

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2020

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : BIOCHIMIE APPLIQUEE

Présenté par :

HAMDANI ASMA

Thème

**Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique
des feuilles de *Cassia angustifolia* Vahl.**

Soutenu le: 22/09/2020

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>Mme. BENSMAIL Souhila</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Présidente</i>
<i>Mme. BOUTELDJA Razika</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promotrice</i>
<i>Mme. DJOUAHRAH-FAHEM Djamilia</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examinatrice</i>

Année Universitaire : 2019/2020

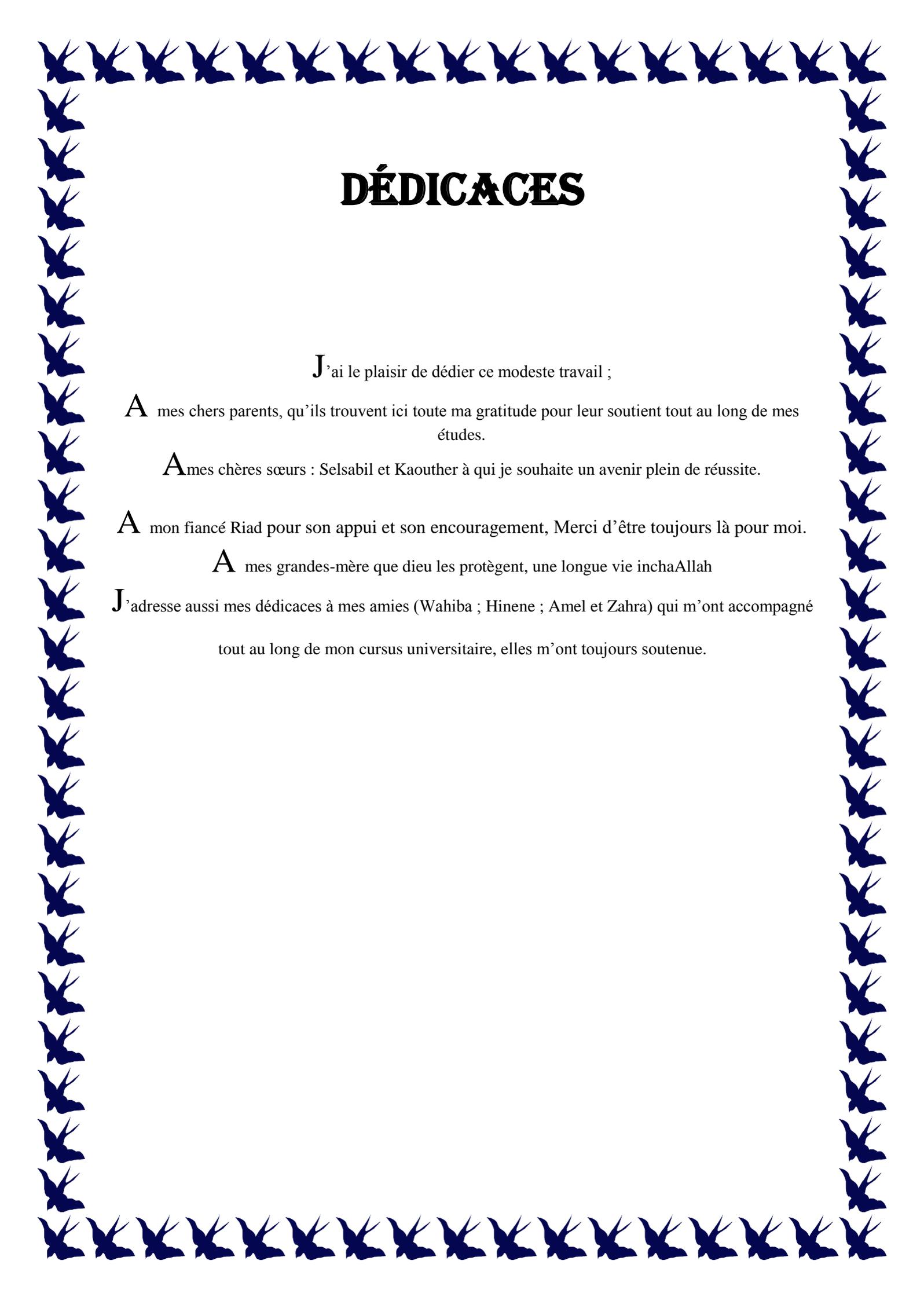
Remerciements

Au terme de ce travail, Je tiens à remercier Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce travail.

J'ai l'honneur et le plaisir de présenter ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à ma promotrice Madame BOUTHELDJA Razika pour son précieux aide, ces orientations et le temps qu'elle m'a accordé pour mon encadrement. Je remercie par ailleurs vivement les membres du jury de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail et d'assister à la soutenance.

Un grand merci à toutes personnes ayant participé de près ou de loin à notre formation et à tous ceux qui nous ont apporté leur soutien et leurs encouragements durant la réalisation de ce travail, sans oublier toutes personnes qui font partie de la faculté SNV-ST, principalement monsieur le Doyen de la faculté.

Ainsi qu'à tous mes proches amies qui m'ont toujours soutenu et encouragé même dans les périodes les plus difficiles.



DÉDICACES

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail ;

A mes chers parents, qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de mes études.

A mes chères sœurs : Selsabil et Kaouther à qui je souhaite un avenir plein de réussite.

A mon fiancé Riad pour son appui et son encouragement, Merci d'être toujours là pour moi.

A mes grandes-mère que dieu les protège, une longue vie inchaAllah

J'adresse aussi mes dédicaces à mes amies (Wahiba ; Hinene ; Amel et Zahra) qui m'ont accompagné tout au long de mon cursus universitaire, elles m'ont toujours soutenue.

Table des matières

Liste d'abréviation

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction... 1

Chapitre I: *Cassia angustifolia* Vahl

I.1 Etude botanique et classification de *Cassia angustifolia* Vahl... 3

I.1.1. Description botanique 3

I.1.2 Description morphologique 4

I.1.3 Répartition géographique 4

I.2 Principes actifs de *Cassia angustifolia* Vahl 5

I.3 Usage et intérêt thérapeutique..... 5

I.4 *Cassia angustifolia* et l'immuno-modulation 6

Chapitre II: Les polyphénols

II.1 Définition 7

II.2 Classification 7

II.1.1 Acide phénolique 7

II.1.2 Flavonoïdes 8

II.1.3 Les non flavonoïdes 8

II.3 Biosynthèse des polyphenols 9

Chapitre III : Le stress oxydant

III.1 Stress oxydant..... 11

III.2 Radicaux libres 11

III.2.1 Les espèces réactives de l'oxygène 12

III.2.2 Origines des ERO 13

III.3 Conséquences de stress oxydant..... 14

III.4 Les antioxydants..... 14

III.4.1 Définition des antioxydants..... 15

III.4.1.1 Les antioxydants endogènes 15

Table des matières

III.4.2.1 Les antioxydants exogènes	15
III.4.2 Pouvoir antioxydant des polyphénols.....	15
III.4.2.1 Le piégeage direct des ERO	15
III.4.2.2 L'inhibition des enzymes génératrices d'EOR.....	15
III.4.2.3 La chélation des ions métalliques.....	16
III.4.3 Rôles des polyphénols dans la physiologie	17
III.4.3.1 Polyphénols et maladies cardiovasculaire	17
III.4.3.2 Polyphénols et cancer	17
III.4.3.3 Polyphénols et maladies neuro-dégénératives.....	18
III.4.3.4 L'activité anti-inflammatoire des polyphénols.....	18

Chapitre IV : Matériel et méthodes

IV.1 Matériel	19
IV.1.1 Matériel végétale	19
IV.1.2 Matériel non biologique	19
IV.2 Méthodes	20
IV.2.1 Préparation de matériels végétales	20
IV.2.2 Préparation de l'extrait phénolique	21
IV.2.2.1 Généralités sur l'extraction liquide–solide	21
IV.2.2.2 Extraction des polyphénols par Soxhlet.....	22
IV.2.2.3 Dosage des polyphénols Totaux.....	23
IV.2.3 Evaluation de l'activité antioxydante.....	23

Chapitre V : Résultats et discussion

V.1 Screening phytochimique des feuilles de <i>Cassia angustifolia</i> Vahl	24
V.2 Extraction des polyphénols	24
V.2.1 Rendement de l'extraction.....	24
V.2.2 Dosage des polyphénols totaux	25
V.2 Evaluation de l'activité antioxydante	26
Conclusion.....	29
Références bibliographiques	30
Résumé	

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique.

AGPI : Acide gras polyinsaturé.

COX-2 : Cyclooxygénase -2.

DPPH : Radical de l'acide 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle.

EAC : Trolox equivalent antioxidant capacity.

EAG : Équivalent d'acide gallique.

ERO: Espèces réactive à l'oxygène.

ERA : Espèces réactives de l'azote.

HDL : High density lipoprotein.

H₃PMo₁₂O₄₀ : Acide phosphomolybdique.

H₃PW₁₂O₄₀ : Acide phosphotungstique.

IC₅₀ : Concentration inhibitrice médiane.

iNOS: Oxyde nitrique synthase.

LDL : Low density lipoprotein.

LPS : Lipopolysaccharide.

NFκ-B: Nuclear factor kappa -B.

NO[•] : Monoxyde d'azote.

O₃ : L'ozone.

O₂^{-•} : Anion superoxide.

OH[•] : Radical hydroxyl.

ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity.

P-450 : Cytochrome -450.

SOD: Superoxyde dismutase.

TNF-α : Facteur de nécrose tumorale.

UV: Ultra-violet.

XO : Xanthine oxydase.

Liste des figures

Figure 01 : Les différentes parties aérienne de <i>Cassia angustifolia</i> Vahl	4
Figure 02 : Structures des sennosides	5
Figure 03 : Structure de noyau phénolique	7
Figure 04 : Structure de base des flavonoïdes	8
Figure 05 : Structure chimique de stilbène	8
Figure 06 : Représentation schématique d'une partie de la chaîne respiratoire mitochondriale	11
Figure 07 : Processus de formation des ERO... ..	12
Figure 08 : Origine extra et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène.	13
Figure 09 : Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques.....	16
Figure 10 : Schéma explicatif du mécanisme d'action de génistéine contre les cellules cancéreuses	18
Figure 11 : Schéma représentatif des différentes étapes suivies durant l'étude de l'activité antioxydante.....	20
Figure 12 : Feuilles et poudre de <i>Cassia angustifolia</i>	20
Figure 13 : Schéma de l'appareil Soxhlet.....	22
Figure 14 : Réaction du Folin-Ciocalteu avec les polyphénols	23
Figure 15 : Structure chimique du radical libre DPPH... ..	23
Figure 16 : Résultats du test DPPH : IC ₅₀ (µg/ml).....	28
Figure 17 : Quantité de polyphénols des extraits phénoliques des différentes parties de <i>C. seberianna</i> (mg EAG/g).....	28

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification de *Cassia angustifolia* Vahl 3

Tableau 02 : Les appareils, verreries et réactifs utilisés durant la manipulation 19

Tableau 03 : Les résultats des teneurs en polyphénols totaux dans les extraits des feuilles de *Cassia angustifolia* Vahl. obtenus par différents solvants 26

Introduction

Au cours des dernières décennies, les substances naturelles à base des plantes connaissent un intérêt croissant dans divers domaines, spécialement en pharmaceutique et médecine traditionnelle. Selon l'OMS (2008), environ 80% de la population mondiale utilisent les plantes médicinales pour le traitement de plusieurs maladies (**Pierageli et al., 2009**). Les plantes médicinales sont connues par leurs pouvoir de guérir les maladies grâce à leurs richesses en molécules douées d'un pouvoir thérapeutique et de plusieurs activités biologiques, tel que les polyphénols (**Sofowora, 1982**).

