

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



UNIVERSITE de TLEMCEEN

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

Département de Biologie

Laboratoire de recherche : LAPRONA

MEMOIRE

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

Option : Biochimie

**Thème**

**Dosage des composés phénoliques, capacité antioxydante totale et pouvoir réducteur du fer d'un extrait de *Caralluma europaea* (Guss.)**

Présenté par

REGUIBI NAOUEL

Soutenu le, 08/07/2021 devant le jury composé de :

Dr CHAUCHE Tarik Mohammed	<b>Président</b>	MCA à l'Université de Tlemcen
Dr MEZOUAR Dounia	<b>Examineur</b>	MCB à l'Université de Tlemcen
Dr CHAUCHE Farah	<b>Encadreur</b>	MCA à l'Université de Tlemcen

**Année Universitaire : 2020/2021**



## Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, qui m'a donné la force et le courage d'aller jusqu'au bout de mes études.

Un remerciement spécial pour mon encadreur **Dr CHAOUCHE Farah**, Maitre de conférences « A » à la Faculté de SNV / STU (Université de Tlemcen). Je tiens vivement à lui exprimer ma profonde reconnaissance et ma gratitude pour sa disponibilité, sa patience, sa compréhension. Merci pour votre gentillesse, vos précieux conseils et votre soutien à tous les instants, et surtout merci pour vos qualités scientifiques et humaines qui resteront à jamais pour moi l'exemple.

J'exprime ma vive reconnaissance au **Dr. CHAOUCHE Tarik Mohammed**, Maitre de conférences « A » à la Faculté de SNV / STU (Université de Tlemcen), d'avoir accepté de me faire l'honneur de présider le jury de ce travail.

Je remercie **Dr MEZOUAR Dounia**, Maitre de conférences « B » à la Faculté de SNV / STU (Université de Tlemcen), je vous suis reconnaissante d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie également de tout mon cœur *M<sup>elle</sup> GUELLAI Imène*, Doctorante à l'université de Tlemcen, pour son aide précieuse au laboratoire des Produits naturels, sa disponibilité et ses conseils.

En fin, Je ne serais achevé sans remercier mon frère REGUIBI WALID, dont l'inestimable collaboration à mes recherches, il m'a apporté l'aide essentielle à la réalisation de ce travail.

*Je dédie ce modeste travail*

À mes chers parents pour leurs encouragements, tendresse,  
affection et soutien durant mes études : vous étiez toujours  
là pour m'écoutez, me sourire, me réconforter et m'encourager  
dans les moments de doute... Je souhaite que vous trouverais  
ici le fruit de vos sacrifices. Que dieu vous bénisse et vous  
accorde une longue vie pleine de sante et de bonheur.

A mes frères

A mes sœurs

A toute ma famille

A tous mes amis (es)

A tous ceux dont l'amitié sincère mes agréable

A tous mes professeurs

A toute la promotion de Biochimie

A toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

## ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للأكسدة لمستخلص *Caralluma europaea* (Guss.) المحضر في خليط من الميثانول-أسيتون (50/50:ح/ح) لمدة 24 ساعة. تم تقدير محتويات كمية البوليفينول الكلي (PPT)، الفلافونويد (Fv) و التانان (Tn) بواسطة القياس الطيفي Folin-Ciocalteu، ثلاثي الكلوريد و الفانيلين على التوالي.

النتائج التي تم الحصول عليها هي  $2,59 \pm 0.17$  ميليغرام معادل لحمض الغاليك لكل غرام من المادة الجافة بالنسبة ل (PPT)،  $1,32 \pm 0.16$  ميليغرام معادل للكاتيشين لكل غرام من المادة الجافة بالنسبة للفلافونويد (Fv) و  $1,34 \pm 0,27$  ميليغرام معادل للكاتيشين لكل غرام من المادة الجافة بالنسبة لتانان (Tn).

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة بطريقتين مختلفتين. السعة الكلية لمضادات الأكسدة (CAT) على أساس اختزال الموليبيدينوم (VI) إلى الموليبيدينوم (V) بواسطة المستخلص النباتي بسعة تقديرية ، مقارنة بحمض الاسكوربيك و المقدر بـ  $12,43 \pm 1,98$  ميليغرام معادل لحمض الاسكوربيك لكل غرام من المادة الجافة. كما تم تقدير القدرة المختزلة للحديد في مستخلصنا بتركيز فعال  $50$  (EC<sub>50</sub>) يساوي  $4,56 \pm 0.086$  ميليغرام/مل وهو نشاط أقل بكثير من المعيار BHA

( $0,00992 \pm 0,0017$  ميليغرام/مل)

الكلمات المفتاحية: *Caralluma europaea* (Guss.)، المركبات الفينولية، القدرة الكلية لمضادات الأكسدة، اختزال الحديد، التركيز الفعال 50.

## Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antioxydante de l'extrait de *Caralluma europaea* (Guss.) préparé par macération par un mélange méthanol-acétone (50/50 : v/v) pendant 24 h. L'estimation des teneurs en polyphénols totaux (PPT), en flavonoïdes (Fv) et en tanins condensés (Tn) à été réalisée par des méthodes spectrophotométriques (méthode de Folin-Ciocalteu, de trichlorure d'aluminium et de vanilline, respectivement). Les résultats obtenus sont :  $2,59 \pm 0,17$  mg EAG /g MS pour les PPT,  $1,32 \pm 0,16$  mg EC/g MS pour les Fv et  $1,34 \pm 0,27$  mg EC/g MS pour les Tn.

L'activité antioxydante a été évaluée par deux méthodes différentes. La capacité antioxydante totale (CAT) basée sur la réduction du molybdène (VI) en molybdène (V) par l'extrait de plante avec une capacité estimée, par rapport à l'acide ascorbique, à  $12,43 \pm 1,98$  mg EAA/g MS. Le pouvoir réducteur du fer de notre extrait est estimé par une concentration efficace 50 (EC<sub>50</sub>) égale à  $4,56 \pm 0,086$  mg/mL. Une activité largement inférieure à celle du standard, le BHA ( $0,0992 \pm 0,0017$  mg/mL).

**Mots clés :** *Caralluma europaea* (Guss.), composées phénoliques, capacité antioxydante totale, pouvoir réducteur, EC<sub>50</sub>.

## Summary

The objective of this study is to evaluate the antioxidant activity of the extract of *Caralluma europaea* (Guss.) Prepared by maceration in a mixture of methanol-acetone (50/50 : v / v) for 24 hours. The estimation of the contents of total polyphenols (TPP), flavonoids (Fv) and condensed tannins (Tn) was carried out by spectrophotometric methods (Folin-Ciocalteu method, aluminum trichloride and vanillin, respectively). The results obtained are:  $2.59 \pm 0.17$  mg EAG / g MS for PPT,  $1.32 \pm 0.16$  mg EC / g MS for VF and  $1.34 \pm 0.27$  mg EC / g MS for the Tn.

Antioxidant activity was assessed by two different methods. The total antioxidant capacity (CAT) based on the reduction of molybdenum (VI) to molybdenum (V) by the plant extract with an estimated capacity, relative to ascorbic acid, at  $12.43 \pm 1.98$  mg EAA / g MS. The reducing power of the iron in our extract is estimated by an effective concentration 50 (EC50) equal to  $4.56 \pm 0.086$  mg / mL. An activity much lower than that of the standard, BHA ( $0.0992 \pm 0.0017$  mg / mL).

Key words: *Caralluma europaea* (Guss.), Phenolic compounds, total antioxidant capacity, reducing power, EC50.

## La liste des tableaux

Tableau 1: Les principales classes des composés phénoliques .....	3
Tableau 2: Méthode de dosage des polyphénols .....	23
Tableau 3: Méthode de dosage des flavonoïdes .....	24
Tableau 4: Méthode de dosage des tanins .....	25
Tableau 5: Méthode de mesure de la capacité antioxydante totale .....	26
Tableau 6: Méthode de mesure du pouvoir réducteur de fer.....	27
Tableau 7: Les rendements et les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés (moyenne $\pm$ écart type) dans l'extrait de <i>C.europaea</i> (Guss.) .....	31
Tableau 8: Les activités antioxydantes (moyenne $\pm$ écart type) de l'extrait de <i>C. europaea</i> (Guss.) et de standard par deux méthodes, la CAT et le pouvoir réducteur.....	33

## La liste des figures

Figure 1: Les principaux acides phénoliques. ....	4
Figure 2: Structure de base d'un flavonoïde .....	5
Figure 3: Structure chimique de quelques flavonols. ....	5
Figure 4: Structure chimique des flavones. ....	6
Figure 5: Structure chimique des flavanones. ....	6
Figure 6: Structure chimique des isoflavones. ....	7
Figure 7: Structure chimique des flavan-3-ols. ....	7
Figure 8: Structure des anthocyanidines les plus courants. ....	8
Figure 9: Structures de deux tanins hydrosolubles. ....	9
Figure 10: Structure d'un tanin condensé. ....	10
Figure 11: Cible de dommage. ....	11
Figure 12: Equilibre de balance entre la production des ERO/ERN et les antioxydants. ....	12
Figure 13: Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants. ....	13
Figure 14: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux. .	29
Figure 15: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes. ....	30
Figure 16: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés. ....	30
Figure 17: Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de la capacité antioxydante totale (CAT). ....	31
Figure 18: Pouvoir réducteur du fer du standard BHA. ....	32
Figure 19: Pouvoir réducteur du fer de l'extrait de <i>C. europaea</i> (Guss.). ....	32

## La liste des photos

Photo 1 : <i>C.europaea</i> (Guss) .....	16
Photo 2: Fruits de <i>C.europaea</i> (Guss).....	17
Photo 3: Préparation de l'extrait.....	21

## Table des matières

Introduction .....	1
1 Les composés phénoliques.....	3
1.1 Les acides phénoliques .....	4
1.2 Les flavonoïdes.....	4
1.2.1 Flavonols .....	5
1.2.2 Flavones .....	6
1.2.3 Les flavanones.....	6
1.2.4 Les isoflavones .....	7
1.2.5 Les flavan-3-ols.....	7
1.2.6 Les anthocyanes .....	8
1.3 Les tanins .....	8
1.3.1 Les tanins hydrosolubles .....	8
1.3.2 Les tanins condensés .....	9
1.4 Activité biologique des composés phénoliques.....	10
2 Les radicaux libres et le stress oxydatif .....	11
2.1 Les antioxydants (système de défense) .....	13
2.2 Différents méthodes de mesure de l'activité antioxydante.....	14
2.2.1 Méthode de piégeage du radical DPPH.....	14
2.2.2 Méthode de l'ABTS .....	14
2.2.3 Méthode de la réduction de Fer.....	14
2.2.4 Méthode de la capacité antioxydante totale (CAT).....	15
3 <i>Caralluma europaea</i> (Guss.) .....	15
3.1 Description botanique.....	15
3.1.1 Systématique .....	17
3.1.2 Synonymes .....	18
3.1.3 Noms vernaculaires .....	18

3.2	Distribution .....	18
3.3	Usage traditionnelle .....	18
3.4	Composition chimique.....	18
3.5	Etudes antérieures sur <i>Caralluma europaea</i> .....	19
3.6	Toxicité.....	19
Matériel et méthodes .....		20
1	Provenance des plantes étudiées .....	21
2	Méthode d'extraction .....	21
3	Quantification de quelques classes phénoliques dans les extraits .....	22
3.1	Polyphénolstotaux : Le dosage des polyphénols est réalisé selon la méthode décrite par Vermerris et <i>al.</i> , 2006 :.....	22
3.1.1	Principe.....	22
3.1.2	Mode opératoire .....	22
3.2	Flavonoïdes totaux : La quantification des flavonoïdes est faite selon une méthode colorimétrique décrite par Dewanto et <i>al.</i> 2002 : .....	23
3.2.1	Principe.....	23
3.2.2	Mode opératoire .....	23
3.3	Tanins condensés : Le dosage des tanins condensés est réalisé selon la méthode décrite par Sun et <i>al.</i> , 1998 : .....	24
3.3.1	Principe.....	24
3.3.2	Mode opératoire .....	24
4	Estimation des activités biologiques, <i>in vitro</i> .....	25
4.1	Détermination de l'activité antioxydante .....	25
4.1.1	Capacité antioxydante totale (CAT) : Elle est réalisée selon la méthode décrite par Prieto et <i>al.</i> , 1999 :.....	25
4.1.1.1	Principe.....	25
4.1.1.2	Mode opératoire.....	25

4.1.2	Pouvoir réducteur du fer :Le pouvoir réducteur est déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu., 1986 :.....	26
4.1.2.1	Principe.....	26
4.1.2.2	Mode opératoire.....	26
5	Analyses statistiques .....	27
	Résultats et discussion.....	28
1	Le rendement de l'extrait de <i>C. europaea</i> (Guss.).....	29
2	Dosages des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins .....	29
3	Evaluation de l'activité antioxydante par deux méthodes .....	31
3.1	Capacité antioxydante totale (CAT) .....	31
3.2	Pouvoir réducteur du fer .....	32
4	Discussion .....	33
	Conclusion générale .....	36
	Références bibliographiques .....	38

# Introduction

Depuis l'antiquité, les être humaines ont utilisés diverses plantes trouvées dans son environnement, pour prévenir et soigner de nombreuses maladies. L'usage thérapeutique de ces plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement comme l'Algérie, en raison du manque d'un système médical moderne (Tabuti et *al.*, 2003) et surtout par sa position géographique qui offre une très grande diversité écologique et floristique (Scherrer et *al.*, 2005).

