**).

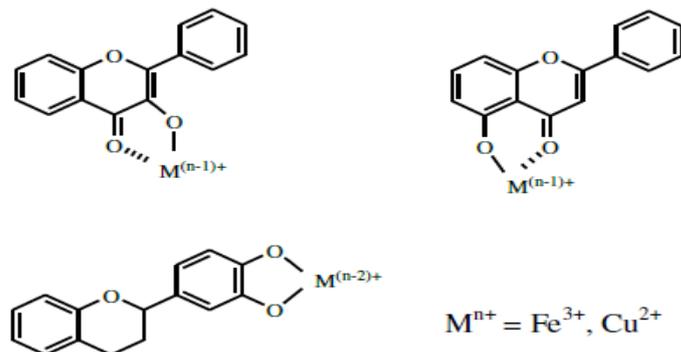


FIGURE 14 : SITES DE CHELATION DES IONS METALLIQUES PAR LES FLAVONOÏDES
(DANGLES, 2006)

- *Inhibition enzymatique*

L'inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres dans les systèmes biologiques est un mécanisme important d'effet antioxydant pour les polyphénols (Nagao *et al*, 1999 ; Lin *et al*, 2002). Les phénomènes d'interaction polyphénols-protéines ont été largement étudiés *in vitro*, particulièrement dans le cas des flavonoïdes (Rolo-Naranjo, 2009 ; S'wieca, 2013). De plus, plusieurs travaux ont rapporté que les flavonoïdes sont les molécules les plus susceptibles d'être impliquées dans cet effet, par formation de complexe inhibiteur-enzyme et/ou par piégeage direct des ERO (Dangles et Dufour, 2006 ; Dangles et Dufour, 2008). Afin de préciser le mécanisme d'action de l'activité inhibitrice des flavonoïdes, des études ont été réalisées sur l'effet de la quercétine sur l'oxydation de l'acide linoléique par une lipoxigénase. Ces auteurs ont constaté que le mécanisme d'inhibition des lipoxigénases par la quercétine ne serait pas dû à une complexation ou à une oxydation du Fe^{2+} , mais plutôt à une inhibition irréversible résultant de liaisons covalentes entre l'enzyme et les dérivés oxydés de la quercétine (quinone ou radical phénoxy) (Chebil, 2006). En outre, Cette double action des polyphénols, inhibition enzymatique et piégeage des ERO, est bien mise en évidence dans le cas de la xanthine oxydase XO, enzyme du foie impliquée dans la maladie de

la goutte, et qui catalyse une réaction du catabolisme des purines, en transformant l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique (**Day et al, 2000**).

Cette enzyme est considérée comme une source biologique importante de radical superoxyde. Les flavones et flavonols, ayant un cycle B de type catéchol comme la quercétine combinent les deux mécanismes, pour inactiver cette enzyme génératrice des ERO, à savoir formation d'un complexe inhibiteur-enzyme et réduction du superoxyde résiduel, qui s'est échappé de la cavité mitochondriale enzymatique (**Day et al, 2000**).

4.2. Activité antiulcéreuse

Des études menées sur des plantes médicinales ont prouvé l'implication des composés phénoliques dans la thérapie de multiples maladies. En effet, des propriétés gastro-protectrices et antiulcéreuses ont été attribuées aux composés phénoliques de ces plantes. Ces derniers se sont avérés de puissants protecteurs de la muqueuse gastrique, des lésions produites par divers agents ulcérogènes expérimentaux. En outre, ceux-ci peuvent être utilisés comme une alternative ou un agent additif à la thérapie actuelle. Par conséquent, ces composés peuvent avoir un potentiel thérapeutique plus efficace et moins toxique pour le traitement des ulcères gastro-duodénaux (**Sumbul et al, 2011**).

Selon la littérature, l'activité antiulcéreuse des composés phénoliques semble être associée à :

- **Leur pouvoir antioxydant** ; En effet, les polyphénols agissent par la désactivation des radicaux libres, altérant la muqueuse gastrique, par création d'addition covalente, la réduction des métaux ou de peroxydes, la complexation d'ions et de métaux de transition et le captage de l'oxygène singulet (**Schlesier et al, 2009 ; Takashima et al, 2012**).
- **Leur capacité de promouvoir l'action des enzymes endogènes du système de défense antioxydante**, à savoir la superoxyde dismutase, la catalase, le glutathion et la glutathion-peroxydase (**Ajaikumar et al, 2005 ; Alvarez-Suares et al, 2011**) ; En effet, il s'est avéré que la consommation de la peau du fruits hautement riches en polyphénols (les grenades), notamment les anthocyanes, les tanins ellagiques, les tanins hydrolysables et les flavonols, particulièrement la quercétine, a un effet inhibiteur sur la formation des ulcères gastriques (**Afaq et al, 2005 ; Alvarez-Suares et al, 2011**) et semble augmenter le taux des enzymes du systèmes de la défense antioxydantes (la superoxyde dismutase, la catalase, le glutathion et la glutathion-peroxydase), chez les animaux traités (**Ajaikumar et al, 2005**). Ainsi que les chercheurs ont découvert que les antioxydants poly phénoliques présents dans

les fraises aident non seulement la paroi de l'estomac contre l'acidité, mais activent aussi les défenses et les enzymes du corps (**Alvarez-Suares et al, 2011**).

La consommation de fraises peut aussi réduire les troubles en prévention ou après l'apparition de l'inflammation ulcéreuse.

- **Leur effet stimulant de la sécrétion du mucus gastrique** ; Par augmentation de la sécrétion accrue du mucus de l'estomac, Ce dernier est caractérisé par un film formé par la polymérisation des glycoprotéines qui permet d'emprisonner les bicarbonates, de retarder la pénétration des ions H⁺ endo luminaux et d'instaurer ainsi un gradient de pH allant de moins de 3 au niveau de la face luminale de cette couche, à plus de 7 sur la face muqueuse (**Nkhili, 2009 ; Kamguia et al, 2011**).

- **Leur effet antisécrétoire** ; En effet, les flavonoïdes, les tanins et les coumarines jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection de la muqueuse gastrique des différentes lésions induites par plusieurs facteurs d'agression, tels que l'acide-éthanol, le stress et l'indométacine (**Borrelli et Izzo, 2000**) tout en inhibant la sécrétion des pepsinogènes (précurseur de la pepsine) et sécrétion de l'acide (action anti pompe H⁺) qui sont connus comme des facteurs ulcérogènes (**Alanko et al, 1999 ; De Lira Mota et al, 2009 ; Melo et al, 2012**).

I. Introduction

Dans le but de la recherche de plantes dotées de propriétés biologiques intéressantes notamment : le pouvoir antioxydant et l'activité antiulcéreuse, le choix des plantes à étudiées est basé sur leur emploi en médecine traditionnelle ou populaire. Pour cela une plante, à intérêt thérapeutique confirmé, a été choisie :

Le Rouvet blanc *Osyris alba*. L Skeel connue chez les habitants de la région montagneuse de Tlemcen sous le nom de Gossatt Elmeiza ou Temertghit. Les écorces des racines de cette plante sont consommées sous forme de tisanes pour traiter les inflammations de tube digestif et pour le traitement de la faiblesse générale et l'anémie. Cette espèce est récoltée dans les régions de d'*Ain Ghoraba et Beni Snouss* respectivement.

Cette espèce pousse à l'état spontanée dans les régions montagneuses de *Tlemcen* (l'Ouest de l'Algérie). Cette région donatrice appartient à un seul étage bioclimatique, semi-aride (*Ain Ghoraba et Beni Snouss*), dont la pluviométrie est respectivement de 500 mm, 600 mm par an.

2. Caractère botanique

La famille des *Santalaceae* (Santalacées) comprend les plantes dicotylédones ; elle comprend 400 espèces divisées en une quarantaine de genres. Ce sont des arbres, des arbustes et des plantes herbacées, parfois à feuilles réduites, partiellement parasite des racines ou aérien parties de l'hôte, des régions tempérées aux régions tropicales. Les trois genres principaux sont : *Thesium*, *Santalum* : le célèbre et odorant bois de santal indien (Lieutaghi, 2006), et le genre *Osyris* regroupant six ou sept espèces d'arbustes (Mabberley, 1997), parmi eux, nous avons l'espèce *Osyris alba* L ; un arbuste hémi-parasitaire qui pousse sauvagement dans le sud Europe, Afrique du Nord, Asie du Sud-Ouest (Davis, 1982 ; Aronne et al, 1993). *Osyris alba* L. est très commun dans le Tell algérien, en particulier dans les forêts et broussailles formant des peuplements denses, mais très rares dans le secteur saharien (Quezel et Santa, 1963).

L'espèce *Osyris alba*. L Skeel provient du nom grec (*Osyris*), qui désigne un petit arbrisseau semblable, souple et pliant sans se casser. Le nom de *Osyris alba* est le même celui de *Casia poetica* des anciens auteurs.

Suivant le pays, le nom *Osyris alba* se diffère :

En Arabe : « Bouhla », **En berbère** : « Temertghit » (**Quezel et Santa, 1963**)

Tamahaq : « Adamam ». **En Français** : « rouvet ou bouvet, Bois-pliant ».

En Anglais : « Poet's-Cassia ». **En Allemand** : « Poetenkasia »

En Flamand : « Witte-Osyris ». **En Italien**: «Ginestrella, Casia-poetica, Osiride

Autres noms : « Osyride blanche, Oziris blanc ». [www.sahara-nature.com]

Osyris alba. L est une plante hémiparasite, c'est à dire qu'elle ne peut vivre que fixée aux racines des arbres auxquels elle emprunte l'eau et les sels minéraux dont elle a besoin. On n'a cependant pas constaté de dépérissement manifeste des arbres cernés (**Lieutaghi, 2006**). Concernant sa description botanique, *Osyris alba* est un sous-arbrisseau, vivace, très rameux, à rameaux dressés, effilés, grêles, anguleux, de 40 cm à 1,5m de hauteur et qu'on rencontre sur les coteaux herbeux (**Lieutaghi, 2006 ; Blamey et al ,2009**). Les petites feuilles alternes persistantes sont étroites lancéolées à une seule nervure. Elles sont coriaces et dressées le long des rameaux (**Quezel et Santa ,1963**). Les fleurs, à odeur de miel, sont d'un blanc jaunâtre ou jaunâtre (périclype à 3 lobes triangulaires, 3 étamines, 1 style) ; C'est une plante dioïque avec des fleurs mâles en petits bouquets, nombreuses et des fleurs femelles solitaires, portées par des pieds différents.

La floraison a lieu de mai à juillet. Les fruits sont des drupes rouges (toxique) peu charnues, rondes de la taille d'un pois sont de 8-10 mm à noyau blanc et d'abord charnues à la maturité, ils se dessèchent ensuite rapidement et deviennent durs. Entourées de petites feuilles allongées. La fructification de fruit sera en août-septembre (**Quezel et Santa ,1963 ; Ozenda ,1991**).

Les racines naissent éparses sur de longs rhizomes qui rampent sous terre à une faible profondeur ; elles consistent en fibres peu ramifiées. Les parties fines des racines portent des suçoirs qui pénètrent dans les parties souterraines des diverses plantes sur lesquelles il est parasite (**Figure 15**).



FIGURE 15 : LES DIFFERENTES PARTIES D'OSYRIS ALBA L
([HTTPS://WWW.GENIALVEGETAL.NET/-ROUVET-](https://www.genialvegetal.net/-ROUVET-))

3. Habitat et Caractère édaphique

Osyris alba. L est indifférent à la nature minéralogique du sol, mais s'écarte des sols frais et leur préfère les localités pierreuses et arides. Il est peu touché par les ruminants, si ce n'est parfois les chèvres (Lieutaghi, 2006). L'espèce d'*Osyris alba*. L se trouve souvent en stations bien exposées; avec humus, saturation du sol en cations et pH variables et à réserves en eau faibles ; station à billon hydrique déficitaire ; altérites issues de roches calcaires (argiles de

décarbonatation plus ou moins riches en cailloux) ou de roches siliqueuses ; leur comportement héliophile, mais espèce tolérant un certain ombrage (**Planchon, 1858**).

4. Usages

4.1. Usage thérapeutique

Dans l'Antiquité, *Dioscoride et Pline* recommandaient la décoction de la racine d'*Osyris alba* L Skeel pour lutter contre la jaunisse et la diarrhée. Au Moyen Age, le livre des simples médecines (de Salerne) l'utilisait pour combattre les règles trop abondantes et la dysenterie. En extérieur on s'en servait en bains, compresses et pessaires. (**Lieutaghi, 2006**)

Ces racines, coupées avant la maturité de la graine et séchées au soleil arrêtent le cours de ventre ; recueillies après la maturité et bouillies dans un potage, elles guérissent les fluxions abdominales ; on les prend aussi seules, pilées dans de l'eau de pluie, pour guérir les catharrés et les affections du ventre (**Nouveau dictionnaire d'histoire naturelle, appliquée aux arts, 1956**).

En Algérie, selon une enquête ethnobotanique, le décocté des écorces des racines d'*Osyris alba*. L sont utilisées par les habitants de la région de Ain Ghoraba (Tlemcen) pour ses vertus nutritionnelles (fortifiant) et thérapeutiques (antianémique, anti inflammatoire).

Selon **Hamdan et Afifi (2008)**, les extraits de la plante se sont avérés utiles dans le contrôle de la glycémie postprandiale, leurs effets étant principalement obtenus par inhibition des enzymes métabolisant les glucides (amylases et glucosidases). En raison du mécanisme impliqué dans le contrôle de la glycémie, de tels extraits de plantes devraient également être utiles dans la gestion de l'obésité.

4.2. Usage ménager et industriel

Les dames s'en servent en guise de vergettes pour nettoyer leurs habillements. Dans l'antiquité les drupes de l'*Osyris alba* étaient utilisées pour la fabrication du savon (**Nouveau dictionnaire d'histoire naturelle, appliquée aux arts, 1816-19**).

L'objectif de notre étude consistera à deux parties :

- L'Etude phytochimique des écorces des racines *Osyris alba* L Skeel tout en visant :
 - a. La valorisation nutritive de la partie racinaire à travers la détermination quantitative des métabolites primaires à savoir : les lipides totaux, les protéines totaux, les sucres totaux, les fibres et les sels minéraux.
 - b. Le dosage des composés phénoliques notamment, les polyphénols totaux, les tanins et les flavonoïdes, molécules universellement connues par leur effet thérapeutique
 - c. L'analyse chromatographique du profil phénolique par *HPLC*, ainsi la caractérisation du profil des acides gras par CGL de l'huile extraite des écorces des racines de cette plante.
- La recherche et l'évaluation de quelques activités biologiques de la racine de à savoir :
 - a. L'évaluation du pouvoir antioxydant des différents composés phénoliques extraits des écorces de la racine
 - b. En fin, cette thèse est complétée par la recherche de l'effet antiulcéreux de décocté aqueux des écorces des racines chez le rat *Wistar*.

Matériel et Méthodes

Le travail qui fait l'objet de cette thèse a été réalisé au laboratoire des produits naturels (LAPRONA.), au sein de l'équipe des analyses physicochimiques des plantes et leurs propriétés nutritionnelles ; au département de biologie de l'université de Tlemcen, Algérie.

I. Matériel biologique étudié

Notre étude se focalise sur l'étude phytochimique et activités biologiques à savoir l'activité anti oxydante et l'activité antiulcéreuse du Rouvet blanc « *Osyris alba L* », à intérêt thérapeutique confirmé, récoltée dans les régions de d'**Aïn Ghoraba et Beni Snouss**.

Le Rouvet blanc *Osyris alba* connue chez les habitants de la région montagneuse sous le nom de Gossatt Elmeiza ou Temertghit. Les écorces des racines de cette plante sont consommées sous forme de tisanes pour traiter les inflammations de tube digestif et pour le traitement de la faiblesse générale et l'anémie.

La récolte des écorces des racines d'*Osyris alba* a été effectuée au niveau des régions montagneuses **d'Aïn Ghoraba** et de **Beni Snouss** de la wilaya de Tlemcen (Nord-Ouest Algérien) en Avril-Mai 2012 (**Figure 16**).

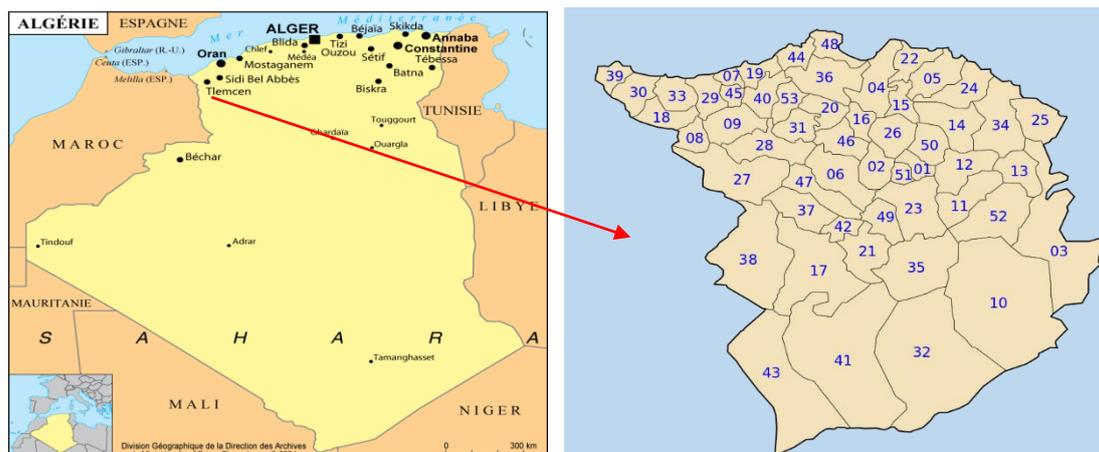


FIGURE 16 : LES COMMUNES D' AÏN GHORABA (49) ET DE BENI -SNOUSS (17) WILAYA DE TLEMCEEN ([HTTPS://FR.WIKIPEDIA.ORG/WIKI/AÏN_GHORABA](https://fr.wikipedia.org/wiki/Aïn_Ghoraba))

La plante a été identifiée par le professeur **BENABADJI N.** du laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels ; Université de Tlemcen (Algérie).

Au laboratoire, les échantillons ont été bien nettoyés, étalés et laissés sécher à l'air libre et à l'abri de la lumière et de l'humidité pendant 15 jours, puis broyés jusqu'à l'obtention d'une poudre fine que possible, facile à conserver dans des flacons en verre teinté pour des utilisations ultérieures (**Figure 17**)



FIGURE 17 : LES RACINES ET LA POUDRE DES ECORCES DES
RACINES D '*OSYRIS ALBA. L. SKEEL*

II. Méthodes d'analyses

Chapitre 1 : Etude phytochimique

1. Tests phytochimiques

Le screening phytochimique consiste à détecter les différentes familles de composés chimiques essentiellement les composés phénoliques, les hétérosides notamment les saponosides, les composés azotés en particulier les alcaloïdes, l'amidon et les composés réducteurs existantes dans une partie quelconque ou bien de la plante par des réactions de précipitation ou de coloration en utilisant des réactifs spécifiques à chaque famille de composés.

- **Principe**

La mise en évidence s'effectue par des tests phytochimiques réalisés, généralement sur des extraits déjà préparés (par épuisement à chaud ou par macération à froid) ou directement sur la poudre d'échantillon à analyser.

Ils sont basés sur :

-Les essais de solubilité, des constituants de la plante, vis-à-vis des solvants organiques de polarité différente : l'eau, l'éthanol, méthanol, chloroforme et l'éther diéthylique ;

-Réaction de coloration et de précipitation ; -Examen sous la lumière ultraviolette.

- **Préparation des extraits**

Dans un ballon surmonté d'un réfrigérant 5g de la poudre d'échantillon séché à l'air sont séquentiellement extraits par Soxhlet en utilisant les solvants suivants : l'eau distillée, méthanol, éthanol, éther diéthylénique, chloroforme. Les extraits bruts sont filtrés, concentrés, à l'aide d'un rota évaporateur, et stockés à 4°C et utiliser pour le screening phytochimique (**Trease et Evans, 1987**).

- **Les saponosides**

Les saponosides sont des hétérosides à génines (partie non glucidique) stéroïdiques et triterpéniques, la partie sucre est liée à la génine par une liaison de type ester ou éther.

Les saponosides sont caractérisés par leurs propriétés tensioactives : ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes (**Figure 18**) (**Bruneton, 1999**).

▪ Test pour les saponosides

Brièvement, 5ml de l'extrait aqueux, de l'extrait éthérique ou méthanolique sont vigoureusement agités avec 10 ml d'eau distillée pendant 2 minutes. L'apparition de la mousse qui persiste au moins 15 minutes ou la formation des émulsions après addition de l'huile d'olive, confirme la présence des saponosides (**Figure 18**) (**Trease et Evans, 1987**).

• Les tanins

Les tanins sont des composés phénoliques de structure variée, de saveur astringente, ayant la propriété de tanner la peau. On distingue deux groupes de tanins différents par leur structure et par leur origine biogénétique :

-Les tanins hydrolysables qui sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol (acide gallique).

-Les tanins condensés ou proantho-cyanidols qui se diffèrent fondamentalement des tanins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes, il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols (**Bruneton, 1999**).

▪ Test pour les tanins

1ml de l'extrait méthanolique, éthanolique ou aqueux sont mélangés avec 10 ml d'eau distillée et filtrés. L'addition de 3 gouttes du réactif Chlorure ferrique $FeCl_3$ préparé à 1% permet de détecter la présence ou **absence** des tanins. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins hydrolysables (tanins galliques) et au brun verdâtre en présence des tanins condensés (tanins catéchiques) (**Figure 18**) (**Trease et Evans, 1987**).

• Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments quasiment d'origine végétale. Tous les flavonoïdes- environ 3000 ont une origine biosynthétique commune et de ce fait, possèdent le même élément structural de la base, à savoir l'enchaînement 2-phénylchromane. Ils peuvent être regroupés en une douzaine de classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central (**Bruneton, 1999**).

▪ Test pour les flavonoïdes

Dans un tube à essai, 1 ml de l'extrait à tester a été mélangé avec 1 ml d'acide chlorhydrique (HCl) concentré et 3 copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rose, rouge, indique la présence des flavonoïdes (**Figure 19**) (**Bruneton, 1999**).

• Les quinones libres

Les quinones sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques notamment les polyphénols. Ils sont caractérisés par un motif 1,4 dicéto-cyclohexa 2,5-diéniq (para quinone ou éventuellement par un motif 1,2-dicéto-cyclohexa-3,5-diéniq (ortho-quinone).

Diverses réactions colorées permettent de mettre les quinones en évidence. La principale réaction est celle de *Bornträger*: réaction que l'on obtient en dissolvant les quinones en milieu alcalin aqueux, la solution prend une teinte vive variant, selon la structure et les substituants de la quinone, de l'orangé- rouge ou violet- pourpre.

(**Bruneton, 1999**).

▪ Test pour les quinones libres

1g de poudre sèche du matériel végétal est placé dans un tube avec 15 à 30 ml d'éther de pétrole. Après agitation et un repos de 24 heures, l'extrait est filtré et concentré au rota évaporateur. La présence des quinones libres est confirmée par l'ajout de quelques gouttes de NaOH 1/10, lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet (**Figure 19**) (**Ribéreau-Gayon et Peynaud, 1968**).

• Les alcaloïdes

Initialement définis comme des substances azotées, basiques, d'origine naturelle et de distribution restreinte, les alcaloïdes ont une structure complexe. Leur atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique. Ils existent à l'état de sels et ils sont biosynthétiquement formés à partir d'un acide aminé.

La détection des alcaloïdes consiste, dans le cas le plus général, à une précipitation. La précipitation est due à la capacité des alcaloïdes de se combiner avec les métaux et des métalloïdes qui constituent les réactifs spécifiques utilisés (**Bruneton, 1999**).

▪ Test pour les alcaloïdes

Dans un bain-*Marie* on mélange 0.2ml de l'extrait aqueux, éthanolique, étherique avec 5ml d'une solution aqueuse de HCl préparée à 1% (en utilisant un agitateur avec barreau magnétique). Après filtration un volume de 1ml du filtrat est traité par 3 gouttes du tétra-iodo-mercurate de potassium connu sous le nom du réactif de Mayer, alors que l'autre quantité (1mL) est traitée par le réactif de Wagner (**Annexe**). Toute floculation, turbidité ou précipitation indique la présence des alcaloïdes (**Sofowara, 1993 ; Harborne, 1973**) (**Figure 19**)

• Les sucres réducteurs

Il est basé sur la capacité de fonction libre du carbone anomérique des oligosaccharides de réduire les sulfates de cuivres existants dans la solution de Fehling 2ml des extraits aqueux et éthanolique sont placés dans des tubes à essai et 5ml de mélange d'un volume égal de la solution de Fehling (A et B) sont ajoutés et porter à l'ébullition dans un bain-marie pendant 2 minutes (**Annexe**) (**Figure 20**).

La formation d'un précipité rouge- brique au fond de tube indique la présence des hydrates de carbone (**Trease et Evans, 1987**).

• L'amidon

La réaction de l'amylose (un constituant essentiel du squelette de l'amidon) avec l'iode est à la base de la caractérisation analytique de l'amidon. L'extrait aqueux est traité avec le réactif de l'amidon qui est à base d'iode (**Annexe**). Tout virage au bleu violacé indique la présence de l'amidon (**Bruneton, 1999**) (**Figure 20**).

Les tests phytochimiques sont schématisés dans le diagramme ci- après :

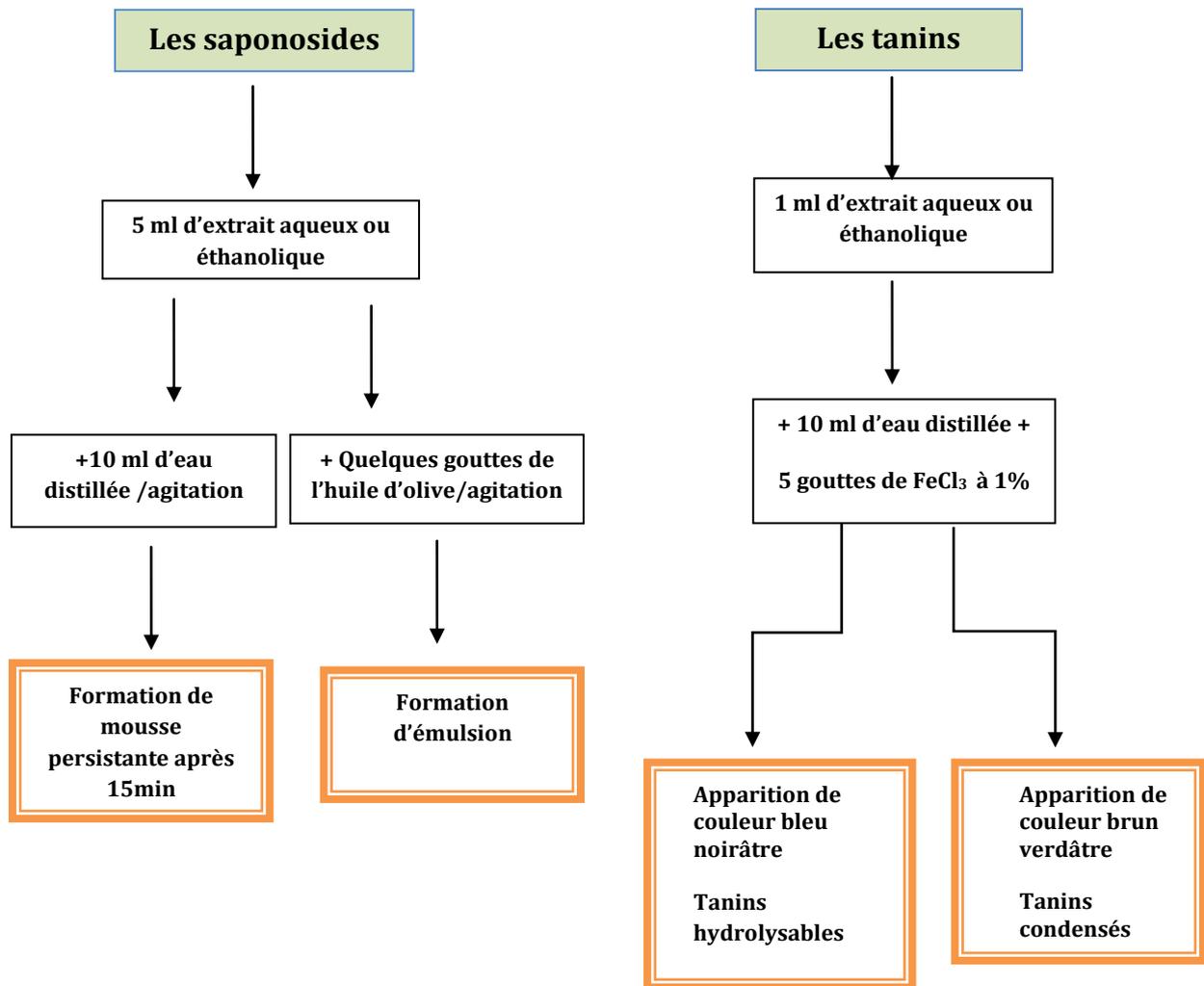


FIGURE 18 : DIAGRAMME DE SCREENING DES DIFFERENTES FAMILLES CHIMIQUES

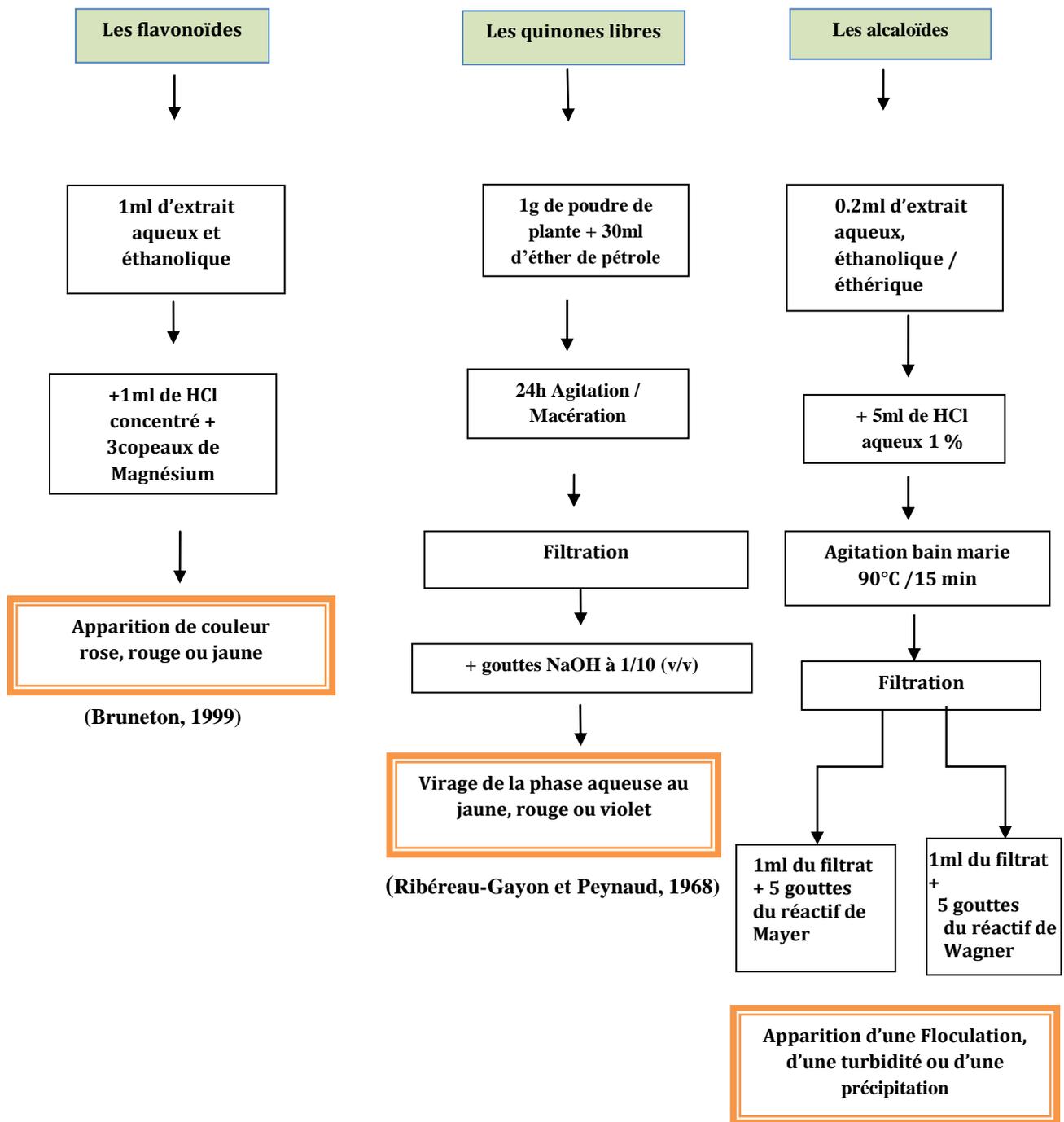


FIGURE 19: DIAGRAMME DE SCREENING DES DIFFERENTES FAMILLES CHIMIQUES

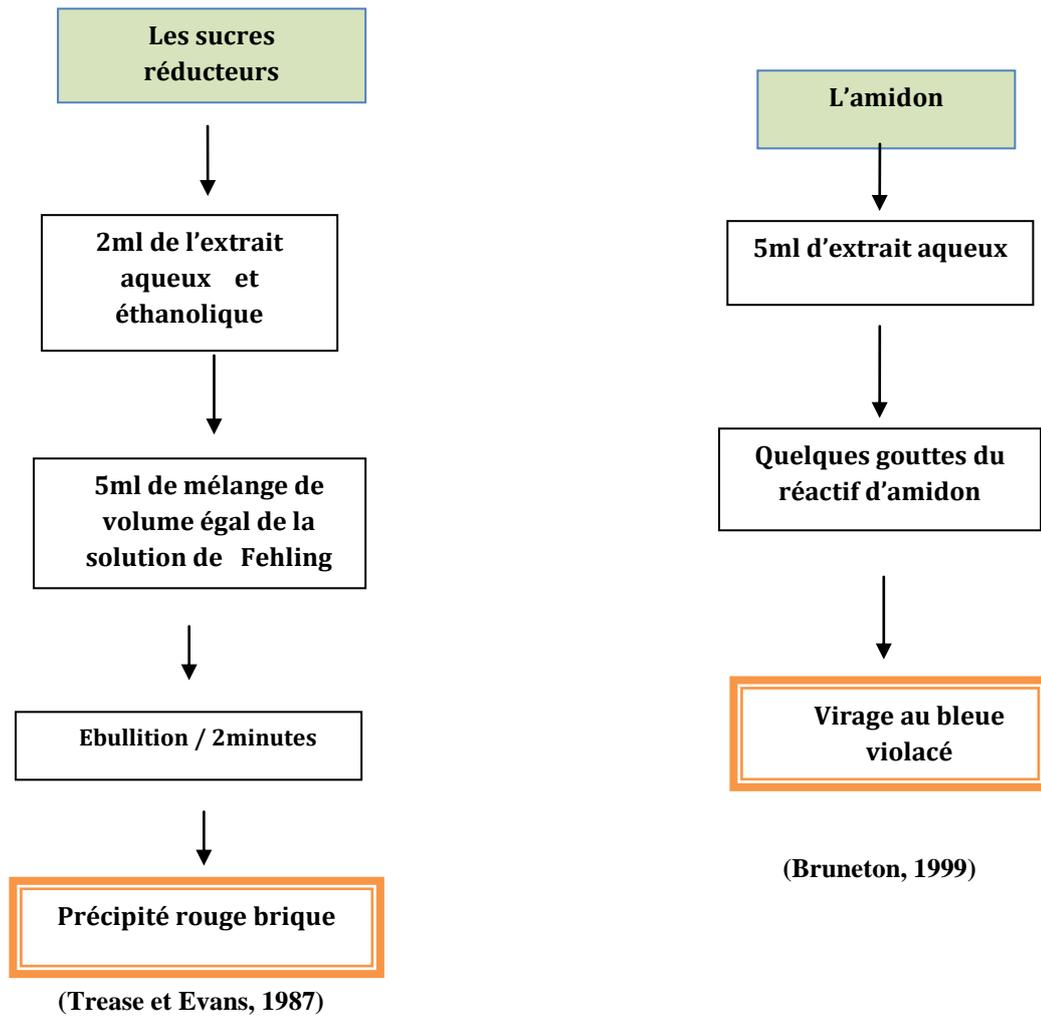


FIGURE 20 : DIAGRAMME DE SCREENING DES DIFFERENTES FAMILLES CHIMIQUES

2. Dosage des métabolites primaires

2.1 L'humidité (teneur en eau)

- **Principe**

On procède à une dessiccation de l'échantillon à analyser dans une étuve à la température de 100 °C à 105 °C jusqu'à l'obtention d'une masse pratiquement constante. Pour éviter toute reprise d'humidité, il convient d'opérer dans des vases de tare, placées dans un dessiccateur (Audigie et al, 1980).

- **Mode opératoire**

-Sécher à l'étuve, les vases de tare pendant 30 minutes à 100 °C avec couvercles inclinés ;

-Laisser refroidir dans un dessiccateur durant 20 à 30 minutes, puis peser les vases de tare avec les couvercles (P1) ;

-Mettre dans chaque vase 2 g d'échantillon moulu, fermer les couvercles et peser, (P2) ;

-Placer les vases qui contiennent l'échantillon dans l'étuve pendant 3 h à 105 °C avec couvercle incliné.

-Mettre rapidement les couvercles et laisser refroidir au dessiccateur pendant 15 minutes et peser, (P3) ;

-Remettre les vases à couvercles inclinés dans l'étuve durant 1 heure et peser comme précédemment. La différence entre deux pesées doit être inférieure à 2 mg, si non l'opération est renouvelée jusqu'à poids constant.

- **Expression des résultats**

Le taux d'humidité (%) d'un échantillon de matériel végétal est donné par la formule suivante :

$$\text{Taux d'humidité \%} = [(P_3 - P_2) / (P_1 - P_2)] \times 100$$

Dont :

P₁ : masse en g de la vase de tare ; P₂ : masse en g de la prise d'essai avant séchage.

P₃ : masse en g de la prise d'essai après séchage.

A partir de la teneur en humidité on peut déterminer le taux de matière sèche qui est donné par la formule suivante :

$$\text{Taux de matière sèche \%} = 100 - \text{Taux d'humidité \%}$$

2.2. Lipides totaux

- **Principe**

Afin d'éliminer le reste d'humidité, l'échantillon à analyser a subi un séchage à l'étuve à 40 °C/ 14 heures. L'extraction de l'huile est réalisée dans un extracteur de type Soxhlet à l'aide d'un solvant organique (le n -hexane).

Après évaporation du solvant, le taux de matière grasse brute est déterminé gravimétriquement selon la méthode directe. La méthode directe consiste à peser l'huile obtenue directement après évaporation du solvant d'extraction (**Lecoq, 1965**).

- **Mode opératoire**

Une enveloppe séchée préparée préalablement et pesée.

Après avoir taré l'enveloppe, placer 1 ou 2 g de l'échantillon à analyser (séché) : PE

L'enveloppe est placée dans l'appareil de Soxhlet, la durée l'extraction dépend de la quantité d'huile présente dans l'échantillon à analyser : elle est de 3 -10 heures (pauvres en huile) et de 6 -12 heures (riche en huile).

- peser le ballon vide séché poids A (PA).

- peser le ballon + huile extraite poids B (PB).

- PE : Poids en gramme d'échantillon séché.

- **Expression des résultats**

Le rendement (ρ) ou le taux en matière grasse brute est donné par la formule suivante :

$$\rho = (PB - PA/PE) \times 100$$

2.3. L'azote total et les protéines brutes

Il est réalisé par la méthode de **Kjeldahl, (1883)**, elle comprend trois étapes : la minéralisation, la distillation et la titration.

- **Principe**

La méthode consiste à détruire la matière organique par l'acide sulfurique concentré et chaud, qui fait passer quantitativement l'azote à l'état de sulfate d'ammonium.

On déplace ensuite l'ammoniac par de la soude et on le recueille dans un excès d'acide sulfurique de concentration connue. Un titrage en retour par de la soude de concentration connue permet de déduire la quantité d'ammoniac formée, donc la teneur en azote du produit initial (**Lion, 1955**).

- **Mode opératoire**

(Méthode d'analyse N°07 96 06 /CACQE/ Ministère du Commerce) ;(Kjeldahl, 1882)

- **La minéralisation**

Elle se fait dans une unité de digestion BÜCKI-K-435. 1g environ de la poudre d'échantillon dégraissé, tamisé à travers des mailles de 2mm et séché à 105° C jusqu'à poids constant. Peser soigneusement et introduire dans toute sa quantité dans un matras de Kjeldahl (le tube de digestion). Pour la digestion de chaque échantillon, ajouter dans le matras :

-1g de catalyseur à partir d'un mélange de 15g de sulfate de potassium anhydre (K_2SO_4), 1.2g de sulfate de cuivre ($CuSO_4$), 1 graine de Sélénium (Se)

-12ml d'acide sulfurique H_2SO_4 concentré à 98%.

Après un certain temps de minéralisation, 1 à 2 ml de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 concentré à 35% (130vol).

-Mélanger soigneusement pour assurer un mouillage complet de la prise d'essai.

-Procéder à un préchauffage de l'appareil de digestion pendant 10 minutes à la graduation 5.-Placer les matras sur le dispositif de chauffage.

-Les gaz d'échappement sont aspirés à l'aide d'une trempe à vide.

-Chauffer le tube de digestion tout d'abord doucement pour éviter que la mousse monte ou s'échappe du matras.

-Chauffer avec modération.

Le minéralisât (le contenu du matras) est transversé dans une fiole en complétant le volume avec de l'eau distillée jusqu'à 100 ml.

-Mélanger soigneusement afin de solubiliser en maximum les sulfates d'ammonium.

Laisser refroidir.

▪ La distillation

Elle se fait dans une unité de distillation **BÚCKI-K-314**.

-10ml du contenu de la fiole sont introduites dans le matras de l'unité de distillation aux quels sont ajoutés 20 ml d'eau distillée et 30 ml de la soude caustique (NaOH) / à 35%.

-Chauffer pendant 4 minutes de façon à recueillir 150 ml de distillat.

-Ensuite vérifier la neutralité du distillat qui coule de l'extrémité du réfrigérant au moyen de papier pH, si la réaction est alcaline poursuivre la distillation jusqu'au virage de la couleur du papier PH á la neutralité (vérification du passage de toutes les molécules de NH_3^+).

-Le distillat est ensuite recueilli dans un erlenmeyer gradué qui contient 25 ml de solution d'acide sulfurique à 0.1N additionné de 10 gouttes d'indicateur de *Tashiro* (de couleur rose- violette en présence d'un milieu acide et verte dans le cas d'un milieu alcalin) voir **Annexe**.

▪ La titration

Puisqu'on utilise l'acide sulfurique comme liquide de récupération. On va alors titrer l'excès d'acide sulfurique avec la solution de NaOH 0.1N jusqu'à changement de la coloration du violet au vert.

• Expression des résultats

Le pourcentage d'azote total est calculé par la formule suivante :

$$L'azote\ total\ (\%) = N\ \% = (V_b - V_e) \times N \times F \times 0.014 \times 10 \times 100/m$$

V_b : Volume en ml de la solution de NaOH à 0.1N nécessaire pour neutraliser l'excès d'acide sulfurique présent dans l'essai à blanc (1g de saccharose) ;

V_e : Volume en ml de la solution de NaOH à 0.1N nécessaire pour neutraliser l'excès d'acide sulfurique présent dans l'échantillon à analyser ;

N : normalité de NaOH utilisée pour titration (0.1N) ; F : facteur de correction de la solution de NaOH ;

m : masse en g de la prise d'essai =1g ;

10 : coefficient du volume total de la solution à doser ;

100 : coefficient du pourcentage.

▪ Conversion du taux d'azote en taux de protéines

100g de protéines correspond à 16g d'azote dans la majorité des cas. On utilise un facteur de conversion basé sur le taux moyen d'azote des protéines :

Les protéines brutes (%) = PB% = N % X 6.25

2.4. Les sucres totaux

L'appréciation de la quantité en oses présents dans les polysaccharides repose sur le dosage des sucres totaux par la méthode de **Dubois et al (1956)** appelée aussi méthode phénol/acide sulfurique.

• Principe

Le dosage des monosaccharides constitutifs des polysaccharides nécessite la rupture de toutes les liaisons glycosidiques par hydrolyse acide (l'acide sulfurique).

L'analyse repose sur des techniques colorimétriques. Le principe des dosages colorimétriques se base sur la condensation par estérification d'un chromogène (Phénol, Orcinol, Anthrone) avec les produits de déshydratation des pentoses, hexoses et acides uroniques.

En milieu acide fort et à chaud, ces oses se déshydratent respectivement en des dérivés du furfural, 5- hydroxy-méthyl-furfural et de l'acide 5-formylfuroïque.

Les chromophores ainsi formés de couleurs jaunes- orange absorbent dans le domaine du visible proportionnellement avec la quantité des sucres présents (**Ruiz, 2005**).

La teneur des sucres est exprimée en µg/ ml (converti en gramme / litre) de α D+ Glucose à partir d'une courbe d'étalonnage.

- **Mode opératoire**

- **Préparation des échantillons**

-Peser 0.5g d'échantillon dans le bêcher, ajouter 20 ml d'acide sulfurique 0.5 M puis placer l'ensemble dans une étuve à 105°C pendant 3 heures ;

-Transvaser quantitativement le contenu du bêcher dans une fiole de 500 ml (ajuster le volume par de l'eau distillée jusqu'à 500 ml), puis filtrer la solution et la conserver à 4°C.

-Réaliser des dilutions de 1/3 à partir de ce filtrat ; -On prépare 03 essais.

-Déposer avec précaution 1 ml de chaque essai, ajouter 1 ml de phénol à 5% et 5 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄) concentré.

-Après agitation (vortex) les tubes sont maintenus, dans l'étuve pendant 5 minutes à 100°C, puis laisser les dans l'obscurité pendant 30 minutes ;

Enfin, on lit la densité optique à une longueur d'onde de 490 nm.