Le stress oxydant est une agression cellulaire résultante d'un déséquilibre entre la production des radicaux libre ou espèces réactives de l'oxygène (ERO) et leurs élimination (**Delatter et al., 2001**).

Les radicaux libres sont très instables et peuvent réagir rapidement avec les molécules biologiques qui se trouve à proximité, par conséquent ils sont capable d'altéré les lipides, les protéines et même l'ADN, ce qui provoque de nombreuses maladies, par exemple : l'athérosclérose, le diabète type 2, les cancers, les maladies neuro-dégénératives et rhumatismales. C'est pour cela la recherche des molécules antioxydants à base des plantes s'est beaucoup développé, dans l'espoir de protéger la santé et guérir les différentes maladies (**Xavier, 2009**).

Cassia angustifolia Vahl. est parmi les plantes des Fabacées et connue généralement comme Senna Mekki, Cassia séné ou Senna Alexandrina. Elle est utilisée en phytothérapie. Cette plante cultivée en Inde, en Pakistan et au niveau des régions semi arides, a été utilisée pendant longtemps comme laxative. Des études plus récentes ont permet de prouver que cette plante est munie d'un pouvoir antibactérien, antiparasitaire, hypoglycémiant et antioxydant (**Zeeshan et al., 2018**).

Le but de ce travail est d'étudier l'activité antioxydante de l'extrait phénolique obtenu à partir des feuilles de Cassia. Ainsi, le présent mémoire s'articulera en 2 grandes parties :

- ✓ Dans la première partie, une étude bibliographique composée de trois chapitres :

Chapitre I: *Cassia angustifolia* Vahl.

Chapitre II : Polyphénols

Chapitre III : Stress oxydant

✓ La deuxième partie est composée de deux chapitres :

Chapitre IV: Matériel et méthodes.

Chapitre : L'activité antioxydante de *C. angustifolia*.

La partie pratique de ce travail a dû être réalisé au niveau du laboratoire de recherche au sein du groupe Saidal, mais à cause des conditions particulières de la pandémie de Covid-19, le travail n'a pas pu être réalisé. Pour cela, dans la dernière partie « Résultats et discussion » nous discuterons les résultats obtenus par les travaux de recherche qui ont cerné le même sujet.

Première partie :
Synthèse bibliographique

Chapitre I : *Cassia angustifolia* Vahl.

Cassia angustifolia Vahl., communément appelé le séné ou Senna Mekki, est une plante qui appartient à la famille des Fabaceae, genre de *Cassia* (Tableau 1), connue aussi par : *Senna Alexandrina* Mill., *Senna acutifolia* (Savulescu *et al.*, 2018). Elle se développe en régions semi arides essentiellement en sud de l'Inde et en Egypte. Cette plante est un petit arbuste qui peut atteindre jusqu'à 1,8 m de hauteur. Les extraits de cette plante sont utilisés en médecine traditionnelle généralement pour traiter les troubles gastro-intestinaux (Souza *et al.*, 2011).

Tableau 01 : Classification de *C. angustifolia* Vahl. (Heinrich *et al.*, 2012).

Règne	Plante
Classe	Fabidées
Ordre	Fabales
Famille	<i>Fabaceae</i>
Sous-famille	<i>Caesalpinioideae</i>
Genre	<i>Cassia</i>
Espèce	<i>C. angustifolia</i>

I.1. Etude botanique et classification de *C. angustifolia* Vahl.

I.1.1. Description botanique

Le Séné est une plante vivace (Figure 01), fleurit en avril-juin, généralement de 80 cm de hauteur à tige dressée et cylindrique. Les feuilles sont alternes ayant 10,3 cm de long avec 5 à 9 paires de folioles opposées. Les fleurs jaunes sont légèrement zygomorphes, regroupées en épis auxiliaires. Les fruits appelés follicules sont des gousses de 3 à 6 cm de large et peuvent contenir 5 à 6 graines qui se reproduisent après 90 jours (Savulescu *et al.*, 2018).

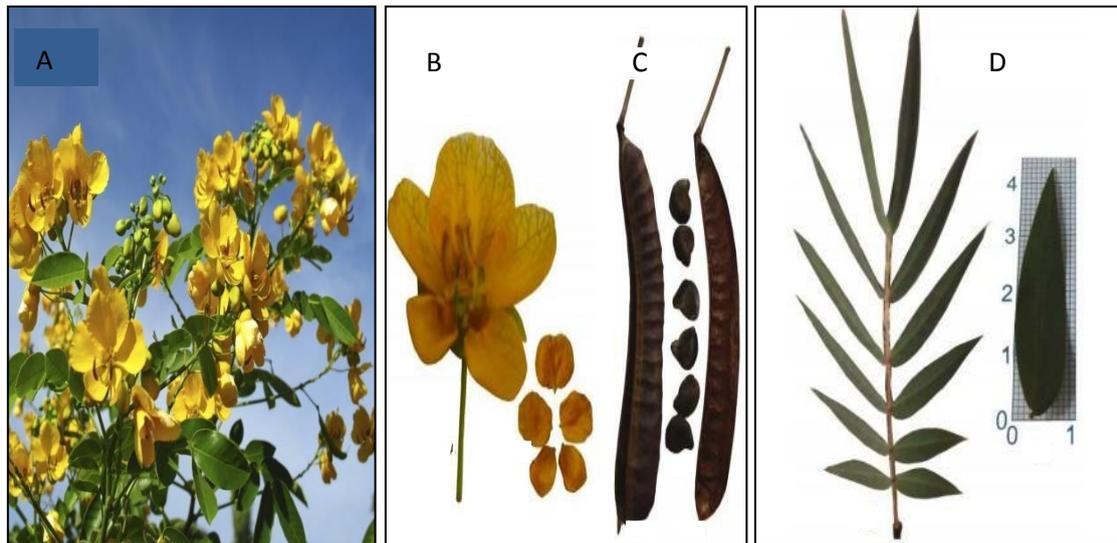


Figure 01: Les différentes parties aériennes de *Cassia angustifolia* Vahl. (Savulescu *et al.*, 2018).

A : *C. angustifolia* Vahl. ; **B :** Fleurs ; **C :** Fruits et gousses ; **D :** Feuilles

I.1.2 Description morphologique

L'anatomie de la tige et de la feuille est similaire à la famille des Fabacées. Le cortex de la tige est constitué de cellules parenchymateuses. Le tissu vasculaire se compose de faisceaux vasculaires séparés dans la jeune tige, formant un cylindre qui contient à la fois de xylème secondaire et de phloème secondaire. Les folioles sont amphystomatiques avec des stomates de type paracytique, avec un trichome unicellulaire non glandulaire recouvert d'une cuticule papilleuse. La mésophyle de la foliole se différencie en palissade et en tissus spongieux (Savulescu *et al.*, 2018).

I.1.3 Répartition géographique

C. angustifolia Vahl est originaire des milieux semi arides. Elle se trouve naturellement au Mali jusqu'au Somalie et Kenya. Elle est présente aussi au désert de l'Arabie saoudite. Sa culture commerciale est pratiquée en Inde, au Soudan, en Egypte, Pakistan, en Chine et en Corée. Elle a été introduite il y a longtemps dans plusieurs pays d'Asie centrale et de la Méditerranée aux caraïbes et au Mexique (Schemlezer *et al.*, 2008).

I.2 Principes actifs de *C. angustifolia* Vahl.

Le séné contient une variété de molécules bioactives, souvent utilisé en médecine traditionnelle. Elle contient plus de 3% d'anthrone glycosides (Sennosides A, A1, B) (Figure 02), et des petites quantités d'anthroquinone glycosides spécialement le rhein-8-glycoside et le rhein-8-sophroside, elle contient environs 2 à 3% de mucilage et 0,05% de huiles essentielles (Czygan *et al.*, 2004). Les métabolites secondaires notamment les acides phénoliques, les flavonoïdes et les coumarines sont repartis d'une manière non homogène dans les différentes parties de la plante (feuilles, fruits) (Elansary, 2018).

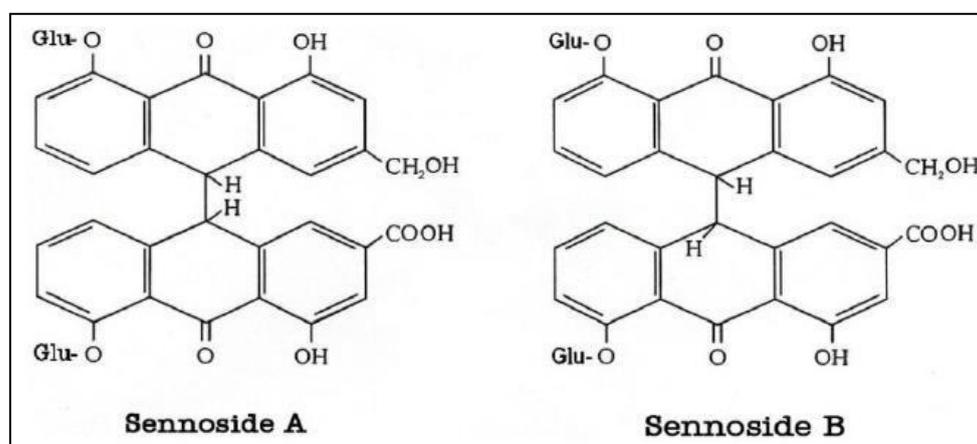


Figure 02: Structure des sennosides (Czygan *et al.*, 2004).

I.3 Usage et intérêt thérapeutique

Les feuilles et les gousses de Séné ont été depuis longtemps exploitées en phytothérapie grâce à leurs vertus laxatives et purgatives. Les feuilles sont utilisées après infusion pour traiter les constipations occasionnelles (Schemlzer *et al.*, 2008). Il a été montré que les gousses sont munies d'une activité anticancéreuse et une activité antibactérienne contre plusieurs souches tel que *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* et *Acinetobacter junii* (Ahmed *et al.*, 2016). Cette plante peut être utiliser pour les diabétiques grâce à son effet anti-hyperglycémiant (Zeeshan *et al.*, 2018).

Les sennosides en forme de dimère traversent l'estomac et l'intestin grêle sans être absorbés. Ils sont hydrolysés au niveau du colon par les enzymes de la flore bactérienne intestinale. Les dimères sont scindés en monomères qui deviennent alors actifs d'où leurs appellations de prodrogue. Le temps de latence avant l'effet est de 4 à 6 heures (temps de transit intestinale) d'où la prise de séné est conseillé le soir (Bureau, 2009).

I.4 *Cassia angustifolia* et l'immunomodulation

Les immuno-modulateurs sont des agents qui améliorent la réactivité immunitaire d'un organisme contre un pathogène en activant le système immunitaire. Certains agents stimulent l'immunité humorale et l'immunité à médiation cellulaire. D'autres activent les composants cellulaires du système immunitaire sans affecter l'immunité humorale. Les recherches faites démontrent que certains extraits méthanoliques de *C. angustifolia* Vahl. peuvent stimuler à la fois les réponses à médiation cellulaire et humorale chez les immunodéprimés. Le maximum d'effet a été à une dose de 5mg/Kg donc l'extrait de *C. angustifolia* peut être utilisé dans le traitement des maladies associées à une immunité affaiblie (Bagwe *et al.*, 2019).

