

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

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID –TLEMCEM–

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



Département de Biologie

Laboratoire :

Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimie,
Synthèse et Activités biologiques



Mémoire

Présenté par **M^{elle} BELHADJ Imene**

En vue de l'obtention du diplôme de master en biologie

Option : Biochimie

Thème :

**Etude phytochimique des extraits enrichis en polyphénols
des feuilles de *Cydonia oblonga***

Soutenu le **21/06/2020**, devant le jury composé de :

Président	Mr LAHFA Farid Boucif	Pr.	Université de Tlemcen
Encadreur	Mr AZZI Rachid	MCA	Université de Tlemcen
Examinatrice	M ^{elle} MEZOUAR Dounia	MCB	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2019-2020

Remerciements

*Tout d'abord, je remercie **ALLAH**, le tout puissant de m'avoir accordé la force, le courage et la foi pour accomplir ce modeste travail.*

*J'exprime en premier lieu ma sincère gratitude à mon encadreur **Mr Azzi Rachid**, Maître de conférence classe « A » au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers, université de Tlemcen Abou Bekr Belkaid, d'avoir dirigé ce mémoire. Je le remercie pour ses discussions utiles et fructueuses, sa disponibilité, sa rigueur scientifique, sa gentillesse, ses encouragements et ses conseils avisés qui m'ont été très précieux pour mener à bien ce travail.*

*Je remercie vivement **Mr Lahfa Farid Boucif**, Professeur au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers, université de Tlemcen Abou Bekr Belkaid, d'avoir accepté de présider le jury.*

*Je remercie profondément **M^{elle} Mezouar Dounia**, Maître de conférences classe « B » au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers, université de Tlemcen Abou Bekr Belkaid, d'avoir accepté d'examiner et de juger ce mémoire.*

*Mes vifs remerciements vont également à **Mme Bouchrit Zahia**, Professeur au département de biologie, université Abou Bekr Belkaid –Tlemcen- responsable de la formation Master Biochimie.*

*Je remercie spécialement **M^{elle} Abbou Fayza**, doctorante en biologie, pour sa présence au quotidien, sa générosité, ses compétences, ses conseils et sa bonne humeur.*

Dédicaces

Grâce à Allah « el Kadir »

Je dédie ce travail :

A mon premier exemple ; mes chers parents pour leur soutien inconditionnel, leur amour, leurs sacrifices tout au long de mon cursus scolaire et universitaire et surtout la confiance qu'ils m'ont toujours témoignée. Qu'Allah les protège.

A mes chers grands parents.

*A mon cher frère **Sofiane** le plus doux.*

*A ma sœur jumelle **Ahlem** ma moitié.*

*A ma petite sœur **Khadidja** la plus gâtée.*

*A mes cousins et cousines, et à toute la famille **Belhadj** et **Senouci**.*

*Et enfin, je dédie spécialement ce travail à **M.A** pour sa présence, son aide et son soutien dans les moments les plus difficiles ainsi qu'à mes chères amies **Wafaa, Ahlem, Hafsa, Samira et Bouchra** pour leur amitié et les bons moments inoubliables partagés.*

Il n'y a point de bonheur sans courage, ni de vertu sans combat.

ملخص:

السفرجل (*Cydonia oblonga*)، نبتة تنتمي إلى عائلة الورديات و المعروفة بخصائصها العلاجية المتنوعة مضادة للاكسدة, مضادة لانحلال الدم, مضادة للبكتيريا... إلخ

الهدف من هذه الدراسة هو إجراء اختبارات كيميائية نباتية نوعية و تحليل كميات البوليفينول الكلي باستخدام طريقة فولين سيوكالتيو ، مركبات الفلافونويد في وسط قاعدي في وجود ثلاثي كلوريد الألومنيوم والعفص المكثف بطريقة الفانيلين ، خلاصة الميثانول المائي الخام التي تم تحضيره بالتسريب الساخن المتبوع بالنقع لمدة 48 ساعة والمستخلص أسيتات الإيثيل العضوي والجزء المائي المتبقي ، للأوراق السفرجل الجافة ، التي تم جمعها من منطقة تلمسان.

قدر مردود الاستخلاص للمستخلص الميثانول المائي الخام ب 14,16 بالمئة والذي شكل أعلى معدل مقارنة بالمستخلصين الآخرين.

كشف الفحص الكيميائي النباتي مستخلصات المحضرة عن وجود مركبات الفلافونويد، العفص، الكينون و التيربانويدات في جميع المستخلصات.

كما أثبتت نتائج فحوصات المركبات الفينول التي تم إجراؤها إلى ان مستخلص أسيتات الإيثيل يحتوي على أعلى نسبة البوليفينول، الفلافونويد و العفص المكثفة بمقدار 37.52 ± 1026.1 مكغ مكافئ حمض غاليك/مغ مستخلص جاف, 21.4 ± 391.06 مكغ مكافئ كاتشين/مغ مستخلص جاف و 28.6 ± 300.8 مكغ مكافئ كاتشين/مغ مستخلص جاف على التوالي.

الكلمات المفتاحية: السفرجل، استخلاص، التحليل كيميائية نباتية، مركبات الفينول.

Résumé :

Cognassier (*Cydonia oblonga*) ou communément appelé Safarjal, est une plante qui appartient à la famille des rosacées, caractérisée par ses diverses propriétés thérapeutiques antioxydante, anti hémolytique, antibactérienne...etc.

Cette présente étude a pour but de réaliser des tests phytochimique qualitatifs et des dosages des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu, des flavonoïdes en milieu alcalin en présence de trichlorure d'aluminium et des tanins condensés par la méthode à vanilline, de l'extrait brut eau-méthanol préparé par une infusion suivie d'une macération (48h), sa fraction organique acétate d'éthyle enrichis en polyphénols et la phase résiduelle aqueuse, des feuilles séchées et broyées de *Cydonia oblonga*, récoltées dans la région de Tlemcen.

L'extrait brut eau-méthanol a présenté le rendement d'extraction le plus élevé, d'ordre de 14,16%, par rapport aux deux autres extraits.

Le screening phytochimique a révélé la présence des flavonoïdes, tanins, quinones et des terpénoïdes dans les différents extraits des feuilles du cognassier.