- **Préparation de l'étalon**

Pour chaque série de détermination, une gamme d'étalonnage est nécessaire, une solution mère (SM) de α D+ Glucose de concentration 100 μ g /ml est préparée comme suit :

Préparer une solution de glucose de 0.01g / 100 ml (100 μ g/ ml).

A partir de cette solution mère préparer des dilutions de différentes concentrations 25 μ g /ml, 40 μ g/ ml, 60 μ g/ml, 75 μ g/ml ,100 μ g/ml.

Prendre 1 ml de chaque concentration (2 essais pour chaque concentration) et ajouter 1 ml de phénol à 5 % et 5 ml d'acide sulfurique à 98% à l'aide d'une burette ;

Après agitation (vortex) les tubes sont maintenus pendant 5 minutes à 100°C, puis à l'obscurité pendant 30 minutes ;

Lire la densité optique, de chaque concentration, à 490 nm, après on trace la courbe d'étalonnage.

- **Expression des résultats**

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'alpha D- Glucose comme étalon. Les résultats sont exprimés

en mg équivalent alpha D- Glucose par 100m g de matière sèche (mg EGLU / 100 mg MS).

L'équation déduite de la courbe d'étalonnage α D glucose pour la détermination des sucres totaux (**Annexe**) :

$$A = \varepsilon .C = 0.01C, \quad r^2 = 0.999$$

C μ g / ml (Concentration déduite de la courbe d'étalonnage) = [A /0.01], dont :

A : absorbance

ε : la pente= 0.01

C : la concentration de l' α -D-Glucose en μ g /ml.

La teneur des sucres totaux est exprimée en μ g équivalent de α – D glucose / ml de solution mère est convertie en μ g équivalent de α – D glucose (EGLU) / 100 mg de matière sèche (MS).

La concentration en poids / poids a été calculée en utilisant la formule suivante :
C μ g EGLU / 100 mg MS = [C μ g / ml . Vi ml . F / g MS], dont :

C μ g / ml : la concentration de l' α -D-Glucose en μ g /ml.

Vi : volume initial de récupération de l'extrait sec ; F : facteur de dilution ; MS : matière sèche.

2.5 Les cendres

- **Principe**

Il consiste en une calcination au bec Benzène de l'échantillon jusqu'à apparition d'une fumée noire, puis en une incinération dans un four à moufle, dans des creusets en porcelaine, à une température de 750°C jusqu'à ce que les résidus deviennent blancs après refroidissement (**Audigie et al, 1980**).

- **Mode opératoire**

-On effectue une pré incinération des creusets en porcelaine à 300°C pendant 15 minutes ;

-Après refroidissement, on les pèse vide, (P₁)

-On pèse 1g de l'échantillon dans les creusets, (P₂)

-On introduit les creusets avec l'échantillon dans le four à moufle à température de 750°C jusqu'à ce que le contenu en substances prises une couleur blanc grisâtre qui blanchisse après refroidissement dans un dessiccateur ;

-Ensuite, on pèse les creusets avec les cendres (P₃).

- **Expression des résultats**

Les résultats sont exprimés selon la formule suivante :

$$X\% = [(P_3 - P_1) / (P_2 - P_1)] \times 100$$

P₁ : poids de creuset vide ; P₂ : poids de creuset + l'échantillon avant incinération ;

P₃ : poids de creuset + l'échantillon après incinération ;

100 : pour exprimer le pourcentage ;

X% : pourcentage en cendre.

2.6 Les fibres alimentaires

Il est réalisé par la méthode de **Henneberg et Stohmann (1860)** appelée aussi la méthode *Weende* en utilisant un extracteur des fibres brutes *FIWE-VELP SCIENTIFICA*.

- **Principe**

Elle consiste à traiter l'échantillon à analyser successivement avec de l'acide sulfurique et de la potasse. L'hydrolyse acide/ basique (à chaud) permet de solubiliser la quasi-totalité du contenu cellulaire à l'exception des fibres alimentaires et des sels minéraux.

Le résidu obtenu sera séché, incinéré puis pesé.

- **Mode opératoire**

-Sécher l'échantillon à l'étuve à 105°C jusqu'à un poids constant puis laisser refroidir dans un dessiccateur ; Peser exactement 1 g de l'échantillon broyé poids (P₁) ;

-Ajouter l'acide sulfurique à 1.25% jusqu'à l'entaille de 150 ml après préchauffage par le plat chaud afin de réduire le temps requis pour bouillir ;

-Ajouter 3 à 5 gouttes de n-octanol comme agent anti moussant ;

- Bouillir 30 min exactement au début de l'ébullition ;
- Relier au vide pour vidanger l'acide sulfurique ;
- Laver 3 fois avec 30ml (creusets remplis jusqu'au-dessus) de l'eau distillée chaude, se reliant chaque fois à l'air comprimé pour remuer le contenu du creuset ;
- Après avoir vidangé le dernier, ajouter 150ml de KOH à 1.25%, préchauffer ;
- Ajouter 3 à 5 gouttes de n-octanol comme antimousse puis bouillir pendant 30 min ;
- Filtrer et laver 3 fois avec 30ml de l'eau distillée chaude, se reliant chaque fois à l'air comprimé pour remuer le contenu du creuset ;
- Performer un dernier lavage avec de l'eau distillée froide pour refroidir les creusets, puis laver 3 fois avec 25 ml d'acétone, remuer chaque fois par l'air comprimé ;
- Retirer les creusets et déterminer le poids sec après séchage dans l'étuve à 105°C pendant 1 heure jusqu'à poids constant ;
- Laisser refroidir dans un dessiccateur, ce poids (P_2) représente les fibres brutes plus la teneur en cendres par rapport au poids initial (P_1).
- placer les creusets dans un four à moufle à 550°C pendant 3 heures et répéter jusqu'à l'obtention d'un résidu blanc grisâtre ;

Après refroidissement dans un dessiccateur ce poids représente les cendres (P_3) ;

La différence des poids représente la teneur en fibres brutes sans cendres.

- **Expression des résultats**

La teneur en fibres est déterminée par la formule suivante :

$$\text{Fibre \%} = (P_2 - P_3 / P_1) \times 100$$

2. Dégraissage de la poudre d'échantillon et obtention du tourteau

L'élimination de la matière grasse est une étape clé qui précède les dosages des métabolites secondaires, elle optimise le rendement en extrait. La poudre de plante dégraissée ainsi obtenue est appelée *tourteau*. L'utilisation du tourteau, au lieu de la plante non dégraissée, facilite la préparation des solutions homogènes lors des analyses et empêche la formation des émulsions dues à la présence des lipides (Yu et Dahlgren, 2000).

- **Mode opératoire**

Le dégraissage est effectué dans un extracteur de type soxhlet en utilisant un solvant organique : qui est le n-hexane (spécifique pour les plantes) la durée de dégraissage dépend de la richesse de la plante en matière grasse, qui est entre 6 h à 12 h (**Lecoq, 1965**). Après, la poudre obtenue du dégraissage est appelée le tourteau et elle va servir pour l'extraction des métabolites secondaires (dans notre cas les composés phénoliques).

3. Dosage des métabolites secondaires

3.5 Dosage des composés phénoliques

3.5.1 Extraction des composés phénoliques

- **Principe**

L'extraction de poly phénols totaux consiste à macérer à froid (4°C) la poudre dégraissée de la plante dans une solution d'acétone aqueuse pendant 24 heures. Après filtration, la solution est évaporée à sec par un évaporateur rotatif sous pression réduite 60°C. L'acétone aqueuse, et le méthanol aqueux, avec des proportions entre 50% et 70% (v/v), sont les solvants les plus utilisés pour l'extraction des poly phénols (**Yu et Dahlgren, 2005**).

- **Mode opératoire**

Une prise d'essai de 2 g de tourteau est macérée avec 100 ml du mélange acétone /eau (70% v/v) pendant 24 heures. Après filtration sous vide (en utilisant une fiole+ entonnoir fritté+ une trempe à vide) l'extrait est alors lavé avec le n-hexane pour se débarrasser des autres composés à faible poids moléculaire.

Le mélange acétone/ eau, est évaporée (en utilisant le rota évaporateur) à sec sous pression réduite à 45°C. Le résidu (extrait sec) obtenu est pesé pour calculer le rendement (**Yu et Dahlgren, 2005**).

Pour effectuer les dosages des composés phénoliques (les polyphénols totaux, les flavonoïdes et les tanins) ; une solution mère doit être préparée à partir du résidu obtenu après sa solubilisation dans 3 à 5 ml de l'eau distillée (**Dogyan et al, 2005**).

3.5.1.1 Dosage des polyphénols totaux

La teneur en phénols totaux des extraits des plantes a été déterminée par la méthode de **Singleton et Rossi (1965)** utilisant le réactif de *Folin–Ciocalteu*.

- **Principe**

Le dosage des composés phénoliques est basé sur la réduction de l'acide phosphomolybdique du réactif *Folin-ciocalteu* (un acide de couleur jaune, constitué de polyhétérocycles acides contenant du molybdène et tungstène) par les polyphénols en milieu alcalin (**Catalano, 1999**).

Elle se traduit par le développement d'une coloration bleu foncé due à la formation d'un complexe molybdène tungstène mesuré au spectrophotomètre.

- **Mode opératoire**

Une prise d'essai de 200 µl de chaque extrait (la solution mère ou de sa dilution) est introduite dans des tubes à essais, le mélange (1 ml de *Folin Ciocalteu* dilué 10 fois et 0.8 ml de carbonate de sodium à 7.5 %) est additionné. Les tubes sont agités et conservés durant 30 min. L'absorbance est mesurée à 765 nm en utilisant le spectrophotomètre *JENWAY 7315 UV/ Vis*.

- **Expression des résultats**

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions expérimentales en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à des concentrations finales allant de 100 à 1000 µg/ml par pallier de 100. L'équation déduite de la courbe d'étalonnage Acide Gallique pour la détermination des polyphénols totaux :

$$Ab = 2.916 \cdot C, r^2 = 0.98 \text{ (Annexe).}$$

$$C \text{ µg / ml (Concentration déduite de la courbe d'étalonnage)} = [Ab / 2.916]$$

ε: la pente = 2.916; C: la concentration de l'acide gallique en µg / ml.

La teneur des poly phénols totaux est exprimée en µg/ ml d'acide gallique (AG) est convertie en µgEAG / 100 mg d'extrait sec (ES). La concentration en poids / poids a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$C \text{ mg}_{\text{EAG}} / \text{g ES} = [C \text{ } \mu\text{g} / \text{ml} \cdot V_i \text{ ml} \cdot F / \text{g ES}]$$

Ab: absorbance; V_i : volume initial de récupération de l'extrait sec; F: facteur de dilution (22) ; ES : Extrait sec ; EAG : équivalent acide gallique.

4.1.1.2 Dosage des flavonoïdes au niveau de l'extrait phénolique (acétone/eau)

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode colorimétrique adaptée par **Zhishen et al (1999)**.

▪ Principe

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure

d'aluminium. Les flavonoïdes forment un complexe rose rouge par chélation des métaux (fer et aluminium) qui absorbe à 510 nm. Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule flavonoïde agissant comme donneur d'électrons (**Ribereau- Gayon, 1968**).

▪ Mode opératoire

Une quantité de 500 μl de la solution étalon (catéchine) de à différentes concentrations ou de l'extrait phénolique dilués est ajoutée à 1500 μl de l'eau distillée.

Au temps zéro, 150 μl de nitrite de sodium (NaNO_2) à 5 % est ajouté au mélange. Après 5 min, 150 μl de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) à 10 % (m/v) est rajouté.

Après incubation de 6 min à la température ambiante, 500 μl d'hydroxyde de sodium (NaOH) (1M) est additionné immédiatement, le mélange est complètement agité. L'absorbance de la solution de couleur rose-rouge est mesurée à 510 nm contre le blanc.

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits des plantes médicinales est exprimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme (g) du poids de la matière sèche (μg ECAT/100 mg). Chaque échantillon est répété trois fois.

▪ Expression des résultats

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif (**Annexe**)

L'équation déduite de la courbe d'étalonnage Catéchine pour les flavonoïdes totaux :

$$Ab = 5.1403C ; r^2 = 0.98$$

$$C \text{ mg / ml (Concentration déduite de la courbe d'étalonnage)} = [Ab / 5.1403]$$

Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent catéchine par g d'extrait sec (mg_{ECAT} / g ES) en utilisant la formule suivante :

$$C \text{ mg}_{ECAT} / \text{g ES} = [C \text{ mg / ml. } V_i \text{ ml. } F / \text{ES g}]$$

A: absorbance;

V_i : volume initial ;

F : facteur de dilution ; ES : extrait sec.

4.1.1.2. Dosage des tannins condensés au niveau de l'extrait phénolique (acétone/eau)

• Principe

Nous avons adopté la méthode à la vanilline avec l'HCl. Cette méthode dépend de la réaction de la vanilline avec le groupement flavonoïde terminal des tanins condensés et la formation de complexes rouges (**Makkar, 2000 ; Schofield et al, 2001**), cela s'explique par la propriété des tanins à se transformer en anthocyanidols de couleur rouge par réaction avec la vanilline (**Sun et al, 1998**). La teneur en tanins condensés a été déterminée par la méthode de vanilline- HCL décrite par (**Julkunen-Titto, 1985**).

• Mode opératoire

Un volume de 50 µl de l'extrait brut est ajouté à 1500 µl de la solution vanilline/méthanol (4 %, m/v) et puis mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 750 µl de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) est additionné et laissé réagir à la température ambiante pendant 20 min. L'absorbance à 550 nm est mesurée contre un blanc.

▪ Expression des résultats

Un standard de calibration a été réalisé en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme étalon.

L'équation déduite de la courbe d'étalonnage de la catéchine pour la teneur en tanins condensés : $Ab = 0.1161C$ $r^2 = 0.99$ (**Annexe**).

C mg / ml (concentration déduite de la courbe d'étalonnage) = $[Ab / 0.1161C]$

Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalent catéchine par g d'extrait sec (mg CATE/ g ES) en utilisant la formule suivante : $C \mu\text{g ECAT} / \text{g ES} = [C \text{ mg} / \text{ml} \cdot V_i \text{ ml} \cdot F / \text{ES} \text{ g}]$

Ab : absorbance ; V_i : volume initial ; F : facteur de dilution ; ES : extrait sec.

4.2. Extractions sélectives des flavonoïdes

• Principe

L'extraction des flavonoïdes est réalisée selon la méthode de **Markham (1982)**, avec une modification inspirée selon la méthode de **Bruneton (1993)**. Elle est basée sur le degré de solubilité des flavonoïdes dans les solvants organiques. Cette méthode comprend deux grandes étapes : la première phase d'extraction se fait avec le méthanol, pour solubiliser les flavonoïdes et la deuxième est réalisée avec l'éther diéthylique (extraction des génines libres), et l'acétate d'éthyle (extraction des monoglycosides) et le n-butanol (pour solubiliser les di et les triglycosides). La phase aqueuse restante représente les flavonoïdes les plus polaires polys hydroxylés.

• Mode opératoire

4.2.1. Préparation des extraits bruts

Une prise d'essai de 5g du tourteau est macérée dans un mélange méthanol-eau (80/20 v/v) à 4 °C/24h. Après une double filtration, l'évaporation du filtrat est effectuée à 60 °C sous pression réduite dans un rota-vapeur de marque **Buchi R-200**. Un résidu sec de couleur jaune -orange est pesé pour déterminer le rendement en flavonoïdes totaux. Une fois déterminé le rendement en flavonoïdes totaux, le résidu obtenu est solubilisé dans 100ml d'eau distillée bouillante pour mettre en solution les différents

flavonoïdes et pour accélérer l'extraction liquide-liquide avec des solvants de polarité croissante, l'acétate d'éthyle et le n-butanol respectivement (**Markham, 1982**).

4.2.2 Epuisement de l'extrait brute et fractionnement des flavonoïdes

Dans une ampoule à décanter, la solution aqueuse bouillante va subir en premier lieu une première extraction liquide-liquide avec 100ml l'acétate d'éthyle, après une décantation d'une nuit, la phase acétate d'éthyle est séparée de la phase aqueuse et évaporée à sec à 35°C et le rendement en fraction acétate d'éthyle est déterminé.

La phase aqueuse restante dans l'ampoule à décanter est ré-épuisée avec 100ml de n-butanol, après une décantation d'une nuit la phase n-butanol est séparée de la phase aqueuse et évaporée à sec à 35°C et le rendement en fraction n-butanol est déterminé. La phase aqueuse restante est évaporée à leur tour à sec 35°C et le rendement de la fraction flavonoïde aqueuse, la plus polaire, est déterminé. Chaque fraction résiduelle est récupérée dans 3mL de méthanol pour les analyses ultérieures.

- **Expression des résultats**

Le rendement (ρ) des différentes fractions flavonoïdes est déterminé gravimétriquement en utilisant la formule suivante : $\rho = [BR - BV / PE] \times 100$

BR : poids de ballon rempli de résidu d'extraction en g ;

BV : poids de ballon vide en g.

PE : le poids de la prise d'essai en g ;

100 : par rapport à 100g de matière sèche.

4.3 Extraction sélective des tanins

L'extraction des tanins a été effectuée selon la méthode adaptée par **Zhang et al (2008)**.

- **Mode opératoire**

10g de poudre végétale dégraissée sont ajoutés à 200ml du mélange acétone – eau (35/15, v/v). Laisser macérer pendant 3 jours à la température ambiante. Après filtration et élimination de l'acétone, la phase aqueuse est reprise dans du dichlorométhane (2 x 50 ml) afin d'éliminer les pigments et les traces des lipides. La phase aqueuse lavée est extraite avec 4 X 50 ml d'acétate d'éthyle. Le mélange des phases acétate éthylique récupéré et évaporé à sec à 40°C par un rota vapeur type

HAHNVAPOR-Model : H-S-2005V-N et le rendement en tannins est déterminé gravimétriquement ensuite le résidu est repris par 3ml de méthanol.

- **Expression des résultats :**

Le rendement (ρ) de la fraction tannique est déterminé gravimétriquement en utilisant la formule suivante : $\rho = [BR - BV / PE] \times 100$

Dont : BR poids de ballon rempli de résidu d'extraction en g ;

BV : poids de ballon vide en g ;

PE : le poids de la prise d'essai en g ;

100 : par rapport à 100g de matière sèche.

5. Analyses chromatographiques

5.1. Détermination de la composition en acides gras par chromatographie en phase gaz -liquide (CGL)

La méthode d'analyse des acides gras repose sur une réaction de saponification de la fraction lipidique permettant de libérer des esters de glycérol. Les acides gras libres sont ensuite transformés en des composés volatiles, les esters méthyliques d'acides gras (EMAG). Cette réaction chimique s'appelle la méthylation (**Kamoun, 1993, Etournaud 1999**).

Brièvement, environ 1 ml de NaOH méthanolique (0,5 N) a été ajouté à 200 mg de l'extrait lipidique puis, le mélange a été chauffé à 80 ° C pendant 20 min. Après refroidissement à 4 ° C, 2 ml de solution de trifluorure de bore-méthanol (BF₃) ont été ajoutés, et la méthylation a été effectuée à 80 ° C pendant 20 min. Après avoir refroidi dans la glace, 2 ml de NaCl (35%) plus 2 ml d'hexane ont été ajoutés dans les tubes. Après une agitation vigoureuse et une centrifugation (1200 g / 5 min), la phase supérieure contenant EMAG a été transférée dans un nouveau tube, et analysée par chromatographie en phase gazeuse.

Les échantillons sont quantifiés par un système constitué d'un chromatographe en phase gazeuse (Packard modèle 417) équipé d'une colonne capillaire (30 m (longueur), CP-WAX) couplé à un détecteur à ionisation de flamme (FID). La température de la colonne est programmée de 85 à 210°C et celle de l'injecteur est de 250°C. La température du four a été augmenté de 85°C (1 min) à 150°C après 30 min,

puis de 150°C à 210°C à raison de 4°C/min. Le gaz vecteur étant de l'hélium avec un débit 0.4 ml/min.

Pour identifier chacun des acides gras présents dans l'échantillon analysé, les temps de rétention des composés de l'échantillon ont été comparés avec ceux du mélange d'étalons. Chaque expérimentation est répétée trois fois et les résultats sont exprimés sous forme de moyenne.

5.2. Analyse chromatographique du profil phénolique des extraits des écorces des racines *d'Osyris alba L. Skeel* par la chromatographie liquide à haute performance HPLC-PDA

L'analyse qualitative des composés phénoliques a été réalisée par chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes sur une colonne en phase inverse (RP-HPLC-PDA). Le système est muni d'une pompe binaire, un détecteur à barrette de diode et une colonne Hypersil ODS C18 (150 mm, 4.6 mm, 5 µm).

La phase mobile est constituée par un mélange de deux solvants : solvant A (Eau/Acide acétique 98/2, V/V) et du solvant B (MeOH) avec un débit de phase mobile de 1mL/min et un volume d'injection de 20µL. Les composés phénoliques sont élués en utilisant un gradient d'élution comme suit : 10% de B pendant 5 min, puis à 90% de B pendant 25 min, et 100% de B pendant 15 min. Enfin, le système est laissé pendant 20 min pour équilibration. La détection des composés a été effectuée à 280 nm.

Afin d'élaborer une base de données interne propre au laboratoire des Produits Naturels sur les composés phénoliques, plusieurs standards ont été injectés et enregistrés. L'identification des composés phénoliques dans les différents extraits étudiés a été effectuée par le traitement des chromatogrammes par le logiciel de l'appareil.

Chapitre 2 : Evaluation des Activités Biologiques *in vitro* /*in vivo*

1. Evaluation du pouvoir antioxydant des composés phénoliques (*in vitro*)

1.1. Capacité Anti-oxydante Totale (C.A.T)

La capacité anti-oxydante totale (C.A.T) des extraits est évaluée par la méthode de **Prieto et al (1999)**. Cette technique ressemble beaucoup avec le dosage *Folin Ciocalteu*, il s'agit d'un dosage des espèces antioxydantes existantes dans chaque extrait. La teneur en antioxydant est exprimée en mg équivalents d'acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg_{EAA}/ g MS).

- **Principe**

Cette méthode est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdène Mo (V) MoO_2^+ en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) à pH acide.

- **Mode opératoire**

Dans un tube à essais à vice un volume de 0.3 ml de chaque extrait préparé à une concentration de 1 mg/ml, est mélangé avec 3 ml de solution du Réactif (0.6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium) (**Annexe**).

Ensuite, les tubes sont vissés à demi et incubés dans un bain Marie à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 3 ml de la solution du réactif et 0.3 ml du méthanol et il est incubé dans les mêmes conditions que les échantillons.

L'étalonnage consiste à préparer une gamme de concentration croissante d'acide ascorbique (0.01 mg/ml, ..., 1 mg/ml), 3ml du Réactif de molybdate/phosphate doit être ajoutée à chaque concentration, après agitation et homogénéisation les tubes visés vont subir les mêmes conditions que l'échantillon.

- **Expression des résultats**

La courbe d'étalonnage est tracée en utilisant le programme d'Excel.

L'équation déduite de la courbe d'étalonnage de la vitamine C (l'acide ascorbique)

($Ab = 2.8429C + 0.1159$, $r^2 = 0.9785$) permet de calculer :

1. La concentration des espèces anti oxydantes des différents extraits est exprimée en mg équivalent d'acide ascorbique /ml : $C_{\text{mg/ml}} = [A - 0.1159 / 2.8429]$

2- La concentration des espèces anti oxydantes exprimée en mg Equivalent Acide Ascorbique par g de matière sèche :

$$C_{\text{mg EAA/g MS}} = [C_{\text{mg/ml}} \cdot V_{\text{ml}} \cdot F / \text{MS}_{\text{g}}]$$

A: absorbance;

Vi : volume initial ;

F : facteur de dilution ;

MS : matière sèche.

1.2. Piégeage du radical libre DPPH

Afin d'étudier l'activité anti radicalaire des différents extraits, la méthode utilisée est celle du DPPH (di phényl picryl hydrazyl). Ce dernier est un radical relativement stable. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par **Sanchez-Moreno et al (1998)**.

- **Principe**

Dans ce test, les antioxydants réduisent le di phényl picryl hydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le di phényl picryl hydrazine. Ce passage de la première forme à la deuxième, est accompagné par une diminution de la densité optique (l'absorbance) qui peut s'exprimer par le pourcentage de réduction de DPPH* (**Sanchez-Moreno, 2002**).

Conventionnellement une grande capacité de piégeage (réduction) des radicaux libres est considérée comme une grande activité anti-oxydante (**Lee et al, 2004**).

- **Mode opératoire**

100 µl d'extrait de différentes concentration (entre 0,01 à 1 mg / ml), est ajoutée à 3,9 ml de solution méthanol de DPPH (0,025 g/L). Suite à une agitation et homogénéisation, les échantillons sont maintenus à l'obscurité à température ambiante pendant 30 min.

L'absorbance est mesurée à 515nm, en utilisant un spectromètre UV / Vis JENWAY 7315, et comparée à un contrôle négatif sans extrait [C-] (100 µl de méthanol + 3,9 ml de solution de DPPH).

L'absorbance du contrôle négatif est mesurée à t= 0 min. Un blanc a été préparé pour chaque échantillon en utilisant du méthanol au lieu de la solution de DPPH (100 µl d'échantillon + 3,9 ml de méthanol).

La vitamine C (L'acide ascorbique) préparé dans le méthanol a été utilisé comme contrôle positif [C +] également connu sous le nom de composé de référence ou de standard ; 100 µl d'acide ascorbique ont été préparées à des concentrations (entre 0,01 à 1 mg/ml) et sont ajoutés à 3,9 ml de solution de DPPH. Les essais sont répétées 3 fois.

- **Expression des résultats**

Une diminution de l'absorbance du mélange réactionnel a été considérée comme une forte activité anti-oxydante. Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH (PI%) est présenté par la formule suivante :

$$PI \% (DPPH) = [Ab (t_0)_{\text{Contrôle}} - Ab (t_{30})_{\text{Echantillon ou Contrôle}} / Ab (t_0)_{\text{Control}}] \times 100$$

Dont :

Ab Contrôle - : L'absorbance du Control négative à t = 0

Ab Contrôle + Absorbance d'extrait ou de standard (Vitamine C= Acide Ascorbique) à t =30 minutes.

A partir de la variation du pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration de l'extrait ou de standard (l'acide ascorbique) nous traçons une courbe à partir de laquelle on détermine graphiquement l'IC₅₀ qui est définie comme étant la concentration efficace de l'antioxydant (l'extrait ou standard) nécessaire pour réduire ou inhiber 50% du DPPH.

1.3. Réduction des ions ferriques F.R.A.P

- **Principe**

La réduction de Fe (III) est souvent utilisée comme indicateur de l'activité donneuse d'électrons. La majorité des composés phénoliques utilisent ce mécanisme, de réduction de fer comme un mode de défense antioxydante (**Yildirim et al, 2001**).

Cette méthode est déterminée en utilisant la technique d'**Oyaizu (1986)**.

- **Mode opératoire**

1 ml de diverses concentrations des extraits (entre 0,01 à 1 mg /ml) préparés dans de l'eau distillée sont mélangés avec un tampon phosphate (2,5 ml, 0,2 M, pH 6,6) et 1% de solution de ferricyanure de potassium (2,5 ml, K₃ Fe (CN) 6). Les mélanges sont incubés à 50 ° C pendant 20 min. Après, 2.5 ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. A la fin, 2.5 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2.5 ml de l'eau distillée et 0.5 ml de FeCl₃, 6 H₂O (0.1% fraîchement préparée. L'absorbance est mesurée à 700 nm.

- **Expression des résultats**

L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de fer. L'acide ascorbique (la Vitamine C) préparé à différente concentration est utilisé comme contrôle positif ou standard.

La concentration IC₅₀ qui est définie comme la concentration des antioxydants nécessaire pour réduire 50% de la concentration initiale du thiocyanate ferrique est un indice utilisé pour comparer et exprimer la puissance des capacités réductrices des substances bioactive.

La concentration en extrait fournissant une valeur d'inhibition de 50% (EC₅₀ ou IC₅₀) (µg /ml) est la concentration efficace donnant une absorbance de 0, 5 pour une puissance réductrice. L'IC₅₀ est obtenue à partir du graphe représenté de l'absorbance par rapport aux concentrations d'extrait ou du standard.

1.4. Test de blanchiment de la beta carotène

Ceci a été fait par la méthode de **Graven et al (1992)**

- **Principe**

Elle ressemble à la méthode d'antibiogramme par diffusion des puits : au lieu des puits remplis d'antibiotiques on a des puits remplis d'extraits ou de standards (troues de 4mm de diamètre) (**Figure 21**).

Dans des boîtes de *Pétri* remplies de la gélose contenant de la beta carotène et de l'acide linoléique avec des puits remplis d'extraits ou de standard (de la quercétine). Après 4 heures d'incubation à 45°, les puits qui gardent la couleur orange du bêta-carotène tout autour, possèdent un pouvoir préventif de l'oxydation de la beta carotène par les produits de dégradation de l'acide linoléique.

- **Mode opératoire**

10 ml d'acide linoléique à raison de 2 mg/ml (solubilisé dans l'éthanol) et 10 ml de β -carotène à raison de 2 mg /ml (solubilisé dans de l'acétone) sont ajoutés à 10 ml de gélose fondue (1,2%). La gélose est ensuite versée dans des boîtes de Petri à raison de 25 ml par boîte, les boîtes de la gélose sont laissées refroidies et solidifiées à l'obscurité pour éviter l'oxydation due à la lumière. Après, avoir creusé des puits (4mm de diamètre) à l'aide d'une pipette *Pasteur*, ces dernières sont remplies, à raison de 100 μ l de chaque extrait et standard / (1mg /ml) par puits et Incubées à 45 ° C pendant 4 heures.

- **Expression des résultats**

Une zone de rétention de couleur orange autour des puits indique une activité antioxydante (**Figure 21**). Le diamètre de la zone de rétention est mesuré et comparé à celui du standard (la quercétine). L'éthanol est considéré comme un contrôle négatif.



FIGURE 21 : TEST DE BLANCHISSEMENT DE LA BETA CAROTENE PAR LA METHODE DE GELOSE

2. Evaluation de l'activité antiulcéreuse gastrique chez le rat *Wistar* (*in vivo*)

▪ Principe

Le principe consiste à provoquer d'abord des ulcères gastriques chez les rats *Wistar*, en administrant per os le mélange ulcérogène (éthanol-HCl-eau) 1ml pour chaque rat pendant 15min. Après 15 minutes de l'induction des ulcères aigus, les animaux ont reçu les extraits de la plante (400 mg/kg de rat) ou la ranitidine (la référence à la dose de 4.28 mg/kg de rat) par gavage, à raison de 1 ml d'extrait ou ranitidine par 100 g de poids corporel de rat. (Galati et al, 2001).

Cette étude a permis d'évaluer sur le plan curatif, l'efficacité et le pouvoir de cicatrisation du décocté d'*Osyris alba* dans le traitement des ulcères gastriques.

Elle consiste à tester l'effet curatif de l'extrait aqueux de la plante en étude sur l'ulcère gastrique provoqué, chez les rats *Wistar* par administration d'un agent ulcérogène à un volume de 1ml pour chaque rat.

2.1. Préparation de l'extrait et de la solution standards

Il s'agit des extraits aqueux des écorces des racines d'*Osyris alba* L Skeel.

▪ La poudre de plante décoction à 4 % (400mg/kg de rat)

L'extrait des écorces des racines d'*Osyris alba* est obtenu par décoction, brièvement dans un ballon à fond rond surmonté d'un réfrigérant 4 g de poudre fine de la plante sont mélangés dans 100 ml d'eau distillée, l'ensemble est porté à ébullition pendant 15 mn. L'extrait obtenu a été filtré à l'aide d'une compresse.

▪ L'antiulcéreux de référence :la Ranitidine (4.28 mg/kg de rat)

la dose de 300 mg / 70 kg comme préconisé chez l'homme en cas de traitement antiulcéreux, soit 0,67 mg/ rat (4.28 mg/kg de rat).

2.2. Préparation des animaux d'expérimentation

2.2.1 Choix des animaux

Les expériences sont réalisées sur des rats *Wistar* de sexe male ayant un poids compris entre 110 et 160 g. Ce choix est justifié par quatre raisons :

- le rat est un animal qui est sensible aux phénomènes ulcérogènes.
- selon **Lambert et Levart (1960)**, les expériences pharmacodynamiques réalisées chez le rat sont transposables à l'homme.
- d'un point de vue stabilité hormonale, les rats de sexe male sont plus stables que les femelles.
- le cout de revient du rat est plus abordable par rapport à d'autres espèces comme le lapin et le cobaye.

2.2.2. Condition d'élevage des rats *Wistar*

Les animaux ont été élevés dans les conditions favorables : température (20-25 °C), exposés quotidiennement à 12 heures de lumière (journée) et 12 heures d'obscurité (nuit). Ils ont été nourris à base d'un régime standard à 18% de protéines brutes, sous forme de granulés fabriqués par SARL « AL ALF » (AIN FEZZA Wilaya de Tlemcen). Il est composé des : céréales, tourteaux de soja, issus de meunerie, huile végétale, plus un complexe minéralo-vitaminiques. À cette alimentation s'ajoutait de l'eau du robinet donnée à volonté.

2.2.3. Matériel de chirurgie (Annexe)

2.2.4. Solutions utilisées

2.2.4.1. Solution ulcérogène

Le mélange HCl/ Ethanol est préparé en ajoutant la solution de HCl à 150mM dans l'éthanol à 60% (v/v) (**Annexe**).

L'agent ulcérogène est administré par gavage à la dose de 1 ml pour chaque rat selon la méthode reportée par **Galati (2001)** et **Astudillo et al (2002)**.

2.2.4.2. Solution d'anesthésie

Une solution aqueuse de chloral à 10% (10g/100ml), est administrée à la dose de 0.3ml par 100 g de rat.

2.2.4.3. Solution de lavage des estomacs : une solution aqueuse de Na Cl à 9‰ (9 g/1000 ml).

2.2.4.4. Solution de fixation des ulcères

Une solution aqueuse de formol à 2% (8.1ml du formol concentré (37%) est complété par l'eau distillée jusqu'à 150 ml).

2.2.5. Préparation des animaux

Avant l'expérience les rats Wistar ont été maintenu à jeun pendant 48h avec accès libre à l'eau pour assurer un estomac vide (**Garg et al, 1993**). Pendant la période de jeun, les rats ont reçu un mélange de solution saccharose (8%) et de solution NaCl saline préparée à 0.2% qui a été enlevé 1 heure avant l'expérimentation. Cette procédure a été utilisée pour prévenir une déshydratation excessive pendant la famine (**Glavin et Mikhail, 1976**).

2.2.6. Constitution des lots et Induction d'ulcère par gavage (Figure 22-A)

Nous avons constitué 4 lots de 5 rats chacun.

Lot 1 : contrôle négatif traité avec 1ml d'eau physiologique 9 ‰ NaCl /L (véhicule)

Lot 2 : contrôle positif traité avec 1ml de la solution ulcérogène (Ethanol/HCl/Eau)

Lot 3 : Expérimental traité avec 1ml de la solution ulcérogène + 1 ml des racines d'*Osyris alba* décoctées (4%) par 100 g du poids du rat.

Lots 4 : chaque rat du lot standard est traité par 1ml de la solution ulcérogène (Ethanol/ HCl/ Eau) + 1 ml de la solution de ranitidine à raison de 0.67 mg/ml d'eau distillée.

▪ Remarque

Les extraits aqueux des plantes en études ainsi que l'antiulcéreux de référence sont préparés extemporanément pour éviter les modifications physicochimiques qui peuvent survenir avec le temps.

Au temps t=0 ; les 20 rats ont été gavés en administrant à l'aide d'une sonde à gavage bucco œsophagienne : 1 ml d'eau distillé aux rats du lot 1 ; 1 ml de mélange HCl/

EtOH comme agent ulcérogènes aux lot 2, lot 3 et lot 4 Après 15 minutes, les rats des lots 3 ont reçu le décocté d'*Osyris alba L Skeel* à raison de 1ml/rat les rats du lot standard ont reçu la solution standard (ranitidine) à raison de 1ml/rat (**Galati, 2001**).

Une (1) heure plus tard, tous les rats ont été anesthésiés avec le chloral (10%, à une dose de 0.3ml/100g de rat) et ensuite disséqués.

2.2.7. Prélèvement des estomacs et cotation des ulcérations (Figure 22-C)

Les estomacs ont été prélevés, ouverts le long de la grande courbure et délicatement lavés et rincés avec l'eau physiologique afin de ne pas enlever la couche de mucus de la surface de l'estomac, puis les ulcères sont fixés par la solution de formol à 2% (**Hara et Okabe., 1985**).

Une fois les estomacs fixés sont étalés sur une tablette pour mieux observer les lésions sous une binoculaire (**Galati, 2001**).

À l'examen on peut observer :

- une muqueuse irritée.
- des points et des sillons hémorragiques
- des points et des sillons non hémorragiques

Selon **Lwoff (1971)** seuls sont considérés comme ulcérations, les points et les sillons hémorragiques. Chaque estomac est coté de 0 à 3 selon le nombre d'ulcérations :

0=pas d'ulcérations, 1=1 à 2 ulcérations, 2=3 à 4 ulcérations, 3=plus de 4 ulcérations.

- **Expression des résultats :**

L'index d'ulcération est calculé selon la formule suivante :

$$IU = \frac{\text{Somme des cotations} \times \% \text{ des estomacs présentant des ulcères.}}{\text{nombre d'animaux}}$$

On considère qu'il y a 100% d'ulcération lorsque la somme des cotations est égale à 15, c'est-à-dire lorsque l'index est égal à 3.

Ainsi à partir de l'index d'ulcération (I.U), on peut calculer le pourcentage d'ulcération (P.U) qui est égale à :

$$P.U. = \frac{I.U \times 100}{3}$$

Les lésions ulcéreuses apparaissent dans la muqueuse gastrique allongée en lignes noir-rouge, parallèle le long de l'axe de l'estomac. La longueur de chaque lésion est mesurée à l'aide d'une règle graduée en mm. Ensuite le calcul de l'indice de lésion (Indice d'ulcère) pour chaque estomac est égal à la somme de la longueur de toutes les lésions

À partir du pourcentage on peut déduire le pourcentage d'inhibition des ulcérations (P.I) :

$$P.I = 100 - P.U$$

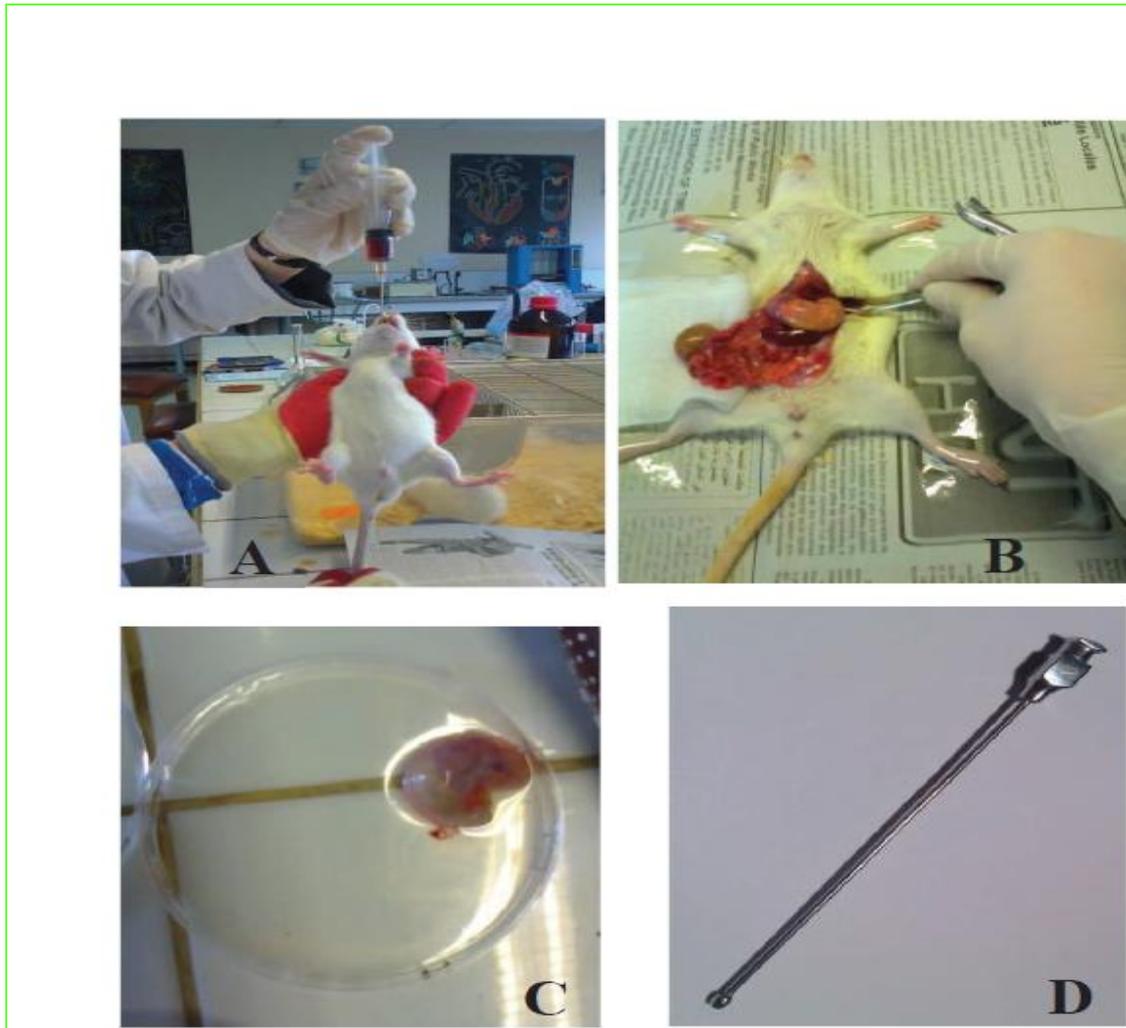


FIGURE 22 : A- GAVAGE ; B- SACRIFICE ; C- PRELEVEMENT ; D-SONDE DE GAVAGE EN INOX

3. Analyse statistique de l'évaluation de l'activité antiulcéreuse

Les moyennes inter et intra lots ont été comparées par analyse de variance (un facteur). Le rapport (F) de la variance inter-groupe à la variance intra-groupe permet de savoir si l'effet du facteur étudié est significatif. Les valeurs de P inférieures à 0,05 sont considérées comme significatives.

Résultats et Discussion

Chapitre 1 : Etude phytochimique d'*Osyris alba L* (Santalacées)

1. Introduction

Osyris alba L Skeel (OA) est connue pour ses propriétés thérapeutiques traditionnelles dans certains pays africains (**Rached et al, 2016**). Comme décocté des écorces des racines *Osyris alba L Skeel* est utilisé, par la population, habitant les montagnes d'Ain Ghoraba et de Beni Snousse (sud-ouest de Tlemcen), comme fortifiant, antianémique et agent anti-inflammatoire intestinal. Compte tenu du caractère héli parasite de *Osyris alba L*, de nombreux ouvrages ont évoqué le mécanisme parasite ainsi que l'anatomie de la partie responsable de son comportement parasite.

Cependant, à notre connaissance, il existe très peu de publications concernant les activités biologiques de cette espèce.

2. Détermination du taux de matière sèche

L'appréciation de la teneur en matière sèche repose sur la détermination du taux d'humidité contenue dans l'échantillon à analyser. L'analyse du taux d'humidité au niveau des écorces de racines *d'Osyris alba L Skeel*, fraîchement récoltés, a montré une proportion estimée à $14.765 \pm 0.02\%$. À partir de cette valeur nous avons pu déterminer le pourcentage en matière sèche (MS) qui s'est révélé important $85.235 \pm 0.17\%$.

Selon **Foudhil (1990)** et **Fraitane (1990)** ; les variations des teneurs en matière sèche peuvent être dues à plusieurs facteurs combinés, liée aux conditions climatiques, au site de récolte. Par ailleurs, **Jiménez et al (1977)** trouvent que les conditions de stockage modifient les teneurs en matière sèche (MS).

Les variabilités des valeurs de l'humidité sont dues principalement à certains facteurs dont :

- Le changement de la température
- Le mode de préparation des échantillons et particulièrement la perte d'eau au cours du broyage.
- L'état physiologique des échantillons.
- La provenance ou le lieu de récolte d'échantillon sachant que le taux d'humidité est proportionnel à l'altitude (**Jiménez et al, 1977 ; CCQ, 2016**).

3. Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques réalisés sur les écorces des racines d'*Osyris alba L.*, ont permis de détecter la présence de différentes familles de composés phytochimiques par des réactions chimiques de caractérisation (**Tableau 4**).

TABLEAU 4 : RESULTATS DES TESTS PHYTOCHIMIQUES DES RACINES D'*OSYRIS ALBA L SKEEL (SANTALACEE)*

Familles chimiques	Extrait aqueux	Extrait éthanol	Extrait éther di éthyle
Saponosides	+++	+++	-
Tanins	+++	+++	-
Flavonoïdes	+++	+++	-
Quinones libres	+	-	-
Coumarines	-	-	-
Alcaloïdes	++	+	-
Amidon	++	-	-
Sucres réducteurs	+++	+++	-

Le screening phytochimique a détecté des fortes teneurs en sucres réducteurs, en saponosides, en tanins de couleur brun verdâtre, en flavonoïdes et des faibles teneurs en quinones libres. Nous avons noté l'absence totale des coumarines. Concernant les alcaloïdes et l'amidon sont présents dans les écorces des racines d'*O. alba L.* ces résultats corroborent avec ceux d'**Iwashina et al, (2001) ; Iwashina et al. (2008) et Aljaber et al, (2010)**, qui ont révélé la présence des alcaloïdes, des composés phénoliques (les flavonoïdes et les tanins) et des sucres réducteurs chez *Osyris alba L.*

De plus, les travaux de **Rached et al (2010)** ; **Rached et al (2016)** qui sont réalisés sur une autre espèce appartenant au même genre « *Osyris quadripartita Salzm* », ont également montré sa richesse en polyphénols et en flavonoides.