Chapitre II: Les polyphénols

II.1. Définition

Les polyphénols, communément appelés composés phénoliques rangent plusieurs milliers de molécules bioactives qui ne sont pas strictement indispensables à la vie des plantes, mais qui jouent un rôle important dans l'interaction des plantes avec l'environnement (métabolites secondaires). Ces derniers n'ont été définis qu'au début des années 1980 connues par leurs structures hétérogènes ayant un point en commun, la présence d'au moins un noyau phénolique, sur lequel sont présents plusieurs groupements hydroxyles ($-OH$) (groupement phénol) (Figure 03) (Bertin, 2014).

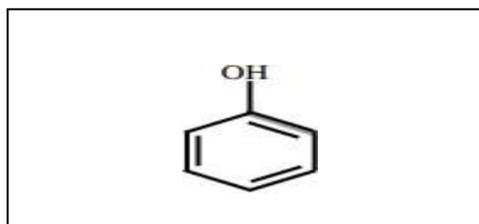


Figure 03: Structure de noyau phénolique (Achat, 2013).

II.2 Classification

La grande diversité des composés phénoliques aboutie à les subdiviser en catégories. Cette classification peut être basée sur la structure, le nombre et l'arrangement des atomes de carbone, le nombre de noyaux phénoliques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux (Achat, 2013).

II.2.1 Acides phénoliques

Ce sont des composés organiques qui possèdent au moins une fonction carboxylique et une fonction hydroxyle phénolique, représentés par deux classes différentes (Brohan *et al.*, 2011) :

- Les dérivés de l'acide hydrobenzoïque ($C_6 - C_1$) : se trouvent généralement sous forme libre ou combinée à l'état ester hétéroside. Les structures de l'acide hydrobenzoïque varient suivant les hydroxylations et les méthoxylations sur le cycle aromatique.
- Les dérivés de l'acide hydroxycinnamique ($C_6 - C_3$) : se trouvent rarement à l'état libre, ils sont souvent estérifiés, amidifiés ou combinés avec des sucres.

II.2.2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une très large gamme de composés phénoliques dont certains sont reconnus comme des pigments de végétaux (Nkhili, 2009). Ils se répartissent en plusieurs classes qu'ils ont une même origine de biosynthèse et par conséquent ils possèdent tous le même squelette de base « 2-phényl-1-benzopyrane » (Figure 04). Ils se distinguent alors par le nombre, la position et la nature de substituants sur les deux cycles aromatiques A et B et le cycle centrale C (Michel, 2012).

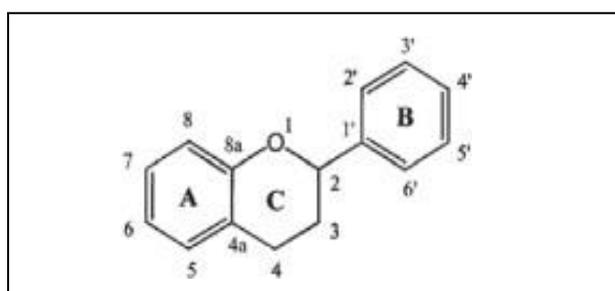


Figure 04: Structure de base des flavonoïdes (Muanda, 2010).

II.2.3 Les non flavonoïdes

a) Stilbènes

Les stilbènes sont des composés non flavonoïdes présentant une structure carbonée particulière en C6-C2-C6 (Figure 05). Cette structure de base relativement simple induit à la formation d'un grand nombre de composés qui sont différents par le nombre et la position des fonctions hydroxyles sur les cycles phénoliques, la conjugaison avec des sucres et des groupements fonctionnels divers (méthyles, méthoxyles, etc.) et la formation d'oligomères résultant de la condensation oxydative des monomères (Richard *et al.*, 2014).

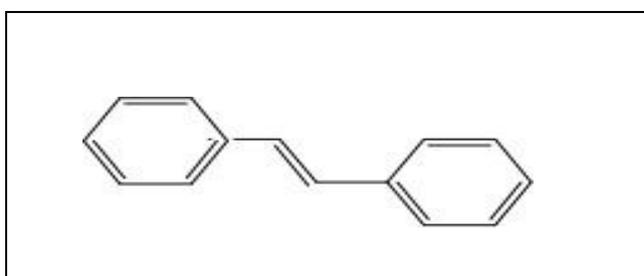


Figure 05: Structure chimique de Stilbène (Lacompagne, 2010).

b) Lignans

Les lignans sont des polyphénols qui s'accumulent dans les tissus ligneux, les graines et les racines de nombreuses plantes. Ces molécules, vraisemblablement impliquées dans les mécanismes de défense chez la plante constituent un vaste groupe de substances naturelles très répandues chez les végétaux supérieurs. Le terme lignane a été introduit pour décrire un groupe de dimères de phénylpropanoïdes dans lesquels les unités phénylpropanes sont liées par le carbone central (C8) de chaque chaîne propyle. Leur structure chimique est le résultat du couplage de deux unités dérivées du 1-phénylpropane, provenant elles-mêmes du métabolisme de la phénylalanine et de précurseur appelé monolignol (**Frédéric et al., 2008**).

c) Tanins

Ils représentent un groupe très hétérogène de haut poids moléculaire. Il n'y a pas de structure chimique de base pour ce groupe, leurs structures sont variées mais rassemblées en famille en fonction d'activité commune. Ce sont des molécules fortement hydroxylées, capables de former des complexes insolubles en association avec les glucides, les protéines et les enzymes digestives (**Lacompagne, 2010**).

Ils sont repartis en deux classes :

- Tanins hydrolysables : ces tanins sont des dimères d'acide gallique condensés sur un dérivé glycosyle. Ils comprennent l'acide gallique et les produits de condensation de son dimère, l'acide hexahydroxydiphénique. Comme leur nom l'indique, ces tanins subissent facilement une hydrolyse acide et basique, sous l'action enzymatique et de l'eau chaude (**Muanda, 2010**).
- Tanins condensés : appelés aussi proanthocyanidines ou procyanidines, les tanins condensés, sont des polyphénols de masse molaire élevée. Ils sont issus de la polymérisation des unités de flavan-3,4-diol liées par les liaisons C4-C8 (parfois C4-C6), en oligomères, dimères et polymères, ce qui leurs confère une structure voisine des flavonoïdes (**Rira, 2019**).

II.3 Biosynthèse des polyphénols

La biosynthèse a permis la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe, d'un tissu particulier, Cette biosynthèse se fait suivant deux voies de production :

- *La voie de l'acide shikimique* : cette voie conduit à la formation des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine) puis à la formation de l'acide cinnamique par désamination et de leurs dérivés : acide benzoïque et coumarines (**Benhammou, 2011**).
- *La voie issue de l'acétate* : La glycolyse et la β -oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl-CoA donnant le malonate. Cette voie induit à la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (**Bruneton, 1999**).

Chapitre III: Le stress oxydant

III.1 Le stress oxydant

La mitochondrie au niveau d'une chaîne respiratoire mitochondriale, montrée sur la figure 06, fournit aux cellules des êtres aérobies, l'énergie nécessaire pour leur bon fonctionnement par l'utilisation de l'oxygène comme substrat pour la phosphorylation de l'ADP (Adénosine Di phosphate) en ATP (Adénosine Triphosphate) qui est une molécule hautement énergétique.

Cependant une réduction incomplète de l'oxygène entraîne la formation des espèces intermédiaires très réactives, à savoir les espèces réactives de l'oxygène ou ROS (reactive oxygen speacies), qui ont un rôle physiologique non négligeable (**Haleng et al., 2007**).

Le stress oxydant apparait lors d'un déséquilibre entre la production des molécules pro-oxydantes et leur élimination en faveur de leur production (**Delatter et al., 2001**).

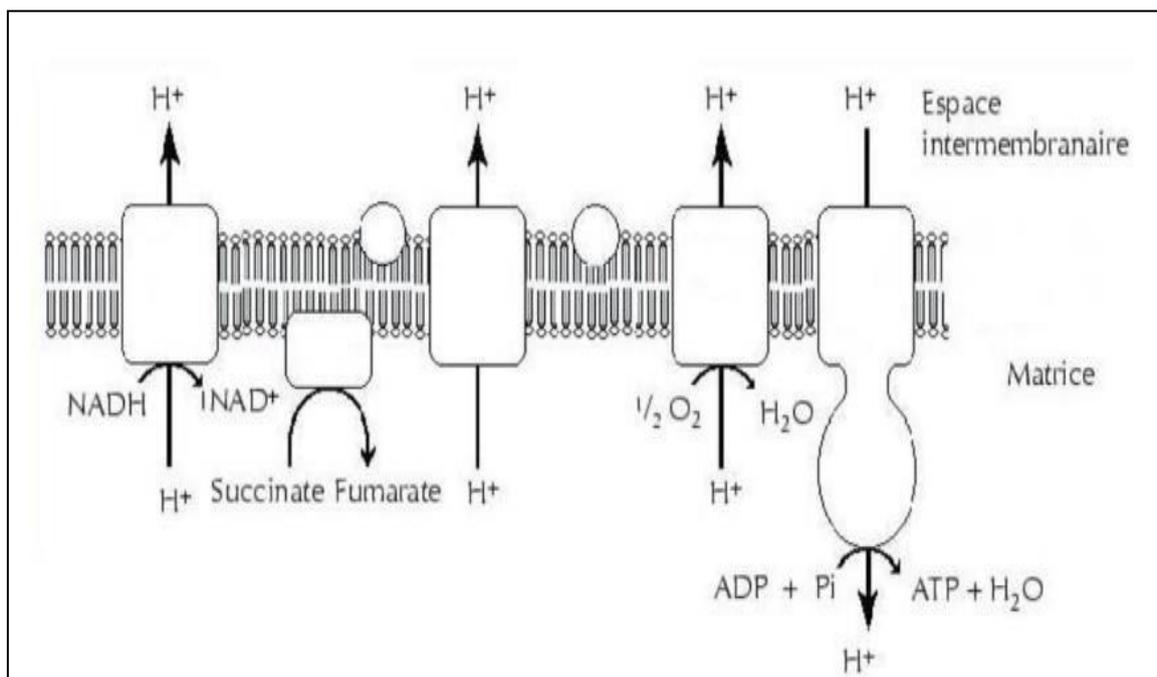


Figure 06: Représentation schématique d'une partie de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Barus, 2008**).

III.2 Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique qui possède un électron célibataire sur sa couche périphérique d'un atome d'oxygène (un électron non apparié sur son orbitale). Qui permet à la molécule d'acquérir une grande réactivité avec une demi-vie très courte (**Joëlle et Alain, 1997**). Dans le stress oxydant les radicaux libres ont une caractéristique commune, celle d'avoir un électron célibataire sur leurs atomes d'oxygène d'où leur appellation

«espèces réactives de l'oxygène » (Koechlin, 2006).

III.2.1 Les espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) est une expression utilisée pour décrire une variété de molécules et de radicaux libres dérivés des molécules d'oxygène. La réactivité de cette molécule est due à sa structure qui contient deux électrons non appariés sur sa couche externe (Pastre, 2005).

