

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abou Bekr Belkaïd -Tlemcen-
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie



Laboratoire de recherche

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

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de MASTER

Domaine : SNV

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

Thème :

**Screening phytochimique de quelques extraits des
fruits de *Crataegus monogyna* et évaluation de son
pouvoir antioxydant**

Présenté par : M^{lle} Benmokhtar Chaïmaa

Soutenu devant le jury : 21-06-2023

Dr. Medjdoub Houria	MCB	Présidente	Université de Tlemcen
Dr. Adida Houria	MCA	Examinatrice	Université de Tlemcen
Dr. Belkacem Nacéra	MCA	Encadrante	Université de Tlemcen

Année Universitaire 2022 / 2023

Remerciements

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

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

*Je tiens à remercier profondément M^{me} **Medjdoub H.**, Maître de Conférences **B** au département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen- d'avoir accepté de présider le jury.*

*J'exprime ma profonde gratitude et mes remerciements à M^{me} **Adida H.**, Maître de conférences **A** au Département de Biologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen- D'avoir accepté d'examiner mon travail.*

Un grand merci est adressé à tous les membres du laboratoire Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimiques, Synthèse et Activité biologique de l'Université de Tlemcen pour leur gentillesse et leur aide.

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

Dédicace

Avec l'aide du Dieu le tout-puissant, j'ai pu achever ce modeste travail, que je suis très heureux de dédier à l'âme de mon père et à ma précieuse
maman.

Je souhaite exprimer ma gratitude envers mon cher frère, Mohammed, ainsi qu'à tous ceux qui m'aiment et m'ont apporté leur soutien et leur aide, que ce soit par une idée, des mots, de motivation ou d'encouragement.

Benmokhtar Chaimaa .

Liste des tableaux

Tableau n°1: Différentes Espèces réactives de l'oxygène	5
Tableau n°2: Noms Vernaculaires de l'Aubépine.....	18
Tableau n°3: Constituants chimiques de la partie comestible du <i>C. monogyna</i>	19
Tableau n°4: Activités biologiques associées aux différentes parties de <i>C. monogyna</i>	25
Tableau n°5: Rendements et caractéristiques des différents extraits des fruits de <i>C. monogyna</i>	37
Tableau n°6: Résultat de l'analyse phytochimique réalisé sur les extraits du <i>C. monogyna</i>	38
Tableau n°7: Teneurs de différents composés phénoliques dans les extraits de <i>C. monogyna</i>	40
Tableau n°8: Valeurs des IC ₅₀ des différents extraits et des molécules de référence.....	47
Tableau n°9: Valeurs des EC ₅₀ des différents extraits et des molécules de référence	52

Liste des figures

Figure n°1 : Une illustration de l'équilibre oxydant / antioxydant	3
Figure n°2 : Origine extracellulaire et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène et d'azote et les éléments du système de défense	4
Figure n°3 : Description schématique des mécanismes de production des espèces réactives d'oxygène (ERO)	6
Figure n°4 : Structure de la vitamine E	9
Figure n°5 : Structure de la vitamine C	9
Figure n°6 : Structures chimiques des acides phénoliques	10
Figure n°7 : Structure basique des flavonoïdes (aglycone) et ses classes chimiques	10
Figure n°8 :Structure des tanins hydrolysables	11
Figure n°9 :Structure chimique du lignane	12
Figure n°10 :Structures des principaux antioxydants phénoliques	12
Figure n°11 :Formation de radicaux ABTS stables à partir d'ABTS avec du persulfate de potassium	13
Figure n°12 : Mécanisme de récupération du DPPH• par un antioxydant (AH).....	13
Figure n°13 : Mécanisme de réaction du ferricyanure de potassium	14
Figure n°14 :Fruit, fleurs et feuilles de <i>C. monogyna</i> jacq.	17
Figure n°15 : Les classes de flavonoïdes de <i>C. monogyna</i>	20
Figure n°16 : Les composés flavane-3-ol catéchine de <i>C. monogyna</i>	21
Figure n°17 :Les procyanidines isolées à partir de différentes parties de <i>C. monogyna</i>	21
Figure n°18 :Flavonols isolés avec une fraction catécholique au cycle-B	22
Figure n°19 : Pigment floral de <i>C. monogyna</i>	22
Figure n°20 : L'acide chlorogénique et ses isomères de fleurs <i>C.monogyna</i>	23
Figure n°21 :Triterpènes isolés à partir des parties aériennes de <i>C. monogyna</i>	23
Figure n°22 : Fruits de <i>C. monogyna</i> secs (A) et broyés (B)	27
Figure n°23 : Schéma récapitulatif du protocole d'extraction et expérimental réalisé sur les fruits de <i>C. monogyna</i>	30

Figure n°24: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	39
Figure n°25: Courbe d'étalonnage de la catéchine	39
Figure n°26: Courbe d'étalonnage de la catéchine (Dosage des tanins condensés)	40
Figure n°27: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par l'extrait brut aqueux.....	42
Figure n°28: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par la phase acétate d'éthyle de l'EBA.	42
Figure n°29: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par la phase aqueuse de l'EBA.	42
Figure n°30: Pourcentage d'inhibition du radical par l'extrait brut (eau/acétone).....	43
Figure n°31: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par la phase acétate d'éthyle de l'EBEA...	44
Figure n°32: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par la phase aqueuse de l'EBEA.	44
Figure n°33: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par l'acide ascorbique.....	45
Figure n°34: Pourcentage d'inhibition radical DPPH• par le BHA	45
Figure n°35 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par le BHT	46
Figure n°36: Pouvoir réducteur du fer par l'extrait brut Aqueux	48
Figure n°37: Pouvoir réducteur du fer par la phase acétate d'éthyle de l'EBA	48
Figure n°38: Pouvoir réducteur du fer par la phase aqueuse de l'EBA	49
Figure n°39: Pouvoir réducteur du fer par l'extrait brut eau/acétone	50
Figure n°40: Pouvoir réducteur du fer par la phase acétate d'éthyle de l'EBEA.....	50
Figure n°41: Pouvoir réducteur du fer par la phase aqueuse de l'EBEA	50
Figure n°42: Pouvoir de réduction de fer par l'acide ascorbique.....	51
Figure n°43: Pouvoir de réduction de fer par le BHA.....	51
Figure n°44 : Pouvoir réducteur du fer par le BHT	51
Figure n°45: Classement des IC ₅₀ par ordre croissant (Méthode DPPH).....	54
Figure n°46: Classement des EC ₅₀ par ordre croissant (Méthode FRAP).....	54
Figure n°47: Teneurs en composés phénoliques des différents extraits	54

Liste des abréviations

ABTS: Acide 2,2_azino_bis_ethyl benzothiaziline_6_ sulfonique.

BHA: Hydroxyanisol butylé

BHT: Hydroxytoluène butylé

CAT: Catalase

CUPRAC: CUPric Reducing Antioxidant Capacity

DPPH: 2-2-diphénilepicrylhydrazyl

ERN: Espèces réactives de l'azote

ERO: Espèces réactives de l'oxygène.

FRAP: Ferric reducing antioxidant power

GPx: Glutathion peroxydase

GSSG: Glutathion oxydé

O[°]2: Radical anion superoxyde

OH[°]: Radical hydroxyle

ORAC: Oxygen radical absorbance capacity

ROO[°]: Radicaux libres peroxydes

SOD: Superoxyde dismutase

TAC: Capacité antioxydante total

TRAP: Total radical-trapping antioxidant parameter

Sommaire

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	1

Synthèse Bibliographique

Chapitre 1 : Stress Oxydatif

1 Définition du stress oxydatif	3
2 Origine du stress oxydatif	3
3 Les radicaux libres	4
4 Les conséquences du stress oxydant	7
5 Le système de défense antioxydant	7
6 Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante in vitro	13

Chapitre 2 : La plante d'étude

1 Généralité	16
2 Définition et répartition	16
3 Description botanique	16
4 Classification botanique	17
5 Appellations	18
6 Utilisation traditionnelle	18
7 Composition chimique	19
8 Propriétés thérapeutiques	23
9 Effets indésirables et toxicité de <i>C. monogyna</i>	26

Matériel Et Méthodes

1 Matériel végétal	27
2 Analyse phytochimique	31
3 Dosage des composés phénoliques	32
4 Évaluation de l'activité antioxydante	34
5 Analyse statistique	36

Résultats Et Interprétation

1 Calcul des rendements d'extraction	37
2 Analyses phytochimiques	38
3 Teneurs en composés phénoliques	39
4 Évaluation de l'activité antioxydante des extraits par DPPH	41
5 Pouvoir réducteur du fer (Méthode FRAP)	47

<i>Discussion</i>	55
-------------------------	----

<i>Conclusion</i>	59
-------------------------	----

<i>Références bibliographiques</i>	60
--	----

الملخص

يركز هذا العمل على البحث عن مضادات الأكسدة الطبيعية و يهدف إلى إجراء دراسة كيميائية نباتية و تقييم النشاط المضاد للأكسدة لمختلف مستخلصات فاكهة الزعرور المقطوفة من منطقة تلمسان بالجزائر.

تم استخراج المادة النباتية عن طريق النقع في الماء المقطر وخليط الماء/الأسيتون (30:70 ، حجم/ حجم) لمدة 72 ساعة ثم يتم إجراء استخراج (سائل-سائل) باستخدام أسيتات الإيثيل. تخضع المستخلصات التي تم الحصول عليها لتحليل كيميائي نباتي ، لتحديد كمية المركبات الفينولية ، وكذلك لتقييم القوة المضادة للأكسدة باستخدام طريقتين: DPPH و FRAP.

اثبتت الدراسة الكيميائية للنبات وجود المركبات الفينولية كالبوليفينول و الفلافونويد و العفص المكثف. إن التحليل الكمي للمستخلص الخام (ماء /أسيتون) لفاكهة الزعرور يثبت غنى هذا المستخلص بكمية معتبرة من المركبات الفينولية (بوليفينول وفلافونويد , عفص المكثف (189,2 ± 15,66 مغ مكافئ حمض الغاليك في الغرام الواحد؛ 36,9 ± 2,20 مغ مكافئ كاتشين في الغرام الواحد , 18,446 ± 2,27 مغ مكافئ كاتشين في الغرام الواحدعلى التوالي). في المقابل يقدم المستخلص الخام المائي للفاكهة نسبة منخفضة لهذه المركبات مقارنة بالمستخلص الخام (ماء /أسيتون) (77,22 ± 12,22 مغ مكافئ حمض الغاليك في الغرام الواحد ؛ 1,4 ± 0,00 مغ مكافئ كاتشين في الغرام الواحد ؛ 0,91 ± 0,00 مغ مكافئ كاتشين في الغرام الواحد , على الترتيب) . يسجل مستخلص أسيتات الإيثيل الناتج عن تجزئة المستخلص الخام (ماء /أسيتون) أعلى محتوى من المركبات الفينولية (392,04 ± 18,14 مغ معادل حمض الغاليك في الغرام الواحد ؛ 738 ± 10,09 مغ معادل كاتشين في الغرام الواحد ؛ 295,46 ± 5,41 مغ معادل كاتشين في الغرام الواحد , على الترتيب) وهذه النتائج تجعله المستخلص الأغنى من بين كل المستخلصات المدروسة.

أظهرت نتائج الإختبارات على النشاط المضاد للأكسدة أن مستخلصات ثمار الزعرور تتميز بقدرة كبيرة على إرجاع الحديد و التخلص من الجذور الحرة DPPH•. يقدم مستخلص أسيتات الإيثيل الناتج عن تجزئة المستخلص الخام (ماء /أسيتون) قدرة إختزال قوية بشكل إستثنائي نحو جذر DPPH (IC₅₀=0.122 mg/ml) هذه القدرة على الحد من الجذور الحرة أعلى و بشكل واضح من قدرة BHA (IC₅₀=0.175 mg/ml) و قدرة BHT (IC₅₀=0,895 mg/ml) يليه المستخلص الخام (ماء أسيتون) (IC₅₀=0,895 mg/ml) مما يكسب هذا المستخلص نشاطا معتبرا كمضاد للأكسدة و لكنه يظل أقل من نشاط الجزيئات المرجعية. كشفت تقنية FRAP أن مستخلص أسيتات الإيثيل الناتج من المستخلص الخام (ماء/أسيتون) يتميز بقدرة إرجاع حديد ممتازة و تقدر ب (EC₅₀=0,077mg/ml) و هذا النشاط أعلى من ما يقدمه BHT و حمض الأسكوربيك (EC₅₀=0.217 mg/ml ; EC₅₀ = 0.519 mg/ml) على الترتيب ؛ و يرتبط النشاط المضاد للأكسدة لهذا المستخلص ارتباطا مباشرا و وثيقا بكمية المركبات الفينولية المعتبرة المتواجدة فيه .

الكلمات المفتاحية : نبات الزعرور, المركبات الفينولية, النشاط المضاد للأكسدة.

Résumé

Ce travail porte sur la recherche d'antioxydants naturels et vise à mener une étude phytochimique tout en évaluant l'activité antioxydante de divers extraits de fruits de *C.monogyna*.

L'extraction du matériel végétal a été réalisée par macération dans l'eau distillée et un mélange eau/acétone (30:70, v/v) pendant 72 heures. Ensuite, une extraction liquide-liquide avec l'acétate d'éthyle est effectuée. Les extraits obtenus sont soumis à une analyse phytochimique, à un dosage des composés phénoliques, ainsi qu'à une évaluation du pouvoir antioxydant à l'aide de deux méthodes : DPPH et FRAP.

L'étude phytochimique des extraits de fruits de *C.monogyna* révèle la présence de polyphénols, de flavonoïdes et de tanins. Les résultats des dosages de polyphénols totaux, de flavonoïdes et de tanins condensés, indiquent que l'extrait brut eau/acétone est particulièrement riche en ces composés ($189,2 \pm 15,66$ mg EAG/gE ; $36,9 \pm 2,20$ mg EQC/gE ; $18,446 \pm 2,27$ mg EQC/gE, respectivement). En revanche, l'extrait brut aqueux présente une faible teneur en ces composés par rapport à l'extrait précédent ($77,22 \pm 12,22$ mg EAG/gE ; $1,4 \pm 0,00$ mg EQC/gE ; $0,91 \pm 0,00$ mg EQC/gE respectivement). La phase acétate d'éthyle, obtenu par fractionnement de l'extrait brut hydroacétonique, est considéré comme l'extrait le plus riche en composés phénoliques ($392,04 \pm 18,14$ mg EAG/gE ; 738 mg EQC/gE ; $295,46$ mg EQC/gE) parmi tous les extraits étudiés.

Les résultats des tests *in vitro* de l'activité antioxydante ont démontré que les extraits organiques de fruits de *C.monogyna* présentent une capacité significative de réduction du fer et de piégeage du radical DPPH[•]. Dans la méthode DPPH[•], la phase acétate d'éthyle de l'extrait brut (eau/acétone), démontre une capacité de réduction exceptionnellement puissante envers le radical DPPH[•], avec une IC₅₀ de 0,122 mg/ml. Cette capacité de réduction du radical libre est nettement supérieure à celle du BHA (IC₅₀ = 0,175 mg/ml) et du BHT (IC₅₀ = 0,542 mg/ml). Par la suite, l'extrait brut (eau/acétone) présente une IC₅₀ de 0,895 mg/ml. En ce qui concerne la méthode FRAP, la phase acétate d'éthyle de l'extrait brut (eau/acétone) se distingue par une activité puissante, avec une EC₅₀ de 0,077 mg/ml. Elle exhibe une capacité de réduction du fer supérieure à celle du BHT et de l'acide ascorbique (EC₅₀ = 0,217 mg/ml ; EC₅₀ = 0,519 mg/ml, respectivement). Cette activité est directement corrélée avec le taux de polyphénols.

Mots Clés : *C. monogyna*, Composés phénoliques, Activité antioxydante.

Summary

This work focuses on the search for natural antioxidants and aims to conduct a phytochemical study while evaluating the antioxidant activity of various fruit extracts of *C.monogyna*.

The extraction of the plant material was carried out by maceration in distilled water and a water/acetone mixture (30:70, v/v) for 72 hours. Then a liquid-liquid extraction with ethyl acetate is performed. The extracts obtained are subjected to phytochemical analysis, a determination of phenolic compounds, as well as an evaluation of antioxidant power using two methods: DPPH and FRAP.

The phytochemical study of the fruit extracts of *C.monogyna* reveals the presence of polyphenols, flavonoids and tannins. The results of the total polyphenol, flavonoid and condensed tannin . assays indicate that the (water/acetone) extract is particularly rich in phenolic compounds (189.2 ± 15.66 mg GAE/gE; 36.9 ± 2.20 mg CEQ/gE; 18.446 ± 2.27 mg CEQ/gE respectively). On the other hand, the aqueous extract has a low content of these compounds compared to the hydroacetic extract (77.22 ± 12.22 mg GAE/gE; 1.4 ± 0.00 mg CEQ/gE; 0.91 ± 0.00 mg CEQ/gE respectively). The ethyl acetate phase, obtained by fractionation of the crude hydroacetic extract, is considered to be the richest extract in phenolic compounds (392.04 ± 18.14 mg GAE/gE ; $738 \pm 10,09$ mg CEQ/gE; $295,46 \pm 5,41$ mg CEQ/gE) among all the studied extracts.

The results of tests carried out *in vitro* on the antioxidant activity have demonstrated that the extracts of *C.monogyna* fruits have a significant capacity for reducing iron and trapping the DPPH• radical. In the DPPH method, the ethyl acetate phase of the crude extract (water/acetone) demonstrates an exceptionally powerful reduction capacity towards the DPPH radical, with an IC_{50} of 0.122 mg/ml. This capacity for reducing the free radical is clearly greater than that of BHA ($IC_{50} = 0.175$ mg/ml) and BHT ($IC_{50} = 0.542$ mg/ml). Subsequently, the crude extract (water/acetone) has an IC_{50} of 0.895 mg/ml. With regard to the FRAP method, the ethyl acetate phase of the crude extract (water/acetone) is distinguished by a powerful activity, with an EC_{50} of 0.077 mg/ml. It exhibits a greater iron reduction capacity than that of BHT and ascorbic acid ($EC_{50} = 0.217$ mg/ml; $EC_{50} = 0.519$ mg/ml respectively). This activity is directly correlated with the level of polyphenols.

Key Words: *C. monogyna* , phenolic compounds , antioxidant activity.

Introduction

Introduction

Le monde scientifique est actuellement fasciné par un concept émergent : le stress oxydant. Ce phénomène se caractérise par un déséquilibre entre les molécules pro-oxydantes et les molécules antioxydantes. Alors que les espèces réactives de l'oxygène jouent un rôle essentiel dans l'équilibre des cellules et la signalisation redox, leur production excessive peut entraîner des conséquences néfastes. En effet, un excès de production de molécules réactives de l'oxygène et de l'azote perturbe les mécanismes de défense de l'organisme, ce qui se traduit par un stress oxydatif (**Pisoschi et al., 2021**).

Les radicaux libres sont des molécules extrêmement réactives et instables qui se forment naturellement dans le corps en tant que produits dérivés du processus métabolique, notamment de l'oxydation. Lorsqu'ils sont produits en excès, ces radicaux libres peuvent causer des dommages aux macromolécules telles que les acides nucléiques, les protéines et les lipides. Cela conduit à des lésions tissulaires associées à diverses maladies chroniques et dégénératives (**Liu, 2022 ; Martemucci et al., 2022**).

Afin de minimiser les effets néfastes de l'oxydation, le corps est doté d'un système de défense antioxydant qui comprend à la fois des antioxydants d'origine enzymatique et non enzymatique. Les antioxydants enzymatiques comprennent superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase et non enzymatique comme la vitamine E, la vitamine C, les carotènes et les composés phénoliques (**Francenia Santos-Sánchez et al., 2019 ; Garcia et Blesso, 2021**).

Les antioxydants de synthèse sont souvent utilisés pour traiter le stress oxydant, mais ils peuvent entraîner des effets indésirables. C'est pourquoi les scientifiques se tournent vers le traitement par les plantes et qui consiste à utiliser des extraits végétaux contenant des principes actifs tels que les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins (**Iserin, 2001**).

L'aubépine (*Crataegus monogyna Jacq.*) occupe une place essentielle en tant que plante comestible et médicinale au sein de la famille des Rosacées. Des études scientifiques ont révélé les propriétés remarquables de capture des radicaux libres et d'antioxydation présentes dans le fruit de l'aubépine, grâce à la présence de composés phénoliques bioactifs tels que l'épicatéchine, l'hyperoside et l'acide chlorogénique. Ces composés sont reconnus pour leurs effets pharmacologiques bénéfiques, notamment en termes de protection neurologique, hépatique, cardiaque et rénale. De plus, le fruit de l'aubépine est renommé pour ses propriétés toniques sur le cœur (**Bahorun et al., 2003 ; Kirakosyan et al., 2003 ; Özcan et al., 2005 ; Barros et al., 2011**).

Introduction

L'objectif de notre travail est de mener une analyse phytochimique et d'évaluer l'activité antioxydante de différents extraits de fruits de *C. monogyna*.

Ce travail débute par une synthèse bibliographique qui comporte deux chapitres. Le premier chapitre aborde le concept de stress oxydant, les radicaux libres, les antioxydants, ainsi que les différentes méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante. Le deuxième chapitre présente des informations générales sur la plante étudiée, *C. monogyna*, en mettant l'accent sur sa composition chimique et ses effets pharmacologiques.

La deuxième partie, qui est la partie expérimentale, comprend le matériel et les méthodes utilisés pour l'analyse phytochimique des extraits de plante ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante par deux méthodes : le piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) et la réduction du fer par la méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Les résultats obtenus sont suivis d'une discussion, puis d'une conclusion finale de cette étude.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Stress oxydatif

1. Définition du stress oxydatif

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la capacité des cellules à les détoxifier ou à réparer les dommages qui en résultent, ce qui entraîne des dommages et des dysfonctionnements cellulaires (**Pizzino *et al.*, 2017**).

La balance entre les antioxydants et les prooxydants est généralement considérée comme équilibrée dans des conditions normales. Cependant, si cette balance est perturbée, que ce soit par une carence en antioxydants ou une surproduction importante de radicaux, cela peut causer un excès de ces derniers, qui est communément appelé « stress oxydatif » (**Favier, 2003**); (**Fig.n°1**).