L'espèce de *Caralluma europaea* (Guss.), connue sous le nom Daghmous, est une plante médicinale largement utilisée dans la thérapie traditionnelle contre différentes maladies comme la toux, les kystes génitales, le goitre ...etc. (Sagou et *al.*, 2016). Quelques études antérieures ont révélé la richesse de la plante, originaire du Maroc, en composés phénoliques avec des propriétés antioxydante, antidiabétique, antiproliférative et une activité hépatoprotectrice.....etc. (Dra et *al.*, 2018 ; Amrati et *al.*, 2020 et 2021).

Le stress oxydatif peut mener à des dommages souvent irréversibles pour la cellule. Ces dommages interviennent à l'apparition de nombreuses maladies graves telles que le cancer, l'artériosclérose, l'arthrite, maladies neurodégénératives....etc. Pour cela de nombreuses stratégies ont été exploitées pour lutter contre le stress oxydatif. Parmi ces stratégies, l'usage des plantes médicinales qui constituent une source importante de substances comme les composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes et les tanins qui ont de nombreuses activités biologiques, pharmacologiques ...etc. (Evans et Halliwell, 1999 ; Favier, 2003).

L'objectif de notre présente étude est basé sur une étude phytochimique par des méthodes de dosages des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins, et une évaluation de l'activité antioxydante, *in vitro*, par deux méthodes : la capacité antioxydante totale (CAT) et le pouvoir réducteur du fer de la partie aérienne de *Caralluma europaea* (Guss.) vendue fraîche chez l'herboriste à Tlemcen (Algérie). Ce travail est réalisé en trois parties :

- La première aborde une étude bibliographique qui donne des approches sur : les composés phénolique, les oxydants et antioxydants et une présentation de la plante étudiée *Caralluma europaea* (Guss.).
- La deuxième illustre le matériel et les méthodes utilisés.
- La troisième est consacrée à la présentation et la discussion des résultats obtenus.

Enfin, cette étude s'achève par une conclusion générale et des perspectives pour le futur.

# **Recherche bibliographique**

## 1 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques désignent les monophénols, les diphénols et les polyphénols qui contiennent une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques. Ce sont des métabolites secondaires des plantes, utilisés dans le système de défense, la lignification, la régulation de la croissance et les interactions avec leur environnement (Macheix *et al.*, 2005 ; Mihanfar *et al.*, 2021). Il existe plus de 8000 composés phénoliques de différentes structures moléculaires, qui contiennent tous d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (Macheix *et al.*, 2005 ; Lund et Mennesota, 2021). Ces composés peuvent être regroupés en de nombreuses classes, allant de la composition simple à la composition polymérisée, selon le nombre d'atome de carbone constitutifs et la structure de base du squelette carboné, les liaisons avec d'autre molécule et la nature et la position des hydroxylations, des méthylations et des glycosylations du squelette carboné de base. Les principales classes sont les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins (Tableau 1) (Macheix, 1996).

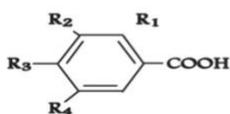
**Tableau 1:** Les principales classes des composés phénoliques (Macheix, 1996).

Nbre de C	Squelette de base	Classe	Exemple	Plante alimentaire (exemple)
6	C <sub>6</sub>	Phénol simple	Catéchol	
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	A.Hydroxybenzoïque	p-Hydrobenzoïque	Epices, fraise
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	A .Hydroxycinnamique  Coumarines	Acide caféïque  Scopoline	Pomme, P. de terre  Citrus
10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naphthoquinones	Juglone	Noix
13	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xanthones	Mangiférine	Mangue
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoïdes Isoflavonoïdes	Quercétol, cyanidol Daidzéine	Fruits, légumes Soja, pois
N	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Lignines		Fruits à noyau
N	(C <sub>15</sub> ) <sub>n</sub>	Tanins		Raisin rouge, kaki

## 1.1 Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés polyphénoliques, non flavonoïdes, qui peuvent être divisés en dérivés d'acide benzoïque en C<sub>1</sub>- C<sub>6</sub> et dérivés d'acide cinnamique basé sur les squelettes en C<sub>3</sub>- C<sub>6</sub> (Macheix *et al.*, 2005) (Figure 1). Ces acides phénoliques sont souvent sous forme liée (Kim *et al.*, 2006 ; Chandrasekara et Shahidi, 2010), et ne peuvent être libérés ou hydrolysés que par hydrolyse acide ou alcaline, ou par des enzymes (Tsao, 2010).

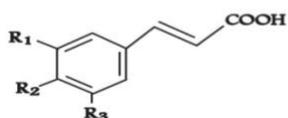
### Acides hydroxybenzoïques



$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$   
 $R_1 = R_2 = R_4 = H, R_3 = OH$   
 $R_1 = R_4 = H, R_2 = R_3 = OH$   
 $R_1 = R_4 = H, R_2 = OCH_3, R_3 = OH$   
 $R_1 = H, R_2 = R_3 = R_4 = OH$   
 $R_1 = H, R_2 = R_4 = OCH_3, R_3 = OH$   
 $R_1 = OH, R_2 = R_3 = R_4 = H$   
 $R_1 = R_4 = OH, R_2 = R_3 = H$

acide benzoïque (non phénolique)  
 acide p-hydroxybenzoïque  
 acide protocatéchique  
 acide vanillique  
 acide gallique  
 acide syringique  
 acide salicylique  
 acide gentisique

### Acides hydroxycinnamiques («phénylpropanoïdes»)



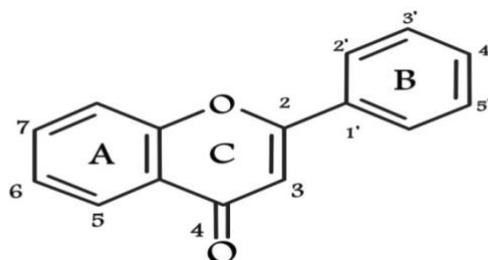
$R_1 = R_2 = R_3 = H$   
 $R_1 = R_3 = H, R_2 = OH$   
 $R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$   
 $R_1 = OCH_3, R_2 = OH, R_3 = H$   
 $R_1 = R_3 = OCH_3, R_2 = OH$

acide cinnamique (non phénolique)  
 acide p-coumarique  
 acide caféique  
 acide férulique  
 acide sinapique

**Figure 1:** Les principaux acides phénoliques (Macheix *et al.*, 2005).

## 1.2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des molécules largement distribuées dans le règne végétal. Ils constituent un groupe de plus de 4000 molécules ont été identifiées. Leurs structure générale de base est C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, et sont constituées de deux unités de benzène qui peuvent être reliés par une chaîne en C<sub>3</sub> qui peut évaluer en un cycle C (hétérocycle) (Figure 2) (Ghadira, 2005 ; Tsao, 2010).

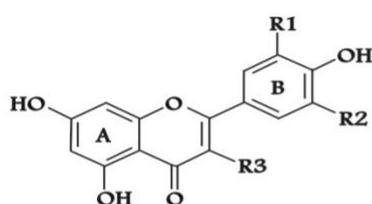


**Figure 2:** Structure de base d'un flavonoïde (Ghadira, 2005)

Les flavonoïdes peuvent être classés en différents sous groupes en fonction de degré d'oxydation du carbone central, de saturation de l'hétérocycle central, et de la présence ou pas de l'hétérocycle (Abbaset *al.*, 2017). Les principaux sous groupes sont : les flavanones, les flavanols, les flavonols, les isoflavones, les flavones et les anthocyanidines. Il ya d'autre flavonoïdes présents en faible concentration dans les aliments tels que les flavane-3,4-diols, les dihydroflavonols, les coumarines, les dihydrochalcones, les chalcones, et les aurones (Williamson et *al.*, 2009)

### 1.2.1 Flavonols

Les flavonols possèdent un hétérocycle oxygéné, avec une double liaison entre C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub>, et un groupement hydroxyle en C<sub>3</sub>. Ils existent sous forme glycosylées (glucose, xylose, arabinose, galactose, rhamnose) (Figure 3) (Collin et Crouzet, 2011 ; Abbas et *al.*, 2017).

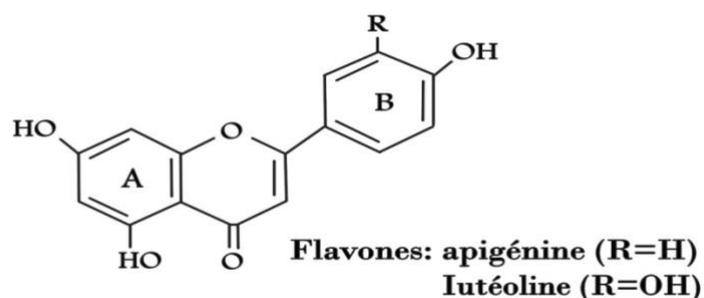


Flavonols	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>Kaempférol</b>	H	H	OH
<b>Quercétine</b>	OH	H	OH
<b>Myricétine</b>	OH	OH	OH
<b>Isorhamnétine</b>	OCH <sub>3</sub>	H	OH
<b>Rutine</b>	OH	H	<b>Rutinose</b>

**Figure 3:** Structure chimique de quelques flavonols (Collin et Crouzet, 2011).

### 1.2.2 Flavones

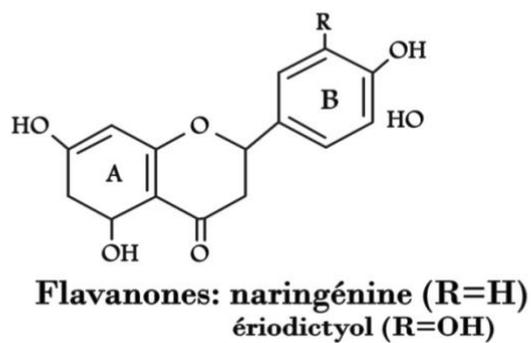
Les flavones possèdent la structure de base des flavonoïdes, avec double liaison entre C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub>, et se distinguent des flavonols par l'absence d'oxygénation en C<sub>3</sub> (Figure 4) (Macheix et *al.*, 2005 ; Frydman et *al.*, 2013).



**Figure 4:** Structure chimique des flavones (Macheix et *al.*, 2005).

### 1.2.3 Les flavanones

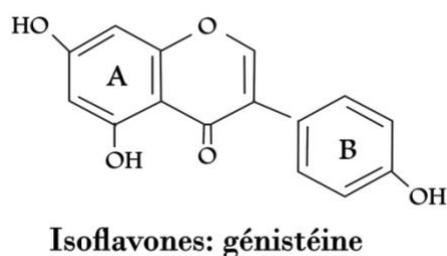
Les flavanones sont des composés caractérisés par l'absence de double liaison entre C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub> (chaîne saturé) et la présence d'un centre chiral en C<sub>2</sub>. Ils sont fortement présents dans les agrumes (Figure 5) (Macheix et *al.*, 2005 ; Frydman et *al.*, 2013).



**Figure 5:** Structure chimique des flavanones (Macheix et *al.*, 2005).

#### 1.2.4 Les isoflavones

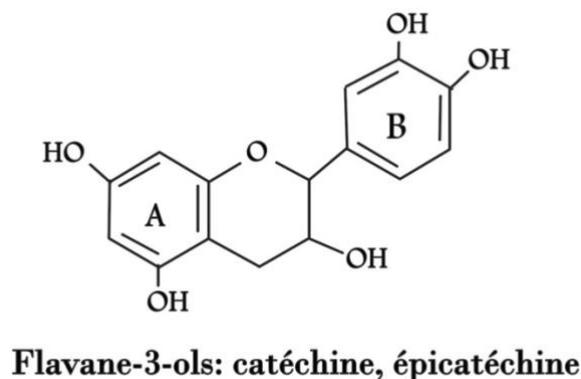
Les isoflavones sont caractérisés par la liaison de cycle B à l'hétérocycle C en C<sub>3</sub> contrairement aux autres flavonoïdes qui se lient en C<sub>2</sub>. Ils sont presque exclusivement présents dans les légumineuses (Figure 6) (Macheix et *al.*, 2005 ; Teng et Chen, 2019).



