



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Biochimie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :
Ibtissam KHAMMAR

Le : mercredi 10 juillet 2019

Thème

Détermination de l'activité antioxydant des extraits de *Cassia angustifolia* Vhal.

Jury :

Mme. Rima ABSI	MAA	Université de Biskra	Président
M. Abdelouahab DEHIMAT	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme. Nabila FETITI	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2018 - 2019

Remerciements

A l'issue de ce travail, nous tenons à exprimer notre remerciement et nos profondes gratitudes avant tout :

A Dieu le tout puissant qui nous a donné le courage, la force et la patience pour mener à bien ce travail.

Je remercie les membres de jury Mme. Rima ABSI et Mme. Nabila FETITI d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie chaleureusement tous les membres du laboratoire de faculté, pour leur sympathie et leur disponibilité.

Je tiens à remercier particulièrement Mr. Dehimat Abdelouahab mon encadreur, pour avoir accepté de diriger ce travail, pour ses précieux conseils, son aide, ses suggestions sur la rédaction de ce mémoire.

Mes remerciements vont également à tous mes enseignants, pour les informations et les aides au cours des années de mes études.

Merci

Dédicaces

A l'aide de Dieu, je réalise ce modeste travail que je dédie

A mes chers parents et qui ont sacrifié leur vie pour

Notre réussite. J'espère qu'un jour je pourrai leurs rendre un

peu de ce qu'ils ont fait pour moi, que dieu leur prête

bonheur et longue vie

A mes chers frère Mohamed, Abd Allah Khalil, Chafii et Abd Alwadoud

*A mes très chère sœurs Asma, Ikram, Meriem, Nafissa, Romaila, Safa,
Salima.*

A mes très chères grandes mères et pères

A mes cousins et cousines Amina et Selma.

A toute ma Famille.

A mes collègues et la promotion 2019.

Merci pour vos conseils, votre soutien, vos Encouragements.

Sommaire

Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations	III
Introduction.....	1

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 *Cassia angustifolia* et les polyphénols

1.1. Famille	2
1.2. <i>Cassia angustifolia</i>	2
1.2.1 Description botanique	2
1.2.2. Nom vernaculaire et synonymes de <i>Cassia angustifolia</i>	3
1.2.3. Classification.....	3
1.2.4. Habitat et répartition géographique de <i>Cassia angustifolia</i>	3
1.2.5. Usage traditionnel.....	4
1.2.6. Composition phytochimique	4
1.2.7. Propriétés biologiques	5
1.3. Métabolites secondaires	6
1.3.1. Polyphénols	6
1.3.2. Flavonoïdes	6

Chapitre 2 Stress oxydatif et les antioxydants d'origine végétale

2.1. Le stress oxydatif.....	8
2.2. Radicaux libres	8
2.3. Espèces réactives de l'oxygène	8
2.4. Les antioxydantes d'origine végétal	9
2.5. Mécanismes d'action des antioxydants	9

Partie expérimentale

Chapitre 3 Matériel et méthodes

3.1. Matériel	11
3.1.1. Réactif et appareillage	11
3.1.2. Matériel végétal.....	11
3.2. Méthodes	11
3.2.1. Préparation des extraits.....	11
3.2.2. Teste Screening phytochimique	12
3.2.3. Dosage des métabolites secondaires.....	13
3.2.4. L'activité antiradicalaire par DPPH.	14
3.2.5. Test de pouvoir réducteur FRAP.....	15

Chapitre 4 Résultats et discussion

4.1. Rendement d'extraction	17
4.2. Test de screening phytochimique	17
4.3. Dosage des métabolites secondaire	18
4.3.1. Dosage des polyphénols totaux	18
4.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	19
4.4. L'évaluation de l'activité antioxydant	20
4.4.1. L'activité anti radicalaire DPPH	20
4.4.2. Teste de pouvoir réducteur FRAP	22
Conclusion.....	25
Références bibliographiques.....	26

Annexes

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification de <i>Cassia angustifolia</i> Vahl.....	3
Tableau 2. Quelques critères des extraits	17
Tableau 3. Test de screening phytochimique.....	17

Liste des figures

Figure 1. <i>Cassia angustifolia</i> Vahl.....	3
Figure 2. Composés pharmacologiquement actifs de <i>Cassia angustifolia</i>	5
Figure 3. Structure de base des composés phénolique	6
Figure 4. Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie	8
Figure 5. Piégeage des ROS par les flavonoïdes.....	10
Figure 6. La teneur des extraits de <i>C. angustifolia</i> en polyphénols totaux.....	18
Figure 7. La teneur des extraits de <i>C. angustifolia</i> en flavonoïdes totaux.....	19
Figure 8. La cinétique d'inhibition de radicale DPPH	20
Figure 9. Les valeurs de l'IC50 des extraits de <i>C. angustifolia</i> et le BHA	21
Figure 10. Pouvoir réducteur des extraits aqueux et méthanolique de <i>C.angustifolia</i>	22
Figure 11. Les pouvoirs réducteurs en absorbances 0.5.	23

Liste des abréviations

% : pourcentage

µg : Microgramme

Abs : absorbance

BHA : Butylated hydroxyanisole

BHT : butylhydroxytoluène

DPPH : radical 1, 1-Diphényl-2 picrylhydrazyl

EAG/g : Equivalent d'Acide Gallique par gramme de Matière Sèche

EQ/g : Equivalent de Quercetine par gramme de Matière Sèche

ERO : Espèces Réactives de l'oxygène

E. Méth : extrait méthanolique

E. Aqu : extrait aqueux

E. Hex : extrait de l'hexan

FL-O : flavonoxy

FL-OH : flavonoïdes

FRAP : Ferric reducing antioxidant power

IC50 : Concentration Inhibitrice 50

nm : nanomètre

ROS : Reactive oxygene species

UV : Ultraviolet

Introduction

Introduction

La phytothérapie a été utilisée depuis des siècles dont les plantes sont depuis toujours une source habituelle de remèdes sous forme de préparations traditionnelles ou de principes actifs purs. Une plante qui présente un intérêt potentiel dans un pays peut fort bien avoir fait ailleurs l'objet d'une étude scientifique (Farnsworth *et al.*, 1986) où les produits naturels sont l'origine de la recherche de nouveaux composés actifs contre de nombreuses maladies (Sebaihi, 2010).

Les avancées de la médecine ont permis de mieux comprendre la physiologie du corps humain et les réactions chimiques permettant son bon fonctionnement. Dès lors, bon nombre de pathologies ont vu leurs mécanismes de survenue identifiés. L'oxydation, si elle est nécessaire à la vie, peut aussi avoir un effet délétère : le stress oxydant peut causer de sévères dommages cellulaires. Pour se protéger de ce type d'agression, notre organisme produit ou fait appel à une source exogène d'antioxydants (Desmier, 2016).

Dans ce cadre, ce travail s'intéresse à l'étude de l'activité antioxydant de trois extraits des feuilles de *cassia angustifolia* Vahl. Une plante du genre *Cassia*, est traditionnellement utilisé comme laxatif. Il est recommandé pour le court terme traitement (1–2 semaines) de constipation aiguë et de nettoyage de l'intestin avant l'endoscopie diagnostique (Vitalone *et al.*, 2011).

Cette recherche est devisée en deux grandes parties, commençant par la partie théorique, où on a cité des généralités sur la plante, sa composition phytochimique et les activités antioxydants

Dans la deuxième partie (partie expérimentale) la préparation des extraits a été réalisé par deux méthodes : macération par le méthanol ensuite une délipidation par l'hexane et une décoction par l'eau distillée. Par la suite l'estimation des teneurs des polyphénols et flavonoïdes totaux de deux extraits méthanolique et aqueux. En fin l'évaluation de l'activité antioxydant via deux tests.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1
***Cassia angustifolia* et les**
polyphénols

1.1. Famille

La grande famille des Fabacée (de faba, la fève) doit son unité à son fruit, appelé gousse ou légume. Ils constituent une des plus grandes familles des plantes à fleurs, avec plus de 730 genres et 19 400 espèces, elle est répartie aussi bien en milieu tempéré que tropical (Sylvie *et al.*, 2011). Cette famille à des formes arborescentes prédominent dans les pays chauds et les formes herbacées dans les régions tempérées (Dupont *et al.*, 2007). Cette famille est composée de variétés horticoles et beaucoup d'espèces sont récoltées dans un but de l'alimentation humaine (haricot, pois, fève, soja) et leur utilisation en médecine (spartéine extraite du genêt à balais, réglisse) ou en chimie (Sylvie *et al.*, 2011).

1.2. *Cassia angustifolia*

Le genre *Cassia* comprend environ 580 espèces d'herbes, d'arbustes et d'arbres. Beaucoup d'entre elles sont médicinales, d'autres sont considérées comme ornementales. *Cassia angustifolia* Vahl., Communément appelée séné, est un petit arbuste vivace, dressé, (Trease et Evans, 1983).

Une plante indigène du Yémen, de la Somalie et de l'Arabie et maintenant cultivée dans d'autres parties du monde, a une variété d'utilisations médicinales à Unani ainsi que d'autres systèmes de médecine traditionnels. La plante est principalement appréciée pour ses propriétés cathartiques et est particulièrement utile dans la constipation habituelle. Les principes laxatifs sennoside A et sennoside B, isolés à partir de feuilles et de gousses de séné, constituent des ingrédients importants dans les médicaments purgatifs. Il peut être cultivé même dans des conditions salines et pluviales. La culture du séné n'exige pas beaucoup de dépenses en irrigation, fumure, pesticides, protection et autres soins avant et après récolte (Tripathi, 1999).

1.2.1 Description botanique

Plante vivace atteignant 100 à 120 cm de hauteur (Tripathi, 1999) à des stipules latérales, de 1,6 mm de long, feuille paripennée, 5,5-10,5 cm de long, folioles 5-9 paire. Fleurs Jeunes avec des bractées en forme de coupe de 8 à 9 mm de long, 5 Sépales, sous-égaux, 10-13 mm de long, 6-9 mm de large, en forme de cuillère ou en coupe, de couleur jaune clair. 5 pétales, sous-égaux, 14-17 mm de long, 7-10 mm de large, 10 étamines, Fruit 5-6 cm de long, 17-23 mm de large. Généralement 5 à 10 graines, floraison d'avril à juin (figure 1) (Sultana *et al.*, 2012).



Figure 1. *Cassia angustifolia* Vahl. (Sultana *et al.*, 2012)

1.2.2. Nom vernaculaire et synonymes de *Cassia angustifolia*

La plante *Cassia angustifolia* Vahl a un synonyme Senna, Sanna Makki (سنا مكّي) et appeler aussi en anglais : Tinne velly Senna, Indian Senna (Sultana *et al.*, 2012).