4. Dosage des métabolites primaires

Les teneurs en métabolites primaires exprimés en pourcentage de matière sèche, détectées au niveau des écorces des racines d'*Osyris alba L Skeel* sont représentés dans la **figure 23**

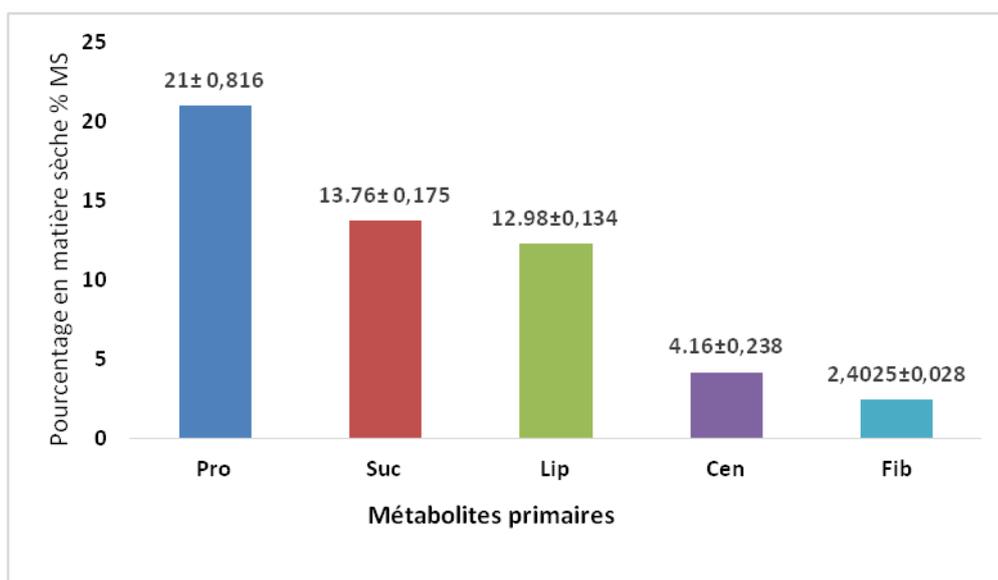


FIGURE 23 : DOSAGE DES METABOLITES PRIMAIRES AU NIVEAU DES ECORCES DES RACINES D'OSYRIS ALBA SKEEL

Pro: Protéines brutes, Lip:Lipides totaux ,Suc: Sucres totaux, Cen: Cendres,
Fib: Fibres alimentaires

Le dosage des métabolites primaires au niveau de l'écorce de la racine d'*Osyris Alba L (EROA)* montre sa richesse en protéines brutes (21 ± 0.816 %) ainsi que des teneurs appréciables en matière de sucres totaux et lipides, avec des taux estimés à $13.76 \pm 0.175\%$ et $12.98 \pm 0.134\%$ respectivement.

Concernant le taux des cendres et des fibres alimentaires ; les analyses révèlent des faibles teneurs comparées à celles des autres métabolites primaires dosés, estimées à $4.16 \pm 0.238\%$ et $2.40 \pm 0.028\%$ respectivement.

Selon la littérature, la détermination de la teneur en métabolites primaires (notamment les protéines brutes) au niveau des plantes, est l'un des critères utilisés pour valoriser la qualité nutritionnelle d'un échantillon.

La teneur en protéine dépend sans aucun doute, des conditions pédoclimatiques (la composition du sol, la température) ainsi de stade de développement de la plante (**Nagy et al, 1978 ; Iwashina et al, 2001 ; Iwashina et al 2008 ; Aljaber et al, 2010**).

Par ailleurs, les variations des teneurs en lipides peuvent être dues aux divers paramètres en particulier la taille des particules de la poudre des échantillons soumises à l'extraction, ainsi que le broyage a pour objet de réduire la dimension des particules et de ce fait augmenter la surface du contact avec le solvant d'extraction (**Buron, 1976 ; Mountasser et Elhaddek, 1999**). Le séchage préalable des poudres des échantillons est un facteur important pour l'accélération de l'extraction car il a comme avantage d'éliminer les quantités d'eau stockées dans la plante et par conséquent il facilite l'extraction. En plus de ces paramètres il ne faut pas oublier la provenance géographique des échantillons notamment le facteur climatique, la date de récolte, la durée et les conditions de conservation.

De plus, la variation au niveau des taux en cendres peut être attribuée à la provenance géographique des échantillons notamment les conditions climatiques (la pluviosité) et les caractères édaphiques des sols (**Buron, 1976 ; Mountasser et Elhaddek, 1999**) et au type de tissu ainsi que de l'activité biologique de chaque partie de la plante (**Linden et Lorient, 1994**).

5. Dosages des métabolites secondaires

5.1. Rendement et analyse spectrophotométrique des composés phénoliques

La présence d'antioxydant naturel dans les plantes est bien connue. Les composés phénoliques végétaux constituent l'un des principaux antioxydants qui agissent comme neutralisateurs de radicaux libres (**Chikhi et al, 2013**). Selon diverses études, il s'est avéré que l'activité antioxydante des extraits des plantes est fortement liée à sa richesse en ces composés (**Cakir et al, 2003**).

Ce potentiel élevé des composés phénoliques à piéger les radicaux peut s'expliquer par leurs groupes hydroxyles phénoliques (**Cakir et al, 2003**). Pour cette raison, la

détermination de la quantité de phénols totaux, de flavonoïdes et de tanins totaux dans l'extrait acétone/eau de l'écorce de racine d'*Osyris alba* a suscité un intérêt particulier.

La teneur en poly phénols totaux au niveau des extraits de plantes a été déterminée par la méthode de **Singleton & Ross (1965)** en utilisant le réactif *Folin-Ciocalteu*. Cette méthode améliorée a recommandé un réactif d'hétéropolyanion molybdo-tungsto-phosphorique pour améliorer la spécificité vis-à-vis des phénols, la lecture de l'absorbance étant prise à 765 nm.

Concernant l'examen des tanins, le test phyto chimique a montré la présence des tanins condensés (couleur vert brunatre) et ces derniers ont été dosés au niveau de l'extrait acétone eau.

À partir de l'analyse, le résultat a clairement montré la richesse de l'écorce des racines d'*Osyris alba* en polyphénols totaux (PT) qui est estimée à $371,67 \pm 3.702$ mg EAG / g ES, suivie par un niveau élevé de tanins condensés (TC) avec $121,146 \pm 1.96$ mg ECAT / g ES, et une quantité considérable de flavonoïdes totaux (FT) estimée à $55,345 \pm 0.099$ mg ECAT / g ES (**Tableau 5**).

TABLEAU 5 : DOSAGE DES TENEURS EN POLYPHENOLS TOTAUX (PT), EN FLAVONOÏDES TOTAUX (FT) ET EN TANINS CONDENSES (TC), AU NIVEAU DES ECORCES DES RACINES

Extrait	Acétone / H ₂ O (70/ 30 v/v)
Rendement %	26.295 ± 0.517
PT (Folin- Ciocalteu ^a)	371.67 ± 3.702
FT ^b	55.345 ± 0.099
TC ^b	121.146 ± 1.96

a : mg EAG/g ES mg Equivalent Acide Gallique/ g Extrait Sec

b : mg ECAT/g ES mg Equivalent Catéchine /g Extrait Sec

Par comparaison avec une espèce proche qui appartient au même genre *Osyris quadripartita* Salzm., Les travaux publiés de **Rached et al, 2010**, ont montré un niveau élevé des poly phénols totaux et de flavonoïdes totaux dans les extraits brutes des feuilles d'*Osyris quadripartita* Salzm avec 438,99 ± 7.52 mg EAG /g ES et 72,09 ± 1.60 mg ECAT/g ES respectivement, cependant, ils ont démontré une quantité inférieure de polyphénols et de flavonoïdes totaux dans la partie des fruits immatures avec 109,49 ± 11.07mg EAG/g ES et 16,95 ± 1.93 mg ECAT/g ES, respectivement.

Selon la littérature, la partie végétale étudiée, les conditions de séchage et les méthodes d'extraction représentent les principaux paramètres qui affectent les taux de composés phénoliques. Les arbres à feuillage sont plus riches en matière de composés phénoliques que les graines ou les racines (**F.A.O./I.A.E.A, 2000**), car les feuilles sont le siège de la photosynthèse et de la production de métabolites secondaires, la partie feuilles est également plus exposée aux conditions extrêmes, comme les rayons UV, la salinité, le changement des conditions météorologiques, les microorganismes et des animaux, ce qui explique la nécessité de produire davantage de composés phénoliques comme substance défensive dans cette partie de la plante (**Croteau et al,2000 ;Dewick, 2002 ; Boizot et Charpentier, 2006**).

L'extraction d'ingrédients actifs à haute valeur ajoutée de la matière végétale, en particulier des polyphénols, est une étape cruciale dans l'isolement ainsi que dans l'identification des composés phénoliques. La solubilité des composés phénoliques dépend de leur nature chimique dans la plante, qui varie des composés simples tels les phénols simples et les acides phénoliques, aux composés hautement polymérisés tels les tanins et la lignine (Jokic et al, 2010).

Cette diversité structurale est responsable de la grande variabilité des propriétés physico-chimiques influençant l'extraction des polyphénols (Garcia Salas et al, 2010). Entre autres, la solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du solvant utilisé. Il est donc très difficile de développer un procédé d'extraction adapté à l'extraction de tous les composés phénoliques de la plante (Koffi et al, 2010 ; Bonnaillie et al, 2012).

5.2. Extractions sélectives et rendements des composés phénoliques

Puisque l'écorce de racine de la plante *Osyris alba L Skeel (EROA)* est utilisée en médecine traditionnelle par la population locale sous forme de tisane, nous avons tenté d'extraire les tanins et de séparer les flavonoïdes et avoir une bonne séparation de ses principes actifs responsables de son pouvoir anti-inflammatoire et donc validant leur utilisation, la méthode d'extraction retenue est basée sur la solubilité différentielle des flavonoïdes dans les solvants organiques (Tableau 6).

TABLEAU 6 : EXTRACTIONS SELECTIVES DES FLAVONOÏDES ET DES TANINS AU NIVEAU DES ECORCES DES RACINES D'OSYRIS ALBA L SKEEL

Extraction sélective des Flavonoïdes	Rendements%
FV ED	0.064 ± 0.009
FV AE	1.143 ± 0.174
FV BUT	4.013 ± 0.609
FVAQ	8.763 ± 0.416
Extractions Sélectives Des Tanins	Rendements%
Epuisement avec acéate éthylique	3.98 ± 0.561

FV : Fraction Flavonoïdes. ED : Ether Di éthyle., AE : Acétate Ethyle., BUT : n-Butanol.,

AQ : Aqueuse., TAN : tanins

Concernant les fractions flavonoïdes, les résultats ont montré un niveau élevé ($8,763 \pm 0.416\%$) avec la fraction aqueuse (FVAQ), contenant le plus de composés phénoliques hydrosolubles. Le rendement de la fraction n-butanol (FVBUT), contenant principalement les di et tri glycosides, est relativement élevé ($4,013 \pm 0.609\%$). Cependant, le rendement de la fraction d'acétate d'éthyle (FVAE) contenant certains aglycones et les monoglycosides est quatre fois inférieur à celui de la fraction n-butanol ($1,143 \pm 0.174\%$) et la fraction éther di éthylique (FVED), riche en aglycones, donne un rendement encore très faible ($0,064 \pm 0.009\%$). Il est à noter que l'étape de lavage (élimination de la chlorophylle et des pigments) avec certains solvants organiques comme le dichlorométhane, l'éther de pétrole affecte les fractions flavonoïdes, en particulier la fraction éther di-éthyle (FVED) (**Bruneton, 1993**).

D'après l'extraction sélective des tanins, l'extrait des tanins (TAN) donne un bon rendement estimé à

($3,98\% \pm 0.561$) (**Tableau 6**). L'extraction des tanins dépend également de leur structure chimique, du solvant utilisé et des conditions opératoires (**Koffi et al, 2010**).

6. Analyses Chromatographiques

6.1. Chromatographie liquide à haute performance HPLC-PDA du profil phénolique

Selon les résultats obtenus (**figure 24**), l'analyse chromatographique de l'extrait des polyphénols totaux PT des écorces des racines d'*Osyris alba L Skeel* a montré la présence de l'Acide Gallique (un acide phénolique) comme composé majoritaire et la présence de la Quercétine (une flavonoïde) comme deuxième composé identifié parmi 19 composés présents dans le chromatogramme.

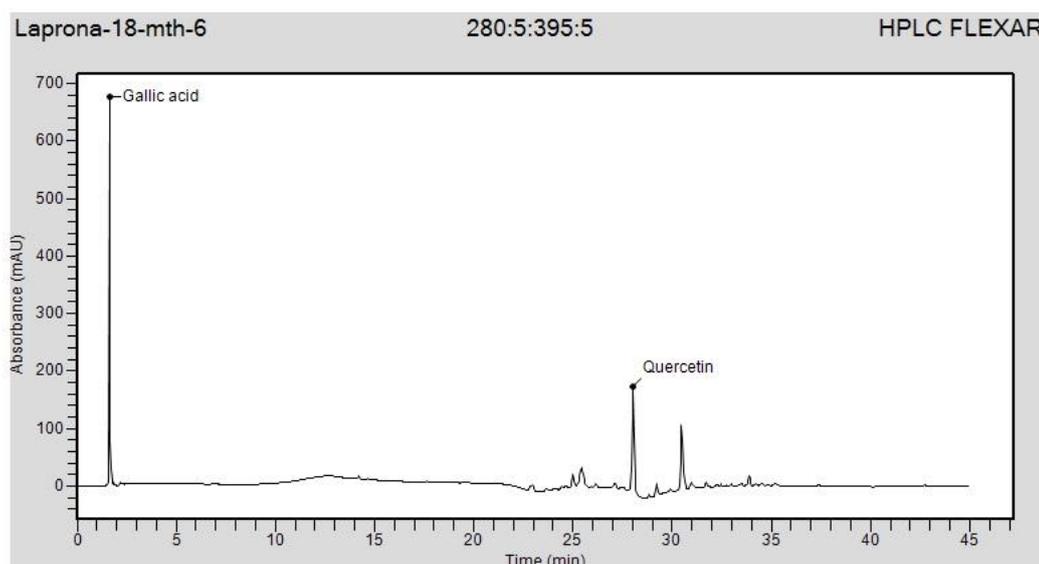


FIGURE 24 : ANALYSE DU PROFIL PHENOLIQUE DE L'EXTRAIT DES POLYPHENOLS TOTAUX (PT) DES ECORCES DES RACINES D'OSYRIS ALBA L SKEEL PAR HPLC

Ces résultats intéressants sont cohérents avec le dosage *Folin Ciocalteu* (**Tableau 5**) qui confirme la forte teneur en polyphénols totaux exprimée en équivalent Acide gallique. De plus la présence de ces deux molécules (Acide gallique et Quercétine), trop connues par leur propriétés antioxydantes, antiinflammatoire, antihistaminiques et antinéoplasiques (**Chong-Hyeon Yoon et al, 2013 ; Zhao et al, 2014 ; Kahkeshani et al, 2019**), dans l'extrait phénolique démontrent que les composés phénoliques de l'écorce de racine *d'Osiris alba L Skeel ont* donc un grand potentiel thérapeutique comme sources de produits de santé naturels.

Concernant la plante étudiée, il n'y pas des travaux qui traitent la partie racinaire de la plante, cependant le travail scientifique d'**Iwashina et al, (2007)** réalisé sur la partie aérienne d'*Osiris alba L Skeel* a montré que la composition flavonoïde des parties aériennes et des fruits était essentiellement similaire, montrée par HPLC et par chromatographie sur papier bidimensionnelle (1^{ère}BAW et 2^{ème} 15% HOAc). Les flavonoïdes ont été identifiés comme de la quercétine 3-O-rutinoside (**Iwashina et al, 2001**) et du kaempférol 3-O-rutinoside (**Iwashina et Hatta, 1998**), par spectres UV selon **Mabry et al (1970)**,

Il a été démontré que les caractères flavonoïdes de la famille des *Santalaceae* sont des flavonols tels que le kaempférol et la quercétine avec des dihydroflavonols (**Gian-nasi, 1988**). Dans cette enquête, un nouveau caractère chimique, les C-glycosylflavones, a également été trouvé dans les parties aériennes et les fruits d'*Osyris alba L Skeel* (**Iwashina et al, 2007**).

Par ailleurs, la caractérisation phytochimique des extraits aqueux et de différentes fractions organiques des feuilles d'une espèce voisine *Osyris quadripartita Salzm. Ex Decne* (**Rached et al, 2016**), en utilisant la chromatographie (HPLC couplée à la détection par barette de diodes et à la spectrométrie à ionisation par électro-pulvérisation (HPLC-DAD ESI / SM), a montré sa richesse en composés phénoliques dont 28 composés phénoliques individuels ont été identifiés : quinze flavan-3-ols, six flavones, quatre flavonols, deux acides phénoliques et un dérivé de flavanone. Les principaux composés abondants dans la fraction d'acétate d'éthyle étaient la (+) catéchine et le dimère de procyanidine B1 (EC-4,8-C). La quercétine-3- O-rutinoside était le principal composé à la fois de la fraction n-butanol et de l'extrait aqueux brut. En comparant avec la littérature, nous avons noté la prédominance de la quercétine comme flavonol dans les extraits analysés ce qui concorde avec nos résultats, cependant l'acide gallique, identifié dans les échantillons étudiés, est totalement absent au niveau des feuilles d'*Osyris alba L Skeel* selon les études d'**Iwashina et al (2007)** et des feuilles d'*Osyris quadripartita Salzm. Ex Decne* selon les travaux de **Rached et al, (2016)**.

Selon la bibliographie, la différence au niveau du profil phénolique des extraits est éventuellement due à différents facteurs phyto-pathogènes (infections bactériennes et mycoses et déficience en oligoéléments et sels minéraux), qui sont directement liés à diverses conditions géographiques, génétiques et culturelles (**Avallone et al, 1997**). De plus, les techniques utilisées et les méthodes de préparation des échantillons influencent beaucoup les concentrations en polyphénols (**Custódio et al, 2011**).

6.2. Détermination de la composition en acides gras par chromatographie en phase gaz-liquide (CGL) :

À notre connaissance, il n'y a aucun rapport dans la littérature concernant la CGL de l'huile extraite de l'écorce de la racine d'*Osyris alba* L Skeel.

L'huile extraite de l'écorce de la racine d'*O. alba* L Skeel (EROA) est de couleur orange-miel, avec un aspect visqueux, une odeur et une saveur prononcée, avec un rendement d'environ $12,98 \pm 0,134\%$. Selon **Jimenez et al, (1977)**, il a été établi que l'extraction de l'huile par solvant organique est la méthode la plus fiable et la plus rentable d'un point de vue économique. Une méthode de chromatographie en phase gazeuse -liquide (GLC) a été développée pour l'analyse quali-quantitative de la composition en acides gras (**Figure 25 ; Tableaux 7**). L'analyse chromatographique a montré la composition diversifiée de l'huile extraite en termes d'acides gras saturés (AGS) et insaturés (AGIS) avec des teneurs estimées à 58% et 42% respectivement (**Tableau 7**).

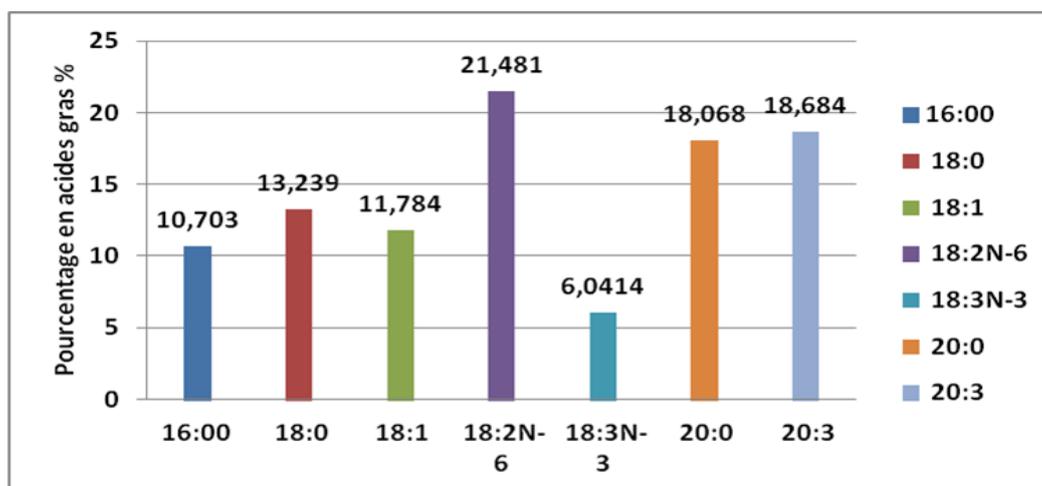


FIGURE 25 : COMPOSITION EN ACIDE GRAS DE L'HUILE EXTRAITE DES ECORCES DES RACINES D'*OSYRIS ALBA* L

TABLEAU 7 : COMPOSITION EN ACIDES GRAS DE L'HUILE EXTRAITE DES ECORCES DES RACINES D'OSYRIS ALBA L. SKEEL

Acides Gras	Symbole	Pourcentage (%)
Acide palmitique	16 : 0	10.703
Acide stéarique	18 : 0	13.239
Acide oléique	18 : 1	11.784
Acide linoléique	18 : 2n-6	21.481
Acide linoléique	18 : 3n-3	6.0414
Acide arachidique	20 : 0	18.068
Acide eicosatriénoïque	20 : 3n-3	18.684
Acides gras saturés	AGS	42
Acides gras insaturés	AGIS	58
AGS/AGIS	-	0.724
AGIS/AGS	-	1.381
Acides gras monoinsaturés	AGMI	11.784
Acides gras polyinsaturés	AGPI	46.2064
AGPI/AGS	-	1.1
AGMI/AGPI	-	0.255
Omega 3	ω -3	21.481
Omega 6	ω -3	24.7254
ω -6/ ω -3	-	0.9
ω -3/ ω -6	-	1.151

Concernant les acides gras saturés (AGS) nous avons l'acide arachidique (Ara) (C20 :0) vient en premier lieu avec une teneur estimée à 18,068%. L'acide arachidique ou acide eicosanoïque est un acide gras saturé à chaîne longue

(AGCL;C20:0) de formule semi-développée $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$. Il est présent dans l'huile d'arachide et d'autres huiles végétales, et les huiles de poisson.

En deuxième position vient l'acide stéarique C18 : 0 avec 13,24%, l'acide palmitique se place en dernier lieu avec 10,70%.

Concernant les acides gras insaturés (AGIS), nous avons révélé la présence des deux catégories : celles des acides gras monoinsaturés (AGMI) avec un pourcentage

de 11,784% et la catégorie des acides gras polyinsaturés (AGPI) avec un pourcentage plus important de 46,2064% (**Tableau 7**). L'analyse montre la présence de l'acide gras mono insaturé (AGMI) (oméga 9) : acide oléique avec une teneur estimée à 11,78%. Selon **Bowman et al, (2012)**, les acides gras monoinsaturés de la série oméga 9 ont pour effet de faire baisser le taux de LDL-cholestérol (mauvais). Ils contribuent donc à réduire les risques de maladies cardiovasculaires et d'hypertension. De plus, cet acide gras est connu par ses effets anti-inflammatoires et anti-cancéreux.

Concernant l'effet préventif du cancer, des études montrent une plus faible présence de cancers du sein, du côlon et de la prostate chez les populations dont l'alimentation est de type méditerranéen avec une consommation élevée d'acide oléique qui est fortement présent dans les olives et l'huile d'olive. Les chercheurs pensent que cet effet protecteur pourrait être attribué en priorité aux antioxydants que l'olive renferme en abondance mais il est possible qu'un apport élevé en oméga-3 et en oméga-9 puisse contrer un effet cancérigène des oméga-6 (**Bowman et al, 2012**).

En ce qui concerne, les acides gras polyinsaturés la caractérisation du profil en acide gras, de l'huile extraite des écorces des racines d'*Osyris alba L Skeel*, a révélé la présence d'un acide gras polyinsaturé à longue chaîne (AGPI -LC), de la série oméga 3, qui est l'acide eicosatriénoïque (ETA) (C20 : 3n-3), aussi nommé l'acide di homo linoléique, qui vient en premier lieu avec une teneur de 18,684%. Il s'agit d'un acide gras rare de la série des oméga-3. Chez l'homme normal, il représente moins de 0,25% des acides gras des phospholipides sériques. Cependant, les études de **Wishart et al (2013)** ont prouvé leur rôle essentiel dans l'inhibition des réactions d'élongation / désaturation des acides gras qui convertissent les acides gras C-18 alimentaires en acides gras C-20. Ces derniers sont des précurseurs des eicosanoïdes

(produits de leur peroxydation enzymatique) intervenant dans les phénomènes inflammatoires (**Wishart et al, 2013**).

De plus, selon des travaux antérieurs il a été montré que l'application topique d'ETA protège contre les dommages cutanés induits par les UV chez les souris sans poils et suggèrent que l'acide gras ETA peut être un agent potentiel pour prévenir et / ou traiter l'inflammation et le photo-vieillessement induits par les UV (**Xing et al, 2010**).

Par ailleurs, la CGL a mis en évidence la présence des acides gras polyinsaturés essentiel (AGE), l'acide linoléique oméga6 (C18 : 2n-6) avec un rendement de 21,48% qui n'est pas loin de la valeur trouvée dans l'huile de Colza (21%) (**Morin et Pares, 2012**). L'acide linoléique est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques. Il intervient dans le fonctionnement du système immunitaire, dans la réponse inflammatoire et dans la fabrication de la membrane cellulaire. Ils interviennent également dans la fertilité et la reproduction, l'intégrité de l'épiderme, contribuent à un taux plus bas de mauvais cholestérol et participent à la prévention de formation d'une thrombose (**Amselem, 2013 ; Matrat, 2016**). Un apport très faible ainsi qu'un excès d'acide linoléique sont délétères au regard du risque cardiovasculaire. Un taux trop élevé favorise l'oxydation des lipoprotéines qui les rendent athérogéniques (**Matrat, 2016**).

Les analyses montrent aussi, la présence d'un autre acide gras essentiel (AGE) oméga 3 de la chaîne moyenne C18(ALA) (acide α -linoléique 6,04%). L'acide linoléique (ALA) est le chef de file de la famille des oméga 3. Il joue un rôle clé au niveau des membranes cellulaires, régule la tension artérielle, diminue le taux de triglycérides, agit sur les réactions inflammatoires, immunitaires (comme l'allergie) et surtout participe à la formation de l'EPA et du DHA. On le trouve dans : l'huile de lin, de noix, de colza, de soja (**Morin et Pares, 2012 ; Amselem, 2013**).

Sur le plan nutritionnel et diététique, l'huile extraite des écorces des racines *d'Osyris alba* est principalement composée d'acides gras insaturés à isomérisation géométrique CIS et ne présente par conséquent aucun problème de digestion ou d'assimilation à l'organisme humain. Nous marquons l'absence d'acide érucique (C22 : 1n-9, oméga 9) (Era) ce qui indique l'huile *d'Osyris alba* comme huile non toxique (**Rahmani, 2005**).

Après avoir classés et analysé les acides gras on a obtenu ces différents ratios :

AGPI/AGS, $\omega 6/\omega 3$, $\omega 3/\omega 6$.

De point de vue nutritionnel ces rapports présentent un intérêt bénéfique pour la santé, du consommateur.

- **Le ratio AGPI/AGS :**

Les résultats du ratio AGPI/AGS de l'huile d'*Osyris alba L Skeel* analysée donne une valeur de 1.1 ce qui lui procure une valeur nutritionnelle très importante en comparaison à d'autres rapports nutritionnels d'AGPI/AGS qui sont inférieure à 1. Ainsi ce ratio joue un rôle très important dans la diminution de la pression artérielle, en faveur d'une réduction du risque de maladies cardiovasculaires (**Hall, 2009**).

La méta-analyse des essais cliniques, dans lesquels les concentrations sériques de cholestérol du groupe avec un ratio AGPI/AGS élevé étaient sensiblement inférieures lors du suivi que celles du groupe témoin, a révélé qu'un régime alimentaire plus riche en AGPI et plus pauvre en AGS diminuait le risque de cardiopathie coronarienne mortelles (CPC) (**FAO, 2014**) Une analyse combinée de onze études de cohorte portant sur les lipides alimentaires et les maladies coronariennes a été présentée lors de la Consultation d'experts (**Jakobsen et al, 2009**). Selon les résultats du projet « Pooling Project of Cohort Studies on Diet and Coronary Disease » qui a combiné les résultats de 11 études de cohorte – toutes conformes aux critères de qualité en matière d'évaluation nutritionnelle, de durée du suivi et d'établissement des faits – afin d'examiner les effets d'une substitution des AGS par des AGMI, des AGPI ou des glucides sur les cas de CPC (cardiopathies coronaires) et les décès qui y sont liés. La principale conclusion est une diminution significative du risque de décès dus aux CPC et de cas de CPC lorsque les AGPI remplacent les AGS. Ainsi que des données issues d'essais cliniques indiquant que le risque de CPC est plus faible avec un régime alimentaire affichant un ratio AGPI/AGS élevé, et les effets des AGPI sur la baisse du Cholestérol de faible densité (C-LDL) et du ratio cholestérol total (C-T)/cholestérol de haute densité (C-HDL), ont poussé la Consultation à conclure qu'il existait des données probantes démontrant un risque inférieur de CPC lorsque les AGPI remplacent les AGS (**FAO, 2014**).

Les acides gras polyinsaturés de type Oméga 3 et Oméga 6, font partie de nombreux éléments naturels essentiels qui opèrent dans notre corps. Cela comprend donc la constitution des membranes cellulaires, le maintien de leur intégrité, le bon fonctionnement des systèmes hormonaux, cérébraux ou encore cardiovasculaires.

En clair, un bon équilibre entre ces deux types d'Oméga est clairement nécessaire pour notre corps. Chacun d'entre eux ne peut se passer de l'autre en termes d'apports, notamment parce qu'ils n'ont pas les mêmes propriétés ni les mêmes effets.

- **Le ratio ω -6/ ω -3 :**

Une bonne alimentation est en grande partie définie par un rapport équilibré dans la consommation d'Oméga3 et d'Oméga6 (**Kris-Etherton et al, 2002**). Selon les recommandations émises par l'Afssa, un ratio proche de cinq doit idéalement être établi. Cela signifie que nous devons respecter un ratio oméga6/oméga3 compris entre 1 :1 et 4 :1 (**ISSFAL, 2004**). En d'autres termes, une alimentation que l'on considère comme équilibrée doit alors apporter cinq molécules d'Oméga 6 pour une seule molécule d'Oméga 3.

Les chercheurs estiment qu'un déséquilibre entre les acides gras ω -3 et ω -6 entraîne certaines maladies inflammatoires et auto-immunes. La diminution du ratio ω -6/ ω -3 dans le régime diminue la synthèse des prostaglandines (PG) et des thromboxanes (TX) de la série 2 et des leucotriènes (LCT) de la série 4. Elle favorise celle des prostaglandines de la série 3 et des leucotriènes de la série 5. Ainsi, il semble que le ratio ω -6/ ω -3 influe sur l'agrégation plaquettaire (**Hall et al, 1992**).

Pour une alimentation équilibrée, et d'après les résultats, nous avons remarqué que le ratio ω -6/ ω -3, de l'huile *d'Osyris alba*, est bien inférieur à 4. (**CGNH, 2002 ; Rahmani, 2005**). Les études montrent qu'un ratio de ω -6 aux ω -3 inférieur à 4 est plus souhaitable pour réduire le risque de nombreuses maladies chroniques qui sont devenues des épidémies dans la plupart des sociétés occidentales.

Des chercheurs du *Center for Genetics, Nutrition and Health de Washington, D.C* (CGNH), ont constaté que plus le ratio ω -6 / ω -3 est faible chez les femmes, plus leur risque de cancer du sein est faible. Un ratio de 2 : 1 supprime l'inflammation chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, et un ratio de 5 : 1 a un effet bénéfique sur les patients asthmatiques (**CGNH, 2002**).

Ratio ω -3/ ω -6 :

L'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail) préconise depuis 2010, un ratio de 1 :5, c'est-à-dire 1 molécule d'oméga 3 pour 5 molécules d'oméga 6 consommées.

Selon les résultats, les analyses de CGL montrent que le ratio ω 3/ ω 6 de l'huile d'*Osyris alba L Skeel* est de 1.15 : 1 c'est à dire 1 molécule d'oméga 3 pour 1 molécule d'oméga-6, ce ratio est plus important que celui préconisé par l'ANSES, ce qui nous amène à déduire que l'huile extraite des racines d'*Osyris alba L Skeel* est de bonne qualité nutritionnelle.

L'alimentation occidentale est souvent trop riche en oméga 6 (entre 10 à 30 fois la quantité journalière recommandée par l'ANSES). Une consommation excessive et répétée d'oméga 6 empêche la bonne assimilation des oméga-3 et induit à la longue, des déséquilibres physiologiques. Par ailleurs et d'après **Bourre et al, (1984)** un régime alimentaire pauvre en ω 3 et en ω 6 peut modifier la composition des cellules et des particules subcellulaires et selon **Eun Jung Chung et al, (1997)**, ce rapport a un effet sur l'évolution comportementale et plus précisément sur les neurotransmetteurs.

Chapitre II : Activités biologiques des écorces des racines d'*Osyris alba L skeel* (invitro /in vivo)

1. Evaluation du pouvoir antioxydant des composés phénoliques in vitro

Il est bien connu que les flavonoïdes, les tanins et les composés phénoliques présentent une activité antioxydante, leurs effets sur la nutrition et la santé humaines sont considérables. Le mécanisme d'action des flavonoïdes passe par le processus de piégeage ou de chélation (Cook *et al*, 1996 ; Kessier *et al*, 2003). Les agents antioxydants agissent comme des neutralisateurs de radicaux libres (Shahidi *et al*, 1992).

À notre connaissance, il n'y a aucun rapport dans la littérature concernant l'activité antioxydante des écorces des racines d'*Osyris alba L Skeel* (EROA).

En raison des facettes réactives et complexes des composés phytochimiques, il est évident que les antioxydants naturels, étant multifonctionnels, ne peuvent pas être pleinement évalués au moyen de méthodes unidimensionnelles uniquement. Donc, comme il est impossible pour un seul essai de refléter avec précision toutes les sources radicalaires, ainsi que tous les antioxydants dans un système complexe, une évaluation valide exige l'utilisation de plusieurs méthodes d'essai qui permettent l'inclusion de différents mécanismes d'inhibition, mais au moins deux systèmes ont été recommandés pour la détermination de l'activité antioxydante afin d'établir l'authenticité (Schlesier *et al*, 2002) (Takashima *et al*, 2012). Pour cette raison, l'activité antioxydante de chaque extrait d'écorce de racine d'*Osyris alba L* a été déterminée par quatre méthodes qui sont : la capacité antioxydante totale CAT, le piégeage de radical libre DPPH, la réduction de l'ion ferrique FRAP et le test de blanchissement de la β -carotène par les dérivés oxydés de l'acide linoléique.

1.1 Capacité antioxydante totale C.A.T

La méthode de la capacité antioxydante totale permet de déterminer la quantité d'espèces antioxydantes existantes dans l'extrait des poly phénols totaux (PT), les tanins (TAN) et les fractions flavonoïdes (FV).

La CAT des composés phénoliques a été exprimé en mg d'équivalents d'acide ascorbique par g de matière sèche. A cet effet, une courbe d'étalonnage a été réalisée

en parallèle, dans les mêmes conditions opératoires, en utilisant l'acide ascorbique comme standard.

L'équation déduite de la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique ($A = 2.8429C + 0.1159$, $r^2 = 0.9785$) (**Figure 26**)

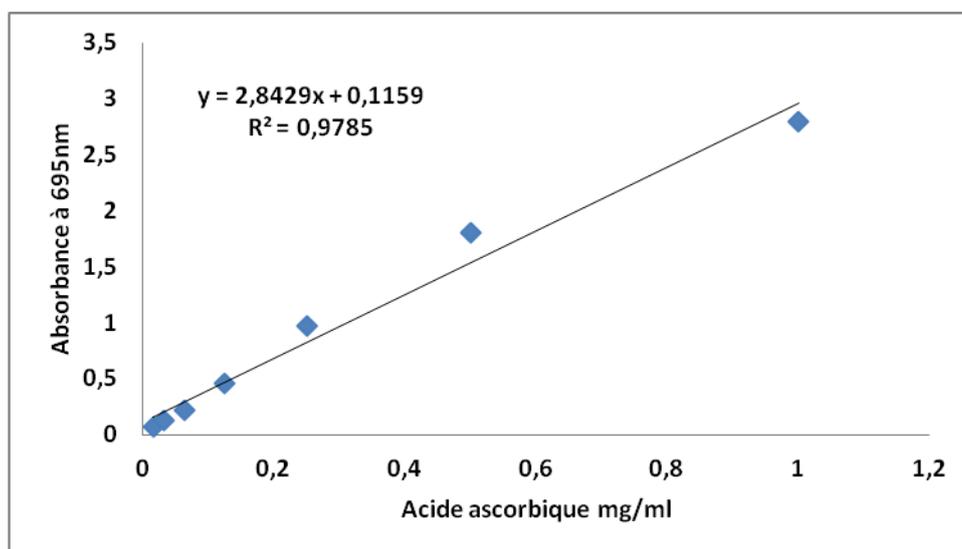


FIGURE 26 : COURBE D'ETALONNAGE DE L'ACIDE ASCORBIQUE (VITAMINE C). C.A.T

Les résultats de la capacité antioxydante totale, exprimés en équivalents d'acide ascorbique de chaque extrait sont présentés dans le **tableau 8**.

TABLEAU 8 : CAPACITE. ANTIOXYDANTE. TOTALE (C.A.T) DES COMPOSES PHENOLIQUES EXTRAITS DES ECORCES DES RACINES D'OSYRIS. ALBA L SKEEL EXPRIMEE EN MG EAA/G MS

Extraits :	EAA mg/g MS
PT	8.815 ± 0.165
TAN	5.038 ± 0.058
FVAE	2.746 ± 0.019
FVBUT	1.65 ± 0.02
FAQ	1.53 ± 0.077

mg EAA/g MS : milligramme Equivalent Acide Ascorbique / gramme de matière sèche

PT : Polyphénols totaux, TAN : tanins, FV : Fraction flavonoïde, AE : Acétate éthylique, BUT : n- butanol,

AQ : Aqueuse.

D'après les analyses, les résultats ont révélé que l'extrait des poly phénols totaux (PT) est l'extrait le plus riche, en matière d'antioxydant, avec une valeur estimée à 8,185 mg EAA /g MS suivi des tanins (TAN) (5,038 mg EAA/g MS), la fraction acétate d'éthyle (FVAE) (4,75 mg EAA / g MS), la fraction n-butanol (FV BUT) (2,97 mg EAA / g MS). La fraction aqueuse (FV AQ) contient la valeur la plus faible (1,65 mg EAA / g MS).

La haute capacité CAT, de l'extrait PT, pourrait être attribuée à la présence de synergie des composés phytochimiques tels que les composés phénoliques, les flavonoïdes et les tanins présentés dans nos résultats précédents, avec des teneurs élevées (**Falleh et al, 2008**). Des études scientifiques ont confirmé cette affirmation, montrant que de nombreux flavonoïdes et poly phénols apparentés contribuent de manière significative à l'activité antioxydante totale de nombreux fruits tels que le raisin rouge (**Negro et al, 2003**), les légumes (**Luo et al, 2002**) et les plantes médicinales (**Bourgou et al, 2008**). De plus, la capacité antioxydante dépend non seulement de la teneur totale en phénol mais de la composition spécifique en phénol, ainsi que le nombre total de groupes hydroxyles phénoliques et leur position sur le noyau aromatique influencent la capacité antioxydante. Il s'est avéré que plus le nombre d'hydroxyles phénoliques orientés ortho ou para est élevé, plus l'activité antioxydante est élevée (**Frankel et al, 1995**).

1.2. Piégeage du radical libre D.P.P.H

La méthode du piégeage du radical libre DPPH est un moyen facile, rapide et sensible pour contrôler l'activité antioxydante de composés spécifiques ou d'extraits de plantes (**Koleva et al, 2002**). Le DPPH est un radical libre stable, qui a été largement utilisé comme outil pour estimer les activités d'élimination des radicaux libres par les antioxydants (**Krishnaiah et al, 2010**).

La valeur EC_{50} OU IC_{50} représente essentiellement la concentration requise pour qu'un antioxydant atteigne 50% de la récupération des radicaux DPPH (**Chen et al, 2013**). Des valeurs d' EC_{50} plus faibles sont liées à une activité d'élimination des radicaux libres plus élevée d'un antioxydant (**Osman, 2011**). Ce paramètre est déterminé graphiquement sur les courbes tracées en pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations du standard (acide ascorbique) et des composés phénoliques testés (**Figures : 27, 28, 29, 30, 31 et 32**).