**Figure 6:** Structure chimique des isoflavones (Macheix et *al.*, 2005).

#### 1.2.5 Les flavan-3-ols

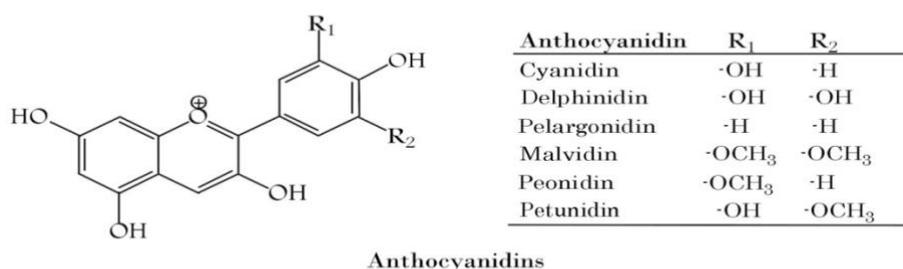
Les flavanols ou les flavan-3-ols sont appelés souvent catéchine et sont caractérisés par l'absence de double liaison entre C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub> dans l'hétérocycle C. Ils représentent la sous classe la plus complexe allant des simples monomères (catéchine et épicatechine), aux polymères de proanthocyanidines qui sont des tanins condensés (Figure 7) (Macheix et *al.*, 2005 ; Tsao, 2010 ; Asenso et *al.*, 2015 ; Yqub et *al.*, 2016).



**Figure 7:** Structure chimique des flavan-3-ols (Macheix et *al.*, 2005).

### 1.2.6 Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments hydrosolubles responsables de la plupart des couleurs des légumes, des fruits et des fleurs. Ils présentent sous deux forme anthocyanidines et anthocyanoside, mais la forme anthocyanidines est la plus abondante (Figure 8) (Tsao, 2010 ; Prior et Wu, 2007 ; Abass et *al.*, 2017).



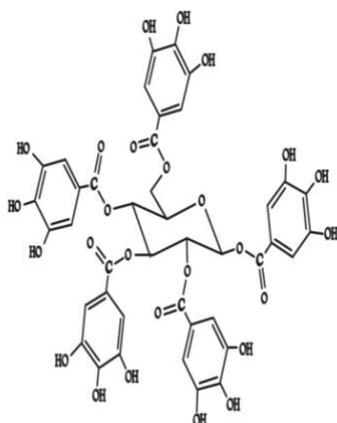
**Figure 8:** Structure des anthocyanidines les plus courants (Tsao, 2010).

### 1.3 Les tanins

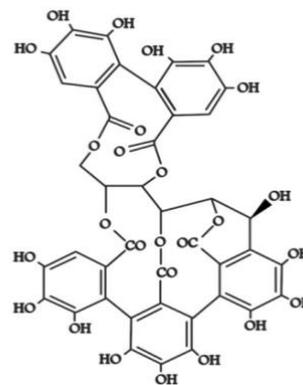
Les tanins sont des composés phénoliques condensés. On distingue deux grand groupes différent selon leur structure chimique et leur compositions : les tanins hydrosolubles et les tanins condensés (Macheix et *al.*, 2005).

#### 1.3.1 Les tanins hydrosolubles

Ce sont des esters de l'acide gallique ou ellagique et de sucre, habituellement le glucose. Ils sont divisés en ellagitanins et en gallotanins. Ils sont capables de s'hydrolyser par hydrolyse acide ou basique et sous action enzymatique. Ils se trouvent chez les dicotylédones et certains arbres (Figure 9) (Macheix et *al.*, 2005; Collin etCrouzet, 2011).



*Pentagalloylglucose*



*Castalagine*

**Figure 9:** Structures de deux tanins hydrosolubles (Macheix.j et *al.*, 2005).

### 1.3.2 Les tanins condensés

Les tanins condensés sont des polymères de flavan-3-ols (éventuellement flavane-3,4-diols) (Figure 10). Ces composés sont non hydrolysables sauf sous action chimique forte (acide) et à chaud. Ils sont appelés ainsi proanthocyanidines en raison de leur capacité de se transformer en pigment rouge (Macheix et *al.*, 2005).

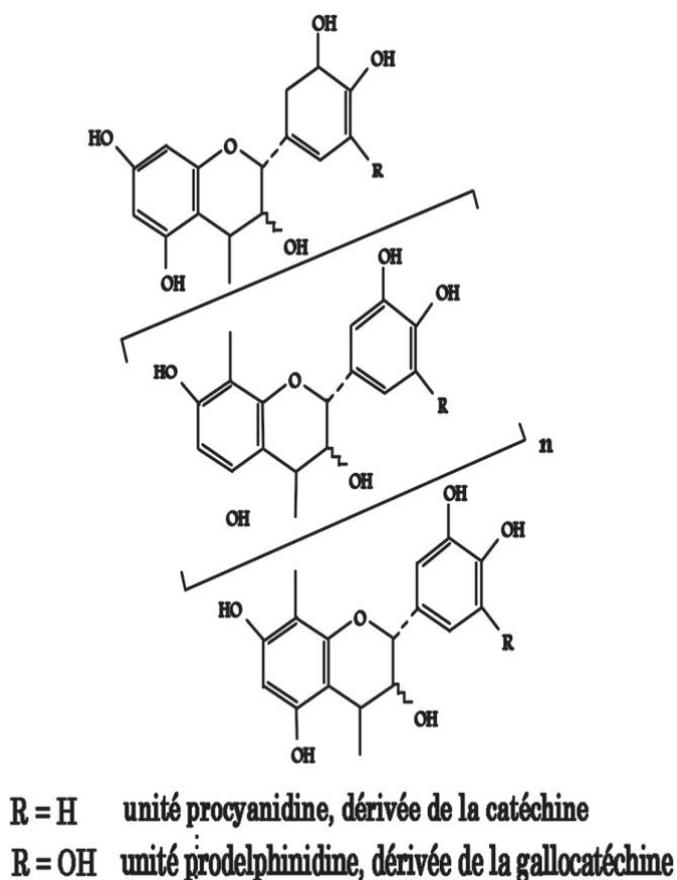


Figure 10: Structure d'un tanin condensé (Macheix et *al.*, 2005).

#### 1.4 Activité biologique des composés phénoliques

Au cours de ces dernières années, l'importance de ces composés a fortement augmenté en réponse de leur propriétés cardioprotectrice, anti cancérogène, antioxydants, antiapoptotiques et anti-inflammatoires (Abbas et *al.*, 2017 ; Mihanfar el *al.*, 2021).

Les polyphénols sont les principaux contributeurs à l'activité antioxydante (Wang et *al.*, 1996). Ce sont de puissants antioxydants capables de neutraliser les radicaux libres en faisant don d'un électron ou d'un atome d'hydrogène. Ainsi, ils sont capables de réduire l'oxydation pour inhiber ou désactiver les espèces actives et les précurseurs des radicaux libres (Rice et *al.*, 1996 ; Guo et *al.*, 2009).

## 2 Les radicaux libres et le stress oxydatif

Un radical libre est un atome ou une molécule contenant un ou plusieurs électrons non appariés dans le cercle externe ce qui le rend instable, très réactif et de durée de vie courte. En raison de leur haute réactivité, ces radicaux peuvent éliminer des électrons d'autres composés pour atteindre leur stabilité. Ainsi, la molécule attaquée perd son électron et devient elle-même un radical libre, déclenchant une cascade de réactions en chaîne ce qui entraîne la formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et des espèces réactives de l'azote (ERN), fabriqués par la chaîne respiratoire mitochondriale et qui endommage la cellule vivante (Fu et al., 2014 ; Biswas et al., 2017) (Figure 11) (Kohen et Nyska, 2002).

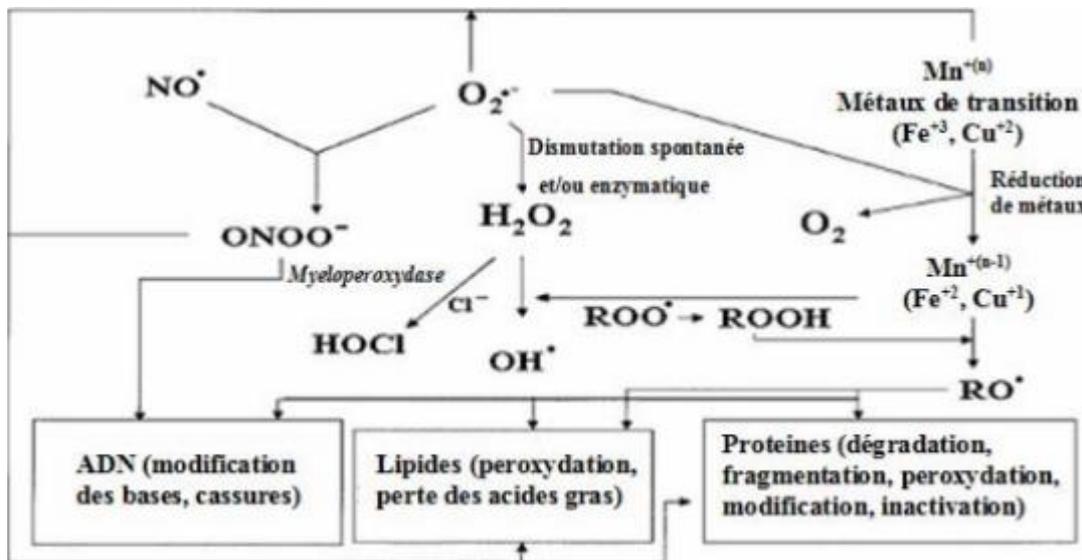


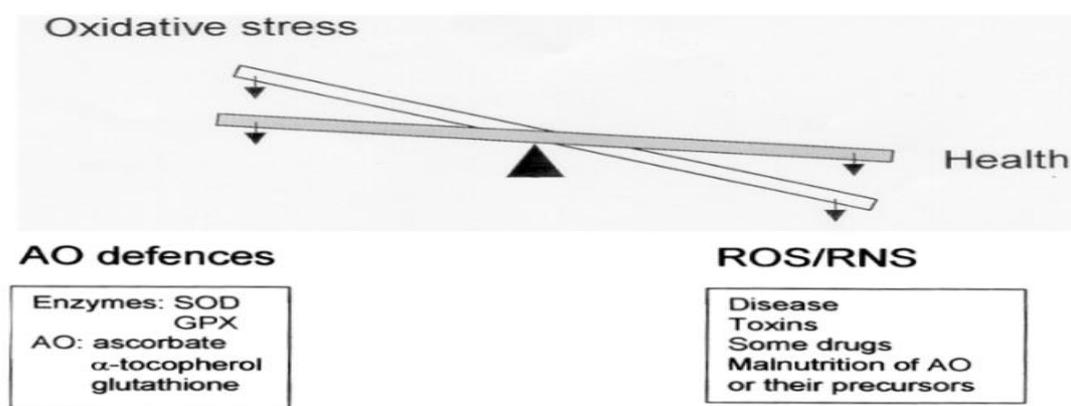
Figure 11: Cible de dommage (Kohen et Nyska, 2002).

Les ERO sont l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ , le radical hydroxyle  $OH^{\bullet}$ , le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  et l'oxygène singulier  $O^{\bullet}$ . L'oxyde nitrique (monoxyde d'azote)  $NO^{\bullet}$  est un ERN. Ils ont néanmoins des rôles bénéfiques à des concentrations faibles ou modérées et participent au fonctionnement de certains enzymes et à la transduction de signaux cellulaires (Favier, 2003 ; Pham-Hay et al., 2008). Les ERO sont impliquées dans différentes voies de défense immunitaire comme les cellules phagocytaires qui secrètent des ERO pour tuer les bactéries, et dans la régulation des fonctions des lymphocytes (Belikov et al., 2015). L'oxyde nitrique  $NO$  est un puissant vasodilatateur qui diminue la concentration intracellulaire de calcium, provoquant la relaxation de muscle lisse vasculaire (Zhao et al., 2015).

## Recherche bibliographique

Ces radicaux libres ont deux sources. Les sources endogènes qui incluent différents organites cellulaires tels que les mitochondries, peroxysomes et réticulum endoplasmique (consommation de l'oxygène élevée), en plus du système enzymatique tel que acylCOA oxydase, D-aspartate oxydase et xanthine oxydase. Les sources exogènes sont l'eau polluée, les pesticides, les drogues ...etc. qui pénètrent dans l'organisme par différentes voies (Pham-Huy et *al.*, 2008 ; Phaniendra et *al.*, 2015). D'autres réactions biologiques, *in vivo*, peuvent fabriquer des ERO comme dans la réponse à l'invasion bactérienne, aux xénobiotiques, aux cytokines et les métaux toxiques (chrome, cuivre,..) (Ray et *al.*, 2012 ; Fu et *al.*, 2014). De même, les rayons ionisants X et ultraviolets peuvent également conduire à la formation d'ERO (Favier, 2003).