Les résultats des dosages des composés phénoliques réalisés indiquent que la fraction acétate d'éthyle possède les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et en tanins condensés, avec des teneurs d'ordre de $1026,1 \pm 37,52 \mu\text{g E AC/mg E}$, $391,06 \pm 21,4 \mu\text{g E C/mg E}$ et de $300,8 \pm 28,6 \mu\text{g E C/mg E}$, respectivement.

Mots clés : *Cydonia oblonga*, extraction, screening phytochimique, composés phénoliques, dosages.

Abstract:

Quince (*Cydonia oblonga*) or commonly called Safarjal, is a plant, which belongs to the family of rosacea, characterized by its various therapeutic properties: antioxidant, anti-haemolytic, antibacterial...ect.

The purpose of this present study is to carry out qualitative phytochemical tests and dosages of total polyphenols by the Folin-Ciocalteu method, flavonoids in an alkaline medium in the presence of aluminum trichloride and tannins condensed by the vanillin method, of crude water-methanol extract prepared by an infusion followed by maceration (48h) and its organic ethyl acetate fraction enriched with polyphenols and the residual aqueous phase, dried and ground leaves of *Cydonia oblonga*, harvested in the region of Tlemcen .

The extraction yield of the crude hydro-methanolic extract has the highest rate compared to the other two extracts of 14.16%

Phytochemical screening revealed the presence of flavonoids, tannins, quinones and terpenoids in the different extracts from quince leaves.

The results of the assays of the phenolic compounds carried out indicate that the ethyl acetate fraction has the highest contents in total polyphenols, total flavonoids and condensed tannins in the order of $1026.1 \pm 37.52 \mu\text{g E AC/mg E}$, $391.06 \pm 21.4 \mu\text{g E C/mg E}$ and $300.8 \pm 28.6 \mu\text{g E C/mg E}$ respectively.

Key word: *Cydonia oblonga*, extraction, phytochemical screening, phenolic compounds, dosage.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Recherche d'effet hémolytique des quelques plantes médicinales	10
Tableau 2 : quelques plantes à effet anti hémolytique	10
Tableau 3 : Méthode de dosage des polyphénols totaux	17
Tableau 4 : Méthode de dosage des flavonoïdes	18
Tableau 5 : Méthode de dosage des tanins condensés	20
Tableau 6 : Rendement d'extraction des différents extraits des feuilles de <i>Cydonia oblonga</i>	21
Tableau 7 : Caractéristiques des différents extraits des feuilles de <i>Cydonia oblonga</i>	21
Tableau 8 : Résultats des tests photochimiques réalisés sur les 3 extraits des feuilles de <i>Cydonia oblonga</i>	22
Tableau 9 : Taux de polyphénols totaux, flavonoïdes et des tanins condensés dans les extraits des feuilles de <i>Cydonia oblonga</i>	25

Liste des figures

Figure 1 : Représentation des voies de biosynthèse des composés phénoliques	3
Figure 2 : Structure d l'acide benzoïque	4
Figure 3 : Structure de l'acide cinnamique	4
Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes	4
Figure 5 : Structure des tanins hydrolysables	5
Figure 6 : Structure des tanins condensés	5
Figure 7 : Structure des coumarines	6
Figure 8 : Structure de l'isoprène	7
Figure 9 : Composition de la membrane cytoplasmique du globule rouge	8
Figure 10 : Lieu de récolte de <i>Cydonia oblonga</i>	13
Figure 11 : Feuilles de <i>Cydonia oblonga</i> broyées	13
Figure 12 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux	23
Figure 13 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes	24
Figure 14 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés	24

Liste des abréviations

DMAPP : Diméthylallyl diphosphate

DMSO : Diméthyle sulfoxyde

EB : Extrait brut

FAE : Fraction acétate d'éthyle

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

IPP : Isopnetényl diphosphate

PR : Phase résiduelle

UV : Ultra-violet

Tables des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction	1
---------------------------	----------

Synthèse bibliographiques

I. Les plantes médicinales	2
1. Phytothérapie.....	2
2. Métabolites secondaires des plantes	2
2.1. Composés phénoliques	2
2.1.1. Les acides phénoliques	4
2.1.2. Les flavonoïdes	4
2.1.3. Les tanins	5
2.1.4. Les coumarines	5
2.2. les composés azotés (Alcaloïdes).....	6
2.3. Composés terpéniques	6
3. Toxicité des plantes médicinales	7
II. L'hémolyse	7
1. Globules rouges.....	7
2. La membrane des globules rouges.....	8
3. Processus de l'hémolyse.....	8
4. Types d'hémolyse	9
4.1. Hémolyse physiologique.....	9
4.1.1. Hémolyse intra tissulaire.....	9
4.1.2. Hémolyse intravasculaire.....	9
4.2. Hémolyse pathologique.....	9
5. Plantes à effets hémolytiques et antihémolytique	9
III. La plante étudiée : <i>Cydoniaoblonga</i>	10
1. Noms vernaculaires.....	10
2. Systématique (classification).....	11
3. Description botanique.....	11
4. Répartition géographique	11

5. Composition phytochimique.....	11
6. Utilisation traditionnelle	12

Partie Expérimentale

Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal	13
1.1. Préparation de la plante	13
1.2. Préparation des extraits.....	13
1.2.1. Extrait brut hydro-méthanolique.....	13
1.2.2. Fractionnement par l'acétate d'éthyle.....	14
1.3. Calcul des rendements.....	14
Tests phytochimiques.....	14
2. Composés azotés.....	15
2.1. Composés phénoliques.....	15
2.2. Composés terpéniques.....	15
2.3. Dosage des composés phénoliques.....	16
3. Dosage des polyphénols totaux.....	16
3.1. Dosage des flavonoïdes	17
3.2. Dosage des tanins condensés	19
3.3. Analyse statistique.....	20
4. Résultats et interprétations	
Rendement d'extraction.....	21
1. Caractéristiques des extraits obtenus.....	21
2. Tests phytochimiques.....	22
3. Dosage des composés phénoliques.....	23
Discussion	26
Conclusion et perspectives	28
Références bibliographiques	29

Introduction

Depuis très longtemps, les plantes médicinales jouent un rôle important dans la conservation de la santé de l'homme et de la survie de l'humanité (**Chevallier, 2011**).

Certaines espèces possèdent des propriétés pharmacologiques en synthétisant de nombreuses composées appelées « métabolites secondaires », qui leur confèrent un intérêt médical remarquable (**Haddouchi et al., 2016**).