La plus grosse part de l'oxygène est utilisée par la mitochondrie pour la production de l'énergie, par contre une petite partie de cet oxygène est inévitablement convertie en ERO et des espèces réactives de l'Azote (ERA) (Figure 07) (Achat, 2013).

Ils doivent leur grande toxicité parfois de leur très grande réactivité rend difficile leur révélation sur les milieux biologiques, Le danger n'est pas seulement corrélé qu'à leur grande réactivité dans plusieurs cas, les ERO doivent leur toxicité de leur demie vie longue ce qui leur permet de se diffuser et gagner des localisations sensibles et causant des dommages à longue distance de leur site de production (Bidie *et al.*, 2003).

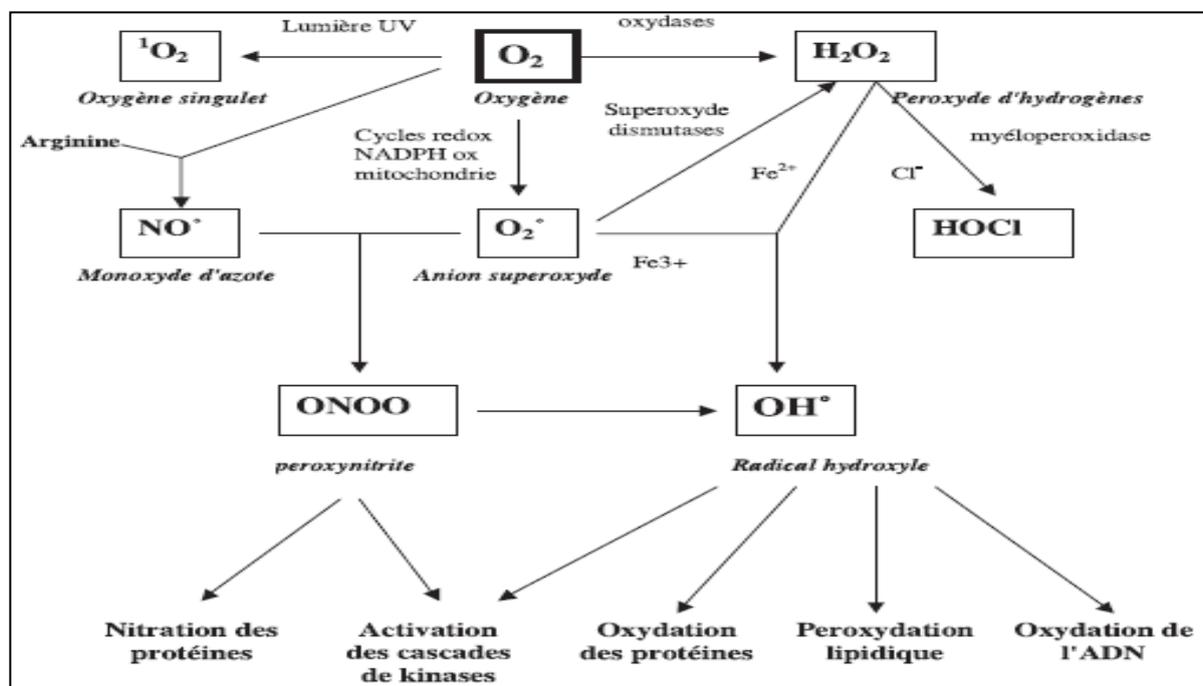


Figure 07: Processus de formation des ERO (Alian, 2003).

Les principales ERO sont des formes réduites de O_2 : l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$, réduction à 1 électron), le radical hydroxyl (OH^{\bullet} , réduction à 3 électrons), mais aussi les radicaux oxyl (RO^{\bullet}), peroxy (ROO^{\bullet}) et le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}). Les ERO incluent aussi des espèces non radicalaires, notamment le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , réduction à 2 électrons), le dioxygène singulet (1O_2), l'acide hypochloreux ($HOCl$), l'ozone (O_3) et le peroxynitrite ($ONOO^-$) (Mygdal et Serres, 2011).

III.2.2 Origines des ERO

La production des ERO est une conséquence inévitable du métabolisme aérobie. L'organisme utilise l' O_2 pour produire l'énergie au cours d'une réduction tétravalente par un processus oxydative. Une partie d'oxygène peut échapper à sa réduction en eau et être à l'origine de la production de l'anion superoxyde et ainsi d'autres ERO (Moniaque *et al.*, 2003).

Les ERO peuvent être générés sous l'effet d'agents oxydants environnementaux, citant par exemple les rayonnements (UV, X) la consommation de l'alcool, le tabagisme, les polluants chimique et industriels, les xénobiotiques, ... etc

Ces agents sont capables d'endommager et surpasser nos défenses antioxydants provoquant ainsi des dégâts cellulaires parfois irréversibles (Figure 08) (Benhammou, 2012).

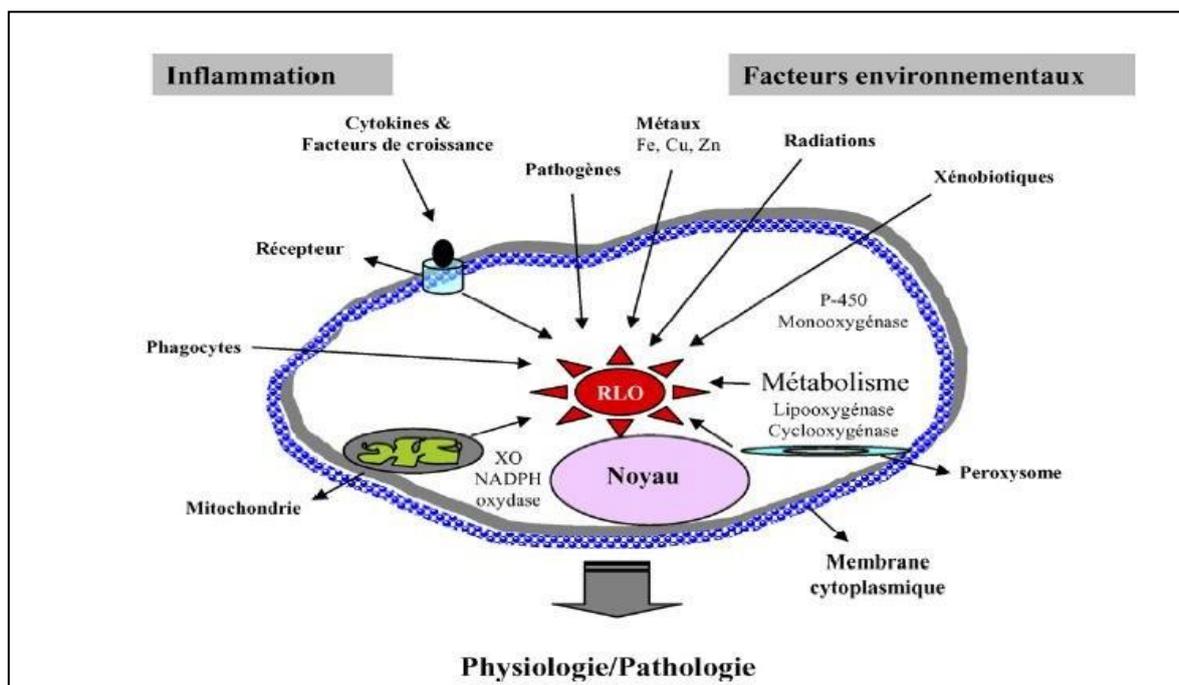


Figure 08: Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène (Valery *et al.*, 2007).

XO : xanthine oxydase ; P-450 : cytochrome P-450.

III.3 Conséquences du stress oxydant

La grande réactivité des ERO leur permet de réagir et d'atteindre toutes les molécules biologiques provoquant des altérations de l'hémostase cellulaire et un dysfonctionnement dans le système de régulation et de signalisation qui induit le déclenchement de plusieurs maladies : le diabète, les maladies cardiovasculaires, les maladies neuro-dégénératives et le cancer (**Manallah, 2012**)

- Les ERO touchant les lipides provoquant ainsi l'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) et des phospholipides membranaires par un phénomène appelé peroxydation lipidique aboutit à la formation de la plaque athéromateuse à partir de LDL oxydé provoque ainsi des maladies cardiovasculaires
- Les radicaux libres peuvent aussi réagir avec les différents acides aminés et donc altérer la structure des protéines. Les fonctions de multiples enzymes, de récepteurs et de protéines de transport cellulaire peuvent ainsi être modifiées. C'est donc toute la machinerie cellulaire qui peut être affectée (**Koechlin, 2006**).
- Les radicaux libres et en particulier OH° , peuvent s'attaquer à l'ADN. Ils réagissent avec les nucléotides. Ils peuvent mener, par exemple, à des altérations des bases azotées, à la fragmentation de l'ADN ou à des ruptures des brins. Les conséquences de ces altérations peuvent apparaître immédiatement. La cellule, entre en apoptose, en n'étant plus capable de fonctionner correctement. Cependant, ces conséquences peuvent aussi s'exprimer à long terme. Les modifications de l'expression du programme génétique de la cellule peuvent être à l'origine d'un cancer (**Achat, 2013**)

III.4 Les antioxydants

III.4.1 Définition des antioxydants

D'après **Halliwell (1999)**, les antioxydants sont définis comme : « toute substance qui en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat ». Il existe 2 classes d'antioxydants :

III.4.1.1 Les antioxydants endogènes

Ils représentant quelques enzymes endogènes de défense de l'organisme contre les radicaux libres :

a. Superoxyde dismutase (SOD)

C'est une metalloenzyme. Il s'agit d'une des premières lignes de défense contre les radicaux libres, elle diminue la durée de vie de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, et catalyse la réaction de sa transformation en peroxyde d'hydrogène (Valko *et al.*, 2006).



b. La catalase

C'est une enzyme localisée dans les peroxysomes qui peut transformer le peroxyde d'hydrogène en une simple molécule d'eau (Françoise, 2004).



c. Glutathion peroxydase

C'est une enzyme a cofacteur de sélénium, localisée dans le cytosol, le réticulum endoplasmique et dans la membrane interne des mitochondries. Elle a pour activité la dégradation des peroxydes organiques (ROOH) et de peroxyde d'hydrogène (Valko *et al.*, 2006).



III.4.1.2 Les antioxydants exogènes

Ils permettent la réduction des radicaux oxygénés qui ont pu passer les deux premières lignes de la défense. Incluant tous les antioxydants non enzymatiques capables de neutraliser seulement un radical libre par molécule. Ce sont des antioxydants naturels issus en grande partie de l'alimentation tels que : la Vitamine C, Vitamine E, Les polyphénols, les caroténoïdes et des flavonoïdes (Valko *et al.*, 2006).

III.4.2 Pouvoir antioxydant des polyphénols

Les polyphénols sont des substances très utilisées dans la médecine traditionnelle et moderne pour leurs activités antioxydantes *via* plusieurs mécanismes :

III.4.2.1 Le piégeage direct des ERO

Grâce à leur mobilité les composés phénoliques sont capables de piéger et réduire rapidement les radicaux libres oxygénés en particulier les radicaux peroxydes (ROO^{\cdot}), alkoxydes (RO^{\cdot}), superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) et les hydroxydes (OH^{\cdot}) par transfert de l'oxygène.

III.4.2.2 L'inhibition des enzymes génératrices d'EOR

L'inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres dans les systèmes biologiques est un mécanisme important des polyphénols contre le stress oxydant.