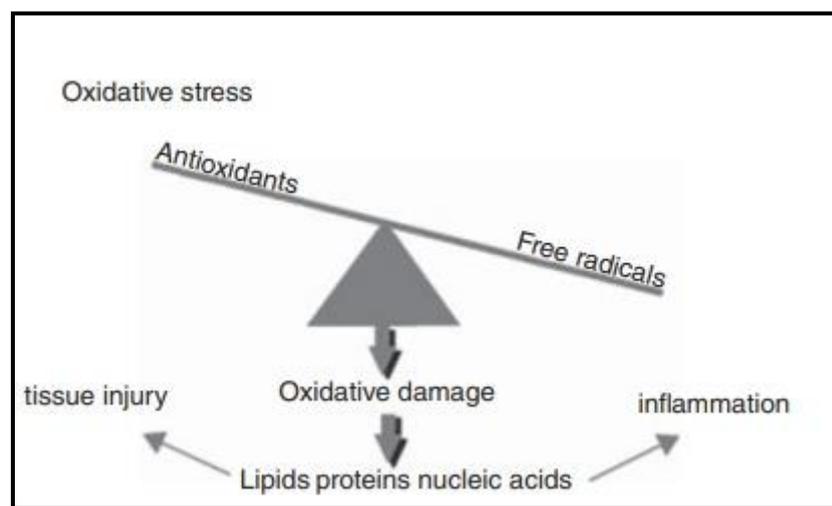


Figure n°1 : Une illustration de l'équilibre oxydant / antioxydant (**Ristovski *et al.*, 2012**).

2. Origine du stress oxydatif

Il résulte des processus métaboliques normaux de l'organisme, au cours desquels des espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont générées en tant que sous-produits de la respiration cellulaire. Ces ERO peuvent endommager les structures cellulaires telles que les lipides, les protéines et l'ADN, ce qui entraîne un stress oxydatif. Hormis les processus métaboliques naturels, des facteurs environnementaux tels que la pollution atmosphérique, la fumée de cigarette et le rayonnement UV peuvent également contribuer au stress oxydatif en générant des ERO supplémentaires dans l'organisme. Le stress oxydatif est donc un processus complexe qui peut être influencé par des facteurs endogènes et exogènes (**Taysi *et al.*, 2019**);(**Fig.n°2**).

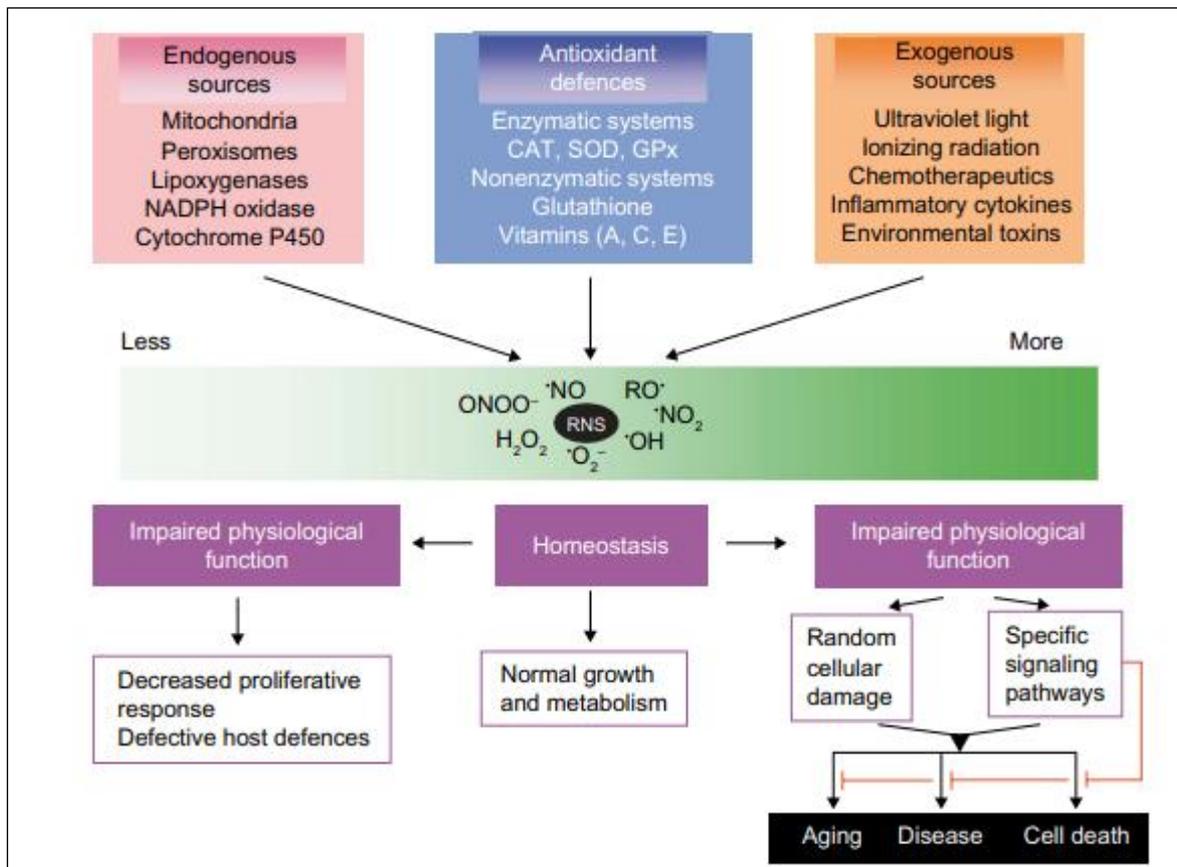


Figure n°2 : Origine extracellulaire et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène et d'azote et les éléments du système de défense (Domej *et al.*, 2014).

3. Les radicaux libres

3.1 Définition

Il peut être défini comme un atome ou une molécule contenant un ou plusieurs électrons non appariés dans la coquille de valence ou l'orbite externe et est capable d'une existence indépendante. Le nombre impair d'électrons d'un radical libre le rend instable, de courte durée et très réactif. En raison de leur grande réactivité, ils peuvent extraire des électrons d'autres composés pour atteindre la stabilité (Phaniendra *et al.*, 2015).

3.2 Types de radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être divisés en espèces réactives de l'oxygène (ERO) comme l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle (OH^\bullet), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et des espèces réactives de l'azote (ERN) tels que le monoxyde d'azote (NO^\bullet) et le peroxydinitrite (ONOO^-) (Szabo, 2003 ; Halliwell et Whiteman, 2004).

3.2.1 Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

- **L'anion superoxyde ($\cdot\text{O}_2^-$)** : est le plus important des ERO répandus. ERO formés par le processus enzymatique, l'auto-oxydation et par une réaction non enzymatique de transfert d'électrons dans lesquelles un électron est transféré à l'oxygène moléculaire (Phaniendra *et al.*, 2015).
- **Le radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$)** : est la forme neutre de l'ion hydroxyde et c'est un radical libre très actif qui peut réagir fortement avec les molécules organiques et inorganiques, y compris l'ADN, les protéines, les lipides et les hydrates de carbone, et causer de graves altérations aux cellules, plus que tout autre ERO (Phaniendra *et al.*, 2015).
- **Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2** : est formé *in vivo* dans une réaction de dismutation catalysée par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) Ce n'est pas un radical libre mais il peut endommager la cellule à une concentration relativement faible ($10\ \mu\text{M}$) et d'une façon indirecte par la production d'un radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$) en présence d'ions de métaux de transition (Phaniendra *et al.*, 2015).
- **L'oxygène singulet (O_2)** : Il s'agit d'un état électronique hautement excité et métastable de l'oxygène moléculaire avec une toxicité élevée. il est formé *in vivo* par l'activation des neutrophiles et des éosinophiles et de certaines réactions enzymatiques (Phaniendra *et al.*, 2015).

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

Tableau n°1: Différentes espèces réactives de l'oxygène (Preiser, 2012).

Formes non Radicalaires		Radicaux Libres	
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	Radical superoxyde	$\text{O}_2\cdot$
Singlet oxygen	1O_2	Radical peroxyde lipidique	$\text{LOO}\cdot$
Acide hypochlorique	HOCl	Radical hydroxyle	$\cdot\text{OH}$
Ozone	O_3	Péroxynitrite	ONOO^-
Radical d'oxyde nitrique	$\text{NO}\cdot$		

La figure n°3 représente le mécanisme de production des espèces réactives d'oxygène.

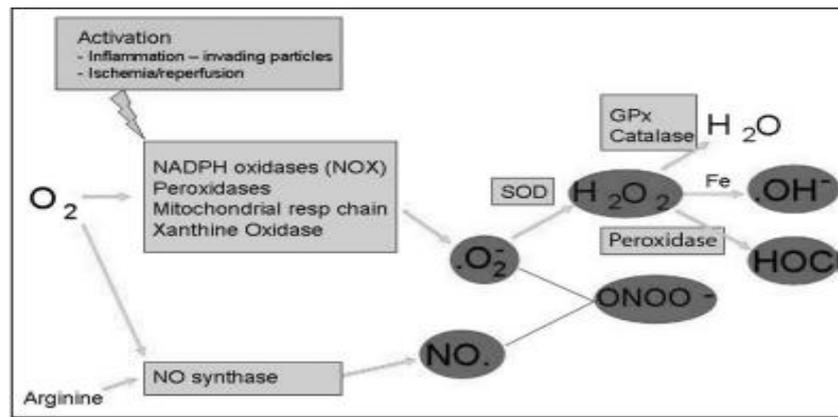


Figure n°3 : Description schématique des mécanismes de production des espèces réactives d'oxygène (ERO)(Preiser, 2012).

3.2.2 Les espèces réactives d'azote (ERN)

a. Le monoxyde d'azote (NO) : Le monoxyde d'azote (NO) est un radical libre inorganique produit à partir de l'arginine par des synthèses d'oxyde nitrique (NOS). Dans les systèmes biologiques, le NO[•] peut réagir selon trois voies principales. Premièrement, le NO[•] traverse la membrane cellulaire par simple diffusion et réagit avec les constituants cellulaires. Deuxièmement, il subit une auto-oxydation en se combinant avec du dioxyde d'azote pour former du N₂O₃. Enfin, le NO[•] réagit rapidement avec l'oxygène pour former ONOO[•], qui peut être cytotoxique par lui-même ou se décomposer facilement en un composé hautement réactif et toxique, l'OH⁻ et le NO₂ (Taysi *et al.*, 2019).

b. L'anion peroxydite (ONOO⁻) : peroxydite (ONOO⁻) est formé par la réaction de l'oxyde nitrique et de l'anion superoxyde. Il diffuse facilement à travers les membranes cellulaires C'est un agent d'oxydation qui endommage les tissus et oxyde L'ADN et les lipoprotéines de faible densité (LDL) ; il semble être produit aux sites d'inflammation (Martemucci *et al.*, 2022).

4. Les conséquences du stress oxydant

Le stress oxydant est causé par une production excessive de radicaux libres dans le corps. Ces derniers sont des molécules instables qui peuvent réagir avec d'autres molécules et causer des dommages oxydatifs aux molécules biologiques comme l'ADN, les protéines, les lipides et les glucides. Ces dommages peuvent entraîner des lésions cellulaires et des mutations qui peuvent causer diverses maladies. Les métabolites cytotoxiques et mutagènes qui sont libérés lors de l'oxydation des lipides peuvent également causer des dommages secondaires.

L'organisme peut réagir à ces composés anormaux en produisant des anticorps, mais malheureusement, ces anticorps peuvent également être des auto-anticorps qui attaquent les cellules saines de l'organisme, créant ainsi une troisième vague d'attaque chimique. En somme, le stress oxydant peut avoir des conséquences graves sur la santé et est impliqué dans le développement de nombreuses maladies chroniques (**Favier, 2003**).

5. Le système de défense antioxydant

Les radicaux libres peuvent être neutralisés de diverses manières, notamment grâce à l'action des antioxydants. Ces derniers jouent un rôle crucial dans ce processus, en participant à la collecte, au don, à la décomposition, à l'extinction, à l'inhibition, à la synergie et à la chélation. Dans l'organisme humain, il existe deux types d'antioxydants : les enzymatiques et les non enzymatiques, qui agissent de manière complémentaire pour détoxifier les ERO (**Lobo et al., 2010**).

5.1 Définition des antioxydants

Les antioxydants sont des substances qui ont la capacité de neutraliser les radicaux libres, des molécules hautement réactives qui peuvent endommager les membranes cellulaires, l'ADN et d'autres structures cellulaires. Les antioxydants préviennent ou ralentissent les dommages oxydatifs sur les cellules, réduisant ainsi le risque de maladies chroniques telles que le cancer, les maladies cardiaques et les troubles neurodégénératifs. Les sources naturelles d'antioxydants comprennent les fruits, les légumes et les noix, tandis que les antioxydants peuvent également être synthétisés dans le corps ou en laboratoire (**Lobo et al., 2010**).

5.2 Les différents types des antioxydants

Il est possible de classifier les antioxydants en deux grandes catégories, à savoir les enzymatiques (endogènes) et les non-enzymatiques (exogènes).

5.2.1 Les antioxydants endogènes enzymatiques

- **Le superoxyde dismutase (SOD)**

Le processus de dismutation, catalysé par les enzymes du superoxyde dismutase, est essentiel dans la conversion de l'anion superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène. Ces enzymes éliminent efficacement l'O₂⁻. Dans le cas où la superoxyde dismutase est absente, la réaction peut se produire mais à une vitesse beaucoup plus lente et sans l'aide d'une enzyme (**Kabel, 2014**);(**Réaction 1**).



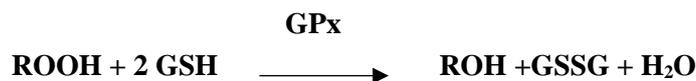
- **La catalase (CAT)**

L'enzyme antioxydante CAT est présente dans la plupart des tissus vivants qui utilisent l'oxygène. Elle utilise soit le fer, soit le manganèse comme cofacteur et permet de catalyser la dégradation ou la réduction du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène moléculaire, ce qui complète le processus de détoxification initié par la SOD (**Ighodaro et Akinloye, 2018**);(Réaction 2).



- **La glutathion peroxydase (GPx)**

La glutathion peroxydase (GPx) est une sélénoenzyme contenant de la sélénocystéine dans leurs sites actifs. La GPx est une enzyme antioxydante qui catalyse la réduction de l'hydroperoxyde à l'aide d'un cofacteur de thiol (**Bhabak et Mugesh, 2010**);(Réaction 3).



5.2.2 Les antioxydants exogènes non enzymatique

Les antioxydants provenant de sources exogènes, telles que les fruits et les légumes, jouent toujours un rôle complémentaire dans l'activité naturelle de défense antioxydante du corps. Des antioxydants tels que la vitamine C et la vitamine E, les caroténoïdes et divers composés phénoliques sont considérés comme les principaux antioxydants exogènes (**Pisoschi & Pop, 2015**).

a. Tocophérol ou Vitamine E

Est une vitamine endogène liposoluble avec une puissante capacité antioxydante. Elle est constituée de huit stéréoisomères, α , β , γ , δ tocophérol et α , β , γ , δ tocotriénol, qui sont des composés chiraux. Chez les humains, l' α -tocophérol est le stéréoisomère le plus actif, offrant une protection efficace contre les dommages causés par les radicaux libres aux membranes cellulaires. La fonction antioxydante de la vitamine E est principalement associée à la prévention de la peroxydation lipidique (**Sailaja Rao et al., 2011**);(Fig.n°4).

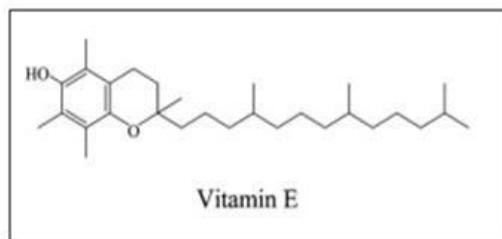


Figure n°4 : Structure de la vitamine E (Pisoschi et Pop, 2015).

b. Acide ascorbique ou vitamine C

Est un antioxydant présent dans les plantes et les animaux. Étant donné qu'elle ne peut être synthétisée par l'organisme humain et doit être apportée par l'alimentation. Dans les cellules, la vitamine C est maintenue sous sa forme réduite grâce à une réaction avec le glutathion, catalysée par des protéines comme la protéine disulfure isomérase et la glutaredoxine. Elle agit en tant qu'agent réducteur, permettant ainsi de neutraliser les radicaux libres, tels que le peroxyde d'hydrogène (Lobo *et al.*, 2010);(Fig.n°5).

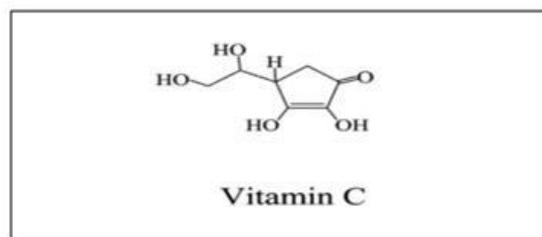


Figure n°5 : Structure de la vitamine C (Pisoschi et Pop, 2015).

c. β - carotène ou vitamine A

Il aide à prévenir la peroxydation lipidique en neutralisant les espèces réactives de l'oxygène. Il agit également en tant qu'éteigneur de molécules électroniquement excitées telles que l'oxygène singulet, et sert d'antioxydant dans les tissus et le plasma. Contrairement aux vitamines E et C, le bêta-carotène agit en tant qu'antioxydant en éliminant les radicaux peroxydes lipidiques plutôt qu'en donnant des atomes d'hydrogène (Tsuchihashi *et al.*, 1995 ; Bandyopadhyay *et al.*, 2004).

d. Les polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents dans les plantes. Les acides phénoliques, les alcools phénoliques, les flavonoïdes, les lignanes et les stilbènes sont les types de polyphénols les plus répandus dans le règne végétal. Grâce à la variété de leurs structures chimiques, ces substances sont considérées comme des antioxydants plus efficaces que les autres types (Anand *et al.*, 2022).

- **Les acides phénoliques**

Les acides phénoliques se subdivisent en deux sous-classes : les dérivés de l'acide benzoïque, également connus sous le nom d'acides hydroxybenzoïques, tels que l'acide protocatéchique et l'acide gallique, ainsi que les dérivés de l'acide cinnamique ou les hydroxycinnamiques, qui englobent l'acide caféique, l'acide coumarique, la curcumine et l'acide férulique (Mitra *et al.*, 2022);(Fig.n°6).

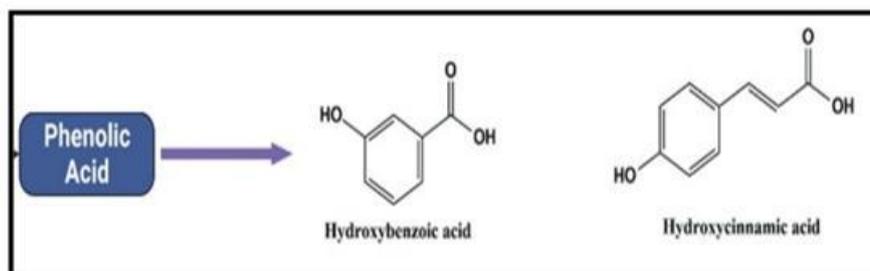


Figure n°6 : Structures chimiques des acides phénoliques (Mitra *et al.*, 2022).

- **Les flavonoïdes**

Les fruits, légumes, boissons et grains sont des sources riches en flavonoïdes. Ces composés sont reconnus pour leurs propriétés bénéfiques pour la santé en tant qu'antioxydants puissants, capables de donner des hydrogènes et de neutraliser les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Les flavonoïdes sont classés en fonction du niveau d'oxydation de leur cycle central C, qui définit les différentes familles telles que l'anthocyanidine, le flavone ou le flavonol (3-hydroxyflavone), le flavanone et les oligomères de proanthocyanidines des flavan-3-ols monomériques. Dans leur forme alimentaire naturelle, la plupart des flavonoïdes sont glycosylés, à l'exception des catéchines (Rice-Evans, 2001);(Fig.n°7).

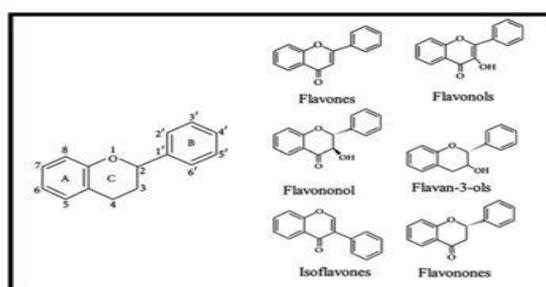


Figure n°7: Structure basique des flavonoïdes (aglycone) et ses classes chimiques (Kumar et Pandey, 2013).

- **Les tanins**

Les tanins sont une classe de biomolécules polyphénoliques présentes dans la plupart des plantes. Les principales classes de tanins sont les tanins hydrolysables, les tanins condensés et les phlorotannins (Fabbrini *et al.*, 2022).

- **Les tanins hydrolysables:** sont composés d'esters d'acides phénoliques et d'un polyol, comme le glucose, qui incluent les gallotannins et les ellagitanins (Farha *et al.*, 2020);(Fig.n°8).
- **Les tanins condensés:** sont principalement composés de catéchines conjuguées à des échafaudages d'aglycone d'anthocyanidine, ce qui explique leur nom alternatif de proanthocyanidines (Fabbrini *et al.*, 2022).
- **Les phlorotannins:** sont constitués d'oligomères de phloroglucinol, un composé qui est principalement synthétisé dans les algues (Fabbrini *et al.*, 2022).

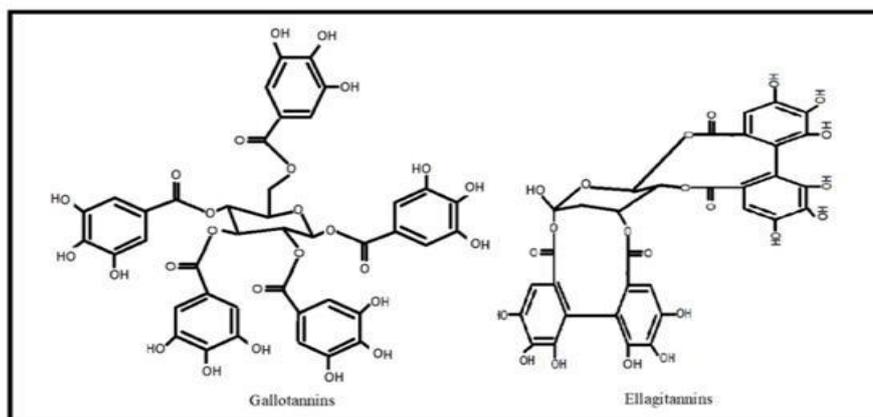


Figure n°8: Structure des tanins hydrolysables (Anand *et al.*, 2022).

- **Les stilbenes**

Les stilbènes sont des allélochimiques polyphénoliques synthétisés par les plantes, notamment les raisins, les arachides, les baies, etc., pour se défendre dans des conditions stressantes. Ils sont maintenant exploités en médecine pour leurs propriétés antioxydantes, anti-prolifératives et anti-inflammatoires (Al-Khayri *et al.*, 2023).

- **Lignanes**

Sont des substances diphenoliques contenant une structure de 2,3-dibenzylbutane qui se forme à partir de la dimerisation de deux résidus d'acide cinnamique. Certains lignanes, tels que le secoisolariciresinol, ont des propriétés phytoestrogéniques. La graine de lin est la source alimentaire la plus abondante en lignanes, notamment en secoisolariciresinol (jusqu'à 3,7 g/kg de poids sec), ainsi qu'en faibles quantités de matairesinol (Pandey et Rizvi, 2009);(Fig.n°9).