Les métabolites secondaires sont des composés chimiques synthétisés par les végétaux dans les différentes parties de la plante, et qui représentent un réservoir immense de molécules utilisables dans le domaine thérapeutique en tant que médicament ou supplément alimentaire pour guérir ou prévenir plusieurs maladies (**Macheix et al., 2005**).

Ces dernières années, en raison d'une conscience croissante des effets secondaires négatifs des médicaments et de leurs coûts élevés, le monde reconnaît un recours aux plantes médicinales comme forme alternative de santé (**Nosto et al., 2000**).

Cydonia oblonga est une plante médicinale de la famille des rosacées, qui est utilisée pour prévenir ou traiter plusieurs maladies tel que le cancer, le diabète, les infections urinaires... etc. Elle est connue par sa richesse en composés phénoliques possédant plusieurs propriétés pharmacologiques ; anti oxydante, anti hémolytique, antibactériennes, antifongique et anti-inflammatoire (**Ashraf et al., 2016**).

L'objectif de notre étude se portera dans la valorisation des plantes médicinales à effets thérapeutiques, utilisées par la population algérienne. Elle se base sur une étude phytochimique qualitative et des dosages des composés phénoliques d'extrait brut eau-méthanol et sa fraction organique acétate d'éthyle enrichis en polyphénols des feuilles de *Cydonia oblonga*, récoltées dans la région de Tlemcen.

Ce travail se divise en deux parties distinctes :

- Une partie bibliographique qui englobe 3 chapitres dans lesquels nous présentons la phytothérapie et les métabolites secondaires, une description de l'hémolyse et son processus et enfin une présentation de la plante étudiée.
- Une partie expérimentale qui comporte les différentes techniques et l'analyse des résultats du screening phytochimique et du dosage des composés phénoliques, polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins condensés, des extraits préparés.

Synthèse

Bibliographique

I. Les plantes médicinales

Depuis l'antiquité, l'homme utilise les plantes médicinales comme une source de survie et de traitement pour différentes maladies. Elles sont considérées comme des usines chimiques naturelles produisant des substances actives (alcaloïdes, huiles essentielles, flavonoïdes, tanins...) indispensables pour le bien-être de l'humanité (**Chevallier, 2001**).

Dans certains pays, surtout ceux en voie de développement, l'usage des plantes médicinales à des fins thérapeutiques reste toujours important malgré le progrès de la pharmacologie. Aujourd'hui, elles sont appliquées aux traitements des maladies chroniques et aiguës (**Tabuti et al., 2003 ; Benzie et Galor, 2011**).

1. Phytothérapie

La phytothérapie est l'application thérapeutique des plantes en entier ou en partie (fleur, feuille, tige, racine) ou comme extrait (décoction, distillat, huile essentielle) (**Benzie et Galor, 2001**). Elle offre les meilleurs remèdes naturels avec de multiples avantages malgré les énormes évolutions réalisées par la médecine moderne (**Chevallier, 2001**).

Ces plantes exercent leurs effets bénéfiques en utilisant l'ensemble des constituants de la plante contrairement aux produits pharmaceutiques qui ne sont composés que d'un seul principe actif (**Donald, 2000**).

2. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des composés de nature chimique synthétisés par la plante, jouant un rôle important dans la croissance, la défense contre l'attaque des pathogènes ainsi que l'adaptation des plantes à leur environnement (**Ramachandra et Ravishankar, 2002 ; Jamwal, 2017**).

En fonction de leurs origines biosynthétiques, les métabolites secondaires peuvent être divisés en trois groupes : les composés phénoliques, les composés azotés et les composés terpéniques.

2.1. Les composés phénoliques

Le terme polyphénols ou composés phénoliques rassemble un ensemble de molécules ayant tous un noyau benzénique portant un groupement hydroxyle libre ou engagé dans une fonction ester ou hétéroside (**Krief, 2003**).

Les composés phénoliques occupent une place majeure dans la science naturelle en tant que classe importante de produits naturels bioactifs dans le monde entier. Ils sont présents presque

dans toutes les familles des plantes, concentrés dans les racines, les feuilles, les fruits et les couches d'écorces.

La biosynthèse des composés phénoliques se fait par deux voies principales ; la voie shikimate, assurée par l'acide shikimique provenant du 3-déhydroshikimate réduit, et la voie acétate (Krief, 2003). (Fig.1)