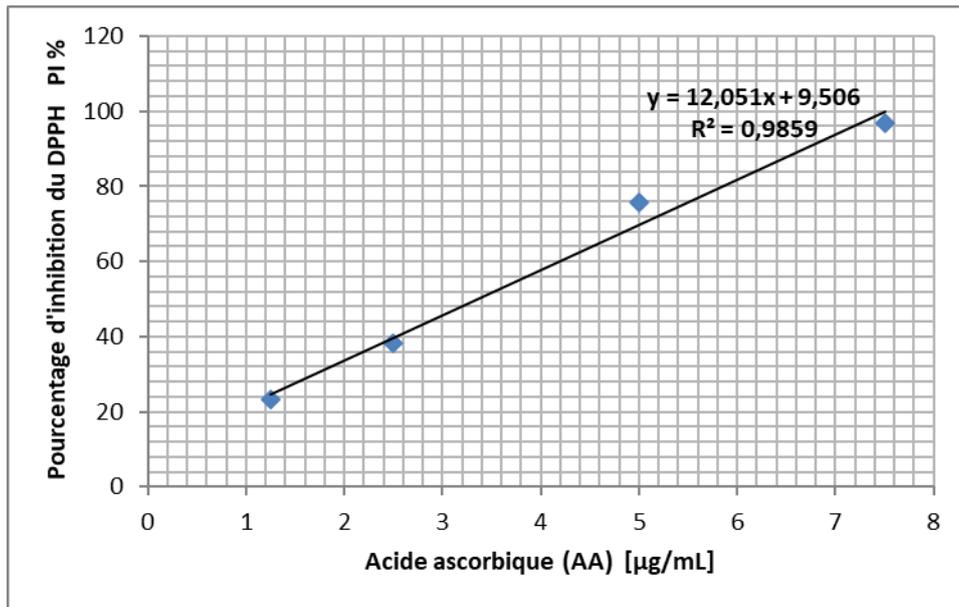


FIGURE 27 : COURBE DU PIEGEAGE DU RADICAL LIBRE DPPH PAR LA VITAMINE C (ACIDE ASCORBIQUE) AA

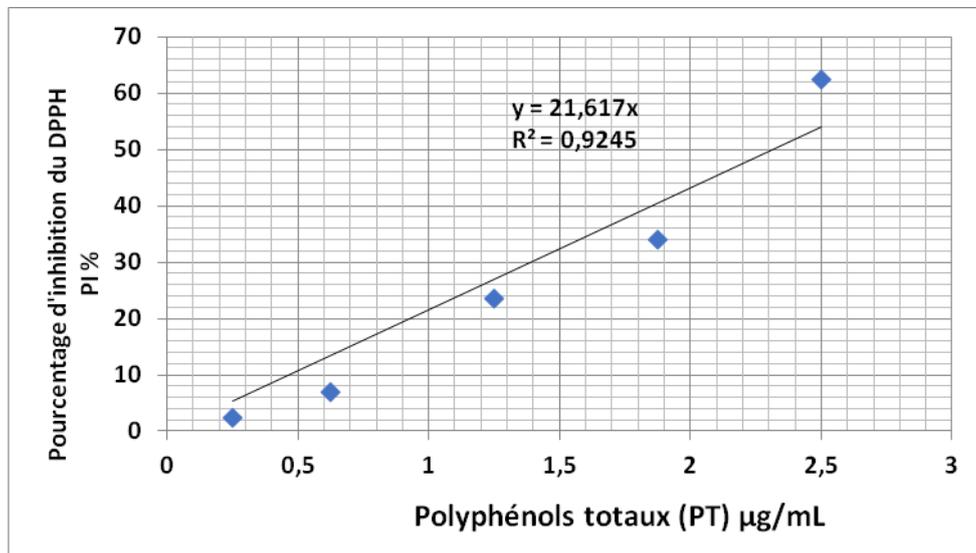


FIGURE 28 : COURBE DU PIEGEAGE DU RADICAL LIBRE DPPH PAR LES POLYPHENOLS TOTAUX (PT)

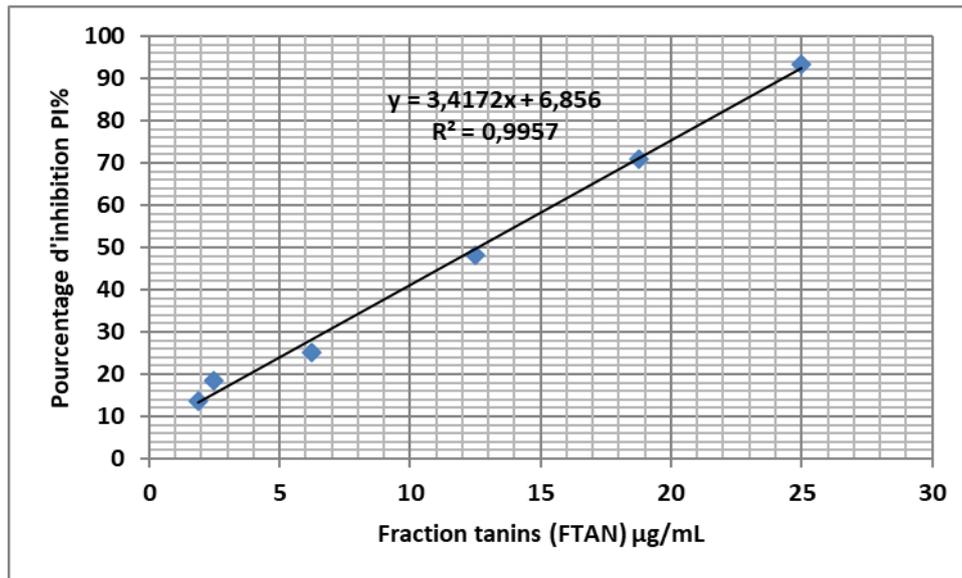


FIGURE 29 : COURBE DU PIEGEAGE DU RADICAL LIBRE DPPH PAR LES TANINS (TAN)

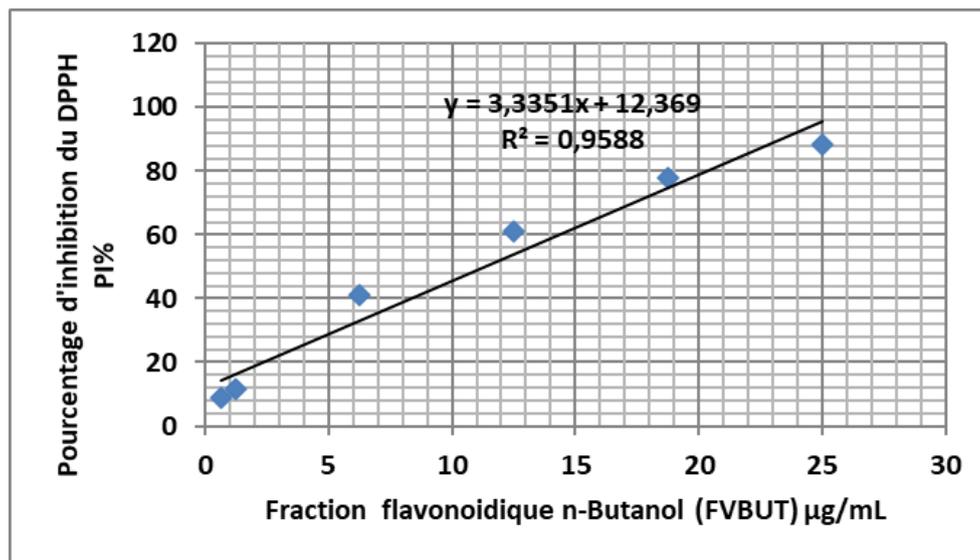


FIGURE 30: COURBE DU PIEGEAGE DU RADICAL LIBRE DPPH PAR LA FRACTION FLAVONOÏDE N-BUTANOL (FVBUT)

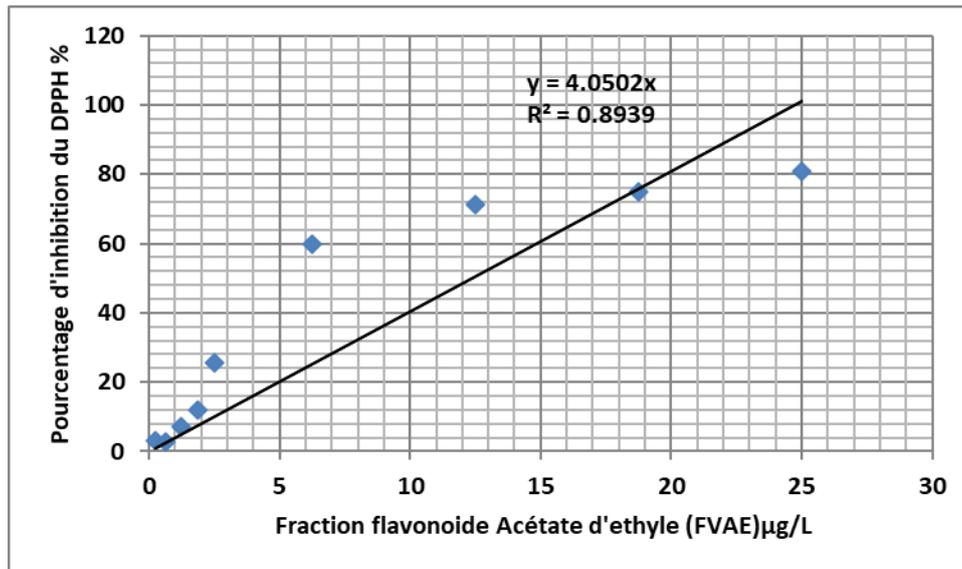


FIGURE 31 : COURBE DU PIEGEAGE DU RADICAL LIBRE DPPH PAR LA FRACTION FLAVONOÏDE ACETATE D'ETHYLE (FVAE)

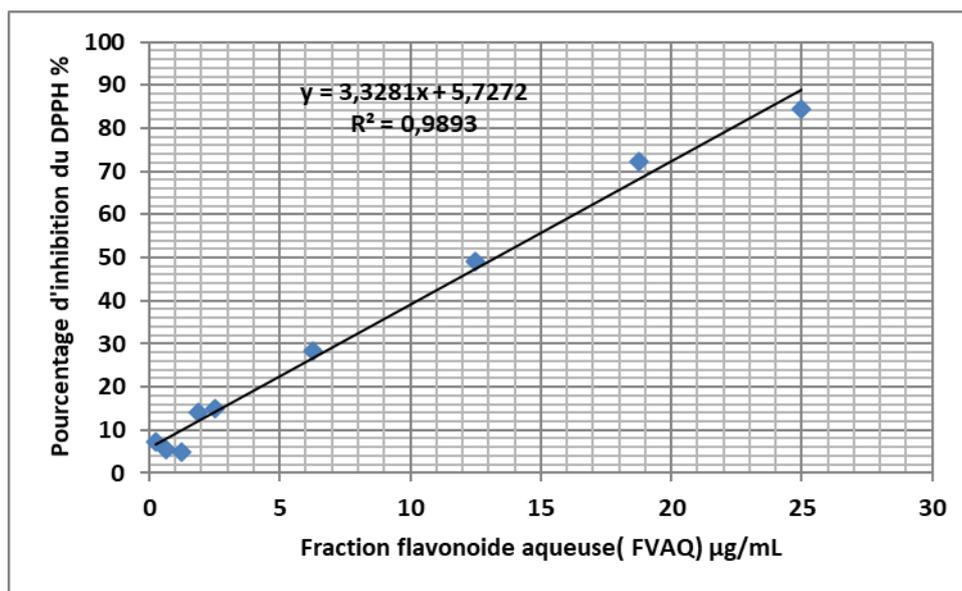


FIGURE 32 : COURBE DU PIEGEAGE DU RADICAL LIBRE DPPH PAR LA FRACTION FLAVONOÏDE AQUEUSE (FVAQ)

D'après l'analyse, nous constatons que tous les composés phénoliques testés de l'écorce de racine d'*Osyris alba* (EROA), y compris l'extrait polyphénols totaux (PT), les fractions flavonoïdes (FV) et L'extrait des tanins (TAN), ont pu piéger les radicaux libres DPPH dans une concentration de manière dépendante (EC_{50}) (**Tableau 9**).

TABLEAU 9 : PIEGEAGE DU RADICAL LIBRE D P P H ET POUVOIR ANTI RADICALAIRE DES COMPOSES PHENOLIQUES EXTRAITS D'EROA EXPRIMEE EN EC50

Extraits	EC ₅₀ µg/ ml ^b
AA	3.317 ± 0.042
PT	2.245 ± 0.047
TAN	12.523 ± 0.097
FVAE	12.292 ± 0.0684
FVBUT	11.184 ± 0.097
FVAQ	13.44 ± 0.235

^b : Concentration inhibitrice (à laquelle 50% du DPPH sont réduits) exprimée en microgramme par millilitre de solution mère. **AA** : Acide ascorbique, **PT** : Polyphénols totaux, **TAN** : tanins, **FV** : Fraction flavonoïde, **AE** : Acétate d'éthyle, **BUT** : n- butanol, **AQ** : Aqueuse.

L'évaluation du pouvoir antiradicalaire nous a montré que l'extrait des polyphénols totaux (PT) est l'extrait le plus actif avec une EC₅₀ (2,245±0.047µg/ml) cette dernière dépasse l'EC₅₀ du standard qui est l'acide ascorbique (AA : vitamine C) (3,317±0.042µg/ml). Nous avons noté le pouvoir important de la fraction flavonoïde n-butanol (FVBUT) (11.184±0.097µg /ml) suivie de la fraction acétate d'éthyle (FVAE) (12.292±0.0684 µg/ml) et l'extrait tanins (TAN)(12.523±0.097µgmL). La fraction flavonoïde aqueuse (FVAQ) (13,44±0.235µg/ml) vient en dernier échelle. En comparaison avec une espèce proche *Osyris quadripartita Salzm.*, Les travaux publiés de **Rached et al, 2016** ont révélé que les fractions flavonoïdes d'acétate d'éthyle (FVAE) et de n-butanol (FVBUT) ont montré une activité importante avec des EC₅₀ = 5,2 µg/ml et 10,3µg/ml respectivement, qui ne sont pas très loin de nos fractions analysées. Selon **Gurib-Fakim (2006)**, les plantes médicinales contiennent généralement des mélanges de différents composés chimiques qui peuvent agir individuellement, en complément ou en synergie pour améliorer la santé.

Le pouvoir antioxydant élevée de l'extrait des polyphénols totaux (PT) peut s'expliquer par l'effet synergique des différents composés phénoliques (phénoliques, flavonoïdes et tanniques) qui subsistent dans le mélange de l'extrait brut hydro-acétone.

Dans ce contexte, des investigations visant l'effet antioxydant synergétique de quelques flavonoïdes et acides phénoliques ont confirmé que la combinaison de l'acide gallique et la quercétine a donné un pouvoir synergétique antioxydant de l'ordre de 55.2%, de plus, les travaux ont montré que la mélange de l'acide gallique et l'acide caféique présentent l'effet synergique le plus actif avec un pourcentage de 137.8% (**Hajimehdipoor et al, 2014**).

1.3. Réduction des ions Ferriques F.R.A.P

La réduction du Fer (III) est souvent utilisée comme indicateur de l'activité donneuse d'électrons, qui est un mécanisme important de l'action antioxydante phénolique (**Yildirim et al, 2001**). Dans le test FRAP, l'évaluation du pouvoir réducteur est basée sur la présence de réducteurs dans les extraits qui provoquent la réduction du complexe Fe III / ferricyanure en la forme ferreuse Fe II (**Chung et al ,2002**), (**Amarowicz et al, 2004**) (**Frankel et al, 1995**).

Dans ce test, en fonction du pouvoir réducteur des composés antioxydants, la couleur jaune des solutions d'essai se transforme en différentes nuances de vert et de bleu. Par conséquent, en mesurant la formation de bleu de Prusse de Perl à 700 nm, nous pouvons surveiller la concentration de Fe II (**Gordon, 1990**).

La concentration d'extrait fournissant une valeur d'inhibition de 50% (EC50 ou IC50) ($\mu\text{g/ml}$) est la concentration efficace donnant une absorbance de 0,5. Ce paramètre est déterminé graphiquement sur les courbes tracées en absorbance (densité optique) en fonction des différentes concentrations du standard (acide ascorbique) et des composés phénoliques testés (**Figures 33, 34, 35, 36, 37, 38 et 39**).

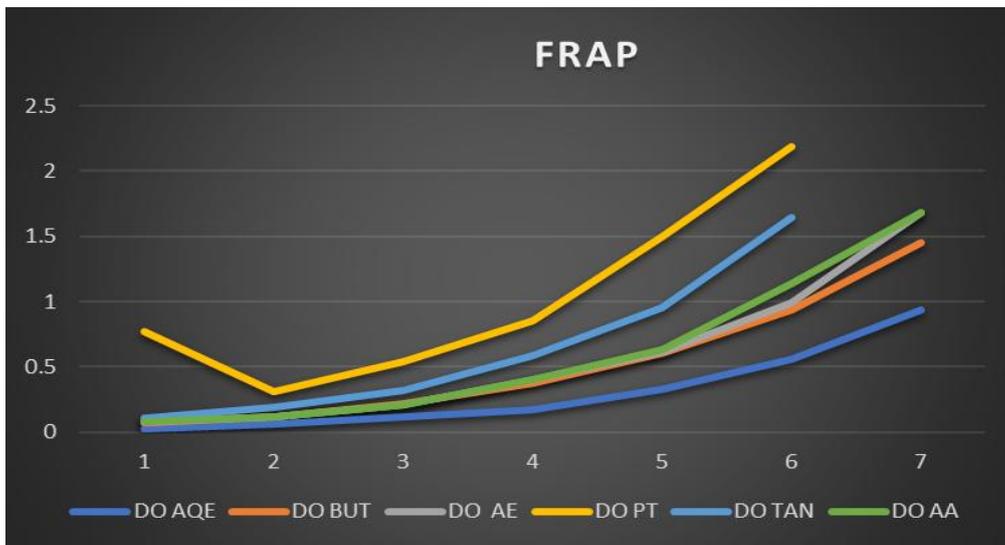


FIGURE 33 : REDUCTION DES IONS FERRIQUES PAR LES COMPOSES PHENOLIQUES

DO : densité optique ou absorbance, AA : Acide ascorbique, PT : Polyphénols totaux, TAN : tanins, AE : Acétate d'éthyle, BUT : n- butanol, AQ : Aqueuse

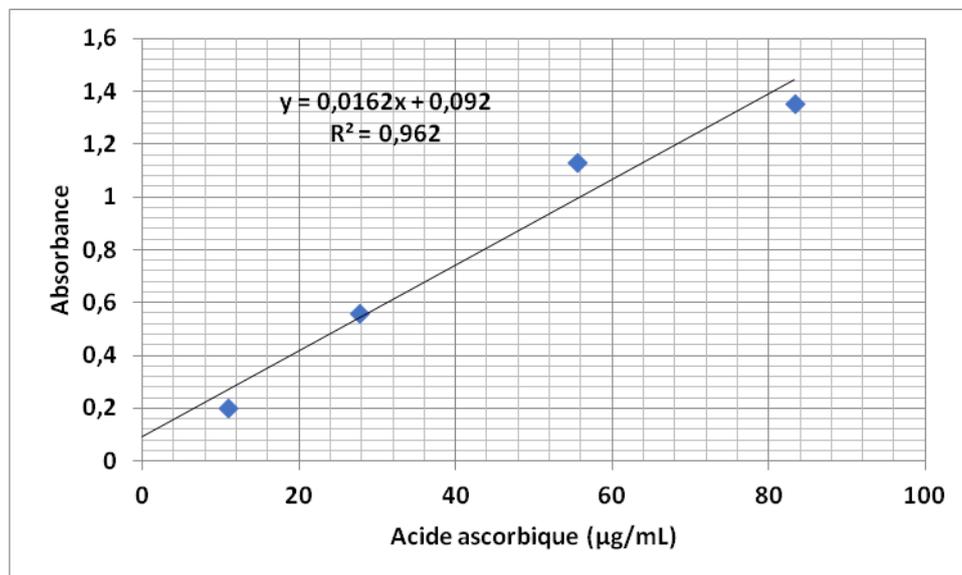


FIGURE 34 : COURBE DE REDUCTION DES IONS FERRIQUES PAR LA VITAMINE C (ACIDE ASCORBIQUE) (AA)

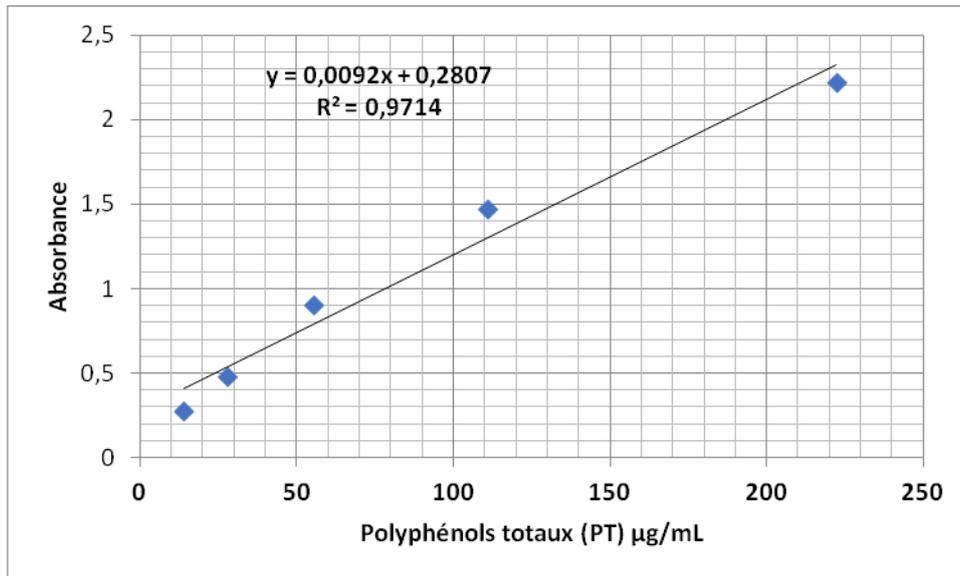


FIGURE 35 : COURBE DE REDUCTION DES IONS FERRIQUES PAR LES POLYPHENOLS TOTAUX (PT)

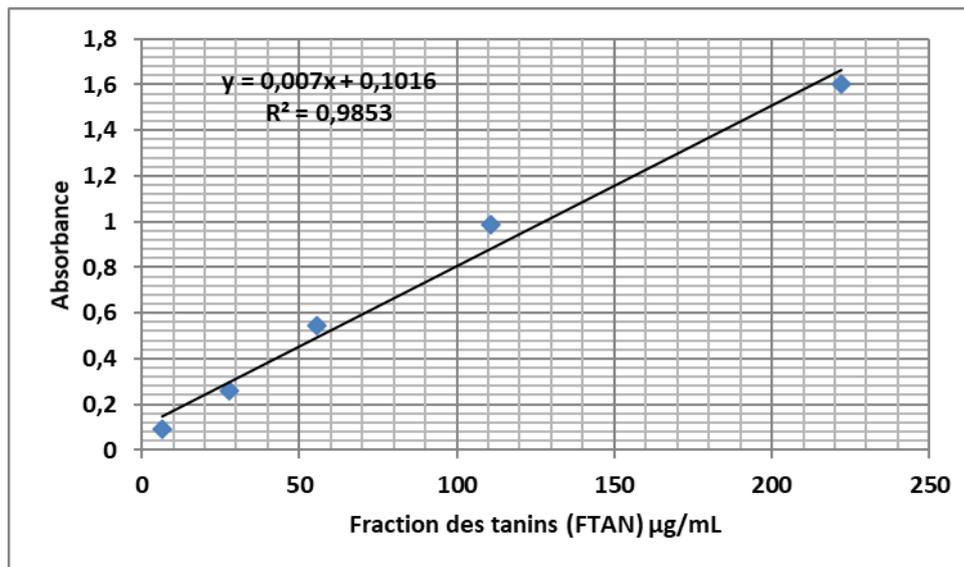


FIGURE 36 : COURBE DE REDUCTION DES IONS FERRIQUES PAR LES TANINS (TAN)

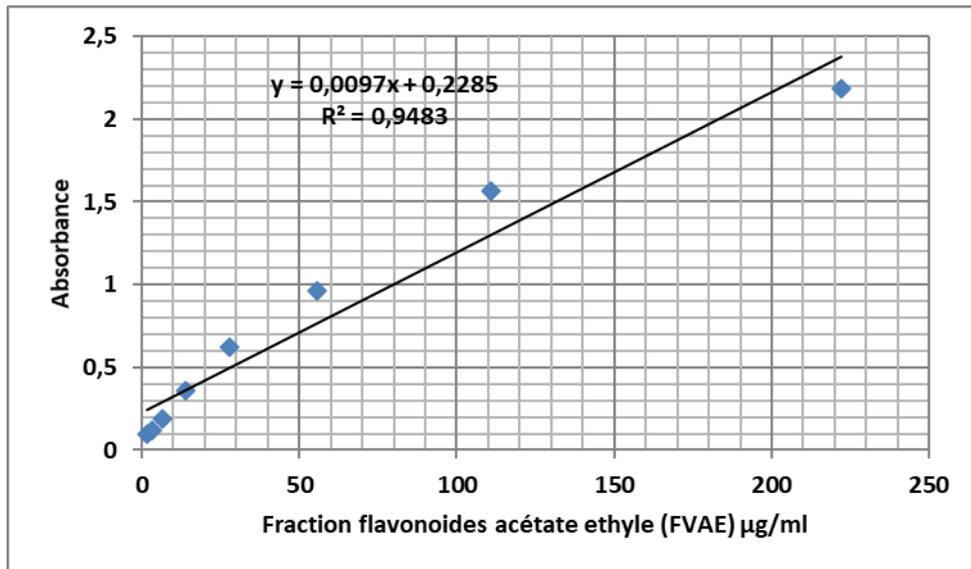


FIGURE 37 : COURBE DE REDUCTION DES IONS FERRIQUES PAR LA FRACTION FLAVONOÏDE ACETATE ETHYLE (FVAE)

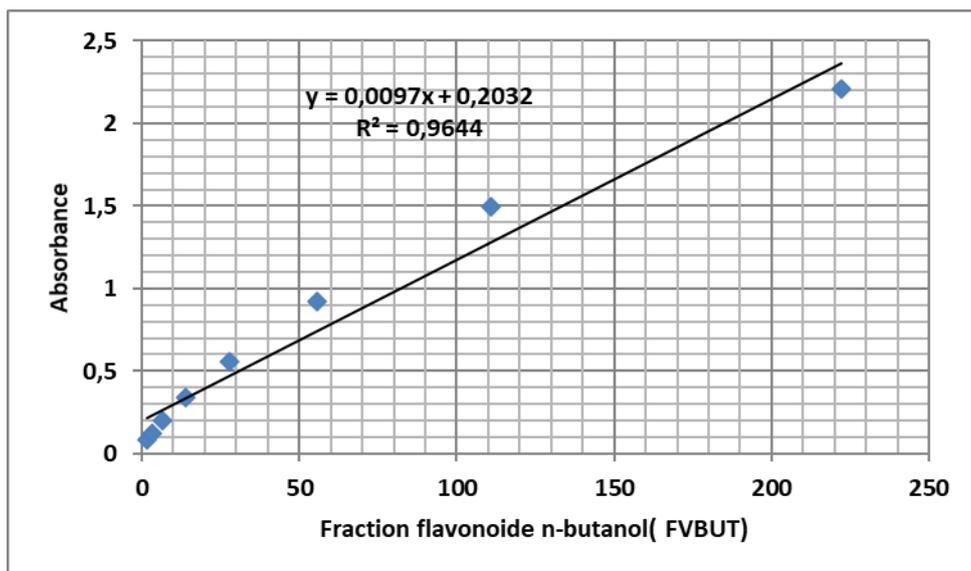


FIGURE 38 : COURBE DE REDUCTION DES IONS FERRIQUES PAR LA FRACTION FLAVONOÏDE N-BUTANOL (FVBUT)

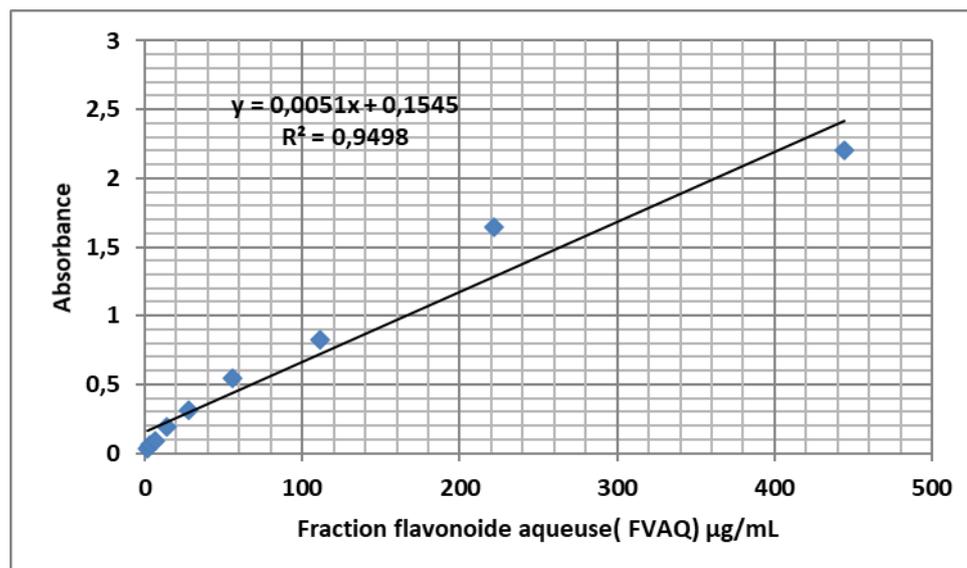


FIGURE 39 : COURBE DE REDUCTION DES IONS FERRIQUES PAR LA FRACTION FLAVONOÏDE AQUEUSE (FVAQ)

Comme le montre le **Tableau 10**, tous les composés phénoliques testés de l'écorce de racine d'*Osyris alba L Skeel*, y compris : l'extrait des polyphénols totaux (PT), les fractions flavonoïdes (FV) et la fraction tanins sont capables de réduire le fer. Nous avons remarqué que l'extrait des polyphénols totaux (PT) vient en premier lieu avec une IC_{50} ($22,565 \pm 1.108 \mu\text{g/ml}$) inférieure à l'acide ascorbique (AA) ($24,345 \pm 0.904 \mu\text{g/ml}$). Puisque la capacité réductrice des ions ferriques des polyphénols totaux (PT) est plus élevée que la vitamine C (acide ascorbique), il est évident que l'extrait présente un potentiel réducteur et peut servir de donneur d'électrons, mettant fin à la réaction radicalaire en chaîne.

Dans la fraction flavonoïde, nous notons le pouvoir réducteur important de la fraction acétate d'éthyle (FVAE) ($27,176 \pm 0.813 \mu\text{g/ml}$) suivie de la fraction n butanol (FVBUT) ($29,88 \pm 0.71 \mu\text{g/ml}$). Les tanins (TAN) et la fraction flavonoïdes aqueuse (FVAQ) sont classés dans la dernière échelle ($54,603 \pm 1.75$ et $66,728 \pm 1.747 \mu\text{g/ml}$ respectivement). En comparaison, avec la méthode précédente (tests C.A.T et DPPH), nous pouvons clairement observer la grande similitude des résultats. Ces résultats prouvent que l'extrait brut d'hydro acétone de la racine d'écorce est riche en réducteurs, en particulier les composés phénoliques qui produisent l'activité antioxydante totale, présentée dans (**Tableau 10**). Par conséquent, le pouvoir

réducteur est un aspect très important pour l'estimation de l'activité antioxydante (Ksouri et al, 2008).

TABLEAU 10 : POUVOIR DE REDUCTION DES IONS FERRIQUES (F.R. A. P) DES COMPOSES PHENOLIQUES EXTRAITS D'EROA EXPRIMEE EN EC50

Extraits :	EC ₅₀ (µg/ ml °)
AA Vit C	24.345 ± 0.904
PT	22.565 ± 1.108
TAN	54.603 ± 1.75
FVAE	27.176 ± 0.813
FVBUT	29.88 ± 0.71
FAQ	66.728 ± 1.747

EC₅₀ : concentration inhibitrice (à laquelle 50% des ions ferriques sont réduits en ions ferreux) exprimée en microgramme par millilitre de solution mère.

AA : Acide ascorbique, PT : Polyphénols totaux, TAN : Fraction tannins, FV : Fraction flavonoïde, AE : Acétate éthyle, BU : n- butanol, AQ : Aqueuse.

1.4. Test de blanchiment de β-carotène

Dans la méthode au β-carotène / acide linoléique, le β-carotène subit une décoloration rapide en l'absence d'antioxydant.

La présence d'un antioxydant peut entraver l'étendue de la destruction du β-carotène en neutralisant le radical libre linoléate et tout autre radicaux libres formés dans le système (Kamath et al, 2007).

Le test de blanchiment β-carotène/acide linoléique est appliqué pour évaluer le potentiel de chaque extrait à inhiber les lipides par oxydation, qui mesure la capacité de réduire l'oxydation de l'acide linoléique et d'inhiber la formation des hydroperoxydes de diène conjugué lors de l'oxydation de l'acide linoléique (Koleva et al, 2002) (Tepe et al, 2005).

Les résultats ont montré la présence des halos orange autour des puits contenant les différents extraits d'écorce de racine d'*Osyris alba* L (EROA) (Figure 40).

Les diamètres de rétention (∅) de la couleur orange autour des puits, contenant différents extraits d'écorce de la racine d'*Osyris alba* L, ont été comparés à celui de la

Quercétine (le standard) en tant que contrôle positif, étant donné que la concentration de chaque extrait et de contrôle positif (standard) est de 1mg / ml.

D'après l'analyse, les tanins (TAN) présente le plus petit diamètre (\varnothing 12.233 \pm 0.2054 mm) et par conséquent cette dernière présente le plus faible pouvoir de rétention de la beta carotène, tandis que les fractions acétate d'éthyle (FVAE) et n-butanol (FVBUT) ont montré un pouvoir, de rétention de la beta carotène, important avec des diamètres de 18.67 ± 0.235 mm et 18.4 ± 0.534 mm respectivement, ces valeurs sont légèrement inférieure que celles obtenues avec le standard la quercétine (21 ± 0.8164 mm). L'extrait des polyphénols totaux (PT) et la fraction flavonoïde aqueuse (FVAQ) ont révélé une activité de protection de la beta carotène, moyenne avec des valeurs estimées à 15.5 ± 0.4082 mm et 15.833 ± 0.235 mm respectivement (**Tableau 11**).

Ces résultats indiquent que les extraits polyphénols, tannins et flavonoïdes de l'écorce de racine d'*Osyris alba L Skeel* possèdent un potentiel antioxydant important dû aux poly phénols, en particulier les flavonoïdes qui stabilisent le radical peroxyde par don d'hydrogène. Selon **Liyanan-Pathirana et Shahidi (2006)**, un extrait qui inhibe ou retarde le blanchissement du Bêta-carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant primaire.

TABLEAU 11 : POUVOIR DE RETENTION DE LA BETA CAROTENE PAR LES COMPOSES PHENOLIQUES EXTRAITS DES ECORCES DES RACINES D'OSYRIS ALBA L SKEEL EXPRIMEE EN \varnothing D

Extraits	\varnothing mm ^d
C- Eth	6 \pm 00
C+ QEC	21 \pm 0.8164
PT	15.5 \pm 0.4082
TAN	12.233 \pm 0.2054
FVAE	18.67 \pm 0.235
FVBU	18.4 \pm 0.534
FAQ	15.833 \pm 0.235

d : diamètre en millimètre des zones de rétention de la couleur orange

C-ETH : Control Négatif : L'Ethanol, **C+ QEC** : Contrôle Positif : La quercétine, **PT** : Poly phénols totaux, **TAN** : tanins, **FV** : Fraction flavonoïde, **AE** : Acétate éthyle, **BUT** : n- Butanol, **AQ** : Aqueuse.

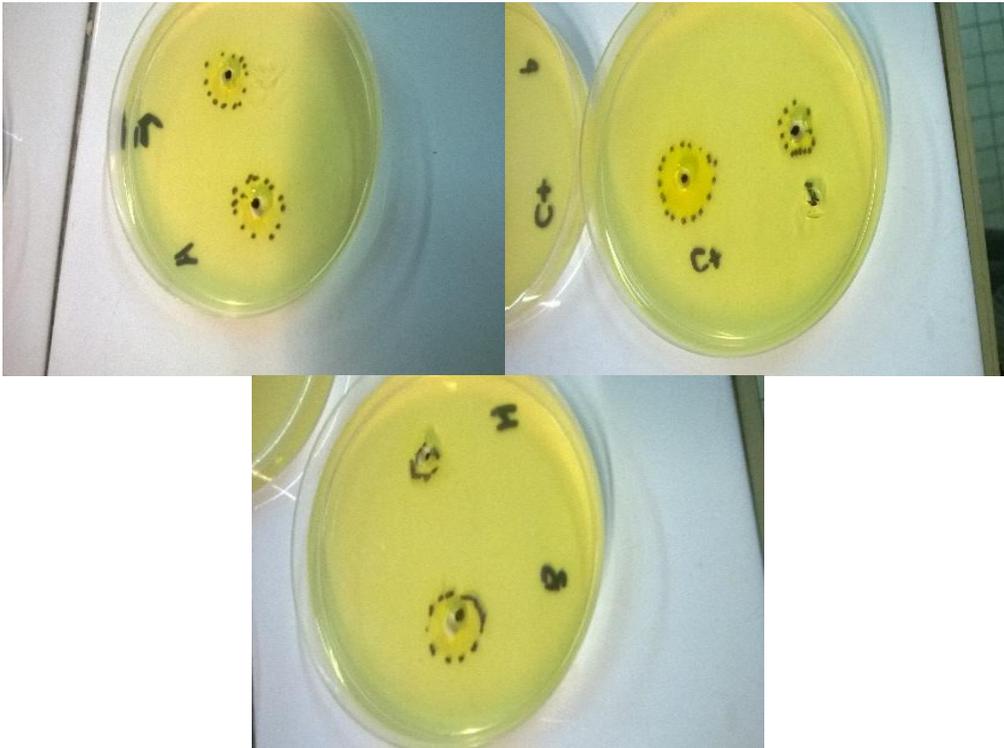


FIGURE 40 : RETENTION DE LA COULEUR DE LA BETA CAROTENE AUTOUR DES PUIITS CONTENANT LES ANTIOXYDANTS

II. Pouvoir cicatrisant de l'ulcère gastrique provoqué chez le rat *Wistar* par le décocté des racines d'*Osyris alba* L Skeel (IN VIVO)

A partir des résultats obtenus nous avons constaté que le traitement à titre curatif par le décocté aqueux des racines d'*Osyris alba* L Skeel est efficace contre l'ulcère gastrique, ce que nous avons remarqué ; la disparition des lésions gastriques, l'absence des éclatements vasculaires, et une production non négligeable de mucus en comparaison avec les témoins (Figure 41 A-B).

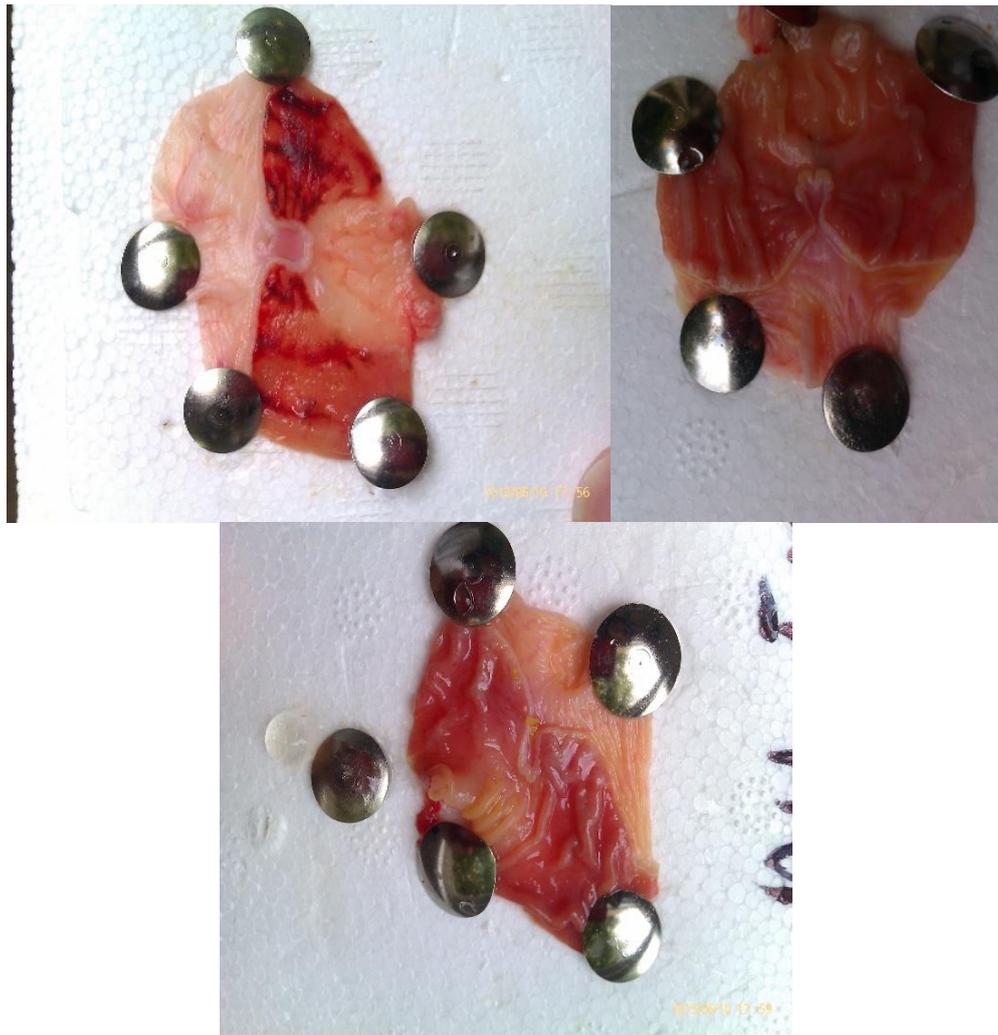


FIGURE 41 : A- ESTOMAC ULCERE PAR LE MELANGE ALCOOL/HCL B-ESTOMAC ULCERE ET TRAITÉ PAR L'EXTRAIT DES ECORCES DES RACINES D'OSYRIS ALBA L

Selon les analyses effectués, l'effet cicatrisant de l'extrait aqueux des écorces des racines *d'Osyris alba L Skeel*, sur l'ulcère gastrique provoqué, chez les rats *Wistar* montre que ce dernier *a* significativement réduit l'ulcération avec un pourcentage d'inhibition qui excède les 98,67 % à la dose de 400 mg/kg de poids corporel (**Tableau 12**). En d'autres termes, à la dose de 400 mg/kg, *Osyris alba L Skeel* revêt une activité antiulcéreuse hautement significative ($P\ value = 9.226E-18 \ll \alpha = 0.05$) (**Annexe**) à un degré plus important que l'antiulcéreux de référence (La Ranitidine) (**Tableau 12**). Cela peut être expliqué que la ranitidine (une molécule pure de conformation connue) va réagir à de très faible dose directement sur le récepteur cible membranaire et donne un effet biologique significatif, alors que l'extrait aqueux de la plante renferme toute une multitude de molécules qui vont agir comme un puzzle pour donner un effet biologique puissant (**Iserin, 1999**).

En effet, ingérée par voie orale, la Ranitidine, absorbée au niveau de l'intestin grêle, passe par la voie hématogène pour agir au niveau des récepteurs histaminiques des cellules cibles pariétales dont il est un agoniste et où il exerce une action antagoniste de celle de l'histamine. Le récepteur histaminique est un récepteur de type 2 (H_2), couplé à l'adénylcyclase. La liaison histamine-récepteur histaminique H_2 active cette adénylcyclase, ce qui conduit à la formation d'AMPc. Ce second messager active à son tour une ou plusieurs protéines kinases qui vont enfin stimuler le transport de l'acide chlorhydrique dans la lumière gastrique en catalysant la phosphorylation de certaines protéines. La Ranitidine, exerce de ce fait une action antisécrétoire en se couplant au récepteur histaminique (**Mignon, 1983 ; Bouvenot, 1995**)

Selon les travaux d'**Abebaw et al, (2017)** l'activité antiulcéreuse de l'extrait brute des feuilles *d'Osyris quasripartita Decne*, une espèce voisine de notre espèce étudiée (*Osyris alba L Skeel*), a montré un pourcentage d'inhibition égal à 85.35 % à la dose de 400mg/kg de poids corporel. Ce dernier est inférieur à celui trouvé par notre espèce.

Par comparaison avec les pourcentages d'inhibition de l'ulcère gastrique de quelques plantes médicinales connues par leurs pouvoirs anti inflammatoire et antiulcéreux (*Quercus coccifera L* 99,5 %, *Inula viscosa L*. 97.2 %, *Rosmarinus officinalis* 96.1%, *Punica granatum L*. 94,7 %, *Glycyrrhiza glabra L*. 92,9%) (**Alkofahi et Atta, 1999**), nous avons noté que le décocté des racines *d'Osyris alba L* vient en deuxième lieu (98.67%) après *Quercus coccifera L* (99.5%).

TABLEAU 12 : ACTIVITE ANTIULCEREUSE DE L'EXTRAIT AQUEUX (LE DECOCTE) DES ECORCES DES RACINES *D'OSYRIS ALBA L SKEEL*

Lots	% des rats présentant des ulcères	Index D'ulcération I.U	% D'ulcération P.U	%d'inhibition d'ulcère gastrique P.I (<i>P value</i> = 9.226 E-18 << α = 0.05)
Contrôle négatif 1ml d'eau physiologique	-	-	-	-
Contrôle positif 1ml d'agent ulcérogène (HCl/Ethanol)	100	3	100	0
Standard Ranitidine 4.8mg/kg de poids corporel A raison de 1.5ml/100g de matière vivante	50	1.4	46.6	53.4
Décoctés des écorces des racines <i>d'Osyris alba L Skeel</i> 400mg/kg de poids corporel A raison de 1.5ml/100g de matière vivante	20	0.046	1.33	98.67

A partir de l'analyse phytochimique de *Osyris alba L Skeel* et comme il est cité au-dessus les résultats révèlent des taux considérables en protéines (**21%**) ainsi les travaux de **Inashiwa, (2008)** montrent sa richesse en acides aminés. Il nous semble que les acides aminés présents dans cette partie de la plante peuvent être impliqués dans la cicatrisation des ulcérations gastriques. En effet, selon **Taylor (1979)**, chez le porc par exemple, on a constaté une action anti-ulcéreuse lors d'une addition de suppléments d' α tocophérol, de cystine ou de méthionine dans l'alimentation. Par ailleurs, l'action cicatrisante de l'*Osyris alba* peut s'expliquer par sa richesse en minéraux (4%), ceux-ci contribuant à réparer le tissu conjonctif (**Kam, 1995**).

Par ailleurs, il a été prouvé que les propriétés antiulcéreuses des infusions et des décoctés à base d'herbes utilisées dans la médecine traditionnelle sont dues directement à la présence des composés phénoliques (**Goncalves et al, 2013**). De plus, l'activité antiulcéreuse est liée directement à la nature et la structure chimique des composés phénoliques présents dans l'extrait (**Afaq et al, 2005 ; Alvares-Suares et al, 2011**).

Par conséquent, on peut déduire que le pouvoir antiulcéreux significatif du décocté des écorces des racines *d'Osyris alba L Skeel* peut être attribué à la présence des composés phénoliques notamment l'acide gallique et la quercétine (composés majoritaires identifiés par HPLC dans notre extrait). Selon la littérature, ces deux molécules sont fortement connues par leur pouvoir antioxydant, antiinflammatoire, antiulcéreux et anticancéreux (**Alanko et al, 1999 ; Afaq et al, 2005 ; De Lira Mota et al, 2009 ; Alvares-Suares et al, 2011 ; Melo et al, 2012 ; Chong-Hyeon yoon et al, 2013 ; Kakeshani et al, 2019 ; Zhou et al, 2020**).

Selon les études antérieures, la quercétine, a un effet inhibiteur et antiinflammatoire sur la formation des ulcères gastriques (**Afaq et al, 2005 ; Alvares-Suares et al, 2011**) et elle augmente le taux des enzymes du systèmes de la défense antioxydantes (la superoxyde dismutase, la catalase, le glutathion et la glutathion-peroxydase), chez les animaux traités (**Ajaikumar et al, 2005**). Dans des expériences réalisées sur des rats, il a été démontré que la quercétine joue un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques. Il a été suggéré que la quercétine exerce son activité via un mécanisme complexe impliquant la production du mucus, le piégeage des radicaux libres et également l'inhibition de la production des leucotriènes, molécules impliquées dans la réaction inflammatoire, via la lipoxydation de l'acide arachidonique membranaire (**Dicarlo et al, 1999**).

Par ailleurs, la quercétine joue un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection de la muqueuse gastrique des différentes lésions induites par plusieurs facteurs d'agression, tels que l'acide-éthanol, le stress et l'indométacine (**Borrelli et Izzo, 2000**) toute en inhibant la sécrétion des pepsinogènes (précurseur de la pepsine) et la sécrétion de l'acide (action anti pompe H⁺) qui sont connus comme des facteurs ulcérogènes (**Alanko et al, 1999 ; De Lira Mota et al, 2009 ; Melo et al, 2012**).

Pour une meilleure compréhension de l'activité antiulcéreuse de la quercétine, les interactions entre cette dernière et les trois récepteurs membranaires (récepteur muscarinique M₃, pompe à protons et récepteur Histaminique H₂) ont été évaluées par **Mohie El-Dien et al, (2020)**. Les résultats obtenus ont révélé plusieurs liaisons hydrogène et interactions hydrophobes avec les acides aminés clés des trois récepteurs (récepteur muscarinique M₃, pompe à protons et récepteur Histaminique H₂).

La quercétine se lie au site actif de la sous unité numéro 3 du récepteur muscarinique (M_3), avec une forte affinité de liaison via de fortes liaisons hydrogènes (**Mohie El-Dien et al, 2020**). En effet, elle se lie avec trois interactions de liaison hydrogène avec des résidus d'acides aminés, Ala₂₃₈, Cys₅₃₂ et Tyr₅₂₉, en plus de l'interaction hydrophobe avec Tyr₅₀₆ (**Figure 42**).

De ce fait elle permet de moduler ou réguler la sécrétion des acides gastriques lors d'un stress vu l'implication du récepteur muscarinique M_3 dans la voie métabolique de neuromédiateur l'acétyl choline.