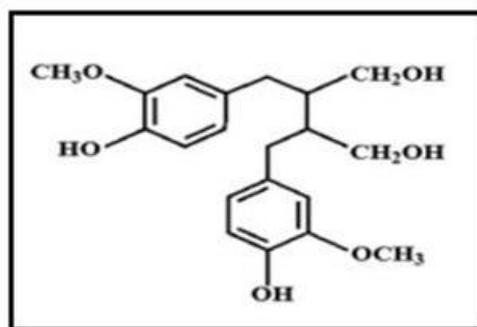


Figure n°9: Structure chimique du lignane (Pandey et Rizvi, 2009).

e. Antioxydants phénoliques synthétiques (SPA)

Ils constituent une famille d'antioxydants hautement efficaces, lipophiles et largement utilisés dans de nombreux types d'aliments. Comparés aux antioxydants naturels tels que les tocophérols produits par les plantes et les animaux, Les principaux SPA sont le butylhydroxyanisole (BHA), le dibutylhydroxytoluène (BHT) et le tert-butylhydroquinone (TBHQ). En général, leur structure chimique est caractérisée par un cycle phénolique qui est souvent substitué en position ortho par un groupe alkyle encombrant. Cette particularité leur confère la désignation d'antioxydants phénoliques entravés (Zhang *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2021);(Fig. n°10).

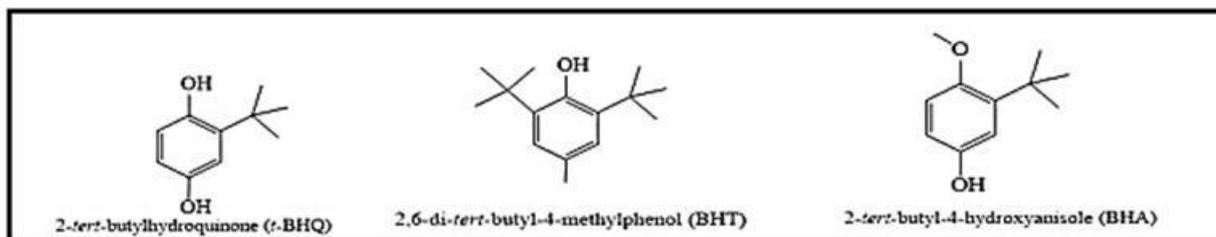


Figure n°10: Structures des principaux antioxydants phénoliques (Nagarajan *et al.*, 2020).

6. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

Plusieurs méthodes sont disponibles pour simplifier la mesure de l'activité antioxydante d'une substance ou d'un extrait *in vitro*.

6.1 Test ABTS (acide 2,2-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

Cette méthode était à l'origine basée sur la production du cation radical ABTS par l'activation de la metmyoglobine avec du peroxyde d'hydrogène en présence d'ABTS [acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)], avec ou sans antioxydants. Ensuite, les antioxydants captent les radicaux ABTS⁺ [acide 2,2-azino-bis(éthylbenzène-thiazoline-

6-sulfonique)], ce qui entraîne une diminution de l'absorbance détectée par la combinaison antioxydante avec les radicaux à différents moments (Vuolo *et al.*, 2019);(Fig.n°11).

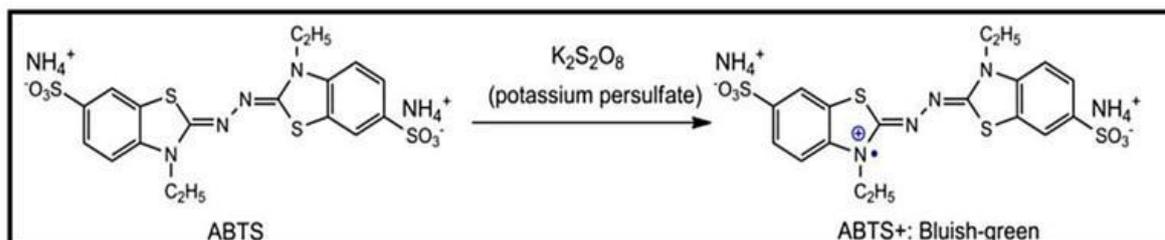


Figure n°11: Formation de radicaux ABTS stables à partir d'ABTS avec du persulfate de potassium (Shi *et al.*, 2022).

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

Le test de neutralisation DPPH• est basé sur le don d'électrons provenant des antioxydants afin de neutraliser le radical DPPH•. La réaction est accompagnée d'un changement de couleur du DPPH• mesuré à 517 nm, et la décoloration agit comme un indicateur de l'activité antioxydante (Munteanu et Apetrei, 2021);(Fig.n°12).

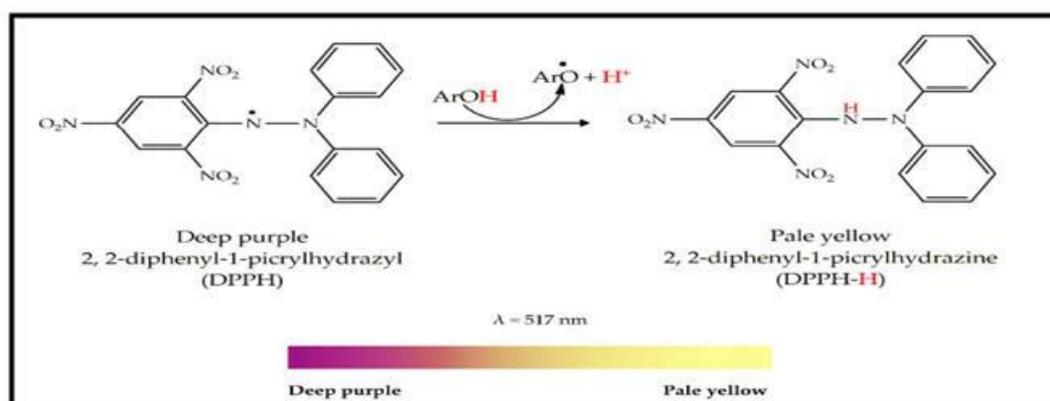


Figure n°12: Mécanisme de récupération du DPPH• par un antioxydant (AH) (Munteanu et Apetrei, 2021).

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

Le test FRAP repose sur le principe selon lequel les substances ayant un potentiel de réduction réagissent avec le ferricyanure de potassium (Fe^{3+}) pour former du ferrocyanure de potassium (Fe^{2+}). Ce dernier réagit ensuite avec le chlorure ferrique pour former un complexe ferrique-ferreux qui présente une absorption maximale à 700 nm (Aye *et al.*, 2018);(Fig. n°13).

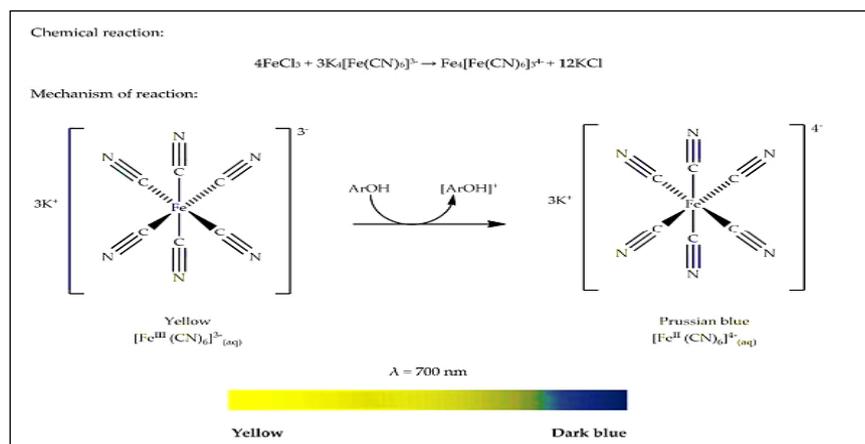


Figure n°13: Mécanisme de réaction du ferricyanure de potassium (Bibi Sadeer *et al.*, 2020).

6.4 Test de blanchissement du bêta-carotène

Cette méthode est basée sur le principe que l'acide linoléique, un acide gras insaturé, est oxydé par des espèces réactives de l'oxygène produites par l'eau oxygénée (H_2O_2). Cette oxydation de l'acide linoléique génère des produits qui vont ensuite initier l'oxydation du bêta-carotène, ce qui provoque une décoloration. La diminution de cette décoloration, mesurée à 434 nm, est utilisée pour quantifier l'activité des antioxydants (Alam *et al.*, 2013).

6.5 Test ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity

Cette méthode est basée sur l'inhibition de l'oxydation de la sonde causée par les radicaux peroxy. Ces derniers sont formés suite à la décomposition thermique de composés azoïques, notamment le dihydrochlorure de 2,2-azobis (2-amidino-propane) (AAPH). Lorsque les antioxydants réagissent avec les radicaux peroxy, la décomposition de la sonde fluorescente est ralentie dans le mélange réactionnel (Kupaeva et Kotenkova, 2021).

6.6 Méthode de TRAP (Total radical-trapping antioxidant parameter)

Elle repose sur la capacité des antioxydants à inhiber la réaction entre les radicaux peroxy et une molécule cible. Initialement, cette dernière représente la consommation d'oxygène (en tant qu'échantillon) dans le processus de peroxydation déclenché par la décomposition thermique du dihydrochlorure de 2,20-azobis (2-amidinopropane)(ABAP). La période d'induction, correspondant au temps de retard de l'absorption d'oxygène, peut être mesurée quantitativement et utilisée pour exprimer la capacité totale d'antioxydation des échantillons sous forme de valeur TRAP (Munteanu et Apetrei, 2021).

6.7 Test CUPRAC (CuPric Reducing Antioxidant Capacity)

La méthode CUPRAC repose sur la mesure de l'absorbance du chélate Cu(I)-néocuproïne (Nc) formé suite à la réaction d'oxydo-réduction des antioxydants protecteurs de chaîne avec le réactif CUPRAC, Cu(II)-Nc, où l'absorbance est enregistrée à la longueur d'onde d'absorption maximale de la lumière de 450 nm (**Özyürek *et al.*, 2011**).

6.8 Capacité de chélation du métal

En général, la capacité de chélation des métaux est déterminée en mesurant l'effet chélatant des antioxydants pour l'ion ferreux. Le sulfate ferreux et la ferrozine sont les sources d'ion ferreux les plus couramment utilisées. Une perte d'absorbance à 485 nm (pour le sulfate ferreux) ou 562 nm (pour la ferrozine) après l'ajout d'antioxydants représente la formation d'un complexe métal-antioxydant, et la capacité de chélation des métaux de l'antioxydant ajouté peut être quantifiée par spectrophotométrie (**Shahidi et Zhong, 2015**).

Synthèse bibliographique

Chapitre 2 : La plante d'étude

1. Généralité

Ces derniers temps, les plantes médicinales, ont suscité un intérêt croissant à l'échelle mondiale en raison de la demande croissante pour des remèdes naturels et durables compatibles avec l'environnement pour traiter les troubles pathologiques ayant des effets bénéfiques sur la santé. Ces plantes peuvent compléter ou remplacer la thérapie pharmacologique conventionnelle. Les produits à base de plantes sont recherchés pour leur sécurité, leur efficacité accrue, leur biodisponibilité et leur coût inférieur par rapport aux médicaments synthétiques disponibles sur le marché.

Parmi ces herbes populaires, l'aubépine, qui appartient à la famille des Rosacées et compte environ 280 espèces présentes en Europe, en Afrique du Nord, en Asie de l'Ouest et en Amérique du Nord (Nazhand *et al.*, 2020).

2. Définition et répartition

L'aubépine (*Crataegus monogyna Jacq*) est un arbre fruitier sauvage comestible appartenant au genre *Crataegus*, l'un des genres les plus intéressants de la famille des Rosacée, connu sous le nom de "fruit nutritif" en raison de sa richesse en substances bioactives. Les préparations dérivées de l'aubépine sont utilisées dans la formulation de compléments alimentaires, d'aliments fonctionnels et de produits pharmaceutiques (Yusuf et Meriçli, 2016 ; Martinelli *et al.*, 2021 ; Zhang *et al.*, 2022).

C. monogyna Jacq est une espèce végétale très répandue dans le monde, couvrant une vaste zone comprenant toute l'Europe, l'Afrique du Nord et l'Asie occidentale jusqu'à l'Inde. En France, elle est présente dans tout le pays, mais surtout dans la région du Midi (sud de la France) (Aymonin, 1993 ; Brosse, 2000 ; Koyuncu *et al.*, 2007).

En Algérie, elle est commune dans les forêts et les maquis de l'Atlas Tallien, mais peut être confondue avec d'autres espèces (Farhat, 2007).

3. Description botanique

Il s'agit d'un arbuste épineux touffu ou d'un petit arbre pouvant atteindre une hauteur de 8 mètres. Son écorce commence par être lisse et gris pâle, avant de devenir brune et écailleuse. Les feuilles, d'un vert brillant, sont caduques et sont profondément divisées en 3 à 5 lobes aigus et écartés. Les fleurs, très abondantes en mai ont une couleur blanche avec une odeur vive plutôt désagréable. Les fruits, sont de forme ovoïde, et possèdent une chair farineuse et douceâtre de couleur rouge clair, renfermant une seule graine lisse et luisante. Les cenelles prennent une couleur rouge sombre à maturité, généralement en septembre (Bruneton, 1993 ; Chevalier et Crouzet-Segarra, 2004 ; Schauenberg et Paris, 2016);(Fig.n°14).



Figure n°14:Fruit, fleurs et feuilles de *C. monogyna jacq.*

(<https://www.herbsencyclopedia.info>)

4. Classification botanique

La classification Botanique de l'Aubépine Monogyne selon **Messaili (1995)** est comme suit :

- **Embranchement** : Spermaphytes.
- **Sous-embranchement**:Angiospermes.
- **Classe** : Dicotylédones.
- **Sous-classe** : Dialypétales.
- **Série** : Calciflores.
- **Ordre** : Rosales.
- **Famille** : Rosacées.
- **Tribu** : Rosacées spontanées.
- **Genre** : Crataegus.
- **Espèce** : *Crataegus Monogyna Jacq.*

5. Appellations

L'aubépine tire son origine du mot grec Kratos, qui signifie la dureté du bois. Elle englobe toutes les espèces végétales du genre *Crataegus* et est connue sous différents noms dans tous les pays du monde, parfois même dans la même région (Verma *et al.*, 2007);(Tabl.n°2).

Tableau n°2:Noms vernaculaires de l'Aubépine.

Langues	Noms
Français	Epine blanche, Epine de mai, Valériane du cœur, Cenellier, Poire d'oiseau (Fabre <i>et al.</i> ,1992).
Berbère	Idhmim, Atelmen, Zaarour (Lucienne, 2013).
Arabe	Zaarour, Berri, Admam, Boumekhri, Baba aajina (Djerroumi, 2004).
English	Hawthorn, Quick thorn (Zhang, 2002).
Indian	Vansaangli (Kashyap <i>et al.</i> , 2012).

6. Utilisation traditionnelle

Au Mexique, les espèces de *Crataegus* ont traditionnellement été utilisées pour traiter les problèmes respiratoires, y compris la toux, la grippe, la bronchite et l'asthme (Arrieta *et al.*, 2010). En médecine traditionnelle chinoise, les fruits d'aubépine sont principalement utilisés pour améliorer la circulation sanguine, éliminer la stase sanguine et traiter les problèmes de digestion, la diarrhée, les douleurs abdominales, l'hyperlipidémie et l'hypertension (Hobbs et Foster, 1990 ; Chang *et al.*, 2002; Barceloux, 2008).

En Europe, les fruits, les feuilles et les fleurs étaient traditionnellement utilisés dans le traitement des problèmes cardiaques en raison de leurs effets antispasmodiques, cardiotoniques, hypotensifs et anti-athérosclérotiques (Chang *et al.*, 2002).

L'aubépine était utilisée à des fins similaires en Amérique du Nord, bien que ce remède soit devenu populaire en Europe avant d'être introduit en Amérique du Nord. En Europe et en Chine, Le fruit de l'aubépine est également utilisé pour fabriquer des produits commerciaux tels que du vin, de la confiture et des bonbons (Chang *et al.*, 2002).

Une décoction de feuilles et de fruits de *Crataegus* est employée dans le système traditionnel de la médecine Arabe pour traiter les maladies cardio-vasculaires, le cancer, le diabète et la faiblesse sexuelle (Kumar *et al.*,2012).

7. Composition chimique

7.1 Composition en métabolites primaires

La partie comestible de *C. monogyna* contient différents métabolites primaires, tels que les protéines, les lipides et les minéraux. Ces constituants chimiques et leurs teneurs sont répertoriés dans le tableau n°3.

Tableau n°3: Constituants chimiques de la partie comestible du *C. monogyna* (Herrara, 1984).

Fraction		Teneur (g/100g de matière sèche)
Protéines		2,5
Lipides		2,3
Eléments minéraux	K	1,25
	Ca	0,44
	Mn	0,33
	Mg	0,06
	P	0,05

7.2 Composition en métabolites secondaires

Les métabolites secondaires extraits des différentes parties de la plante varient des simples acides gras aux composés terpénoïdes et polyphénoliques. De nombreux polyphénols ont été détectés dans *C. monogyna*. Plusieurs composés possèdent des propriétés antioxydantes, tels que l'acide chlorogénique, l'épicatéchine, l'hyperoside, la quercétine, la rutine, la vitexine et les procyanidines. Les flavonoïdes, en particulier les flavonols et les flavones, sont généralement abondants dans les boutons floraux, tandis que les proanthocyanidines se trouvent en plus grande quantité dans les fruits non mûrs (Zhang *et al.*, 2001 ; Sokól-Łętowska *et al.*, 2007 ; Rodrigues *et al.*, 2012 ; Simirgiotis, 2013) .

Dans le cas de l'aubépine, des analyses par électrophorèse capillaire, chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et spectrophotométrie ont révélé que les feuilles prélevées sur les branches supérieures des arbres présentaient le niveau le plus élevé de flavonoïdes tels que la rutine, la vitexine, la vitexine-211-O-rhamnoside et l'hyperoside . En plus des agents antioxydants à base de polyphénols, d'autres composés ont été identifiés, qui contribuent à la valeur nutritionnelle et aux propriétés médicinales de la plante. Par exemple, les fleurs renferment des niveaux élevés de tocophérols et d'acide ascorbique, ainsi qu'un bon rapport entre les acides

gras n-6/n-3, comparé aux fruits mûrs. Les fruits non mûrs, quant à eux, contiennent généralement le plus haut niveau d'acides gras polyinsaturés (Urbonavičiūtė *et al.*, 2006).

Les principales classes chimiques d'importance biologique de *C. monogyna* sont données par la suite :

a. Les flavonoïdes

C. monogyna est riche en composés phénoliques, en particulier en flavonoïdes. Les principales classes de flavonoïdes présentes dans *Crataegus monogyna* sont les flavones, les flavonols (quercétine), les flavanols (catéchine) et les anthocyanidines (Habtemariam, 1997); (Fig. n°15).

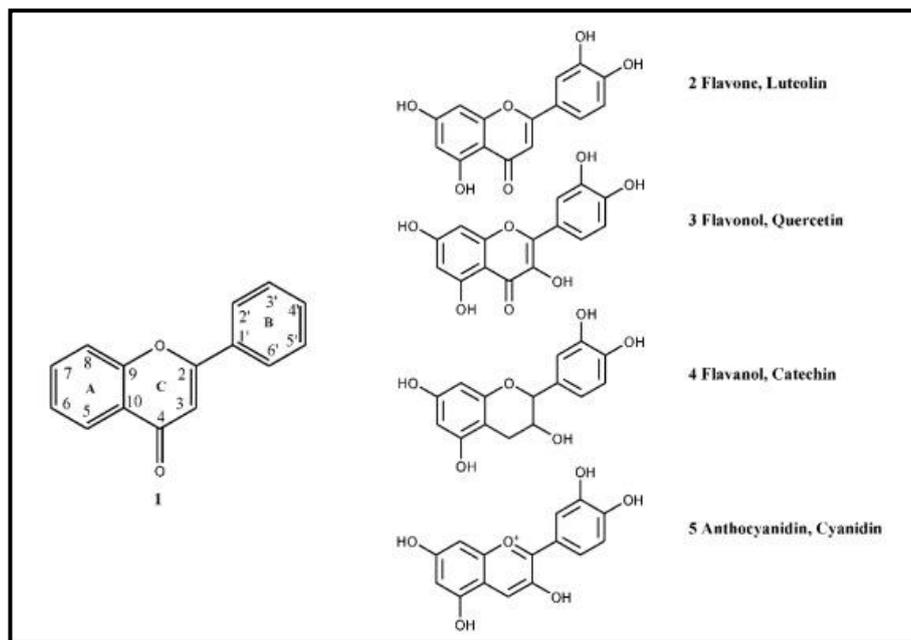


Figure n°15: Les classes de flavonoïdes de *C. monogyna* (Habtemariam, 1997).

b. Flavan-3-ols

Les flavan-3-ols représentent la sous-classe la plus complexe des flavonoïdes, englobant à la fois des monomères simples tels que la catéchine et son isomère, l'épicatéchine, ainsi que des oligomères allant des dimères jusqu'aux décamères. *C. monogyna* est reconnue comme une plante abondante en flavan-3-ols (Mena *et al.*, 2014); (Fig. n°16).

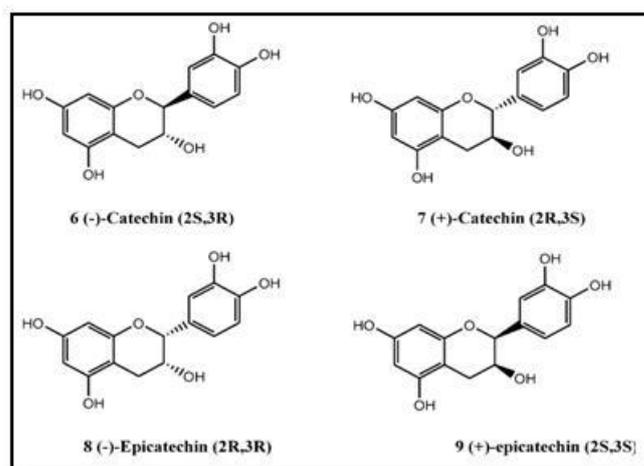


Figure n°16: Les composés flavane-3-ol catéchine de *C. monogyna* (Nabavi *et al.*, 2015).

c. Procyanidines

Les catéchines et les épicatechines subissent fréquemment des réactions d'oxydation dans les plantes, donnant ainsi naissance à des dimères, trimères et structures oligomériques appelées procyanidines. Ces macromolécules représentent de bons exemples des proanthocyanidines, également connues sous le nom de tanins condensés, formées par la condensation des flavanes (Rohr *et al.*, 1999);(Fig.n°17).