1.2.3. Classification

La classification botanique de l'espèce *Cassia angustifolia* selon Sylvie *et al.* (2011) est cité dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1. Classification de *Cassia angustifolia* Vahl. Sylvie *et al.* (2011)

Règne	Plante
Embranchement	Spermatophytes
Sous-embranchement	Angiosperme
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Rosidées
Ordre	Fabales
Famille	Fabacées
Sous-famille	Caesalpiniées
Genre	Cassia
Espèce	<i>Cassia Angustifolia</i> Vahl

1.2.4. Habitat et répartition géographique de *Cassia angustifolia*

Cassia angustifolia est une plante sauvage commune dans les provinces du Yémen et de Hadramaout en Arabie du Sud. Où il est appelé comme Senna arabe (Abulafatih, 1987 ; Ghazanfar et Al-Sabahi, 1993).

On le trouve également sur la côte opposée de la Somalie et s'étend vers l'est jusqu'aux États du Sind et du Punjab au Pakistan. Le nom de séné alexandrin fait en réalité référence à une autre plante (Gupta, 1974).

Cassia angustifolia a été introduit dans le sud de l'Inde par des médecins et des commerçants arabes au début du Ier siècle, et il a généralement été cultivé sur des terres arides de l'État du Tamil Nadu (Pandse *et al.*, 1974). Il pourrait facilement être cultivé dans les régions arides et semi-arides du Gujarat et des États du Rajasthan (Bentley et Trimen, 1992). La plante est maintenant également cultivée avec succès en Europe occidentale, en Afrique du Nord et dans les pays de l'Asie du Sud-Est (Husain, 1992).

1.2.5. Usage traditionnel

Les propriétés médicinales du séné ont été explorées pour la première fois par des Arabes qui utilisent cette plante depuis 900 après JC (Abulafatih, 1987). Les feuilles de séné sont utilisées pour le traitement de la constipation, de la perte d'appétit, de l'hépatomégalie, de la splénomégalie, du paludisme, de la jaunisse, de l'anémie, et sont utilisées comme purgatif sûr et augmentant les mouvements péristaltiques du colon (Anon, 1966).

A des fins thérapeutiques, les systèmes Unani et Ayurveda prescrivent l'administration d'infusion de feuilles ou de fruits de séné. Les principes laxatifs sennoside A et sennoside B, qui sont isolés à partir des feuilles et des gousses de séné constituent les ingrédients essentiels des médicaments purgatifs. Dans le système allopathique, les sennosides sont distribués sous forme de comprimés à la dose de 30mg/comprimé (Anon, 1966). En raison de sa teneur élevée en sennosides. Le médicament convient aux enfants, aux personnes âgées et aux mères allaitantes (Asolkar *et al.*, 1992).

Outre ses utilisations laxatives, une pâte à base de poudre de feuilles de vinaigre est appliquée sur les affections cutanées et sur l'élimination des boutons. La résine obtenue à partir de séné utilisé pour purger la matière visqueuse du cerveau et de l'estomac (Asolkar *et al.*, 1992).

1.2.6. Composition phytochimique

La plupart des *Cassia* contiennent des dérivés d'anthracène, les feuilles et les gousses de séné contiennent des glycosides d'antraquinone, dérivés de la dianthrone de la rhéine, avec deux unités glycosides. Les principes cathartiques du séné sont solubles dans l'eau et dans l'alcool dilués, mais insolubles dans l'alcool absolu. Stoll et ses collaborateurs (1949) ont isolé les deux glycosides, le sennoside A et le sennoside B, qui seraient les principaux principes

laxatifs du séné, ayant la même formule moléculaire $C_{42}H_{33}O_{20}$, mais différant principalement par le type de liaison du glucose à l'aglycone fraction. L'aglycone du sennoside A est dextro-rotatoire, tandis que celle du sennoside B est la forme méso (Waterman et Faulkner, 1979). La teneur en sennoside dans le séné indien varie entre 1,5 et 3%, alors que le séné alexandrin en contient 2,5 à 4,5% (Anon, 1985 ; Husain, 1992).

De petites quantités d'autres glycosides anthraquinoniques, à savoir les sennosides C et D (Tyler, 1982). Un autre nouveau glycoside, le sennoside G, a également été isolé des feuilles de séné et s'est révélé être l'antipode optique du sennoside A (Tanaka *et al.*, 1982).

1.2.7. Propriétés biologiques

L'action du sennoside laxatif (figure. 2A) concerne principalement l'intestin inférieur, à l'instar d'autres cathartiques de la série des anthraquinones, qui sont probablement les produits de dégradation des composés glycosidiques primaires présents dans le médicament brut. Une fois absorbées dans le tractus intestinal, les anthraquinones actives libérées sont excrétées dans le côlon et stimulent les mouvements péristaltiques du côlon par son action locale sur la paroi intestinale (Kobashi *et al.*, 1980). Cela entraîne également une diminution de l'absorption d'eau et par conséquent une masse fécale plus volumineuse et plus molle (Fairbairn et Moss, 1970).

Une évacuation complète simple est généralement produite dans les 6 à 10 heures après l'administration orale de séné. L'adhérence est présumée être causée par la résine ou l'émodine présente dans les feuilles (Mukerji, 1963). Un autre constituant de la feuille, la rhéine (figure. 2B), s'est révélé être un antibiotique contre *Staphylococcus aureus* (Perry, 1980). Le jus des feuilles est considéré comme utile pour le cancer et les tumeurs (figure. 2C) (Hartwell, 1967).

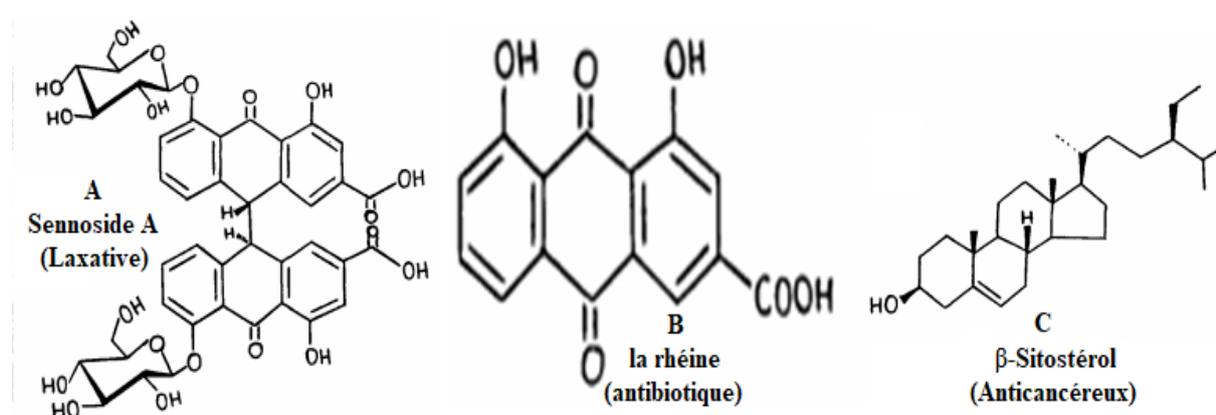


Figure 2. Composés pharmacologiquement actifs de *Cassia angustifolia* (Tripathi, 1999)

1.3. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont présents dans toutes les plantes supérieures, et ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. (Hartmann, 2007) et sont d'une variété structurale extraordinaire mais sont produits en faible quantité. Les métabolites secondaires sont classés ont trois grands groupes : les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes. Chacune de ces classes possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (Krief, 2003)

1.3.1. Polyphénols

Les composés phénoliques sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Ils sont des produits de la condensation de molécules d'acétylcoenzyme A et de phénylalanine., d'un organe ou d'un tissu particulière (Nkhili, 2009). Ces corps jouent un rôle fondamental car sont des éléments importants de qualités sensorielles (couleur et caractères organoleptiques) et nutritionnelles des végétaux, tels que les légumes, les fruits, les céréales, le cacao ou le thé. Une alimentation équilibrée fournit à l'Homme environ un gramme de polyphénols chaque jour, soit dix fois plus que de vitamine C et 100 fois plus que de caroténoïdes ou vitamine E (figure. 3) (Scalbert *et al.*, 2005).

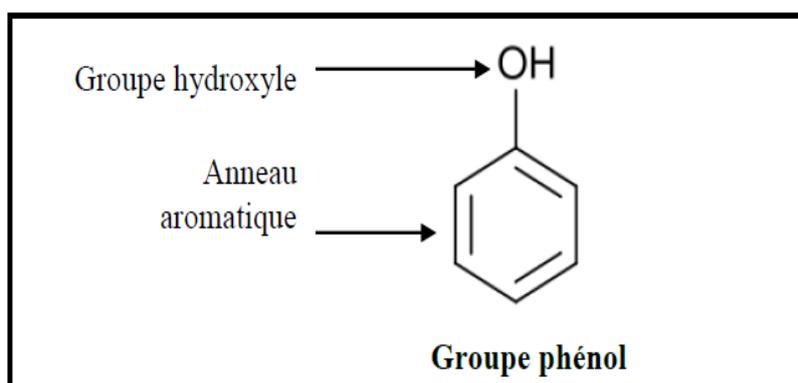


Figure 3. Structure de base des composés phénolique

Les polyphénols sont caractérisés par un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés. Ils sont classés en différents groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et des substitutions qui les relie (Manallah, 2012).

1.3.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont de composés phénoliques dont beaucoup sont des pigments responsables de la coloration de nombreuses fleurs et de certains fruits. (Levisalles *et al.*, 1974). Ils sont largement distribués dans le règne végétal où il existe le plus souvent sous forme soluble

d'hétérosides. Les principales activités attribuées aux flavonoïdes sont une propriété vitaminique P.

Les flavonoïdes, de structure générale en C₁₅(C₆-C₃-C₆), qui fait de deux cycles phényles C₆, les cycles A et B, La Distinction des sous-classes se fait sur la conformation de la structure centrale (cycle C).comprend à lui seul plusieurs milliers de molécule regroupées en plus de dix classes Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles libres, méthylés ou glycosylés) sur les deux cycles aromatiques A et B et le cycle central C (Bellebcir, 2008).

Chapitre 2

Stress oxydatif et les antioxydants d'origine végétale

2.1. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (Boyd *et al.*, 2003).