Dans le cas de la pompe à protons gastrique, il convient de mentionner que la quercétine forme un donneur de liaison hydrogène avec Glu₃₄₃ similaire au ligand co-cristallisé et deux interactions de liaison hydrogène supplémentaires avec Ala₃₃₅ et Asn₇₉₂ résidus d'acides aminés. Ceci est cohérent avec l'interaction de liaison prédite de ce composé avec le récepteur M_3 . En ce qui concerne les résidus du site de liaison du récepteur histaminique H_2 il était intéressant d'observer que la quercétine se lie à Glu₃₄₃ via une interaction de liaison hydrogène avec le groupe OH de la fraction phénolique, de ce fait elle joue un rôle d'antagoniste des récepteurs H_2 (anti- H_2) et elle inhibe la sécrétion acide par un blocage sélectif des récepteurs membranaire H_2 à l'histamine de la cellule pariétale (**Vakil, 2021**). Ces résultats indiquent que l'activité significative de la quercétine peut être impliquée dans l'activité antiulcéreuse par inhibition des récepteurs mentionnés (récepteurs muscariniques M_3 , la pompe à proton et le récepteur histaminique H_2). Grâce à ces trois mécanismes, la quercétine arrive à contrôler la sécrétion acide au niveau gastrique (**Mohie El-Dien et al, 2020**).

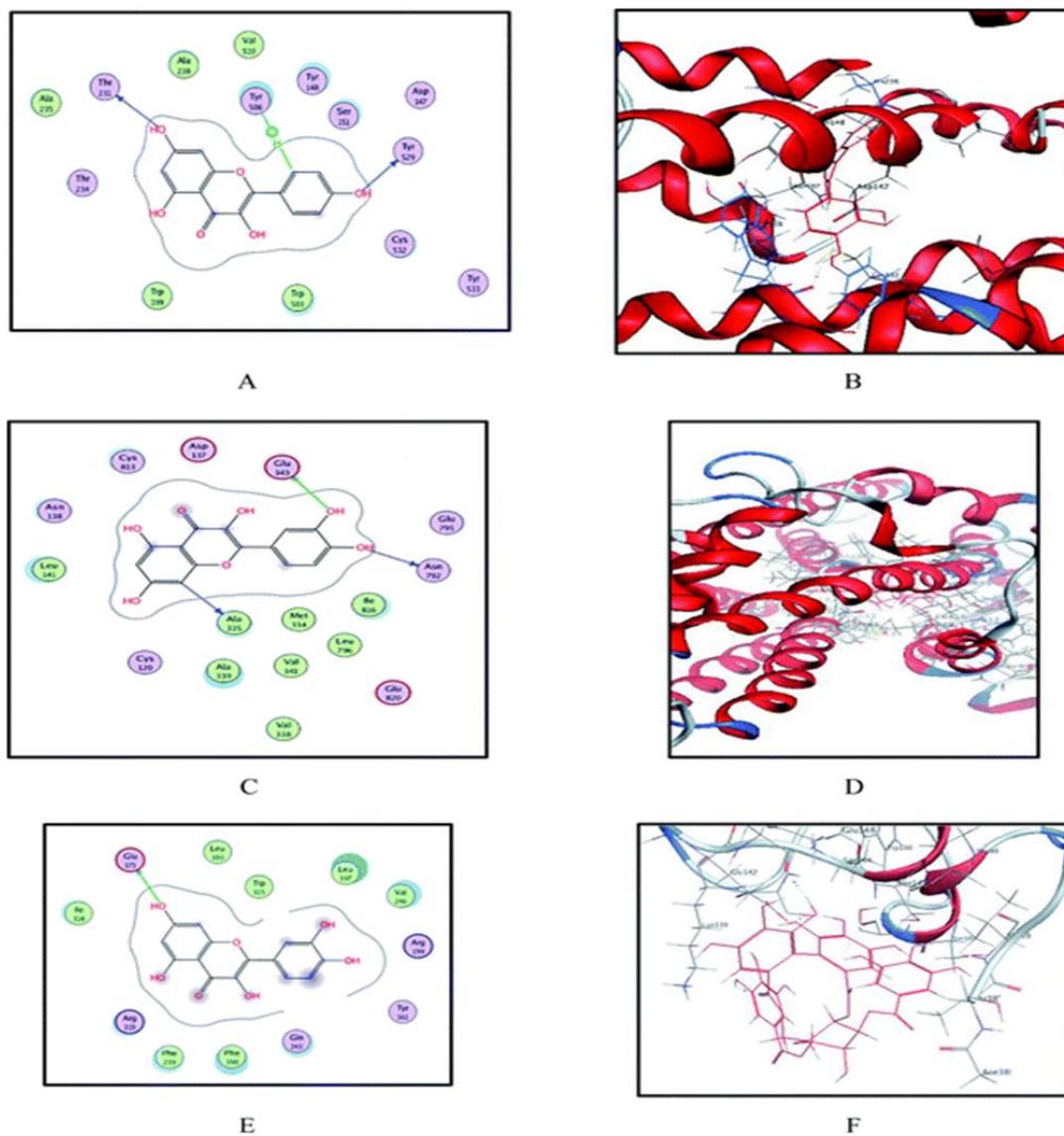


FIGURE 42 : SITES DE LIAISON DE LA QUERCÉTINE DANS LA STRUCTURE CRISTALLINE DE M₃, POMPE A PROTONS GASTRINE ET RECEPTEUR H₂ MODELISE *(MOHIE EL-DIEN ET AL ,2020)

*Les modèles 2D et 3D de la quercétine dans le site actif de M₃ montrent respectivement une liaison hydrogène et une interaction hydrophobe avec d'importants résidus du site actif. (C et D) Les modèles 2D et 3D de la quercétine dans le site actif de la pompe à protons gastrine montrent une certaine liaison hydrogène et une interaction hydrophobe avec des résidus importants du site actif, respectivement. (E et F)) Les modèles 2D et 3D de site de liaison de la quercétine dans le récepteur H-2 modélisé, respectivement. (A C E : 2D : deux dimension ; B D F : 3D : trois dimensions)

En ce qui concerne l'acide gallique (acide 3,4,5-Trihydroxybenzoïque) est largement présent dans les plantes et les fruits. Il est présent sous sa forme libre ou faisant partie d'une molécule de tanin. En particulier, on trouve l'acide gallique et ses dérivés les catéchines dans le thé noir et le thé vert. C'est un des acides phénoliques les plus présents.

Sur le plan activité antiulcéreuse, des études récentes (**Rahman et al, 2020 ; Zhou et al, 2020**) ont prouvé l'effet gastro protecteur et antiinflammatoire de l'acide gallique contre l'ulcère gastrique induit par l'éthanol chez le rat toute en stimulant le système enzymatique de défense antioxydante. L'effet gastro protecteur de l'acide gallique pourrait être en partie lié aux stimulations du gaz monoxyde d'azote gastrique et de la prostaglandine PGE₂. Cet effet protecteur de l'acide gallique, contre les lésions de la muqueuse gastrique induites par l'éthanol, peut être associé à l'amélioration du système de défense antioxydant par l'activation de la voie de signalisation liée au facteur de transcription Nrf2/HO-1 (facteur nucléaire érythroïde -2/l'hème Oxygénase-1). Un prétraitement avec pourrait inhiber l'apoptose des cellules de la muqueuse par la régulation de Bax, Bcl-2 et Caspase-3 (**Rahman et al, 2020 ; Zhou et al, 2020**). Selon les analyses effectuées par **Zhou et al, (2020)**, les observations macroscopiques et microscopiques, montrent que le prétraitement avec l'acide gallique a efficacement atténué les ulcères gastriques induits par l'éthanol chez les rats. Tous les groupes de traitement ont présenté une réduction dose-dépendante significative de la zone de lésion gastrique dans la muqueuse gastrique ainsi qu'une augmentation du pH de l'acide gastrique et des niveaux de mucus de la paroi gastrique (growth wall mucus pour GWM) par rapport au groupe éthanol, qui était également soutenu par les modifications pathologiques telles que la diminution de l'œdème sous-muqueux et l'infiltration de cellules inflammatoires.

Le monoxyde d'azote ou l'oxyde nitrique (NO) et la prostaglandine 2 (PGE₂) sont tous deux des médiateurs cruciaux pour le maintien de l'intégrité de la défense de la muqueuse gastrique et pour la cicatrisation de l'ulcère gastrique (**Sánchez-Mendoza et al, 2019**). Il a été bien identifié que les effets protecteurs du monoxyde d'azote NO dans l'ulcère gastrique sont associés à la stimulation de la sécrétion de mucus gastrique et de bicarbonate, au maintien du flux sanguin gastrique et à l'inhibition de l'inflammation (**Sánchez-Mendoza et al, 2019 ; Tarnawski, 2005**).

La PGE₂ contrôle la sécrétion d'acide gastrique et la libération de substances cytotoxiques, stabilise la membrane des mastocytes et stimule le processus de réparation des tissus, jouant ainsi un rôle important dans la prévention et la guérison des ulcères causés par des composés nocifs (**Tarnawski, 2005 ; Gyires, 2005**). La diminution du niveau de PGE₂ au niveau de la muqueuse gastrique provoque une ulcération gastrique et aggrave également les ulcères gastriques préexistants (**Luo et al, 2018**). L'étude actuelle de **Zhou et al, 2020** a prouvé que l'administration d'éthanol diminuait le niveau gastrique de NO et de PGE₂, tandis que l'acide gallique modulait proportionnellement à la dose de NO et de PGE₂ dans l'homogénat gastrique par rapport au groupe éthanol. Les résultats de plusieurs études antérieures, ont donné la preuve que de petits composés phénoliques moléculaires, en particulier des composés dérivés de l'acide gallique, sont accomplis pour supprimer les lésions hémorragiques de la muqueuse gastrique en régulant la production de PGE₂ et de NO, empêchant ainsi l'accumulation des cellules inflammatoires et améliorent l'activité enzymatique antioxydante dans les ulcères gastriques induits par l'éthanol chez les rats (**Melgarejo et al, 2010; Borato et al, 2016 ; Sistani et al, 2019**). Ainsi, on pourrait dire que l'effet gastro protecteur de l'AG peut être en partie lié aux stimulations de l'oxyde nitrique gastrique et de la prostaglandine (**Zhou et al, 2020**).

Une relation entre l'inflammation et l'évolution des lésions de l'ulcère gastrique induites par l'éthanol a été largement reconnue (**De Souza et al, 2019 ; Fahmy et al, 2020**).

L'éthanol digère la couche de mucus et expose la muqueuse aux agents protéolytiques et actions hydrolytiques de l'acide chlorhydrique et de la pepsine (**Oates et Hakkinen, 1988**). L'éthanol induit des lésions microvasculaires toute en réduisant le flux sanguin, en augmentant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de cytokines pro-inflammatoires par conséquent, réduit les niveaux d'antioxydants cellulaires (**Adinortey et al, 2013**). L'éthanol induit la réponse inflammatoire qui initie les macrophages produisant de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α , qui favorisent l'accumulation de neutrophiles dans le site de l'inflammation, entraînant la dégradation de la connexine et de la destruction de la barrière muqueuse (**Badr et al, 2019 ; De Souza et al, 2019 ; Fahmy et al, 2020**). Ces cytokines pro-inflammatoires pourraient également

produire à leur tour une quantité accrue de radicaux libres dérivés de l'oxygène et de l'azote (ROS, RNS), facilitant ainsi la formation d'ulcères gastriques (**Albaayit et al, 2016**).

L'exposition à l'éthanol présentait une augmentation des niveaux des interleukines IL-1 β , d'IL-6 et de facteur de nécrose tumorale TNF- α par rapport aux rats témoins. En revanche, le prétraitement avec l'acide gallique a inhibé l'élévation des niveaux de TNF- α et d'IL-6 et a même inversé ces cytokines pour atteindre les niveaux normaux (50 mg/kg de prétraitement par l'AG), ce qui montre son effet anti-inflammatoire sur l'ulcère gastrique induit par l'éthanol chez le rat (**Zhou et al, 2020**). Cela concorde également avec les résultats pathologiques antérieurs où moins de réponses inflammatoires ont été observées chez les rats prétraités à l'AG présentant un ulcère gastrique induit par l'éthanol /acide chlorhydrique (**Abdelwahab et al, 2013 ; Song et al, 2018**).

Le stress oxydatif a été bien lié au processus pathologique de l'ulcère gastrique (**Sokolova et al, 2019**). Les ulcères gastriques (UG) induites par l'éthanol sont impliquées dans la perturbation d'un subtil équilibre oxydant/antioxydant, ce qui peut entraîner des lésions de la muqueuse gastrique via le stress oxydatif (**De Souza et al, 2019 ; Fahmy et al, 2020 ; Saadaoui et al, 2020**).

Il est bien connu que les radicaux libres dérivés de l'oxygène peuvent réagir avec les lipides pour former des peroxydes lipidiques, car les principaux composants de la membrane cytoplasmique sont les lipides, qui causent des dommages importants. Si les processus n'ont pas été neutralisés par suffisamment de molécules antioxydantes, leur peroxydation peut entraîner la mort cellulaire et/ou l'apoptose (**Li et al, 2016**).

Selon **Zhou et al, (2020)** une production accrue de radicaux libres peut être responsable des dommages membranaires observés dans l'expérience pathologique, comme en témoigne également la peroxydation lipidique élevée, à savoir la teneur en TBARS (Thiobarbituric acid reactive substance). Les radicaux libres dérivés de l'oxygène peuvent être récupérés par le système de défense antioxydant de l'organisme (**Albaayit et al, 2016 ; Li et al, 2016**), qui est constitué d'antioxydants tels que le glutathion GSH et les vitamines A, E, C et d'enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase SOD et la catalase CAT. L'épuisement de la teneur en GSH cellulaire ainsi que l'affaiblissement des activités SOD et CAT pourraient affaiblir la

récupération après une courte période de lésion oxydative gastrique induite par l'éthanol (Song et al, 2018). Comme le montrent les résultats récents de Zhou et al, (2020), l'exposition à l'éthanol entraîne des diminutions significatives de la teneur en GSH et des activités SOD et CAT.

À l'inverse, le prétraitement à l'acide gallique AG a montré des augmentations significatives des niveaux de GSH, SOD et CAT et une réduction du niveau de TBARS, spécifiant son potentiel antioxydant et confirmant en outre que l'acide gallique possède des propriétés gastro protectrices contre le développement d'ulcères induits par l'éthanol.

Conclusion

Les plantes constituent la base des systèmes de médecine traditionnelle sophistiqués qui existent depuis des milliers d'années et continuent de fournir à l'humanité de nouveaux remèdes.

L'intérêt pour la nature en tant que source d'agents chimio thérapeutiques potentiels se poursuit. Les produits naturels et leurs dérivés représentent plus de 50% de tous les médicaments utilisés en clinique dans le monde. Les plantes supérieures représentent au moins 25% du total (**Gurib-Fakim, 2006**). Les plantes médicinales contiennent généralement des mélanges de différents composés chimiques pouvant agir individuellement, conjointement ou en synergie pour améliorer la santé (**Gurib-Fakim, 2006**)

Le travail présenté dans cette thèse contribue à la valorisation de la composition phytochimique et l'évaluation de quelques activités biologiques au niveau de la plante *Osyris alba L SKeel* appartenant à de la famille des *Santalacées*, l'écorce de sa racine est utilisée traditionnellement par la population locale pour le traitement des ulcères gastriques, les rhumatismes et son décocté est pris comme un fortifiant.

Selon l'étude phytochimiques, les résultats du dosage des métabolites primaires au niveau de l'écorce de la racine d'*Osyris Alba L (EROA)* ont montré sa richesse en protéines brutes avec une teneur estimée à 21 ± 0.816 %. Nous avons noté que la poudre des racines est moyennement riche en matière de sucres totaux et lipides, avec des taux estimés à $13.76 \pm 0.175\%$ et $12.26 \pm 0.205\%$ respectivement. Par comparaison avec les autres métabolites primaires dosés, les analyses révèlent des faibles teneurs en cendres et en fibres alimentaires.

En ce qui est en relation avec les métabolites secondaires, le dosage des polyphénols totaux, par le réactif *Folin Ciocalteu*, a dévoilé la richesse de l'écorce de racine d'*Osyris alba* en polyphénols totaux qui est estimée à $371,67 \pm 3.702$ mg EAG/g ES, suivie par un niveau élevé de tanins condensés avec $121,146 \pm 1.96$ mg ECAT/g ES, et une quantité considérée de flavonoïdes totaux estimés à $55,345 \pm 0.099$ mg ECAT/g ES.

Concernant l'extraction sélective des fractions de flavonoïdes et de tanins basée sur la différence de solubilité de ces dernier dans les solvants organiques, les résultats ont montré un niveau élevé ($8,763 \pm 0.416\%$) avec la fraction flavonoïde aqueuse (FVAQ), contenant le plus de composés phénoliques hydrosolubles. Le rendement de la fraction flavonoïde de n-butanol (FVBU), contenant principalement les di et tri glycosides, est relativement élevé ($4,013 \pm 0.609\%$). Cependant, le rendement de la fraction flavonoïde acétate d'éthyle (FVAE)

contenant certains aglycones et les monoglycosides est quatre fois inférieur à celui de la fraction n-butanol ($1,143 \pm 0.174\%$) et la fraction flavonoïde éther di éthylique (FVED), riche en aglycones, donne un rendement encore très faible ($0,064 \pm 0.009\%$). L'extraction sélective des tanins (FTAN) donne un bon rendement estimé à $3,98\% \pm 0.561$.

L'analyse chromatographique (HPLC) du profil phénolique de l'extrait des polyphénols totaux a montré que l'acide gallique et la quercétine sont les principaux composés. Ces résultats intéressants sont cohérents avec le dosage *Folin ciocalteu* (qui confirme la forte teneur en polyphénols totaux exprimée en équivalent Acide gallique). De plus la présence de ces deux molécules (Acide gallique et Quercétine), trop connues par leur propriétés antioxydantes, anti-inflammatoire, antihistaminiques et antinéoplasmiqes, dans l'extrait phénolique démontre que les composés phénoliques de l'écorce de racine d'*Osyris alba L Skell* ont donc un grand potentiel thérapeutique comme sources naturelles de molécules bioactives à effet thérapeutique .

D'autre part le test de chromatographie en phase gazeuse (CGL) de l'extrait d'huile de l'écorce de racine d'*Osyris alba* a révélé la présence de deux groupes d'acides gras : l'acide arachidique (C20 : 0) et l'acide linoléique (C18 : 9.12) connus pour son effet pro-inflammatoire contre l'acide oléique C18 : 1, l'acide linoléique C18 : 9.12.15 et l'acide eicosatriénoïque (ETA) C20 :3 qui sont connus pour leur effet proanti-inflammatoire. Pour cette raison, nous devons tester l'effet de cette huile sur les modèles inflammatoires.

Par ailleurs, nous avons recherché deux activités biologiques pour les extraits des racines d'*Osyris alba*, dans cette thèse :

L'activité antioxydante des composés phénoliques et le pouvoir antiulcéreux de l'extrait aqueux des écorces des racines de la plante étudiée.

Les résultats de l'activité antioxydante des différents composés phénoliques, a révélé que tous les extraits, à savoir les polyphénols totaux, les fractions flavonoïdes et les tanins exercent un effet antioxydant important. Selon l'analyse, nous avons noté que l'extrait des polyphénols totaux (PT) a montré le pouvoir antioxydant le plus élevé qui dépasse la vitamine C (l'antioxydant standard) selon les valeurs enregistrées des IC₅₀, par piégeage du radical libre DPPH (IC₅₀= $2.245 \pm 0.047 \mu\text{g/ml}$) et par le pouvoir de réduction des ions ferriques (FRAP)(IC₅₀= $22.565 \pm 1.108 \mu\text{g/ml}$).

En ce qui concerne la capacité antioxydante totale (CAT) qui permet de déterminer la quantité d'espèces antioxydantes existantes dans l'extrait des poly phénols totaux (PT), la fraction

tannique (FTAN) et les fractions flavonoïdes (FV). Les résultats ont également révélé que l'extrait des polyphénols totaux (PT) est l'extrait le plus riche, en matière d'antioxydant, avec une valeur estimée à 8,185 mg EAA / g MS.

Concernant la quatrième méthode d'évaluation du pouvoir antioxydant qui est le test de blanchiment β -carotène/acide linoléique. D'après l'analyse, les fractions acétate d'éthyle (FVAE) et n-butanol (FVBU) ont montré un pouvoir, de rétention de la beta carotène, important avec des diamètres de 18.67 ± 0.235 mm et 18.4 ± 0.534 mm respectivement, ces valeurs sont légèrement inférieures que celles obtenues avec le standard la quercétine (21 ± 0.8164 mm). L'extrait des polyphénols totaux (PT) et la fraction flavonoïde aqueuse (FVAQ) ont révélé une activité, de protection de la beta carotène, moyenne avec des valeurs estimées à 15.5 ± 0.4082 mm et 15.833 ± 0.235 mm respectivement.

Ces résultats démontrent que les composés phénoliques de l'écorce de racine *d'Osyris alba* ont d'excellentes activités antioxydantes et ils ont donc un grand potentiel en tant que sources de produits de santé naturels.

L'effet curatif de l'extrait aqueux des écorces des racines sur l'ulcère gastrique évalué, chez les rats *Wistar* par administration du mélange alcool/ acide chlorhydriques a démontré son pouvoir cicatrisant et pouver inhiber l'ulcération de l'estomac à 98.67%.

L'ensemble des résultats obtenus lors de cette étude sont satisfaisants et prometteurs, et ne constituent que le début d'une longue et fleurissante recherche. Ils ont permis de valoriser *Osyris alba L Skeel* en tant que plante antioxydante et antiulcéreuse grâce à la présence des composés phénoliques (acide gallique et la quercétine). Il ressort de l'ensemble des résultats que le décocté *d'Osyris alba L Skeel* possède des propriétés gastro curatives plus marquées que la Ranitidine.

Malgré ces résultats encourageants, Il serait souhaitable d'enrichir ce travail par les perspectives suivantes :

1. Mener des recherches à plus grande échelle et pendant une plus longue période (ulcère chronique), afin de déterminer le délai au bout duquel on obtient 100% de guérison, avant une exploitation en officine de cette vertu thérapeutique du décocté *d'Osyris alba L Skeel*.
2. Des études plus approfondies seraient aussi nécessaires pour déterminer le pouvoir gastro protecteur de cette plante ainsi son mécanisme d'action.
3. Une étude histologique de la muqueuse gastrique et le dosage des paramètres anti-inflammatoires au niveau sanguins à savoir la CRP, le dosage du monoxyde d'azote (NO) et des interleukines.
5. La caractérisation de la composition en acide gras de la partie huile fait dévoiler sa qualité en matière des acides gras essentiels oméga 6 et oméga 3, il serait alors préférable de compléter cette analyse par des tests sur des modèles inflammatoires.

Références bibliographiques

- **Afraitane K (1990)** Contribution à l'étude biochimique du fruit de chêne liège (*Quercus—suber* L) de la suberaie de la *Marmora*. Maroc. Thèse de doctorat 3eme cycle. ENSA de Rabat.125p.
- **Abdelwahab SI (2013)** Protective mechanism of gallic acid and its novel derivative against ethanol-induced gastric ulcerogenesis: involvement of immunomodulation markers, Hsp70 and Bcl-2-associated X protein. *Int Immunopharmacol* 16 (2) 296–305.
- **Abebaw M, Mishra B, Gelayee D A (2017)** Evaluation of anti-ulcer activity of the leaf extract of *Osyris quadripartita Decne. (Santalaceae)* in rats. *Exp Pharmacol*.16;9:1-11.
- **Adinortey M b, Ansah C, Galyuon I, et al (2013)** In vivo models used for evaluation of potential anti gastroduodenal ulcer agents. *Ulcers* 2013: 1–12
- **Afaq F, Saleem M, Krueger CG, et al (2005)** Anthocyanin- and hydrolysable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappa B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice, *International Journal of Cancer* 113(3):423-33.
- **Ajaikumar K B, Asheef M, Babu B H, et al (2005)** The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L. (pomegranate) methanolic extract. *J of Ethnopharmacology*, 96: 171–176.
- **Akhtar AH, Ahmed KU (1995)** Anti-ulcerogenic evaluation of the methanolic extracts of some indigenous medicinal plants of Pakistan in aspirin-ulcerated rats. *Journal of Ethnopharmacology* 46, 1–6.
- **Alanko J, Riutta A, Holm P, et al (1999)** Modulation of arachidonic acid metabolism by phenols: relation to their structure and antioxidant /prooxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*,26: 193-201.
- **Albaayit SF, Abba Y, Abdullah R, et al (2016)** Prophylactic effects of *Clausena excavata Burum. F.* Leaf extract in ethanol-induced gastric ulcers, *Drug Des Devel Ther* (10) 1973–1986.
- **Al-Jaber H I , Mosleh I M, Mallouh A, et al (2010)** Chemical constituents of *Osyris alba* and their antiparasitic activities. *Journal of Asian Natural Products Research* Volume 12, Issue 9.
- **Alkofahi A, Atta HA (1999)** Pharmacological screening of the anti-ulcerogenic effects of some Jordanian medicinal plants in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 67: 341–345.
- **Alothman M , Bhat R, Karim A (2009)** Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry* Volume 115, Issue 3, Pages 785-788.

- **Al-Quraishy S, Othman MS, Dkhil MA, et al (2017)** Olive (*Olea europaea*) leaf methanolic extract prevents HCl/ethanol-induced gastritis in rats by attenuating inflammation and augmenting antioxidant enzyme activities. *Biomed Pharmac other* (91) 338–349.
- **Alvarez-Suarez JM, Dekanski D, Ristic N, et al (2011)** Strawberry Polyphenols Attenuate Ethanol-Induced Gastric Lesions in Rats by Activation of Antioxidant Enzymes and Attenuation of MDA Increase. *Public Library of Science ONE*, 6 (10): 25-31.
- **Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddamc P, et al (2004)** Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem* 84:551–62.
- **Amiot M J, Aubert S, Gonnet M, et al (1989)** Les composés phénoliques des miels : étude préliminaire sur l'identification et la quantification par familles. *Elsevier*, 20 : 115-125.
- **Amselem J (2013)**. Omega 3, Omega 6 : la juste proportion. <https://www.santemagazine.fr/alimentation/nutriments/lipides-et-acides-gras/omega-3-omega-6-la-juste-proportion-174190>.
- **ANCIENS COMBATTANTS CANADA (2005)** Lignes directrices sur l'admissibilité au droit à pension - Maladie ulcéreuse Gastroduodénale 10p.
- **Andersen MØ, Markham KR (2006)** Flavonoids, Chemistry, Biochemistry and Applications. Natural Products from Plants. Edition Taylor & Francis Group, LLC.
- **ANSES (2010)** Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras. Récupérer le 30 décembre 2019 sur <https://www.anses.fr/fr/system/files/NUT-Ra-omega3.pdf>.
- **Araujo D A, Takayama C, De-Faria F M, et al (2011)** Gastroprotective effects of essential oil from *Protium heptaphyllum* on experimental gastric ulcer models in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol21, no. 4, pp 721–729.
- **Ariyphisis I, Toshiharu A, Sugimura F, Abe M, et al (1986)** Recurrence during maintenance therapy with histamine H2 receptors antagonist in cases of gastric ulcers, *Nikon Univ. J. Med.* 28, 69-74.
- **Aronne G, Wilcock C C, Pizzolongo P (1993)** Pollination biology and sexual differentiation of *Osyris alba* (Santalaceae) in the Mediterranean region. *Pl. Syst. Evol.* 188 : 1-16.
- **Astridle M (1998)** Ulcère de l'estomac, in magazine votre santé, Ouagadougou, N°27, 39 p.

- **Astudillo L, Rodriguez JA, Schmeda HG (2002)** Gastroprotective activity of oleanolic acid derivatives on experimentally induced gastric lesions in rats and mice. *Journal of Pharmacy and pharmacology*, 54, 583-588.
- **Audigie C L, Figarelle J, Zons Zani F (1980)** Manipulation d'analyses biochimiques. Ed Doin. Paris, pp : 88-97.
- **Avallone R, Plessi M, Baraldi M, et al (1997)** Determination of Chemical Composition of Carob (*Ceratonia siliqua*): Protein, Fat, Carbohydrates, and Tannins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10(2), 166–172.
- **Aziz K, Bonnet D, Foppa B (2012)** *Hépatogastro-entérologie : chirurgie digestive*. 2^{ème} Edition. Elsevier-Masson. Pp : 441-467.
- **Badr AM, El-Orabi NF, Ali RA (2019)** The implication of the crosstalk of Nrf2 with NOXs, and HMGB1 in ethanol-induced gastric ulcer: potential protective effect is afforded by Raspberry Ketone. *PLoS One* 14 (8) e0220548.
- **Bahorun T (1997)** Substances naturelles actives : La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food. Agric. Res. Council, Réduit, Mauritius*, 83-94.
- **Balas D (2010)** Histologie l'estomac. In *Formation professionnelle, enseignement, recherches associées [en ligne]*. Daniel Balas. 2010 [date de consultation : 16 mars 2018]. <http://www.db-gersite.com/histologie/epithdig/estomac/estomac.htm>.
- **Balasundram N, Sundram K, Samman S (2006)** Phenolic compounds in plants and agro industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99: 191–203.
- **Batovska D, Parushev S, Stamboliyska B, et al (2009)** Examination of growth inhibitory properties of synthetic chalcones for which antibacterial activity was predicted. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(5) : 2211-2218.
- **Bazin T, Lamarque D, (2018)** La sécrétion acide : régulation, applications en clinique, actualités. *V25(4) :342-52. Revue Hépatogastro et Oncologie Digestive*.
- **Beaugerie L, Sokol H, Goirand, f, et al (2014)** Les fondamentaux de la pathologie digestive. Paris: Masson. Pp :288.
- **Bigard M A (1999)** Ulcère gastrique et ulcère duodéal (Syndrome de Zollinger-Ellison exclu) : Épidémiologie, physiopathologie, diagnostic, évolution, traitement. *La Revue du praticien*, vol.49, no.5, pp.547-554.

- **Bigoniaya P, Singh K (2014)** Ulcer protective potential of standardized hesperidin, a citrus flavonoid isolated from *Citrus sinensis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol.24, no.3, p. 330-340.
- **Blamey M, Grey-Wilson C (2000 ;2009)**, *Toutes les fleurs de Méditerranée*, Delachaux & Niestlé, 560 p.
- **Boisseau N (2005)** Nutrition et bioénergétique du sport : bases fondamentales. Edition Masson, Paris, pp : 62.
- **Boizot N, Charpentier J P (2006)** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*, 79-82.
- **Boizot N, Charpentier J P (2006)** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*. p 79-82.
- **Boligon A A, Freitas R B, Brum T F, et al (2014)** Antiulcerogenic activity of *Scutiabuxifolia* on gastric ulcers induced by ethanol in rats. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, vol.4, no.5, p.358–367.
- **Bonnaillie C, Salacs M, Vassiliova E, et al (2012)** Étude de l'extraction des composés phénoliques à partir de la pellicule d'arachides (*Arachis hydrogaea L.*). *Revue de génie industrie 7* :35–45.
- **Borato D G, Scoparo C T, Maria-Ferreira D, et al (2016)** Healing mechanisms of the hydroalcoholic extract and ethyl acetate fraction of green tea (*Camellia sinensis (L.) Kuntze*) on chronic gastric ulcers. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 389 (3) 259–268.
- **Borrelli F, EtIzzo A A, (2000)** The Plant Kingdom as a Source of Antiulcer Remedies. *Phytotherapy researches*,14: 581-591.
- **Bourgou S, Ksouri R, Bellila A, et al (2008)** Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa L.* shoots and roots. *C R Biol* 331:48–55.
- **Bourre J M, Pascal G, Durand G, et al (1984)** Alterations in the Fatty Acid Composition of Rat Brain Cells (Neurons, Astrocytes, and oligodendrocytes) and of Subcellular Fractions (Myelin and Synaptosomes) Induced by a Diet Devoid of n-3 Fatty Acids. *Journals of Neurochemistry*. Vol (43) Issue2 .Pages 342-348.
- **Bouvenot G, Devulder et Guillevin L, (1995)** Pathologie médicale, Gastro-entérologie, hépatologie, hématologie ; Paris : Masson : 27-42.
- **Bowman G L, Silbert L C, Howieson D, et al (2012)** Biomarker patterns, cognitive function, and MRI measures of brain aging. *Neurology*, 78(4)241-249.

- **Bruneton J (1993)** Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. *LAVOISIER TEC et DOC*, Paris. 2ème édition. p.268-277.111-Tapas A R, Sakarkar D M, Kakde R B (2008) Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7 (3), 1089-1099.
- **Bruneton J (1993)** Pharmacognosie et phytochimie plantes médicinales. Paris, France : Lavoisier. 278 - 279p.
- **Bruneton J (1999)** Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 3ème édition. 3, *Lavoisier*, Paris.
- **Bruneton J (2009)** Pharmacognosie, Phytochimie, Plante médicinales. Lavoisier Technique & Documentation, 4ème Edition. Paris.
- **Brzozowski T, Konturek S J, Kwiecien S, et al (1998)** Involvement of endogenous cholecystokinin and somatostatin in gastro protection induced by intra duodenal fat. *Journal of Clinical Gastroenterology*, vol27, p125-137.
- **Buron Arias I (1976)** Thesis doctorat. Escuela tecnica superior de ingenieros agronomes, Madrid, Espagne, 105p.
- **Cakir A, Mavi A, Yildirim A, et al (2003)** Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hysopifolium L.* by activity-guided fractionation. *J Ethnopharmacol* 87:73–83.
- **Canon F (2016)** Physiologie des systèmes intégrés, les principes et fonctions. In UNISCIEL portail scientifique [en ligne] (Mise à jour le 23/02/2016)
Disponible sur :http://ressources.unisciel.fr/physiologie/co/module_Physiologie_56.html(Consulté le 1/06/2018).
- **Canon F (2016)** Spécificités histologiques de l'estomac. In Physiologie des systèmes intégrés, les principes et fonctions - Unisciel [en ligne]. Université de technologie de Compiègne. 2016
[date de consultation : 01 mars 2018] Disponible sur <http://ressources.unisciel.fr/physiologie/co/grain6b2.html> .
- **Catalano L, Franco I, De Nobili M, et al(1999)** Polyphenols in olive mill waste waters and their depuration plant effluents: comparison of the *Folin-Ciocalteu* and HPLC methods. *Agrochimica*, 43, pp. 193-205.
- **CCQ (en line : CCQ : Centre de conservation de Québec, dernière mise à jour (2016)** consulté le 22/05/2019 Web site <https://www.ccq.gouv.qc.ca/index.php?id=171>:).

- **CGNH (the Center for Genetics, Nutrition and Health, Washington, DC 20009, USA. (2002)** The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids *J Biomed Pharmacother* 56:365–79
- **Chanforan C (2010)** Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation : études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate. Thèse de Doctorat : Université D'Avignon et des Pays de Vaucluse.
- **Chebil L (2006)** Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle. Thèse de Doctorat : Institut national polytechnique de LORRAIN, pages200.
- **Chen H, Liao H, Liu Y, et al (2015)** Protective effects of pogostone from *Pogostemonis Herba* against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Fitoterapiavol.100*, pp.110-117.
- **Chen P, Shen Y, Shi H, et al (2016)** Gastroprotective effects of Kangfuxin-against ethanol-induced gastric ulcer via attenuating oxidative stress and ER stress in mice. *Chem Biol Interact* 2797 (16) 30509-9.
- **Chen Z, Bertin R, Froidi G (2013)** EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *J Food Chem* 138:414–20
- **Chikhi I, Allali H, Dib M A, et al (2013)** Antioxidant activities and phytochemical study of extract of two Phagnalons species growing in Algeria. *J Trad Herbal Med Intl* 1:49–53.
- **Chira K, Suh JH, Saucier C, et al (2008)** Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6 : 75-82
- **Choi E Y, Hwang H J, Kim I H, et al (2009)** Protective effects of a polysaccharide from *Hizikia fusiformis* against ethanol toxicity in rats. *Food Chemical Toxicology*, vol.47, no.1, pp.134-139.
- **Chong-Hyeon Yoon, Soo-Jin Chung, Sang-Won Lee, et al(2013)** L'acide gallique, acide polyphénolique naturel, induit l'apoptose et inhibe l'expression des gènes pro-inflammatoires dans les synoviocytes fibroblastiques de polyarthrite rhumatoïde. *Revue du Rhumatisme*, Volume 80, Issue 3, May 2013, Pages 271-278
- **Chopra R N, Nayar S L, Chopra I C (1956)** Glossary of Indian Medicinal Plants. Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, pp. 35, 77, 170, 246.

- **Chung Y C, Chang C T, Chao W W, et al (2002)** Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *J Agric Food Chem* 50:2454–8.
- **Collin S, Crouzet J (2011)** Agence universitaire de la francophonie. Polyphénols et procédés : Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l’agro-alimentaire. Edition Lavoisier, p 13.
- **Constance R, Graham, Mary V (2003)** *Clinical Guidelines in Family Practice* 4th Edition by Uphold Barmarrae Books, 974 pg.
- **Cook N C, Samman S (1996)** Flavonoids chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutr Biochem* 7:66–76.
- **Corsi L, Avallone R, Cosenza F, et al (2002)** Antiproliferative effects of *Ceratonia siliqua* L. on mouse hepatocellular carcinoma cell line. *Fitoterapia*, 73: 674-684.
- **Couroucé-Malblanc A (1957)** *Maladies des chevaux*. Edition France Agricole, Paris, pp : 120.
- **Cowan M M (1999)** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol Re*, 12(4) : 564- 582.
- **Croteau R, Kutchan T M, Lewis N G (2000)** *Naturel Products (Secondary Métabolites)*. *Biochemistry and molecular biology of plants*.1250-1318.
- **Crozier A, Clifford M N, Ashihara H (2006)** *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Edit Blackwell Publishing Ltd.
- **Cushnie T P T, Hamilton V E S, Chapman D G, et al (2007)** Aggregation of *Staphylococcus aureus* following treatment with the antibacterial flavonol galangin. *Journal of Applied Microbiology*,103(5): 1562-1567.
- **Custódio L, Escapa A L, Fernandes, et al (2011)** In vitro cytotoxic effects and apoptosis induction by a methanol leaf extract of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(10), 1987–1996.
- **D’Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, et al (2007)** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super Sanità* 43(4) 348-361.
- **Dai J, Mumper R J (2010)** Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* 15 (10), 7313-52.
- **Dal-Ros S (2009)** *Dysfonction Endothéliale et pathologies Cardiovasculaires : Rôle du stress Oxydant et Effets Protecteurs des Polyphénols Végétaux*. These de Doctorat. France, p.89.

- **Dangles O (2006)** Propriétés chimiques des polyphénols dans les polyphénols en agroalimentaire. Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires. Lavoisier. 29-50.
- **Dangles O, Dufour C (2006)** Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. Eds Andersen O. and Markham K. CRC Press, Boca Raton. Chapter 9: p 443-469.
- **Dangles O, Dufour C (2008)** Flavonoid-protein binding processes and their potential impact on human health. In Recent Advances in Polyphenol Research. Blackwell Publishing: Oxford. 01: 67-87.
- **Davis P H (1982)** Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Ed inburgh University Press, Edinburgh, vol 7, pp 545–6.
- **Dawidowicza A L, Wianowska D, Baraniak, B (2006)** The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra L.* (antioxidant properties of extracts). LWT-Food Sci. Technol. 39, 308–315.
- **Day A-J, Bao Y, Morgan M-R-A, et al (2000)** Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. Free Radical Biology and Medicine. 29: 1234-1243.
- **De lira Mota K L, Dias G E N, Ferreira Pinto M E, et al (2009)** Flavonoids with Gastroprotective Activity. Molecules, vol.14, p. 979-1012.
- **De Souza M C, Vieira A J, Beserra F P, et al (2019)** Gastroprotective effect of limonene in rats: influence on oxidative stress, inflammation and gene expression. Phytomedicine 53: 37–42.
- **Dewick P M (2002)** Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. John Wiley & Sons, Hoboken.
- **Di Carlo G, Mascolo N, Izzo A A, et al (1999)** Flavonoids: old and new aspects of class of natural therapeutic drugs. Life Sei. 1999; 65:337-353.
- **Dine T, Claerbout, Rave M (2008)** Traitement de l'ulcère gastro-duodénale. *Pharmacie clinique et thérapeutique*. 3ème édition Paris : Elsevier Masson. 215 p.
- **Dive Ch (1990)** La maladie ulcéreuse : Progrès en hépto-gastro entérologie. Paris: Doin éditeur, pp25-43.
- **Dogyan S, Turan Y, Ertuerk H, et al (2005)** Characterization and Purification of Polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus L.*). J. Agric. Food Chem, 53, 776-785.
- **Dubois M K A, Gilli Y K, Hamilton P A (1956)** Colometric method for determination of sugars and related substance. Anal. and Chem. Jour; Vol. 28 pp: 350-356.

- **Etournaud A (1999)** Sciences alimentaires, chimie des denrées alimentaires pour laborantin(e) s en chimie et biologie. Pp 31 *Laboratoire CANTONAL*.
- **Eun Jung chung Ph, Young Sook Um Ph D, Kyung Hwan Kim MD, et al (1997)** Effects of w3/ w6 fatty acids on behavioral developments of rats: Relation with neurotransmitters. *Journal of the Korean Neurological Association*. 15(5): 952-963.
- **Fahmy NM, Al-Sayed E, Michel HE, et al (2020)** Gastroprotective effects of *Erythrina speciosa (Fabaceae)* leaves cultivated in Egypt against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol*248: 112297.
- **Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, et al (2008)** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C R Biol* 331:372–9.
- **FAO (2014)** Graisses et acides gras dans la nutrition humaine Rapport d'une consultation d'experts. Étude FAO : Alimentation Et Nutrition 91 Issn 1014-2908.
- **FAO / IAEA (2000)** Quantification of tannins in tree foliage. FAO/ IAEA. Working document, IAEA, Vienna. P 26.
- **Fatland B L, Ke J, Anderson M, et al (2004)** Molecular characterization of a heteromeric ATP-citrate lyase that generates cytosolic acetyl-Coenzyme A in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 130, 740-756.
- **Ferec M, Bronstein J-A, Massoure M-P, et al (2008)** Clinique et endoscopique des ulcères gastroduodénaux, Elsevier Masson SAS, Brest France. pp 1-9.
- **Flandrois J P (1997)** Bactériologie médicale. France. Presses universitaires de Lyon, pp 217.
- **Fokou N (2011)** Effets antiulcérogéniques de l'extrait aqueux des écorces d'*Anthocleista shweinfurthii (Loganiacées)* sur les ulcères gastriques aigus induits chez les rats. Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme de Professeur de l'Enseignement Secondaire grade II (D.I.P.E.S.II).
- **Foudhil M (1990)** Contribution à l'étude de la valeur nutritionnelle du gland. Possibilité de son incorporation dans l'alimentation animale. Mémoire d'ingénieur en contrôle de qualité et analyse. INES de Biologie Tizi Ouzou, 112p.
- **Frankel E N, Waterhouse A L, Teissedre P L (1995)** Principal phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J Agric Food Chem* 43:890–4.
- **Friedman M, Henika P R, Levin C E, et al (2006)** Antimicrobial activities of tea catechins and the a flavins and tea extracts against *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*, 69(2): 354-361.

- **Galati E M, Monforte M T, Tripodo M M, et al (2001)** Antiulcer activity of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (Cactaceae): ultrastructural study. *Journal of Ethnopharmacology* 76 (2001) 1–9.
- **Garcia-Salas P, Morales-Soto A, Segura-Carretero A, et al (2010)** *Molecules* 15 : 8813–26 Phytothérapie 11.
- **Garg G P, Nigam S K, Ogle C W (1993)** The gastric antiulcer effects of the leaves of the neem tree. *Planta Medica* 59, 215–217.
- **Giannasi D E (1988)** Flavonoids and evolution in the dicotyledons. In: *The Flavonoids: Advances in Research Since 1980*. Chapman and Hall, London.
- **Gimenez F, Brazier M, Calop J, et al (2000)** Traitement de l'ulcère gastro-duodéal dans *Pharmacie Clinique et Thérapeutique*. Paris : Masson, 1065 p.
- **Glavin G B, Mikhail A A (1976)** Stress and ulcer etiology in the rat. *Physiology and Behavior* 16, 135–139.
- **Gonçalves S, Gomes D, Costa P, et al (2013)** The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Industrial Crops and Products* 43 :465–471.
- **Gordon M H (1990)** The mechanism of antioxidant action in vitro. In: B.J.F. Hudson (Ed.), *Food antioxidants Elsevier Applied Science, London*, pp. 1-18.
- **Gordon M C, David J N (2002)** Drugs from nature: past achievements, future prospects. *Advances in Phytomedicine Vol 1, Pages 23-37*.
- **Gordon M H (1990)** The mechanism of antioxidant action in vitro. In: B.J.F. Hudson (Ed.), *Food antioxidants Elsevier Applied Science London*, 1-18.
- **Goupy P, Dufour C, Loonis M, et al (2003)** Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 615–622.
- **Graven E H, Dean S G, Svoboda K P, et al (1992)** Antimicrobial and antioxidative properties of the essential oil of *Artemisia afra* Jacq. *InJ Flavour Fragr.* 7 : 121-123.
- **Grima M (2005)** Les médicaments des pathologies digestives : Les inhibiteurs de la pompe à protons. *Faculté de Médecine de Strasbourg, Module de Pharmacologie Clinique*.
- **Guignard J L (2000)** *biochimie végétale 2^{ème} édition Dunod 188p*.
- **Guribe-Fakim A (2006)** Medicinal plants: tradition of yesterday and drugs of tomorrow: a review. *Mol Aspects Med* 27:1–93.
- **Gyires K (2005)** Gastric mucosal protection: from prostaglandins to gene-therapy. *Curr Med Chem* 12 (2) 203–215.