Les flavonoïdes sont les molécules les plus susceptibles d'être impliquées dans cet effet par formation de complexe inhibiteur-enzyme et/ou par piégeage direct des ERO.

Cette double action est bien mise en évidence dans le cas de la xanthine oxydase (XO), enzyme du foie impliquée dans la maladie de la goutte, et qui catalyse une réaction du catabolisme des purines, par la transformation l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique. Cette enzyme est considérée comme une source biologique importante de radical superoxyde. Les flavones et flavonols se lient à la Xanthine oxydase en compétition avec le substrat xanthine, ce qui inhibe la formation de l'acide urique (**Dangles et al., 2006**).

III.4.2.3 La chélation des ions métalliques

Dans les systèmes biologiques, les ions métalliques sont nécessaires pour le fonctionnement des processus biochimiques et physiologiques cellulaires. Ces ions peuvent être à l'origine d'une peroxydation lipidique, un stress oxydatif ou une blessure de tissu, lorsque leur mécanisme d'action n'est pas bien contrôlé, à titre d'exemple Cu^{2+} est un stimulateur de la peroxydation des LDL. Grâce à leur structure chimique spécifique, les flavonoïdes peuvent facilement chélater les ions métalliques en créant des composés complexes inactifs. La chélation des ions métalliques nécessite trois sites principaux (Figure09) (**Dangles et al., 2006**) :

- Site situé entre le groupe 3' OH et le groupe 4' OH du cycle B
- Site situé entre le groupe 3OH et 4 C=O de l'hétérocycle C
- Site situé entre le groupe 5OH du cycle A et le groupe 4C=O de l'hétérocycle C.

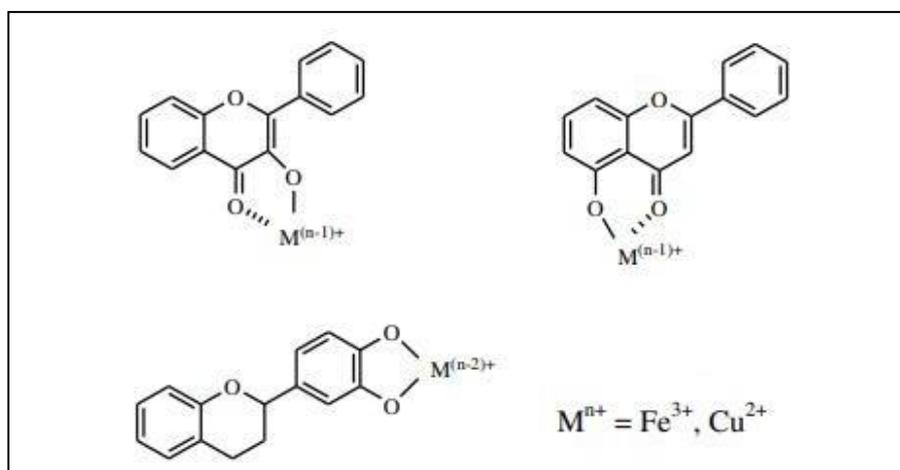


Figure 09: Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques (**Achat, 2013**).

III.4.3 Rôles des Polyphénols dans la physiologie

III.4.3.1 *Polyphénols et maladies cardiovasculaire*

Plusieurs études ont montré la relation entre la consommation des aliments riches en polyphénols et le pouvoir cardio-protecteur. Une méta-analyse basée sur 7 études suggère une réduction du risque d'infarctus du myocarde de 11% lors de la consommation de trois tasses de thé riches en polyphénols par jour. La prise de flavonols et de flavones était inversement corrélée aux taux de mortalité par les maladies coronariennes (**Sandhya et al., 2013**).

Les polyphénols agissent en bloquant l'oxydation de LDL et en améliorant le niveau du HDL sanguin prévient ainsi la formation des cellules spumeuses comme ils améliorent considérablement la fonction ventriculaire (**Sandhya et al., 2013**).

III.4.3.2 *Polyphénol et cancer*

Les polyphénols sont des éléments protecteurs des lignées de cellules cancéreuses humaines, par l'induction d'une réduction du nombre de tumeurs et de leur croissance. Plusieurs mécanismes d'action ont été identifiés citant par exemple: l'activité ostrogénique ou anti-ostrogénique, effets antiprolifératifs, induction de l'arrêt du cycle cellulaire ou de l'apoptose, prévention du stress oxydant, activité anti-inflammatoire, modification de la signalisation cellulaire. Il a été montré qu'une administration orale d'acide éllagique réduisait l'expression du facteur de transcription NF- κ B et des enzymes COX-2 et iNOS lors d'une carcinogène colique chimiquement induite chez le rat. En outre, les tumeurs sensibles aux hormones sont inhibées par la génistéine (Figure10), grâce à ses propriétés ostrogéniques expliquant ainsi en partie les effets protecteurs des isoflavones observés dans les modèles de cancers mammaires et prostatiques (**Achat, 2013**).

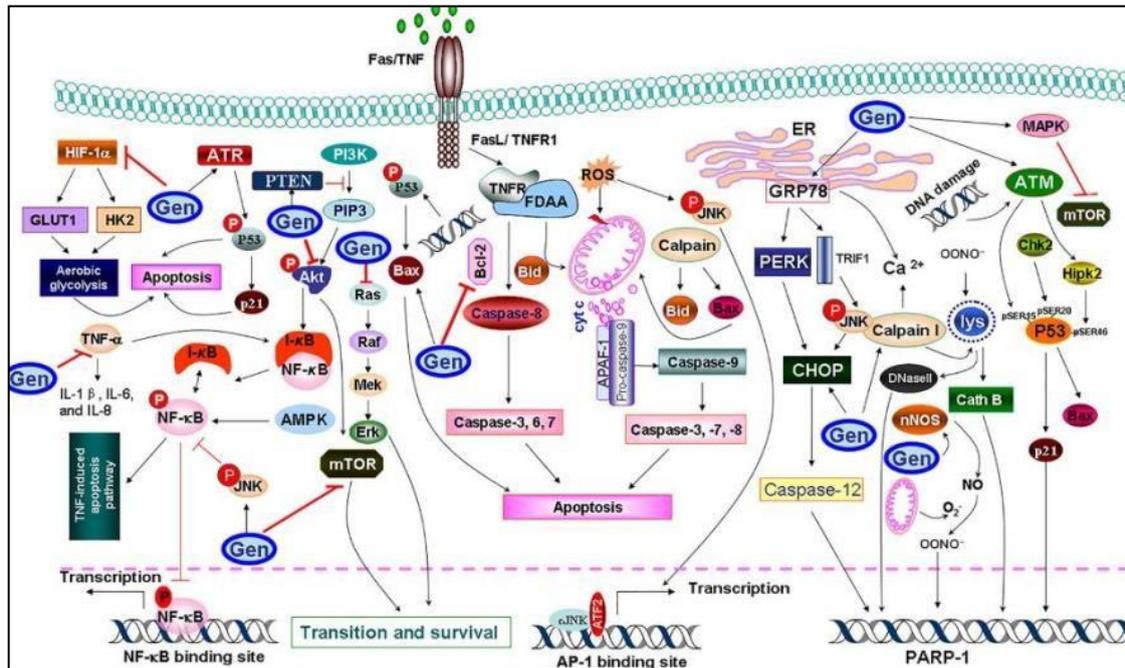


Figure10 : Schéma explicatif de mécanisme d'action de génistéine contre les cellules cancéreuses (Hardeep *et al.* , 2019).

III.4.3.3 Polyphénols et maladies neuro-dégénératives

Les polyphénols procurent des effets neuro-protecteurs grâce à diverses actions biologiques, telles que l'interaction avec les métaux de transition, l'inactivation des radicaux libres, la modulation de l'activité des différentes enzymes et les effets sur les voies de signalisation intracellulaires. Plusieurs études épidémiologiques suggèrent que les régimes riches en antioxydants jouent un rôle important dans la protection contre diverses pathologies (Ghedira, 2005).

III.4.3.4 L'activité anti-inflammatoire des polyphénols

De nombreuses études montrent que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations. Ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation athérosclérotique en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires. D'autres sont capables d'inhiber l'histamine. Les flavones et les flavonols sous forme glycosylés ou libre comme la quercétine, kaempférol, myrecétine ont une activité inhibitrice de la Cyclooxygénase-2 (COX-2) (Ghiringhelli *et al.*, 2012).

Deuxième partie :
Partie expérimentale

Chapitre IV: Matériel et méthodes

La partie pratique de ce travail devrait être réalisé *in vivo* au niveau du laboratoire du groupe Saidal, malheureusement suite à la pandémie du Covid-19, seulement la partie extraction a été réaliser au niveau de laboratoire de la faculté science de la nature et de la vie et science de la terre. La suite des étapes du Protocol ont été décrites dans la littérature.

IV.1 Matériel

IV.1.1 Matériel végétale

Ce travail a été réalisé sur les feuilles de *Cassia angustifolia* Vahl., importées de leurs pays d'origine (Inde, Pakistan). Une quantité suffisante de la plante a été achetée auprès d'un herboriste dans la région de Lakhdaria.

IV.1.2 Matériel non biologique

Le tableau suivant montre le matériel non biologique (appareillage, verreries et réactifs) utilisé pour la réalisation de ce travail.

Tableau 02: Les appareils, verreries et réactifs utilisés durant la manipulation.

Appareillage	Verreries	Réactifs
Soxhlet (BEHROTEST R104S) Balance Rota-vapeur (Stuart)	Flacons Eprouvettes Ballon chauffé de 250 ml	Ethanol 90%

IV.2 Méthodes

Le schéma suivant représente les différentes étapes réalisées durant l'expérimentation :

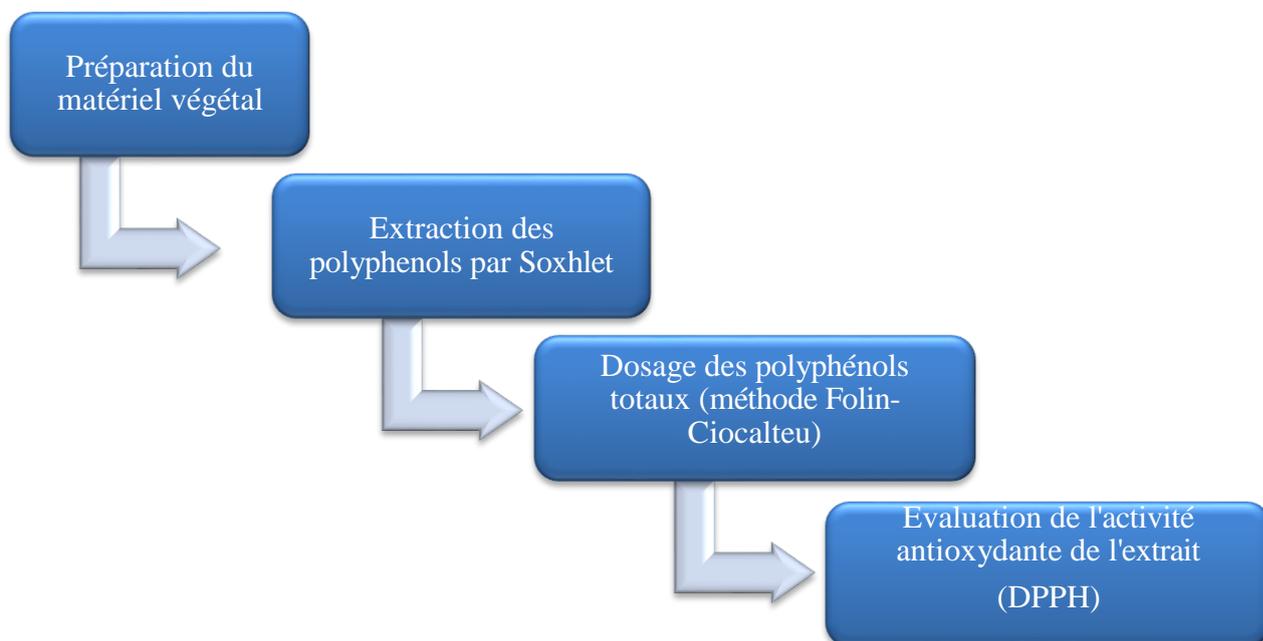


Figure 11: Schéma représentatif des différentes étapes suivies durant l'étude de l'activité antioxydante des feuilles de *Cassia angustifolia* Vahl.