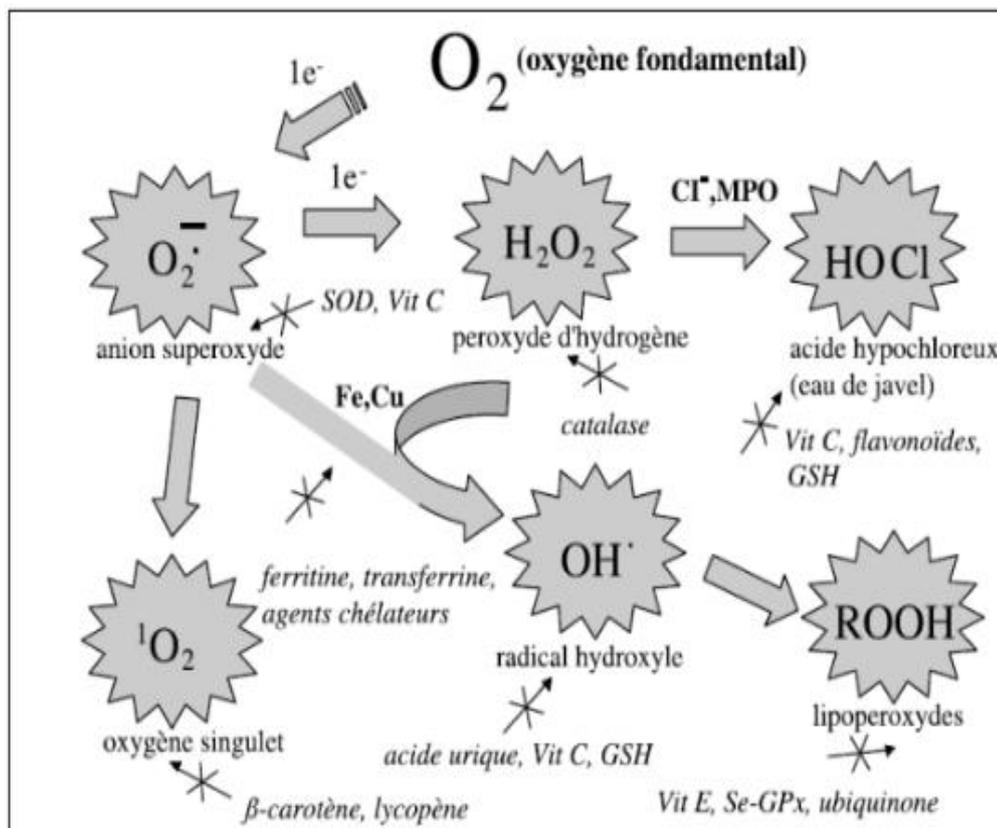
L'excès d'ERO et ERN peut amener à un stress oxydatif et nitrosatif (Biswas, 2017). Le terme stress oxydatif peut être défini comme un déséquilibre entre la balance des oxydants (ERO et ERN) et le système de défense (les antioxydants) (Figure 12) (Evans et Halliwell, 1999), en faveur des oxydants. Lorsqu'il y a ce déséquilibre cela conduit à une perturbation de signalisation cellulaire et à l'apparition des dégâts souvent irréversibles pour la cellule (ADN, protéines, lipides) associés à l'apparition de nombreuses maladies graves (cancer, artériosclérose, arthrite, neurodégénératives) (Evans et Halliwell, 1999 ; Biswas, 2016).



**Figure 12:** Equilibre de balance entre la production des ERO/ERN et les antioxydants (Evans et Halliwell, 1999).

## 2.1 Les antioxydants (système de défense)

Un antioxydant est défini comme toute substance qui, lorsqu'elle est présente à de faible concentration par rapport à celles d'un substrat oxydable, est capable de retarder ou empêcher de manière significative l'oxydation de ce substrat (Halliwell et witheman, 2004). Pour cela, l'organisme dispose un complexe de défenses antioxydants (Figure 13) (Pincemail et *al.*, 2002). On peut classés les antioxydants selon leur mode de fonctionnement en deux catégories (Chapple et Matthews, 2007). Les antioxydants préventifs enzymatiques impliquant directement dans la neutralisation des ERO et ERN, tels que le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx), la glutathion réductase (GRx). Les antioxydants piègeurs qui sont des antioxydants de rupture de chaine comme : coenzyme Q10, acide urique, glutathion réduit, polyphénols, vitamine E, vitamine C (Pham-Huy, et *al.*, 2008 ; Wang, et *al.*, 2017), de plus d'autre micronutriment tel que  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Na^{+}$ ,  $Fe^{++}$ ... (Goff, 2018).



**Figure 13:** Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants (Pincemail et *al.*, 2002).

## **2.2 Différents méthodes de mesure de l'activité antioxydante**

En raison de la complexité des processus d'oxydo-réduction impliqués et la nature diversifiée à la fois des radicaux libres et des antioxydants, il n'existe aucune méthode universelle par laquelle la capacité antioxydante (CA) peut être exprimée d'une façon précise. Diverses méthodes ont été développées pour estimer cette capacité antioxydante, et les méthodes les plus utilisées sont divisées en deux groupes : des analyses basées sur le transfert de proton et des analyses basées sur le transfert d'électron (Huang et *al.*, 2005; Prior et *al.*, 2005). Parmi ces méthodes, nous citons :

### **2.2.1 Méthode de piégeage du radical DPPH**

Le test avec le radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est très simple à mettre en œuvre et peut être coûteux, basé majoritairement sur les réactions de transfert d'électron, mais peut neutraliser les radicaux par transfert d'atome hydrogène, dépend de la structure et la composition d'antioxydant testé (Jiménez et *al.*, 2004 ; Prior et *al.*, 2005). Ce radical n'est pas stable à la lumière, c'est pourquoi le test doit se faire à l'obscurité (Ozcelik et *al.*, 2003). De plus, Le DPPH est soluble dans les solvants organiques et aqueux, est utilisé pour mesurer l'activité antioxydante des antioxydants hydrophiles et lipophiles (Prior et *al.*, 2005). Cependant, plusieurs molécules peuvent réagir de façon lente avec le DPPH, et certaines réactions avec ce radical ne peuvent pas mener à une vraie estimation du potentiel des molécules testées (Huang et *al.*, 2005).

### **2.2.2 Méthode de l'ABTS**

Cette méthode est caractérisée par sa simplicité à mettre en œuvre et sa rapidité. L'ABTS (l'acide 2,2'-azino-bis-3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique), soluble dans l'eau et dans les solvants organiques, peut mesurer la capacité antioxydante des composés lipophiles et hydrophiles (Awika et *al.*, 2003). Au cours de cette méthode les réactions d'oxydo-réduction sont basées sur le transfert de proton et d'électron (l'ABTS est oxydé par les antioxydants), et se déroulent rapidement (4-6 min). Mais, il existe des réactions d'oxydo-réduction plus lentes. Pour cette raison la méthode n'est pas adéquate pour toutes les réactions, ce qui peut donner des valeurs de la capacité antioxydante erronées lorsqu'on lit avant la fin de la réaction (Prior et *al.*, 2005).

### **2.2.3 Méthode de la réduction de Fer**

## *Recherche bibliographique*

Cette méthode est basée sur le transfert d'électron (en réduisant le fer ferrique  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  par des antioxydants). Elle est simple, rapide et peu coûteuse. De plus elle est adéquate pour mesurer le potentiel d'antioxydant du plasma sanguin, et ainsi le potentiel des composés purs (Prior et *al.*, 2005). La principale limite de cette méthode réside dans le temps de réaction. Plusieurs molécules ne peuvent être mesurées par cette méthode, comme certains phénols qui réagissent plus lentement, et qui nécessitent un temps de réaction plus long (Huang et *al.*, 2005).

### **2.2.4 Méthode de la capacité antioxydante totale (CAT)**

La méthode est basée sur la réduction de Mo (VI) en Mo (V) en présence d'un agent antioxydant qui favorise la formation de phosphomolybdène vert. Elle est spécifiquement efficace à une température comprise entre 25-37 °C, parce que quelques antioxydants à température plus faible ne sont pas détectés (Hang et Ou, 2002 ; Zheng et *al.*, 2003). Cette méthode est plus utilisée en raison de sa simplicité, pour mesurer la capacité antioxydante d'antioxydants hydrophiles et lipophiles également.

## **3 *Caralluma europaea* (Guss.)**

### **3.1 Description botanique**

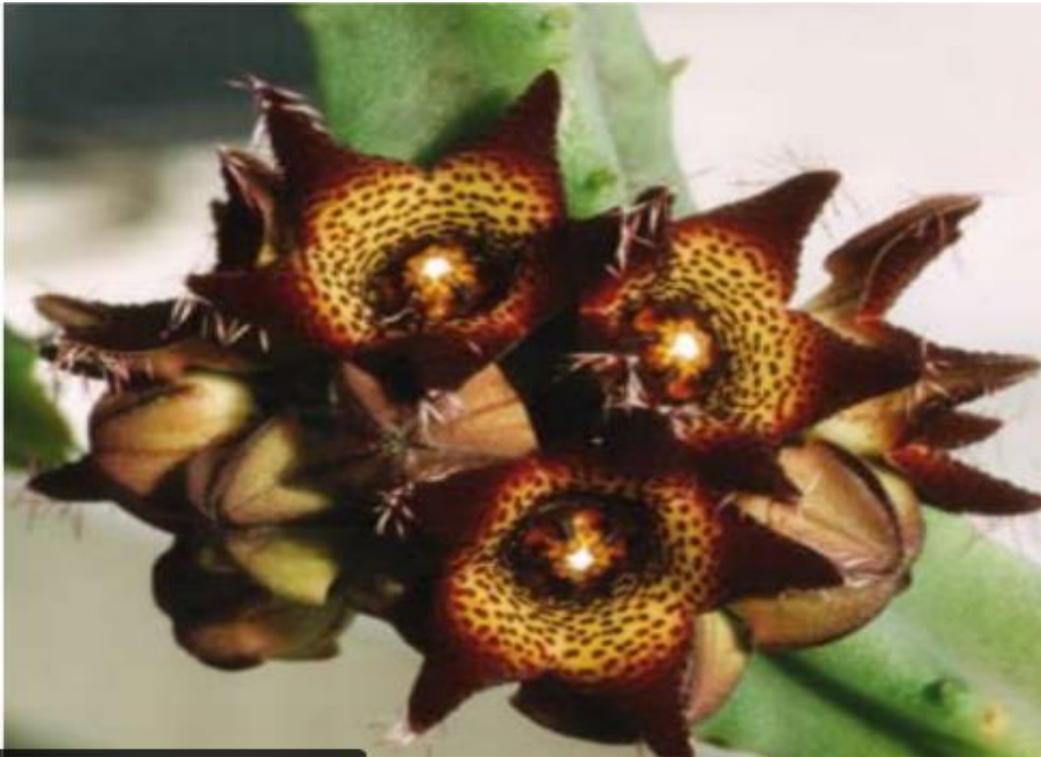
Le genre *Caralluma*, de la famille des Apocynacées, comprend plusieurs espèces, variables à l'état végétatif. Cependant, il existe des espèces qui ne représentent aucune variation végétative.

*Caralluma europaea* (Guss.), est une espèce sauvage découverte par Gussone en 1832 et décrite par lui-même en 1839 (Meve et Heneidak, 2005; Audissou, 2005).

C'est une plante grasse d'une forme cactus, avec des tiges plus ou moins succulentes et charnues, feuilles rudimentaires et des fleurs pentamères à corolle de 10-12 mm, rotatives, charnues, brunâtres, tachées de jaune et de pourpre, avec des lobes triangulaires très obtus plus ou moins ciliés sur les bords (Photo 1). Le fruit est formé de deux follicules déhiscents contenant de petites graines (Photo 2) (Qezel et Santa, 1963 ; Aafi et *al.*, 2002, Audissou, 2005).



**Photo 1** : *C.europaea* (Guss) (Audissou, 2005).



**Photo 2:** Fruits de *C.europaea* (Guss) (Audissou, 2005).

**3.1.1 Systématique (Boulos et *al.*, 2010).**

Subdivision : Angiosperme

Classe : Dicotylédone

Famille : Apocynacées

Sous famille : Asclépiadacées

Genre : *Caralluma*

Genre Espèce : *Caralluma europaea* (Guss.)

### **3.1.2 Synonymes**

*Apherants europaea* (Guss.) Murb. (Qezel et Santa, 1963), *Atherantus europaea* (Guss.), *Stapelia europaea* Guss., Suppl., *Apteranthes gussouneana* Mika, Nov., *Boucerosia gussouneana* (Mikan), *Caralluma europaea* (Guss.) N. E. Br., *Caralluma confusa*, *Caralluma europaea* subsp. *Gussouneana* (J. C. Mikan) (Boulos et al., 2010).

### **3.1.3 Noms vernaculaires**

Daghmous en arabe, doigts de dieu en français, Zakkum et Tikiwt (Benkhnigue, 2014 ; Dra et al., 2019).

### **3.2 Distribution**

*C. europaea* est largement distribuée le long de l'Afrique du nord et de la méditerranéenne (Algérie, Maroc, Italie ou il été découverte pour la première fois, sud de l'Espagne, Sinaï...) (Meve et Heneidak, 2005).

### **3.3 Usage traditionnelle**

La partie aérienne de *C. europaea* est utilisée sous forme de jus ou de poudre mélangé avec du miel contre certaines maladies telles que les kystes de l'appareil génital (poudre de feuilles mélangée avec du leben, par voie orale) (Bouyyadi et al., 2015 ; Sagou et al. 2016), le diabète, le goitre et les calculs rénaux (Lahsissane et al., 2009 ; Sagou et al., 2016). Les feuilles sont employées en décoction contre la toux et l'asthme (Lahsissane et al., 2009). Les thérapeutes traditionnels recommandent aux consommateurs utiliser des tiges de *Caralluma* fraîches ou séchées mélangées avec du lait ou mélangé avec du miel (Sagou et al. 2016).