2.2. Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique (Camille et Mireille, 2011). La molécule d'oxygène présente la particularité d'avoir la structure d'un biradical libre. Dans les phénomènes de stress oxydant prenant place dans les milieux biologiques, les radicaux libres qui interviennent, partagent pour caractéristique celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène ou d'azote. Ceci leur confère la dénomination d'espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS : reactive oxygen species) ou de l'azote (EAR ou RNS : reactive nitrogen species), (Wolff, 1993).

2.3. Espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives oxygénées (ERO) incluant les radicaux libres comme le radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$), le radical superoxyde ($\text{O}_2\cdot^-$) et sa forme protonée ($\text{HO}_2\cdot$), le radical peroxyde ($\text{ROO}\cdot$) (figure. 4), et les espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) sont des molécules hautement réactives (Chu *et al.*, 2010). Dans tous les systèmes vivants aérobies, ces espèces sont produites habituellement par voie endogène durant le métabolisme cellulaire (Kumari et Kakkar, 2008).

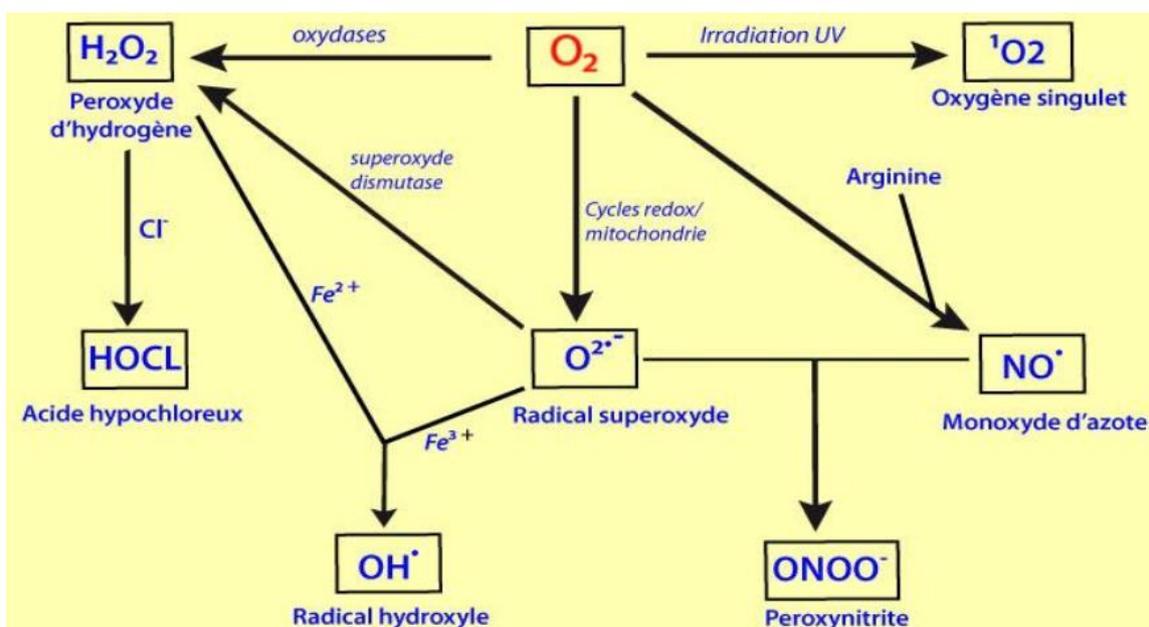


Figure 4. Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003)

2.4. Les antioxydantes d'origine végétal

Pour contourner les dommages causés par les ERO, la cellule fait appel à des systèmes de défense appelés antioxydants. Un antioxydant est défini comme toute substance ayant la capacité de retarder, prévenir ou réparer un dommage oxydatif d'une molécule cible (Halliwell et Gutteridge, 2007). Ainsi, les antioxydants servent à contrôler le niveau des espèces réactives pour minimiser le dommage oxydatif (Tang et Halliwell, 2010).

Il existe deux types d'antioxydants :

– Les antioxydants primaires ou radicalaires ou vrais, qui permettent l'interruption de la chaîne autocatalytique : $AH + R\bullet \rightarrow A\bullet + RH$. La molécule AH est antioxydante si le radical formé $A\bullet$ est plus stable. La stabilité du radical $A\bullet$ peut s'expliquer par sa conversion en composés non radicalaires : $A^* + A' \rightarrow A-A$ ou $A\bullet + R^* \rightarrow A-R$.

– Les antioxydants secondaires ou préventifs qui assurent l'inhibition de la production des radicaux libres. Ce sont des substances décomposant les hydroperoxydes en alcool, des thiols (glutathion, acides aminés soufrés) ou les disulfures, des protecteurs vis-à-vis des UV, comme les carotènes, des chélatants des métaux promoteurs d'oxydation type fer et cuivre, comme l'acide citrique et les lécithines) ou enfin de séquestrants d'oxygène comme l'acide ascorbique (Rolland, 2004).

2.5. Mécanismes d'action des antioxydants

Les flavonoïdes expriment les propriétés antioxydants par : Le piégeage direct des espèces réactives de l'oxygène (ERO), La suppression de la formation des ERO impliqués dans leur production, La protection des systèmes de défense antioxydants de l'organisme (Boudiaf, 2006). L'action antioxydant de ces phytonutriments ne s'exerce pas seulement par l'inhibition et la désactivation des radicaux libres, elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation des traces d'ions métalliques responsables de la production de ROS (Cotelle, 2001). Grâce à leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (FL-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants, comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyde, par transfert d'hydrogène et le radical flavonoxy (FL-O) qui en résulte peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable (Figure. 5) (Jovanovic *et al.*, 1998).

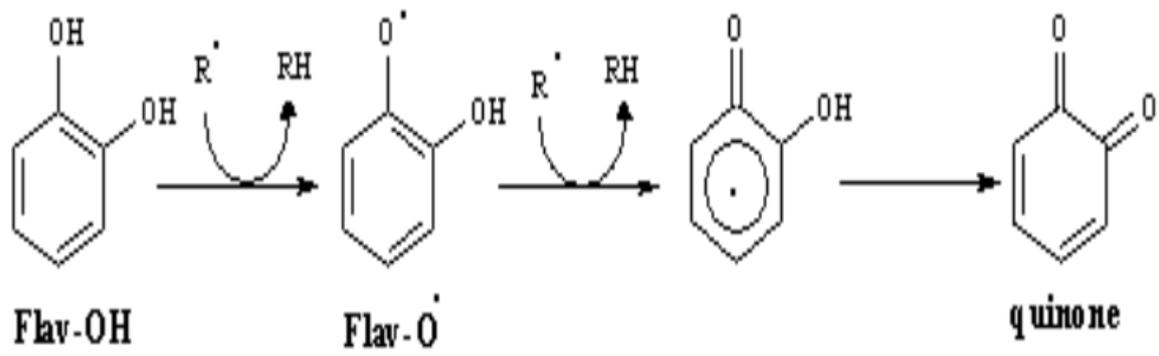


Figure 5. Piégeage des ROS par les flavonoïdes (Jovanovic *et al.*, 1998).

Partie expérimentale

Chapitre 3

Matériel et méthodes

3.1. Matériel

3.1.1. Réactif et appareillage

Les différents réactifs et appareillages utilisés dans cette étude sont cités dans l'annexe 1

3.1.2. Matériel végétal

Les feuilles de *Cassia angustifolia* (*C. angustifolia*) utilisées dans cette étude ont été achetées chez un herboriste de la ville de Ouled-Djellal Biskra, elles ont subi un lavage à l'eau pour éliminer la poussière, séchées à 40°C pendant une semaine, puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique et tamisées afin de pouvoir récupérer une poudre fine et homogène.

L'identification botanique de l'espèce a été effectuée par Mr. LAIADI Zaine. (professeur au niveaux de université Mohamed khider de Biskra

3.2. Méthodes

3.2.1. Préparation des extraits

3.2.1.1. Extrait méthanolique

Cette méthode d'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par Bekheet *et al.*, (2011) avec une légère modification :

Dans une première étape l'extraction se fait avec le méthanol à 75% (V/V), 40g de la plante broyée a été soumise à une macération avec 400 ml de méthanol à température ambiante et sous agitation pendant 72 heures, l'extrait récupéré est filtré (2 fois).

Le filtrat récupéré subi une extraction liquide-liquide un volume d'hexane (V/V) a été ajouter au filtrat, l'opération a été répéter trois fois jusqu'à épuisement total. Les deux phases (organique : extrait hexane, et aqueuse : extrait méthanolique) récupérés sont évaporé dans une rota vapeur (évaporateur rotatif) à 40°C, l'extrait est placé dans l'étuve à 37°C jusqu'à séchage.

3.2.1.2. Extrait aqueux

Cette méthode d'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par Konkon *et al.*, (2006) avec de légères modifications :

10g de la poudre des feuilles de *C. angustifolia* sont met dans 200 ml eau distillée puis agiter manuellement et doucement ; Chauffer le mélange dans un bain-marie bouillant pendant 30 minutes ; Laisser le mélange refroidir à la température ambiante. La solution obtenue a été filtrée à l'aide d'une papier Wattman n°1. Répéter la procédure trois fois (fraction retenue par le filtre dans 200 ml eau distillée bouillante). Les trois filtrats obtenus sont placés dans un seul récipient. L'extrait est placé dans l'étuve à 37°C jusqu'à séchage.

- **Expression des résultats**

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction.

Les rendements des extractions (méthanolique, hexane, aqueux) sont calculés suivants la formule ci-dessous (Boubekri, 2014).

$$R \% = \frac{Me}{Mé} \times 100$$

R% : rendement en pourcentage.

Me : masse de l'extrait sec en gramme.

Mé : masse de l'échantillon en gramme.

3.2.2. Teste Screening phytochimique

La partie aérienne de *C. angustifolia* réduites en poudre a subi différents tests chimiques afin de mettre en évidence la présence ou l'absence des principales familles de métabolites secondaires (Kebili, 2016).

a) Caractérisation des alcaloïdes

Dans un tube à essai, 3 ml d'extrait (éthanolique et hexane), auquel a été ajoutée 1 goutte d'HCl concentré, et puis 2 gouttes de réactif de Dragendorff.