IV.2.1 Préparation du matériel végétale

La partie étudiée (feuilles), achetée au préalable, a été broyée à l'aide d'un broyeur manuelle (Figure 12), puis tamisée avec un tamiseur. Une poudre verte très fine a été récupérée. Par la suite cette poudre a été conservée dans un flacon en verre à l'abri de la lumière et de l'humidité.



Figure 12: Feuilles et poudre de *Cassia angustifolia*.

IV.2.2 Préparation de l'extrait phénolique

IV.2.2.1 Généralités sur l'extraction liquide–solide

C'est une pratique très ancienne qui met en jeu des mécanismes complexes qui permettent d'extraire une substance présente dans un solide pour la faire passer dans un solvant liquide pour dissoudre le principe actif. L'extraction solide-liquide est gérée par le phénomène d'osmose qui permet au solvant de franchir la barrière végétale et le phénomène de dialyse ou de diffusion pour faire sortir le soluté (**Vercauteren et al., 1998**).

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'extraction :

- a. *La taille des particules:* Plusieurs études ont montré l'effet positif du broyage sur la qualité d'extraction. Le broyage influe sur le phénomène de transfert du solvant par l'augmentation de la surface d'échange entre le solvant et le solide (**Ben Amor, 2008**).
- b. *La nature du solvant d'extraction:* La diversité structurale du règne végétale est responsable de la variabilité des propriétés physico-chimiques des principes actifs, ce qui rend le choix du solvant, un élément crucial pour réussir à l'extraction (**Mahmoudi et al., 2012**). Le choix du solvant est guidé par la polarité des composés d'intérêts et la solubilité des principes actifs dans le solvant (**Vercauteren et al., 1998**).
- c. *La température:* Dans la plupart des cas la température élevée influe positivement sur le rendement de l'extraction, en raison que la chaleur perméabilise les parois cellulaires en conséquence elle augmente la solubilité des substances à extraire. La température d'extraction est définie par le point d'ébullition du solvant. En outre cette température peut causer la détérioration des molécules thermolabiles ainsi qu'à l'augmentation de la viscosité du milieu (**Leybros et Frémeaux, 1990**).
- d. *Le temps d'extraction:* la quantité des substances extraites est généralement liée au temps d'extraction (le temps nécessaire à la pénétration du solvant dans la matière végétale et pour la dissolution des composés) (**Ben Amor, 2008**).

IV.2.2.2 Extraction des polyphénols par Soxhlet

L'extraction par Soxhlet est une méthode conventionnelle qui a été depuis longtemps utilisée grâce à sa grande performance par rapport à d'autres méthodes (**Luque de Castro et Garcia-Ayuso, 1998**). Le dispositif de Soxhlet, montré en figure 13, est composé de plusieurs compartiments essentiels à l'extraction. Une cartouche dans laquelle se trouve la

matière végétale, un ballon qui contient le solvant porté à ébullition par une source de chaleur et le solvant frais condensé dans la cartouche (Dean, 2010). Quand le liquide atteint le niveau de débordement, un siphon aspire la solution de la cartouche et la décharge de nouveau dans le ballon à distiller, portant les corps dissous extraits dans le liquide en bloc. Dans le ballon, le corps dissous (soluté) est séparé du solvant par distillation. Le soluté reste dans le flacon et le solvant frais passe de nouveau dans le lit de solide. L'opération est répétée jusqu'à épuisement totale de la matière (Luque-Garcia et Luque de Castro, 2004).

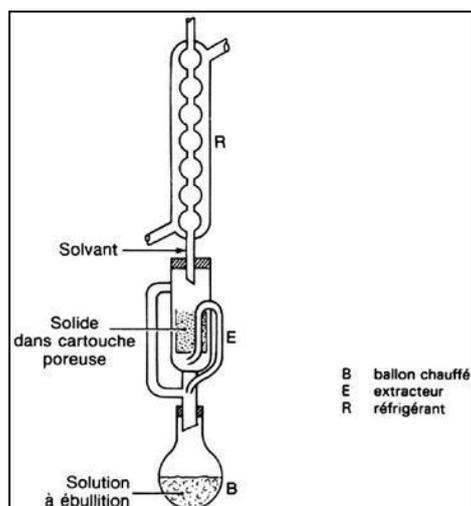


Figure13: Schéma de l'appareil Soxhlet (Poirot, 2007).

➤ Mode opératoire

Après la préparation de la poudre de Séné, une quantité de 20g a été introduite à l'intérieure de la cartouche, avec un volume de 200 ml d'éthanol mis dans le ballon chauffé à une température de 70°C. Les vapeurs émet passe par le siphon, forment des gouttelettes en passant par le réfrigérant, qui vont traverser la cartouche contenant le Séné. Le soluté est par la suite éliminé dans le ballon lors de débordement du siphon. L'extraction a duré 6 heures jusqu'à l'épuisement total de la matière. L'extrait a été récupéré dans un flacon en verre et le solvant a été éliminé en utilisant le rota-vapeur.

IV.2.2.3 Dosage des polyphénols Totaux

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange entre l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit par les polyphénols en oxyde de tungstène et de molybdène de couleur bleue. L'absorption maximale est à 760nm et elle est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans l'extrait (Collin et Crouzet, 2011).

Chapitre V : Activité antioxydante de *Cassia angustifolia* Vahl.

L'extrait des feuilles de *Cassia angustifolia* Vahl. a été récupéré dans un flacon. La suite des étapes expérimentales, à savoir: le screening phytochimique, le dosage des polyphénols totaux et l'évaluation de l'activité antioxydante *in vivo* auraient dû être réalisés au niveau de laboratoire Sidal mais à cause des conditions de confinement, la partie expérimentale de ce travail n'a pas pu être accomplie.

Pour cela nous avons opté à faire une analyse bibliographique de l'activité antioxydante de la plante d'intérêt pour procéder par la suite à commenté et même comparer entre les résultats obtenus.

V.1 Screening phytochimique des feuilles de *Cassia angustifolia* Vahl.

Des études rapportant le screening phytochimique des feuilles de *C. angustifolia* Vahl. ont montré que l'extrait des feuilles contient les composés suivants: les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tannins, les coumarines et les anthraquinones. La présence des alcaloïdes et des stéroïdes a été également signalé (Ahmed *et al.*, 2016). De plus, l'étude qualitative réalisée par Zeeshan *et al.* (2018) sur les feuilles de cette plante a révélé la présence des anthocyanes, des flavonoïdes, des tannins et des acides phénoliques. Par ailleurs, les travaux réalisés par Larfi et Mahfoud (2019) ont montré la présence des tanins, des anthraquinones libres (Sennosides A et B), les saponosides et les alcaloïdes. Ces composés sont retrouvés en teneurs différentes dans les différentes parties de cette plante.

Les résultats rapportés par ces études montrent clairement la richesse des feuilles de *C. angustifolia* en substances bioactives.

V.2 Extraction des polyphénols

V.2.1 Rendement de l'extraction

Le rendement de l'extraction est calculé selon la formule suivante :

$$R\% = (M_1 - M_0/M) \times 100$$

Avec :

R% : Le rendement de l'extraction en (%).

M₀ : Masse du bécher vide (g).

M₁ : Masse du bécher avec l'extrait après évaporation (g).

M : Masse de matière sèche (g).

D'après une étude réalisée par **Bourgou *et al.* (2016)**, sur l'effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. Quatre solvants de polarité croissante ont été employés pour l'extraction des composés phénoliques à partir d'*Euphorbia helioscopia*, à savoir l'éthanol (polarité de 5,2), l'acétone (polarité de 5,4), le méthanol (polarité de 6,6) et l'eau (polarité de 9,0). Les résultats indiquent que les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux varient significativement selon le solvant utilisé, avec des teneurs allant de 2,77 mg EAG.g⁻¹ MS à 28,5 mg EAG.g⁻¹ MS pour les polyphénols totaux et de 5,66 à 30,70 mg EQ.g⁻¹ MS pour les flavonoïdes totaux. Concernant la méthode d'extraction, d'après les résultats obtenus, une amélioration du rendement par extraction par sonication (2,50% pour l'acétone à 70%) et 2,20% pour l'éthanol à 70%) comparée à la macération (2,25% pour l'acétone à 70% et 1,85% pour l'éthanol à 70%) alors qu'on assiste à une baisse des rendements lors de l'utilisation du Soxhlet (1,20% pour l'acétone à 70% et 1,70% pour l'éthanol à 70%). La macération et le Soxhlet sont considérés comme étant des méthodes conventionnelles d'extraction des composés phénoliques approuvées par divers auteurs pour leurs efficacités (**Bourgou *et al.*, 2016**).

Le rendement de l'extraction est lié à la nature du solvant d'extraction et à la méthode choisie pour l'extraction, mais d'autres paramètres ont une influence comme la température et le temps d'extraction (**Penchev *et al.*, 2010**).

Les composés sont extraits selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction. Pour cela, il est difficile de comparer les résultats de la bibliographie. Le rendement est relatif et dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée.

V.2.2 Dosage des polyphénols totaux

L'évaluation de la concentration des polyphénols totaux a été effectuée par la méthode de Folin-Ciocalteu (**Collin et Crouzet, 2011**). Dans les travaux d'**Ahmed *et al.* (2016)**, l'extraction des polyphénols a été effectuée par macération en utilisant plusieurs solvants d'extraction: éthanol, acétone et éthyle d'acétate (tableau 03). Les résultats ont montré des teneurs importantes en polyphénols dans l'extrait éthanolique. Les teneurs en polyphénols sont exprimées en mg EAG/g d'extrait, après l'utilisation d'une équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique [$y = 0,504x$ ($R^2 = 0,991$)].

Différentes études ont montré que la teneur en composés phénoliques est tributaire de plusieurs facteurs extérieurs (facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques,

mais aussi le degré de maturation de la plante et la durée de stockage (**Aganga et Mosase, 2001; Bouzid et al., 2010; Merouane et al., 2014; El Hazzat et al., 2015**).

Tableau 03: Les résultats des teneurs en polyphénols totaux dans l'extrait des feuilles de *C. angustifolia* Vahl., extraits par différents solvants (**Ahmed et al., 2016**).