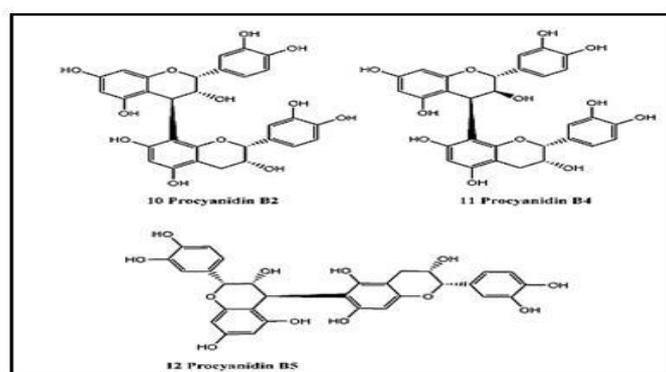


Figure n°17: Les procyanidines isolées à partir de différentes parties de *C. monogyna* (Nabavi *et al.*, 2015).

d. Flavones et flavonols

Dans *C. monogyna*, plusieurs composés flavones et flavonols contenant une fraction catécholique au niveau du cycle B ont été isolés. La quercétine-3-O-glucoside (hyperoside), un flavonol glucoside, a été isolée à partir des cultures de callus de la plante. L'hyperoside a également été reconnu comme l'un des principaux constituants des fleurs. En plus de cette substance, un dérivé rare de flavone C-glycosylé, lié au glucose et au rhamnose, a été isolé des feuilles (Nikolov *et al.*, 1981);(Fig.n°18).

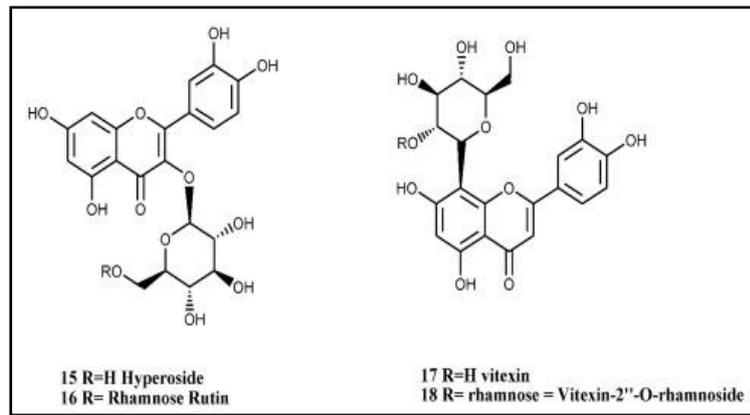


Figure n°18: Flavonols isolés avec une fraction catécholique au cycle-B
(Nabavi *et al.*, 2015).

e. Anthocyanine

Se trouvent principalement dans les fleurs, où ils sont responsables de leur couleur caractéristique. la cyanidine-3-O-galactoside a été identifiée comme le pigment floral de *C. monogyna* (Nabavi *et al.*, 2015);(Fig.n°19).

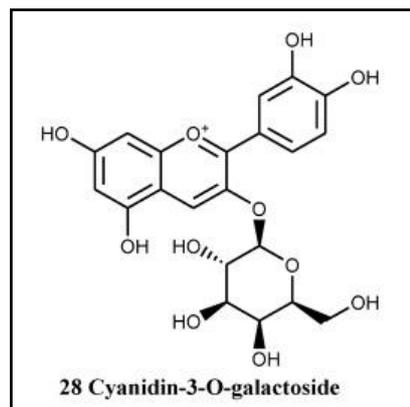


Figure n°19: Pigment floral de *C. monogyna* (Froehlicher *et al.*, 2009).

f. Acide chlorogénique

Les fleurs de *C. monogyna* contiennent principalement de l'acide chlorogénique et de ses isomères. Une étude de la composition florale, basée sur l'analyse HPLC, a mis en évidence la présence d'autres acides caféoylquiniques, incluant des dérivés 3- et 4-O-caféoyl (Barros *et al.*, 2012);(Fig.n°20).

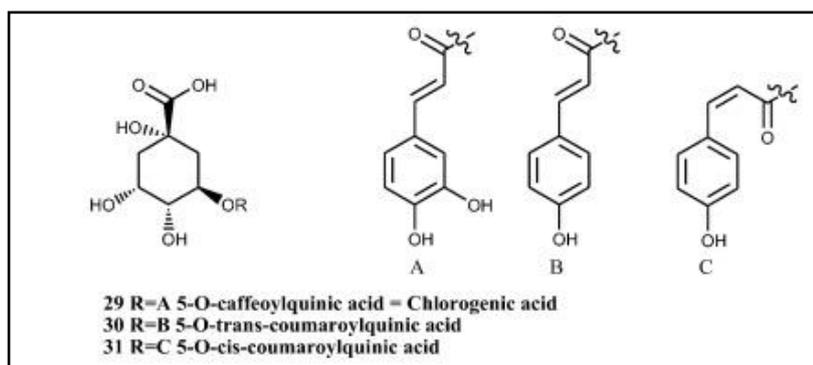


Figure n°20 : L'acide chlorogénique et ses isomères de fleurs *C.monogyna* (Nabavi *et al.*, 2015).

g. Triterpènes

Les triterpènes identifiés dans *C. monogyna* sont l'acide bétulinique, l'acide oléanolique et l'acide ursolique (Caligiani *et al.*, 2013);(Fig.n°21).

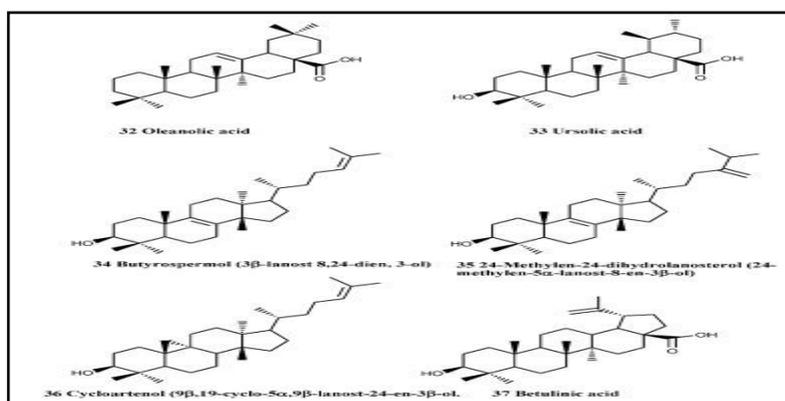


Figure n°21:Triterpènes isolés à partir des parties aériennes de *C. monogyna* (Caligiani *et al.*, 2013).

8. Propriétés thérapeutiques

C. monogyna occupe une place prépondérante parmi les plantes comestibles de la famille des Rosacées, tout en étant largement utilisée en médecine traditionnelle. Cette plante présente une variété d'activités physiologiques et pharmacologiques intéressantes, attribuées à la présence de divers composés naturels bioactifs, notamment les composés phénoliques. De plus, des preuves scientifiques suggèrent que l'aubépine présente une toxicité négligeable (Bahorun *et al.*, 2003).

Cette plante offre une multitude d'activités biologiques, jouant le rôle d'agent antioxydant pour neutraliser les radicaux libres, améliorant ainsi le métabolisme des lipides et renforçant l'immunité grâce à ses propriétés anti-inflammatoires. De plus, elle est réputée pour son action

contre le diabète et le cancer, et présente une propriété spécifique en tant qu'agent cardiotonique (Li *et al.*, 2022).

Selon Bahorun (1997), *C. monogyna* est une plante populaire en phytothérapie, reconnue pour ses bienfaits sédatifs, vasculoprotecteurs et antioxydants, et est également répertoriée dans la pharmacopée française.

Le tableau n°4 répertorie les différentes activités biologiques découvertes dans les différentes parties de l'aubépine.

Tableau n°4: Activités biologiques associées aux différentes parties de *C. monogyna*.

Activité biologique	Extrait	Référence
Activité antioxydante	Ethanolique (fruit ; feuille) IC ₅₀ =78,66 µg/ml ; IC ₅₀ = 33,19 µg/ml acétate d'éthyle (fruit ; feuille) (IC ₅₀ =51,21 µg/ml ; IC ₅₀ = 5,53 µg/ml) Chloroforme (fruit ; feuille) (IC ₅₀ =293,51 µg/ml ; IC ₅₀ =197,85 µg/ml) Méthanolique (fleur, IC ₅₀ =29,8 µg/ml) Méthanolique (fruit ; feuille)	(Dekić <i>et al.</i> , 2020). (Sahin Yaghoglu <i>et al.</i> , 2016). (YiĠiT <i>et al.</i> , 2015). (Bouzid <i>et al.</i> , 2011).
Activité antimicrobienne	Méthanolique (fruit ; feuille) Aqueux (fruit ; feuille) Ethanolique et dichlorométhane (fruit)	(YiĠiT <i>et al.</i> , 2015). (Bouzid <i>et al.</i> , 2011).
Anti-inflammatoire	Ethanolique (fruit)	(Tadić <i>et al.</i> , 2008).
Activité antithrombotique	Ethanolique (feuille)	(Arslan <i>et al.</i> , 2015).
Activité Anticancéreuse	Méthanolique (fleur)	(Sahin Yaghoglu <i>et al.</i> , 2016).

9. Effets indésirables et Toxicité de *C. monogyna*

Une revue systématique portant sur 5577 patients ayant reçu des extraits standardisés d'aubépine a révélé que la plupart des effets indésirables étaient de légers à modérés (**Daniele et al., 2006**).

Les effets indésirables sont généralement limités à la sudation, les maux de tête, une éruption cutanée légère, des palpitations, la somnolence, l'agitation et des problèmes gastro-intestinaux, lorsqu'elle est prise à des doses thérapeutiques (**Rigelsky et Sweet, 2002**).

À ce jour, les études cliniques ont montré que la consommation d'aubépine n'entraîne pas d'effets indésirables significatifs (**Daniele et al., 2006**).

Les doses létales médianes (DL₅₀) pour l'administration orale d'un extrait hydroalcoolique de feuilles et de fruits d'aubépine sont respectivement de 18,5 ml/kg chez les souris et de 33,8 ml/kg chez les rats. Les doses létales médianes pour les fractions riches en flavonoïdes administrées par voie intraveineuse s'élèvent à 1,56 g/kg chez les souris. Toutefois, la dose létale médiane pour la fraction de proanthocyanidines est de 130 mg/kg (par injection intrapéritonéale) et de 300 mg/kg (par injection sous-cutanée) chez les souris (**Chang et al., 2002 ; Nabavi et al., 2015**).

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

Notre étude expérimentale a été effectuée au sein du laboratoire de recherche «Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique » (**LAPSAB**).

L'objectif de cette étude est, d'une part quantifier les taux de composés phénoliques présents dans les différents extraits de fruits *C. monogyna*, d'autre part évaluer leur activité antioxydante en utilisant deux méthodes distinctes, à savoir le piégeage du radical libre DDPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) et la réduction du fer par la méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).

1. Matériel végétal

1.1 Préparation du matériel végétale

Le matériel végétal utilisé dans notre étude est constitué de fruits de *C. monogyna* (l'aubépine) récoltés en Janvier 2023 au niveau de la commune de Nedrouma, Wilaya de Tlemcen.

Afin de préserver les constituants contenus dans le matériel végétal, ce dernier a été séché à l'abri de la lumière dans un endroit bien aéré et sec, à une température ambiante, dans le but d'éviter toute altération ou détérioration. Une fois séchés, les fruits sont broyés à l'aide d'un mortier jusqu'à ce qu'ils soient réduits en poudre fine, qui est ensuite utilisée pour préparer les extraits (**Fig.n°22**).



(A)



(B)

Figure n°22: Fruits de *C. monogyna* secs (A) et broyés (B) (Photo prise au laboratoire).

1.2 Extraction du matériel végétal

Les extraits étudiés au cours de notre travail sont préparés selon le mode d'extraction par macération.

➤ Préparation de l'extrait brut Eau/Acétone

Pour préparer cet extrait, 5 g de matière végétale sont dissous dans 100 ml d'un solvant mixte (eau/acétone ; 30:70 ; v/v). Le mélange est vigoureusement agité à l'aide d'un agitateur magnétique pour assurer une parfaite homogénéisation. Ensuite, le mélange est laissé en macération pendant 72 heures, à l'abri de la lumière.

Une fois macéré, l'extrait est filtré puis concentré à l'aide d'un rotavapeur réglé à 50°C en évaporant la phase organique. Une partie de l'extrait brut obtenu après concentration est séchée à sec dans l'étuve à 37°C. L'autre partie est réservée à l'extraction liquide-liquide.

➤ Préparation de l'extrait aqueux

Pour préparer l'extrait aqueux, on combine 5 g de matière végétale avec 200 ml d'eau distillée. Ensuite, on agite vigoureusement le mélange à l'aide d'un agitateur magnétique pour assurer une homogénéisation optimale. On laisse ensuite le mélange macérer pendant 72 heures, à l'abri de la lumière. Après cette période, le mélange est filtré et une quantité de l'extrait brut est évaporée à sec dans une étuve réglée à 37°C. L'autre quantité est réservée à l'extraction liquide-liquide.

➤ Extraction liquide-liquide

Les extraits bruts (aqueux et hydro-acétonique) subissent une extraction liquide-liquide en utilisant le dichlorométhane suivi de l'acétate d'éthyle.

Après un mélange vigoureux des extraits bruts avec le dichlorométhane, ils se séparent en deux phases distinctes : une phase aqueuse et une phase organique (phase dichlorométhane) éliminée par la suite.

Les phases aqueuses récupérées précédemment sont mélangées avec de l'acétate d'éthyle. Les résultats de cette procédure donnent deux phases : une phase acétate d'éthyle évaporée à sec à l'aide d'un rotavapor à 40 °C et une phase aqueuse évaporée à sec à 37 °C.

Les extraits testés dans ce travail sont :

- ✓ Extrait brut eau/acétone (EBEA)
- ✓ Extrait brut aqueux (EBA)
- ✓ Phases acétate d'éthyle de l'EBEA
- ✓ Phases acétate d'éthyle de l'EBA
- ✓ Phases aqueuses résiduelles de l'EBEA
- ✓ Phases aqueuses résiduelles de l'EBA

1.3 Calculs des rendements d'extraction

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

Rdt : Rendement.

m1 : Poids du ballon rempli d'extrait (g).

m2 : Poids du ballon vide (g).

m3 : Poids de la matière végétale (g).

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

Matériel et méthodes

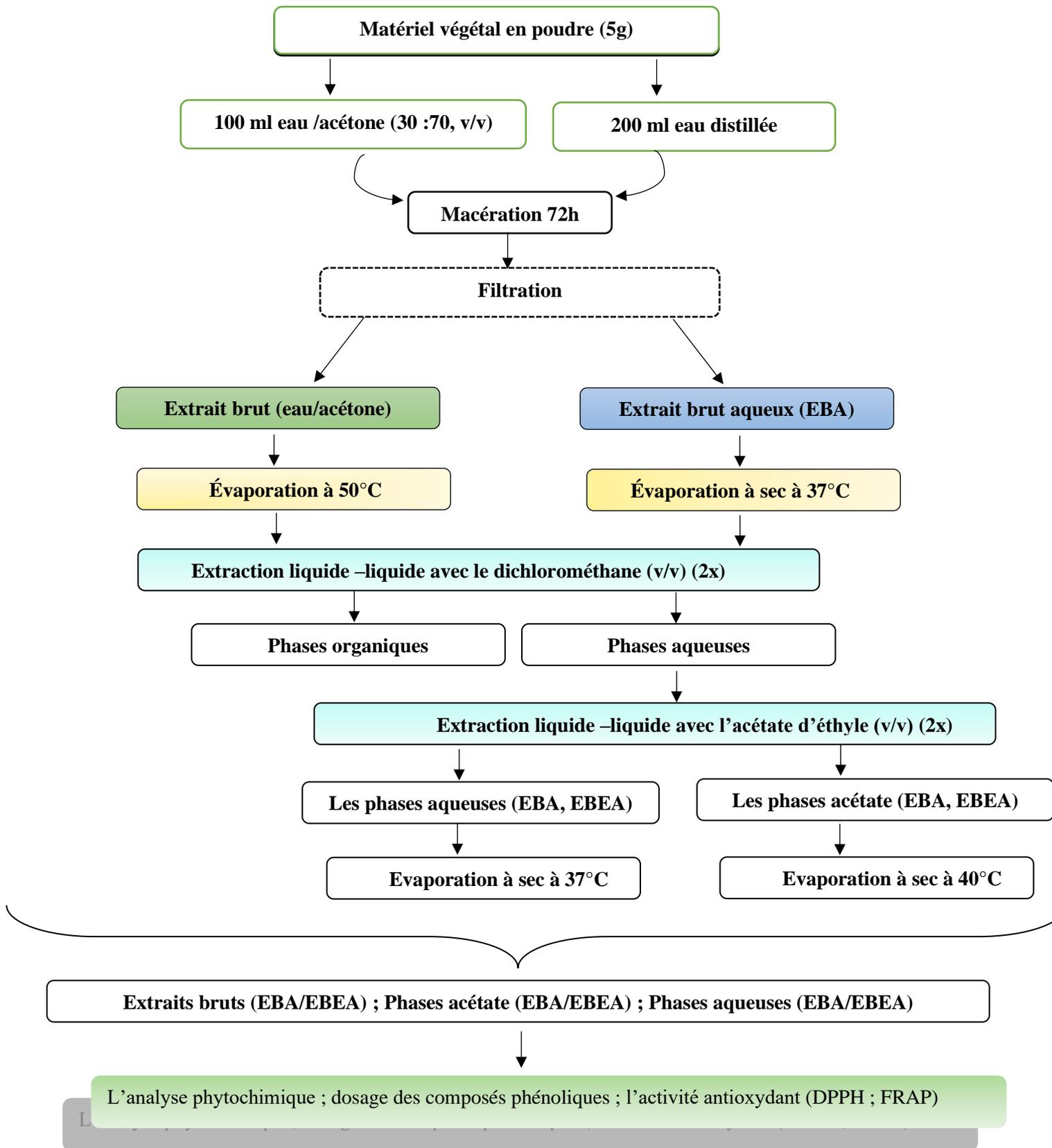


Figure n°23: Schéma récapitulatif du protocole d'extraction et expérimental réalisé sur les fruits de *C. monogyna*.

2. Analyse phytochimique

Les extraits préparés passent par une série des analyses phytochimiques visant à identifier la présence ou l'absence de diverses familles de composés chimiques tel que :

✓ Les tanins

Pour effectuer l'analyse, il convient de placer 1 ml de l'extrait à tester dans un tube à essai et d'ajouter 0,25 ml d'une solution aqueuse de FeCl_3 (1%). Le mélange est ensuite incubé pendant 15 minutes à température ambiante. L'obtention d'une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre indique la présence de tanins (**Karumi *et al.*, 2004**).

✓ Les flavonoïdes

Pour réaliser l'analyse, il convient de placer 1 ml de l'extrait à tester dans un tube à essai et d'y ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (HCl) ainsi que quelques copeaux de magnésium. La coloration rouge, orange ou rose indique la présence de flavonoïdes (**Karumi *et al.*, 2004**).

✓ Les quinones libres

Pour réaliser l'analyse, il faut placer 1 ml de l'extrait à analyser dans un tube à essai et ajouter 0,1 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH à 1%). Un changement de couleur vers le jaune, le rouge ou le violet indique la présence de quinones libres (**Oloyede, 2005**).

✓ Les anthraquinones

Pour réaliser l'analyse, il suffit d'ajouter 1 ml d'extrait à tester à 1 ml de NH_4OH (10%) dans un tube à essai. Après agitation, la présence d'anthraquinones est indiquée par une coloration violette (**Oloyede, 2005**).

✓ Les terpénoïdes (Test de Slakowski)

Pour réaliser l'analyse, il convient d'ajouter 1 ml d'extrait dans un tube à essai, puis 0,4 ml de chloroforme et 0,6 ml d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4). Un test positif est indiqué par l'apparition de deux phases et une couleur marron à l'interphase (**Khan *et al.*, 2011**).

✓ Les saponosides (Test de mousse)

Pour réaliser l'analyse, il suffit de placer 10 ml de l'extrait à tester dans un tube à essai, puis agiter le tout. La persistance d'une mousse pendant 20 minutes confirme la présence de saponosides (**N'Guessan *et al.*, 2009**).

✓ Les alcaloïdes

Pour effectuer l'analyse, il est nécessaire de prendre deux tubes à essai et y introduire 0,5 ml de l'extrait à analyser. Ensuite, ajouter 0,5 ml de réactif de Mayer dans le premier tube et 0,5 ml de réactif de Wagner dans le second tube. La présence d'alcaloïdes est indiquée par la formation d'un précipité blanc dans le premier tube et marron dans le second (**Majob et al., 2003**).

✓ Les composés réducteurs

Pour réaliser l'analyse, il faut ajouter 1 ml d'extrait dans un tube à essai, puis 2 ml de liqueur de Fehling (1 ml de réactif A et 1 ml de réactif B). Ensuite, placer le tube dans un bain marie bouillant pendant 8 à 10 minutes. La présence d'un précipité rouge brique indique un test positif (**Cai et al., 2011**).

3. Dosage des composés phénoliques

3.1 Dosage des polyphénols totaux

a) Principe

La méthode de Folin-Ciocalteu est une méthode couramment utilisée pour quantifier la teneur totale en composés phénoliques. Cette méthode repose sur la mesure de l'augmentation de la densité optique résultant de l'interaction du réactif avec divers phénols. Le réactif de Folin-Ciocalteu est un complexe phosphomolybdique hexavalent/acide phosphotungstique ($3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-13\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$) qui subit des réactions de réduction réversibles à un ou deux électrons, ce qui entraîne une coloration bleue de la solution (**Ivanova et al., 2020**).

b) Mode opératoire

1 ml de chaque extrait est introduit dans des tubes à essai, suivi de l'addition de 2 ml d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 2%, le tout est agité puis incubé pendant 5 min. Ensuite, un volume de 100 μL de réactif de Folin-Ciocalteu (1N) est ajouté au mélange. Les solutions ainsi obtenues ont été incubées pendant 30 min à température ambiante. La lecture des absorbance est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc à 700 nm. En parallèle, une courbe d'étalonnage est réalisée dans les mêmes conditions opératoires, en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations (0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 et 1 mg/ml).

3.2 Dosage des flavonoïdes

a) Principe

La quantification des flavonoïdes a été réalisée à l'aide d'une méthode modifiée de **Zhishen *et al.* (1999)**, impliquant l'utilisation de chlorure d'aluminium et de soude. Lorsque des flavonoïdes sont présents, le chlorure d'aluminium forme un complexe jaune tandis que la soude forme un complexe rose, tous deux absorbant à une longueur d'onde de 510 nm dans le spectre visible.

b) Mode opératoire

Dans des tubes à essai, 500 µL de chaque extrait sont dilués avec 2 ml d'eau distillée, suivi de l'addition de 150 µL d'une solution de nitrite de sodium (NaNO₂) à 15 %. Après 6min d'incubation à température ambiante, un volume de 150 µL d'AlCl₃ à 10% est ajouté au mélange suivi d'une 2^{ème} incubation pendant 6 min à température ambiante. Ensuite, 2 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4% sont ajoutés immédiatement.