### **3.4 Composition chimique**

Des études phytochimiques réalisées sur *C. europaea* montrent que cette espèce peut constituer une source de composés bioactifs efficaces contre le cancer ainsi que les maladies dues aux radicaux libres (activités anti oxydantes et antiprolifératives) (Amrati et al., 2020 ; Sagou et al., 2016). Sa partie aérienne contient quelques composés phénoliques (flavonoïdes, tanins) (Sagou et al., 2016 ; Dra et al., 2018 ; Amrati et al., 2020), des terpènes et stéroïdes (Sagou et al., 2016; Dra et al.,2018), des saponines, des coumarines (Amrati et al., 2020) et des alcaloïdes (Sagou et al., 2016). Cependant, d'autres études montrent la plante est dépourvue de quinones, d'alcaloïdes (Dra et al., 2018 ; Amrati et al.,2020) et de saponines (Dra et al., 2018). Il est à signaler que le mode d'extraction et les solvants sont différents d'une étude à une autre.

L'analyse par HPLC de la fraction riche en polyphénols d'*Apteranthes europaea* a confirmé la présence de composés potentiellement actifs, notamment l'acide gallique, le galatte de méthyl, la rutine, l'acide férulique et le résorcinol (Amrati et al., 2021).

### **3.5 Etudes antérieures sur *Caralluma europaea***

Des études antérieures ont montré que *C. europaea* présente des activités antioxydantes et hyperglycémique (Dra et al., 2018) par inhibition des enzymes tels que l'alpha-amylase et alpha-glucosidase qui sont liées au diabète de type 2 (Dra et al., 2019).

L'étude réalisée par Amrati et al., (2020) sur la partie aérienne et les classes bioactives naturelles de *C. europaea*, montrent qu'elles présentent des activités antioxydantes et antiprolifératives et que cette plante peut constituer une source importante de composés bioactifs pouvant conduire à la conceptualisation de nouveaux médicaments efficaces contre le cancer ainsi que maladies dues aux radicaux libres. Un autre travail révèle l'activité hépatoprotecteur des polyphénols de cette plante (Amrati et al., 2021).

### **3.6 Toxicité**

Aucune mortalité, aucun signe de toxicité ou changement de poids corporel n'ont été remarqué chez les souris des deux sexes, par administration orale et par une dose unique pouvant aller jusqu'à 2000 mg/kg de poids corporel pendant sept jours d'étude. La dose létale orale est supérieure à cette concentration (Dra et al., 2018).

# **Matériel et méthodes**

## Matériel et méthodes

Le présent travail a été réalisé dans le laboratoire des Produits naturels « LAPRONA », département de Biologie, Faculté des SNV-STU, Université de Tlemcen.

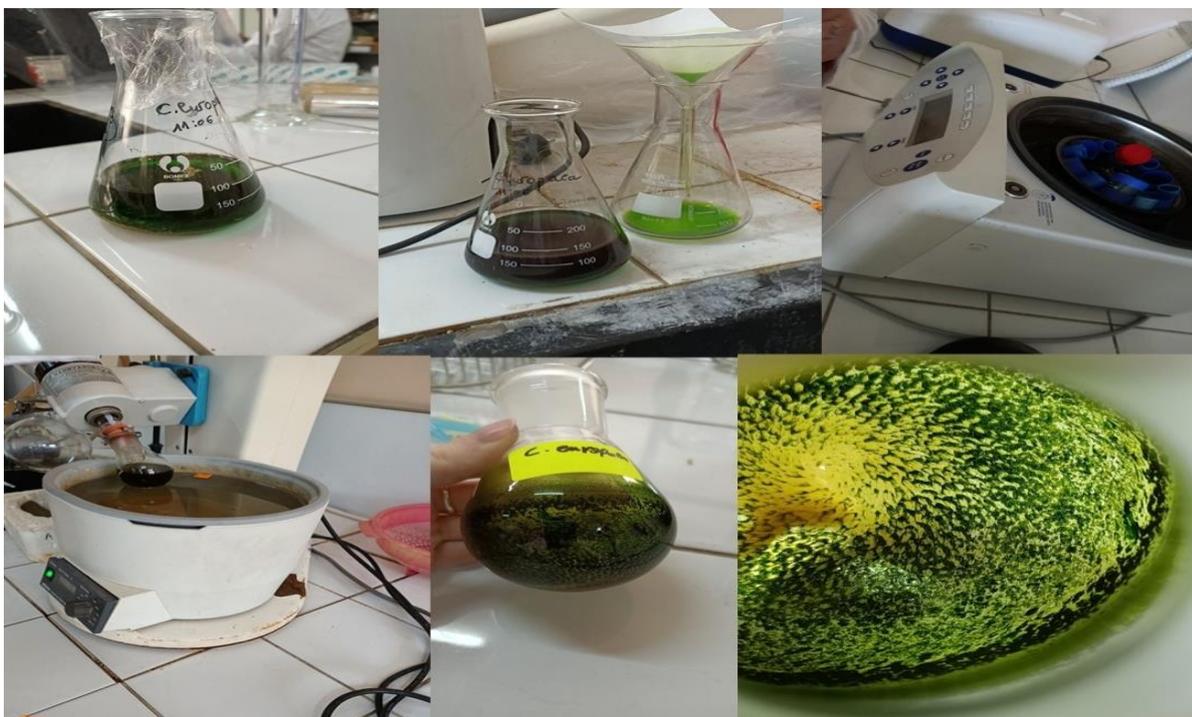
### 1 Provenance des plantes étudiées

La partie aérienne de *Caralluma europaea* a été achetée chez l'herboriste, découpée en petits morceaux et séchée à l'air libre et à l'abri de la lumière pendant 10 jours.

### 2 Méthode d'extraction

Pour la préparation de l'extrait, la plante sèche a été broyée à l'aide d'un moulin afin d'obtenir une poudre.

L'extrait a été obtenu par une macération pendant 24 h de 9 g de la poudre de plante avec 140 ml du mélange méthanol- acétone (50/50 : v/v). L'extrait a été filtré par papier filtre, centrifugé à 3500/min et évaporé à l'évaporateur rotatif, à 45°C sous pression réduite (Photos 1).



**Photo 3:** Préparation de l'extrait (Photos prise au laboratoire).

L'extrait sec est pesé et nous avons calculé le rendement en extrait sec en calculant le rapport suivant :

$$\text{Rdt \%} = [\text{P1} - \text{P2} / \text{P3}] \times 100$$

**P1** : Poids du ballon après évaporation.

**P2** : Poids du ballon avant évaporation (ballon vide).

**P3** : Poids de la matière végétale sèche de départ.

L'extrait sec est conservé à 4°C. Pour les dosages et les évaluations de l'activité antioxydante l'extrait est repris, dans quelques millilitres de méthanol selon la concentration souhaitée.

### **3 Quantification de quelques classes phénoliques dans les extraits**

**3.1 Polyphénols totaux** : Le dosage des polyphénols est réalisé selon la méthode décrite par **Vermerris et al., 2006** :

#### **3.1.1 Principe**

Le réactif utilisé, le «Folin-Ciocalteu», est un mélange de complexes d'acide phosphotungstique ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ) de couleur jaune. Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif. Cette oxydation entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleu qui absorbe à 750 nm.

#### **3.1.2 Mode opératoire**

Une prise de 100  $\mu\text{L}$  de l'extrait est mélangée avec 2 mL d'une solution de carbonate de sodium à 2% fraîchement préparée, le tout est agité par un vortex. Après 5 min, 100  $\mu\text{L}$  du réactif de Folin-Ciocalteu (1N) sont ajoutés au mélange, le tout est laissé pendant 30 min à la température ambiante et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 750 nm. Ce dosage est effectué par la comparaison de la D.O observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue. Pour cela, une gamme étalon à base de l'acide gallique est également préparée à des concentrations allant de 0 à 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Tableau 2). Les teneurs en Polyphénols totaux des extraits sont alors exprimées en milligramme équivalent acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg EAG/g MS)

**Tableau 2:** Méthode de dosage des polyphénols.

	Gamme d'étalonnage ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )					Extraits de <i>C. europaea</i> (mg / mL)
Concentrations	0	62,5	125	250	500	2
Acide gallique ( $\mu\text{L}$ )	-	100	100	100	100	-
Solvant ( $\mu\text{L}$ ) (Eau distillée ou Méthanol)	100	-	-	-	-	-
Extrait ( $\mu\text{L}$ )	-	-	-	-	-	100
Carbonate de sodium à 2% ( $\mu\text{L}$ )	2000	2000	2000	2000	2000	2000
Repos pendant 10 min.						
Folin-Ciocalteu 1N ( $\mu\text{L}$ )	100	100	100	100	100	100
Incubation pendant 30 min.						
Lecture de l'absorbance à 750 nm.						

**3.2 Flavonoïdes totaux :** La quantification des flavonoïdes est faite selon une méthode colorimétrique décrite par **Dewanto et al.2002** :

### 3.2.1 Principe

Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par deux réactifs incolores, le nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) et le chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ). Elle entraîne la formation d'un complexe brunâtre qui absorbe à 510 nm.

### 3.2.2 Mode opératoire

Une prise de 250  $\mu\text{L}$  d'extrait diluée est additionnée de 75  $\mu\text{L}$  d'une solution de  $\text{NaNO}_2$  à 5%. Après 6 mn d'incubation à température ambiante, 150  $\mu\text{L}$  d'une solution fraîchement préparée de chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ , 10%) sont ajoutés au mélange. Après 5 mn de repos à température ambiante, 500  $\mu\text{L}$  de soude ( $\text{NaOH}$ , 1M) sont apportés au mélange, et le volume final est porté à 2.5 mL avec de l'eau distillée. L'absorbance de cette préparation est mesurée contre un blanc à 510 nm. La comparaison de la D.O observée à celle obtenue par un étalon de catéchine de concentration connue permet d'évaluer la teneur totale en flavonoïdes.

Pour cela, une gamme étalon à base de catéchine est également préparée à des concentrations allant de 0 à 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Tableau 3). Les teneurs en flavonoïdes des extraits sont alors

## *Matériel et méthodes*

exprimées en milligramme équivalent catéchine par gramme de la matière sèche (mg EC/g MS).

**Tableau 3:** Méthode de dosage des flavonoïdes.

	Gamme d'étalonnage ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )					Extraits de <i>C. europaea</i> ( $\text{mg} / \text{mL}$ )
Concentrations	0	62,5	125	250	500	2
Catéchine ( $\mu\text{L}$ )	-	250	250	250	250	-
Solvant ( $\mu\text{L}$ ) (Eau distillée ou Méthanol)	250	-	-	-	-	-
Extrait ( $\mu\text{L}$ )	-	-	-	-	-	250
$\text{NaNO}_2$ à 5% ( $\mu\text{L}$ )	75	75	75	75	75	75
Repos pendant 6 min à température ambiante.						
$\text{AlCl}_3$ à 10% ( $\mu\text{L}$ )	150	150	150	150	150	150
Repos pendant 5 min à température ambiante.						
$\text{NaOH}$ à 1M ( $\mu\text{L}$ )	500	500	500	500	500	500
Eau distillée ( $\mu\text{L}$ )	1525	1525	1525	1525	1525	1525
Lecture de l'absorbance à 510 nm.						

**3.3 Tanins condensés :** Le dosage des tanins condensés est réalisé selon la méthode décrite par **Sun et al., 1998** :

### 3.3.1 Principe

En présence d'acide sulfurique, les tanins condensés se dépolymérisent et, par réaction avec la vanilline, se transforment en anthocyanidols de couleur rouge, mesurables par spectrophotométrie à 500 nm.

### 3.3.2 Mode opératoire

Une prise de 50  $\mu\text{L}$  d'extrait est ajoutée à 3 ml de vanilline à 4% et 1.5 mL d'acide chlorhydrique concentré. Après homogénéisation, le mélange est mis en incubation à température ambiante pendant 15 min. L'absorbance est mesurée contre un blanc à 500 nm. Les teneurs en tanins condensés, déterminées en se référant à une gamme étalon de catéchine (0 à 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Tableau 4), sont exprimées en milligramme équivalent catéchine par gramme de la matière sèche (mg EC/ g MS).

**Tableau 4:** Méthode de dosage des tanins.

	Gamme d'étalonnage (µg / mL)					Extraits de <i>C. europaea</i> (mg / mL)
Concentrations	0	62,5	125	250	500	2
Catéchine (µL)	-	50	250	50	50	-
Solvant (µL) (Eau distillée ou Méthanol)	50	-	-	-	-	-
Extrait (µL)	-	-	-	-	-	50
Vanilline à 4% (µL)	3000	3000	3000	3000	3000	3000
HCL (µL)	1500	1500	1500	1500	1500	1500
incubation pendant 15 min à température ambiante.						
Lecture de l'absorbance à 500 nm.						