La présence des alcaloïdes est révélée par l'apparition de précipité orangé avec le réactif de Dragendorff (Koffi *et al.*, 2009) (Hammoudi, 2009).

b) Caractérisation des flavonoïdes

La présence de flavonoïdes dans un extrait peut être mise en évidence par un test simple et rapide appelé « réaction de Shinoda » (Lock *et al.*, 2006). Le test consiste à ajouter à 2ml de l'extrait, quelques gouttes d'HCl concentré (2N) et environ 0,5g de magnésium métallique. Laisser agir 3 min et regarder le changement de couleur (Malec et Pamelio, 2003).

c) Caractérisation des polyphénols

La réaction au chlorure ferrique (FeCl₃) permet de caractériser les polyphénols. A 2 ml de l'extrait (éthanolique et hexane), une goutte de solution aqueuse de chlorure ferrique à 5% est ajoutée. L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée, indique la présence de polyphénols. (Koffi *et al.*, 2009).

d) Caractérisation des stéroïdes

A 2 ml des différents extraits, 2ml d'anhydre acétique et 0,5ml d'acide sulfurique sont ajoutées. L'apparition d'une couleur violette, bleu puis verte indique leurs présences (Bruneton, 1999).

e) Caractérisation des Tanins

La présence de tanins est démontrée en ajoutant à 1 ml de chaque extrait 1 ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl_3 diluée à 1%. L'apparition d'une couleur vert foncé ou bleu-vert indique la présence de tanins. L'apparition d'une couleur vert foncé indique la présence de tannins catéchiques. L'apparition d'une couleur bleu-vert indique la présence de tanins galliques (Boufellous *et al.*, 2017).

3.2.3. Dosage des métabolites secondaires

3.2.3.1. Dosage des polyphénols

- **Principe**

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique folin ciocalteu selon la méthode décrite par Singleton et Rossi (1965).

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotomètre selon la méthode de folin ciocalteu ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif folin-ciocalteu en un complexe ayant la couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénolique oxydés.

- **Mode d'opérateur**

Dans un tube à essai mélanger 100 μl d'extraits plus 500 μl du réactif de folin ciocalteu à 10 % (v/v) le mélange est incubé pendant 4 min. on ajout ensuite 400 μl de NaCO_3 (carbonate de sodium) à 7.5 % (v/v) puis le mélange est soumis à une autre incubation pendant 2h à l'obscurité la lecture se fait dans la longueur d'onde 765 nm.

Le blanc de test contient 100 μl d'éthanol 500 μl de folin et 400 μl de NaCO_3 .

- **Expression des résultats**

Les concentrations en composés phénoliques totaux des extraits sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue à différentes concentrations d'acide gallique dans le

méthanol. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent en acide gallique par 1 milligramme d'extraits sec (μg EAG/mg d'extrait).

3.2.3.2. Dosage des flavonoïdes

- **Principe**

La teneur en flavonoïdes dans les extraits a été déterminée par spectrophotométrie selon Lamaison et Carnat (Quettier-Deleu *et al.*, 2000), en utilisant une méthode basée sur la formation d'un complexe flavonoïde-aluminium, après décomposition du chlorure d'aluminium, ayant le maximum d'absorption à 430 nm. La quercétine a été utilisée pour établir la courbe d'étalonnage.

- **Mode d'opérateur**

1 ml d'échantillon dilué a été mélangé séparément avec 1 ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 2%. Après une incubation à la température ambiante pendant 15 minutes, l'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée à 430 nm avec un spectrophotomètre et la teneur en flavonoïdes a été exprimée en μg par g d'équivalent en quercétine.

- **Expression des résultats**

Les concentrations en flavonoïdes totaux des extraits sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue à différentes concentrations de quercétine. Les résultats sont exprimés en μg EAG/mg d'extrait.

3.2.4. L'activité antiradicalaire par DPPH.

- **Principe**

Le DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre, stable ou accepteur d'hydrogène de couleur violet intense (Cavar *et al.*, 2009). Ce radical perd sa coloration native quand il se lie avec des substances anti oxydantes (AH), qui lui transfèrent des électrons ou des protons. La forme réduite du DPPH confère à la solution une couleur jaune (Gadow *et al.*, 1997). Le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration découle, de la nature, de la concentration et de la puissance des principes actifs présents (kroyer, 2003 ; Es Safi *et al.*, 2007).

- **Mode d'opérateur**

Pour chaque extrait et pour chaque concentration, 200 µl d'extrait préparé dans l'éthanol est additionné à 800 µl de solution DPPH préparée à 6 mg dans 100 ml d'éthanol. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre après 30min à la longueur d'onde de 517 nm. Pour chaque extrait, le test est réalisé en triplicata.

Pour le blanc, l'extrait est remplacé par l'éthanol.

- **Expression des résultats**

Les résultats obtenus pour chaque extrait testé sont comparés à ceux obtenus pour (BHA), et pris comme antioxydant standard.

Le pourcentage d'inhibition du DPPH est déterminé par la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition \%} = \frac{A C - A t}{A C} \times 100$$

Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant des extraits, introduit le paramètre IC50

L'indice IC50 montre les concentrations de l'antioxydant qui sont nécessaires pour faire décroître la concentration initiale du DPPH• avec 50%. La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que son IC50 est petite (Popovici *et al.*, 2009). Les résultats sont exprimés en µg/ml et les écart-types ont été calculés à partir de trois séries d'expériences.

3.2.5. Test de pouvoir réducteur FRAP

- **Principe**

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir anti-radicalaire. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) présent dans le complexe K₃Fe (CN)₆ en fer ferreux (Fe²⁺). En effet le Fe³⁺ participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. (Bijoy *et al.*, 2008)

- **Mode d'opérateur**

225 µl d'extraits de différentes concentrations sont mélangés à 225 µl de tampon phosphate (pH = 6,6), par la suite l'ajout de 225 µl de K₃Fe avec agitation, le tout incubé au bain marie à 50°C pendant 20 min. 225 µl de TCA (10%) a été immédiatement ajouté et directement centrifugé pendant 10 min à 3000 TPM. Un volume (375 µl) a été prélevé du surnageant au quel est ajouté 375 µl d'eau distillé et 75 µl de FeCl₃. La lecture des Absorbances est réalisée à 700 nm. Contre un blanc ou l'extrait est remplacé par le méthanol (Oyaizu, 1986 ; Hubert, 2006)

- **Expression des résultats**

L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Singelton et Rossi, 1995). Pour chaque concentration, une absorbance est mesurée et les résultats sont représentés sous forme de graphique.

Les résultats sont obtenus en $\mu\text{g/ml}$ d'extrait par comparaison avec l'acide ascorbique et α -Tocophérol comme standards. Les écart-types ont été calculés à partir de trois séries d'expériences.

Chapitre 4

Résultats et discussion

4.1. Rendement d'extraction

Les résultats ont été exprimés en pourcentage, ils sont présentés dans le (tableau. 2).

Tableau 2. Quelque critère des extraits

Extrait	Aspect	Couleur	Rendement %
Méthanolique	Cristallisé	Vert foncé	24.5
Aqueux	Cristallisé	Maron	20
Hexane	Pâteux	Vert noirâtre	0.75

Les extraits obtenus ont des aspects différents. La forme poudre cristallisé chez l'extrait méthanolique aqueux et par contre l'extrait de l'hexane était d'un aspect pâteux.

L'extrait méthanolique et de l'hexane ont un couleur vert foncé, vert noirâtre respectivement. Le couleur marron pour l'extrait aqueux.

Les feuilles de cette plante présentent des rendements d'extraction importantes. L'extrait méthanolique est le plus élevé avec un pourcentage de 24.25 % par la suite l'extrait aqueux de 20% et finalement l'extrait de l'hexane le plus faible de 0.75%.

D'une manière générale, les teneurs en extraits secs varient selon plusieurs paramètres, d'une plante à une autre de la même famille ou différent et en fonction des paramètres de l'extraction solide-liquide : la température, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion de solvant.

4.2. Test de screening phytochimique

Les résultats de screening phytochimique sont exprimés dans le tableau 3.

Tableau 3. Test de screening phytochimique

	Extrait méthanolique	Extrait aqueux
Alcaloïdes	+	-
Flavonoïdes	+	+
Polyphénols	+	+
Stéroïdes	-	+
Tannin	-	+

+ présent - absent

Le dépistage phytochimique qualitatif d'extrait méthanolique de *C. angustifolia* a révélé la présence de alcaloïdes, flavonoïdes, polyphénols, et l'absence des stéroïdes et les tannins.

En même temps l'extrait aqueux est dépourvu en alcaloïdes et a mis en évidence la présence des flavonoïdes, polyphénols, stéroïdes, tanins, qui contribuent aux diverses activités biologiques de la plante.

Selon Ahmed *et al.*, (2016) l'extrait méthanolique contient tous les métabolites cités dans ce teste par contre nos résultats marquent l'absence des tannins et des stéroïdes, qui sont expliqués par les méthodes de caractérisation ou par les réactifs utilisés. Par ailleurs, pour l'extrait aqueux on constate des résultats identiques

4.3. Dosage des métabolites secondaire

4.3.1. Dosage des polyphénols totaux :

Le contenu phénolique total dans les extraits aqueux et organiques de *C. angustifolia* a été évalué en traçant une courbe standard en utilisant différentes concentrations d'acide gallique. L'équation de régression linéaire est : $y = 0.0034x + 0.1044$. Sachant que le coefficient de corrélation : $R^2 = 0.9972$ (voir annexe 2)

La quantité totale de contenu phénolique présente dans chaque extrait, exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par un gramme d'extrait sec (figure. 6).

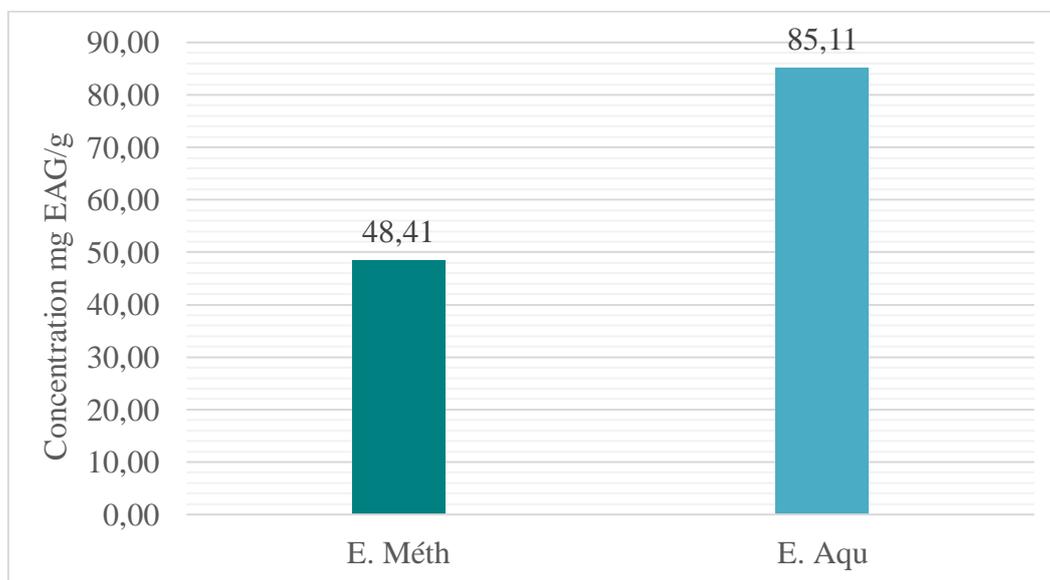


Figure 6. La teneur des extraits de *C. angustifolia* en polyphénols totaux

L'analyse a montré qu'une quantité considérable de contenu phénolique était présente dans les extraits organiques et aqueux de *C. angustifolia*.