- **Hajimehdipoor H, Shahrestani R, Shekarchi M (2014)** Investigating the synergistic antioxidant effects of some flavonoid and phenolic compounds *Research Journal of Pharmacognosy (RJP)* 1(3): 35-40.
- **Hall AV, Parbtani A, Clark W F, et al (1992)** Oméga-3 fatty acid supplementation in primary nephrotic syndrom: effets on plasma lipids and coagulopathy. *J Am Soc Nephrol*,3(6).1321-9.
- **Hall W L (2009)** Dietary saturated and unsaturated fats as determinants of blood pressure and vascular function. *Nutr Res Rev.* 22 : pp.18.-38.
- **Halliwell B (1994)** Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews.* 52:253-265.
- **Hamdan Imad I, Afifi Fatma U (2008)** Screening of JordanianFlora for Amylase Inhibitory Activity, *Pharmaceutical Biology*, 46:10-11, 746-750, DOI: 10.1080/13880200802316053).
- **Hara N, Okabe S (1985)** Effect of gefernate on acute lesions in rats *Folia Pharmacologica Japonica* (85), pp: 443-448.
- **Harborne J B (1973)** Phytochemical methods, London. *Chapman and Hall, Ltd.* Pp. 49-188.
- **Harborne J B (1998)** Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. Third Edition.
- **Haslam E (1996)** Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs : possible modes of action. *J. Nat Pro*, 59: 205 215.
- **Havsteen H B (2002)** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and therapeutics*, vol. 96, p. 67-202.
- **Heim K E, Tagliaferro A R, Bobilya D J (2002)** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 13: 572-584.
- **Henneberg W, Stohmann K (1860)** Beiträge zur Begründung einer rationellen Fütterungder Wiederkäuer. Fasc.1, Schwetschkeand Sohn édit; Braunschweig. p 145-147.
- How Olive Oil Protects Against Breast Cancer. January (2005) <http://www.northwestern.edu/newscenter/stories/2005/01/oleic.html> (accessed on 8 th July, 2017)
- <http://www.northwestern.edu/newscenter/stories/2005/01/oleic.html> (accessed on 8 th July, 2017).

- <http://www.sirtin.fr/2011/01/20/les-epluchures-surprenants-de-lestomac/> 2011.
- https://fr.wikipedia.org/wiki/Aïn_Ghoraba.
- <https://www.genialvegetal.net/-Rouvet->
- <https://www.sahara-nature.com>
- **ISFAL International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (2004)** Recommendations for intake of Polyunsaturated Fatty Acids in Healthy Adults. ISSFAL 2004, UK (www.issfal.org.uk/) [Accessed 25/07/2008] ISBN: 978-2-294-74287-3.
- **Iserin P (2001)** Encyclopédie des plantes médicinales : Identification, préparations, soins LAROUSSE. 335p ISBN 2-03-560252-1.
- **Ito C, Itoigawa M, Onoda S (2005)** Chemical constituents of *Murraya siamensis*: three coumarins and their anti- tumor promoting effect. *Phytochemistry*, 66(5): 567-572.
- **Iwashina T, Hatta H (1998)** *Ann. Tsukuba Bot. Gard.* 17, 139.
- **Iwashina T, Lopez-Saez J A, Kitajima J, et al (2008)** Flavonoids from *Osyris alba* *Biochemical Systematics and Ecology* 36: 146-147.
- **Iwashina, T, Konta, F, Kitajima J (2001)** *J Jpn Bot.* 76, 166.
- **Jakobsen M U, O'Reilly E J, Heitmann B L, et al (2009)** Major types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a pooled analysis of 11 cohort studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 89: 1425-1432.
- **Jarrige R, Ruckebusch Y (1995)** Nutrition des ruminants domestiques : Ingestion et digestion. Editions Quae, p 57.
- **Jeon W Y, Lee M Y, Shin I, et al (2015)** *Curcuma aromatica* water extract attenuates ethanol-induced gastritis via enhancement of antioxidant status. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. Volume 2015, Article ID 582496, 7 pages.
- **Jimenez, G and al (1977)** *Agroquímica tecnología de alimentos*, 3 : 363-371.
- **Jokić S, Velić D, Bilić M, et al (2010)** Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from soybeans. *J Food Sci* 28 :206–12.
- **Jovanovic SV, Steenken S, Tosic M, et al (1994)** Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemistry Society*. 116: 4846-4851.
- **Julkunen-Titto R (1985)** Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J Agric Food Chem*, 33: 213-217.
- **Kadjo K, Ouattara B, Sanogo S, et al (1999)** Aspects épidémiologiques des ulcères gastroduodénaux. *Médecine d'Afrique Noire*, 46 : 2.

- **Kahkeshani, Fatemeh Farzaei, Maryam Fotouh, Seyedeh Shaghayegh Alavi et al (2019)** Pharmacological effects of gallic acid in health and diseases: A mechanistic review Niloofar. Iran J Basic Med Sci, Vol. 22, No. 3.
- **Kam A (1995)** Contribution à l'étude de l'activité anti-ulcéreuse des extraits totaux de fruits murs d'*Acacia nilotica (L.) var Adansonii* (GUILL.et PERR.) OKTZE (Mimosaceae L.) Thèse : Méd. Vét. : Dakar ; 23.
- **Kamath V, Rajini PS (2007)** The efficacy of cashew nut (*Anacardium occidentale L.*) skin extract as a free radical scavenger. J Food Chem 103:428–33.
- **Kamguia H, Guifo F, Fokunang C, et al (2011)** Effet cytoprotecteur de l'extrait aqueux des racines de *Dorsteniapsilurus* sur l'ulcère gastrique chez les rats mâles de la souche *Wistar*. HealthScience. Diseases, 12 : 4.
- **Kamoun P (1993)** Atlas de poches des méthodes d'analyse. Flammarion Médecine – sciences.
- **Karoui A, Allouche F, Deghrigue M, et al (2014)** Synthesis and pharmacological evaluation of pyrazolopyrimidine derivatives: anti-inflammatory agents with gastroprotective effect in rat. Medicinal Chemistry Research, vol.23, no.3, pp. 1591-1598.
- **Keita A (2005)** Etude de trois plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'ulcère gastro-duodéal dans le District de Bamako : *Borassus aethiopum* Mart (Palmeae), *Sclerocarya birrea* (A. Rich.). Hochst. (Anacardiaceae) et *Ximenia americana* L. 197p These Doctorat. Pharm: Bamako.
- **Kessier M, Beaud G U, Jung L (2003)** Anti and pro-oxidant activity of Rutin and Quercetin derivatives. J Pharm Pharmacol 55:131–42.
- **Khaldi D, Belarbi M, El Haci I A, et al (2018)** Antioxidant Activity and Determination of Gallic Acid and Quercetin in *Osyris alba* L. Root Extract. The Root Oil Contains Essential Fatty Acids. In Phytotherapie–Pharmacognosie Lavoisier. DOI: 10.3166/phyto-2018-0072.
- **Kierszenbaum A (2006)** Histologie et Biologie Cellulaire. In : Une introduction à l'anatomie pathologique. 1ère édition. Paris. 416 p.
- **Kim J Y, Lim H J, Lee DY, et al (2009)** In vitro anti-inflammatory activity of lignans isolated from *Magnolia fargesii*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 19(3): 937-940.
- **Kim J H, Campbell B C, Mahoney N, et al (2010)** Augmenting the activity of antifungal agents against *aspergilla* using structural analogues of benzoic acid as chemosensitizing agents. Fungal Biology, 114(10): 817-824.

- **Kjeldahl J (1883)** Meue Methode Zur bestimmung des stiktoffs in organischem körpern.Z. Anal. Chem ; Vol. 22, pp: 366-382.
- **Knaggs A R (2001)** The biosynthesis of shikimate metabolites. Nat. Prod. Rep.18, 334-355.
- **Koffi E, Sea T, Dodehe Y, et al (2010)** Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty-three Ivorian plants. J Animals Plant Sci 5:550–8
- **Koleva II, Van Beek T A, Linssen J P, et al (2002)** Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. Phytochem Anal 13:8–17.
- **Kris-Etherton P M, Harris W S, Appel L J (2002)** AHA Scientific Statement: Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. Circulation. 106 : 2747–2757.
- **Krishnaiah D, Sarbatly D, Nithanandam R (2010)** A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. Food Bioprod Process 89:217–33.
- **Ksouri R, Megdiche W, Falleh H, et al (2008)** Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. C R Biol 331:865–73.
- **Kubata BK, Nagamune K, Murakami N, et al (2005)** *Kola acuminata* proanthocyanidins: a class of anti-trypanosomal compounds effective against *trypanosome brucei*. International Journal for Parasitology, 35(1): 91-103.
- **L'OPDQ (2016)** Ulcère, Manuel de nutrition clinique de l'Ordre professionnel des diététistes du Québec (OPDQ).
- **Labayle D, Talbert M, Willoquet G (2001)** Guide Pharmaco, partie II, III, IV Hépatogastro- entérologie. 4eme Edition Lamarre, Paris, 1820 p.
- **Lacour B, Belon J P (2015)** Physiologie. Edition Elsevier Masson, France
- **Lakshmi Srinivas T, Mohana Lakshmi S, Neelufar Shama S, et al (2013)** Medicinal Plants as Anti-Ulcer Agents. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2 : 91-97.
- **Lamarque D (2004)** Physiopathologie des lésions gastroduodénales induites par les anti-inflammatoires non stéroïdiens, Gastroentérologie Clinique et Biologique, 28 : 18-26.
- **Lavanya A, Pitchiah K, Anbu J, et al (2012)** Antiulcer activity of *Canavalia virosa* (ROXB) W&A leaves in animal model, In J Life Sci Pharma Res, 2, 39 —43.
- **Lawrence L, Richard B, JyotiK, et al (2009)** Antidiabetic and hypoglycemic effects of *Mormodica charantia* (bitter melon): Amini review. British Journal of Nutrition 102:1703-1708.

- **Lecoq (1965)** Manuel d'analyse alimentaires et d'expertises usuelles.
- **Lee I, Mangano K, Rapisarda A, et al (2004)** Protection against murine endotoxemia by treatment with *Ruta Chalepensis L.*, a plant with anti-inflammatory properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 90, 267-272.
- **Lee J H, Koo N S, Min D B (2004)** Reactive oxygen species aging and antioxidative nutraceuticals. Comprehensive review. *Int J Food Sci food Safety* 3:20–33.
- **Levart M, Lambert P (1960)** La maladie ulcéreuse : influence de l'hérédité et de l'environnement. *Presse méd*, 68 : 431-434.
- **Li H, Song F, Duan L R, et al (2016)** Paeonol and danshensu combination attenuates apoptosis in myocardial infarcted rats by inhibiting oxidative stress: roles of Nrf2/HO-1 and PI3K/Akt pathway. *Sci Rep* (6) 23693.
- **Lieutaghi P (2006)** Une ethnobotanique méditerranéenne plantes, milieux végétaux et sociétés, des témoignages anciens au changement climatique. *Actes Sud 2006*.
- **Lin C, Chen C, Liang Y, et al (2002)** Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 294: 167-172.
- **Linden G, Lorient D (1994)** Biochimie agro- industrielle, valorisation alimentaire de la production agricole. Edition Masson, 75.
- **Lion P H (1955)** Travaux pratiques de chimie organique, Ed. Dunod. Paris.
- **Liyana-Pathirana C M, Shahidi F (2006)** Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. *J Agr Food Chem*, 54 pp. 1256-1264.
- **Louvet A (2010)** Hépatogastro-entérologie chirurgie digestive, Collection Medline, pp 99-111.
- **Lucarini M, Mugnaini V, Pedulli G F (2002)** Bond dissociation enthalpies of polyphenols: the importance of cooperative effects. *Journal of Organic Chemistry*. 67: 928-931.
- **Luo X D, Basile M J, Kennelly E J (2002)** Polyphenolic antioxidants from the fruits of *Chrysophyllum cainito L.* (star apple). *J Agric Food Chem* 50:1379–82.
- **Luo C, Chen H, Wang Y, et al (2018)** Protective effect of coptisine free base on indomethacin-induced gastric ulcers in rats: characterization of potential molecular mechanisms. *Life Sci* 193: 47–56.
- **Lv H, Lin Y, Liu P, et al (2019)** Protective effects and potential underlying mechanisms of sodium copper chlorophyllin against ethanol induced gastric ulcer in mice. *Acta Biochim Biophys* 51 (9) 925–933.

- **Lwoff J M (1971)** Activité ulcérogène chez le rat. Fiche technique n° 12. Journal de Pharmacologie, 2 (1) 81-83.
- **Mabberley D D (1997)** In: The Plant-book. Second Ed, Cambridge University Press, Cambridge, p 514.
- **Mabry T J, Markham K R, Thomas M B (1970)** The Systematic Identification of Flavonoids. Springer, Berlin.41-164.
- **Macheix J J, Fleuriet A, Jay-Allemand C (2005)** Les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. 1ere Edition, Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne.
- **Magnin E (2016)** Estomac-Anatomie, Fonctionnement et pathologie Fiche. Créé JUILLET2016 vue le 1/06/2018 disponible sur www.passeport_sante.net/fr/parti-corps/Fiche.
- **Makhlouf M (2014)** ulcer gastro-duodenal. La muqueuse et EMC. Gastro-enterologie ; 38: 316-321.
- **Makkar H P S (2000)** In "*Quantification of tannins in tree foliage*" Working document, FAO/IAEA, Vienna.
- **Marc J F (2007)** Physiologie du stress, système nerveux autonome (SNA) et adrénaline (ADR). Labarha (Laboratoire de Rhumatologie Appliquée), p. 1-5, Lyon.
- **Marfak A (2003)** Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leurs activités avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thèse de doctorat, Université de Limoge, spécialité biophysique, pages 200.
- **Marieb E N (2008)** Biologie humaine principes d'anatomie et de physiologie. 8^eEd. France : Pearson, 708p.
- **Marieb E N, Hoehn K (2010)** Anatomie et physiologie humaines. 8^{ème} édition. Québec : Pearson. 1004p.
- **Markham K R (1982)** Technics of flavonoids identification. *Academic Press* (London); Chap.1 et 2: 1-113.
- **Martin S (2001)** La phythérapie et les troubles digestifs. Thèse Doctorat en Pharmacie. p 285. Université Henri Poincaré - Nancy 1 Faculté de Pharmacie.
- **Martins J L R, Rodrigues O R L, Da Silva D M, et al (2014)** Mechanisms involved in then gastroprotective activity of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent on gastric lesions in mice. Journal of ethnopharmacology, 155(3), 1616-1624.
- **Masquelier J, Dumon M, Dumas J (1979)** Stabilisation des collagènes par des oligomères procyanidoliques. Acta thérapeutique, 1: 101- 104.

- **Matrat L (2016)** <http://anses.fr/tableciqual/> ANSES (Agence nationale de sécurité de l'alimentation, de l'environnement et du travail), Table ciqual composition nutritionnelle des aliments (accessed on 29th June 2017).
- **Maurice N (1997)** L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire duXXIe siècle. Ed. Tec et Doc, Paris. France. Pp 12-14.
- **Mazur W, Lindholm P, Vuorinen K, et al (2010)** Cell-specific elevation of NRF2 and sulfiredoxin-1 as markers of oxidative stress in the lungs of idiopathic pulmonary fibrosis and non-specific interstitial pneumonia. *Apmis* 118: 703–712.
- **Melgarejo E, Medina MA, Sánchez-Jiménez F, et al (2010)** Targeting of histamine producing cells by EGCG: a green dart against inflammation? *J Physiol Biochem* 66 (3) 265–270.
- **Melo FH, Cenacchi RM, Barbosa JP, et al (2012)** Gastroprotective, toxicological and immune toxicological evaluation of *Austroplenckia populnea*. *Int J Pharm Bio Sci*, vol.3, no.3. P. 396 – 411.
- **Méthode d'analyse N°07 96 06 /CACQE.** Méthode d'analyse N°07 96 06 Ministère de commerce CAQUE. Détermination de la teneur en azote en vue de calcul de la teneur en protéines brutes.
- **Metoughi N (2008)** 91 % de la population algérienne atteinte d'*Helicobacter pylori*_[en ligne] sur<http://www.algerie-dz.com/forums/archive/index.php/t-104936.html> [consulté le 9/03/2018].
- **Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC (2000)** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*, 52: 673-839.
- **Mignon M (1983)** Gastro-entérologie ; Paris : Editions ellipses/AUPELF ; 703p.
- **Mignon M (1990)** Prévention des rechutes et des complications ulcéreuses dans la maladie ulcéreuse duodénale. *Gastroentérol Clin Biol* 14, T1-T7.
- **Mignon M (1992)** Gastro-Enterologie : Précis des maladies de l'appareil digestif. Edition Ellipses Paris, 703 p.
- **Milane H (2004)** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, études et applications thérapeutiques. Thèse en vue de l'obtention du grade de docteur en science. Université Louis Pasteur. Strasbourg.

- **Mohie El-Dien R T, Maher S A, Abdelmohsen U R, et al (2020)** Antiulcer secondary metabolites from *Elaeocarpus grandis*, family *Elaeocarpaceae*, supported by in silico studies† Radwa Taher Journal of Royal Society of Chemistry RSC Adv,10, 34788–34799.
- **Mompon B, Lemaire B, Mengal P, et al(1998)** Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. Ed. INRA, Paris (les Colloques, N° 87).
- **Morain P (1969)** Ulcères gastro-duodénaux, in revue horizons médicaux, Edition Platon, Paris, N° 167, 132 p.
- **Morin O, Pares X P X (2012)** Huiles et corps gras végétaux : ressources fonctionnelles et intérêt nutritionnel. J OCL 19 : 63–74.
- **Mountasser A, Elhaddek M (1999)** Optimisation des facteurs influenc,ant l'extraction de l'huile d'argan par une presse, Oleagineux, Corps gras, lipides, Vol. 6 No. 3, pp. 273-9.
- **Nagao A, Seki M, Kobayashi H (1999)** Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 63(10), 1787-1790.
- **Nagy S, Telek L., Hall NT, Berry NE (1978)** Potentiel food uses for protein from tropical and subtropical plant leaves. *J Agric Food Chem*. 26(5), 1016-1028.
- **Negro C, Tommasi L, Miceli A (2003)** Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresour Technol* 87:41–4.
- **Ness AR, Powels JW (1997)** Fruits and vegetables and cardiovascular disease: a review. *J Epidemiol Intl* 26 :1–13.
- **Nićiforovic N, Mihailovic V, Maskovic P, et al (2010)** Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources of natural antioxidants. *J Food Chem Toxicol* .48 :3125–30
- **Nkhili E (2009)** Polyphénols de l'Alimentation μ Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de Doctorat. Avignon. p. 327.
- **Oates P J, Hakkinen J P (1988)** Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. *Gastroenterology* 94: 10–21.
- **Oberdiaca P, Mineur L (2010)** Dose de tolérance à l'irradiation des tissus sains : L'estomac. *Cancer/Radiothérapie*, vol.14, P.336–339.
- **Okamura H, Mimura A, Yakou Y, et al (1993)** Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry*, 33(3): 557-561.
- **Osman A M (2011)** Multiple pathways of the reaction of 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) with (+)-catechin: Evidence for the formation of a covalent adduct between DPPH and the oxidized form of the polyphenol. *Biochem Biophys Res Comm* 412:473–8.

- **Oyaizu M (1986)** Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J Nutr*, 44: 307-315.
- **Ozenda P (1991)** Flore et végétation du Sahara. 3.ed. (Mise à jour et augm.) de la Flore du Sahara. Ed. Du CNRS. 662 p.
- **Paris M, Hurabielle M (1981)** Abrégé de matière médicale- Pharmacognosie. Tome 1. Edition Masson, Paris. p.182.
- **Pearson J, Hutton D (1998)** Structure and Function of the Stomach. *Encyclopedia of Human Nutrition*, 2: 929-938.
- **Pénicaud C (2009)** Etude et modélisation du couplage entre le transfert d'oxygène et les réactions d'oxydation dans les aliments au cours de leur conservation. Thèse de Doctorat : Université de MONTPELLIER II.
- **Pietta P G (2000)** Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63: 1035-1042.
- **Pillai N R, Suganthan D, Seshari C, et al (1978)** Antigastric ulcer activity of nimbidin. *Indian Journal of Medical Research* 68, 169–175.
- **Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, et al (2002)** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydant physiologique action of antioxydant défense. *Nutrition clinique et métabolisme*. 16 : 233-239.
- **Piquemal G (2008)** Les flavonoïdes (en ligne): <http://www.detoursante.com/index.php?Option=comcontent&view=article&id=166&Itemid=215>
- **Planchon J E (1858)** Sur le parasitisme de l'*Osyris alba*. 445-446 - Départ /Région : 17 - Société Botanique de France, Bull. Soc. bot. Fr., Session extraordinaire, Tome 5 - Session extraordinaire - Saisie : Jean TIMBAL - Art. n°5823.
- **Planchon M L (1912)** Sur l'*Osyris alba* L, Bulletin de la Société Botanique de France, 59 :2, 108-112.
- **Porth C M, Grossman S C (2013)** Porth's Pathophysiology: Concepts of Altered Health States, Lippincott Williams & Wilkins.
- **Prieto P, Pineda M, Aguilar M (1999)** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*, 269: 337–341.
- **Quezel P, Santa S (1962 ; 1963)** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I et Tome II. CNRS, Paris, 1087 p.
- **Rached W, Benamar H, Bennaceur M, et al (2010)** Screening of the antioxidant potential of some Algerian indigenous plants. *J Biol Sci*. 10(4):316–24.

- **Rached W, Calhelha RC, Fernandes A, et al (2016)** Phytochemical characterization and bioactive properties of *Osyris quadripartita Salzm. ex Decne.* leaves from Algeria. Journal of RSC Advance, Issue 76.
- **Rahman Z, Dwivedi DK, Jen G B (2020)** Ethanol-induced gastric ulcer in rats and intervention of tert-butylhydroquinone: Involvement of Nrf2/HO-1 signaling pathway Human and Experimental Toxicology Vol. 39(4) 547–562.
- **Raynard B, Nitenberg G (1999)** la prévention des hémorragies digestives hautes en réanimation est-elle utile ? *Schweiz Med Wochenschr*, vol.129, no. 43, pp1605–1612.
- **Rhamani M (2005)** Composition chimique de l'huile d'argan vierge. Cahier Agricultures 14: 461–465.
- **Rhoades R A, Tanner G A (2005)** *Medical physiology*. Blackwell publishing. USA. P.483-488.
- **Ribéreau-Gayon J, Peynaud E (1968)** Les composés phénoliques des végétaux. Traité d'œnologie. Paris.Edition Dunod, 254p.
- **Richter G (1993)** Métabolisme des végétaux. Physiologie et Biochimie. Edition Presses Polytechniques et Universitaire Romandes, p.322-323.
- **Robert A, Nezamis J E, Lancaster C, et al (1979)** Cytoprotection by prostaglandin in rats, Prevention of gastric necrosis produced by Alcohol, HCl, NaOH, Hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology*,1979.77433-43.
- **Rolo-Naranjo A, Rebollido-Rios R., Melchor-Rodriguez, et al (2009)** Pseudo-phase portrait applied to pattern recognition in flavonoid–protein interactions. *Applied Mathematics and Computation* 215, 156–167.
- **Roth J L A (1974)** Drugs induced lesions. In Bockus HL (ed) *Gastroenterology*, volI,3rd ed Saunders, Philadelphia p487.
- **Roux D, Catier O (2007)** Botanique, Pharmacognosie et Phytothérapie. Wolters Kluwer France Edition, p 74.
- **Rozza A L, Hiruma-Lima C A, Tanimoto A, et al (2012)** Morphologic and Pharmacological Investigations in the Epicatechin Gastroprotective Effect. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, P.1-8.
- **Ruiz G (2005)** Extraction, Détermination Structurale et Valorisation Chimique de Phycocolloïdes d'Algues Rouges. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Limoges Discipline : Chimie appliquée - Chimie des Substances Naturelles. Pp258.

- **Saadaoui N, Weslati A, Barkaoui T, et al (2020)** Gastroprotective effect of leaf extract of two varieties grapevine (*Vitis vinifera* L.) native wild and cultivar grown in North of Tunisia against the oxidative stress induced by ethanol in rats. *Biomarkers* 25 (1) 48–61.
- **Sabiha Achat (2013)** Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. Autre. Université d'Avignon. Thèse de doctorat en Chimie. pages 209.
- **Sadasivam S, Thayumanavan B (2003)** Molecular host plant resistance to pests. Volume 96 de Books in soils, plants and the environment. CRC Press, p221.
- **Safar M, Safavian A, et al (1985)** Conduite Thérapeutique dans les principales affections du tube digestif. Guide pratique de thérapeutique, Edition Ellipses, Paris, tome.1, 407 p.
- **Salducci J, Desjeux A, Chamlian A (2005)** Ulcère gastrique et duodéal. In : *Hépatogastro entérologie*. 90p.
- **Salena B J, Hunt R H (2005)** *L'estomac et le duodénum*. In : Thomson AB R, Shaffer EA (2005) Principes fondamentaux de Gastro-entérologie : Etats pathologiques et démarches thérapeutiques. 5ème édition. Canada : Janssen Ortho.157 p.
- **Samsong W (1980)** Physiologie appliqué à la médecine. Médecine-science Edition Flammarion, Paris, pp : 475, 479-480.
- **Sánchez-Mendoza ME, López-Lorenzo Y, Cruz-Antonio L, et al (2019)** Gastroprotection of calein D against ethanol-induced gastric lesions in mice: Role of prostaglandins, nitric oxide and sulfhydryls. *Molecules*, Basel, V. 24, N. 3, P. 622.
- **Sanchez-Moreno C (2002)** Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Sci Tech Int*, 8(3): 121-137.
- **Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F (1998)** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric*, 76: 270–276.
- **Scalbert A (1991)** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30 : 3875-3883.
- **Scalbert A, Manach C, Morand, et al (2005)** Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45 : 287–306.
- **Schlesier K, Harwat M, B.hm V, et al (2002)** Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods, *Free Radic Res*; 36(2): 177–87.
- **Schlesier K, Harwat M, Bohm V, et al (2009)** Assessment of Antioxidant Activity by Using Different In Vitro Methods. *Free Rad Res* 36:177–87.
- **Schofield P, Mbugua D M, Pell A N (2001)** Analysis of condensed tannins A review. *Anim. Feed Sci Technol*. Vol (91) page: 21.

- **Shahidi F, Wanasundara PK (1992)** Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 32:67–103.
- **Sharifi-Rad M, Fokou PVT, Sharapova F, et al (2018)** Antiulcer agents: from plant extracts to phytochemicals in healing promotion, *Molecules*. 23, 1751.
- **Sherwin E R (1976)** Antioxidants for vegetable oils. *Journal of American Oil Chemical Society*,53(6): 430-436.
- **Sherwood (2006)**. Physiologie humaine : 2ème édition. De Boeck, Paris, pp.452-462.
- **Sherwood L (2000)**. Physiologie humaine. 2^eEd. Bruxelles : De Boeck, 674p.
- **Silbernagl S, Despopoulos A (2001)** Atlas de poche de physiologie. 3^{ème} Edition : Flammarion, Paris. P.233-237.
- **Silverthorn D U (2007)** Physiologie humaine.4 Ed. France : Pearson, 938p.
- **Singleton V L, Rossi J A Jr (1965)** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *American journal of ecology and viticulture*,16: 144-158.
- **Sistani Karampour N, Arzi A, Rezaie A, et al (2019)** Gastroprotective effect of zingerone on ethanol-induced gastric ulcers in rats. *Medicina Kaunas (Kaunas)* 55 (3) E64 pii.
- **Smith S I, Kirsch C, Oyedeji K S, et al (2002)** Prevalence of *Helicobacter pylori* vac A, cag A and ice A genotypes in Nigerian patients with duodenal ulcer disease. *J Med Microbiol*, 51, 851 —854.
- **Smyth T, Ramachandran V N, Smyth W F (2009)** A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *International journal of antimicrobial agents*,33(5): 421-426.
- **SAIN Société des agriculteurs et des naturalistes (1956)** Nouveau dictionnaire d'histoire naturelle, appliquée aux arts, à l'agriculture, à l'économie rurale et domestique, à la médecine, etc. Genre. Paris, Chez Deterville, 1816-19. Edition Nouv. presque' entièrement refondue et considérablement augmentée.DOI <https://doi.org/10.5962/bhl.title.20211>.
- **Sofowara A (1993)** Medicinal plants and Traditional medicine in Africa. Spectrum Books Ltd, Ibadan, Nigeria. P. 289.
- **Sokolova O, Naumann M (2019)** Crosstalk between DNA damage and inflammation in the multiple steps of gastric carcinogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*. (421) 107–137.
- **Song S H, Kim J E, Sung J E, et al (2018)** Anti-ulcer effect of Gallarhois extract with anti-oxidant activity in an ICR model of ethanol/hydrochloride acid-induced gastric injury. *J Tradit Complement Med* 9 (4) 372–382.

- **Sun B, Richardo-da-Silvia J M, Spranger I (1998)** Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J of Agriculture and Food Chemistry*. Vol (46), page: 4267- 4274.
- **S´wieca M, Gawlik-Dziki U, Dziki D, et al (2013)** The influence of protein–flavonoid interactions on protein digestibility in vitro and the antioxidant quality of breads enriched with onion skin. *Food Chemistry* 141, 451–458.
- **Szent-Györgyi A (1938)** Therapeutic properties of vitamins. *Presse Medicale* 46(995) : 1893-1971.
- **Takashima M, Horie M, Shichiri M, et al (2012)** Assessment of antioxidant capacity for scavenging free radicals in vitro: a rational basis and practical application. *Free Radic Biol Med* 52:1242–52.
- **Tanih N, Ndipl L, Clarke A (2010)** An overview of pathogenesis and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Afr J Microbiol Res*, 4, 426 —436.
- **Tarnawski AS (2005)** Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Dig Dis Sci* 50 (S1) S24–33.
- **Taylor D (1979)** Les maladies du porc. Maisons Alfort : Ed. du point vétérinaire : 150-152.
- **Tepe B, Sokmen H M, Akpulat A, et al (2005)** In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of five *Allium* species from Turkey. *Food Chemistry* Volume 92, Issue 1, Pages 89-92.
- **Tortora G J, Derrickson B (2010)** Manuel d’anatomie et de physiologie humaine. 2ème tirage. Bruxelles : De Boeck, 684p.
- **Trease E, Evans W C (1987)** Pharmacognosy Billiare Tindall. London 13th Edn; pp: 61-62.
- **Tripathi K D (1999)** Gastrointestinal Drugs: drugs for peptic ulcers. *Essentials of Medical Pharmacology* New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd; pp. 628–42. 8.
- **Tsao R (2010)** Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231-1246.
- **Vakil N (2021)** University of Wisconsin School of Medicine and Public Health. Dernière révision totale juin 2021. Dernière modification du contenu juin 2021. Revue générale de la sécrétion acide.
- **Vermerris W (2006)** Phenolic compound biochemistry, Springer, Dordrecht. ISBN-10 1-4020-5163-8 (EB).

- **Visioli F, Borsani L, Galli C (2000)** Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of Phytochemicals. *Cardiovascular Research* 47, 419–425.
- **Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J (2011)** High Performance Liquid chromatography in Phytochemical science. *Chromatographic Science Series*, 477-478.
- **Wishart D S, Jewison T, Guo A C, et al (2013)** The Human Metabolome Database in <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB60039> (accessed on 29 th June, 2017).
- **Xing J J, Eun J K, In K O, et al (2010)** Prevention of UV-induced skin damages by 11,14,17-eicosatrienoic acid in hairless mice in vivo. *J Korean Med Sci* 25:930–7.
- **Yildirim A, Mavi A, Kara (2001)** Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus L.* extracts. *J Agric Food Chem* 49:4083–9.
- **Yildirim A, Mavi A, Kara A (2001)** Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus L.* extracts. In *J Agriculture and Food Chemistry*. 49:4083-4089.
- **Yu Z, Dahlgren R A (2005)** Evaluation of methods for measuring polyphenols in copper foliage. *J. Chem. Ecol.* 26: 2119-2140.
- **Zhang Y, Vareed SK, Nair MG (2008)** Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Sci*, 76: 1465-1472.
- **Zhao P, Jun-Min Mao, Shu-Yun (2014)** Quercetin induces HepG2 cell apoptosis by inhibiting fatty acid biosynthesis. *Oncology letters*. Volume (8) Issue 2 Pages: 765-769.
- **Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W (1999)** The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 64 (4): 555–559.
- **Zhou D, Yang Q, Tian T, et al (2020)** Gastroprotective effect of gallic acid against ethanol-induced gastric ulcer in rats: Involvement of the Nrf2/HO-1 signaling and anti-apoptosis role. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 126.110075.
- **Zhou H C, Lin Y M, Wei S D, et al (2011)** Structural diversity and antioxidant activity of condensed tannins fractionated from mangosteen pericarp. *Food Chemistry*, 129(4): 1710-1720.

Annexes

1-Métabolites primaires :

Tableau 1 : Valeurs des absorbances (A) de la gamme d'étalonnage (α -D-Glucose) lues à 490 nm

Nb des tubes	Concentration $\mu\text{g/ml}$	A de la Solution G1 (D + glucose)	A de la Solution G2 (D + glucose)	Moyenne des 2 densités optiques $M = (G1 + G2) / 2$
Blanc	00	00	00	00
1	10	0.147	0.093	0.12
2	25	0.278	0.256	0.267
3	40	0.408	0.393	0.4005
4	60	0.632	0.577	0.6045
5	75	0.744	0.763	0.7535
6	100	1.050	0.934	0.992

Tableau 2 : Valeurs des teneurs en métabolite primaires

EROA	Pro	Suc	Lip	Cen	Fib
% MS	21	13.76	12.26	4.16	2.4025
	21	13.76	12.5	4.5	2.438
	20	13.98	12	3.99	2.367
	22	13.55	12.3	4	2.4025
	21	13.76333333	12.26666667	4.163333333	2.4025
	0.81649658	0.17556259	0.20548047	0.23809429	0.02898563

2. Métabolites secondaires

Tableau 3 : Les données de base pour le dosage des polyphénols totaux PT

	mi g	Vi ml	%
0.927	0.248	5.77	26.84
0.948			25.6
0.946			26.445
C mg/ml = A/2,916		C mg EAG/ES g	26.295
0.3179			0.51722013
0.325		366.4535	
0.3244		374.63	
		373.94	
		371.6745	
		3.70253569	

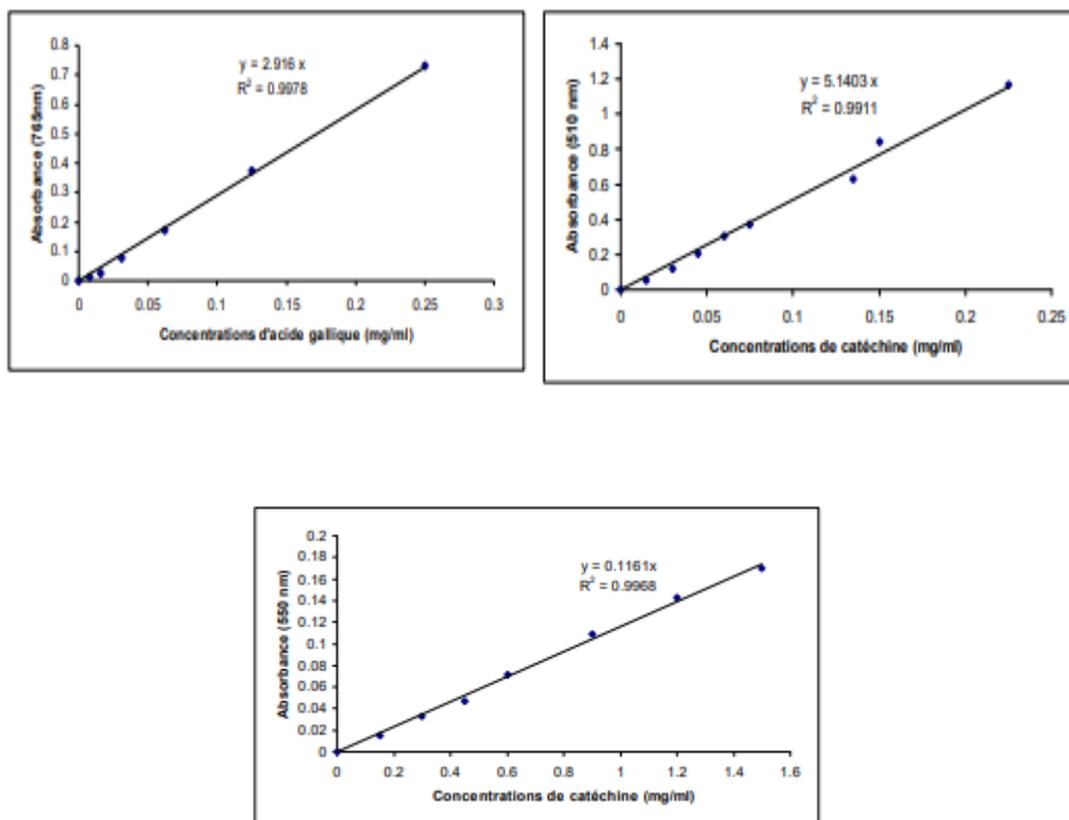
Tableau 4 : Les données de base pour le dosage spectrophotométrique des flavonoïdes totaux FT

A	mi g	Vi ml	%
0.992	0.248	5.77	24.7727
0.988			
C mg/ml = A/5,1403		C mg ECAT/ES g	
0.1929		55.4448	
0.1922		55.245	
		55.3449	
		0.0999	

Tableau 5 : Les données de base pour le dosage spectrophotométrique des tanins condensés TC

A	mi g	Vi ml	%	
0.456	0.248	5.77	24.7727	
0.496				
	C mg/ml = A/0,1161		C mg ECAT/ ES g	
	4.0995		119.1867	
	4.27179		123.1057	
			121.1462	
			1.9595	

Figure 1 : Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux PT, des flavonoïdes totaux FT et des tanins condensés TC



2.2. Extractions sélective et rendements des composés phénoliques

Tableau 6 : Les données de base pour les extractions sélectives des fractions flavonoïdes et tanins

	EROA			
% FVED	% FVAE	% FVBUT	% FVAQ	% TAN
0.06	1.3	4.81	8.32	3.24
0.077	1.23	3.9	8.65	4.1
0.056	0.9	3.33	9.32	4.6
0.06433333	1.14333333	4.01333333	8.76333333	3.98
0.00910433	0.17441967	0.60949888	0.41603953	0.56166419

3. Evaluation du pouvoir antioxydant

3.1. Piégeage du radical libre DPPH

Tableau 7 courbes de piégeage du radical libre DPPH par le standard et les extraits d'*Osyris alba L Skeel*

AA [µg/ml]	1.25	2.5	5	7.5
% PI DPPH	23.2409	38.3795	75.586	96.64

AA [µg/ml]	1.25	2.5	5	7.5
% PI DPPH	24	39.5	77	97.5

[µg/ml] PT	0.25	0.625	1.25	1.875	2.5
% PI DPPH	2.51	7.1	23.6	34.06	62.5

[µg/ml]PT	0.25	0.625	1.25	1.875	2.5
% PI DPPH	6.22	9.61	23.14	38.43	63.5

[µg/ml] PT	0.25	0.625	1.25	1.875	2.5
% PI DPPH	5.02	12.77	22.6	34.5	65

[µg/ml] FVBUT	0.25	0.625	1.25	1.875	2.5	6.25	12.5	18.75	25
% PI DPPH	8.9	8.8	11.66	19.89	39.98	41.05	61.12	78	88.33
[µmg/ml] FVBUT	0.25	0.625	1.25	1.875	2.5	6.25	12.5	18.75	25
% PI DPPH	8	10	12.23	21.03		42.17	63.5	72.33	88.33
[µmg/ml] FVBUT	0.25	0.625	1.25	1.875	2.5	6.25	12.5	18.75	25
% PI DPPH	7.5	8	10.44	22.55	43	45.21	60.33	80	88

[µg/ml] FVAQ	0.25	0.625	1.25	1.875	2.5	6.25	12.5	18.75	25
% PI DPPH	7.15	5.6	5	14.15	15	28.46	49	72.32	84.5
[µg/ml] FVAQ	0.25	0.625	1.25	1.875	2.5	6.25	12.5	18.75	25
% PI DPPH	7.15	4.5	6	16.2	13.13	30.66	50.09	66	82.3
[µg/ml] FVAQ	0.25	0.625	1.25	1.875	2.5	6.25	12.5	18.75	25
% PI DPPH	6	5.6	5.6	13.7	17.355	29	49.99	71	85

% PI DPPH	3.125	1.98	6.25	12.5	24.78	60	70	77	82.55
[µg/ml] FVAE	0.25	0.625	1.25	1.875	2.5	6.25	12.5	18.75	25
% PI DPPH	3.89	3.27	5.82	12.4	24.88	59	71.88	74	81.9
[µg/ml] FVAE	0.25	0.625	1.25	1.875	2.5	6.25	12.5	18.75	25
% PI DPPH	3.3	2.8	7.1	11.92	25.6	60	71.2	75	81

3.2. Pouvoir de réduction des ions ferrique F. R. A. P

Tableau 8 : Courbe de réduction des ions ferriques par le standard et les extraits d'*Osyris alba LSkeel*

g/ml] AA	0	11	27.77	55.55	83.33
A		0.2036	0.5609	1.1304	1.355
[µg/ml] AA	0	11	27.77	55.55	83.33
A		0.22	0.632	1.14	1.45
[µg/ml] AA	0	11	27.77	55.55	83.33
A		0.18	0.601	1.15	1.385

[µg/ml] PT	13.88	27.77	55.55	111	222.22
A	0.279	0.48	0.904	1.471	2.224
[µg/ml] PT	13.88	27.77	55.55	111	222.22
A	0.312	0.501	0.859	1.493	2.218
[µg/ml] PT	13.88	27.77	55.55	111	222.22
A	0.311	0.537	0.853	1.5	2.187

[µg/ml] FVAE	1.66	3.33	6.66	13.88	27.77	55.55	111	222
A	0.08	0.116	0.207	0.399	0.612	0.988	1.679	2.218
[µg/ml] FVAE	1.66	3.33	6.66	13.88	27.77	55.55	111	222
A	0.1	0.117	0.192	0.359	0.621	0.961	1.567	2.187
[µg/ml] TAN	6.66	13.88	27.77	55.55	111	222.22		
A	0.089	0.19	0.259	0.542	0.986	1.603		
[µg/ml] TAN	6.66	13.88	27.77	55.55	111	222.22		
A	0.11	0.19	0.316	0.587	0.954	1.646		
[µg/ml] TAN	6.66	13.88	27.77	55.55	111	222.22		
A	0.116	0.19	0.293	0.592	0.985	1.742		

[µg/ml] FVAQ	1.66	3.33	6.66	13.88	27.77	55.55	111	222	444.44
A	0.027	0.048	0.09	0.159	0.317	0.499	0.85	1.532	2.53
[µg/ml] FVAQ	1.66	3.33	6.66	13.88	27.77	55.55	111	222	444.44
A	0.026	0.058	0.119	0.172	0.333	0.555	0.935	1.525	2.43
[µg/ml] FVAQ	1.66	3.33	6.66	13.88	27.77	55.55	111	222	444.44
A	0.034	0.058	0.088	0.19	0.316	0.545	0.827	1.645	2.2

g/ml] FVBUT	1.66	3.33	6.66	13.88	27.77	55.55
A	0.075	0.121	0.216	0.375	0.608	0.939
[µg/ml] FVBUT	1.66	3.33	6.66	13.88	27.77	55.55
A	0.087	0.119	0.2	0.337	0.556	0.925

Tableau 9 : les absorbances DO de l'acide ascorbique et des extraits d'*Osyris alba LSkeel*

A	AQ	BUT	AE	PT	TAN	AA
[µg/ml] 1.66	0.026	0.075	0.08	0.77	0.11	0.078
3.33	0.058	0.121	0.116	0.311	0.19	0.115
6.66	0.119	0.216	0.207	0.537	0.316	0.213
13.88	0.172	0.375	0.399	0.853	0.587	0.402
27.77	0.333	0.608	0.612	1.5	0.954	0.632
55.55	0.555	0.939	0.988	2.187	1.646	1.14
111	0.935	1.452	1.679	2.187		1.686
222	1.525	2.006	2.218			2.515
444.44	2.43					

3.3. Capacité antioxydante totale CAT :

Tableau10 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique AA

AA [mg/ml]	0.016	0.032	0.063	0.125	0.25	0.5	1
A	0.07	0.132	0.219	0.404	0.919	1.75	2.8
A	0.072	0.11	0.218	0.415	0.985	1.71	2.85
A	0.076	0.145	0.213	0.566	1.025	1.918	2.78
0.07266667	0.129	0.21666667	0.46166667	0.97633333	1.79266667	2.81	
0.00249444	0.0144453	0.00262467	0.07391136	0.04370609	0.09011597	0.0294392	

[mg/ml] AA	0.016	0.032	0.063	0.125	0.25	0.5	1
A	0.073	0.129	0.217	0.462	0.976	1.8	2.8

Equation déduite de la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique

$$A=2,842C+0,115$$

$$r^2 =,978$$

Tableau 11 : Données de base de CAT de l'acide ascorbique, des polyphénols PT, des tanins TAN, et des fractions flavonoïdes FV

PT mg EAA/g ES		mg EAA/g MS	
	A à 1 mg/ml		
	0.399	8.65	
	0.41	8.98	
		8.815	
	mi=301,3mg	0.165	
	vi=7,9ml		
TAN mg EAA/g ES		mg EAA/g MS	
	A à 1 mg/ml		
	1.074		
	0.975	4.98	
	0.994	5.096	
		5.038	
	mi=55,4mg	0.058	
	18,47mg/ml	vi=3ml	
AE mg EAA/g ES		mg EAA/g MS	
	A à 1 mg/ml		
	0.549		2.765
	0.543		2.727
	0.429		2.746
	mi=15,9mg	vi=3,3ml	0.019
	c=4,82mg/ml		
BUT mg EAA/g ES		mg EAA/g MS	
	A à 1 mg/ml		
	0.396	1.626	
	0.403	1.666	
	0.504	1.646	
mi=96,2 mg	vi=3ml	0.02	
	c=32,07 mg/ml		
AQ mg EAA/g ES		mg EAA/g MS	
	A à 1 mg/ml		
	0.242		0.976
	0.262		1.13
	0.437		2.485
	mi=166,4mg	vi=4ml	1.53033333
	c=41,6mg/ml		0.67797263

2. **Evaluation de l'activité antiulcéreuse a titre curatif et pouvoir cicatrisant - chez le rat *Wistar***

Tableau 12 : Activité antiulcéreuse avec parametres

		Lot ulcer	Lot RN	Lot OA
% Ulcération PU		100	50	1.33
Index Ulcère IU		3	1.4	0.046
% Inhibition PI		0	100	98.67

Tableau13 : Lot ulcèr : Ulcèr provoqué par le melange alcool /acide hydrochlorydrique

	Lot Ulcer			
RATS	% ULC	COTATION	INDEX ULC	% INULC
1	20	3	3	0
2	20	3	3	0
3	20	3	3	0
4	20	3	3	0
5	20	3	3	0

Tableau 14 : Lot décocté : Effet curatif- du décocté des racines *d'Osyris alba L Skeel* (extrait)

Lot Décocté (EROA)			
% ULC	COTATION	INDEX ULC	% IN ULC
0	0	0	20
0	0	0	20
0	0	0	20
0	0	0	20
1.33	1	0.046	18.67

Tableau 15 : Lot Standard :Effet curatif- de la molécule médicamenteuse le ranitidine (standard)

Lot référence la Ranitidine			
% ULC	COTATION	INDEX ULC	% IN ULC
9.32	1	1.4	10.67
9.32	2	1.4	10.67
9.32	1	1.4	10.67
9.32	2	1.4	10.67
9.32	1	1.4	10.67

3. Analyse statistique de l'évaluation de l'activité antiulcéreuse chez le rat Wistar

Analyse de variance : un facteur ANOVA % PI (pourcentage d'inhibition) ULCER

RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Groupes</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>	<i>Somme</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Variance</i>
% PI LOT ULCER	5	0	0	0
% PI LOT RANITIDINE	5	53.35	10.67	0
% PI LOT DECOCTE OSYRIS ALBA L SKEEL	5	98.67	19.734	0.35378

ANALYSE DE VARIANCE

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	975.726253	2	487.863127	4137.0043	9.226E-18	3.88529383
A l'intérieur des groupes	1.41512	12	0.11792667			
Total	977.141373	14				

Analyse de variance : un facteur INDEX ULCERATION

RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Groupes</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>	<i>Somme</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Variance</i>
INDEX ULC	5	15	3	0
INDEX ULC	5	7	1.4	0
INDEX ULC	5	0.23	0.046	0

ANALYSE DE VARIANCE

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	21.86572	2	10.93286	65535	#DIV/0!	3.88529383
A l'intérieur des groupes	0	12	0			
Total	21.86572	14				

Analyse de variance : un facteur ANOVA COTATION

RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Groupes</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>	<i>Somme</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Variance</i>
COTATION	5	15	3	0
COTATION	5	6	1.2	0.2
COTATION	5	1	0.2	0.2

ANALYSE DE VARIANCE

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	20.1333333	2	10.0666667	75.5	1.5921E-07	3.88529383
A l'intérieur des groupes	1.6	12	0.13333333			
Total	21.7333333	14				

Analyse de variance : un facteur % ULCERATION

RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Groupes</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>	<i>Somme</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Variance</i>
% ULC	5	100	20	0
% ULC	5	46.6	9.32	0
% ULC	5	6.65	1.33	0

ANALYSE DE VARIANCE

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	877.452333	2	438.726167	65535	#DIV/0!	3.88529383
A l'intérieur des groupes	0	12	0			
Total	877.452333	14				

Préparation des solutions :

1-Indicateur de Tashiro : Indicateur coloré mixte

-Mettre : 0.2g de rouge de méthyle et 0.1g de bleu de méthylène dans 100ml d'éthanol à 95%.