#### **4 Estimation des activités biologiques, *in vitro***

##### **4.1 Détermination de l'activité antioxydante**

**4.1.1 Capacité antioxydante totale (CAT) :** Elle est réalisée selon la méthode décrite par **Prieto et al., 1999 :**

###### **4.1.1.1 Principe**

Ce test est basé sur la réduction du molybdène (VI) en molybdène (V) par l'extrait de plante. Cette réduction induit, à pH acide, la formation du complexe phosphate/Mo (V) de couleur verte.

###### **4.1.1.2 Mode opératoire**

Une prise de 100 µL d'extrait est combinée dans un tube avec 1mL de solution composée d'acide sulfurique (0.6 M), de phosphate de sodium (28 mM) et de molybdate d'ammonium (4 mM). Les tubes sont incubés à 95°C pendant 90 mn. Après un repos de 6 mn à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 695 nm contre un blanc contenant du méthanol à la place de l'extrait (Tableau 5). Comme pour les polyphénols totaux, l'activité

antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalent acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg EAA/ g MS).

**Tableau 5:** Méthode de mesure de la capacité antioxydante totale.

Concentrations	Gamme d'étalonnage ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )							Extraits de <i>C. europaea</i> ( $\text{mg} / \text{mL}$ )
	0	15,6 2	30,15	62,5	125	250	500	2
Acide ascorbique ( $\mu\text{L}$ )	-	100	100	100	100	100	100	-
Solvant ( $\mu\text{L}$ ) (Eau distillée ou Méthanol)	100	-	-	-	-	-	-	-
Extrait ( $\mu\text{L}$ )	-	-	-	-	-	-	-	100
Réactif ( $\mu\text{L}$ )	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Incubation à 95 C° pendant 90 min.								
Après 6 min de repos à température ambiante.								
Lecture de l'absorbance à 695 nm.								

**4.1.2 Pouvoir réducteur du fer :** Le pouvoir réducteur est déterminé selon la méthode décrite par **Oyaizu., 1986 :**

**4.1.2.1 Principe**

L'activité réductrice d'un extrait est évaluée par la réaction d'oxydoréduction entre l'extrait et les ions métalliques de transition, notamment le fer. Le ferricyanure de potassium  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  fournit des ions  $\text{Fe}^{3+}$  qui seront réduits en  $\text{Fe}^{2+}$  par les antioxydants présents dans l'extrait végétal.

**4.1.2.2 Mode opératoire**

Cette méthode consiste à mélanger 1 mL de l'extrait à différentes concentrations avec 2.5 mL de tampon phosphate 0.2 M à pH 6.6 et 2.5 ml d'une solution de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  à 1% (m/v). Le mélange obtenu est incubé pendant 20 mn à 50°C, puis 2.5 mL d'acide trichloracétique à 10% (m/v) sont ajoutés pour arrêter la réaction. Le mélange est centrifugé à 650 g pendant 10 mn à température ambiante et 2.5 mL du surnageant sont additionnés de 2.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml de  $\text{FeCl}_3$  à 0.1% (m/v). La lecture de l'absorbance se fait à 700 nm contre un blanc (Tableau 6). Les résultats permettent de calculer la concentration efficace ( $\text{CE}_{50}$ ), concentration

## *Matériel et méthodes*

de l'extrait correspondante à une absorbance égale à 0.5, obtenue par l'interprétation de la courbe de régression linéaire ( $D.O = f([ ])$ ). L'activité de l'extrait est enfin comparée à celle de témoin positif, le butylhydroxyanisole (BHA).

**Tableau 6:** Méthode de mesure du pouvoir réducteur de fer.

Concentrations	BHA ( $\mu\text{g/mL}$ )						Extrait de <i>C. europaea</i> ( $\text{mg/mL}$ )					
	0	50	100	150	200	250	2	3	4	5	6	7
BHA ( $\mu\text{L}$ )	-	1000	1000	1000	1000	1000	-	-	-	-	-	-
Solvant ( $\mu\text{L}$ ) (Eau distillée ou Méthanol)	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrait ( $\mu\text{L}$ )	-	-	-	-	-	-	1000	1000	1000	1000	1000	1000
S.T à 0.2 M à pH 6.6 ( $\mu\text{L}$ )	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1% ( $\mu\text{L}$ )	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500
Incubation pendant 20 min à 50 C°.												
d'acide trichloracétique à 10% ( $\mu\text{L}$ )	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500
Eau distillée ( $\mu\text{L}$ )	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500
$\text{FeCl}_3$ à 0.1% ( $\mu\text{L}$ )	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
Lecture de l'absorbance à 700 nm.												

### 5 Analyses statistiques

Les valeurs indiquées dans les tableaux sont des moyennes  $\pm$  écarts-types des trois mesures parallèles en utilisant EXCEL (2007). Les valeurs des concentrations (Dosage et CAT) et de  $\text{CE}_{50}$  (pouvoir réducteur de fer) ont été calculées à partir des équations linéaires des courbes tracées sur EXCEL.

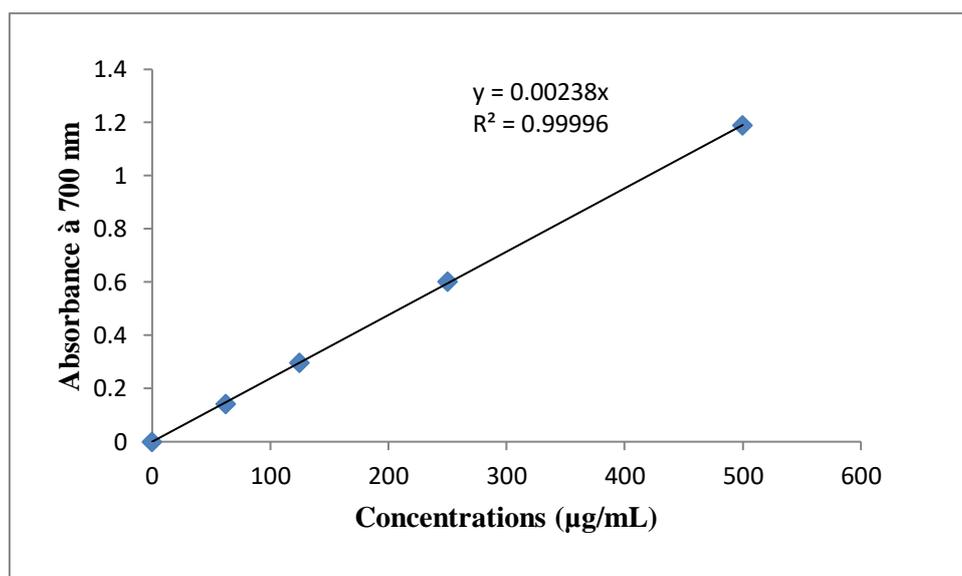
# **Résultats et discussion**

### 1 Le rendement de l'extrait de *C. europaea* (Guss.)

Le rendement en extrait de *C. europaea* (Guss.), préparé par macération en utilisant le mélange méthanol- acétone (50/50 : v/v) est de 10,88% (tableau 7).

### 2 Dosages des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins

Les teneurs en polyphénols totaux (PPT), en flavonoïdes (Fv) et en tanins (Tn) dans l'extrait de *C. europaea* ont été déterminées. Elles sont estimées en référence aux courbes d'étalonnage d'acide gallique pour les PPT (Figures 14), et de la catéchine pour les Fv (Figures 15), et les Tn (Figures 16) Les résultats obtenus, exprimées en milligramme équivalent acide gallique par gramme d'extrait (mg EAA/ g extrait) ou par g de la matière sèche (mg EAA/ g MS) dans le (tableau 7).



**Figure 14:** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

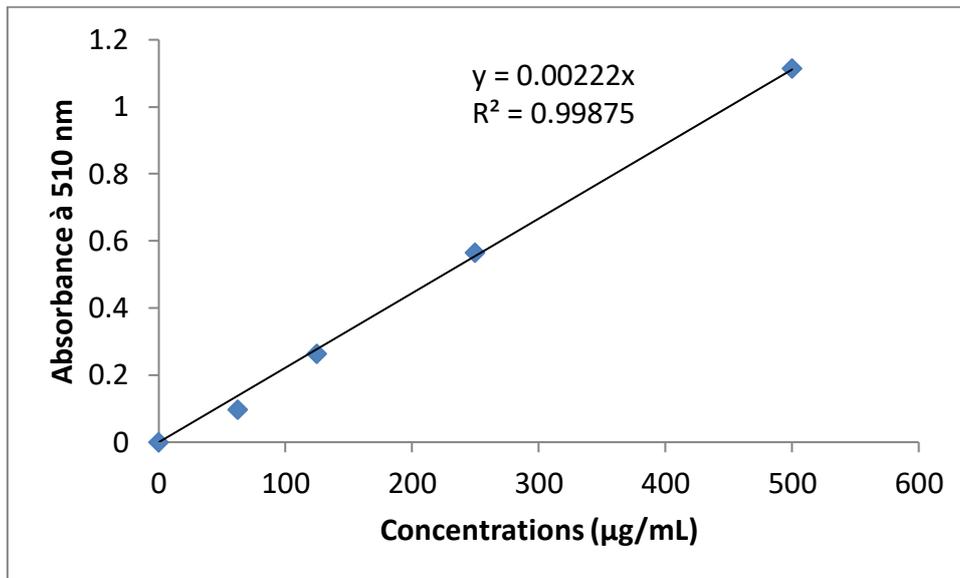


Figure 15: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

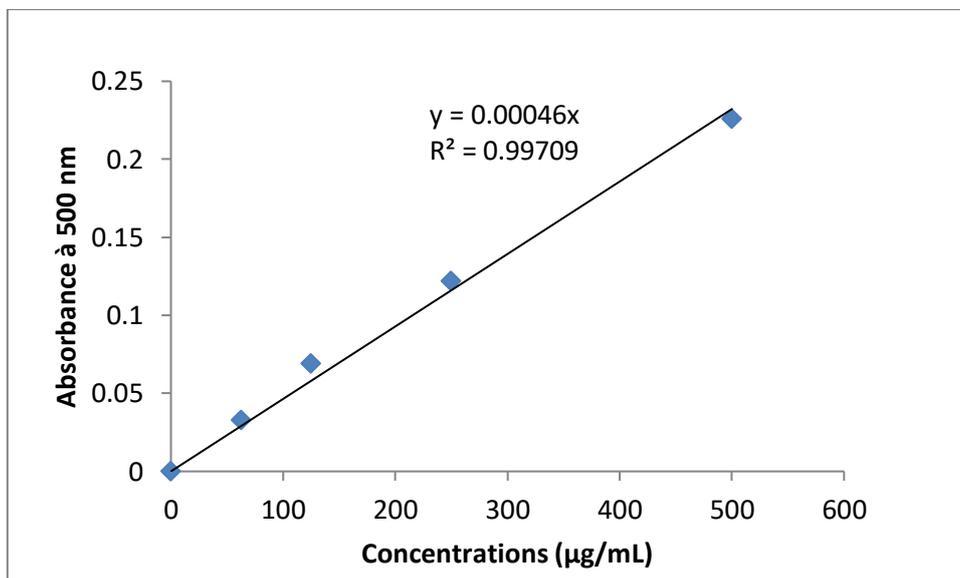


Figure 16: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés.

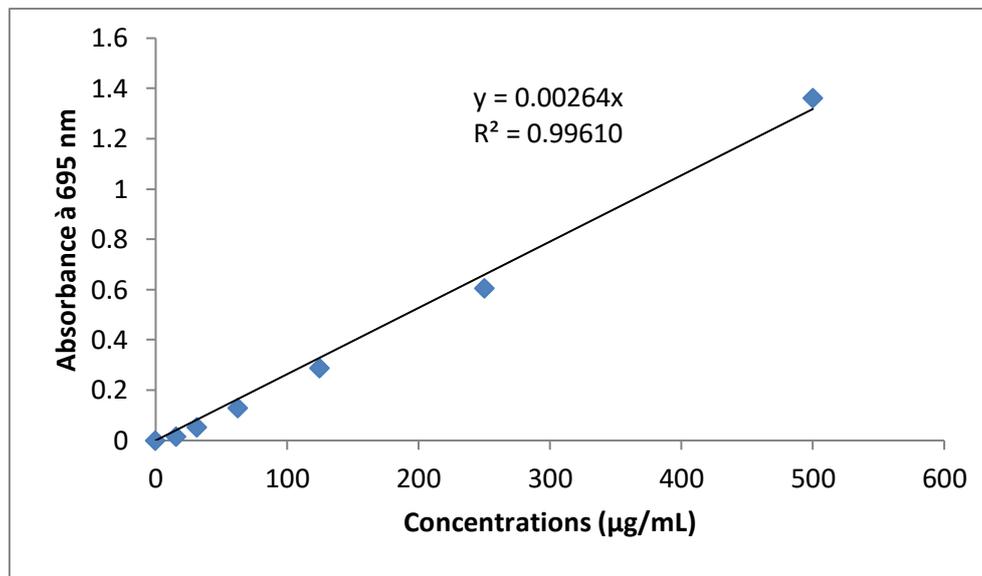
**Tableau 7:** Les rendements et les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés (moyenne ± écart type) dans l'extrait de *C.europaea* (Guss.).