L'extrait aqueux est riche en polyphénols totaux et contient une teneur de 85.112 mg EAG/g d'extrait. Après l'extrait méthanolique de 48.406 mg EAG /g d'extrait.

Une étude faite par Ahmed *et al.*, (2016) montre que la teneur en polyphénols totaux dans l'extrait méthanolique et aqueux des graines de *C. angustifolia* est de 2.328 mg EAG/g, 0.535 mg EAG/g respectivement. Ces taux sont inférieurs à nous résultats. Alors en peut conclure que les feuilles sont plus riches en polyphénols que les graines.

4.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La courbe d'étalonnage de la quercétine a été utilisée pour évaluer la quantité totale de contenu de flavonoïdes en utilisant différentes concentrations. L'équation de régression linéaire est : $y = 0.0048x$, sachant que le coefficient de corrélation : $R^2 = 0.997$ (annexe 3).

Dans chaque extrait, La teneur des flavonoïdes sont exprimés en mg équivalent de quercétine par g d'extrait (figure 7)

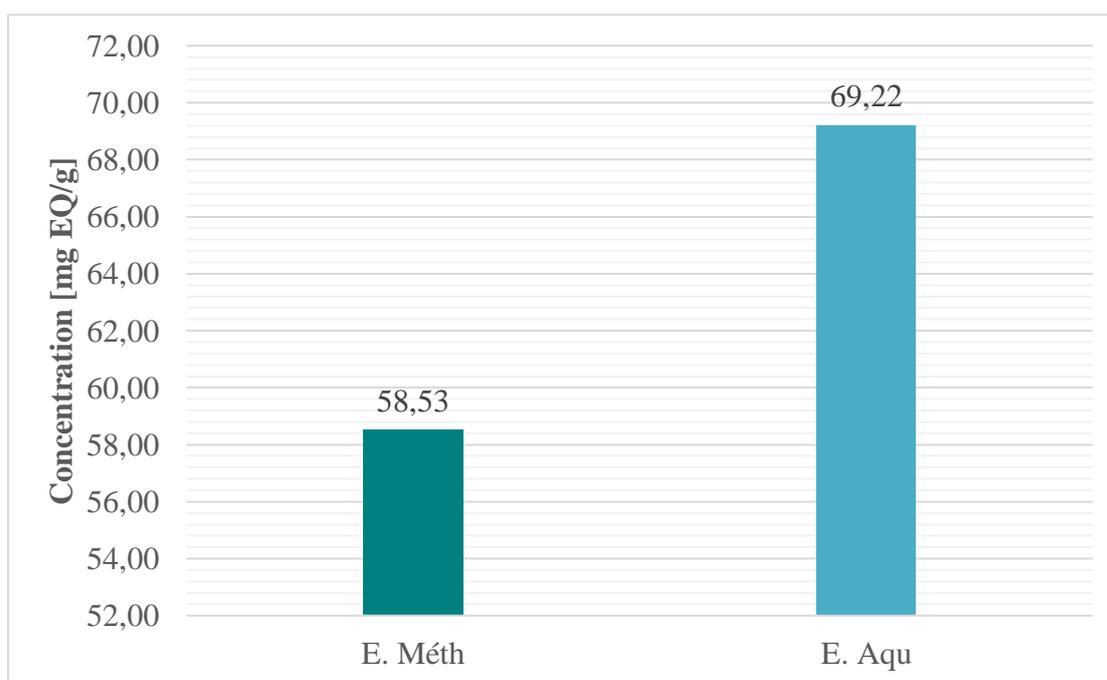


Figure 7. La teneur des extraits de *C. angustifolia* en flavonoïdes totaux

L'extrait aqueux de *C. angustifolia* présentait une teneur en flavonoïdes plus élevée que l'extrait méthanolique avec une concentration de 69.22 mg EQ/g d'extrait. Par comparaison avec les résultats précédents on peut conclure que les flavonoïdes expriment 81% des polyphénols totaux. Par ailleurs l'extrait aqueux contient 58.52 mg EQ/g.

D'autre part une étude faite par Ahmed *et al.*, (2016) montre que la teneur en flavonoïde dans les graines de *C. angustifolia* est de 5.00 mg EQ/g, dans l'extrait méthanolique et

1.29mgQE/g d'extrait aqueux ce qui montre que les feuilles sont plus riches en flavonoïdes par rapport aux graines.

Selon Laghari *et al.*, (2011) le taux des flavonoïdes dans les deux parties aériennes de *C. angustifolia* (l'extraction par micro-ondes) est 28.15mg EQ/g et 26.30 mg EQ/g trouvés dans les fleurs et les feuilles respectivement.

4.4. L'évaluation de l'activité antioxydante

4.4.1. L'activité anti radicalaire DPPH

Les activités antioxydantes des extraits organiques (méthanolique et de l'hexane) de *C. angustifolia* et de standards BHA (figure 8).

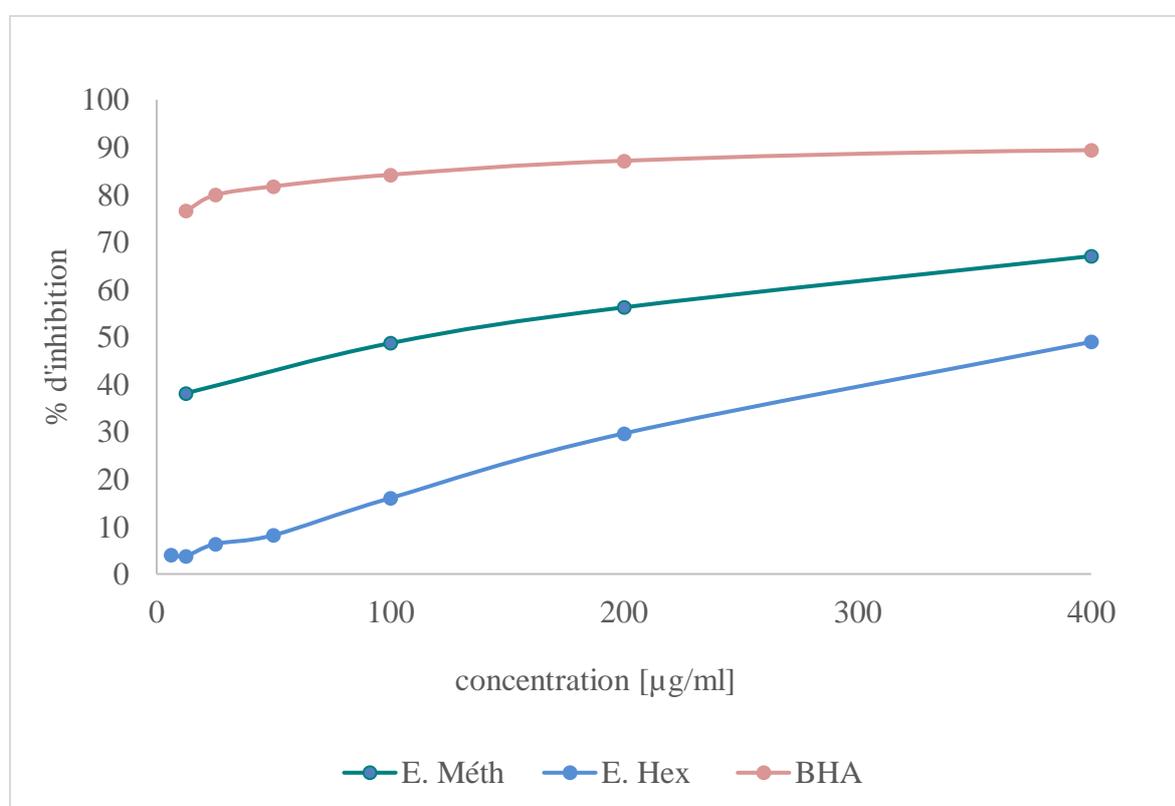


Figure 8. La cinétique d'inhibition de radicaux DPPH

D'après la courbe on observe que l'extrait méthanolique suit la cinétique logarithmique comme le standard BHA. Par contre l'extrait de l'hexane suit une cinétique linéaire

Les deux extraits ont des activités antioxydantes dépendantes de la dose, c'est-à-dire que les activités d'élimination des extraits ont augmenté avec l'augmentation respective des concentrations (figure 8). Selon les résultats, L'extrait méthanolique présente une activité maximale de piégeage des radicaux libres du DPPH (67.02%) alors que l'extrait de l'hexane présentait une faible activité d'élimination du DPPH (48.93%) à 400 µg/ml.

Le BHA à montrés une activité antiradicalaire minimale et maximale intéressante 76.55%, 90.14%, à des concentrations allant de 12.5 μ g/ml à 800 μ g/ml respectivement.

Pour une meilleure comparaison entre les extraits et le standard utilisé, en calcule les IC50 à partir de graphe (figure 9).

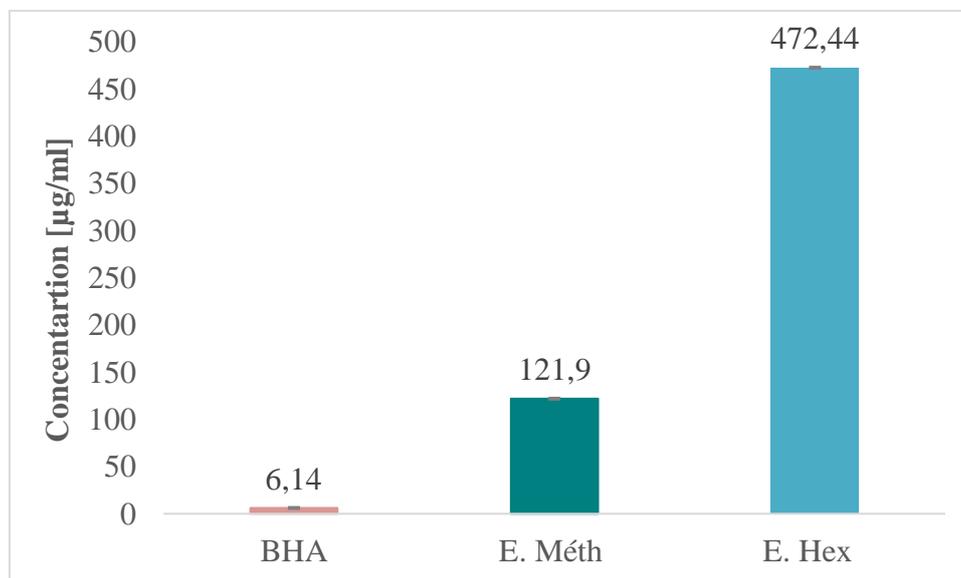


Figure 9. Les valeurs de l'IC50 des extraits de *C. angustifolia* et le BHA

Les valeurs IC50 sont les concentrations requises pour l'inhibition de 50% des radicaux libres DPPH. Plus les valeurs IC50 sont faibles, plus le potentiel antioxydant des composants de la plante est élevé.