2-Solution de phénol :

-Dissoudre 5g de phénol dans 100 ml d'eau distillée, la solution être incolore et limpide, stable à la température ambiante. Cette solution est manipulée avec précaution, outre le dégagement de la vapeur du phénol, sa toxicité est également due à son aptitude à être résorbé rapidement par la peau.

3-Solution de Fehling (A et B) :

Fehling A :

-Dissoudre 5g de sulfate de cuivre CuSO_4 dans 50ml d'eau distillée.

Fehling B :

-Dissoudre 6.5g de la soude + 17.3g de tartrate de sodium et potassium dans 35ml d'eau distillée

-compléter à 50ml d'eau distillée.

4-Solution pour CAT :

***solution de H_2SO_4 à 0.6M :**

-Prélever 3.263 ml de H_2SO_4 et ajuster à 100ml par l'eau distillée.

***Solution de phosphate trisodique à 28Mm**

28 mM=0.028M.-

***solution d'Amonium molybdate à 4 Mm :**

4Mm= 0.004M.

MM masse molaire (Amonium molybdate) =1235.86 g/mol

-Molarité = $n/l=m/MM$ (nombre de mol/litre=masse /masse molaire)

- $m=Molarite \times Masse \text{ Molaire}=0.004 \text{ M} \times 1235.86\text{g/M}=4.9434\text{g}$

4.943g/1000ml.

-m (phosphate trisodique) = 0.494g/100ml.

5- Solution ulcérogène :

Le mélange HCl/ EtOH est préparé en ajoutant la solution de HCl à 150mM dans l'éthanol à 60% (v/v).

***solution de HCl à 150Mm :**

Cette solution est préparée à partir de HCl à 11.63M : prélever 0.302ml de HCl et ajuster à 100ml d'eau distillée.

***Solution d'éthanol à 60% :** l'éthanol à 60% est obtenu en diluant 100ml d'éthanol à 99° dans 70ml d'eau distillée.

Préparation des réactifs :

1-Réactifs de Mayer :

- Dissoudre 1.358 g de **Hg Cl₂** dans 60ml d'eau distillée ;
- Dissoudre 5 g de **KI** dans 10ml d'eau distillée ;
- Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100ml d'eau distillée.

2-Réactifs de Wagner :

- Dissoudre 2 g de **KI** et 1.27 g de **I₂** dans 75 ml d'eau distillée ;
- Ajuster le volume total à 100ml d'eau distillée.

3-Réactif de l'amidon :

- Dissoudre 1.2 g d'iode **I₂** dans 50ml d'eau distillée contenant 2.5 g d'iodure de potassium **KI** ;
- Chauffer pendant 5 minutes puis diluer jusqu'à 500ml d'eau distillée.

Matériel de chirurgie activité anti ulcérogène :

- d'un manche et lames de bistouri,
- des paires de ciseaux courbes et droites,
- des pinces anatomiques courbes,
- des écarteurs,
- d'une plaque de contention,
- des sondes de gavage bucco œsophagiennes en acier inoxydable
- des Boîtes de pétri
- des Béchers,
- des seringues (2.5cc)
- d'un binoculaire et loupes
- des bandes à gaz des compresses et du coton,
- des gants,
- du scotch,
- Ethanol,
- des règles métalliques graduées en mm.

Antioxidant Activity and Determination of Gallic Acid and Quercetin in *Osyris alba* L. Root Extract. The Root Oil Contains Essential Fatty Acids

Activité antioxydante et détermination de l'acide gallique et de la quercétine dans l'extrait de racine d'*Osyris alba* L. L'huile de racine contient des acides gras essentiels

D. Khaldi · M. Belarbi · I.A. El Haci · F. Atik · W. Zeriuoh · F.Z. Ghanemi · A. Nani · A. Hichami

© Lavoisier SAS 2018

Abstract *Osyris alba* L. (Santalaceae) is a shrub that grows wildly in southern Europe, North Africa and South-west Asia. In Algeria, the decoction of the root bark of this plant has been used since ancient times in folk medicine by the local population in the region of the mountains of Béni-Snousse (South west of Tlemcen), as a fortifying, anti-anaemic and as an anti-inflammatory agent. The aim of this work was to evaluate the antioxidant activity of the phenolic compounds of the root by using DPPH, FRAP, TAC methods. Determination of the phenolic profile of the root extract was assessed using HPLC-DAD technique (High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection). While the determination of total fatty acid composition of the root oil was performed using Gas Chromatography (GC-FID). From the results, the total poly-phenol extract of the root bark has shown the highest antioxidant power which exceeds the standard, namely, ascorbic acid and Trolox. The chromatographic analysis of the total poly-phenol extract has found that the Gallic acid and Quercetin are the major compounds. These results demonstrate that the phenolic compounds of *Osyris alba* root bark have a great potential

as sources for natural health products. Gaseous Chromatography Assay of the oil has revealed the presence of two groups of fatty acids: arachidic acid (C20:0) and linoleic acid (C18: 9.12) known for its pro-inflammatory effect against oleic acid C18:1, linoléic acid C18: 9.12.15, and eicosatrienoic acid (ETA) C20:3 which are known for their pro-anti-inflammatory effect. For this reason, we need to test the effect of this oil on inflammatory models.

Keywords *Osyris alba* · Root · Phenolic compounds · Antioxidant · DPPH · FRAP · TAC · Oil · HPLC · GPC · Fatty acid

Résumé *Osyris alba* L. (Santalaceae) est un arbuste qui pousse de manière sauvage dans le sud de l'Europe, en Afrique du Nord, en Asie du Sud-Ouest. En Algérie, la décoction de l'écorce de racine de cette plante a été utilisée depuis l'Antiquité en médecine populaire par la population locale qui habite la région des montagnes de Béni-Snousse (Sud-Ouest de Tlemcen), comme fortifiant, antianémique et comme anti-inflammatoire. Le but de ce travail était d'évaluer : 1) l'activité antioxydante des composés phénoliques de la racine en utilisant les méthodes DPPH, FRAP, TAC ; 2) le profil phénolique à travers la chromatographie liquide à haute performance ; 3) la composition totale en acides gras de l'huile extraite des racines par chromatographie en phase gazeuse. À partir des résultats, l'extrait phénolique de la racine a montré le plus haut pouvoir antioxydant qui dépasse la norme à savoir l'acide ascorbique et Trolox. L'analyse chromatographique de l'extrait phénolique a montré que l'acide gallique et la quercétine sont les composés majoritaires. Ces résultats démontrent que les composés phénoliques de l'écorce de racine d'*Osyris alba* ont un grand potentiel en tant que sources de produits de santé naturels. Concernant la chromatographie gazeuse, l'analyse de l'huile a révélé la présence de deux groupes d'acides gras : l'acide

D. Khaldi (✉) · M. Belarbi · F. Atik · W. Zeriuoh · F.Z. Ghanemi · A. Nani
Laboratoire des produits naturels (LAPRONA),
département de biologie, faculté des sciences de la nature et
de la vie et des sciences de la terre et de l'univers,
université Aboubekr-Belkaid, Pb no 119, Imama, Tlemcen,
Algérie
e-mail : darine1604@yahoo.fr

A. Hichami
U1231 INSERM/Université de Bourgogne-Franche Comté
(UBFC)/Agro-Sup, Physiologie de la Nutrition & Toxicologie,
F-21000 Dijon, France

I.A. El Haci
Centre de recherche scientifique et technique en
analyses physicochimiques (CRAPC),
BP 384, Bou-Ismaïl 42004, Tipaza, Algérie

arachidique (C20: 0) et l'acide linoléique (C18: 9.12) connu pour son action pro-inflammatoire contre l'acide oléique C18: 1 ; l'acide linoléique C18: 9.12.15 et l'acide éicosatriénoïque (ETA) C20: 3 qui sont connus pour leur effet proanti-inflammatoire. Pour cette raison, nous devons tester l'effet de cette huile sur les modèles inflammatoires.

Mots clés *Osyris alba* · Racine · Composés phénoliques · Antioxydant · DPPH · FRAP · TAC · HPLC · Huile · GPC · Acide gras

Introduction

Plants have formed the basis of sophisticated traditional medicine systems that have been in existence for thousands of years and continue to provide mankind with new remedies. The interest in nature as a source of potential chemotherapeutic agents continues. Natural products and their derivatives represent more than 50% of all drugs in clinical use in the world. Higher plants contribute no less than 25% of the total drugs. Medicinal plants typically contain mixtures of different chemical compounds that may act individually, additively or in synergy to improve health [1]. Plants synthesize a diverse spectrum of antioxidant phenolic compounds as secondary products, which prevent oxidative damage in planta, but also confer protective effects on humans when the plants are consumed as food [2]. The relationship between polyphenol-rich food consumption and reduced possibility of being affected by some diseases has attracted increasing interest from consumers, food manufacturers and nutritional scientists [3]. In the human diet, phenolic compounds, primarily flavonoids, phenolic acids and isoflavones are the most abundant antioxidants [4]. The estimated daily total dietary intake is thought to reach from 20 mg to 1 g [5,6]. Because of their antioxidant activity, phenolic compounds may protect human cells against oxidative damage, leading to a reduced risk of several oxidative stress-associated degenerative diseases, such as cancer, cardiovascular or neurodegenerative diseases [7], notably Alzheimer's disease which is a progressive neurodegenerative disorder with deadly outcome [8]. The antioxidant properties of phenolic compounds reflect a combination of mechanisms, including free radical scavenging, hydrogen donation, singlet oxygen quenching, metal ion chelation and acting as a substrate for oxidation [2].

The Santalaceae family includes dicotyledonous plants; it comprises 400 species divided into about forty genera. These are trees, shrubs and herbaceous plants, sometimes with reduced leaves, partially parasitic to the roots or aerial parts of the host, from temperate to tropical regions. The three main genera are: *Thesium*, *Santalum* which is the

famous and fragrant Indian sandalwood [9], and the genus *Osyris* grouping six or seven shrub species [10], among them, *Osyris alba* L. "*Bouhla in Arabic*".

It is a hemi-parasitic shrub that grows wild in southern Europe, north Africa, south-west Asia [11]. *Osyris alba* L. is very common in the Tell Algerian, especially in forests and brush forming dense stands, but very rare in the Sahara sector [12].

The Poet's Cassia (*Osyris*) is known for its traditional therapeutic properties in some African countries [13]. Since ancient times, the watery decoction of the root barks of *Osyris alba* L. Skeel (RBOA) has been used, by the population of the mountains of Béni-Snousse (south west of Tlemcen.) in folk medicine as fortifier anti-anemic and anti-inflammatory agent. For hundreds of years the inhabitants of this region had used the root bark of *Osyris alba* as a fortifying, anti-anemic and as an intestinal anti-inflammatory agent.

In view of the hemi-parasitic character of *Osyris alba*, there are many works which have spoken about the parasitic mechanism as well as the anatomy of the part responsible of the parasitic plant. However, to the best of our knowledge, there are very few publications concerning this specie and they do not report the phytochemical characterization and the antioxidant power of the root part.

The aim of this work was, on one hand, the determination of the phenol content from the root bark through the use of spectrophotometric dosage and selective extraction, the evaluation of their antioxidant power by using different methods, namely, DPPH radical scavenging power, FRAP ferric reducing power, TAC total anti-oxidative capacity, and the chromatographic analysis (HPLC) of the activist extract. On the other hand, the characterization and the valorisation of the removed oil (secondary product) is extracted from the bark root.

Materials and methods

Plant materials

Osyris alba was collected at the flowering stage from north-west of Algeria (Tlemcen). The plant material was botanically identified by Professor N Benabadji and a voucher specimen of the plant was deposited in the Herbarium of the Laboratory of Ecology and Ecosystem Management, University of Tlemcen, Algeria.

The root barks of *Osyris alba* (RBOA) were dried in a shadowy place and at room temperature for a few days. During drying time, plants were turned over to allow homogeneous drying. After drying, the roots barks (RBOA) were cut to obtain the fine smithereens, which were used for extractions.

Extraction and dosage of phenolic compounds in the hydro-acetone crude extract

Total phenol content in the hydro-acetone crude extract

The air-dried plant materials (RBOA) were ground and defatted with *n*-hexane using Soxhlet extractor [14]. The removed fat was analysed by GPC in order to valorise this secondary product and know its fatty acid composition.

2 g of the fat-free material was extracted with 100 ml of 70% of acetone/water (v/v) by cold maceration at 4 °C for 24 hours. The obtained extract was filtered, washed with *n*-hexane to get rid of other low molecular weight compounds, and evaporated, using a rotary evaporator, to dryness under reduced pressure at 45 °C. The resulting residue is weighed to calculate the yield [15]. The total phenol content of the plant extracts was determined by Singleton & Ross [16] using the *Folin-Ciocalteu* reagent.

Folin-Ciocalteu reagent: It is a yellow acid, consisting of acid poly-hetero-cycles containing molybdenum and tungsten. The reaction is based on the reduction of the phosphomolybdic acid of the *Folin-Ciocalteu* reagent by polyphenols in an alkaline medium [17].

It results in the development of a dark blue coloration due to the formation of a tungsten molybdenum complex measured by a spectrophotometer.

Briefly, 0.2 ml of each sample was mixed with 0.8 ml of sodium carbonate (7.5%) freshly prepared; the whole sample was vigorously mixed on a vortex. After 5 min, 100 µl of diluted *Folin-Ciocalteu* reagent (1/10 v/v) was added to the mixture, and left for 30 min at room temperature in the dark, and the reading of absorbance by the spectrophotometer (JENWAY 6405 UV/Vis mark) is performed against a blank at 765 nm.

A calibration curve was performed in parallel under the same operating conditions using Gallic acid as a positive control. The results were expressed as mg Gallic acid equivalent per g of dried extract (mg GAE/g De). The equation deduced from the Gallic acid calibration curve for the total phenols content: $A = 2.916C$, $r^2 = 0.98$.

Total flavonoïds content in the hydro-acetone crude extract

The total flavonoïds content was determined by a colorimetric method as described in the literature [18]. Each sample (500 µl) was mixed with 2 ml of distilled water and subsequently with 150 µl of NaNO₂ solution (15%). After 6 min, 150 µl of aluminium chloride (AlCl₃) solution (10%) was added and allowed to stand for 6 min. Then, 2 ml of NaOH solution (4%) was added to the mixture. Immediately, distilled water was added to bring the final volume 5 ml and the mixture was thoroughly mixed and allowed to stand for

another 15 min. Absorbance of the mixture was then determined at 510 nm versus prepared water blank. A calibration curve was performed in parallel under the same operating conditions using Catechin as appositive control. The results were expressed as mg Catechin equivalent per g of dried extract (mg CATE/g De).

The equation deduced from the Catechin calibration curve for the total flavonoïd content:

$$A = 5.1403C \quad r^2 = 0.98.$$

Condensed tannin content in the hydro-acetone crude extract

The amounts of condensed tannins were estimated using the Acidic-Vanillin method [19]. 50 µl of each sample was added to 1,500 µl of the vanillin/methanol solution prepared at 4 % (w/v). After that 750 µl of HCl was added and the mixture was thoroughly mixed and allowed to stand for 20 min at room temperature. Absorbance of the mixture was then determined at 550 nm versus prepared water blank. A calibration curve was performed in parallel under the same operating conditions using Catechin as appositive control. The results were expressed as mg Catechin equivalent per g of dried extract (mg CATE/g De).

The equation deduced from the Catechin calibration curve for condensed tannins content:

$$A = 0.1161C \quad r^2 = 0.99.$$

Selective extraction of flavonoids and tannins

Preparation of hydro-methanol crude extract and the fractionation of flavonoids

The extraction of the flavonoid was carried out according to the method of Markham [20], with modification inspired by the method of Bruneton [21]. It was based on the degree of solubility of flavonoids in organic solvents. This method comprises two major steps: the first extraction phase was carried out with methanol to solubilize the flavonoids and the second was carried out with diethyl ether (extraction of free genins = non glucosidic part) and ethyl acetate (extraction of monoglycosides) and *n*-butanol (to solubilize di and triglycosides).

The root bark of *Osyris alba* (OARB) was powdered and 1 g of dried sample was extracted by cold maceration (4 °C/ 24 h) using a hydro-methanol solution prepared at 80% (v/v) after filtration by Whatman paper [15].

The resulting solution was evaporated under vacuum at 60 °C by Buchi Rotavapor R-200 to dryness. The residue obtained by methanol extraction was treated with 10 ml of boiling water to dissolve the flavonoids. Further filtration through filter paper No 0.45 mm, produced the aqueous solution that was firstly extracted with 10 mL of diethyl

ether, 10 ml of ethyl acetate and then with 10 ml of *n*-butanol, using the separating funnel (Pyrex) the remaining solution represented the aqueous fraction which contains the most polar flavonoïds. Each fraction were evaporated and weighed, then dissolved in almost 5 ml of methanol.

Preparing tannin-rich extracts from hydro-acetone crude extract

The extraction of tannins from *OARB* was obtained according to the method of Zhang et al. [22] and 5 g of (*OARB*) was extracted with cold maceration (4 °C) for 3 days (72 h) using 100 mL acetone–water (70/30, v/v). Then, the mixture was filtrated and the acetone phase was removed under vacuum at 45 °C. Then, the remaining aqueous phase was washed with 30 ml dichloromethane to remove derived lipid and chlorophyll. Next, the aqueous solution was further extracted with ethyl acetate at a ratio of 30/30 (v/v) using the separated funnel. The process was repeated three times to macerate the maximum of tannin by the acetate-ethyl phase. In the end, the organics phases (acetate ethyl) were collected, filtrated, and evaporated to dryness, and the residues obtained were weighed for the rate measure, and dissolved in almost 5 ml of methanol.

Antioxidant activity evaluation

TAC:total antioxidant capacity assay

The Total Antioxidant Capacity (TAC) of plant extracts was evaluated by the phosphor-molybdate method of Prieto et al. [23].

A 0.3 ml aliquot of extract was mixed with 3 ml of the ammonium phospho-molybdate reagent solution (0.6 M sulphuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate). After cooling, the absorbance was read at 695 nm versus a blank.

The tubes were capped and incubated at 95 °C for 90 min. Then, the samples were cooled down to room temperature and the mixture's overall absorbance was measured at 695 nm against a blank. The antioxidant activity of the samples was expressed as milligrams of ascorbic acid equivalent per gram of dried weight (mg AAE/ g DW).

DPPH:free radical scavenging assay

This is one of the oldest and simplest assays [24] used to determine relative capacity for scavenging radicals. It makes use of stable organic nitrogen radical which on being reduced loses its deep purple colour. Its stability is due to delocalization of the extra electron over the entire molecule [25]. DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) is practically the most stable free radical.

In solution (methanol or ethanol) DPPH is characterized by a violet colour whose intensity is measured at 515–517 nm. In the presence of a hydrogen donor, DPPH is reduced to the pale yellow non-radical form (hydrazine form) DPPH-H. This change from the first form to the second is accompanied by a decrease in the absorbance (A) which can be expressed by the percentage reduction of DPPH. Conventionally, a high capacity for trapping (reducing) free radicals is considered to be a high antioxidant activity [26].

The free radical scavenging activity was measured by a modified DPPH assay [27].

In test tubes, 100 µl of various concentrations of the extracts (between 0.01 and 1 mg/ml) in methanol were added to 3 ml DPPH solution (0.025 g/l in methanol). After mixing, the samples were maintained in the dark at room temperature for 30 min. The absorbance was measured at 515 nm, using a JENWAY 6405 UV/Vis spectrophotometer, and compared with a negative control without extract [C⁻] (100 µl of methanol + 3 ml of DPPH solution). The absorbance of negative control was measured at *t* = 0 min.

A blank was prepared for each sample using methanol instead of the DPPH solution (100 µl of sample +3 ml of methanol). The ascorbic acid prepared in methanol was used as positive control [C⁺] which also known as the reference compound or the Standard; 100 µl of ascorbic acid was prepared at the increased concentrations (between 0.01 and 1 mg/ml) and was added at 3 ml of DPPH solution. A decreased absorbance of the reaction mixture was taken to mean an increased reducing power. DPPH free radical scavenging activity in percentage (%) was calculated using the following formula which has given by Yen and Duh [28]:

$$\text{DPPH scavenging activity \%} = \left[\frac{A_{(t0) \text{ Control}^-} - A_{(t30) \text{ Sample or Control}^+}}{A_{(t0) \text{ Control}^-}} \right] \times 100$$

where

A_{Control^-} : is the absorbance value of the only DPPH+ methanol, which is measured at *t* = 0

$A_{\text{Sample or Control}^+}$: is the absorbance value of the mixture of sample (extract) or standard (ascorbic acid) with DPPH which is measured at *t* = 30'

The extract concentration providing 50% inhibition (EC₅₀) value (µg/ml) was calculated from the plotted graph of scavenging activity percentage against extract concentrations.

FRAP: ferric reducing ability power assay

Fe (III) reduction is often used as an indicator of electron-donating activity which is an important mechanism of phenolic antioxidant action [29]. The reducing power of the *OARB* extract was estimated according to the method of Oyaizu [30].

Briefly, 1 ml of various concentrations of the extracts (between 0.01 and 1 mg/ml) in distilled water were mixed

with a phosphate buffer (2.5 ml, 0.2 M, pH 6.6) and 1% of potassium ferricyanide water solution (2.5 ml, $K_3Fe(CN)_6$). The mixture was incubated at 50 °C for 20 min. Aliquots of trichloro-acetic acid (2.5 ml, 10%) were added to the mixture which was then centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. The upper layer of the solution (2.5 ml) was mixed with distilled water (2.5 ml) and a freshly prepared $FeCl_3$ solution (0.5 ml, 0.1%). The absorbance was measured at 700 nm. An increased absorbance of the reaction mixture was taken to mean an increased reducing power. The extract concentration providing 50% inhibition (EC_{50} or IC_{50}) value ($\mu g/ml$) is the effective concentration giving an absorbance of 0.5 for reducing power and was obtained from the plotted graph of absorbance against extract concentrations. The ascorbic acid prepared in methanol solution was used as positive control.

High-performance liquid chromatography with diode-array detection of phenolic extract

RP-HPLC-PDA analysis of phenolic acids and flavonoids was performed on a Perkin Elmer Flexar system equipped with a binary pump delivery system, an internal degasser, photodiode array detector (PDA) and an Eclipse ODS Hypersil C18 column (150 mm \times 4.6 μm) was used. The mobile phase consisted of solvent A: water/acetic acid (98/2) and solvent B: methanol. The gradient elution system was 5 min with 10% of B, 25 min with 90% of B and 15 min for 100% of B, after that, 20 min were considered for equilibration. Flow rate was 1 ml/min. The chromatograms were monitored at 280 nm. The compound identification and peak assignments were done based on their retention times, UV-VIS spectra and also comparing with standards.

Gas chromatography of the removed oil extract from *Osyris alba* root bark

Oil extraction

The oil extraction from ground bark root was realized with an organic solvent called *n*-hexane with a Soxhlet apparatus [14].

The gaseous phase chromatography (GPC) consists in the separation of fatty acids by column chromatography after conversion to methyl esters easily transportable by the carrier gas. On the chromatogram obtained, the ordinate of the vertices or the area between the baseline and the peak makes it possible to measure the quantity of each solute separated in the sample [31].

Preparation of fatty acid methyl esters (FAMES)

In brief, 0.1 ml of hexane, containing lipid extract, was transferred into screw cap tubes and dried under nitrogen, then 1 ml of methanolic NaOH (0.5 N) was added into tubes, and

heated at 80 °C during 20 min. After cooling at 4 °C, 2 ml of boron trifluoride-methanol solution (BF_3) were added, and the methylation was performed at 80 °C for 20 min. After cooling down in ice, 2 ml of NaCl (35%) plus 2 ml of hexane were added into the tubes. After vigorous agitation and centrifugation (1,200 g/5 min), the upper phase containing fatty acid methyl esters was transferred into new tubes, and analysed by gaseous phase liquid chromatography (GPC).

GPC was performed in a Packard Model 417 gas-liquid chromatography, equipped with a flame ionization detector and a 30-m capillary gas column coated with carbowax 20 M. The analysis conditions were as follows: oven temperature was 85 °C/1 min, increased to 150 °C at 30 °C/min, then increased at 4 °C/min to 210 °C. Helium was used as carrier gas, with a flow rate of 0.4 ml/min. Analysis of fatty acid peaks was achieved with reference to the internal standards (Nu-Chek-Prep, Elysian, MN) by using DELSI ENICA 31 (Delsi Nermag, Rungis, France). The fatty acid levels were expressed as g/100 g of total fatty acids [32].

Statistical analysis

All experimental data were expressed as means \pm standard deviation (SD) of three parallel. The correlation coefficient of all dosages and antioxidant activity was determined using Excel program.

Results and discussion

Colorimetric dosage of phenolic compounds in hydro-acetone solution of *Osyris alba*'s root bark (OARB)

The presence of natural antioxidant in plants is well known. Plant phenolics constitute one of the major groups of components that act as primary antioxidant free radical terminators [33]. In various studies, antioxidant activity of plant extracts was found to be fairly high when they are rich in phenolic compounds [34].

This high potential of phenolic compounds to scavenge radical may be explained by their phenolic hydroxyl groups [35]. For this reason, there has been a particular interest about the determination of the amount of total phenols, total flavonoids and tannins in the hydro-acetonic crude extract of *Osyris alba* root bark.

The total phenol content of the plant extracts was determined by the method of Singleton & Ross [16] using the Folin-Ciocalteu reagent. This improved method recommended a molybdo-tungsto-phosphoric heteropolyanion reagent to improve specificity towards phenols with the absorbance reading being taken at 765 nm.

Concerning the tannins examination, the phytochemical screening test was shown the presence of condensed tannins. Indeed, spectrophotometric dosage in the hydro acetonic crude extract confirmed this fact. The results have clearly shown the richness of *Osyris alba* root bark in total phenols which is estimated at 371.67 mg GAE/g De, followed by a high level of condensed tannins with 121.146 mg CATE/g De, and a considerable amount of total flavonoids which is estimated at 55.345 mg CATE/g De (Table 1). In comparison with a near species which belongs to the same genus *Osyris quadripartita* Salzm., the published work of Rached et al. 2010 [13] has shown high levels of total phenolics and flavonoids in the crude extract of *Osyris quadripartita* Salzm. with 438.99 mg GAE/g De and 72.09 mg CATE/g De respectively, However they have demonstrated a lower quantity of total phenols and flavonoids in the fruit part with 109.49 mg GAE/g De and 16.95 mg CATE/g De, respectively.

According to the literature, the plant part studied, the drying conditions and the extraction methods represent the principal parameters which affect the phenolic compound rates.

The foliage trees are richer in the phenolic compound than seed or root, because the leaves are the seat of photosynthesis and the production of secondary metabolites; the leaf part is exposed to the extreme conditions like UV ray, salty conditions, the change of weather, microbes and animal attack which induces the necessity to produce more of phenols compounds as defensive substance in this part of plant.

The extraction of high value-added active ingredients from the plant material, particularly polyphenols, is a crucial step in isolation as well as in the identification of phenolic compounds. The solubility of phenolic compounds depends on their chemical nature in the plant, which varies from simple to highly polymerized compounds. Vegetable materials may contain varying amounts of phenolic acids, phenylpropanoids, anthocyanins, and tannins [36]. This structural diversity is responsible for the great variability of the physicochemical properties influencing the extraction of polyphenols [37]. Among other things, the solubility of the phenolic compounds is affected by the polarity of the solvent used.

Table 1 Total phenolic content, total flavonoids content and condensed tannins content	
Extracts	Acetone/H2O [70% (v/v)]
Yield%	26.295 ± 0.517
Folin-Ciocalteu ^a	371.674 ± 1.502
Flavonoid ^b	55.345 ± 0.099
Condensed tannin ^b	121.146 ± 1.665

a: mg GAE /g De Gallic acid equivalent /g Dried extract
b: mg CATE/g De Catechin equivalent /g Dried extract

Therefore, it is very difficult to develop an extraction process suitable for the extraction of all phenolic compounds from the plant [36,38].

Selective extractions of flavonoids and tannin-rich extract

Because the root bark of *Osyris alba* (*OARB*) plant is used in folk medicine by the local population in the form of herbal tea, we are tempted to extract the tannins and to segregate the flavonoids and to obtain a good separation of its active ingredients responsible for its anti-inflammatory power and thus validating utility, the extraction method adopted is based on the differential solubility of flavonoids in organic solvents (Fig. 1).

Concerning the flavonoids fractions, the results have shown a high level (8.76%) which is obtained with the aqueous fraction (AQE FRA), containing the most phenolic compounds water soluble. The yield of the *n*-butanol fraction (BUT FRA), containing mainly the di and triglycosides, is relatively high (4.1%). However, the yield of the ethyl acetate fraction (ETAC FRA) containing certain aglycones and the monoglycosides is four times lower than of the *n*-butanol fraction (1.1%), and the diethyl ether fraction (EDE FRA), rich in aglycones, gives a still very low yield (0.064%). Giving the washing step (to get rid of chlorophyll and pigments) with certain organics solvent like dichloromethane, petroleum ether affect the flavonoids fractions, particularly the diethyl ether fraction (EDE) [21].

From the analysis, the tannin fraction (TAN FRA) gives a good yield which is estimated at (3.98%) (Fig. 1).

In the end, we can say that the extraction of tannins depends, also, on their chemical nature, the solvent used and the operating conditions [39].

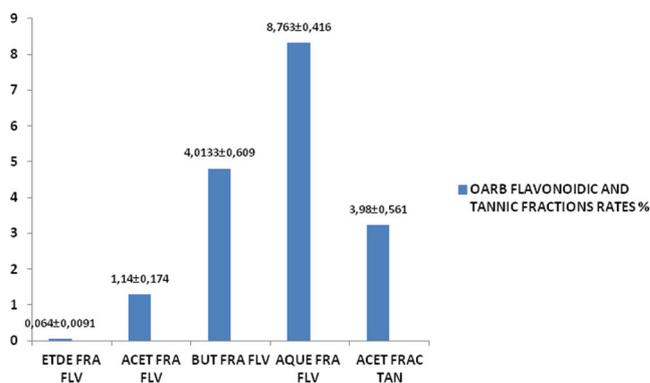


Fig. 1 Flavonoidic and tannic fractions rates (yields) obtained by selective extractions of *OARB* FLV (flavonoids), FRA (fractions), ETDE FRA (ether diethyl fraction), ETAC FRA (ethyl acetate fraction), BUT FRA (*n*-butanol fraction), AQE FRA (aqueous fraction), TAN FRA (tannic fraction)

Antioxidant activity evaluation

It has been recognized that flavonoids, tannins and phenolic compounds show antioxidant activity and their effects on human nutrition and health are considerable. The mechanism of the actions of flavonoids is through scavenging or chelating process [40,41]. Phenolic compounds are a class of antioxidant agents acting as free radical terminators [42].

To the best of our knowledge, there are no reports in the literature concerning the antioxidant activity of the bark root of *Osyris alba*.

Owing to the complex reactive facets of phytochemicals, it is evident that natural antioxidants, being multifunctional, cannot be fully evaluated by means of one-dimensional methods only. So, as it is impossible for any one single assay to accurately reflect all of the radical sources, as well as all of the antioxidants in a complex system, a valid evaluation demands the use of several assay methods which allows for the inclusion of different mechanisms of inhibition, but at least two systems have been recommended for the determination of antioxidant activity to establish authenticity [43,44]. For this reason, the antioxidant activity of each extracts of root bark of *Osyris alba* were determined by three methods which are: Total Antioxidant Capacity (TAC), DPPH free radical scavenging activity, Ferric ion Reducing Antioxidant Power (FRAP).

TAC: total antioxidant capacity assay

Total antioxidant capability method allows the determination of the amount of existing antioxidant species in the total phenol extract (TPE), the tannic fraction (TAN FRA) and the flavonoids fractions (FLV FRA).

The TAC of the *Osyris alba* flavonoids was expressed in mg equivalents of ascorbic acid per g dry matter. For this purpose, a calibration curve was carried out in parallel, under the same conditions, using ascorbic acid as a standard.

The equation deduced from the calibration curve of ascorbic acid ($A = 2.8429C + 0.1159$, $r^2 = 0.9785$).

The results of the Total antioxidant capacity TAC, expressed in equivalents of ascorbic acid of each extract of *OARB* are presented in figure 2.

We note that the total phenolic extracts (TPE) was the most active extract with a great value estimated at 8.185 mg EAA/g DM followed by the tannic fraction (TAN FRA) (5.038 mg EAA/g DM), the ethyl acetate flavonoid fraction (ETAC FRA) (4.75 mg EAA/g DM), and the *n*-butanolic (2.97 mg EAA/g DM). The aqueous fraction (AQE FRA) contains the lowest value (1.65 mg EAA/g DM).

The high capacity, in hydro-acetonic extract might be attributed to the presence of phytochemicals such as phenolic compounds, flavonoids and tannins presented in our previous results, with high contents [45]. Recent studies have con-

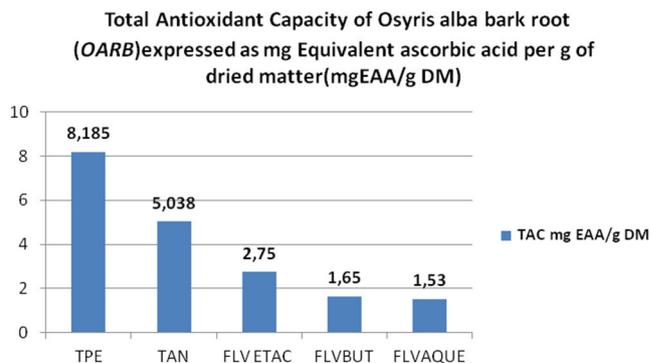


Fig. 2 TAC of total phenols extract, tannins extract and flavonoids fraction from the root bark of *Osyris alba* L. Total phenols extract (TPE), tannins extract (TAN), flavonoids fraction (FLV FRA), ETAC FRA (acetate ethyl fraction), BUT FRA (*n*-butanol fraction), AQE FRA (aqueous fraction)

firmed this assertion, showing that many flavonoids and related polyphenols contribute significantly to the total antioxidant activity of many fruits such as the red grape [46], vegetables [47] and medicinal plants [48]. In addition, the antioxidant capacity depends not only on the total phenol content but on the specific phenol composition, as well the total number of phenolic hydroxyl groups and their position on the aromatic core influence the antioxidant capacity. It is believed that the greater the number of ortho- or para-oriented phenolic hydroxyls, the higher the antioxidant activity [49].

DPPH: free radical scavenging assay

The stable free radical DPPH method is an easy, rapid, and sensitive way to survey the antioxidant activity of specific compounds or plant extracts [50]. DPPH is a stable free radical, which has been widely accepted as a tool for estimating free radical scavenging activities of antioxidants [51].

IC₅₀ value basically represents the required concentration for an antioxidant to reach.

50% of DPPH radical scavenging [52,53]. Lower IC₅₀ values are related with higher free radical scavenging activity of an antioxidant [54,55]. This parameter is determined graphically on the graphs plotted percent inhibition as a function of the different concentrations of the standard (ascorbic acid) and of the flavonoids tested.

From the analysis, we find that all tested phenolic compounds of *Osyris alba* root bark (*OARB*) including: total phenolic extract (TPE), flavonoids fractions (FLV FRA) and tannins extract (TAN) were able of scavenging DPPH free radical in a concentration dependent-manner (IC₅₀) (Fig. 3).

The results for the DPPH assay have revealed that all the extracts exhibited greater activity than Trolox (42 µg/ml) [13]. The analysis has found that the total phenols extract (TPE) is the activist extract with an IC₅₀ (2.245 µg/ml)

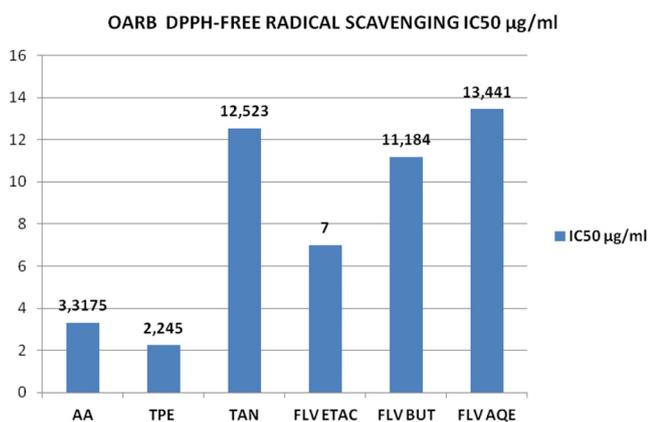


Fig. 3 DPPH free radical scavenging of phenolic compounds of *Osyris alba* root bark expressed on IC₅₀ (µg/ml) ascorbic acid (AA), phenols extract (TPE), tannins extract (TAN), flavonoids fraction (FLV FRA), ACET FRA (acetate ethyl fraction), BUT FRA (*n*-butanol fraction) AQE FRA (aqueous fraction), IC₅₀ (inhibition concentration at 50% of DPPH reduction)

which is stronger than ascorbic acid (3.317 µg/ml). We note the high power of the ethyl acetate fraction (FLV ETACE) (7 µg/ml) followed by the butanolic fraction (FLV BUT) (11.184 µg/ml). The tannins extract (TAN) (12.523 µg/ml) and the flavonoids aqueous fractions (FLV AQE) (13.44 µg/ml) are classed in the last scale. In comparison with a near species *Osyris quadripartita* Salzm., the published work of Rached et al. [13] has revealed that the acetate ethyl (FLV ETACET) and butanol (FLV BUT) flavonoids fractions have shown an important power with IC₅₀ = 5.2 µg/ml and 10.3 µg/ml respectively, which are not very far from our analysed fractions.

According to the author Guribe-Fakim [1], the medicinal plants typically contain mixtures of different chemical compounds that may act individually, additively or in synergy to improve health, the high power of the total phenol extract can be explained by the synergic effect of the different phenolic compounds (phenolics, flavonoidics and tannins) which subsist in the mixture of the hydro-acetonic crude extract.

FRAP: ferric reducing ability power assay

Fe (III) reduction is often used as an indicator of electron-donating activity, which is an important mechanism of phenolic antioxidant action [29]. In FRAP assay, the evaluation of the reducing power is based on the presence of reductones in the extracts that provoke the reduction of Fe III /ferricyanide complex to the ferrous form Fe II [50,55,56].

In this assay, depending on the reducing power of antioxidants compounds, the yellow color of the test solutions change into various shades of green and blue. Therefore,

by measuring the formation of Perl's Prussian blue at 700 nm, we can monitor the Fe II concentration [57]. The extract concentration providing 50% inhibition (EC₅₀ or IC₅₀) value (µg/ml) is the effective concentration giving an absorbance of 0.5 for reducing power and was obtained from the plotted graph of absorbance against extract concentrations. The ascorbic acid prepared in methanol solution was used as positive control.

As shown in figure 4, all tested phenolic compounds of *Osyris alba* root bark (*OARB*) including total phenolic extract (TPE), flavonoidics fractions (FLV FRA) and tannins extract (TAN) were capable of the iron reducing in a concentration dependent-manner.

Although all the extracts show an important reducing power, it was noted that the total phenol extract comes first with an IC₅₀ that was lower than the ascorbic acid (AA).

Because the reductive ability of the total phenol extract (TPE) (22.565 µg/ml) was higher than Vitamin C (ascorbic acid) (24.345 µg/ml), it was evident that the extract showed reductive potential and could serve as electron donor, terminating the radical chain reaction.

In the flavonoids fraction, we note the high power of the Ethyl Acetate fraction (FLV ETACET) (27.176 µg/ml) followed by the Butanolic fraction (FLV BUT) (29.88 µg/ml). The tannins extract and the flavonoids aqueous fraction were classed in the last scale (54.6 and 66.728 µg/ml respectively). By comparison, with the precedent method (TAC and DPPH assays), we can clearly observe the great similarity in the results. These results prove that the hydro acetone-crude extract of the bark root is rich in reductones, particularly phenolic compounds which produce the total antioxidant activity, presented in (Fig. 2). Therefore, the reducing power is a very important aspect for the estimation of the antioxidant activity [58].

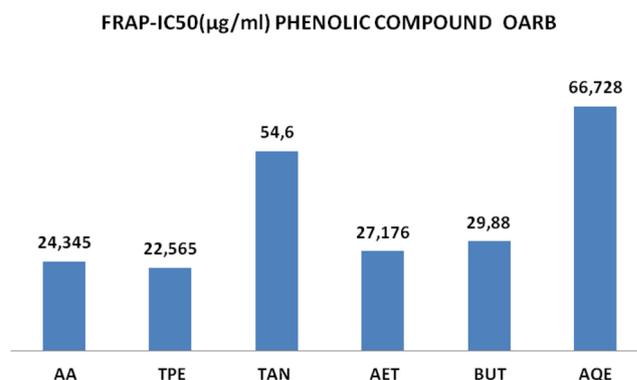


Fig. 4 FRAP (ferric reducing ability power assay) of phenolic compounds of *Osyris alba* root bark (*OARB*) expressed on IC₅₀ ascorbic acid (AA), phenols extract (TPE), tannins extract (TAN), flavonoids fraction (FLV FRA), ACET FRA (acetate ethyl fraction), BUT FRA (*n*-butanol fraction) AQE FRA (aqueous fraction), EC₅₀ = IC₅₀ (µg/ml) (Effective concentration at 0.5 of absorbance)

High-performance liquid chromatography with diode array detection of the total phenolic extract

The chromatographic analysis of the most active extract (TPE) has shown its high richness in Gallic acid and Quercetin (Fig. 5); these interesting results are consistent with the dosage *Folin–Ciocalteu* (Table 1) and confirm the strong antioxidant activity of this extract.

These results demonstrate that the phenolic compounds of *Osyris alba* root bark have an excellent antioxidant activities and thus they have a great potential as sources for natural health products.

Oil yield and gas chromatography (GC) assay of the oil extract from the root bark of *Osyris alba*

To the best of our knowledge, there are no reports in the literature concerning the GC of the oil extracted from bark root of *Osyris alba*.

The oil extracted from the root bark of *Osyris alba* (L.) is orange-honey in colour, with a viscous appearance and smell and pronounced flavour. Our results showed that the oil yield was about 12.98 per cent. It has been established that the extraction oil by organic solvent was the method most reliable and profitable from economical point of view [59].