Rendements (%)	Teneur en Polyphénols totaux		Teneur en Flavonoïdes		Teneur en Tanins condensés	
	mg EAG /g extrait	mg EAG /g MS	mg EC/g extrait	mg EC/g MS	mg EC/g extrait	mg EC/g MS
10,88	23,80± 1,59	2,59 ± 0,17	12,08±1,49	1,32 ± 0,16	12,31±2,51	1,34 ± 0,27

### 3 Evaluation de l'activité antioxydante par deux méthodes

#### 3.1 Capacité antioxydante totale (CAT)

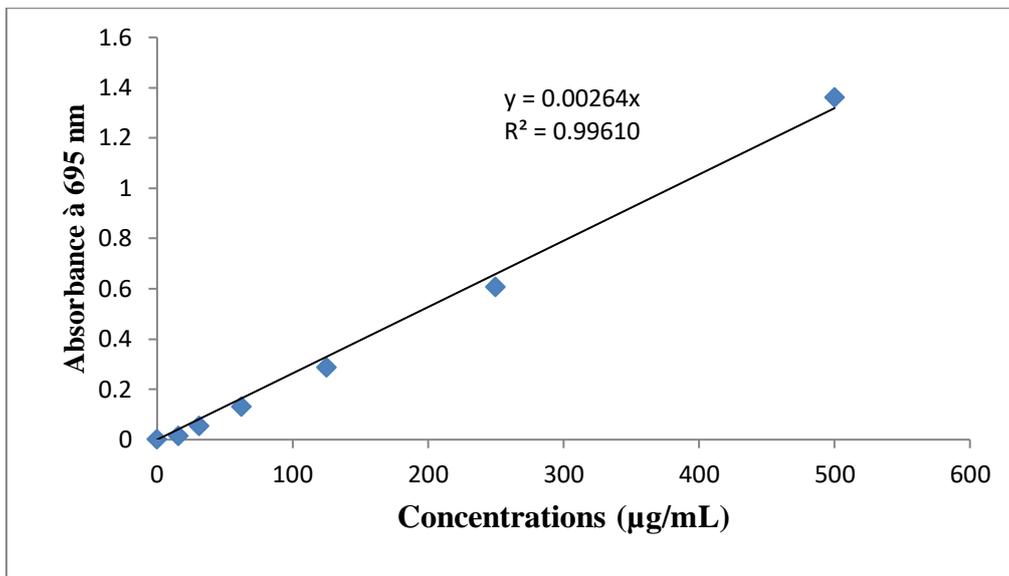
Le résultat est calculé à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (Figure 17). L'activité antioxydante totale est exprimée ensuite en milligramme équivalent acide ascorbique par gramme d'extrait (mg EAA/ g extrait) ou par gramme de la matière sèche (mg EAA/ g MS) (Tableau 8).



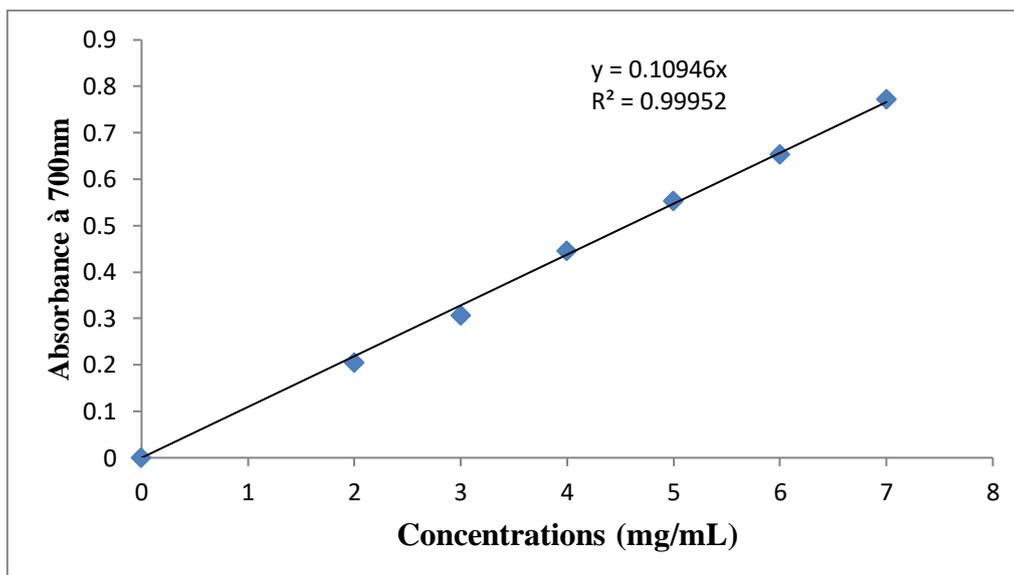
**Figure 17:** Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de la capacité antioxydante totale (CAT).

### 3.2 Pouvoir réducteur du fer

Les valeurs de  $CE_{50}$  (tableau 8) ont été calculées à partir des équations linéaires des courbes D.O = f ([ ]) (Figures 18, 19) de l'extrait et du témoin positifs, le BHA. Elle correspond à une absorbance égale à 0,5.



**Figure 18:** Pouvoir réducteur du fer du standard BHA.



**Figure 19:** Pouvoir réducteur du fer de l'extrait de *C. europaea* (Guss.).

**Tableau 8:** Les activités antioxydantes (moyenne  $\pm$  écart type) de l'extrait de *C. europaea* (Guss.) et de standard par deux méthodes, la CAT et le pouvoir réducteur.

Extrait	Capacité antioxydante totale		Réduction du Fer (CE <sub>50</sub> en mg/mL)
	(mg EAA/ g extrait)	(mg EAA/g MS)	
<i>C. europaea</i> (Guss.)	114,26 $\pm$ 18,20	12,43 $\pm$ 1,98	4,46 $\pm$ 0,086
BHA	/		0,0992 $\pm$ 0,0017

#### 4 Discussion

Dans la présente étude nous avons choisi la partie aérienne de *caralluma europaea* (Guss.) pour une étude phytochimique (dosages de polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins) et une évaluation de l'activité antioxydante en utilisant le test de la capacité antioxydante totale et la méthode de réduction du fer. Rares sont les études réalisées sur cette espèce. Il s'agit de la plante originaire du Maroc (Sagou et *al.*; 2016 ; Dra et *al.*, 2018 et 2019 ; Amrati et *al.*, 2020). D'autres travaux sont réalisées mais sur d'autres espèces du même genre. Il s'agit de *C. quadrangula* et *C. flava* d'Oman (Marwah et *al.*, 2007), de *C. adscendens var. fimbriata* (Maheshu et *al.*, 2014) et *C. diffusa* (Chandran et *al.*, 2014) de l'Inde.

L'extrait obtenu par macération à froid par un mélange méthanol-acétone (50/50 : v/v), de la partie aérienne de *caralluma europaea* (Guss.), a montré un rendement de 10,88%. Ce résultat rentre dans l'intervalle (9,12% à 30,34%) obtenu par Sagou et *al.* (2016), en utilisant des solvants de polarités croissantes par macération de 72h et est plus important que celui d'un extrait méthanolique (4,2%) de cette espèce. Cependant, cette préparation a été précédée par une extraction par dichlorométhane (Dra et *al.*, 2019). Les travaux antérieurs montrent que les solvants polaires et modérément polaires par macération à long durée donnent des meilleurs rendements. Cette polarité a un pouvoir d'extraction qui favorise la pénétration du solvant dans la plante et facilite la libération des composés bioactifs (Sagou et *al.*, 2016 ; Marwah et *al.*, 2007).

Les résultats des dosages des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés montrent que l'extrait de *Caralluma europaea* (Guss.) contient les teneurs respectives suivantes : 23,80  $\pm$  1,59 mg EAG /g d'extrait sec (2,59  $\pm$  0,17 mg EAG /g MS), 12,08 $\pm$ 1,49 mg EC/g d'extrait sec (1,32

## Résultats et discussion

$\pm 0,16$  mg EC/g MS) et  $12,31 \pm 2,51$  mg EC/g d'extrait sec ( $1,34 \pm 0,27$  mg EC/g MS). Ces composés ont été révélés, dans la même espèce, par Sagou et *al.* (2016) par une abondance maximale en polyphénols totaux et un test modérément positif pour les flavonoïdes et les tanins dans les extraits préparés par des solvants polaires, en particulier celui méthanolique. Les résultats, obtenus par Amrati et *al.* (2020), montrent que l'extrait hydro-éthanolique de *C. europaea* (Guss.) a une teneur en polyphénols ( $51,42 \pm 0,003$  EAG /g d'extrait) plus importante par rapport à la nôtre et une teneur en flavonoïdes de  $20,06 \pm 0,007$  quercétine équivalent/g d'extrait.

D'autres études antérieures sur d'autres espèces du même genre révèlent des teneurs en polyphénols totaux proches par rapport à la nôtre :  $27,1 \pm 1,6$  mg EAG/g d'extrait éthanolique de *C. quadrangula* et  $18,7 \pm 0,4$  mg EAG/g d'extrait éthanolique de *C. flava* (Marwah et *al.*, 2007). En revanche, les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés dans l'extrait méthanolique de *C. diffusa* sont nettement plus importantes ( $62,6 \pm 0,6$  mg EAG /g d'extrait pour les PPT,  $87 \pm 3,06$  mg équivalent Rutine /g d'extrait pour les Fv et  $32,5 \pm 6,7$  mg EAG/g d'extrait pour les Tn) (Chandran et *al.*, 2014).

Des extractions successives par des solvants de polarité croissante (chloroforme suivi d'acétate d'éthyle, méthanol et eau) révèlent des teneurs plus importantes et proches en polyphénols totaux (méthanol :  $21,0 \pm 0,59$  mg GAE/g MS et eau :  $18,8 \pm 0,98$  mg EAG/g MS) et en flavonoïdes (méthanol :  $3,7 \pm 1,16$  mg Quercétine équivalent QE/g MS et eau :  $3,1 \pm 0,54$  mg QE/g MS) dans les extraits polaires comparées aux deux autres extraits (Maheshu et *al.*, 2014). Les teneurs en PPT sont nettement plus importantes par rapport à la nôtre.

Le résultat de la capacité antioxydante totale (CAT) de notre extrait est de  $114,26 \pm 18,20$  mg EAA/g d'extrait sec ( $12,43 \pm 1,98$  mg EAA/g MS). Une activité faible comparée à celle des extraits éthanoliques de *C. quadrangula* ( $899 \pm 29,2$  mg EAG /g d'extrait), de *C. flava* ( $335 \pm 0,5$  mg EAG /g d'extrait) (Marwah et *al.*, 2007) et de l'extrait méthanolique de *C. diffusa* ( $888,8 \pm 6,9$  mg EAA/g d'extrait) (Chandran et *al.*, 2014).

Concernant le pouvoir réducteur du fer, notre extrait a une valeur de  $EC_{50}$  de  $4,46 \pm 0,086$  mg/mL, ce qui reflète une faible activité comparée à celle du standard, le BHA ( $EC_{50} = 0,0992 \pm 0,0013$  mg/mL) et même à celle de l'extrait de la même espèce ( $EC_{50} = 376 \pm 0,003$   $\mu$ g/mL), étudiée par Dra et *al.* (2018).

## ***Résultats et discussion***

Ces différences peuvent être expliquées par différents facteurs tels que la région géographique, la période de récolte, le séchage et le stockage de la plante, la méthode d'extraction et la polarité des solvants utilisés et même les méthodes de dosages et d'évaluation des activités.

# **Conclusion générale**

Ces dernières années, les substances naturelles connaissent un intérêt croissant dans le domaine médical et dans l'industrie pharmaceutique. Dans ce cadre nous nous sommes intéressés à la quantification des polyphénols totaux et au pouvoir antioxydant de l'extrait d'acétone-méthanol (50/50 : v/v) de la partie aérienne de *Caralluma europaea* (Guss.) vendu fraîche chez l'herboriste à Tlemcen (Algérie) comme traitement traditionnel contre les kystes génitales.

Les résultats de dosage dans l'extrait de cette plante et de son activité antioxydante par les méthodes de la capacité antioxydante totale et celle de la réduction de fer, montrent que l'extrait a des taux en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins faibles comparés aux extraits de la même espèce originaire du Maroc et même à d'autres espèces à l'exception de *C. quadrangula* et *C. flava*. Il a une capacité antioxydante faible par rapport aux autres extraits d'autres espèces du genre *Caralluma* et un faible pouvoir réducteur en comparant la valeur de CE<sub>50</sub> de l'extrait à celle de contrôle positif le BHA.

L'ensemble de ces résultats obtenus, *in vitro*, ne constitue qu'une première étape dans la recherche des substances naturelles qui ont une activité antioxydante. Il serait intéressant de réaliser d'autres techniques et méthodes comme :

- Tester l'effet antioxydant par d'autres méthodes, *in vitro*
- Evaluer le potentiel antioxydant de ces extraits, *in vivo*
- Déterminer d'autres activités comme : l'activité antibactérienne, antidiabétique, anticancéreuse etc....
- Evaluer l'effet hémolytique de la plante.

# **Références bibliographiques**

Aafi, A., Taleb, M. S., & Fechtal, M. (2002). Espèces remarquables de la flore du Maroc. *Rabat: Édition MCEF*.