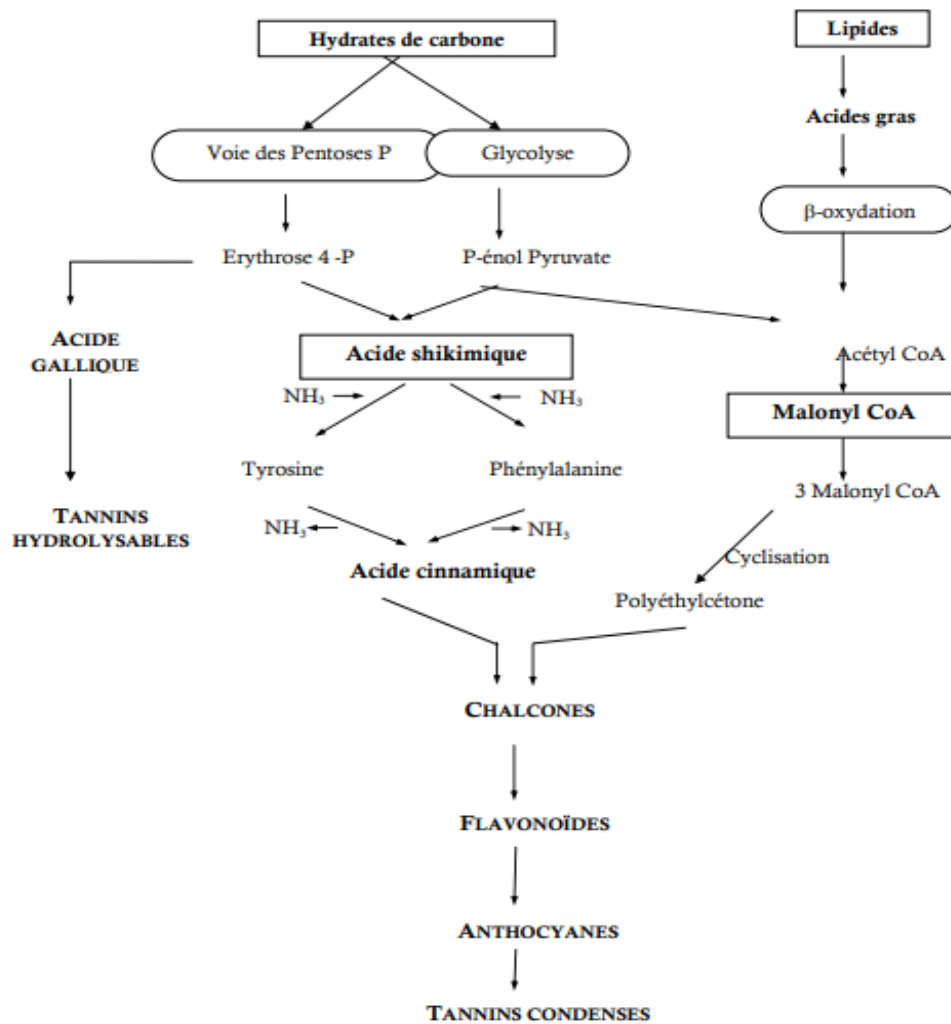


Figure 1 : Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols

Les polyphénols sont divisés en plusieurs classes en fonction du nombre de cycles de phénols qu'ils contiennent et aux éléments structuraux qui les relient les uns aux autres. On distingue les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les coumarines... (Archivioet *al.*, 2007).

2.1.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés phénoliques, ayant au moins une fonction acide et un hydroxyle phénolique. Ils sont appelés aussi phénol carboxylique (Kumar et Goel, 2019). Ces composés sont représentés en deux sous-groupes :

- Les acides hydroxy benzoïques sous forme d'ester ou glycoside (Fig. 2).
- Les acides hydroxy cinnamiques souvent estérifiés (Fig. 3) (Achat, 2014).

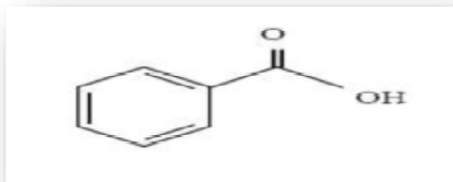


Figure 2 : Structure de l'acide benzoïque (Krief, 2003)

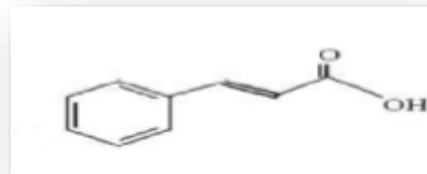


Figure 3 : Structure de l'acide cinnamique (Bruneton, 2008)

2.1.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques naturellement présents dans la plante, responsables de la couleur des fleurs (Chouhanetal., 2017).

Structuralement, les flavonoïdes partagent un même squelette de base qui se compose de deux cycles aromatiques (cycle A et B) liés par une chaîne à trois atomes de carbone formant un hétérocycles (cycle C) (Erdmanet al., 2005) (Fig. 4).

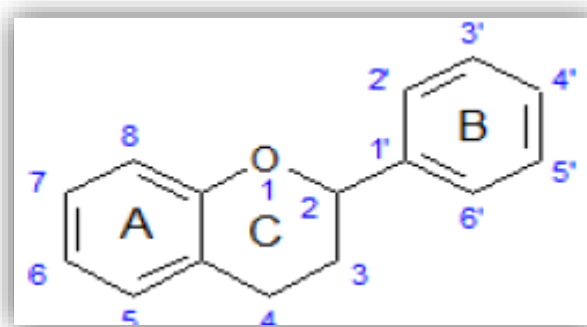


Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes (Rajnarayana et al., 2001)

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes en fonction de la présence d'une double liaison entre atome de carbone 2 et 3, ou un groupe hydroxyle en position 3 du cycle C : les flavanes, flavones, flavanones, flavanols... etc (Middeltonet al., 2000 ; Erdman et al., 2005).

2.1.3. Les tanins

Les tanins sont des métabolites poly phénoliques caractérisés par un poids moléculaire supérieur à 500 Dalton et la capacité de précipiter les protéines (Bennick, 2002).

Selon les caractéristiques structurales et les propriétés chimiques spécifiques. Les tanins sont classés en deux grands groupes : Les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Khanbabaee et Van Ree, 2001).

- Les tanins hydrolysables : sont caractérisés par un noyau central glucidique sur lequel se fixe des acides carboxyliques phénoliques par une liaison ester (Quideau et al., 2011) (Fig. 5).
- Les tanins condensés : sont appelés aussi pro anthocyanidines. Ce sont des oligomères formés de 2 à plusieurs unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons C-C (Khanbabaee et Van Ree, 2001) (Fig. 6).

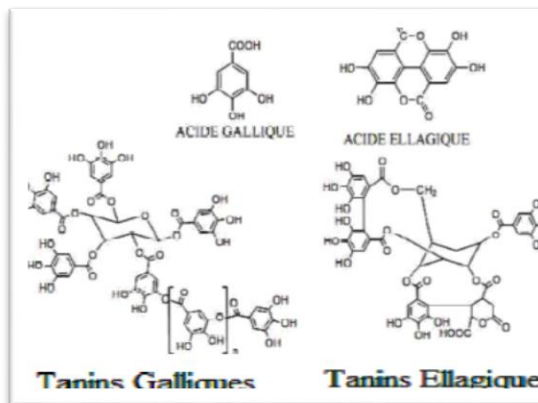


Figure 5 : Structure des tanins hydrolysables (Peronny, 2005)

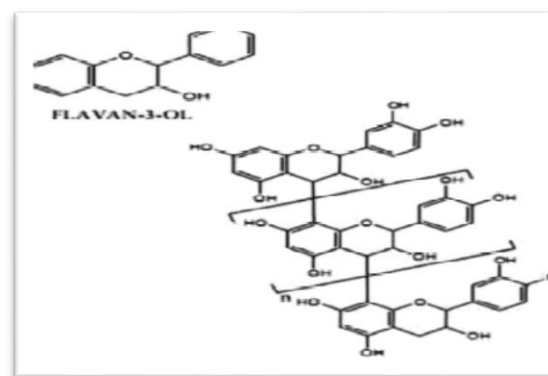


Figure 6: Structure des tanins condensés (Peronny, 2005)

2.1.4. Les coumarines

Les coumarines constituent une classe des métabolites secondaires des végétaux dérivés d'acide cinnamique par cyclisation de la chaîne latérale de l'acide *o*-coumarique. Ces substances sont plus courantes dans la nature sous forme d'hétéroside (Giada, 2013). Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés à 9 atomes de carbones possédant le noyau benzo-pyranone-2 (Curini et al., 2006) (Fig. 7).