Les résultats montrent que l'extrait méthanolique possède la meilleure activité anti radicalaire avec la plus faible IC50=121.9 μ g/ml d'autre part l'extrait de l'hexane à une très faible activité anti-radicalaire de IC > 400 μ g/ml.

Selon les résultats de l'étude de Laghari *et al.*, (2016) sur les feuilles et les fleurs de *C. angustifolia* par des différent méthode d'extraction (extraction par micro-ondes) Le pourcentage d'inhibition de 50% des radicaux libre est 3.6 μ g/ml, 3.1 mg/L respectivement, ce qui permette de dire que les fleurs ont un meilleure activité anti DPPH par rapport les feuilles.

L'évaluation de l'activité anti radicalaire de DPPH varient selon plusieurs paramètres, parmi les quelle la région de récolte el la méthode d'extraction

Cependant, la méthode d'extraction par micro-ondes c'est une méthode très simple, robuste et qui prend moins de temps ; elle s'avère être la méthode la plus efficace pour extraire un plus grand nombre de flavonoïdes en plus grande quantité et les extraits obtenus selon cette méthode montrent une activité antioxydante plus élevée. (Laghari *et al.*, 2016)

D'après Ahmed *et al.*, (2016) Il a été rapporté que des flavonoïdes isolés, à partir de *C. angustifolia* la quercimeritrine, la scutellareine et la rutine, ont une activité antioxydante significative contre le stress oxydatif. Notez que tous les trois ont des groupes 1,2 dihydroxybenzène qui sont facilement oxydés en orthoquinones, ce qui en fait des antioxydants puissants.

4.4.2. Teste de pouvoir réducteur FRAP

Les deux extraits méthanolique et aqueux ont été évaluées par le test de FRAP sur la base des valeurs d'absorbance 0.5 par comparaison avec des courbes des différent standards : l'acide ascorbique et α -Tocophérol (figure 10).

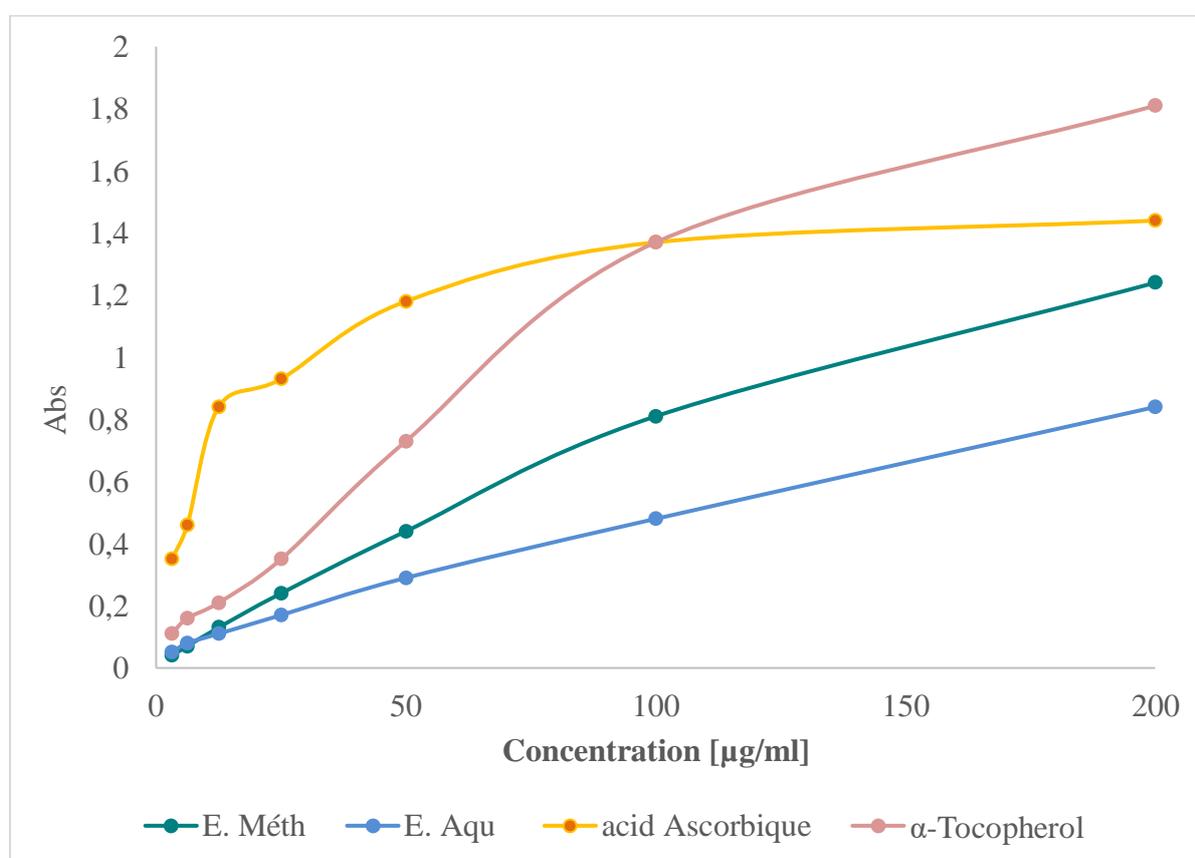


Figure 10. Pouvoir réducteur des extraits aqueux et méthanolique de *C. angustifolia*

L'extrait méthanolique a donné le pouvoir réducteur le plus important avec une absorbance de $1.24 \pm 0,07$ enregistrée à la concentration $200 \mu\text{g/ml}$, à la même concentration, l'extrait aqueuse avec une absorbance $0,84 \pm 0,01$

La figure 14 valide que les deux extraits méthanolique et aqueux suivent la cinétique linéaire comme le standard α -Tocophérol.

On remarque que la capacité de réduction du fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des échantillons.

L' α -Tocophérol possède une activité réductrice de fer ferrique (Fe^{3+}) plus élevée par rapport aux autres standards avec une valeur maximale d'absorbance $1,81 \pm 0,09$ correspondant à $200 \mu\text{g/ml}$.

Pour une meilleure comparaison entre les extraits et le standard utilisé, en site les absorbances 0.5 à partir de graphe de la figure 11.

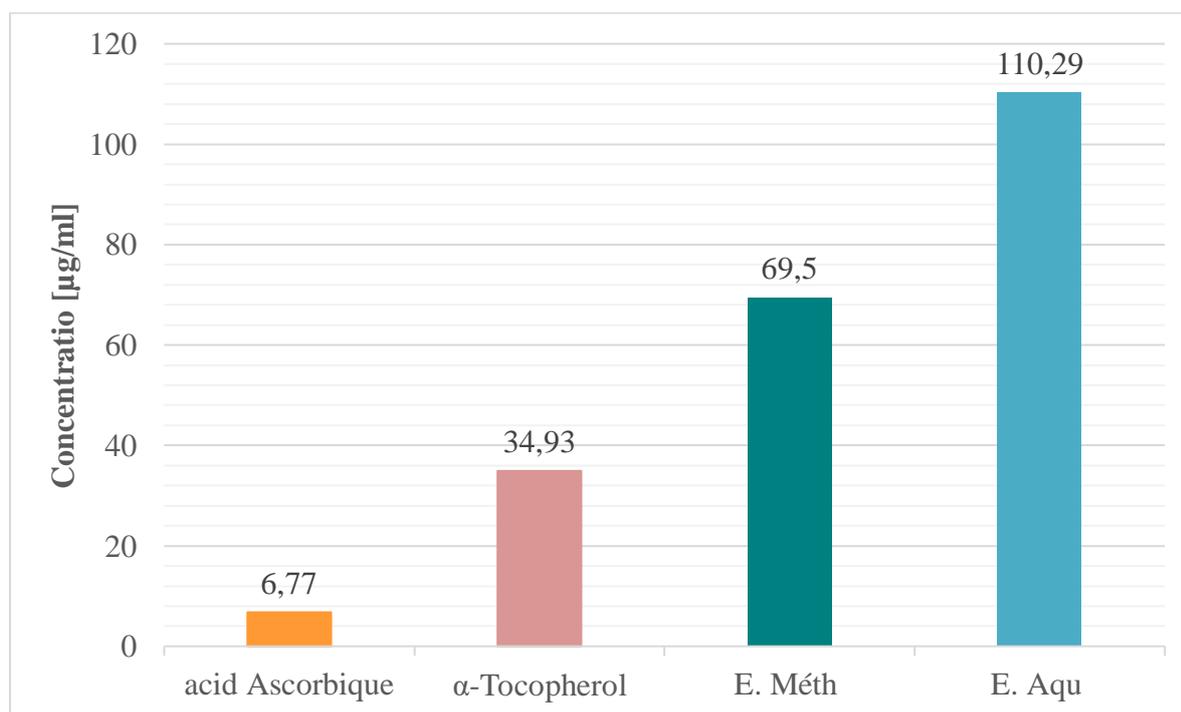


Figure 11. Les pouvoirs réducteurs en absorbances 0.5.

La concentration de l'extrait méthanolique de la plante à l'absorbance 0.5 ($69,5 \mu\text{g/ml}$) est inférieure par rapport à l'extrait aqueux ($110,29 \mu\text{g/ml}$), mais nettement supérieure à celui des standards (figure. 11). Ces résultats montrent que l'extrait méthanolique a un pouvoir réducteur plus élevé que l'extrait aqueux.

Le pouvoir réducteur de l'espèce *C. angustifolia* est probablement dû à la présence de groupements hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants (Siddhurajue et Becker, 2007).

Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (Bougandoura *et al.*, 2012).