Solvant utilisé	Teneurs en polyphenols totaux (mg EAG /g d'extrait)
Ethanol	1,769 ± 0,001**
Acétone	1,535 ± 0,004**
Ethyl acétate	1,318 ± 0,002*

(**), et (*) signifiant au niveau $P \leq 0,001$ et $0,01$, respectivement

Une autre étude réalisée par **Bellassoued et al. (2019)** sur les feuilles de *C. angustifolia* a montré que la teneur des polyphénols totaux était égale à $4,38 \pm 0,08$ mg EAG/g d'extrait ($P \leq 0,001$). De plus, **Larfi et Mahfoud (2019)**, après extraction par Soxhlet, ont trouvé des teneurs nettement supérieures par rapport à d'autres études avec une valeur de $107,208 \pm 15,208$ mg EAG/g d'extrait de feuilles.

Les résultats des études précédentes ont permis d'observer une différence significative entre les résultats de la teneur des polyphénols totaux, ce qui indique que la méthode d'extraction et la nature du solvant ont un impact sur le rendement et la teneur en polyphénols.

V.2 Evaluation de l'activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron. La forme non radicalaire DPPH-H (2,2-diphényl-1-1-picrylhydrazine) est formée. L'activité antioxydante des extraits est exprimée en IC_{50} . Ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats. Il définit la concentration d'extrait de la plante responsable de 50% d'inhibition des radicaux DPPH. Il est déterminé sur le graphique représentant le pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des extraits (**Bidie et al., 2011**). Plus cette valeur est faible, plus le composé est antioxydant (**Belkheiri, 2010**).

✓ L'activité antioxydante de l'extrait des graines

Plusieurs travaux ont rapporté le pouvoir antioxydant de *C. angustifolia*. L'activité antioxydante a été démontrée pour plusieurs extraits des différentes parties de la plante à savoir les feuilles, les fleurs et les graines. L'extrait méthanolique des graines de *Cassia* a

montré un puissant pouvoir antioxydant. Il a été rapporté qu'elle présente une plus forte activité antioxydante par rapport à l'Alphatocophérol (vitamine E). Les composants phénoliques, l'alaternine et la nor-rubrofusarine glucoside isolés à partir d'un extrait de l'espèce de *Cassia* ont également montré un puissant pouvoir antioxydant (**Chakrabarty et Chawla, 1983; Shivjeet et al., 2013; Ishtiaq Ahmed et al., 2016**).

✓ *L'activité antioxydante de l'extrait des feuilles*

De nombreux travaux ont montré que les feuilles de *C. angustifolia* sont douées d'une activité antioxydante (**Laghari et al., 2011; Bellasoued et al., 2019; Ahmed et al., 2016**) dont la valeur est variable selon les conditions d'extraction (méthode d'extraction, nature du solvant, température, temps d'extraction). Toutefois, une étude effectuée sur les feuilles de *Cassia fistula* a démontré que l'activité antioxydante de cette dernière est faible lors d'une extraction par Soxhlet, par rapport à celle effectuée par une simple macération. Cela pourrait être attribuée à la décomposition thermique des polyphénols (**Cheng et al., 2006**). Il a été également montré que les fractions aqueuses d'éthanol (70%) des feuilles de *C. angustifolia* sont très riches en flavonoïdes présentant une forte activité antioxydante (**Laghari et al., 2011**).

✓ *L'activité anti-oxydante de l'extrait de fleurs*

Il a été montré que les fractions aqueuses d'éthanol (70%) des fleurs de *C. angustifolia* sont très riches en flavonoïdes doués d'une forte activité antioxydante (**Laghari et al., 2011**). La teneur en flavonoïdes totaux varie légèrement d'un extrait éthanolique d'un organe de la plante à un autre (**Evenamede et al., 2017**).

✓ *L'activité anti-oxydante de l'extrait de l'écorce de *Cassia angustifolia* vahl.*

Les valeurs d'IC₅₀ (concentration inhibitrice à 50%) obtenues (Figure16) dans les travaux d'**Evenamede et al. (2017)** sur les extrait des feuilles, des racines et des écorces, ont permis de classer la capacité de piégeage du radical DPPH par les extraits testés par rapport à la quercétine (molécule de référence pour le test DPPH) et entre elles. Les extraits éthanoliques des écorces du tronc et des racines ont une activité anti-radicalaire semblable de 43,79 et 43,39 µg/mL, respectivement, et une valeur de 47,44 µg/mL pour les feuilles. Ces deux extraits sont plus antioxydants que l'extrait éthanolique de la feuille, le pouvoir antioxydant étant inversement proportionnel à la valeur de l'IC₅₀. La quercétine ayant l'IC₅₀ le plus faible, soit 17,19±1,690 µg/mL, présentant alors la plus grande activité anti-radicalaire

comparativement aux autres extraits éthanoliques testés.

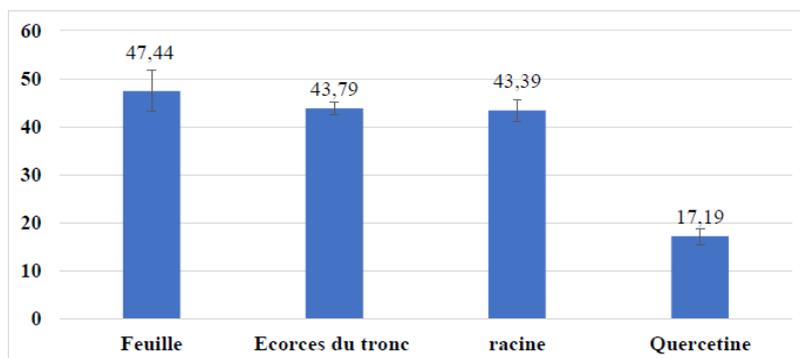


Figure 16: Résultats du test DPPH : IC₅₀ (µg/ml) (Evenamede *et al.*, 2017) .

Le même travail indique que l'activité antioxydante des extraits, est due à la contribution des composés phénoliques (Figure 17), qui sont les antioxydants dominants dans ces extraits. La teneur en phénols totaux des extraits de *C. sieberiana* s'est corrélée significativement avec leurs activités anti-radicalaires. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par d'autres auteurs qui ont démontré une corrélation positive entre la teneur totale des composés phénoliques et l'activité antioxydante (Djeridane *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2006; Turkmen *et al.*, 2007; Wojdylo *et al.*, 2007).

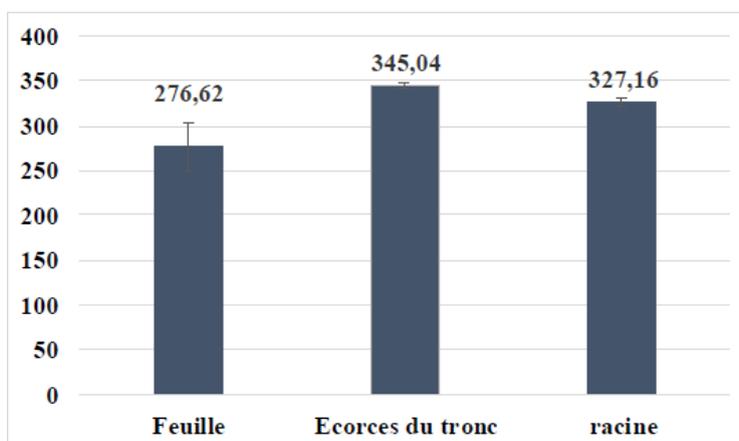


Figure 17: Quantité de polyphénols des extraits phénolique des différentes parties de *C. sieberiana* (mg EAG/g) (Evenamede *et al.*, 2017).

Conclusion et perspectives

La connaissance et l'usage des plantes médicinales constituent un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique est très accentuée dans ces dernières années grâce aux thérapeutiques qu'elles procurent. Cette diversité en propriétés biologiques est liée certainement aux vertus thérapeutiques attribuées à une gamme extraordinaire de molécules bioactives synthétisées par la plante non seulement comme des agents chimiques contre les maladies, les herbivores et les prédateurs mais aussi comme des agents médicinaux tels que les antioxydants.

Cassia angustifolia Vahl. est largement utilisée en médecine traditionnelle en raison de son potentiel thérapeutique. Les études précédentes ont montré que l'extrait éthanolique des feuilles de *Cassia angustifolia* Vahl. est doué d'une forte activité antioxydante, qui est liée en grande partie à sa richesse en composées phénoliques, repartis d'une façon non homogène dans tous les organes de cette plante.

Toutefois, le pouvoir antioxydant de cette plante est influencé par la méthode, la nature du solvant et les conditions d'extraction.

A la lumière de toutes ces données, l'importance de *C. angustifolia* est liée sa forte activité antioxydante, sa teneur totale en polyphénols, surtout des flavonoïdes en font une meilleure alternative aux agents antioxydants synthétiques et aux sources de flavonoïdes. Il serait intéressant d'explorer et de caractériser les autres métabolites et d'étudier les autres activités pharmacologiques *in vitro et in vivo* à savoir l'activité anti-tumoral, anticancéreuse, et même caractériser et isoler les groupes responsables de ces activités pharmacologiques.

Références bibliographiques

« A »

- Achat, S. (2013, November). Polyphénols de l'alimentation: extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. Avignon.
- Ahmed, S. I., Hayat, M. Q., Tahir, M., Mansoor, Q., Ismail, M., Keck, K., & Bates, R. B. (2016). Pharmacologically active flavonoids from the anticancer, antioxidant and antimicrobial extracts of *Cassia angustifolia* Vahl. *BMC complementary and alternative medicine*, 16(1), 460.
- Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., & Lomri, A. (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases: rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du rhumatisme*, 74(7), 636-643.
- Albert, M. G., Rousselot, D. B., Abedinzadeh, Z., & Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène: Comment l'oxygène peut-il devenir toxique. *L'Actualité Chimique*, 11-12.

« B »

- Barouki, R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. *médecine/sciences*, 22(3), 266-272.
- Barus, C. (2008). Etude électrochimique de molécules antioxydantes et de leur association en milieux homogène et biphasique-Application aux produits dermocosmétiques (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- Bagwe, A., Bangi, S., Nete, S., Maiti, S., & Ragade, V. (2019). *World Journal of Pharmaceutical Sciences*.
- Beaudeau, J. L., Peynet, J., Bonnefont-Rousselot, D., Therond, P., Delattre, J., & Legrand, A. (2006, November). Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote: Implication dans la transcription et la régulation des gènes. In *Annales pharmaceutiques françaises* (Vol. 64, No. 6, pp. 373-381). Elsevier Masson.
- Bellassoued, K., Hamed, H., Ghrab, F., Kallel, R., Van Pelt, J., Makni Ayadi, F. & Elfeki, A. (2019). Antioxidant and hepatopreventive effects of *Cassia angustifolia* extract against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats, *Archives of Physiology and Biochemistry*, DOI:10.1080/13813455.2019.1650778.
- Ben Amor, B. (2008). Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction des principes actifs: texturation par détente instantanée contrôlée (DIC) (Doctoral dissertation, La Rochelle).
- Benhammou, N. (2012). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques

Références bibliographiques

de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien (Doctoral dissertation).

- Bertin, É. (2014). Les polyphénols, des actions bien au-delà du resvératrol et des effets anti-oxydants !. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 49(4), 139-140.
- Bidie, A. P., N'Guessan, B. B., Yapo, A. F., N'Guessan, J. D., & Djaman, A. J. (2011). Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences & Nature*, 8(1-2), 1-12.
- Boizot, N., Charpentier, J. P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra* : 79-82.
- Bourgou, 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*. *Journal of New Sciences*, 28.
- Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4^e éd.). *Tec & Doc/Lavoisier, Paris*, 279-281.
- Bureau, L. (2012). *La phytothérapie pertinente*. ALTAL Éditions.