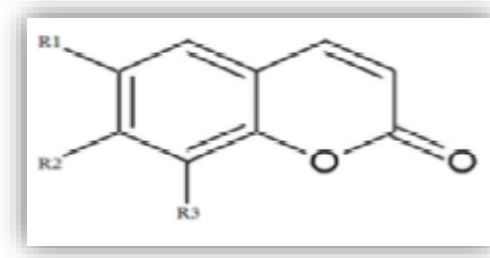


Figure 7 : Structure des coumarines (Bruneton, 2008)

2.2. Les composés azotés (Alcaloïdes)

Les alcaloïdes sont des substances organiques d'origine végétale, à caractère alcalin et présentent une structure complexe hétérocyclique ayant un atome d'azote (Gupta *et al.*, 2015). Ils sont synthétisés au niveau des sites précis (racine de croissance) puis transportés dans leur site de stockage, qui est le plus souvent les tissus périphériques, sous forme soluble, sels ou sous forme complexée (Rakotonanahary, 2012).

Selon la présence ou l'absence d'un précurseur de synthèse (acide aminé), et l'inclusion ou non d'un atome d'azote dans un système hétérocyclique (Bruneton, 2009 ; Gupta *et al.*, 2015), on distingue trois classes d'alcaloïdes :

- **Alcaloïdes vrais** : formés à partir des acides aminés dont l'atome azote est inclu dans un système hétérocyclique.
- **Proto alcaloïdes** : formés à partir des acides aminés dont l'atome d'azote n'est pas inclu dans un système hétérocyclique.
- **Pseudo alcaloïdes** : présentent tous les caractères des alcaloïdes vrais mais qui ne sont pas des dérivés des acides aminés.

2.3. Les composés terpéniques

Les terpénoïdes constituent la plus grande classe des produits naturels et la plus variée sur le plan structural (Buchanan, 2000).

Chez les végétaux, les terpénoïdes sont des métabolites secondaires produits par les tissus végétatifs dans les racines mais aussi par diverses pièces florales à partir d'un précurseur simple de 5 atomes de carbones ; l'isopentenylidiphosphate (IPP) et son isomère le diméthylallyldiphosphate (DMAPP) assemblés et modifiés (Singh et Sharma, 2014).

Leur classification est basée sur le nombre de répétitions de l'unité de base 'isoprène' (Fig.8). On distingue : les hémiterpènes (C5), les monoterpènes (C10), les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C20), les sesterterpènes (C25), les triterpènes (C30), les tétraterpènes (C40) et les polyterpènes (C5n) (Vandermoten *et al.*, 2008).

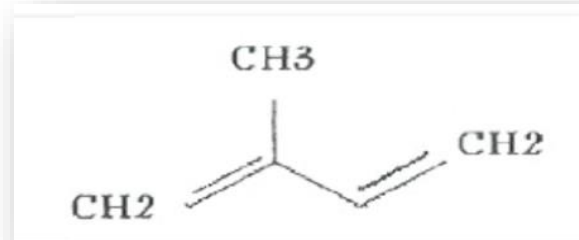


Figure 8 : Structure de l'isoprène (Olide Mayer, 2004)

3. Toxicité des plantes médicinales :

En dehors de l'usage thérapeutique, les produits à base de plante médicinales peuvent contenir des contaminants toxiques tels que les pesticides et les métaux lourds qui sont susceptibles de causer des réactions allergiques et/ou toxiques. Cette toxicité peut être liée aux mélanges complexes qu'elles contiennent tel que les terpènes, alcaloïdes, saponines et d'autres produits chimiques augmentant le risque de réactions indésirables par leurs effets additifs ou synergiques des interactions chimiques. Les plantes médicinales ou remèdes naturels ne diffèrent pas fondamentalement des médicaments ; ils ont aussi des effets bénéfiques, des limites d'utilisation et des effets secondaires (Zeggwaghet *al.*, 2003 ; Saad., 2006).

Pour étudier la toxicité *in vitro*, les globules rouges présentent un modèle cellulaire idéal en raison de leur facilité d'isolement et leur simplicité, en se basant sur l'effet hémolytique qui est un phénomène irréversible par lequel les globules rouges sont détruits et libèrent leur contenu hémoglobinique.

II. L'hémolyse

1. Globules rouges

Les globules rouges ou hématies sont des cellules anucléées produites principalement dans la moelle osseuse et circulent dans les vaisseaux sanguins en fixant l'oxygène sur l'hémoglobine au niveau des tissus et des poumons (Aguilar, 2007).

Les hématies ont la forme d'un disque biconcave de 7 à 8 micromètres de diamètre contenant principalement l'hémoglobine et d'autres molécules indispensables à sa survie (**Gaucher, 2007 ; Medkour, 2008**).

2. Membrane des globules rouges

Les globules rouges sont formés d'une membrane érythrocytaire composée d'un mélange de lipides et de protéines, structurés dans une bicouche lipidique, dont leur répartition est commune dans toutes les membranes érythrocytaires (**Daleke, 2008**).

La répartition des lipides dans la bicouche n'est pas homogène ; on trouve la sphingomyéline et la phosphatidylcholine dans le feuillet externe et la phosphatidyléthanoline et la phosphatidylsérine dans le feuillet interne. Ces phospholipides sont en mouvement continu et se déplacent rapidement à travers la bicouche lipidique (**Kuypers, 2008**).

Les protéines membranaires s'intercalent entre les deux feuillets de la bicouche lipidique jouant un rôle important dans les échanges entre les deux milieux externe et interne et dans la stabilité de la membrane érythrocytaire (**Elgsaeter et al., 1986**) (**Fig. 9**).