A gas liquid chromatography method was developed for the quali-quantitative analysis of fatty acids composition. According to the result (Fig. 6) (Table 2), the chromatographic analysis has shown the diversified composition of *Osyris alba* bark root oil in terms of saturated (SFA) and unsaturated fatty acid (USFA). Concerning the saturated fatty acid (SFA), arachidic acid (Ara) (C20) comes first with (18.068%) According to the literature, arachidic acid (Ara) was first discovered by Gössmann in 1854 in peanuts oil;

peanuts are the seed of *Arachis hypogea* from which its name is derived [60]. Peanut oil contains the highest quantity, about 2.3% of edible portion. However, in our result we can say that the oil extracted from the roots of *Osyris alba* is considered as a new natural source of arachidic acid (Ara). In the second place comes the stearic acid (Sta) C18:0 with 13.24%, the palmitic acid (Paa) is the last one with 10.70%. Recent studies have shown that saturated arachidic acid (Ara) has induced the liver dysfunction in hyperglycaemic rats and increased hepatic expression of inflammatory markers in vivo [61]. Concerning the unsaturated fatty acid (USFA), we note the presence of the linoleic acid omega6 (C18:n-6) with high yield (21.48%), the almost quantity of linoleic acid is presented in Colza oil (21%) [62]. Linoleic acid is involved in many physiological functions. It is involved in the functioning of the immune system, in the inflammatory response, and in the manufacture of the cell membrane. A very low intake as well as an excess of linoleic acid is deleterious with regard to cardiovascular risk. A too high rate promotes the oxidation of the lipoproteins which make them atherogenic [63]. The results reveal the eicosatrienoic acid (ETA) omega 3 of long chain (C20:n-3) with (18.684%). eicosatrienoic acid (20:3w-3) is a rare polyunsaturated fatty acid of the omega-3 series. In normal humans, it represents less than 0.25% of serum phosphor lipid fatty acids. However, it is one of the most active essential fatty acids when assayed for the inhibition of fatty acid elongation/desaturation reactions which convert dietary C-18 fatty acids to C-20 eicosanoid precursors [64]. Recent studies have shown that the topical application of ETA protects against UV-induced skin damage in hairless mice and suggest that ETA can be a potential agent for preventing and/or treating UV-induced inflammation and photo-aging [65]. The analysis shows the presence of the oleic acid (Ola)

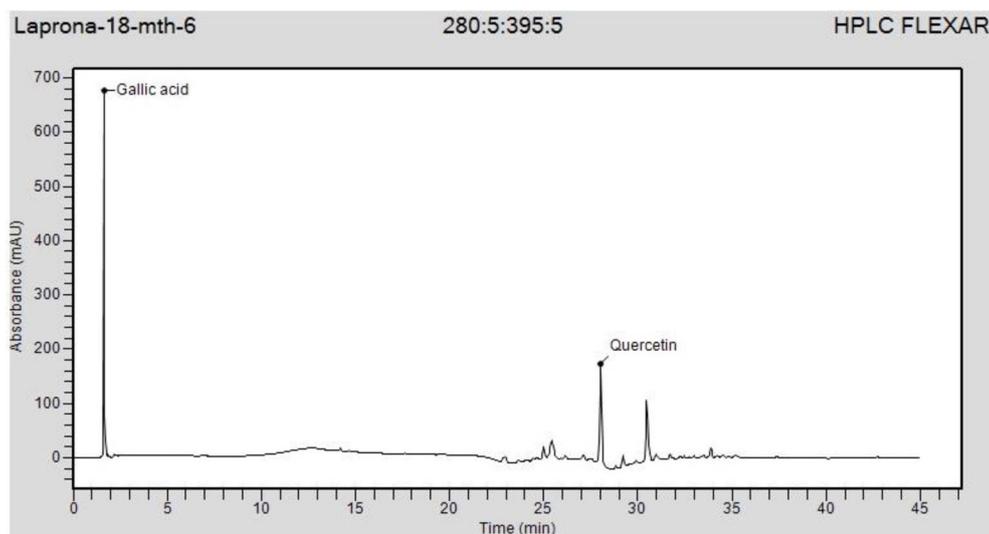


Fig. 5 High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection of the total phenolic extract (TPE)

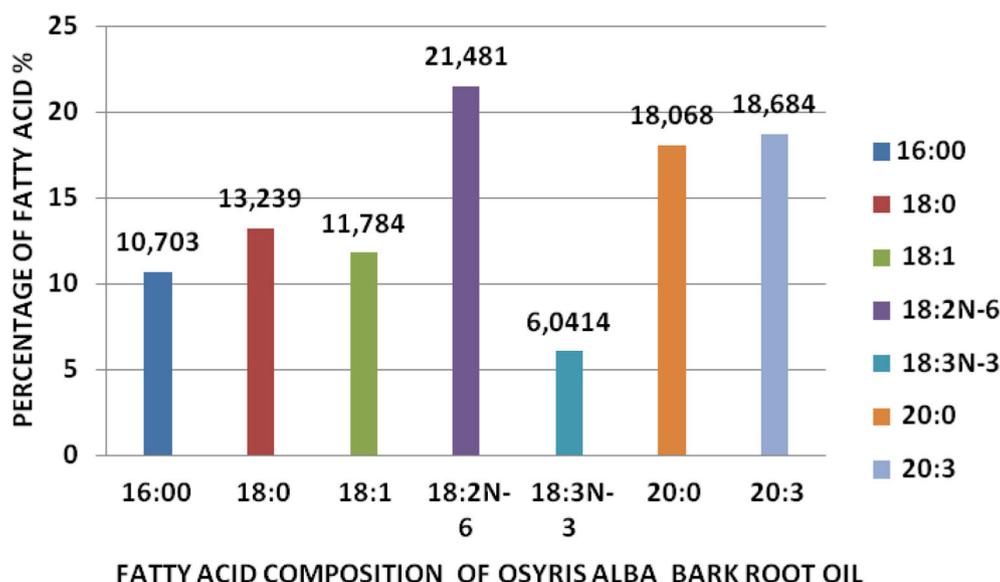


Fig. 6 Total fatty acid composition of the oil of *Osyris alba* bark root (OABR) Gaseous phase chromatography analysis (GPC)

Fatty acid	Symbol	% percentage
Palmitic acid	16:00	10,703
Stearic acid	18:0	13,239
Oleic acid	18:1	11,784
Linoleic acid	18:2N-6	21,481
α -Linolenic acid	18:3N-3	6,041
Arachidic acid	20:0	18,068
Eicosatrienoic acid	20:3	18,684

omega 9 (11.78%) oleic acid; this mono-unsaturated fatty acid (MIFA) is known in the literature by their anti-inflammatory and anti-cancerous effects [66]. We note the significant presence of the omega 3 of medium chain C18 (α -linolenic acid 6.04%) which is not far to the quantity presented in Soybean oil (7 %) [62]. At nutritional and dietetic level, *Osyris alba* oil is mainly composed of unsaturated fatty acids with cis geometric isomerism and consequently shows no problem of digestion or assimilation to human organism. We note the absence of C22:1 erucic acid (Era) indicates *Osyris alba* oil as non-toxic and edible oil [67]. For balanced diet, we note that *Osyris alba* oil has a low ratio of omega 6 to omega 3 which is estimated at 1 (omega 6/ omega 3 ratio 1:1). The studies show that a lower ratio of omega-6s to omega-3s is more desirable to reduce the risk of many chronic diseases that have become epidemics in most Western societies. For example, researchers from The Center for Genetics, Nutrition and Health of Washington, DC found that the lower the omega-6/omega-3 ratio was in women, the lower their risk of breast

cancer. A ratio of 2:1 suppresses inflammation in patients with rheumatoid arthritis, and a ratio of 5:1 has a beneficial effect on patients with asthma [68]. In the end we can conclude that the oil of *Osyris alba* contains two groups of fatty acids arachidic acid (eicosanoic acid C20) and linoleic acid (C18:9.12) known in the literature, for its pro-inflammatory effect against oleic acid C18:1, linolenic acid C18:9.12.15, and eicosatrienoic acid (ETA) C20:3 which are known for their anti-inflammatory effect. For this reason, we propose to test the effect of this oil on inflammatory models.

Conclusion

From the results, the total phenolic extract of the root bark has shown the highest antioxidant power which exceeds the standard, namely, ascorbic acid and Trolox. The chromatographic analysis (HPLC–DAD Array) of the total phenols extract have found that the Gallic acid and Quercetin are the major compounds which explain their strongest antioxidant activity. These results demonstrate that the phenolic compounds of *Osyris alba* root bark have excellent antioxidant activities and thus they have a great potential as sources for natural health products. From other side, the Gaseous phase Chromatography (GLC) assay of the oil extract from the root bark of *Osyris alba* has revealed the presence of two groups of fatty acids: arachidic acid (C20:0) and linoleic acid (C18:9.12) known for its pro-inflammatory effect against oleic acid C18:1, linolenic acid C18:9.12.15, and eicosatrienoic acid (ETA) C20:3 which are known for their pro-anti-inflammatory effect. For this reason, we need to test the effect of this oil on inflammatory models.

Acknowledgements We thank all the collaborators for their help. We thank all the team of our laboratory LAPRONA N°14, université Aboubekr-Belkaid Tlemcen, 13000, Algérie.

We thank Dr Imad Abedelhamid ELHACI, Centre de Recherche scientifique et technique en analyses physicochimiques (CRAPC), BP 384, Bou-Ismaïl 42004, Tipaza, Algérie.

We thank INSERM U 866 laboratory, université de Bourgogne, F-21000 Dijon, France as well.

All authors read and approved the manuscript and they declare that there are no conflicts of interest. The present research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors.

Conflicts of interests: the authors have not conflicts of interests to declare.

References

- Guribe-Fakim A (2006) Medicinal plants: tradition of yesterday and drugs of tomorrow: a review. *Mol Aspects Med* 27:1–93
- Ničiforovic N, Mihailovic V, Maskovic P, et al (2010) Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources of natural antioxidants. *J Food Chem Toxicol* 48:3125–30
- Ness AR, Powels JW (1997) Fruits and vegetables and cardiovascular disease: a review. *J Epidemiol Intl* 26:1–13
- Riehle P, Vollmer M, Rohn S (2013) Phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal infusions-Antioxidant capacity and thermal stability during the brewing process. *J Food Res Intl* 53:891–9
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acid. *Free radic Biol Med* 20:933–56
- Scalbert A, Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130:2073S–85S
- Scalbert A, Manach C, Morand, et al (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45:287–306
- Perry G, Cash AD, Smith MA (2002) Alzheimer disease and oxidative stress. *J Biomed Biotechnol* 2:120–3
- Lieutaghi P (2006) Une ethnobotanique méditerranéenne plantes, milieux végétaux et sociétés, des témoignages anciens au changement climatique. *Actes Sud* 2006
- Mabberley DD (1997) In: *The Plant-book*. Second Ed, Cambridge University Press, Cambridge, p 514
- Davis PH (1982) *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh University Press, Edinburgh, vol 7, pp 545–6
- Quezel P, Santa S, Schotter O (1963) *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques et méridionales*. Tome I, Ed Centre national de la recherche scientifique, Paris-VII, France, 636 p
- Rached W, Calhelha RC, Fernandes A, et al (2016) Phytochemical characterization and bioactive properties of *Osyris quadripartita* Salzm.ex Decne leaves from Algeria. *J RSC Adv* 72768–76. Volume 6
- Lecoq (1965) *Manual of food analysis and usual appraisals*. Ed Doin, Paris, Volume II
- Yu Z, Dahlgren RA (2000) Evaluation of methods for measuring polyphenols in copper foliage. *J Chem Ecol* 26:2119–40
- Singleton VL, Rossi JA Jr (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult* 16:144–58
- Catalano L, Franco L, De Nobili M, et al (1999) Polyphenols in olive mill waste waters and their depuration plant effluents: a comparison of the Folin-Ciocalteu and HPLC methods. *Agrochimica* 43:193–205
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W (1999) Research on antioxidant activity of flavonoids from natural materials. *J Food Chemistry* 64:555–9
- Julkunen-Titto R (1985) Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J Agri Food Chem* 33:213–7
- Markham KR (1982) *Techniques of flavonoids identification*. Academic Press, London, Chap 1et 2, pp 1–113
- Bruneton J (1993) *Pharmacognosy phytochemistry and medicinal plants*. Lavoisier TEC and DOC, Paris, 2nd ed, pp 268–77
- Zhang SY, Zheng CGX, Yan Y, et al (2008) Low concentration of condensed tannins from catechu significantly inhibits fatty acid synthase and growth of MCF-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 371:654–8
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M (1999) Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *J Anal Biochem* 269:337–41
- Blois (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 4617:1200–999
- Molineux P (2004) The use of the stable free radical diphenyl picryl hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songk lana karin. *J Sci Technol* 26:211–9
- Lee JH, Koo NS, Min DB (2004) Reactive oxygen species aging and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive review*. *Int J Food Sci food Safety* 3:20–33
- Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F (1998) A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric* 76:270–6
- Yen GC, Duh PD (1994) Scavenging effect of methanolic extract of peanut hulls on free radical and active oxygen species. *J Agri Food Thec* 42:629–32
- Yildirim A, Mavi A, Kara (2001) Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus L.* extracts. *J Agric Food Chem* 49:4083–9
- Oyaizu M (1986) Studies on products of browning reaction antioxidative activities prepared from glucosamine. *J Jpn J Nutr* 44:307–15
- Kamoun P (1993) *Atlas de poches des méthodes d'analyse*. Ed Flammarion-Médecine-Sciences. Paris, 250 p
- Nani A, Belarbi M, Ksouri- Megdiche W, et al (2015) Effects of polyphenols and lipids from *Pennisetum glaucum* grains on T-cell activation: modulation of Ca²⁺ and ERK1/ERK2 signaling. *J BMC Complement Altern Med* 15:426
- Chikhi I, Allali H, Dib MA, et al (2013) Antioxidant activities and phytochemical study of extract of two Phagnalons species growing in Algeria. *J Trad Herbal Med Intl* 1:49–53
- Cakir A, Mavi A, Yildirim A, et al (2003) Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium L.* by activity-guided fractionation. *J Ethnopharmacol* 87:73–83
- Oke F, Aslim B, Ozturk S, et al (2009) Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *J Food Chem* 112(4):874–9
- Jokić S, Velić D, Bilić M, et al (2010) Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from soybeans. *J Food Sci* 28:206–12
- Garcia-Salas P, Morales-Soto A, Segura-Carretero A, et al (2010) *Molecules* 15:8813–26

38. Bonnaillie C, Salacs M, Vassiliova E, et al (2012) Étude de l'extraction des composés phénoliques à partir de la pellicule d'arachides (*Arachis hydrogaea* L.). *Revue de génie industrie* 7:35–45
39. Koffi E, Sea T, Dodehe Y, et al (2010) Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty three Ivorian plants. *J Animals Plant Sci* 5:550–8
40. Kessier M, Beaud GU, Jung L (2003) Anti and pro-oxidant activity of Rutin and Quercetin derivatives. *J Pharm Pharmacol* 55:131–42
41. Cook NC, Samman S (1996) Flavonoids chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutr Biochem* 7:66–76
42. Shahidi F, Wanasundara PK (1992) Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 32:67–103
43. Schlesier K, Harwat M, Bohm V, et al. (2009) Assessment of Antioxidant Activity by Using Different In Vitro Methods. *Free Rad Res* 36:177–87
44. Takashima M, Horie M, Shichiri M, et al (2012) Assessment of antioxidant capacity for scavenging free radicals in vitro: a rational basis and practical application. *Free Radic Biol Med* 52:1242–52
45. Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, et al (2008) Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C R Biol* 331:372–9
46. Negro C, Tommasi L, Miceli A (2003) Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresour Technol* 87:41–4
47. Luo, XD, Basile MJ, Kennelly EJ (2002) Polyphenolic antioxidants from the fruits of *Chrysophyllum cainito* L. (star apple). *J Agric Food Chem* 50:1379–82
48. Bourgou S, Ksouri R, Bellila A, et al (2008) Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *C R Biol* 331:48–55
49. Frankel EN, Waterhouse AL, Teissedre PL (1995) Principal phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J Agric Food Chem* 43:890–4
50. Koleva II, Van Beek TA, Linsen JP, et al (2002) Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem Anal* 13:8–17
51. Krishnaiah D, Sarbatly D, Nithanandam R (2010) A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod Process* 89:217–33
52. Chen Z, Bertin R, Froldi G (2013) EC₅₀ estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *J Food Chem* 138:414–20
53. Osman AM (2011) Multiple pathways of the reaction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) with (+)-catechin: Evidence for the formation of a covalent adduct between DPPH and the oxidized form of the polyphenol. *Biochem Biophys Res Comm* 412:473–8
54. Chung YC, Chang CT, Chao WW, et al (2002) Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *J Agric Food Chem* 50:2454–8
55. Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, et al (2004) Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem* 84:551–62
56. Dib H, Belarbi M, Beghdad MC, et al (2014) Antioxidant Activity of *Opuntia ficus -Indica* Flowers Phenolic extracts. *Int J Pharm Sci Res* 5:4574–82
57. Ksouri R, Megdiche W, Falleh H, et al (2008) Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *C R Biol* 331:865–73
58. Kamath V, Rajini PS (2007) The efficacy of cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) skin extract as a free radical scavenger. *J Food Chem* 103:428–33
59. Fornasari CH, Secco D, Santos RF, et al (2017) Efficiency of the use of solvents in vegetable oil extraction at oleaginous crops. *Renew Sust Energ Rev* 80: 121–4
60. Akoh CC, Min DB (2008) Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology 3th ed 2008, by CRC Press Reference— 928 pages— 334B/W Illustrations ISBN 9781420046632 - CAT# 46632
61. Laparra JM, Municio MD, Moreno FJ, et al (2015) Kojibiose ameliorates arachidic acid-induced metabolic alterations in hyperglycaemic rats. *Br J Nutr* 114:1395–402
62. Morin O, Pares XPX (2012) Huiles et corps gras végétaux : ressources fonctionnelles et intérêt nutritionnel. *J OCL* 19:63–74
63. Matrat L (2016) [Http://anses.fr/tableciqua/](http://anses.fr/tableciqua/) ANSES (Agence nationale de sécurité de l'alimentation, de l'environnement et du travail), Table ciqua composition nutritionnelle des aliments (accessed on 29th June 2017)
64. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, et al (2013) HMDB 3.0 — The Human Metabolome Database in 2013 <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB60039> (accessed on 29 th June, 2017)
65. Xing JJ, Eun JK, In KO, et al (2010) Prevention of UV-induced skin damages by 11,14,17-eicosatrienoic acid in hairless mice in vivo. *J Korean Med Sci* 25:930–7
66. How Olive Oil Protects Against Breast Cancer. January (2005) <http://www.northwestern.edu/newscenter/stories/2005/01/oleic.html> (accessed on 8 th July, 2017)
67. Rhamani M (2005) Composition chimique de l'huile d'argan vierge. *Cahier Agricultures* 14:461–5
68. CGNH (2002) The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids (the Center for Genetics, Nutrition and Health, Washington, DC 20009, USA. *J Biomed Pharmacother* 56:365–79

Argan oil improves surrogate markers of CVD in humans

Souad Sour¹, Meriem Belarbi¹, Darine Khaldi¹, Nassima Benmansour¹, Nassima Sari¹, Abdelhafid Nani¹, Farid Chemat² and Francesco Visioli^{3*}

¹Natural Products Laboratory, Department of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences and Sciences of Earth and the Universe, Abu Bakr Belkaid University, Tlemcen, Algeria

²Eco-Extraction Laboratory of Natural Products (GREEN), University of Avignon and Pays de Vaucluse, France

³Laboratory of Functional Foods, IMDEA-Food, Calle Faraday 7, 28049 Madrid, Spain

(Submitted 5 May 2011 – Final revision received 6 July 2011 – Accepted 4 August 2011 – First published online 15 November 2011)

Abstract

Limited – though increasing – evidence suggests that argan oil might be endowed with potential healthful properties, mostly in the areas of CVD and prostate cancer. We sought to comprehensively determine the effects of argan oil supplementation on the plasma lipid profile and antioxidant status of a group of healthy Algerian subjects, compared with matched controls. A total of twenty healthy subjects consumed 15 g/d of argan oil – with toasted bread – for breakfast, during 4 weeks (intervention group), whereas twenty matched controls followed their habitual diet, but did not consume argan oil. The study lasted 30 d. At the end of the study, argan oil-supplemented subjects exhibited higher plasma vitamin E concentrations, lower total and LDL-cholesterol, lower TAG and improved plasma and cellular antioxidant profile, when compared with controls. In conclusion, we showed that Algerian argan oil is able to positively modulate some surrogate markers of CVD, through mechanisms which warrant further investigation.

Key words: Argan oil: *Argania spinosa*: CVD: Atherosclerosis: Cholesterol: Lipid oxidation: Mediterranean diet

Diet and its components play major roles in the onset and development of several degenerative diseases such as atherosclerosis, CVD, cancer and neurodegeneration⁽¹⁾. In this respect, adherence to the Mediterranean diet is associated with lower incidence of CVD and cancer^(2,3). It must be emphasised that the term ‘Mediterranean diet’ encompasses several diverse dietary profiles typical of the Mediterranean basin^(4,5). Indeed, some differences, e.g. with respect to alcohol consumption or protein intake, exist among the various Mediterranean countries⁽⁵⁾. Among the various components of the Mediterranean diet, much attention is being paid to olive oil, because its consumption is associated with favourable cardiovascular outcomes⁽⁶⁾. However, some countries, namely those in the Maghreb area, also use argan oil for culinary and cosmetic applications⁽⁷⁾. Indeed, accumulating evidence suggests that argan oil might be endowed with potential healthful properties, mostly in the areas of CVD⁽⁸⁾ and prostate cancer⁽⁹⁾. As an example, several recent studies reported hypolipidaemic, hypocholesterolaemic and antihypertensive effects of argan oil in the rat^(7,10). Argan oil is obtained from the fruit of *Argania spinosa* (Sapotaceae), an endemic tree which mostly grows in South-western Morocco. Argan trees also grow in Algeria, namely in the Tindouf

countryside. While technological advancement, e.g. Soxhlet's extraction, is changing argan oil production, most of its making still follows traditional procedures, i.e. hand-grounding and cold-pressing of the kernels, yielding yellowish, nutty-flavoured products⁽⁷⁾. The fatty acid profile of argan oil consists of approximately 45% MUFA, approximately 35% PUFA and approximately 20% SFA. Moreover, virgin argan oil contains minor, bioactive components such as phenolic compounds, phytosterols and tocopherols^(11,12).

Despite suggestive *in vitro* and animal evidence, the potential cardioprotective properties of argan oil have been the subject of very limited studies in humans^(8,13). Moreover, the *in vivo* effects of Algerian argan oil have never been investigated. Therefore, we sought to comprehensively determine the effects of argan oil supplementation on plasma lipid profile and antioxidant status of a group of healthy Algerian subjects, compared with matched controls.

Experimental methods

Materials and methods

Argan fruits were harvested in the Tindouf area of South-western Algeria. The argan oil used in the present work was

Abbreviations: CAT, catalase; LOOH, lipoperoxides; ORAC, oxygen radical absorbance capacity; TBARS, thiobarbituric acid-reacting substances.

* **Corresponding author:** F. Visioli, email francesco.visioli@imdea.org

Table 1. Composition of the argan oil adopted in this study

Fatty acid	%
C16:0	12.89
C18:0	4.83
C16:1n-9	0.4
C18:1n-9	45.01
C18:2n-6	35.39
C18:3n-3	0.2
Total SFA	17.72
Total MUFA + PUFA	81
MUFA/PUFA	1.27
α-Tocopherol (mg/kg)	56.34
Phenolic compounds (mg/kg)	52.36

produced from freshly picked seeds of a single harvest, using traditional hand-methods. The oil was kept at 4°C in a brown glass bottle until the beginning of the trial.

The fatty acid composition of the oil was determined by gas-phase chromatography (Applied Sciences Labs, State College, PA, USA). Fatty acid standards were from Nu-Check-Prep (Elysian, MN, USA). Vitamin E (α-tocopherol) was measured by HPLC according to Zaman *et al.*⁽¹⁴⁾. Polyphenols were extracted from the oil and quantified using the method of Pirisi *et al.*⁽¹⁵⁾. The composition of the oil at study is given in Table 1. More than 80% of total fatty acids was composed of oleic and linoleic acids (45.01 and 35.39%, respectively). Linolenic acid accounted for only 0.2% of total fatty acids. SFA (mostly palmitic and stearic acids) accounted for 17.7% of total fatty acids. This oil was devoid of erucic acid. Vitamin E (α-tocopherol) concentration was quite low, i.e. 56.34 mg/kg. Polyphenols were also scarcely present, i.e. 52.36 mg/kg.

Subjects

The present study conforms to the Declaration of Helsinki (Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects) and was approved by the local ethics committee. A total of forty healthy subjects aged 25–45 years with normal BMI and blood pressure were recruited from within the Abu Bakr Belkaid University (Tlemcen, Algeria) and written or oral informed consent to the study was taken from them. All participants were free of metabolic diseases such as hypercholesterolaemia, hypertriglycerolaemia, diabetes and hypertension, and were non-smokers and medication-free. We monitored the volunteers' lifestyle, e.g. physical activity, working hours and sleep duration, which did not markedly change throughout this study. A total of twenty subjects consumed 15 g/d of argan oil – with toasted bread – for breakfast, during 4 weeks (intervention group), whereas twenty matched controls followed their habitual diet, but did not consume argan oil. We found that provision of argan oil translated into lower consumption of habitual fat (oils and, to a lower extent, butter). It is noteworthy that, unexpectedly, consumption of olive oil in Algeria is quite low (approximately 1 kg/year), whereas milk consumption is higher than in neighbouring Maghreb countries^(16,17).

We chose the dose of 15 g/d because (a) it was well tolerated by our volunteers and approximates habitual

consumption and (b) Drissi *et al.*⁽⁸⁾ previously reported on the healthful effects of this daily dose.

Both groups had similar anthropometric characteristics (Table 2). All subjects filled in a food questionnaire, in which they noted the quality and quantity of food consumed during the day before blood sampling, including their argan oil intake (which was nil in controls). The registered values were converted into energy and were estimated according to the Ciqual standard table of food composition⁽¹⁸⁾. All participants had similar physical activity and lifestyle.

Blood analyses

At days 0 (T_0), 15 (T_{15}) and 30 (T_{30}), venous blood was drawn into evacuated tubes, some of which contained disodium EDTA as the anticoagulant; other tubes did not contain anticoagulants to allow for the preparation of serum. Both serum and plasma were separated by centrifugation at 2100 g for 20 min at 4°C, aliquoted, and stored at –20°C. Erythrocytes were collected and washed three times in isotonic saline; then they were haemolysed by the addition of cold distilled water (1/4, vol/vol). Cellular debris was removed by centrifugation.

Lipoprotein and lipid determination

Plasma lipoproteins (LDL, $d < 1.063$; HDL, $d < 1.21$ g/ml) were separated by sequential ultracentrifugation. Serum total cholesterol (TC) and TAG were measured using enzymatic kits (Quimica Clinica Aplicada S.A., Amposta, Spain). HDL-cholesterol and LDL-cholesterol concentrations were also measured by enzymatic kits.

Determination of hydroperoxides

Both plasma and erythrocyte levels of hydroperoxides (lipoperoxides, LOOH) were measured by the ferrous ion oxidation-xylene orange assay – using the specific LOOH reducer triphenylphosphine – according to the method of Nourooz-Zadeh *et al.*⁽¹⁹⁾.

Determination of thiobarbituric acid-reacting substances

Thiobarbituric acid-reacting substances (TBARS) in plasma and erythrocytes were measured according to the method of Nourooz-Zadeh *et al.*⁽¹⁹⁾.

Table 2. Anthropometric characteristics of the study subjects (Mean values and standard deviations)

	Argan oil (n 20)		Controls (n 20)	
	Mean	SD	Mean	SD
Age (years)	37.9	2.18	35.2	1.52
BMI (kg/m ²)	23.08	0.37	22.82	0.55
Glycaemia (mg/l)	931	20.0	926	18.7
SBP (mmHg)	117	2.59	115.5	2.32
DBP (mmHg)	73.5	1.29	70.5	1.7

SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure.

Table 3. Dietary intakes at day 30

	Argan oil (n 20)				Controls (n 20)			
	g/d		%		g/d		%	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Energy intake								
kcal/d	2108.06		40.59		2100.14		93.28	
kJ/d	8820.12		169.82		8786.98		390.28	
Total protein	74.86	2.86	14.20	0.55	73.83	3.89	14.06	0.78
Total sugars	313.24	9.70	59.43	1.87	319.58	7.46	60.86	1.95
Simple sugars	100.85	2.64	32.19	1.42	104.05	4.84	32.55	1.75
Complex sugars	212.39	9.98	67.80	3.46	215.53	7.69	67.44	2.78
Total lipids	61.74	3.82	26.35	1.66	58.5	2.79	25.06	1.26
SFA	22.41	1.23	36.92	2.31	23.02	1.28	39.35	2.66
MUFA	20.75	1.74	33.60	3.26	20.78	1.17	35.52	2.43
PUFA	18.58*	1.17	30.09*	2.19	14.7	0.96	25.12	2.00
Cholesterol (mg/d)	244.82		15.58		257.72		34.74	

* Mean values were significantly different ($P < 0.05$).

Determination of carbonyl proteins

Carbonyl proteins were measured in plasma and erythrocytes by the 2,4-dinitrophenylhydrazine reaction described by Levine *et al.*⁽²⁰⁾.

Conjugated diene formation

The *in vitro* oxidisability of plasma lipoproteins induced by metals, i.e. copper sulphate, was analysed by monitoring, over time, the formation of conjugated dienes, as described by Esterbauer *et al.*⁽²¹⁾.

Determination of plasma levels of vitamins A, E and C

Vitamins A (retinol) and E (α -tocopherol) were determined in the plasma of all volunteers by HPLC coupled with UV detection at 292 nm for vitamin E and 325 nm for vitamin A, according to Zaman *et al.*⁽¹⁴⁾. Vitamin C was measured in plasma by the method of Jagota & Dani⁽²²⁾.

Determination of catalase activity

Catalase (CAT; EC 1.11.1.6) activity was measured by spectrophotometric analysis of the rate of H_2O_2 decomposition at 240 nm, according to the method of Aebi⁽²³⁾.

Oxygen radical absorbance capacity

The total antioxidant ability of plasma (oxygen radical absorbance capacity, ORAC) was estimated by the capacity of erythrocytes to resist free-radical-induced haemolysis, according to the method of Blache & Prost⁽²⁴⁾.

Statistical analysis

Results are expressed as means and standard deviations. The Student's *t* test was used to compare data from the intervention group with those from controls. Statistical analysis was performed using Statistica (version 4.1, Statsoft, Paris, France). A *P* value less than 0.05 was considered as statistically significant.

Results

Dietary profile

Neither total daily energy intake nor consumption of proteins, carbohydrates and lipids significantly differed between the two groups during the experiment (Table 3). Consumption of SFA and MUFA was also similar in both groups; however, argan oil intake resulted in a higher overall consumption of PUFA (Table 3).

Table 4. Plasma lipid profile of argan oil-supplemented (A) and control (C) subjects, at different time points†

(Mean values and standard deviations)

	C		A-T ₀		A-T ₁₅		A-T ₃₀	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
TAG (mg/l)	1210	80	1240	10	1170	90	980*	60
TC (mg/l)	1620	70	1640	60	1520	40	1400*	60
HDL-C (mg/l)	420	20	410	20	440	20	470	10
LDL-C (mg/l)	790	30	810	30	730	20	680**	20

T₀, day 0; T₁₅, day 15; T₃₀, day 30; TC, total cholesterol; HDL-C, HDL-cholesterol; LDL-C, LDL-cholesterol.

Mean values were significantly different from those of controls: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$.

† The plasma lipid profile of control subjects did not change significantly throughout the study: we present the average value of T₀ + T₁₅ + T₃₀.

Table 5. Circulating and cellular markers of lipid and protein oxidation of argan oil-supplemented (A) and control (C) subjects, at different time points†
(Mean values and standard deviations)

	C		A- T_0		A- T_{15}		A- T_{30}	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
TBARS pl ($\mu\text{mol/l}$)	1.31	0.05	1.45	0.06	1.31	0.08	1.19*	0.06
TBARS erythrocytes ($\mu\text{mol/l}$)	8.67	1.57	8.70	1.71	7.89	1.30	6.65*	1.51
LOOH pl ($\mu\text{mol/l}$)	0.86	0.11	0.93	0.13	0.77	0.11	0.46**	0.05
LOOH erythrocytes ($\mu\text{mol/l}$)	9.98	1.40	10.3	1.33	9.42	1.37	8.09*	1.30
PC pl (nmol/l)	61.55	2.35	62.74	2.48	59.47	2.39	56.83*	2.03
PC erythrocytes (nmol/l)	90.97	5.18	94.93	6.31	87.85	5.02	81.05	4.83

T_0 , day 0; T_{15} , day 15; T_{30} , day 30; TBARS, thiobarbituric acid-reacting substances; pl, plasma; LOOH, lipoperoxides; PC, protein carbonyls.

Mean values were significantly different from those of controls: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

† The biomarkers of control subjects did not change significantly throughout the study: we present the average value of $T_0 + T_{15} + T_{30}$.

Circulating lipids

We recorded a significant improvement in the plasma lipid profile of subjects who were given argan oil as compared to controls, whose values did not significantly change during the study (data not shown). In particular, TAG decreased by 20.97%, TC by 14.63% and LDL-cholesterol by 16.05% after 30 d of treatment (Table 4). We also recorded a concomitant non-significant increase in HDL-cholesterol.

Circulating and cellular markers of oxidation and antioxidant status

Circulating and cellular markers of lipid (TBARS and LOOH) and protein (carbonyls) oxidation are shown in Table 5. Argan oil significantly decreased the former (at T_{30}), but not the latter. In addition, susceptibility of LDL to copper-induced oxidation was decreased in argan oil-treated subjects, as indicated by the significantly increased lag phase and decrease of conjugated diene production (Table 6).

Plasma vitamin E concentrations were significantly increased (+18% at T_{15} , $P < 0.05$ and +43% at T_{30} , $P < 0.001$ when compared with controls; Table 7) by argan oil ingestion throughout the study. Conversely, vitamins A and C did not change significantly in either group. CAT activity also increased significantly in argan oil-treated subjects, whereas plasma ORAC remained unmodified.

Discussion

We performed the first trial of Algerian argan oil in human subjects and evaluated a wide array of surrogate markers of CVD. Our present study results show that daily consumption of feasible amounts of argan oil positively modulates such markers. Argan oil consumption is increasing in Europe and high-quality virgin argan oil can also be currently purchased in Japan and the USA, where it is mostly sold for its purported cosmetic properties. Thus far, due to its elevated price, the dietary use of argan oil is mostly limited to the areas where it is produced (for the most part Morocco, although West Algeria also contributes). As such, it contributes to the diet of selected population groups and is an integral part of the Maghrebian version of the Mediterranean diet.

Our results are in agreement with those of Drissi *et al.*⁽⁸⁾ and of Cherki *et al.*⁽¹³⁾ and fit with cumulated animal evidence of the anti-atherogenic potential of argan oil⁽⁷⁾. In particular, argan oil consumption – in feasible amounts – decreased total and LDL-cholesterol and TAG. Of note, our subjects had low mean cholesterolaemia, which reflects the average values found in countryside Algeria. Other cardiovascular parameters such as blood pressure were not modified by argan oil consumption, in contrast with the findings of Berrougui *et al.*⁽²⁵⁾ who reported hypotensive effects in normotensive Wistar rats. This discrepancy might be due to species specificity, dose or treatment duration.

Table 6. Susceptibility of LDL to oxidation of argan oil-supplemented (A) and control (C) subjects, at different time points†
(Mean values and standard deviations)

	C		A- T_0		A- T_{15}		A- T_{30}	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
LP (min)	57.5	5.40	56.25	4.78	62.75	5.75	67.5*	6.45
MR (min)	122.5	6.45	123.25	7.05	124.55	7.27	126.75	8.16
IDP (nmol/l)	33.05	1.39	36.68	0.62	32.22	0.58	30.83	0.95
MDP (nmol/l)	40.83	4.61	43.25	4.97	38.30	4.53	33.7*	3.94

T_0 , day 0; T_{15} , day 15; T_{30} , day 30; LP, lag phase; MR, maximal rate; IDP, initial conjugated diene production; MDP, maximum conjugated diene production.

* Mean values were significantly different from those of controls ($P < 0.05$).

† The susceptibility of LDL to oxidation of control subjects did not change significantly throughout the study: we present the average value of $T_0 + T_{15} + T_{30}$.

Table 7. Plasma antioxidant parameters of argan oil-supplemented (A) and control (C) subjects, at different time points

(Mean values and standard deviations)

	C		A-T ₀		A-T ₁₅		A-T ₃₀	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Vitamin C (µg/ml)	13.25	0.31	13.42	0.43	13.05	0.25	13.6	0.46
Vitamin E (µg/ml)	21.52	1.78	21.46	1.75	25.21*	1.92	30.66**	2.01
Vitamin A (µg/ml)	66.54	1.59	66.92	1.91	65.46	0.68	71.54	1.98
ORAC (AU)	2.22	0.11	2.1	0.10	2.43	0.11	2.97	0.12
CAT pl (U/ml)	0.23	0.02	0.22	0.02	0.26	0.03	0.28	0.03
CAT erythrocytes (U/ml)	81.21	2.64	80.12	1.95	82.05	1.71	88.88*	2.08

T₀, day 0; T₁₅, day 15; T₃₀, day 30; ORAC, oxygen radical absorbance capacity; AU, arbitrary; CAT, catalase; pl, plasma. Mean values were significantly different from those of controls: *P<0.05, **P<0.01.

The exact mechanisms of action by which argan oil exerts its lipid-modulating and potentially anti-atherogenic actions remain elusive. However, we speculate that the high proportion of PUFA and MUFA in the argan oil we administered – and reflected in the overall dietary intake (Table 3) – played marked roles, as suggested by the available literature^(26,27). Other contributors to the hypolipidaemic effects of argan oil are – probably – sterols and saponins, which we did not measure in the present investigation due to technical limitations, but which have been previously investigated by Khallouki *et al.*⁽¹¹⁾ and Berrougui *et al.*⁽²⁸⁾. Both classes of molecules interfere with intestinal cholesterol absorption and are currently exploited as functional food components⁽²⁹⁾.

We also evaluated circulating markers of oxidation and report that argan oil consumers had lower concentrations of LOOH and TBARS, but not of oxidatively-modified proteins. Total antioxidant capacity (evaluated as ORAC) also did not change. Finally, we recorded increased intracellular CAT activity. This finding is, indeed, counterintuitive (there should be no reason to activate an antioxidant enzyme if the antioxidant profile is augmented). However, several studies with antioxidants, e. g. polyphenols, reported similar increases in the activity of antioxidant enzymes, namely superoxide dismutase and CAT⁽³⁰⁾. As far as argan oil is concerned, our results agreed with those of Benajiba *et al.*⁽³¹⁾, which showed that the activities of cytosolic CAT were significantly higher in Wistar rats treated with argan oil in comparison with the untreated rats. We can conceivably attribute the observed antioxidant actions (including increased LDL resistance to oxidation, which confirms previous findings of Cherki *et al.*⁽¹³⁾) to the provision of vitamin E (which increased in consumers' plasma, Table 7) by argan oil. While Algerian argan oil appears to contain less vitamin E than, for example, the average Moroccan argan oil or extra-virgin olive oil, the contribution of tocopherols to the overall intake is, apparently, sufficient to elicit antioxidant effects. Other components such as polyphenols, namely ferulic acid⁽³²⁾, and sterols might have played a role. The precise nature of the cumulative positive effects on antioxidant profile, however, is still elusive and requires *ad hoc* investigations.

Our present study has several limitations – most of which are due to technical constraints – which we should acknowledge. As mentioned, we could not analyse the

argan oil's content of sterols and saponins and, thus, we rely on the data of Khallouki *et al.*⁽¹¹⁾ and Berrougui *et al.*⁽²⁸⁾. We also could not evaluate the modifications of plasma and lipoprotein lipid profile brought about by consumption of argan oil. Hence, we rely on food composition tables to estimate intakes. Finally, we assessed an array of lipid peroxidation indices, due to the current lack of robust biomarkers⁽³³⁾; however, each of them has shortcomings⁽³⁴⁾.

In conclusion, we showed that argan oil is able to positively modulate some surrogate markers of CVD, through mechanisms which warrant further investigation. Moreover, based on these results, argan oil could prove to be an effective livelihood opportunity to diversify the options of small rural Berber producers and enhance their incomes.

Acknowledgements

We thank all the volunteers for their cooperation. We also thank the UPRES Laboratory of Lipids and Nutrition, Faculty of Sciences Gabriel, Burgundy University (Dijon, France). All authors read and approved the manuscript. S. S., D. K., N. B., N. S. and A. N. recruited the volunteers, analysed the FFQ and performed the biochemical analyses. M. B., F. C. and F. V. supervised the study and wrote the paper. All authors declare that there are no conflicts of interest. The present research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors.

References

- McNaughton SA, Mishra GD & Brunner EJ (2009) Food patterns associated with blood lipids are predictive of coronary heart disease: the Whitehall II study. *Br J Nutr* **102**, 619–624.
- Martinez-Gonzalez MA, Bes-Rastrollo M, Serra-Majem L, *et al.* (2009) Mediterranean food pattern and the primary prevention of chronic disease: recent developments. *Nutr Rev* **67**, Suppl. 1, S111–S116.
- Bedard A, Goulet J, Riverin M, *et al.* (2010) Effects of a dietary intervention promoting the adoption of a Mediterranean food pattern on fast-food consumption among healthy French-Canadian women. *Br J Nutr* **104**, 1662–1665.
- Bogani P & Visioli F (2007) Antioxidants in the Mediterranean diets: an update. *World Rev Nutr Diet* **97**, 162–179.
- Bere E & Brug J (2010) Is the term 'Mediterranean diet' a misnomer? *Public Health Nutr* **13**, 2127–2129.

6. Visioli F & Bernardini E (2011) Extra Virgin Olive Oil's Polyphenols: biological activities. *Curr Pharm Des* **17**, 786–804.
7. Charrouf Z & Guillaume D (2010) Should the amazigh diet (regular and moderate argan-oil consumption) have a beneficial impact on human health? *Crit Rev Food Sci Nutr* **50**, 473–477.
8. Drissi A, Girona J, Cherki M, *et al.* (2004) Evidence of hypolipemiant and antioxidant properties of argan oil derived from the argan tree (*Argania spinosa*). *Clin Nutr* **23**, 1159–1166.
9. Bennani H, Drissi A, Giton F, *et al.* (2007) Antiproliferative effect of polyphenols and sterols of virgin argan oil on human prostate cancer cell lines. *Cancer Detect Prev* **31**, 64–69.
10. Berrougui H, Ettaib A, Herrera G, *et al.* (2003) Hypolipidemic and hypocholesterolemic effect of argan oil (*Argania spinosa* L.) in Meriones shawi rats. *J Ethnopharmacol* **89**, 15–18.
11. Khallouki F, Younos C, Soulimani R, *et al.* (2003) Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *Eur J Cancer Prev* **12**, 67–75.
12. Cherki M, Berrougui H, Drissi A, *et al.* (2006) Argan oil: which benefits on cardiovascular diseases? *Pharmacol Res* **54**, 1–5.
13. Cherki M, Derouiche A, Drissi A, *et al.* (2005) Consumption of argan oil may have an antiatherogenic effect by improving paraoxonase activities and antioxidant status: intervention study in healthy men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **15**, 352–360.
14. Zaman Z, Fielden P & Frost PG (1993) Simultaneous determination of vitamins A and E and carotenoids in plasma by reversed-phase HPLC in elderly and younger subjects. *Clin Chem* **39**, 2229–2234.
15. Pirisi FM, Cabras P, Cao CF, *et al.* (2000) Phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Reappraisal of the extraction, HPLC separation, and quantification procedures. *J Agric Food Chem* **48**, 1191–1196.
16. Kallithraka S, el-Jazouli A & Zeghichi S (2000) Mediterranean diets in the Maghreb. *World Rev Nutr Diet* **87**, 160–179.
17. Zeghichi-Hamri S & Kallithraka S (2007) Mediterranean diet in the Maghreb: an update. *World Rev Nutr Diet* **97**, 139–161.
18. Anonymous (1991) *Répertoire général des aliments: technique et documentation (General list of foods: technical documentation)*. Paris: Lavoisier-INRA-Ciqual-Régál Edit.
19. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Ling KL, *et al.* (1996) Low-density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in plasma. Relevance to determination of total plasma lipid hydroperoxide concentrations. *Biochem J* **313**, 781–786.
20. Levine RL, Garland D, Oliver CN, *et al.* (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* **186**, 464–478.
21. Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, *et al.* (1989) Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun* **6**, 67–75.
22. Jagota SK & Dani HM (1982) A new colorimetric technique for the estimation of vitamin C using Folin phenol reagent. *Anal Biochem* **127**, 178–182.
23. Aebi H (1974) Catalase. In *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd ed., pp. 673–684 [HU Bergmeyer, editor]. Weinheim: Verlag Chemie.
24. Blache D & Post M (1992) Free radical attack: biological test for human resistance capability. In *Proceedings of the College Park on Chemical Evolution*, pp. 82–98. Washington, DC: Chemical Analysis Laboratory.
25. Berrougui H, Alvarez dS, Perez-Guerrero C, *et al.* (2004) Argan (*Argania spinosa*) oil lowers blood pressure and improves endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr* **92**, 921–929.
26. Ramsden CE, Hibbeln JR, Majchrzak SF, *et al.* (2010) n-6 fatty acid-specific and mixed polyunsaturate dietary interventions have different effects on CHD risk: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Br J Nutr* **104**, 1586–1600.
27. Calder PC (2010) The American Heart Association advisory on n-6 fatty acids: evidence based or biased evidence? *Br J Nutr* **104**, 1575–1576.
28. Berrougui H, Cloutier M, Isabelle M, *et al.* (2006) Phenolic-extract from argan oil (*Argania spinosa* L.) inhibits human low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* **184**, 389–396.
29. Marangoni F & Poli A (2010) Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacol Res* **61**, 193–199.
30. Hassimotto NM, Pinto MS & Lajolo FM (2008) Antioxidant status in humans after consumption of blackberry (*Rubus fruticosus* L.) juices with and without defatted milk. *J Agric Food Chem* **56**, 11727–11733.
31. Benajiba N, Morel S, De Leiris J, *et al.* (2002) The effect of argan oil on heart function during ischemia and reperfusion. *Thérapie* **57**, 246–252.
32. Zougagh M, Salghi R, Dhair S, *et al.* (2011) Nanoparticle-based assay for the detection of virgin argan oil adulteration and its rapid quality evaluation. *Anal Bioanal Chem* **399**, 2395–2405.
33. Spickett CM, Wiswedel I, Siems W, *et al.* (2010) Advances in methods for the determination of biologically relevant lipid peroxidation products. *Free Radic Res* **44**, 1172–1202.
34. Halliwell B (2000) Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiovasc Res* **47**, 410–418.