Conclusion

Conclusion

De nos jours l'utilisation des plantes médicinales devient une alternative de la médecine moderne à cause de ces principes actifs qui sont les métabolites secondaires où elles fournissent des activités biologiques pour soigner la santé.

Dans cette étude, *C. angustifolia* a été fait l'objet de notre recherche, où les extrait méthanolique et aqueux représentent le taux le plus élevée 24.5%, 20 % du rendement respectivement par rapport l'extrait d'hexane (0.7 %).

Les résultats de l'estimation des polyphénols et des flavonoïdes totaux des deux extraits obtenus nous ont révélé que l'extrait aqueux est le plus riche en polyphénols qui égale à 85.11mg AGE/ g et en flavonoïdes 69.22 mg QE/g.

L'évaluation de l'activité anti oxydante des trois extraits du *C. angustifolia* via les deux test, piégeage du radical libre (DPPH) et le pouvoir réducteur (FRAP)

Les résultats enregistrant une valeur maximale des pouvoirs antioxydants remarquables pour l'extraits méthanolique ($IC_{50}= 121.98\pm 6.76$, $A_{0.5}=69.5\pm 6.65$) respectivement.

Nos résultats permettent de conclure que les feuille de *C. angustifolia* représente une source naturelle d'agents antioxydants et peut servir comme traitement préventif contre le stress oxydatif. Dans le même sens, il est souhaité de réaliser :

- Procéder à une séparation de ces composés, afin de les tester séparément et identifier ceux, parmi eux, actifs.
- Réaliser des tests *in vivo* pour évaluer certaines activités thérapeutiques (activités antidiabétique, antitumorale, anti cancéreuse etc.).
- Réaliser des tests de cytotoxicité pour, éviter les doses toxiques en thérapeutique.

Références bibliographiques

Abulafatih H.A.1987. Medicinal Plants of Southern Arabia, Economic Botany 41: 354-360

Ahmed S.I. , Muhammad Q. H., Muhammad T., Qaisar M., Muhammad I., Kristen K., Robert B. B.2016. Pharmacologically active flavonoids from the anticancer, antioxidant and antimicrobial extracts of *Cassia angustifolia* Vahl. 16:460.

Anon. 1966. Pharmacopoeia of India (2nd edn.). Manager of Government Publications, Delhi, India. pp 647-49.

Anon. 1985. The Wealth of India-Raw Materials. Vol. C. Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, India.93-95

Asolkar L.V., Kakkar K.K. and Charkre O.J. 1992. Glossary of Indian Medicinal Plants with Active Principles. Part I. CSIR, New Delhi, India. pp. 177-178.

Bekheet S. H. M., Abdel-Motaal F. F., Mahalel U.A. 2011. Antifungal effects of *Ficus sycomorus* and *Pergularia tomentosa* aqueous extracts on some organs in *Bufo regularis* treated with *Aspergillus niger*. Tissue and Cell 34:398-404.

Bellebcir L.2008. Etude des composés phénoliques en tant Que marqueurs de biodiversité chez les céréales, En vue de l'obtention du Diplôme de Magister. 119p.

Bendjilali B., Richard H. et Liddle P.1984. Chimotypes d'armoise Blanche du Maroc : *Artémisia herba alba*. 131-151p

Bentley R. and Trimen H. 1992. Medicinal Plants. Vol. II. Allied Book Centre, Dehra Dun, India.p. 91

Bijoy T., Gnanaseelan C., Anant P., Salvekar P.S.2008. Indian Institute of Tropical Meteorology, Pashan, Pune. India.10p

Boubekri C.2014. Etude de l'activité antioxydant des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de doctorat, université Mohamed khider, Biskra, 160p.

Boudiaf, K. (2006). Etude des effets anti-xanthine oxydoréductase et antiradicalaires des extraits des graines de *Nigella sativa*. Thèse de magistère. Département de biologie. Université Ferhat abbas. (Sétif) Algérie

Boufellous M., Lrhorfi A., Berrani A., EL Haoud H., Zaher A., Bouhaddioui B., Bengueddour R .2017. Phytochemical screening of a medicinal plant: *Lavandula stoechas* (Lamiaceae). *Journal of pharmacognosy and phytochemisyry* 6(2):56-62

Bougandoura N., Bendimerad N.2012. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp.Nepeta (L.) Briq. B-* Sciences Agronomiques et Biologiques.14-19.

Boyd N.F., Stone J, Vogt K.N., Connelly B.S., Martin L.J., Minkin S.2003. Dietary fat and breast cancer risk revisited: a meta-analysis of the published literature. 3;89(9):1672-85.

Bruneton, J. 1999. Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. Edition Technique et documentation, p.233.

Camille, M., Mireille, S.2011. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Médecine/sciences ; 27 : 405-12*

Cavar S., Maksimovic M., Vidic D.,Paric A. 2009. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Aetemisias annua L.* From Bosnia. *Industrial Crops and Products.* 37: 479-485.

Chu W L, Lim Y W, Radhakrishnan A K and Lim P E .2010. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC Complementary and Alternative Medicine,* 10 (53), 2-8.

Colette-Keller D. (2004). Les plantes médicinales. ALS (séance du 25 Avril 2004).

p 58

Desmier T.2016. Les antioxydants de nos jours : définition et applications. Thèse de doctorat d'état, université de Limoges, France, 88 p.

Dupont F. and Guignard J.L. Abrégé de Botanique 14ème édition (2007). Edition Masson, Paris ; 285 p.

Es-Safi, N., Kollmann, A., Khlifi, S., Ducrot, P.H. 2007. Antioxydative effect of compounds isolated from *Globularia alypum L.* Structure activity relationship. *L.W.T* 40: 1246- 1252.

Fairbairn J.W. and Moss M.J.R. 1970. The relative purgative activities of 1,8-dihydroxyanthracene derivatives. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 22: 584-5

Farnsworth N.R., Akerele O., Bingel A.S, Soejarto D.D., Guos Z.1986. Place des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 64 (2): 159-175

Favier A .2003. Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115

Gadaw, A. V., Joubert., Hansmann, C. F. 1997. Comparaison of the Antioxidant Activity of Aspalathin with That of Other Plant Phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*), a Tocopherol, BHT, and BHA. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 45: 632-638.

Ghazanfar S.A. and Al-Sabahi A.A., 1993. Medicinal plants of northern and central Oman (Arabia), *Economic Botany* 41: 89-98.

Gupta R.1974. Wild occurring senna (*C. angustifolia* Vahl) from Kutch, Gajarat, India. *Current Science* 43: 89.

Halliwell B and Gutteridge J M C .2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford (fourth edition)

Hammoudi R.2009. Contribution à la mise en évidence de principes actifs de plante *Teucrium polium geyrii* provenant de la région Tamanrasset. mémoire magister. "Biochimie et Analyse des Bio-produits". Université Kasdi Merbah-Ouargla, 52p

Hartmann T. (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*. 68, 2831–2846.

Hartwell J.L. 1967-71. Plants used against cancer-A survey. *Lloydia* 30

Hubert A J.2006. Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaine. Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse, Ecole doctorale des Sciences Ecologiques. 174p

Husain A. 1992. Status Report on Medicinal Plants for NAM Countries. Dec. 1992, Centre for Science and Technology of NAM and other Developing Countries: 87-90.

Jovanovic, S.V., Steenken, S., Simic, M.G & Hara, Y. (1998). Antioxidant properties of flavonoids. AHDIEQ Journal. 7: 137-161.

Kebili Z. 2016. Contribution à l'étude de quelques activités biologiques des extraits de *Ephedra alata* de la région de Ouargla. Mémoire de magister : Biochimie et Analyse des Bioproduits. Université Kasdi Merbah-Ouargla. Algérie .116p

Khatoon M, Ekramul I, Rafikul I, Rahman AA, Khurshid AHMA, Khondkar P, Rashid M, Parvin S. Estimation of total phenol and in vitro antioxidant activity of Albizi aprocera leaves. BMC Res Notes. 2013.6:121.

Kobashi K., Nishimura T., Kusaka M., Hattori M. and Namba T. 1980. Metabolism of sennosides by human intestinal bacteria. *Planta Medica* 40: 225-236.

Koffi N., Beugré K., Guédé N., Dossahoua T., et Laurent A. 2009. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature* 6 (2): 1 – 15

Krief S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal. Thèse doctorat, muséum national d'histoire naturelle, p. 32.

Kroyer G.T. 2003. Red clover extract as antioxidant active and functional food ingredient innovative. *Food Science and Emerging Technologies* 5: 101-105.

Kumari A and Kakkar P .2008. Screening of antioxidant potential of selected barks of Indian medicinal plants by multiple in vitro assays. *Biomedical and environmental sciences*, 21, 24-29

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) :871-878.

Levisalles J., Jozefowicz M. 1974. chimie organique, composés organiques complexes .Flammarion. Paris .308p

Lock O., Cabello I., Doroteo V., H. 2006. Analysis of flavonoids in plants. *Current Medicinal Chemistry* 20: 6-11

Malec L.S., Pamilio A.B. 2003. Herbivory effects on the chemical constituents of *Bromus pictus*. *Molecular Medicinal Chemistry* 1: 30-38.

Manallah, A. (2012). Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. Pour obtenir le Diplôme de magister, Option : Biochimie Appliquée. Université Ferhat Abbas- sétif, 87p.

Mohamed AA, Ali SI, El-Baz FK. Antioxidant and antibacterial activities of crude extracts and essential oils of *Syzygium cumini* leaves. *PLoS One*.2013.8:e60269

Mukerji B.1963. *The Indian Pharmacological Codex*. Vol. I. Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, India. p 224-26.

Nkhili E.2009. Polyphénols de l'alimentation : extraction, interactions avec les ions du fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant. Thèse de doctorat. Université Cadi Ayyad – Marrakech

Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition* 44: 307–315.

Pandse G.S., Dange P.S. and Surange S.R. 1974. *J. Univ. Porma* 46: 157-162

Perry L.M. 1980. *Medicinal Plants of East and South-East Asia*. MIT Press, Cambridge, USA.p. 620

Popovici C., Saykova I. et Tylkowski B., 2009- Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*. 4 :25-39

Quettier-Deleu C., Gressier B., Vasseur J., Dine T., Brunet C., Luyckx M., Cazin M., Cazin J.C., Bailleul F., Trotin F.2000. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology* 72: 35–42.

Rolland Y.,2004. Burgundy Botanical Extracts, Actiparc de Pont de Vaux, Les Chapelles Sud, 01190 Reyssouze – France. p 6, 419-424.

Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A.1998. Main methods used in lipid oxidation determination. Food Sci. Technol. Int, 4: 391-399

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C. (2005). Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases, Critical Reviews in Food Science and Nutrition. p45, 287- 306.