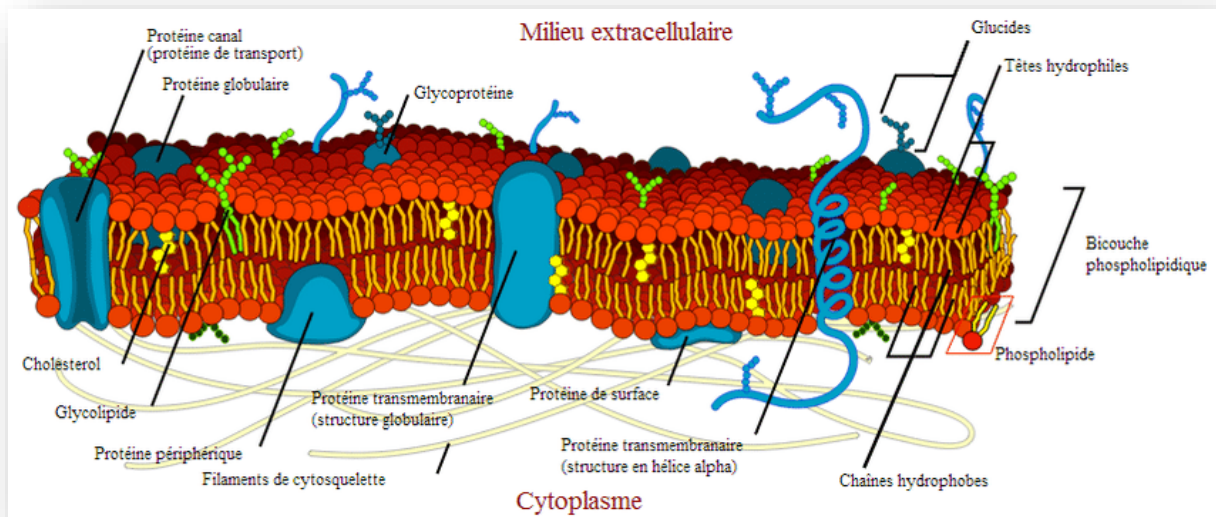


Figure 9 : Composition de la membrane cytoplasmique du globule rouge (**Dodge et al., 1963**)

3. Processus de l'hémolyse

L'hémolyse est un phénomène physiologique irréversible qui est dû à la destruction de la membrane érythrocytaire entraînant alors une libération excessive des éléments intra-érythrocytaire dans le sérum après une durée de vie de 120 jours (**Mezzour et al., 2005**).

4. Types d'hémolyse

4.1. Hémolyse physiologique

C'est la destruction des globules rouges après une durée de vie normale de 120 jours par la perte du contenu enzymatique et l'altération membranaire. Elles sont ensuite phagocytées par les macrophages du système des phagocytes mononuclés (**Aguilar, 2007**).

On distingue deux types d'hémolyse physiologique :

4.1.1. Hémolyse intra tissulaire

Pour une personne saine, la plupart des hématies sont détruites dans les macrophages de la moelle osseuse, tandis que le reste de l'hémolyse se répartit dans l'organisme en particulier dans le foie et la rate (**Aguilar, 2007**).

4.1.2. Hémolyse intra vasculaire

Elle est caractérisée par la libération du contenu du globule rouge dans la circulation sanguine, ceci est due à la formation du complexe d'attaque membranaire qui en résulte de l'activation complète du complément à la surface des hématies. Et l'hémoglobine libérée va être captée par l'haptoglobine et transportée directement aux cellules du foie afin d'être dégradée (**Rother et al., 2005**).

4.2. Hémolyse pathologique

Elle est définie par la destruction prématurée des hématies sous l'effet d'un processus hémolytique qui peut être due à deux mécanismes principaux ; soit à une anomalie du globule rouge (hémolyse corpusculaire ou globulaire) soit à une agression extrinsèque des hématies (**Rother et al., 2005 ; Aguilar, 2007**).

5. Plantes à effet hémolytique et anti hémolytique

En tant que modèle cellulaire, les globules rouges sont les plus employés dans l'étude de la cytotoxicité *in vitro*, grâce à leur simplicité, leur facilité d'isolement et à leur effet hémolytique.

Plusieurs plantes médicinales ont été étudiées pour la recherche de leurs effets hémolytiques. Le tableau 1 résume quelques travaux réalisés sur l'effet hémolytique des extraits des plantes médicinales.

Tableau 1 : Recherche d'effet hémolytique de quelques plantes médicinales

Plantes (partie utilisée)	Dose et type d'extraction	Taux d'hémolyse	Références
Tiges et feuilles <i>d' Ajuga iva</i>	2mg/ml : extrait hydro méthanolique préparé par macération	71,31%	Abbou, 2016
Partie aérienne <i>d' Artemisia absinthium</i>	2mg/ml : extrait brut hydro alcoolique préparé par macération	85,9%	Chabane, 2016
Ecorces et racines de <i>Berberis vulgaris</i>	5mg/ml : extrait des alcaloïdes	54,21%	Elalaoui, 2015
Partie aérienne d' <i>Urtica dioica</i>	2mg/ml : fraction acétate d'éthyle préparée par macération	77%	Hammad, 2019

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que les plantes médicinales constituent un réservoir de substances à effet anti-hémolytique (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Quelques plantes à effet anti-hémolytique

Plantes (partie utilisée)	Oxydants et érythrocytes utilisés	Taux d'effet anti-hémolytique (%)	Références
Feuilles de <i>Laurus nobilis</i>	AAPH Erythrocytes humain	68,18 % à une concentration de 1000µg/ml	Bouloufa et Chetioui, 2018
Feuilles de <i>Citrus reticulata</i>	H ₂ O ₂ Erythrocytes humain	81% à une concentration de 110 µg/ml	Arib et Fennouch, 2016
Pépins de <i>Citrus maxima</i>	H ₂ O ₂ Erythrocytes humain	56,37% à une concentration de 20mg/ml	Amrane et Babahani, 2017

III. Plante étudiée : *Cydonia oblonga*

1. Noms vernaculaire

Cydonia oblonga est connue par plusieurs noms vernaculaire (**Marwat et al., 2009**).

En arabe : Safarjal

En français : Cognassier

En anglais : Quince

Nom local : Bahi

2. Systématique

La classification botanique de *Cydonia oblonga* selon **Evreinoff, 1960** est la suivante :

Règne : Plantae

Sous règne : Trocheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Rosidae

Ordre : Rosales

Famille : Rosaceas

Genre : *Cydonia*

Espèce : *oblonga*

3. Description botanique

L'espèce, représentant le genre *Cydonia*, est unique appelée *Cydonia oblonga* (cognassier) qui appartient à la famille des rosacées. C'est un arbre qui peut atteindre 5 à 8 mètres d'hauteur et 4 à 6 mètres de largeur (**Orhan et al., 2014**).