Le volume total est ajusté à 5 ml avec l'eau distillée. Ensuite, les tubes sont agités puis incubés pendant 15 min. La lecture des absorbance est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc à 510 nm.

Dans les mêmes conditions opératoires, une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle, en utilisant la catéchine à différentes concentrations (0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 mg /ml).

3.3 Dosage des tanins condensés

a) Principe

Les tanins condensés présents dans les extraits ont été quantifiés à l'aide de la méthode de la vanilline. Cette méthode consiste à dépolymériser les tanins condensés en un milieu acide, puis à les transformer en anthocyanidols rouges grâce à une réaction avec la vanilline. La quantité d'anthocyanidols produits a ensuite été mesurée à l'aide d'un spectrophotométrie à 550 nm (**Sun *et al.*, 1998**).

b) Mode opératoire

Dans des tubes à essai, un volume de 50 µL de chaque extrait est mélangé avec 1500 µL de la solution vanilline/méthanol (4 %, m/v). Après agitation, 750 µL d'acide chlorhydrique concentré (HCl) sont additionnés. Le mélange est laissé réagir à température ambiante pendant 20 min. Ensuite, La lecture de l'absorbance est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc à 550 nm.

Matériel et méthodes

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires, en utilisant la catéchine à différentes concentrations (0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 et 1 g/mL).

c) Expression des résultats

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

$$T = a * f / b$$

T : Teneur

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

f : Facteur de dilution ;

b : Concentration initiale de l'extrait.

4. Evaluation de l'activité antioxydante

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

✓ Principe

Cette méthode se fonde sur la réduction du radical libre stable DPPH•. Ce dernier, qui possède un électron impair, présente une absorption maximale à 517 nm (violet). Lorsque des antioxydants réagissent avec le DPPH•, le radical libre stable se couple en présence d'un donneur d'hydrogène et est réduit à la forme DPPHH. Cette transformation se traduit par une décoloration (jaune) proportionnelle au nombre d'électrons capturés entraînant ainsi une diminution de l'absorbance du DPPH•. La capacité de réduction est donc d'autant plus grande que la décoloration est importante (Sunitha, 2016).

✓ Mode opératoire

- ✓ 1950 µL de la solution méthanolique de DPPH• (0,025 mg/mL), sont ajoutée à 50 µL de chaque extrait à différentes concentrations .
- ✓ Pour chaque concentration, un blanc est préparé contenant 50 µL de chaque concentration d'extrait et 1950 mL de méthanol .
- ✓ Pour le contrôle négatif, 50 µL de méthanol est mélangé avec 1950 µL de la solution de DPPH• .
- ✓ Les séries des tubes sont incubés à l'obscurité pendant 30 min à température ambiante ;
- ✓ La lecture des densités optiques est réalisée contre les tubes blancs à l'aide d'un spectrophotomètre à 515 nm.
- ✓ L'acide ascorbique, le BHA et le BHT sont utilisés comme contrôles positifs à différentes concentrations.

✓ Expression des résultats

▪ Calcul des pourcentages d'inhibition

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

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

% I: Pourcentage d'inhibition.

AC: Absorbance du contrôle.

AE: Absorbance de l'échantillon

✓ Calcul des IC₅₀

La valeur de l'IC₅₀ correspond à la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50% la concentration initiale de DPPH•. Cette valeur, ainsi que le pourcentage d'inhibition, sont fréquemment utilisés comme paramètres pour caractériser l'activité de piégeage des radicaux libres. Les valeurs d'IC₅₀ sont obtenues par analyse graphique des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits testés, à travers des régressions logarithmiques ou linéaires (Gulcin, 2020).

4.2 Réduction du fer par la méthode FRAP

a. Principe

Cette méthode repose sur le principe dont lequel une augmentation de l'absorbance peut être corrélée à la capacité réductrice des antioxydants ou des extraits d'antioxydants. Les composés dotés d'une capacité antioxydante réagissent avec le ferricyanure de potassium (K₃[Fe(CN)₆]) pour former du ferrocyanure de potassium (K₄[Fe(CN)₆]). Par la suite, ce dernier réagit avec le trichlorure de fer, ce qui permet la production d'un complexe ferrique de ferrocyanure de couleur bleue, présentant une absorbance maximale à 700 nm (Xiao *et al.*, 2020).

b. Mode opératoire

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

Matériel et méthodes

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

▪ Expression des résultats

Dans la méthode FRAP, une augmentation de l'absorbance témoigne d'une augmentation du pouvoir réducteur du fer par les échantillons testés, tels que les extraits ou les contrôles positifs. Pour comparer ces échantillons, le paramètre utilisé est l'EC₅₀ (concentration efficace) qui représente la concentration de l'échantillon requise pour atteindre une absorbance de 0,5 sur les graphiques [Absorbances=f(concentrations)] (Ferreira *et al.*, 2007 ; Tamuly *et al.*, 2014).

5. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont traités par le logiciel Excel afin de calculer les moyennes et les écarts types. D'autre part le logiciel Sigma Plot (12.0) est utilisé pour tracer les courbes et les régressions correspondantes. L'analyse de ces régressions par le même logiciel donne les équations et les facteurs de corrélation pour chaque courbe.

Résultats et interprétation

Résultats et interprétation

1. Calcul des rendements d'extraction

Les différents extraits issus des fruits de la plante *C. Monogyna* présentent des rendements et des caractéristiques différentes (aspects, couleurs; solubilité) et les résultats sont donnés dans le tableau n°5.

Tableau n°5: Rendements et caractéristiques des différents extraits des fruits de *C. monogyna*.

Extraits	Rendements (%)	Aspect	Couleur	Solubilité
Extrait brut aqueux (EBA)	20,80 %	Pâte	Marron verdâtre	Eau /méthanol
Phase acétate d'éthyle d'EBA	4,52 %	Pâte	Jaune	Eau /méthanol
Phase aqueuse d'EBA	5,64%	Pâte	Marron claire	Eau /méthanol
Extrait brut (eau/acétone) (EBEA)	37,27 %	Pâte	Brun	Eau /méthanol
Phase acétate d'éthyle d'EBEA	3,44%	Pâte	Brun foncée	Eau /méthanol
Phase aqueuse d'EBEA	12,38 %	Pâte	Brun claire	Eau/méthanol

Selon les données du tableau n°5, il est à noter que l'EBEA présente le rendement le plus élevé par rapport aux autres extraits, atteignant 37,27 % suivi de l'EBA avec un rendement de 20,8 %. Bien que ces deux extraits aient une texture similaire (pâte), leurs couleurs diffèrent.

On note également que la phase aqueuse d'EBEA présente un rendement supérieur à celui de la phase aqueuse d'EBA. Plus précisément, les rendements des phases aqueuses sont respectivement de 12,38 % et 5,64 %. Les phases acétate d'éthyle présentent des rendements convergents, la phase acétate d'éthyle d'EBA affiche un rendement de 4,52 % et la phase acétate d'éthyle d'EBEA donne un rendement de 3,44 %.

Ainsi, les six extraits étudiés se révèlent solubles à la fois dans le mélange eau/méthanol.

Résultats et interprétation

2. Analyses phytochimiques

En présence de réactifs particuliers, la détection des diverses familles de composés résulte en l'apparence de turbidité, de floculation, de précipitation ou de changement de couleur qui nous indique la nature chimique des constituants présents dans la plante.

Les résultats de l'analyse phytochimique effectuée sur les divers extraits étudiés, sont regroupés dans le tableau n°6.

Tableau n°6: Résultat de l'analyse phytochimique réalisé sur les extraits du *C.monogyna*

		EBA	Phase acétate d'éthyle (EBA)	Phase aqueuse (EBA)	EBEA	Phase acétate d'éthyle (EBEA)	Phase aqueuse (EBEA)
Tanins		+	++	-	-	+++	-
Flavonoïdes		-	-	-	+++	+++	+++
Quinones		++	++	+	++	+++	+++
Anthraquinones		-	-	-	-	-	-
Terpénoïdes		+	++	++	+++	+++	+++
Saponosides		-	-	-	-	-	-
Alcaloïdes	M	-	-	-	-	-	-
	W	-	-	+	-	-	-
Composés réducteurs		-	-	-	+++	+++	+

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

Le tableau n°6 montre une différence au niveau de la composition chimique des extraits bruts étudiés (EBA, EBEA). L'extrait brut eau/acétone (EBEA) se distingue par une forte présence de flavonoïdes, terpénoïdes et composés réducteurs, tandis que l'extrait aqueux (EBA) en est dépourvu.

Les deux extraits bruts contiennent des quinones, mais ne renferment aucune trace d'anthraquinones, de saponosides ou d'alcaloïdes. En comparant les phases acétate d'éthyle, on constate que la phase acétate d'éthyle issue de l'EBEA est riche en tanins, flavonoïdes, quinones, terpénoïdes et composés réducteurs, mais pauvre en anthraquinones, saponosides et alcaloïdes.

Résultats et interprétation

En revanche, la phase acétate d'éthyle issue de l'EBA se caractérise par une présence modérée de tanins, quinones et terpénoïdes, et une absence totale de flavonoïdes, composés réducteurs, alcaloïdes, saponosides et anthraquinones.

En comparant les phases aqueuses, on observe que la phase aqueuse issue de l'EBEA est riche en flavonoïdes, quinones et terpénoïdes, tandis que la présence de composés réducteurs est faible. De plus, elle se caractérise par l'absence de tanins, d'anthraquinones, de saponosides et d'alcaloïdes. En ce qui concerne la phase aqueuse issue de l'EBA, elle est caractérisée par une présence modérée de terpénoïdes, une faible présence de quinones et d'alcaloïde (wagnar), et une absence totale de tanins, flavonoïdes, anthraquinones, saponosides, alcaloïde (Mayer) et composés réducteurs.

3. Teneurs en composés phénoliques

Les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés des différents extraits sont calculées à partir des équations des courbes d'étalonnage représentées sur les figures n°24, 25 et 26.

Les teneurs en composés phénoliques sont exprimées en milligramme équivalent acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/gE) pour les polyphénols totaux et en milligramme équivalent catéchine par gramme d'extrait (mg EQC/gE) pour les flavonoïdes et les tanins condensés. Les teneurs obtenues sont données dans le tableau n°7.

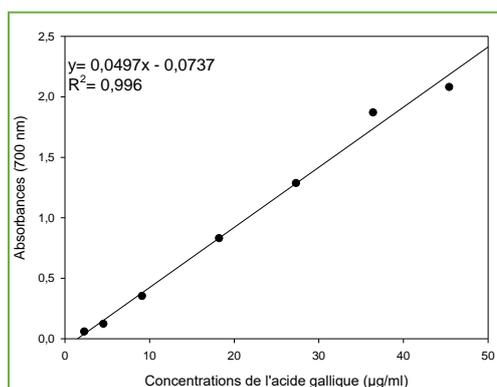


Figure n°24: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique
(dosage des polyphénols totaux n=3)

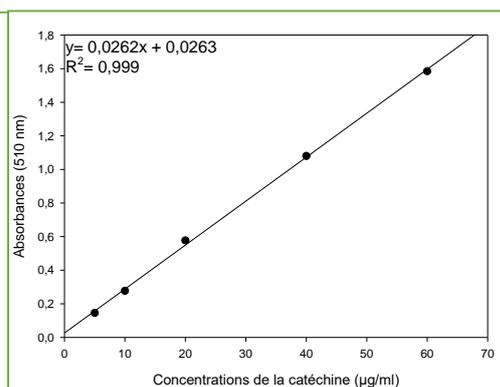


Figure n°25: Courbe d'étalonnage de catéchine
(dosage des flavonoïdes n=3)

Résultats et interprétation

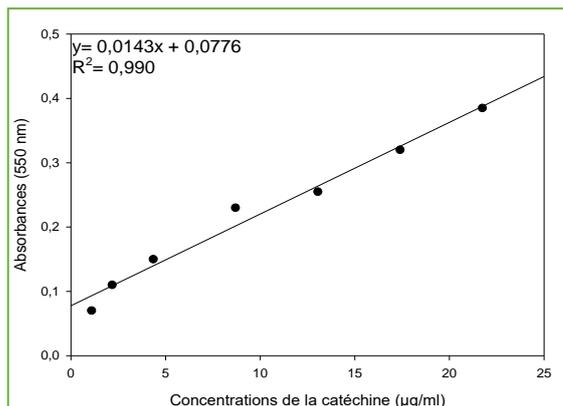


Figure n°26: Courbe d'étalonnage de la catéchine (dosage des tanins condensés) (n=3).

Tableau n°7: Teneurs de différents composés phénoliques dans les extraits de *C. monogyna*.

Extraits	EBA	Phase acétate d'éthyle (EBA)	Phase aqueuse (EBA)	EBEA	Phase acétate d'éthyle (EBEA)	Phase aqueuse (EBEA)
polyphénols Totaux (mgEAG/gE)	77,22±12,22	152,90±6,21	63,14±12,36	189,20±15,66	392,04±18,14	62,26±8,24
Flavonoïdes (mg EQC/gE)	1,40±0,00	157,79±3,81	12,80±5,39	36,90±2,20	738,00±10,09	15,50±5,83
Tanins condensés (mg EQC/gE)	0,91±0,00	ND	ND	18,446±2,27	295,46± 5,41	20,056±0,00

Selon les données du tableau n°7, la phase acétate d'éthyle issue de l'EBEA présente le taux le plus élevé en polyphénols totaux, avec une valeur de $392,04 \pm 18,14$ mgEAG/gE. Ensuite, l'extrait brut hydroacétonique enregistre approximativement la moitié de la quantité de polyphénols totaux de sa phase acétate, soit $(189,2 \pm 15,66$ mgEAG/gE). La phase acétate d'éthyle issue de l'EBA occupe la troisième place avec un taux de $152,90 \pm 6,21$ mgEAG/gE), suivie par l'extrait brut aqueux (EBA) qui présente un taux de $(77,22 \pm 12,22$ mgEAG/gE).

Les phases aqueuses de l'EBA et de l'EBEA affichent des teneurs presque similaires en polyphénols totaux ($63,14 \pm 12,36$ mgEAG/gE ; $62,26 \pm 8,24$ mgEAG/gE, respectivement).

Résultats et interprétation

Le dosage des flavonoïdes révèle une teneur significativement élevée dans la phase acétate d'éthyle de l'EBEA, atteignant un taux élevé de $738,00 \pm 10,09$ mgEQC/gE. En revanche, la phase acétate d'éthyle de l'EBA présente une différence marquée, affichant une teneur de $157,79 \pm 3,81$ mgEQC/gE. De plus, l'EBEA présente une teneur plus faible, avec un taux de $36,9 \pm 2,20$ mgEQC/gE. La phase aqueuse d'EBEA présente une teneur supérieure à celle de la phase aqueuse de l'EBA, avec des valeurs respectives de $15,5 \pm 5,83$ mgEQC/gE et $12,8 \pm 5,39$ mgEQC/gE). En revanche, l'extrait brut aqueux (EBA) affiche le taux le plus faible en flavonoïdes, avec une valeur de $(1,4 \pm 0,00$ mgEQC/gE).

Parmi tous les extraits préparés, la phase acétate d'éthyle de l'EBEA, présente la plus forte teneur en tanins condensés, atteignant une valeur de $(295,46 \pm 5,41$ mgEQC/gE). Ensuite, la phase aqueuse de l'EBEA est suivie par l'extrait brut hydroacétonique (EBEA), affichant respectivement des teneurs de $(20,056 \pm 0,00$ mgEQC/gE) et $(18,446 \pm 2,27$ mgEQC/gE). En revanche, l'extrait brut aqueux (EBA) présente une teneur extrêmement faible, avec une valeur de $(0,91 \pm 0,00$ mgEQC/gE).

En raison de leur concentration initialement faible, il n'est pas possible d'évaluer la teneur en tanins condensés dans la phase acétate d'éthyle et aqueuse de l'EBA.

4. Évaluation de l'activité antioxydante des extraits de fruits de *C. monogyna* par DPPH

a. Piégeage du radical DPPH• par l'extrait brut aqueux et ses phases

Les figures n° 27, 28 et 29 illustrent graphiquement les pourcentages d'inhibition respectifs de l'extrait brut aqueux (EBA), sa phase acétate d'éthyle et sa phase aqueuse.

D'après les figure n°27, 28 et 29, le pourcentage d'inhibition du radical DPPH• augmente proportionnellement avec la concentration de l'extrait testé et suit une tendance linéaire bien corrélée ($R^2 > 0,95$).

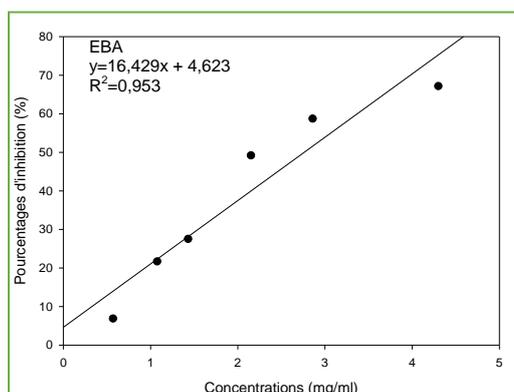


Figure n°27: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par l'extrait brut aqueux (n=3).

Résultats et interprétation

D'après la figure n°27, la concentration de 0,6 mg/ml enregistre un faible pourcentage d'inhibition de 7 %. En revanche, à une concentration proche de 3 mg/ml, on observe une augmentation importante du pourcentage d'inhibition, atteignant 59%. Ensuite, le pourcentage passe à 67% à une concentration supérieure à 4 mg/ml.

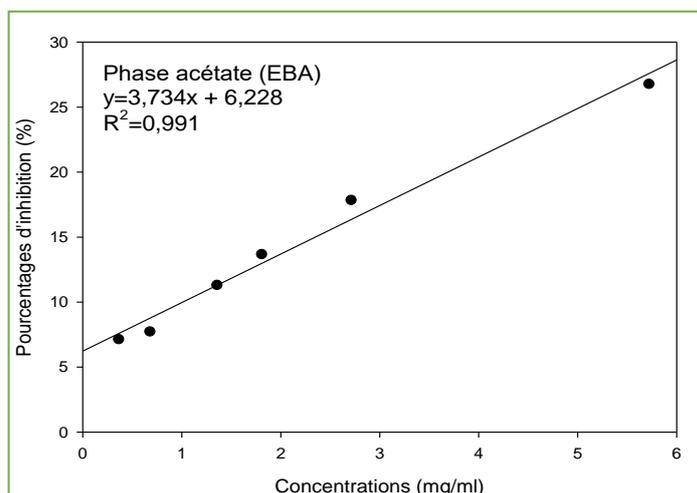


Figure n°28: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par la phase acétate d'éthyle de l'EBA (n=3).

D'après la figure n°28, le pourcentage d'inhibition du radical DPPH• augmente proportionnellement avec la concentration de la phase acétate d'éthyle d'EBA et suit une tendance linéaire bien corrélée ($R^2=0,99$). La concentration de 0,35 mg/ml présente un pouvoir inhibiteur relativement faible (7 %). Lorsque la concentration est augmentée à 1,80 mg/ml, le pourcentage d'inhibition augmente légèrement pour atteindre environ 14 %. À la concentration la plus élevée (5,7 mg/ml), le pourcentage d'inhibition reste faible et atteint 27%.

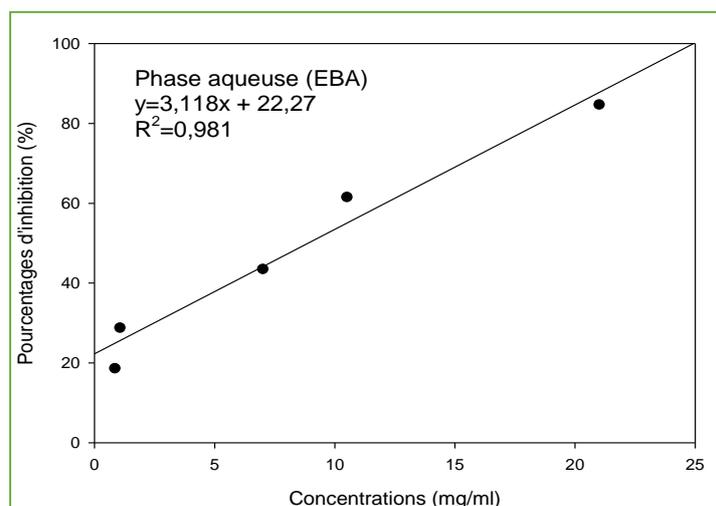


Figure n°29: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par la phase aqueuse de l'EBA (n=3).

Résultats et interprétation

D'après la figure n°29, le pourcentage d'inhibition du radical DPPH• augmente proportionnellement avec la concentration de la phase aqueuse d'EBA suit une tendance linéaire bien corrélée ($R^2=0,98$). D'après cette courbe, on observe que la concentration de 0,84 mg/ml correspond à un pourcentage d'inhibition de 18%. En augmentant la concentration à 7 mg/ml, le pourcentage d'inhibition s'élève à environ 43,5%, puis à 62% à une concentration de 10,5 mg/ml, ensuite 85% à 21 mg/ml.

b. Piégeage du radical DPPH• par l'extrait brut eau/acétone et ses phases

Les figures n°30, 31 et 32 illustrent graphiquement les pourcentages d'inhibition respectifs de l'extrait brut eau/acétone (EBEA), de sa phase acétate d'éthyle et sa phase aqueuse.

Selon ces figures, on observe une augmentation proportionnelle du pourcentage d'inhibition du radical DPPH• en fonction des concentrations des extraits testés, suivant une tendance logarithmique bien corrélée ($0,85 < R^2 < 1$).

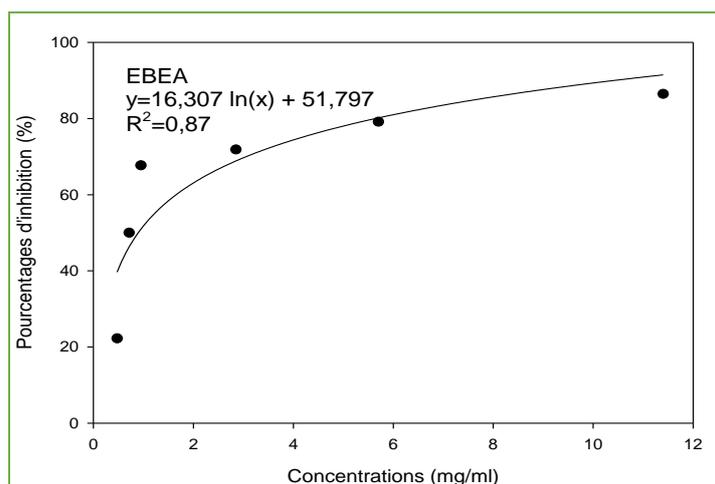


Figure n°30: Pourcentage d'inhibition du radical par l'extrait brut (eau/acétone) (n=3).