Sebaihi S. 2010. Activités anti radicalaires des extraits de *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) : caractérisation des fractions. Thèse de magistère, université Abderrahmane Mira, Algérie, 111p.

Shahine A.G. 1994. A Hand Book of Arabian Medicinal Plants. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, USA. 68-70

Siddhuraju P., Becker K.2007. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. Food Chemistry.10 p

Singleton V.L., Rossi J.A.1965. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and viticulture 16: 144-158.

Sultana S., Ahmad M., Zafar M., Khan M., Arshad M. 2012. Authentication of herbal drug Senna (*Cassia angustifolia* Vahl.): A village pharmacy for Indo-Pak. 6(30) : 2299-2308.

Sylvie M. 2011. Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae). Biochimie, Biologie Moléculaire. Thèse de doctorat, Université d'Angers, France, 266p.

Tang S Y and Halliwell B .2010. Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? Biochemical and Biophysical Research Communications, 394, 1-5

Trease G.E. et Evans W.C. 1983. Pharmacognosy. Bailliere Tindall, London, UK. 812.

Tripathi Y.C. 1999. *Cassia angustifolia*, a versatile Medicinal crop. International Tree Crops Journa 10 : 121-129

Tyler V.E. 1982. *The Honest Herbal-A Sensible Guide to the Use of Herbs and Related Remedies*. George F. Stickley, Philadelphia, USA.263

Vitalone A., Di Giacomo S., Di Sotto A., Franchitto A., Mammola C.L., Mariani P., Mastrangelo S., Mazzanti G.2011. Cassia angustifolia Extract Is Not Hepatotoxic in an in vitro and in vivo Study. Departments of Physiology and Pharmacology ‘V. Erspamer’, Anatomical, Histological, Forensic and Orthopedic Sciences, and General and Specialized Surgery ‘P. Stefanini’, Sapienza University of Rome, Rome , Italy 88:252–259

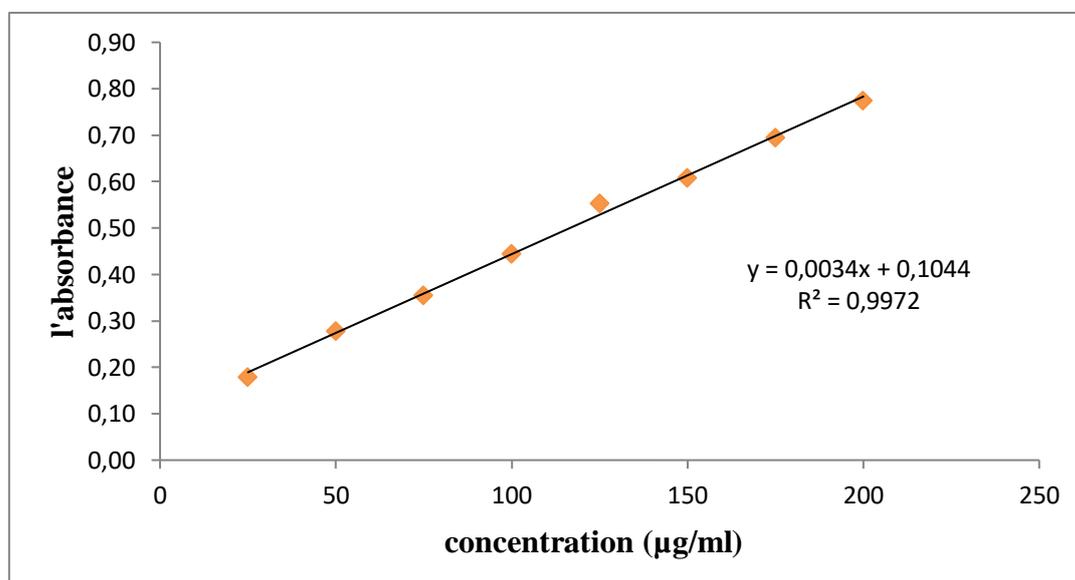
Waterman P.G. and Faulkner D.F. 1979. *Planta Medica* 37: 178-179

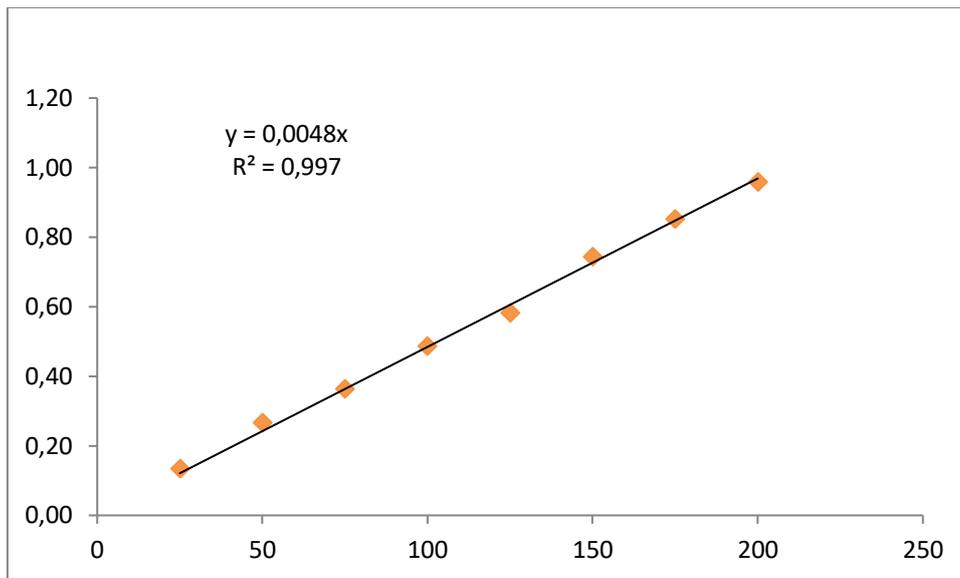
Wolff, S.P.1993. Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aethiology of diabetes mellitus. *Br Med Bull* ; 49 : 642-52.

Annexes

Annexe 1 : matériel et produits utilisés

Appareillage	Réactifs utilisés
Agitateurs magnétique (FALC). Autoclave. Bain-marie MEMMERT. Balance analytique (KERN, ABT 220-5DM). Balance normale (KERN EMB 220-1). Broyeur. Etuve HRDH-71. pH mètre (WTW Ph 3110). Plaque agitatrice VELP. Spectrophotomètre UV-visible (JENWAY 6310). Tamiseur. Vortex (VELP Scientifica).	Acide chloridrique (HCl). Acide gallique (200 µg/ml) : préparé dans l'eau distillée. Acide sulfurique. AlCl ₃ (2%) : préparé dans le méthanol. Carbonate de sodium Na ₂ CO ₃ (7,5 %) FeCl ₃ (0,1%) : préparé dans l'eau distillée. Quercétine (100 µg/ml). Réactif de Folin : dilué au 1/10 avec de l'eau distillée. Solution de DPPH (0,1mM) : préparée dans l'éthanol.

Annexe 2. Courbe d'étalonnage d'acide gallique

Annexe 3. Courbe d'étalonnage de la quercétine

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم نشاط مضادات الأكسدة في المستخلصات المختلفة من الجزء الهوائي (أوراق) من *Cassia angustifolia* Vahl والذي يعتبر نبات طبي ينتمي إلى عائلة fabacée. تم تحضير ثلاثة مستخلصات: مائي، هكسان، ميثانولي. تم الحصول على أعلى مردود للمستخلص الميثانولي بنسبة 24.5% و 20% بالنسبة للمستخلص المائي. تم تحديد كمية مركبات الفينول الكلي بواسطة كاشف Folin-Ciocalteu، و قد قدر بنسبة (85.11mgEAG/g) بالنسبة للمستخلص المائي. تم تقييم الفلافونويدات الكلية باستخدام طريقة $AlCl_3$ ، أعلى قيمة سجلت 69.26 بالنسبة لنفس المستخلص تمت دراسة نشاط مضادات الأكسدة بواسطة اختبارين DPPH و FRAP. تظهر نتائج هذه الدراسة أن مستخلص الميثانول له تأثير ملحوظ عند قيمة IC_{50} تساوي $121.9 \mu g/ml$ فيما يخص اختبار (DPPH) وقدرة امتصاص تساوي $0.5 \mu g/ml$ بالنسبة لاختبار القوة المضادة للأكسدة الحديدية (FRAP)

الكلمات المفتاحية: *Cassia angustifolia*، النشاط المضاد للأكسدة، مركبات الفينول، الفلافونويدات.

Résumé

L'objectif de cette étude est évalué l'activité antioxydant de différents extraits de la partie aérienne (les feuilles) de *Cassia angustifolia* Vahl, est une plante médicinale qui appartient à la famille de fabacée. Trois extraits ont été préparés: aqueux, hexane, méthanolique. Le rendement le plus élevé est : 24.5% pour l'extrait méthanolique et 20% pour l'extrait aqueux. La teneur de polyphénols totaux a été déterminée par le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de (85.11mgEAG/g) pour l'extrait aqueux. Les flavonoïdes ont été évalués en utilisant la méthode $AlCl_3$, la teneur le plus élevé est 69.26 mg EQ/g pour le même extrait. L'activité antioxydant a été étudiée par deux tests DPPH et FRAP. Les résultats de cette étude montrent que l'extrait méthanolique a un effet remarquable à une valeur d' IC_{50} égale à $121.9 \mu g/ml$ concernant le test de DPPH et absorbance 0.5 égale à $69.5 \mu g/ml$ pour le pouvoir antioxydant de réduction de fer.

Mots clés : *Cassia angustifolia*, polyphénols, flavonoïdes, activité antioxydants.

Abstract

The objective of this study is to evaluate the antioxidant activity of different extracts of the aerial part (leaves) of *Cassia angustifolia* Vahl, is a medicinal plant that belongs to the fabaceae family. Three extracts were prepared: aqueous, hexane, methanol. The highest yield is for the methanolic extract: 24.5% however 20% for the aqueous extract. The content of total polyphenols was determined by the Folin-Ciocalteu reagent, it is 85.11 mg EAG / g for the aqueous extract. The flavonoids were evaluated using the $AlCl_3$ method, the highest content is 69.26 mg EQ / g.

Antioxidant activity was studied by two tests DPPH and FRAP. The results of this study show that the methanolic extract has a remarkable effect at IC_{50} value equal to $121.9 \mu g / ml$ concern the DPPH test and absorbance 0.5 equal to $69.5 \mu g / ml$ for the antioxidant iron reduction power.

Key Word : *Cassia angustifolia*, polyphenol, flavonoids, antioxidant activity.