Les feuilles sont ovales de 5 à 10 centimètres de long. Les fleurs blanches de 5 pétales mesurant de 4 à 5cm de diamètre donnant naissance aux coings, en forme de poire à pépin de couleur jaune ou/et doré brillant à maturité. Les coings sont composés d'une pulpe moyennement acide à saveur très âpre qui disparaît totalement à la cuisson (**Postman, 2009 ; Orhan et al., 2014**).

4. Répartition géographique

Cydonia est originaire du nord d'Iran, du Turkménistan et des régions de l'ouest de l'Anatolie et de la Grèce (**Yüksel et al., 2013**). Cette rosacée est moyennement répandue en Afrique du Nord et plus particulièrement en Algérie.

5. Composition phytochimique

Les graines de coing contiennent des triterpènes et des tanins qui leur confèrent leur activité anti diarrhéique, tandis que les fruits sont riches en acides organiques à savoir l'acide citrique, ascorbique, malique, quinique et fumarique (**Silva et al., 2002 ; Magalhaes et al., 2009**).

D'autres analyses phytochimiques ont montré que l'extrait des feuilles de cognassier est reconnu comme source de composés phénoliques en particulier l'acide 5-O-caféoylquinique possédant une activité anti-oxydante, antimicrobienne, anti ulcéralive et anti hémolytique (**Fattouch et al., 2007 ; Costa et al., 2009**).

6. Utilisation traditionnelle

Les parties de cognassier les plus utilisées en médecine traditionnelle sont : les feuilles, les fruits et les graines (**Al-Snafi., 2016**).

En Italie, les feuilles de coings sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement de diverses maladies de la peau contre les affections cutanées (**Oliveira et al., 2007**).

Les fruits et les graines de *Cydonia Oblonga* sont utilisés comme astringent, antiseptique, pour le traitement de la diarrhée, des troubles hépatiques et même pour le traitement de la toux et des maux de gorge (**Al-Snafi., 2016**).

En Algérie, on utilise le jus de coing pour accélérer la cicatrisation des plaies cutanées ou adoucir les gerçures et les brûlures.

Matériel

et

Méthodes

Notre travail a été réalisé au sein du laboratoire de recherche « antibiotiques, antifongiques, Physico-chimie, Synthèse et Activités Biologiques (**LAP-SAB**), Faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et l'univers, Université Abou Bekr Belkaïd (Tlemcen).

1. Matériel végétal

1.1. Préparation de la plante

Les feuilles de *Cydonia oblonga* ont été récoltées le mois d'Août 2019 dans la région Kiffen (Tlemcen) (**Fig.10**). Elles ont été séchées à température ambiante et à l'obscurité.

Les feuilles séchées sont ensuite broyées et conservées dans un endroit sec et à l'abri de la lumière (**Fig.11**).

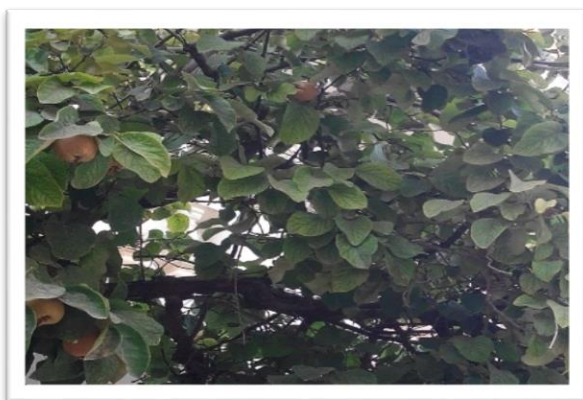


Figure 10 : Lieu de la récolte de *Cydonia oblonga*
(Photo personnel)



Figure 11 : Feuilles de *Cydonia oblonga*
broyées
(Photo prise au laboratoire)

1.2. Préparation des extraits

Les feuilles de *Cydonia oblonga* broyées et séchées ont été soumises à une extraction solide/liquide réalisée par une infusion suivie d'une macération.

1.2.1 Extrait brut hydro-méthanolique (EB)

- Mélanger dans un bécher 20g de la matière végétale avec 400ml du mélange eau méthanol (30/70 : v/v) bouillant (infusion).
- Laisser le mélange macéré à une température ambiante pendant 48h à l'obscurité (macération).
- Filtrer le mélange et récupérer le filtrat.
- Evaporer le méthanol du filtrat à l'aide d'un Rotavapor à 60°C

- Récupérer de l'extrait brut Eau-méthanol (EB).

1.2.2 Fractionnement par l'acétate d'éthyle :

Après évaporation du méthanol, une extraction liquide-liquide a été réalisée sur l'extrait brut à l'aide d'une ampoule à décanter en présence de l'acétate d'éthyle.

- Dans une ampoule à décanter, mélanger le volume de l'extrait brut obtenu avec un volume d'acétate d'éthyle (v/v)
- Agiter bien, dégazer et laisser décanter le mélange
- Récupérer la phase organique
- Continuer l'épuisement de la phase aqueuse, deux fois avec l'acétate d'éthyle
- Récupérer les deux phases ;
- La fraction acétate d'éthyle (FAE) a été évaporée à sec à l'aide d'un Rotavapor à 60°C et la phase résiduelle (PR) a été séchée à sec dans l'étuve à 35°C.

Les trois extraits : EB, FAE et PR ainsi obtenus ont été conservés à l'obscurité dans des tubes secs.

1.3. Calcul du rendement

Le rendement de chaque extrait a été calculé à partir de la formule suivante :

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

- R (%) : rendement exprimé en pourcentage
- M1 : masse en gramme de l'extrait sec obtenu
- M0 : masse en gramme de la matière végétale initiale.

2. Tests phytochimiques

Les différents extraits obtenus ont été soumis aux différents tests phytochimiques qualitatifs afin de mettre en évidence les différents métabolites secondaires présents dans les feuilles de la plante étudiée par des réactions de coloration et de précipitation.

Ces tests qualitatifs sont menés selon les méthodes décrites par **(Harbone, 1998)**

2.1. Composés azotés

➤ Les alcaloïdes

Dans deux tubes à essai, introduire 0,5ml de l'extrait à analyser. Acidifier le milieu par quelques gouttes d'HCl (1%) et ajouter 0,5ml de réactif de Mayer dans le premier tube et 0,5ml de réactif de Wagner dans le second tube. L'apparition d'un précipité blanc ou brun respectivement, révèle la présence d'alcaloïdes.