« C »

- Carrière, A., Galinier, A., Fernandez, Y., Carmona, M. C., Pénicaud, L., & Casteilla, L. (2006). Les espèces actives de l'oxygène: le yin et le yang de la mitochondrie. *médecine/sciences*, 22(1), 47-53.
- Cheng, Z., Su, L., Moore, J., Zhou, K., Luther, M., Yin, J. J., & Yu, L. (2006). Effects of postharvest treatment and heat stress on availability of wheat antioxidants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(15), 5623-5629.
- Collin, S., & Crouzet, J. (2011). *Polyphénols et procédés: Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire*. Lavoisier.
- Czygan, F. C. (2004). *Herbal drugs and phytopharmaceuticals: a handbook for practice on a scientific basis*. CRC Press.
- De Castro, M. L., & Garcia-Ayuso, L. E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica chimica acta*, 369(1-2), 1-10.

« D »

- Defraigne, J. O., & Pincemail, J. (2008). Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. *Revue médicale de Liège*, 63, 10-19.
- Delattre, J., Gardès, M., & Jore, D. (2001). Stress oxydant et diabète sucré. *Journal de la Société de Biologie*, 195(4), 375-376.

Références bibliographiques

- Doat, J. (1978). Les tanins dans les bois tropicaux. *BOIS & FORETS DES TROPIQUES*, 182(182), 37-54.

« F »

- Favier, A. (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique*, (11/12), 108-117.

« G »

- Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., & Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique*, 91.
- Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169.
- Ghiringhelli, F., Rebe, C., Hichami, A., & Delmas, D. (2012). Immunomodulation and anti-inflammatory roles of polyphenols as anticancer agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 12(8), 852-873.
- Goudable, J., & Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition clinique et métabolisme*, 11(2), 115-120.
- Groussard, C. (2006). Stress oxydatif et exercice anaérobie. *Science & sports*, 21(2), 62-67.
- Guillouty, A. (2016). *Plantes médicinales et antioxydants* (Doctoral dissertation, Université Toulouse III-Paul Sabatier).

« H »

- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-38.
- Halliwell, B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free radical research*, 31(4), 261-272.
- Hazout, A.; Menezo, Y.; Madelenat, P.; Yazbeck, C.; Selva, J.; Bacrie, C.P. Causes et implications cliniques des altérations de l'ADN des spermatozoïdes, *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 36,2008 ; 1109–1117.
- Heinrich, M., Barnes, J., Prieto-Garcia, J., Gibbons, S., & Williamson, E. M. (2017). *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy E-Book*. Elsevier Health Sciences.

« K »

- Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies

Références bibliographiques

respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4), 165-177.

« L »

- Lacampagne, S. (2010). *Localisation et caractérisation des tannins dans la pellicule du raisin: Etude de l'impact de l'organisation physico-chimique des parois cellulaires sur la composante tannique, la qualité du fruit et la typicité des raisins de Bordeaux* (Doctoral dissertation, Thèse Doct. Université, Bordeaux 2).
- Laghari, A. Q., Memon, S., Nelofar, A., & Laghari, A. H. (2011). Extraction, identification and antioxidative properties of the flavonoid-rich fractions from leaves and flowers of *Cassia angustifolia*. *American Journal of Analytical Chemistry*, 2(08), 871.
- Lamblin, F., Hano, C., Fliniaux, O., Mesnard, F., Fliniaux, M. A., & Lainé, É. (2008). Intérêt des lignanes dans la prévention et le traitement de cancers. *médecine/sciences*, 24(5), 511-520.
- Laplante, M. A. (2007). La production de l'anion superoxyde par l'angiotensine, l'endothéline et les voies de signalisation dépendantes de l'acide arachidonique dans les tissus vasculaires dans le développement de l'hypertension.
- Larfi, S., & Mahfoud, A. (2019). L'étude de l'action anti-hydatique et antioxydante de l'extrait des feuilles et des fruits de *Cassia angustifolia* Vahl.
- Leverage, X. (2009). Stress oxydant et antioxydants?. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 44(5), 219-224.

« N »

- Nkhili, E. Z. (2009). Polyphénols de l'Alimentation: Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. *Diplôme de doctorat Spécialité: Sciences des Aliments, Université d'avignon et des pays de vaucluse*, 13-16.

« M »

- Manallah, A. (2012). Activités antioxydant et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive. *Mémoire de magister, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Ferhat Abbas, Sétif, Algérie*.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. PPUR presses polytechniques.
- Marc, F., Davin, A., Deglene-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M., & Fritsch, P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *M/S*:

Références bibliographiques

médecine sciences, 20(4), 458-463.

- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol*, 26(2), 211-219.
- Michel, J. (2012). *Classification et influences des polyphénols du bois de chêne sur la qualité sensorielle des vins (Application du procédé OakScan®)* (Doctoral dissertation, Université de Bordeaux Ségalen (Bordeaux 2)).
- Migdal, C., & Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*, 27(4), 405-412.
- Muanda, F. N. (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. *Thèse de doctorat en Chimie organique. Ecole doctorale SESAMES Université Paul Verlaine-Metz*, 294.

« P »

- Papuc, C., Goran, G. V., Predescu, C. N., Nicorescu, V., & Stefan, G. (2017). Plant polyphenols as antioxidant and antibacterial agents for shelf-life extension of meat and meat products: Classification, structures, sources, and action mechanisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(6), 1243-1268.
- Pastre, J. (2005). *Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques* (Doctoral dissertation).
- Pierangeli, G., Vital, G., Windell Revera, L.J. (2009).. *Plants Res*, (3)7, 511.
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., & Defraigne, J. O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16(4), 233-239.
- Popovici, C., Saykova, I., Tylkowski, B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre. *Rev Gen Indus*, 4, 25-39.

« R »

- Richard, T., Tamsamani, H., Delaunay, J. C., Krisa, S., & Mérillon, J. M. (2014). Stilbènes: de la chimie à la neuroprotection. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 49(4), 173-180.
- Rira, M. (2019). *Les tanins hydrolysables et condensés: une piste pour la réduction de la production du méthane entérique par les ruminants en milieu tropical* (Doctoral dissertation, Université Clermont Auvergne).

Références bibliographiques

« S »

- Săvulescu, E., Georgescu, M. I., Popa, V., & Luchian, V. (2018, July). Morphological and Anatomical Properties of the *Senna Alexandrina* Mill. (*Cassia Angustifolia* Vahl.). In “*Agriculture for Life, Life for Agriculture*” Conference Proceedings (Vol. 1, No. 1, pp. 305-310). Sciendo.
- Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 215S-217S.
- Simon, H. U., Haj-Yehia, A., & Levi-Schaffer, F. (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, 5(5), 415-418.
- Sofowora, E. A. (1982). *Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa* Wiley. New York.
- Srivastava, M., Srivastava, S., & Rawat, A. K. S. (2010). Chemical standardization of *Cassia angustifolia* Vahl seed. *Pharmacognosy Journal*, 2(13), 554-560.

« T »

- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*, 552(2), 335-344.

“Y”

- Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M., & Matar, C. (2018). The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*, 10(11), 1618.

“Z”

- Zeeshan, U., Barkat, M. Q., & Mahmood, H. K. (2018). *Phytochemical and antioxidant screening of Cassia angustifolia, Curcuma zedoaria, Embelia ribes, Piper nigrum, Rosa damascena, Terminalia belerica, Terminalia chebula, Zingiber officinale* and their effect on stomach and liver. *Matrix Sci. Pharma*, 2(2), 15-20.

Résumé

Cassia angustifolia Vahl. est une plante utilisée depuis longtemps comme laxative. Les études récentes ont pu montrer son activité antibactérienne, antifongique et anticancéreuse. Cette étude consiste à une étape d'extraction des polyphénols à partir des feuilles de la plante par l'utilisation du «Soxhlet» comme la méthode d'extraction avec l'éthanol comme solvant. L'extrait éthanolique obtenu est concentré par rota-vapeur. D'après les études déjà effectuées, le screening phytochimique a révélé la présence d'une variété de molécules bioactives, à savoir: les acides phénoliques, les flavonoïdes, les coumarines et l'anthraquinone (sennosides A, B et C), ce qui explique son activité thérapeutique et son utilisation en médecine traditionnelle. Les polyphénols totaux ont été dosés par la méthode de Folin-Ciocalteu. Le taux a été différent d'une étude à une autre en changeant la méthode et le solvant d'extraction. La deuxième partie porte sur l'évaluation de l'activité antioxydante de *Cassia* par l'utilisation du radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), au moyen colorimétrique. L'activité anti-radicalaire des différentes parties de la plante a été confirmée à travers plusieurs études.

Mots clés : *Cassia angustifolia* Vahl., Polyphénols, activité antioxydante, DPPH, extraction, extrait éthanolique.

Abstract

Cassia angustifolia Vahl. is a plant that has long been used as a laxative. Recent studies have been able to show its antibacterial, antifungal and anticancer activities. This study consists in evaluating the antioxidant activity of the polyphenols extracted from the leaves of the plant by the use of "Soxhlet" as an extraction method, and ethanol as a solvent. The ethanolic extract obtained is concentrated by rota-vapor. According to research, phytochemical screening revealed the presence of a variety of bioactive molecules, namely: phenolic acids, flavonoids, coumarins, anthraquinone (sennosides A, B and C), and this richness in biomolecules confers biological activities of therapeutic interest in traditional medicine. Total polyphenols were measured by the Folin-Ciocalteu method. The rate was different from one study to another depending on the method and the extraction solvent. The second part concerns the evaluation of the anti-oxidant activity of *Cassia* by the use of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical, by colorimetric means. The anti-free radical activity of the different parts of the plant has been confirmed through several studies.

Keywords: *Cassia angustifolia* Vahl., polyphenols, antioxidant activity, DPPH, extraction, ethanolic extract .

ملخص

هذا العمل هو عبارة عن مساهمة في دراسة القدرة المضادة للأكسدة لأوراق سني مكّي هذه النبتة المستعملة منذ القدم في الطب الطبيعي حيث بينت الدراسات قدرتها المضادة للبكتيريا، و الفطريات كما بينت قدرتها على اتلاف الخلايا السرطانية. بداية تم استخراج المواد الفعالة من أوراق السني مكّي , باستخدام السوكسليت مع محلول الإيثانول فمن خلال عدة دراسات نوعية لمركبات النبتة يولحظ وجود عدة انواع من البوليفينولات مثل: الفالفونات, الكومارينات, السينوزيدات المسؤولة عن فوائدها و التي تشرح سبب استعمالها في الطب الموازي. كما تم قياس نسبة هذه البوليفينولات الكلية باستخدام طريقة الفوالن سيوكالتو. اختلفت النتائج من دراسة الى اخرى باختلاف الطريقة و المحلول المستخدم في الاستخراج. تم استخدام طريقة لقياس الفعالية المضادة للأكسدة حيث لوحظ من خلال عدة دراسات سابقة ان قدرة الاوراق المضادة للأكسدة مرتبطة بكميات البوليفينولات و خاصة الفلافونوات التي بدورها تتأثر بظروف الاستخراج مثل الآلية المستخدمة لاستخلاص المواد الفعالة , المحلول و درجة الحرارة .

الكلمات الدالة : سني مكّي , البوليفينولات , الفعالية المضادة للأكسدة , DPPH , استخراج , مستخلص إيثانولي.