D'après la figure n°30, le pourcentage d'inhibition du radical DPPH• est d'environ 22% à une concentration de 0,47 mg/ml. Cependant, à une concentration de 0,95 mg/ml, le pourcentage d'inhibition augmente de manière significative pour atteindre 68%, et il atteint 86,5% à une concentration supérieure à 11 mg/ml.

Résultats et interprétation

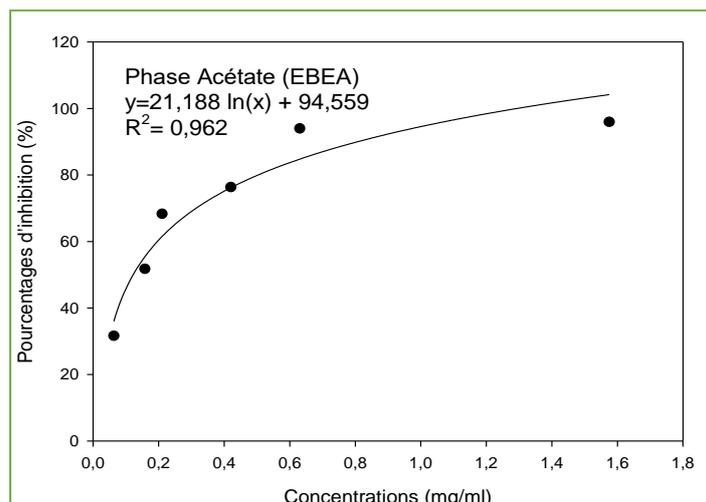


Figure n°31: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par la phase acétate d'éthyle de l'EBEA (n=3).

En se référant au graphique de la figure n°31, on observe une augmentation importante du pourcentage d'inhibition avec l'augmentation de la concentration de l'extrait testé. La plus faible concentration (0,063 mg/ml), présente un pourcentage d'inhibition de 32%. Ce pourcentage augmente à 52% et 68% respectivement, à des concentrations de 0,16 mg/ml et 0,20 mg/ml, pour atteindre son maximum à une concentration de 1,6 mg/ml, avec une valeur de 96%.

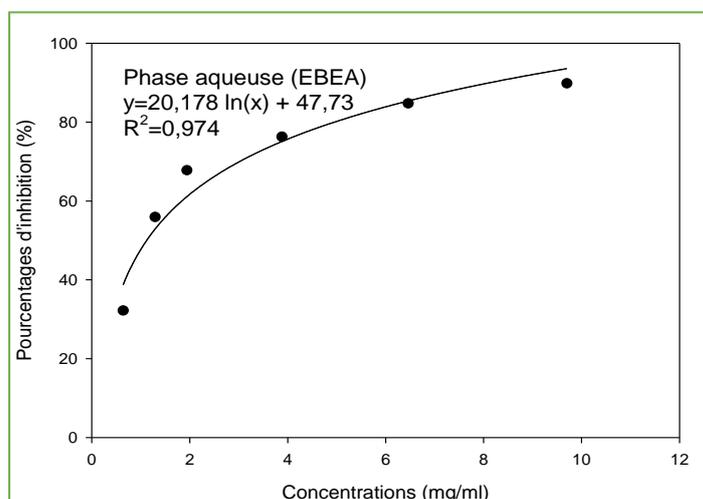


Figure n°32: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par la phase aqueuse de l'EBEA (n=3).

En observant le graphique ci-dessus, la concentration la plus faible (0,64 mg/ml) est associée à un pourcentage d'inhibition d'environ 32%. Ce pourcentage augmente par la suite pour atteindre 56% à une concentration de 1,3 mg/ml, puis respectivement, 68% et 76% aux concentrations de 2 mg/ml et 4 mg/ml. Finalement, le pourcentage d'inhibition atteint son maximum à une concentration proche de 10 mg/ml, avec une valeur de 90%.

Résultats et interprétation

c. Piégeage du radical libre DPPH• par les molécules de référence

Les trois molécules de référence (acide ascorbique, BHA et BHT), utilisées pour piéger le radical libre DPPH•, présentent des pourcentages d'inhibition représentés sur les figures n°33, 34 et 35, avec des régressions logarithmiques et linéaires nettement corrélées.

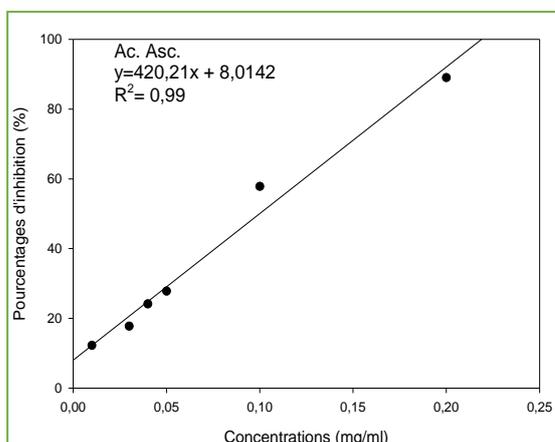


Figure n°33: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par l'acide ascorbique (n= 3).

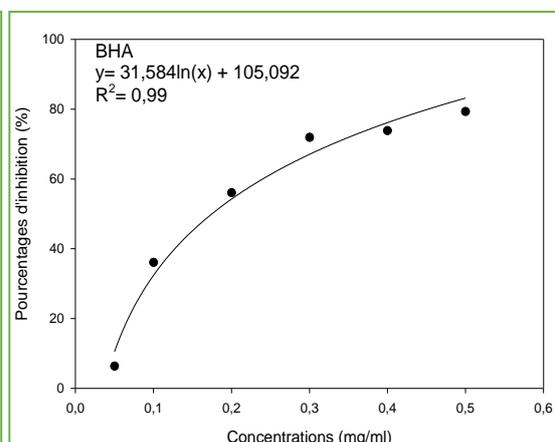


Figure n°34: Pourcentage d'inhibition radical DPPH par le BHA (n= 3).

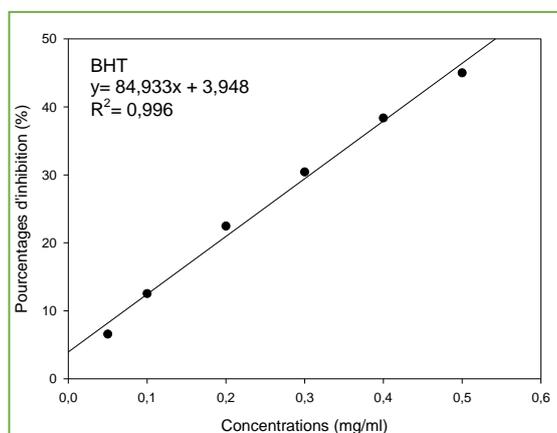


Figure n°35 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par le BHT (n= 3).

Selon la figure n°33, on peut observer que l'acide ascorbique présente une activité inhibitrice de 12% à la concentration la plus faible, soit 0,01 mg/ml. Lorsque la concentration est augmentée à 0,1 mg/ml, le pourcentage d'inhibition atteint 58%. Finalement, à une concentration de 0,2 mg/ml, il atteint son maximum (90%), démontrant clairement l'effet dose-dépendant de l'acide ascorbique.

Selon la figure n°34, à une concentration de 0,05 mg/ml, le pourcentage d'inhibition est estimé à environ 6%. Ce pourcentage augmente de manière significative à 56% lorsque la concentration de BHA atteint 0,2 mg/ml.

Résultats et interprétation

Enfin, à la concentration la plus élevée (0,5 mg/mL), le pourcentage d'inhibition atteint un niveau remarquable de 79%. Ces résultats mettent en évidence une augmentation proportionnelle de l'efficacité inhibitrice du BHA avec l'augmentation de la concentration.

D'après la figure n°35, on note qu'à la concentration la plus faible de 0,05 mg/ml, un pourcentage d'inhibition relativement faible de 7 % est observé. Cependant, lorsque la concentration est augmentée (0,2 mg/ml), le pourcentage d'inhibition atteint un niveau plus élevé, soit 22 %. Enfin, à la plus forte concentration de BHT, soit 0,5 mg/ml, un pourcentage de 45 % est enregistré.

En comparaison, parmi les molécules de référence testées, le BHT présente le pouvoir inhibiteur le plus faible, ne dépassant même pas 50 %. Tandis que l'acide ascorbique présente la meilleure activité antioxydante, reflétée par les pourcentages d'inhibition les plus élevés, suivi du BHA.

d. Calcul des IC₅₀

Pour évaluer et comparer l'activité antioxydante des extraits étudiés par rapport aux molécules de référence, on calcul le paramètre IC₅₀ qui représente la concentration requise pour réduire de 50 % du radical DPPH• dans une période de 30 minutes.

Les valeurs d'IC₅₀ sont calculées en utilisant les équations des régressions logarithmiques et linéaires des graphes précédents, et les résultats sont indiqués dans le tableau n°8.

Résultats et interprétation

Tableau n°8: Valeurs des IC₅₀ des différents extraits et des molécules de référence.

Extraits	IC ₅₀ (mg/ml)
EBA	2,762
Phase acétate d'éthyle d'EBA	11,722
Phase aqueuse d'EBA	8,893
EBEA	0,895
Phase acétate d'éthyle d'EBEA	0,122
Phase aqueuse d'EBEA	1,119
Acide Ascorbique	0,099
BHA	0,175
BHT	0,542

Selon les données du tableau n°8, une valeur d'IC₅₀ faible indique une activité antioxydante élevée. Ainsi, il est important de souligner que l'acide ascorbique présente l'activité antioxydante la plus puissante avec une IC₅₀ = 0,099 mg/ml.

Les extraits étudiés démontrent des IC₅₀ variables. En comparaison, il est remarquable que la phase acétate d'éthyle de l'EBEA, présente une activité antioxydante très puissante avec une IC₅₀ = 0,122 mg/ml, meilleure que celle de BHA (IC₅₀ = 0,175 mg/ml). Suivie de l'extrait brut eau/acétone (EBEA) (IC₅₀ = 0,895 mg/ml), puis sa phase aqueuse (IC₅₀ = 1,119 mg/ml).

L'extrait brut aqueux affiche aussi une valeur importante (IC₅₀ = 2,762 mg/ml), alors que son fractionnement n'améliore pas cette activité.

5. Pouvoir réducteur du fer (méthode FRAP)

a. La réduction du fer par l'EBA et ses phases.

Les figures n°36, 37 et 38 présentent respectivement, l'évolution des absorbance du milieu réactionnel en présence des concentrations croissantes de l'extrait brut aqueux (EBA), sa phase acétate d'éthyle et de sa phase aqueuse.

Résultats et interprétation

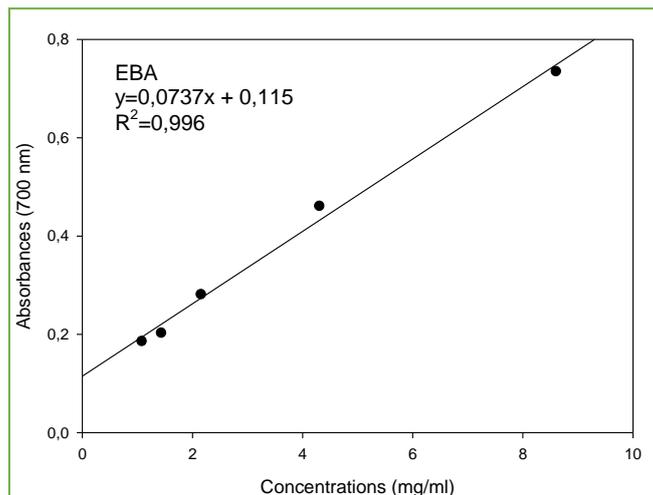


Figure n°36: Pouvoir réducteur du fer par l'extrait brut Aqueux (n=3).

Selon la figure n°36, on observe que les absorbances augmentent de manière proportionnelle aux concentrations de l'extrait, conformément à une régression linéaire ($R^2=0,99$). À une concentration de 1,43 mg/ml, l'absorbance mesurée est de 0,20. Par la suite, on observe une augmentation progressive atteignant 0,46 et 0,73 aux concentrations respectives de 4,3 mg/ml et 8,6 mg/ml.

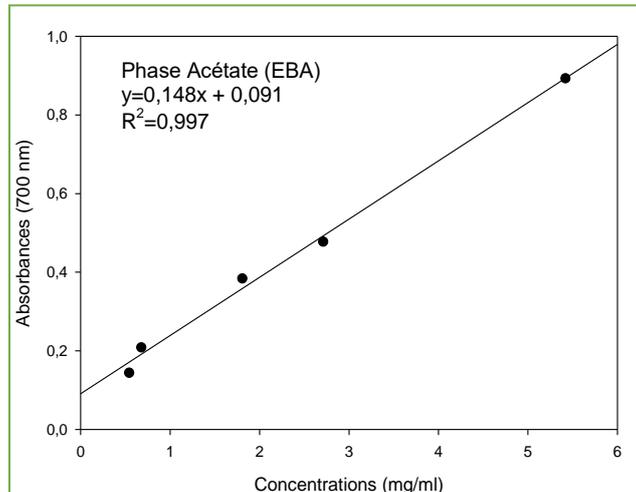


Figure n°37: Pouvoir réducteur du fer par la phase acétate d'éthyle de l'EBA (n=3)

Selon les données de la figure n°37, l'absorbance mesurée à différentes concentrations donne une valeur de 0,38 à une concentration de 1,8 mg/ml. Ensuite à une concentration de 2,71 mg/ml, l'absorbance est de 0,47 puis 0,90 à une concentration supérieure à 5 mg/ml.

Résultats et interprétation

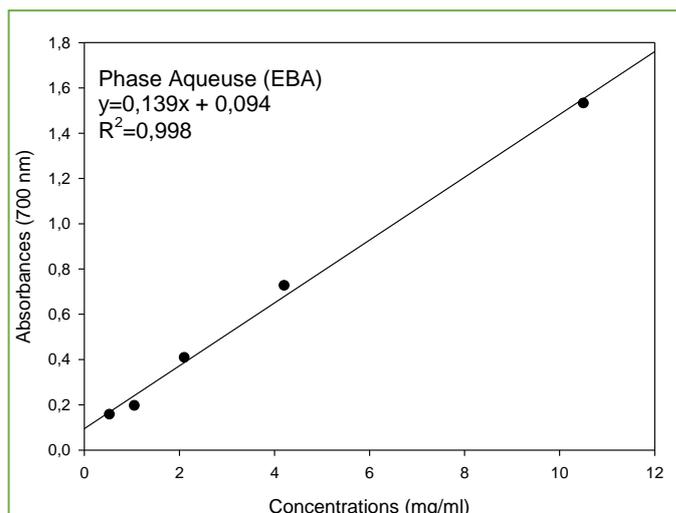


Figure n°38: Pouvoir réducteur du fer par la phase aqueuse de l'EBA (n=3).

Selon les données de la figure n°38, à une concentration de 1 mg/ml, l'absorbance est de 0,20. Elle augmente linéairement jusqu'à 0,4 à une concentration de 2 mg/ml, ensuite à 0,73 et 1,5 à une concentration de 4 mg/ml et 10,5 mg/ml, respectivement.

b. La réduction du fer par l'EBEA et ses phases

Les figures n°39, 40 et 41 présentent respectivement l'évolution de l'absorbance du milieu réactionnel en présence des concentrations croissantes de l'extrait brut eau/acétone (EBEA), sa phase acétate d'éthyle et sa phase aqueuse.

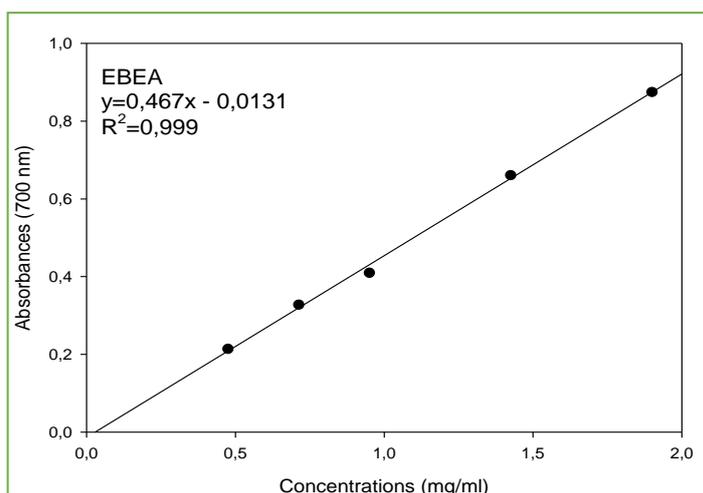


Figure n°39: Pouvoir réducteur du fer par l'extrait brut eau/acétone (n=3).

Suite à l'analyse de la figure n°39, on note que l'absorbance présente une valeur de 0,2 lorsque la concentration est de 0,48 mg/ml. Cette valeur augmente à 0,4 lorsque la concentration

Résultats et interprétation

atteint 0,95 mg/ml. Enfin, à une concentration proche de 2 mg/ml, l'absorbance obtenue atteint 0,87.

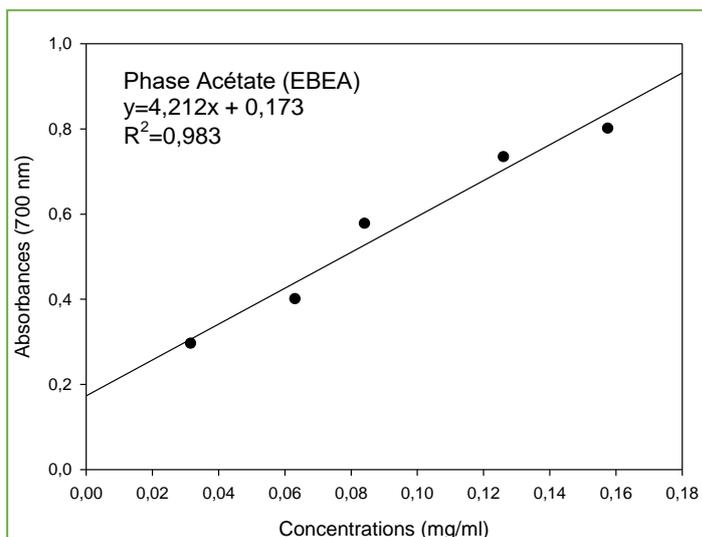


Figure n°40: Pouvoir réducteur du fer par la phase acétate d'éthyle de l'EBEA (n=3).

Selon les données fournies par la figure n°40, on constate qu'à une concentration initialement faible de l'extrait (0,03 mg/ml), l'absorbance mesurée est de 0,3. Par la suite, elle augmente de manière progressive pour atteindre 0,73 à une concentration de 0,13 mg/ml. Finalement, à une concentration de 0,16 mg/ml, l'absorbance atteint son niveau maximum de 0,80.

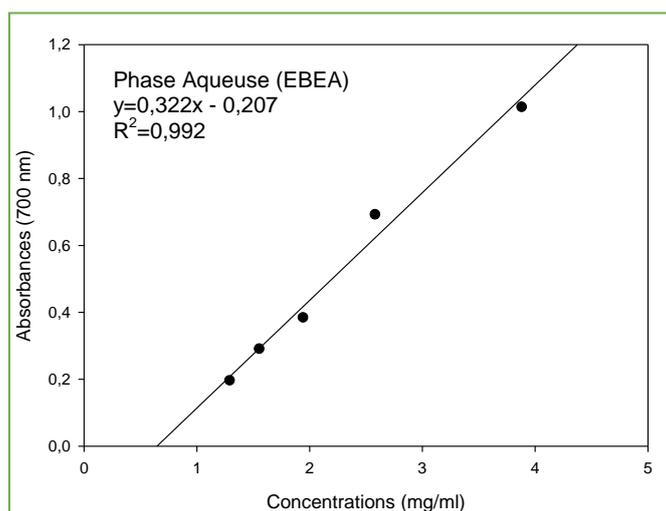


Figure n°41: Pouvoir réducteur du fer par la phase aqueuse de l'EBEA (n=3).

D'après les données présentées sur la figure n°41, on observe qu'à une concentration de 1,3 mg/ml de l'extrait, l'absorbance est de 0,20. Par la suite, une augmentation progressive de cette

Résultats et interprétation

valeur pour atteindre 0,4 à une concentration proche de 2 mg/ml, pour finalement atteindre la valeur maximale de 1 à une concentration proche de 4 mg/ml.

c. Réduction du fer par les molécules de référence

Les résultats des trois molécules de référence, à savoir l'acide ascorbique, le BHA et le BHT, utilisées pour réduire le fer, sont représentés respectivement sur les figures n°42, 43 et 44.

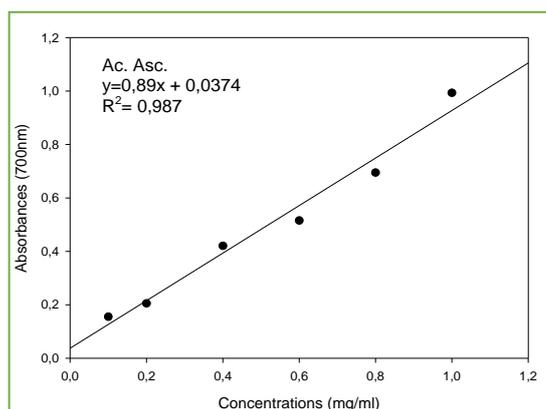


Figure n°42: pouvoir de réduction de fer par l'acide ascorbique

(n= 3).

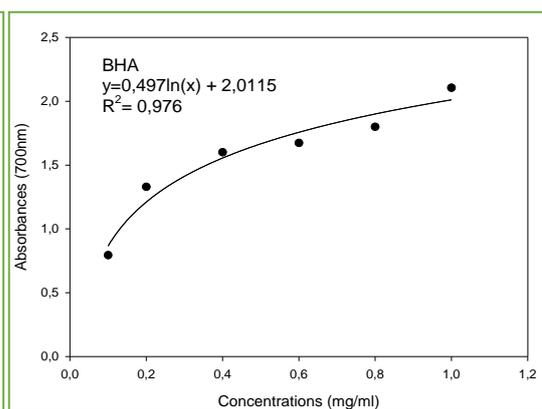


Figure n°43: pouvoir de réduction de fer par le BHA

(n= 3).

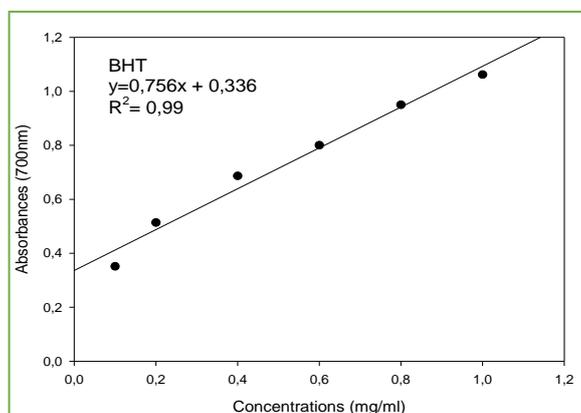


Figure n°44 : Pouvoir réducteur du fer par le BHT (n=3).