Abbas, M., Farhan, S., Faqir, M. A., Afzaal, M., Tabussam, T., Shakeel, M., B., Ishtiaq, A., Hussain, S., & Hafiz Ansar Rasul Suleria (2017). Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties*, 20(8), 1689-1699.

Amrati, F. E. Z., Bourhia, M., Slighoua, M., Boukhira, S., Ullah, R., Ezzeldin, E., Ae Mostafa, G., Grafov, A., & Bousta, D. (2021). Protective Effect of Chemically Characterized Polyphenol-Rich Fraction from *Apteranthes europaea* (Guss.) Murb. subsp. maroccana (Hook. f.) Plowes on Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury in Mice. *Applied Sciences*, 11(2), 554.

Amrati, F. E. Z., Bourhia, M., Slighoua, M., Ibnemoussa, S., Bari, A., Ullah, R., Amagnouje, A., Cristo, F. D., El Mzibri, M., Calarco, A., Benbacer, D., & Bousta, D. (2020). Phytochemical study on antioxidant and antiproliferative activities of Moroccan *Caralluma europaea* extract and its bioactive compound classes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020.

Asenso, J., Yang, X. D., Yu, J., Zhou, P., Wang, C., & Wei, W. (2015). Plant-based anti-inflammatory agents: Progress from Africa and China. *Clinical Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Drugs (Discontinued)*, 2(1), 52-66.

Audissou, J. A. (2005). Moroccan Stapeliads. *Asklepios*, 94, 18-27.

Awika, J. M., Rooney, L. W., Wu, X., Prior, R. L., & Cisneros-Zevallos, L. (2003). Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(23), 6657-6662.

Belikov, A. V., Schraven, B., & Simeoni, L. (2015). T cells and reactive oxygen species. *Journal of biomedical science*, 22(1), 1-11.

Benkhighe, O., Ben Akka, F., Salhi, S., Fadli, M., Douira, A., & Zidane, L. (2014). Catalogue des plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète dans la région d'Al Haouz-Rhamna (Maroc). *J Anim Plant Sci*, 23(1), 3539-68.

Biswas, S. K. (2016). Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox?. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.

Biswas, S., Das, R., & Banerjee, E. R. (2017). Role of free radicals in human inflammatory diseases. *AIMS Biophysics*, 4(4), 596-614.

Bouayyadi, L., El Hafian, M., & Zidane, L. (2015). Étude floristique et ethnobotanique de la flore médicinale dans la région du Gharb, Maroc. *Journal of Applied Biosciences*, 93, 8770-8788.

Chandran, R., Sajeesh, T., & Parimelazhagan, T. (2014). Total Phenolic Content, Anti-Radical property and HPLC profiles of *Caralluma diffusa* (Wight) NE Br. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 4(3), 188-195.

Chandrasekara, A., & Shahidi, F. (2010). Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(11), 6706-6714.

Chapple, I. L., & Matthews, J. B. (2007). The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontology 2000*, 43(1), 160-232.

Collin, S., & Crouzet, J. (2011). *Polyphénols et procédés: transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire*. Lavoisier.

Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(10), 3010-3014.

Dra, L. A., Rodrigues, M. J., da Rosa Neng, N., Nogueira, J. M., Elamine, Y., Aghraz, A., ... & Custódio, L. (2019). Exploring *Caralluma europaea* (Guss.) NE Br. as a potential source of bioactive molecules: In vitro antioxidant and antidiabetic properties, and phenolic profile of crude extracts and fractions. *Industrial Crops and Products*, 139, 111527.

Dra, L. A., Sellami, S., Rais, H., Aziz, F., Aghraz, A., Bekkouche, K., ... & Larhsini, M. (2018). Antidiabetic potential of *Caralluma europaea* against alloxan-induced diabetes in mice. *Saudi journal of biological sciences*, 26(6), 1171-1178.

Evans, P., & Halliwell, B. (1999). Free radicals and hearing: cause, consequence, and criteria. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 884(1), 19-40.

Favier, A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108(10), 863-832.

Frydman, A., Liberman, R., Huhman, D. V., Carmeli-Weissberg, M., Sapir-Mir, M., Ophir, R., ... & Eyal, Y. (2013). The molecular and enzymatic basis of bitter/non-bitter flavor of citrus fruit: evolution of branch-forming rhamnosyltransferases under domestication. *The Plant Journal*, 73(1), 166-178.

Fu, P. P., Xia, Q., Hwang, H. M., Ray, P. C., & Yu, H. (2014). Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. *Journal of food and drug analysis*, 22(1), 64-75.

Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169.

Goff, J. P. (2018). Invited review: Mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid–base and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 2763-2813.

Guo, J. J., Hsieh, H. Y., & Hu, C. H. (2009). Chain-breaking activity of carotenes in lipid peroxidation: A theoretical study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(47), 15699-15708.

Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology*, 142(2), 231-255.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.

Jiménez, A., Selga, A., Torres, J. L., & Julià, L. (2004). Reducing activity of polyphenols with stable radicals of the TTM series. Electron transfer versus H-abstraction reactions in flavan-3-ols. *Organic letters*, 6(24), 4583-4586.

Kim, K. H., Tsao, R., Yang, R., & Cui, S. W. (2006). Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*, 95(3), 466-473.

Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology*, 30(6), 620-650.

- Lahsissene, H., Kahouadji, A., & Hseini, S. (2009). Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc occidental). *Lejeunia, revue de botanique*.
- Le, F. H. E., Boulos, L., & Vela, E. (2010). Catalogue synonymique commenté de la Flore de Tunisie.
- Lund, Minnesota (2021). Réactions des polyphénols végétaux dans les aliments : impact de la structure moléculaire. *Tendances en science et technologie alimentaires*.
- Macheix, J. J. (1996). Les composés phénoliques des végétaux: quelles perspectives à la fin du XXème siècle?. *Acta botanica gallica*, 143(6), 473-479.
- 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.
- Maheshu, V., Priyadarsini, D. T., & Sasikumar, J. M. (2014). Antioxidant capacity and amino acid analysis of *Caralluma adscendens* (Roxb.) Haw var. *fimbriata* (wall.) Grav. & Mayur. aerial parts. *Journal of food science and technology*, 51(10), 2415-2424
- Marwah, R. G., Fatope, M. O., Al Mahrooqi, R., Varma, G. B., Al Abadi, H., & Al-Burtamani, S. K. S. (2007). Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. *Food chemistry*, 101(2), 465-470.
- Meve, U., & Heneidak, S. (2005). A morphological, karyological and chemical study of the *Apteranthes* (*Caralluma*) *europaea* complex. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 149(4), 419-432.
- Mihanfar, A., Nouri, M., Roshangar, L. et Khadem-Ansari, MH (2021). Polyphénols : Composés naturels au potentiel prometteur dans le traitement du syndrome des ovaires polykystiques. *Biologie de la reproduction* , 21 (2), 100500.
- Nicholson, R., & Vermeris, W. (2006). Phenolic compound biochemistry.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, 44(6), 307-315.

Ozcelik, B., Lee, J. H., & Min, D. B. (2003). Effects of Light, Oxygen, and pH on the Absorbance of 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of Food Science*, 68(2), 487-490.

Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*, 4(2), 89.

Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry*, 30(1), 11-26

Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., & Defraigne, J. O. (2002). Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16(4), 233-239.

Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269(2), 337-341.

Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.

Quezel, P., & Santa, S. (1963). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales* (No. 581.965 Q8).

Ray, P. D., Huang, B. W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling*, 24(5), 981-990.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933-956.

Sagou N., Rhandour, Z., Eddebbagh, M., Hsaine, M., Berrada, M., Abourriche, A., & Bennamara, A. (2016). Ethnobotany study and phytochemical screening of *Caralluma europaea* (Guss.) N.E. Br. *International Journal of Biosciences* 6 (9), 460-467.

Scherrer, A. M., Motti, R., & Weckerle, C. S. (2005). Traditional plant use in the areas of monte vesole and ascea, cilento national park (Campania, Southern Italy). *Journal of ethnopharmacology*, 97(1), 129-143.

## ***Références bibliographiques***

Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. M., & Spranger, I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(10), 4267-4274.

Tabuti, J. R., Lye, K. A., & Dhillon, S. S. (2003). Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, use and administration. *Journal of ethnopharmacology*, 88(1), 19-44.

Teng, H., & Chen, L. (2019). Polyphenols and bioavailability: An update. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(13), 2040-2051.

Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.

Wang, H., Cao, G., & Prior, R. L. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 44(3), 701-705.

## ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للأكسدة لمستخلص *Caralluma europaea* (Guss.) المحضر في خليط من الميثانول-اسيتون (50/50:ح/ج) لمدة 24 ساعة. تم تقدير محتويات كمية البوليفينول الكلي (PPT)، الفلافونويد (Fv) و التانان (Tn) بواسطة القياس الطيفي Folin-Ciocalteu، ثلاثي الكلوريدو الفانيلين على التوالي.

النتائج التي تم الحصول عليها هي  $2,59 \pm 0,17$  ميلليغرام معادل لحمض الغاليك لكل غرام من المادة الجافة بالنسبة ل (PPT)،  $1,32 \pm 0,16$  ميلليغرام معادل للكاتيشين لكل غرام من المادة الجافة بالنسبة للفلافونويد (FV) و  $1,34 \pm 0,27$  ميلليغرام معادل للكاتيشين لكل غرام من المادة الجافة بالنسبة لتانان (Tn).

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة بطريقتين مختلفتين. السعة الكلية لمضادات الأكسدة (CAT) على أساس اختزال الموليبيدينوم (VI) إلى الموليبيدينوم (V) بواسطة المستخلص النباتي بسعة تقديرية، مقارنة بحمض الاسكوريك و المقدر بـ  $12,43 \pm 1,98$  ميلليغرام معادل لحمض الاسكوريك لكل غرام من المادة الجافة. كما تم تقدير القدرة المختزلة للحديد في مستخلصنا بتركيز فعال 50 (EC<sub>50</sub>) يساوي  $4,56 \pm 0,086$  ميلليغرام/ مل وهو نشاط أقل بكثير من المعيار BHA

( $0,00992 \pm 0,0017$  ميلليغرام/ مل)

الكلمات المفتاحية: *Caralluma europaea* (Guss.)، المركبات الفينولية، القدرة الكلية لمضادات الأكسدة، اختزال الحديد، التركيز الفعال 50.

## Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antioxydante de l'extrait de *Caralluma europaea* (Guss.) préparé par macération par un mélange méthanol- acétone (50 :50 v/v) pendant 24 h. L'estimation des teneurs en polyphénols totaux (PPT), en flavonoïdes (Fv) et en tanins condensés (Tn) à été réalisée par des méthodes spectrophotométriques (méthode de Folin-Ciocalteu, de trichlorure d'aluminium et de vanilline, respectivement). Les résultats obtenus sont :  $2,59 \pm 0,17$  mg EAG /g MS pour les PPT,  $1,32 \pm 0,16$  mg EC/g MS pour les Fv et  $1,34 \pm 0,27$  mg EC/g MS pour les Tn.

L'activité antioxydante a été évaluée par deux méthodes différentes. La capacité antioxydante totale (CAT) basée sur la réduction du molybdène (VI) en molybdène (V) par l'extrait de plante avec une capacité estimée, par rapport à l'acide ascorbique, à  $12,43 \pm 1,98$  mg EAA/g MS. Le pouvoir réducteur du fer de notre extrait est estimé par une concentration efficace 50 (EC<sub>50</sub>) égale à  $4,56 \pm 0,086$  mg/mL une activité largement inférieure à celle du standard, le BHA ( $0,0992 \pm 0,0017$  mg/mL).

**Mots clés :** *Caralluma europaea* (Guss.), composées phénoliques, capacité antioxydante totale, pouvoir réducteur, EC<sub>50</sub>.

## Summary

The objective of this study is to evaluate the antioxidant activity of the extract of *Caralluma europaea* (Guss.) Prepared by maceration in a mixture of methanol-acetone (50:50 v / v) for 24 hours. The estimation of the contents of total polyphenols (TPP), flavonoids (Fv) and condensed tannins (Tn) was carried out by spectrophotometric methods (Folin-Ciocalteu method, aluminum trichloride and vanillin, respectively). The results obtained are:  $2.59 \pm 0.17$  mg EAG / g MS for PPT,  $1.32 \pm 0.16$  mg EC / g MS for VF and  $1.34 \pm 0.27$  mg EC / g MS for the Tn.

Antioxidant activity was assessed by two different methods. The total antioxidant capacity (CAT) based on the reduction of molybdenum (VI) to molybdenum (V) by the plant extract with an estimated capacity, relative to ascorbic acid, at  $12.43 \pm 1.98$  mg EAA / g MS. The reducing power of the iron in our extract is estimated by an effective concentration 50 (EC<sub>50</sub>) equal to  $4.56 \pm 0.086$  mg / mL, an activity much lower than that of the standard, BHA ( $0.0992 \pm 0.0017$  mg / mL ).

Key words: *Caralluma europaea* (Guss.), Phenolics compounds, total antioxidant capacity, reducing power, EC<sub>50</sub>.