D'après l'analyse des trois figures précédentes, il est évident que le BHA présente une capacité réductrice exceptionnelle. Ce résultat est expliqué par les absorbances relativement supérieures à celles observées pour le BHT et l'acide ascorbique.

Résultats et interprétation

d. Calcul des EC₅₀

Les valeurs d'EC₅₀, qui correspondent aux concentrations efficaces pour une absorbance de 0,5 sont calculées à partir des équations de régression linéaire et logarithmique indiquées sur les graphes précédents. Ces valeurs sont indiquées dans le tableau ci-dessous :

Tableau n°9: Valeurs des EC₅₀ des différents extraits et des molécules de référence.

Extrait	EC ₅₀ (mg/ml)
EBA	5,224
Phase acétate d'éthyle de l'EBA	2,763
Phase aqueuse de l'EBA	2,920
EBEA	1,042
Phase acétate d'éthyle de l'EBEA	0,077
Phase aqueuse de l'EBEA	2,195
Acide Ascorbique	0,519
BHA	0,047
BHT	0,217

Selon le tableau n°9, la phase acétate d'éthyle de l'EBEA à la plus faible EC₅₀ (0,077 mg/ml), ce qui indique qu'il possède le pouvoir réducteur le plus élevé en termes de capacité à réduire le fer, dépassant ainsi celui du BHT (EC₅₀ = 0,217 mg/ml) et de l'acide ascorbique (EC₅₀ = 0,519 mg/ml) et légèrement inférieure à celle de BHA (EC₅₀ = 0,047 mg/ml).

L'extrait brut hydroacétonique (EBEA) se positionne en deuxième place en termes de pouvoir réducteur élevé, avec une EC₅₀ de 1,042 mg/ml. Cependant, il convient de noter que sa capacité réductrice demeure inférieure à celle des molécules de référence.

La phase aqueuse de l'EBEA, présente un pouvoir réducteur supérieur à celui de la même phase provenant de l'EBA, avec des valeurs d'EC₅₀ de 2,195 mg/ml et de 2,920 mg/ml, respectivement.

La phase acétate d'éthyle de l'EBA donne une EC₅₀ plus élevée (2,763 mg/ml) par rapport à celle de la phase acétate d'éthyle de l'EBEA (0,077 mg/ml).

Résultats et interprétation

L'extrait brut aqueux (EBA) affiche la plus faible activité pour réduire le fer, avec une EC_{50} de 5,224 mg/ml.

e. Comparaison entre les résultats de l'activité antioxydante et la teneur en composés phénoliques

Les résultats (IC_{50} et EC_{50}) obtenus dans cette étude (DPPH et FRAP) sont classés par ordre d'efficacité et ce classement est représenté graphiquement sur la figure n°45 et n°46, respectivement. Ainsi, la figure n°47, représente graphiquement les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés.

En se référant à la figure n°47, il est observé que la phase acétate d'éthyle d'EBEA présente les teneurs les plus élevées en composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés), avec des valeurs respectives de 392,04 mgEAG/gE ; 738,00 mgEQC/gE et 295,46 mgEQC/gE. De plus, d'après la figure n°45 et n°46, cet extrait présente un pouvoir de piégeage du radical DPPH• particulièrement fort ($IC_{50} = 0,122$ mg/ml) d'une part et une puissance accrue de réduction du fer ($EC_{50} = 0,077$ mg/ml), d'autre part. Cette remarquable activité antioxydante est directement attribuée aux teneurs élevées en composés phénoliques.

L'extrait brut (eau/acétone) se classe en deuxième position en termes de teneur élevée en polyphénols totaux (189,2 mgEAG/gE). D'après les figures n°45 et n°46, cet extrait est classé après sa phase acétate avec des valeurs de IC_{50} de 0,895 mg/ml et de EC_{50} de 1,042 mg/ml. Cela indique qu'il existe une corrélation entre la teneur élevée en polyphénols totaux et l'activité antioxydante.

D'après la figure n°47, l'extrait brut aqueux (EBA) présente les taux les plus faibles en flavonoïdes et en tanins condensés (respectivement 1,4 mg EQC/gE et 0,91 mg EQC/gE), ainsi qu'un taux modéré en polyphénols totaux (77,22 mg EAG/gE). Cependant, il présente une activité antioxydante importante du radical DPPH• ($IC_{50} = 2,762$ mg/ml) et il est considéré comme moins puissant vis-à-vis du fer ($EC_{50} = 5,224$ mg/ml), Par conséquent, on peut dire qu'il n'y a pas de corrélation claire entre les teneurs en composés phénoliques et l'activité antioxydante de cet extrait.

Résultats et interprétation

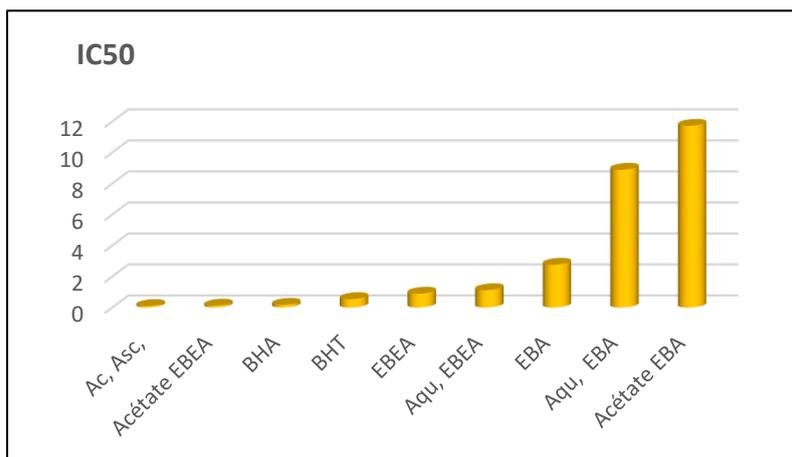


Figure n°45: Classement des IC₅₀ par ordre croissant (Méthode DPPH).

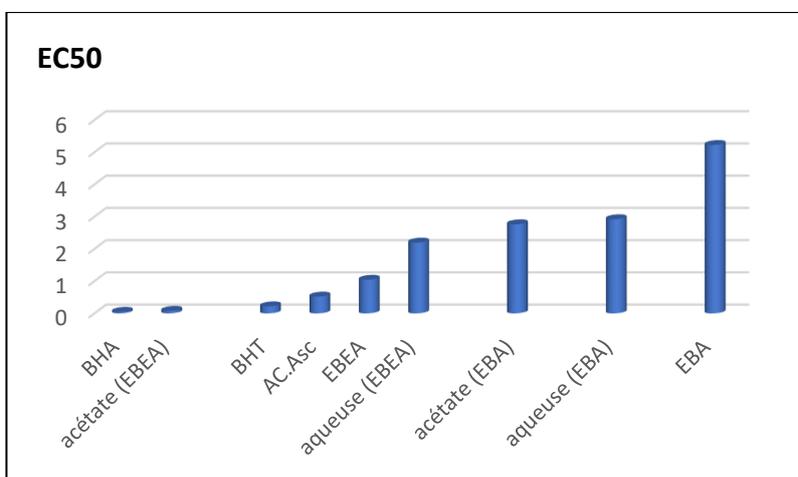


Figure n°46: Classement des EC₅₀ par ordre croissant (Méthode FRAP).

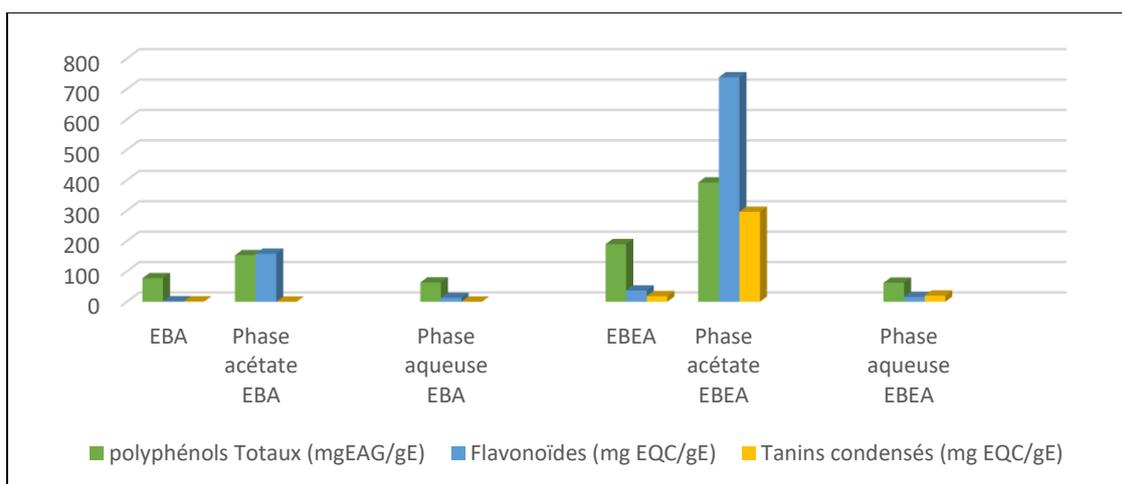


Figure n°47: Teneurs en composés phénoliques des différents extraits.

EBA : extrait brut aqueux.
Acétate (EBA) : phase acétate d'éthyle de l'extrait brut aqueux.
Aqu, (EBA) : phase aqueuse de l'extrait brut aqueux.
EBEA : extrait brut (eau /acétone).
Acétate (EBEA) : phase acétate d'éthyle de l'extrait brut (eau /acétone).
Aqu, (EBEA) : phase aqueuse de l'extrait brut (eau /acétone).

Discussion

Discussion

C. monogyna est largement répandue dans le bassin méditerranéen, en particulier en Algérie, elle est considérée comme l'une des plantes médicinales les plus utilisées. Les fruits de cette plante ont été employés en médecine traditionnelle depuis des siècles, en raison de leur abondance en composés phytochimiques bioactifs. Des recherches antérieures ont été menées sur différentes parties de *C. monogyna* et ont révélé la présence d'une variété de complexes de bioflavonoïdes, principalement constitués d'oligomères de proanthocyanidines, de vitexine, de quercétine et d'hyperoside. D'autres constituants chimiques comprennent la vitamine C, les saponines, les tanins, l'isobutylamine, la purine et l'acide ursolique (**Benkirane, 2018 ; Hakima et al., 2019**).

Notre étude phytochimique sur les extraits du fruit de *C. monogyna* révèle une variation des teneurs en composés phénoliques (polyphénols, flavonoïdes, tanins) entre les différents extraits. Les extraits bruts (aqueux et hydroacétonique) présentent des teneurs distinctes : ($77,22 \pm 12,22$ mgEAG/gE, $189,2$ mgEAG/gE, $1,4 \pm 0,00$ mgEQC/gE et $36,9 \pm 2,20$ mgEQC/gE, $0,91 \pm 0,00$ mgEQC/gE et $18,446 \pm 2,27$ mgEQC/gE) respectivement. On observe une supériorité de l'extrait brut hydroacétonique en termes de teneurs par rapport à l'extrait aqueux. Concernant les extraits obtenus par fractionnement, les phases acétate des extraits bruts (aqueux et eau/acétone) présentent des teneurs différentes en composés phénoliques : ($152,9 \pm 6,21$ mgEAG/gE, $392,04 \pm 18,14$ mgEAG/gE, $157,79 \pm 3,81$ mgEQC/gE et $738 \pm 10,09$ mgEQC/gE, ND et $295,46 \pm 5,41$ mgEQC/gE) respectivement. Selon les résultats du dosage quantitatif, la phase acétate issue de l'extrait brut hydroacétonique se distingue par sa richesse par rapport à l'extrait aqueux. La teneur en tanins condensés dans la phase acétate de l'extrait brut aqueux n'est pas déterminable en raison de la faible concentration d'extrait préparé.

Les recherches menées par **Andreea-Adelina et al. (2022)**, sur différentes parties de cette plante mettent en évidence des variations dans les teneurs en polyphénols totaux des extraits méthanoliques de *C. monogyna*, incluant les fruits mûrs, les fruits immatures, les fleurs et les feuilles. Les fruits immatures enregistrent la concentration la plus élevée ($284,06$ µg EAG/mgE), suivis des fleurs ($253,35$ µg EAG/mgE), puis des feuilles ($199,5$ µg EAG/mgE), tandis que les fruits mûrs présentent la valeur la plus faible ($105,10$ µg EAG/mgE). Dans la même étude, le dosage quantitatif des flavonoïdes révèle que les fleurs et les feuilles présentent les valeurs les plus élevées ($41,28$ et $39,08$ µg EQ/mgE respectivement), suivies des fruits immatures ($15,79$ µg EQ/mgE). Les fruits mûrs affichent la valeur la plus faible ($4,69$ µg EQ/mgE). Les résultats de cette étude soulignent une variation dans la répartition des composés

Discussion

phénoliques selon les différentes parties de la plante, tandis que le degré de maturité des fruits influe sur leur teneur en composés phénoliques.

Les travaux de **Dekić *et al.*(2020)**, ont été consacrés à l'extraction de fruits en utilisant des solvants de polarités différentes, notamment l'éthanol, l'acétate d'éthyle et le chloroforme. Ces travaux ont révélé des résultats significatifs, qui ont été observés à travers une analyse quantitative des composés phénoliques. La teneur en polyphénols totaux des extraits de fruits de *C. monogyna* a varié de $38,05 \pm 0,18$ à $152,87 \pm 0,11$ mg EAG/g poids sec. L'extrait d'acétate d'éthyle présente la plus grande concentration en polyphénols, avec une valeur de $152,87 \pm 0,11$ mg EAG/g poids sec, suivi de près par l'extrait éthanolique avec une concentration de $101,01 \pm 0,12$ mg EAG/g poids sec. En revanche, l'extrait de chloroforme a révélé la teneur la plus faible en polyphénols, avec une valeur de $38,05 \pm 0,18$ mg EAG/g poids sec. Le profil des flavonoïdes obtenus a suivi le même ordre que celui des polyphénols. L'extrait d'acétate d'éthyle a présenté la concentration la plus élevée en flavonoïdes, avec une valeur de $58,81 \pm 0,12$ mg RU/g poids sec, suivi de l'extrait éthanolique ($48,27 \pm 0,26$ mg RU/g poids sec) et l'extrait de chloroforme ($21,11 \pm 0,11$ mg RU/g poids sec), respectivement. Les résultats de cette étude ont montré l'impact du solvant utilisé sur la teneur en composés phénoliques. D'après plusieurs études, la quantité totale de composés phénoliques dans de nombreuses espèces végétales varie en fonction du mode d'extraction et de la polarité des solvants employés (**Zhou et Yu, 2004 ; Mohsen et Ammar, 2008**).

L'étude de **Bouزيد *et al.*(2011)**, porte toujours sur la même partie de la plante où ils réalisent des extraits par macération. Le dosage des composés phénoliques révèle que l'extrait méthanolique est le plus riche en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins ($21,72 \pm 6,10$ µg EAG/mgE ; $3,2 \pm 0,02$ µg EQ/mgE ; $2,1 \pm 0,01$ µg EC/mgE, respectivement), suivi de l'extrait de dichlorométhane ($17,87 \pm 2,22$ µg EAG/mg E, $2,1 \pm 0,10$ µg EQ/mg E, $3,2 \pm 0,02$ µg EC/mg E), tandis que l'extrait d'éther de pétrole est le plus pauvre en ces métabolites. Les études menées par **Bardakci *et al.*(2019)**, sur les fruits de différentes espèces de *Crataegus* démontrent que *C. monogyna* présente des teneurs importantes en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés, avec les valeurs respectives de ($391,97 \pm 2,30$ mg EAG/gE ; $17,60 \pm 1,41$ mg EQ/gE et $175,65 \pm 10,59$ mg EGGC/gE).

Discussion

La richesse en composés phénoliques des fruits de *C. monogyna* confère à cette plante un pouvoir antioxydant très important, comme l'ont démontré les résultats des études mentionnées précédemment.

Selon notre étude, le profil de piégeage du radical DPPH• varie d'un extrait à un autre. Les extraits bruts (eau/acétone et aqueux) de fruits présentent une activité antioxydante importante ($IC_{50} = 0,89$ mg/ml et $2,76$ mg/ml, respectivement). Cependant, l'extrait qui présente la meilleure activité de réduction du radical DPPH• est la phase acétate de l'extrait brut (eau/acétone) avec une IC_{50} de $0,122$ mg/ml. D'autres part, nos résultats concernant la méthode FRAP, mettent en évidence une capacité significative de nos extraits à réduire le fer, notamment l'extrait brut hydroacétonique et sa phase acétate ($EC_{50} = 1,098$ mg/ml et $0,077$ mg/ml, respectivement).

L'extrait méthanolique des fruits de *C. monogyna*, testé contre le radical DPPH•, présente une IC_{50} de $3,61$ µg/ml d'après l'étude de **Simirgiotis (2013)**. En revanche, l'étude de **Ziouche et al. (2020)** sur le même extrait et par la même méthode d'évaluation de l'activité antioxydante donne une IC_{50} de $328,8$ µg/ml. En outre, les résultats de **Tahirović et Bašić (2014)**, mettent en évidence une inhibition significative du radical DPPH• par l'extrait hydrométhanolique et hydroéthanolique, avec des pourcentages élevés ($91,15$ % et $84,71$ % respectivement), tandis que les extraits bruts méthanolique et éthanolique montrent des pourcentages plus faibles ($65,01$ et $37,64$ %, respectivement). Cette étude démontre que l'utilisation de solvants mixtes a un effet positif sur l'activité antioxydante. Selon **Mohammedi et Atik (2011)**, l'utilisation de solvants mixtes entraîne un enrichissement notable des extraits en polyphénols. La supériorité des solvants mixtes pourrait s'expliquer par une augmentation de la solubilité des composés phénoliques dans les extraits obtenus, par rapport à ceux obtenus à partir de solvants purs (**Trabelsi et al., 2010**).

Une étude menée par **Bardakci et al. (2019)**, met en évidence que l'extrait éthanolique de fruit de *C. monogyna* présente la plus forte activité de FRAP et de CUPRAC parmi plusieurs espèces de *Crataegus* étudiées ($EC_{50} = 2,83 \pm 0,04$ µM $FeSO_4$ E/gE et de $560,08 \pm 0,10$ mg EAA/gE, respectivement).

L'étude de **Çaliskan et al. (2012)** sur plusieurs espèces de *Crataegus* en Turquie révèle que *C. monogyna* présente la plus importante activité antioxydante selon la méthode du bêta-

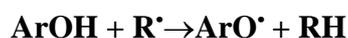
Discussion

carotène, avec un pourcentage de 81,9 %. Cette puissante activité est attribuée à sa richesse en composés phénoliques, mesurée à 55,2 mg EAG/g poids sec.

D'après les résultats obtenus dans cette étude, il y a une bonne corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en polyphénols totaux. Ces derniers agissent comme des antioxydants par la désactivation des radicaux libres dans les milieux biologiques via trois mécanismes (Di Meo *et al.*, 2013) :

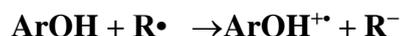
✓ **HAT (H-atom transfer) :**

HAT est en quelque sorte le transfert pur d'atome d'hydrogène dans lequel le proton et l'électron de l'atome d'hydrogène sont transférés vers le même orbital atomique dans le radical libre.



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

Ce mécanisme implique le transfert d'un électron vers le radical libre R^{\bullet} , ce qui conduit à la formation de l'anion R^{-} et du cation radical $\text{ArOH}^{+\bullet}$. Ces entités formées sont généralement stables.



✓ **SPLET (sequential proton loss–electron transfer)**

C'est initié par une perte de proton. Ensuite, l'anion de polyphénol subit un transfert d'électron. SPLET est favorisé lorsque l'anion (ArO^{-}) est suffisamment stable pour permettre le transfert d'électron avant la reprotonation.



Conclusion

Conclusion

Les résultats obtenus dans cette étude permettent de conclure que les fruits de *C. monogyna* sont particulièrement riches en composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins).

La teneur la plus élevée en polyphénols, flavonoïdes et tanins est obtenue dans la phase acétate de l'extrait brut hydroacétonique ($392,04 \pm 18,14$ mgEAG/gE ; $738,00 \pm 10,09$ mgEQC/gE ; $295,46 \pm 5,41$ mgEQC/gE, respectivement). Cet extrait est considéré comme étant le plus riche en composés phénoliques parmi les six extraits étudiés.

Concernant l'activité antioxydante, les résultats mettent en évidence une puissante activité antioxydante des extraits de fruits de *C.monogyna*, indépendamment des tests utilisés (DPPH• et FRAP). La phase acétate de l'extrait brut (eau/acétone) présente une IC₅₀ de 0,122 mg/ml vis-à-vis du radical DPPH•, ainsi qu'une EC₅₀ de 0,077 mg/ml vis-à-vis du fer. Cette activité est étroitement corrélée à la teneur en polyphénols totaux.

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

- Le changement de la méthode ainsi que du solvant d'extraction.
- Une étude visant à déterminer l'effet du solvant d'extraction utilisé sur le contenu en composés phénoliques de *C. monogyna*.
- Séparation et identification de principes actifs par des techniques chromatographiques et spectrales telle que l'HPLC, à partir de cette plante.
- Réalisée une étude phytochimique sur les différentes parties de cette plante pour déterminer la répartition des composés phénoliques entre ces parties.
- Une étude *in vivo* des molécules bioactives isolées serait souhaitable pour découvrir leurs mécanismes d'action à l'échelle tissulaire et moléculaire.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Ahmed M Kabel. (2014).** “Free Radicals and Antioxidants: Role of Enzymes and Nutrition.” *Journal of Nutrition and Health*, vol. 2, no. 3: 35-38. doi: 10.12691/jnh-2-3-2. Kabel, A. M. (s. d.). Free Radicals and Antioxidants : Role of Enzymes and Nutrition. *Journal of Nutrition and Health*.
2. **Al-Khayri, J. M., Mascarenhas, R., Harish, H. M., Gowda, Y., Lakshmaiah, V. V., Nagella, P., Al-Mssallem, M. Q., Alessa, F. M., Almaghasla, M. I., & Rezk, A. A.-S. (2023).** Stilbenes, a Versatile Class of Natural Metabolites for Inflammation—An Overview. *Molecules*, 28(9), 3786. <https://doi.org/10.3390/molecules28093786>
3. **Anand, S., Sowbhagya, R., Ansari, M. A., Alzohairy, M. A., Alomary, M. N., Almalik, A. I., Ahmad, W., Tripathi, T., & Elderderly, A. Y. (2022).** Polyphenols and Their Nanoformulations : Protective Effects against Human Diseases. *Life*, 12(10), 1639. <https://doi.org/10.3390/life12101639>
4. **Andreea-Adelina, P., Nagy, I.-N., Socaci, A., Hodişan, B., Biriş, S.-E., & Tofană, M. (2022).** *Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Crataegus monogyna*.
5. **Arslan, R., Bektas, N., Bor, Z., & Sener, E. (2015).** Evaluation of the antithrombotic effects of *Crataegus monogyna* and *Crataegus davisii* in the carrageenan-induced tail thrombosis model. *Pharmaceutical Biology*, 53(2), 275-279. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.914957>
6. **Aye, S. W., Myint, W., & Zar Toe. (2018).** *Evaluation of Antimicrobial and Antioxidant Properties of Myanmar Herbal Plants Evaluation of Antimicrobial and Antioxidant Properties of Myanmar Herbal Plants*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.17489.38240>
7. **Bandyopadhyay, D., Chattopadhyay, A., Ghosh, G., & Datta, A. (2004).** Oxidative Stress-Induced Ischemic Heart Disease : Protection by Antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, 11(3), 369-387. <https://doi.org/10.2174/0929867043456016>
8. **Bardakci, H., Celep, E., Gözet, T., Kan, Y., & Kirmızıbekmez, H. (2019).** Phytochemical characterization and antioxidant activities of the fruit extracts of several *Crataegus* taxa. *South African Journal of Botany*, 124, 5-13. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.04.012>.
9. **Bhabak, K. P., & Mugesh, G. (2010).** Functional Mimics of Glutathione Peroxidase : Bioinspired Synthetic Antioxidants. *Accounts of Chemical Research*, 43(11), 1408-1419. <https://doi.org/10.1021/ar100059g>
10. **Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020).** The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry,

Références bibliographiques

- Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709. <https://doi.org/10.3390/antiox9080709>
11. Boizot, N., & Charpentier, J.-P. (2006). *Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier*.
 12. Bourguou, S., Beji, R. S., Medini, F., & Ksouri, R. (2016). *Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'Euphorbia helioscopia*. 28.
 13. Bouzid, W., Yahia, M., Abdeddaim, M., & Aberkane, M. C. (2011). EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET ANTIMICROBIENNE DES EXTRAITS DE L'AUBEPINE MONOGYNE. *Lebanese Science Journal*, 12(1).
 14. Çaliskan, O., Ercisli, S., Gündüz, K., Serçe, S., Toplu, C., Kamiloglu, Ö., & Sengül, M. (2012). Phytochemical characterization of several hawthorn (*Crataegus* spp.) species sampled from the Eastern Mediterranean region of Turkey. *Pharmacognosy Magazine*, 8(29), 16. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.93305>
 15. Christodoulou, M. C., Orellana Palacios, J. C., Hesami, G., Jafarzadeh, S., Lorenzo, J. M., Domínguez, R., Moreno, A., & Hadidi, M. (2022). Spectrophotometric Methods for Measurement of Antioxidant Activity in Food and Pharmaceuticals. *Antioxidants*, 11(11), 2213. <https://doi.org/10.3390/antiox11112213>
 16. Dekić, V., Ristić, N., Dekić, B., & Ristić, M. (2020). Phenolic and flavonoid content and antioxidant evaluation of hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) fruits and leaves extracts. *The University Thought - Publication in Natural Sciences*, 10(1), 20-25. <https://doi.org/10.5937/univtho10-25574>
 17. Di Meo, F., Lemaure, V., Cornil, J., Lazzaroni, R., Duroux, J.-L., Olivier, Y., & Trouillas, P. (2013). Free Radical Scavenging by Natural Polyphenols : Atom versus Electron Transfer. *The Journal of Physical Chemistry A*, 117(10), 2082-2092. <https://doi.org/10.1021/jp3116319>
 18. Domej, W., Oetl, K., & Renner, W. (2014). Oxidative stress and free radicals in COPD – implications and relevance for treatment. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 1207. <https://doi.org/10.2147/COPD.S51226>
 19. Edwards, J. E., Brown, P. N., Talent, N., Dickinson, T. A., & Shipley, P. R. (2012). A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochemistry*, 79, 5-26. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.04.006>

Références bibliographiques

20. Elbadrawy, E., & Sello, A. (2016). Evaluation of nutritional value and antioxidant activity of tomato peel extracts. *Arabian Journal of Chemistry*, 9, S1010-S1018. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.11.011>
21. Fabbrini, M., D'Amico, F., Barone, M., Conti, G., Mengoli, M., Brigidi, P., & Turrone, S. (2022). Polyphenol and Tannin Nutraceuticals and Their Metabolites : How the Human Gut Microbiota Influences Their Properties. *Biomolecules*, 12(7), 875. <https://doi.org/10.3390/biom12070875>
22. Farha, A. K., Yang, Q.-Q., Kim, G., Li, H.-B., Zhu, F., Liu, H.-Y., Gan, R.-Y., & Corke, H. (2020). Tannins as an alternative to antibiotics. *Food Bioscience*, 38, 100751. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100751>
23. Favier, A. (2003). *Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique.*
24. Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Tsikas, D., & Rossi, R. (2009). Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 46(5–6), 241–281. <https://doi.org/10.3109/10408360903142326>
25. Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651-715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
26. H.A. Moharram, M. M. Y. (2014). Methods for Determining the Antioxidant Activity : A Review. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 11(1), 31-42. <https://doi.org/10.12816/0025348>
27. Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
28. Ivanova, A., Gerasimova, E., & Gazizullina, E. (2020). Study of Antioxidant Properties of Agents from the Perspective of Their Action Mechanisms. *Molecules*, 25(18), 4251. <https://doi.org/10.3390/molecules25184251>
29. Kumar, D., Arya, V., Ali Bhat Zq, Ahmad Khan, N., Nandan Prasad, D. (2012). The genus *Crataegus*: chemical and pharmacological perspectives. *Revista Brasileira de Farmacognosia* .22(5) :1187-1200.
30. Kupaeva, N. V., & Kotenkova, E. A. (2021). Current view on the assessment of antioxidant and antiradical activities : A mini review. *IOP Conference Series: Earth and*

Références bibliographiques

- Environmental Science*, 854(1), 012048. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/854/1/012048>
31. Li, T., Fu, S., Huang, X., Zhang, X., Cui, Y., Zhang, Z., Ma, Y., Zhang, X., Yu, Q., Yang, S., & Li, S. (2022). Biological properties and potential application of hawthorn and its major functional components : A review. *Journal of Functional Foods*, 90, 104988. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.104988>
 32. Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, Volume 13, 757–772.
 33. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
 34. Martinelli, F., Perrone, A., Yousefi, S., Papini, A., Castiglione, S., Guarino, F., Cicatelli, A., Aelaei, M., Arad, N., Gholami, M., & Salami, S. (2021). Botanical, Phytochemical, Anti-Microbial and Pharmaceutical Characteristics of Hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.), Rosaceae. *Molecules*, 26(23), 7266. <https://doi.org/10.3390/molecules26237266>
 35. Mastronikolis, S., Kagkellaris, K., Pagkalou, M., Tsiambas, E., Plotas, P., & Georgakopoulos, C. D. (2022). Antioxidant Defense and Pseudoexfoliation Syndrome : An Updated Review. *Medical Sciences*, 10(4), 68. <https://doi.org/10.3390/medsci10040068>
 36. MatÉs, J. M., Pérez-Gómez, C., & De Castro, I. N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32(8), 595-603. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(99\)00075-2](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(99)00075-2)
 37. Mena, P., Domínguez-Perles, R., Gironés-Vilaplana, A., Baenas, N., García-Viguera, C., & Villano, D. (2014). Flavan-3-ols, anthocyanins, and inflammation : Anti-Inflammatory Effects of Anthocyanins and Flavan-3-ols. *IUBMB Life*, 66(11), 745-758. <https://doi.org/10.1002/iub.1332>
 38. Mitra, S., Tareq, A. M., Das, R., Emran, T. B., Nainu, F., Chakraborty, A. J., Ahmad, I., Tallei, T. E., Idris, A. M., & Simal-Gandara, J. (2022). Polyphenols : A first evidence in the synergism and bioactivities. *Food Reviews International*, 1-23. <https://doi.org/10.1080/87559129.2022.2026376>

Références bibliographiques

39. Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity : A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
40. Nabavi, S., Habtemariam, S., Ahmed, T., Sureda, A., Daglia, M., Sobarzo-Sánchez, E., & Nabavi, S. (2015). Polyphenolic Composition of *Crataegus monogyna* Jacq. : From Chemistry to Medical Applications. *Nutrients*, 7(9), 7708-7728. <https://doi.org/10.3390/nu7095361>
41. Nagarajan, S., Nagarajan, R., Kumar, J., Salemme, A., Togna, A. R., Saso, L., & Bruno, F. (2020). Antioxidant Activity of Synthetic Polymers of Phenolic Compounds. *Polymers*, 12(8), 1646. <https://doi.org/10.3390/polym12081646>
42. Nazhand, A., Lucarini, M., Durazzo, A., Zaccardelli, M., Cristarella, S., Souto, S. B., Silva, A. M., Severino, P., Souto, E. B., & Santini, A. (2020). Hawthorn (*Crataegus* spp.): An Updated Overview on Its Beneficial Properties. *Forests*, 11(5), 564. <https://doi.org/10.3390/f11050564>
43. Nihed Ziouche, Leila Derradji, & Youcef Hadeif. (2020). Determination of polyphenolic components by high performance liquid chromatography (HPLC) and evaluation of the antioxidant activity of leaves and fruits of *Crataegus mongyna* Jacq. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 251-256. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2020.13.1.0344>
44. Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R. (2011). The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(4), 652-664. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.11.016>
45. Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270-278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
46. Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
47. Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress : A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
48. Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits

Références bibliographiques

- for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
49. Powers, S. K., & Hamilton, K. (1999). ANTIOXIDANTS AND EXERCISE. In *Clinics in Sports Medicine* (Vol. 18, Issue 3, pp. 525–536). Elsevier BV. [https://doi.org/10.1016/s0278-5919\(05\)70166-6](https://doi.org/10.1016/s0278-5919(05)70166-6).
50. Preiser, J.-C. (2012). Oxidative Stress. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 36(2), 147–154. <https://doi.org/10.1177/0148607111434963>
51. Rice-Evans, C. (2001). Flavonoid Antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, 8(7), 797-807. <https://doi.org/10.2174/0929867013373011>
52. Sahin Yaghioglu, A., Eser, F., Tekin, S., & Onal, A. (2016). Antiproliferative activities of several plant extracts from Turkey on rat brain tumor and human cervix carcinoma cell lines. *Frontiers in Life Science*, 9(1), 69-74. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1089949>
53. Sailaja Rao, P., Kalva, S., Yerramilli, A., & Mamidi, S. (2011). Free Radicals and Tissue Damage: Role of Antioxidants. *Free Radicals and Antioxidants*, 1(4), 2-7. <https://doi.org/10.5530/ax.2011.4.2>
54. Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology*, 24(10), R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
55. Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757-781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
56. Simirgiotis, M. (2013). Antioxidant Capacity and HPLC-DAD-MS Profiling of Chilean Peumo (*Cryptocarya alba*) Fruits and Comparison with German Peumo (*Crataegus monogyna*) from Southern Chile. *Molecules*, 18(2), 2061-2080. <https://doi.org/10.3390/molecules18022061>
57. Sunitha, D. (2016). A REVIEW ON ANTIOXIDANT METHODS. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 14. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2016.v9s2.13092>
58. Taysi, S., Tascan, A. S., Ugur, M. G., & Demir, M. (2019). Radicals, Oxidative/Nitrosative Stress and Preeclampsia. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 19(3), 178–193. <https://doi.org/10.2174/1389557518666181015151350>
59. Thanina, B., & Dyhia, B. (2021.). *Contribution à l'étude de l'activité Anti-Oxydante de la plante Crataegus Monogyna Jacq (Aubépine)*.

Références bibliographiques

60. Tsuchihashi, H., Kigoshi, M., Iwatsuki, M., & Niki, E. (1995.). *Action of b-Carotene as an Antioxidant against Lipid Peroxidation ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS Vol. 323, No. 1, October 20, pp. 137–147, 1995.*
61. Vuolo, M. M., Lima, V. S., & Maróstica Junior, M. R. (2019). Phenolic Compounds. In *Bioactive Compounds* (p. 33-50). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5>
62. Wang, W., Xiong, P., Zhang, H., Zhu, Q., Liao, C., & Jiang, G. (2021). Analysis, occurrence, toxicity and environmental health risks of synthetic phenolic antioxidants : A review. *Environmentalsearch*, 201, 111531. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111531>
63. Yiğit, D., Yiğit, N., & Sülün, A. (2015). SCREENING OF ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL POTENTIAL OF HAWTHORN (CREATAGUS MONOGYNA) FRUIT AND LEAVES EXTRACTS. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7(2), 149. <https://doi.org/10.18185/eufbed.69764>
64. Yusuf, J. B., & Meriçli, A. H. (2016.). *Pharmacological activities of Crataegus species : A review*. Volume 3; Issue 4; Page No. 73-76
65. Zhang, J., Chai, X., Zhao, F., Hou, G., & Meng, Q. (2022). Food Applications and Potential Health Benefits of Hawthorn. *Foods*, 11(18), 2861. <https://doi.org/10.3390/foods11182861>
66. Zhong, Y., & Shahidi, F. (2015). Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. This chapter is reproduced to a large extent from an article in press by the authors in the Journal of Functional Foods. In *Handbook of Antioxidants for Food Preservation* (p. 287-333). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-089-7.00012-9>
67. (<https://www.herbsencyclopedia.info>)

المخلص

يركز هذا العمل على البحث عن مضادات الأكسدة الطبيعية ويهدف إلى إجراء دراسة كيميائية نباتية و تقييم النشاط المضاد للأكسدة لمختلف مستخلصات فاكهة الزعرور المقطوفة من منطقة تلمسان بالجزائر. تم استخراج المادة النباتية عن طريق النقع في الماء المقطر وخليط الماء/الأسيتون (30:70) ، حجم/ حجم) لمدة 72 ساعة ثم يتم إجراء استخراج (سائل-سائل) باستخدام أسيتات الإيثيل. تخضع المستخلصات التي تم الحصول عليها لتحليل كيميائي نباتي ، لتحديد كمية المركبات الفينولية ، وكذلك لتقييم القوة المضادة للأكسدة باستخدام طريقتين: DPPH و FRAP. أثبتت الدراسة الكيميائية للنبات وجود المركبات الفينولية كالبوليفينول و الفلافونويد و العنصر المكثف. إن التحليل الكمي للمستخلص الخام (ماء /أسيتون) لفاكهة الزعرور يثبت غنى هذا المستخلص بكمية معتبرة من المركبات الفينولية (بوليفينول وفلافونويد . عنص المكثف (189,2 ± 15,66 مغ مكافئ حمض الغاليك في الغرام الواحد؛ 36,9 ± 2,20 مغ مكافئ كاتشين في الغرام الواحد , 18,446 ± 2,27 مغ مكافئ كاتشين في الغرام الواحد على التوالي) . في المقابل يقدم المستخلص الخام المائي لفاكهة نسبة منخفضة لهذه المركبات مقارنة بالمستخلص الخام (ماء /أسيتون) (77,22 ± 12,22 مغ مكافئ حمض الغاليك في الغرام الواحد ؛ 1,4 ± 0,00 مغ مكافئ كاتشين في الغرام الواحد ؛ 0,91 ± 0,00 مغ مكافئ كاتشين في الغرام الواحد , على الترتيب) . يسجل مستخلص أسيتات الإيثيل الناتج عن تجزئة المستخلص الخام (ماء /أسيتون) أعلى المحتوى من المركبات الفينولية (392,04 ± 18,14 مغ معادل حمض الغاليك في الغرام الواحد ؛ 738 ± 10,09 مغ معادل كاتشين في الغرام الواحد ؛ 295,46 ± 5,41 مغ معادل كاتشين في الغرام الواحد , على الترتيب) و هذه نتائج تجعله المستخلص الأغنى من بين كل المستخلصات المدروسة.

أظهرت نتائج الاختبارات على النشاط المضاد للأكسدة أن مستخلصات ثمار الزعرور تتميز بقدرة كبيرة على إرجاع الحديد و التخلص من الجذور الحرة DPPH*. يظهر مستخلص الإيثيل الناتج من المستخلص الخام (ماء /أسيتون) قدرة إختزال قوية بشكل إستثنائي نحو جذر DPPH (IC₅₀=0.122 mg/ml) هذه القدرة على الحد من الجذور الحرة أعلى و بشكل واضح من قدرة BHA (IC₅₀=0.175 mg/ml) و قدرة BHT (IC₅₀=0,895 mg/ml) يليه المستخلص الخام (ماء أسيتون) (IC₅₀=0,895 mg/ml) مما يكسب هذا المستخلص نشاطا مضادا للأكسدة معتبرا و لكنه يظل أقل من نشاط الجزيئات المرجعية .. كشفت تقنية FRAP أن مستخلص أسيتات الإيثيل الناتج من المستخلص الخام (ماء/أسيتون) يتميز بقدرة إرجاع حديد ممتازة و تقدر ب (EC₅₀= 0,077mg/ml) و هذا النشاط أعلى من ما يقدمه BHT و حمض الأسكوربيك (EC₅₀=0.217 mg/ml ; EC₅₀ = 0.519 mg/ml) على الترتيب ؛ و يرتبط النشاط المضاد للأكسدة لهذا المستخلص إرتباطا مباشرا و وثيقا بكمية المركبات الفينولية المعتبرة المتواجدة بكثرة فيه.

الكلمات المفتاحية : نبات الزعرور, المركبات الفينولية, نشاط مضاد لأكسدة.

Résumé

Ce travail porte sur la recherche d'antioxydants naturels et vise à mener une étude phytochimique tout en évaluant l'activité antioxydante de divers extraits de fruits de *C.monogyna*.

L'extraction du matériel végétal a été réalisée par macération dans l'eau distillée et un mélange eau/acétone (30:70, v/v) pendant 72 heures. Ensuite, une extraction liquide-liquide avec l'acétate d'éthyle est effectuée. Les extraits obtenus sont soumis à une analyse phytochimique, à un dosage des composés phénoliques, ainsi qu'à une évaluation du pouvoir antioxydant à l'aide de deux méthodes : DPPH et FRAP.

L'étude phytochimique des extraits de fruits de *C.monogyna* révèle la présence de polyphénols, de flavonoïdes et de tanins. Les résultats des dosages de polyphénols totaux, de flavonoïdes et de tanins condensés, indiquent que l'extrait brut eau/acétone est particulièrement riche en ces composés (189,2 ± 15,66 mg EAG/gE ; 36,9 ± 2,20 mg EQC/gE ; 18,446 ± 2,27 mg EQC/gE, respectivement). En revanche, l'extrait brut aqueux présente une faible teneur en ces composés par rapport à l'extrait précédent (77,22 ± 12,22 mg EAG/gE ; 1,4 ± 0,00 mg EQC/gE ; 0,91 ± 0,00 mg EQC/gE respectivement). La phase acétate d'éthyle, obtenu par fractionnement de l'extrait brut hydroacétonique, est considéré comme l'extrait le plus riche en composés phénoliques (392,04 ± 18,14 mg EAG/gE ; 738 mg EQC/gE ; 295,46 mg EQC/gE) parmi tous les extraits étudiés.

Les résultats des tests *in vitro* de l'activité antioxydante ont démontré que les extraits organiques de fruits de *C.monogyna* présentent une capacité significative de réduction du fer et de piégeage du radical DPPH'. Dans la méthode DPPH', la phase acétate d'éthyle de l'extrait brut (eau/acétone), démontre une capacité de réduction exceptionnellement puissante envers le radical DPPH', avec une IC₅₀ de 0,122 mg/ml. Cette capacité de réduction du radical libre est nettement supérieure à celle du BHA (IC₅₀ = 0,175 mg/ml) et du BHT (IC₅₀ = 0,542 mg/ml). Par la suite, l'extrait brut (eau/acétone) présente une IC₅₀ de 0,895 mg/ml. En ce qui concerne la méthode FRAP, la phase acétate d'éthyle de l'extrait brut (eau/acétone) se distingue par une activité puissante, avec une EC₅₀ de 0,077 mg/ml. Elle exhibe une capacité de réduction du fer supérieure à celle du BHT et de l'acide ascorbique (EC₅₀ = 0,217 mg/ml ; EC₅₀ = 0,519 mg/ml, respectivement). Cette activité est directement corrélée avec le taux de polyphénols.

Mots Clés : *C. monogyna*, Composés phénoliques, Activité antioxydante.

Summary

This work focuses on the search for natural antioxidants and aims to conduct a phytochemical study while evaluating the antioxidant activity of various fruit extracts of *C.monogyna*.

The extraction of the plant material was carried out by maceration in distilled water and a water/acetone mixture (30:70, v/v) for 72 hours. Then a liquid-liquid extraction with ethyl acetate is performed. The extracts obtained are subjected to phytochemical analysis, a determination of phenolic compounds, as well as an evaluation of antioxidant power using two methods: DPPH and FRAP.

The phytochemical study of the fruit extracts of *C.monogyna* reveals the presence of polyphenols, flavonoids and tannins. The results of the total polyphenol, flavonoid and condensed tannin , assays indicate that the (water/acetone) extract is particularly rich in phenolic compounds (189.2 ± 15.66 mg GAE/gE; 36.9 ± 2.20 mg CEQ/gE; 18.446 ± 2.27 mg CEQ/gE respectively). On the other hand, the aqueous extract has a low content of these compounds compared to the hydroacetic extract (77.22 ± 12.22 mg GAE/gE; 1.4 ± 0.00 mg CEQ/gE; 0.91 ± 0.00 mg CEQ/gE respectively). The ethyl acetate phase, obtained by fractionation of the crude hydroacetic extract, is considered to be the richest extract in phenolic compounds (392.04 ± 18.14 mg GAE/gE ; 738 ± 10,09 mg CEQ/gE; 295,46± 5,41 mg CEQ/gE) among all the studied extracts.

The results of tests carried out *in vitro* on the antioxidant activity have demonstrated that the extracts of *C.monogyna* fruits have a significant capacity for reducing iron and trapping the DPPH• radical. In the DPPH method, the ethyl acetate phase of the crude extract (water/acetone) demonstrates an exceptionally powerful reduction capacity towards the DPPH radical, with an IC₅₀ of 0.122 mg/ml. This capacity for reducing the free radical is clearly greater than that of BHA (IC₅₀ = 0.175 mg/ml) and BHT (IC₅₀ = 0.542 mg/ml). Subsequently, the crude extract (water/acetone) has an IC₅₀ of 0.895 mg/ml. With regard to the FRAP method, the ethyl acetate phase of the crude extract (water/acetone) is distinguished by a powerful activity, with an EC₅₀ of 0.077 mg/ml. It exhibits a greater iron reduction capacity than that of BHT and ascorbic acid (EC₅₀ = 0.217 mg/ml; EC₅₀ = 0.519 mg/ml respectively). This activity is directly correlated with the level of polyphenols.

Key Words: *C. monogyna* ; phenolic compounds , antioxidant activity.