2.2. Composés phénoliques

➤ Les tanins

Dans un tube à essai, introduire 1ml d'extrait à analyser et ajouter 0,25ml d'une solution aqueuse de FeCl₃ (1%). Le mélange est incubé pendant 15min à une température ambiante. La présence des tanins est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre.

➤ Les flavonoïdes

Dans un tube à essai, introduire 1ml d'extrait à analyser et ajouter 1ml d'HCl et quelques copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rose ou rouge ou jaune prouve la présence des flavonoïdes.

➤ Les quinones

Dans un tube à essai, introduire 1ml d'extrait à analyser et ajouter 0,1ml du NaOH (1%). L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres.

➤ Les anthraquinones

Dans un tube à essai, introduire 1ml d'extrait à analyser et ajouter 1ml de NH₄OH (10%) puis agiter. L'apparition d'une coloration violette indique la présence des anthraquinones.

2.3. Composés terpéniques

➤ Les saponines : test de mousse

Dans un tube à essai, introduire 5ml de l'extrait à analyser, ajouter 5ml d'eau distillée, agiter pendant 15 secondes et laisser le mélange au repos pendant 15 minutes. Une hauteur persistante supérieure à 1 cm de mousse indique la présence des saponines.

➤ **Les terpénoïdes : test de Slakowski**

Dans un tube à essai, introduire 1ml de l'extrait à analyser, ajouter 0,4 ml de chloroforme et 0,6 ml d'acide sulfurique concentré. La formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase indique la présence des terpénoïdes.

3. Dosage des composés phénoliques

3.1. Dosage des polyphénols totaux

➤ **Principe**

Le réactif utilisé pour le dosage des polyphénols totaux est le Folin Ciocalteu. C'est un acide de couleur jaune constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). L'oxydation des composés phénoliques par ce réactif entraîne la formation d'un nouveau complexe redox molybdène-tungtène de couleur bleu qui absorbe à 725nm (**Nickavar et al., 2008**)

➤ **Mode opératoire :**

Les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits préparés des feuilles de *Cydonia oblonga* ont été déterminées par la méthode décrite par **Nickavar et al., 2008**

- 100µl de chaque extrait (1mg/ml) est mélangé avec 2000µl de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (2%) ;
- Le mélange est incubé pendant 5 minutes à température ambiante ;
- 100µl du réactif Folin Ciocalteu (1N) est ajouté au mélange ;
- Le mélange final est incubé pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité ;
- L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 725nm contre un blanc ;

En parallèle et dans les mêmes conditions opératoires, une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant l'acide gallique comme étalon à un intervalle de concentration de 50 à 400µg/ml (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Méthode de dosage des polyphénols totaux

	Gamme d'étalonnage ($\mu\text{g/ml}$)									Extraits (1mg/ml)		
	Blanc	50	100	150	200	250	300	350	400	EB	FAE	PR
Acide gallique (μl)	-	100	100	100	100	100	100	100	100	-	-	-
Eau distillée (μl)	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrait (μl)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	100
Na ₂ CO ₃ (2%) (μl)	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
Incubation pendant 5min à température ambiante												
Folin Ciocalteu (1N) (μl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Incubation pendant 30min à température ambiante												
Mesure de l'absorbance à 725nm												

EB : extrait brut, FAE : fraction acétate d'éthyle, PR : phase résiduelle.

La teneur en polyphénols totaux est exprimée en microgramme Equivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG/ mg E}$).

3.2. Dosage des flavonoïdes

➤ Principe

Les réactifs utilisés pour le dosage des flavonoïdes sont les solutions incolores de nitrite de sodium (NaNO₂) et de chlorure d'aluminium (AlCl₃). L'oxydation des flavonoïdes par ces réactifs, en milieu alcalin, entraîne la formation d'un complexe rose qui absorbe à 510nm (Zhishen *et al.*, 1999)

➤ Mode opératoire

Les teneurs en flavonoïdes dans les différents extraits préparés des feuilles de *Cydonia oblonga* ont été déterminées par la méthode colorimétrique décrite par Zhishen *et al.*, 1999

- 250 μl de chaque extrait (1mg/ml) est mélangé avec 1000 μl d'eau distillée.
- 75 μl d'une solution de nitrite de sodium (NaNO₂) (15%) est ajouté au mélange.
- Les tubes sont incubés pendant 6 minutes à température ambiante.
- 75 μl d'une solution de chlorure d'aluminium (AlCl₃) (10%) est ajouté.

- Après 6 minutes de repos à température ambiante, 1000µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) (4%) est ajouté au mélange.
- 100µl d'eau distillée est ajouté pour obtenir un volume final de 2500µl
- Les tubes sont agités et incubés pendant 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 510nm contre un blanc.

En parallèle et dans les mêmes conditions opératoires, une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant la catéchine comme étalon à un intervalle de concentration de 50 à 400µg/ml (Tableau 4).

Tableau 4 : Méthode de dosage des flavonoïdes

	Gamme d'étalonnage (µg/ml)									Extraits(1mg/ml)		
	Blanc	50	100	150	200	250	300	350	400	EB	FAE	PR
Catéchine (µl)	-	250	250	250	250	250	250	250	250	-	-	-
Extrait(µl)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	250	250	250
Eau distillée (µl)	1250	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
NaNO ₂ (15%) (µl)	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
Incubation pendant 6min à température ambiante												
AlCl ₃ (10%) (µl)	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
Incubation pendant 6min à température ambiante												
NaOH (4%) (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Eau distillée (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Incubation pendant 15min à l'abri de la lumière												
Mesure de l'absorbance à 510nm												

EB : extrait brut , **FAE** : fraction acétate d'éthyle , **PR** : phase résiduelle.

La teneur en flavonoïdes est exprimée en microgramme Equivalent catéchine par milligramme d'extrait (µg EC/ mg E).

3.3. Dosage des tanins condensés

➤ Principe

La teneur en tanins condensés présent dans les feuilles de la plante étudiée a été déterminée par la méthode à vanilline.

En milieu acide, les tanins condensés se dépolymérisent, et par réaction avec la vanilline se transforment en anthocyanidols de couleur rouge mesurable par spectrophotomètre à 550nm (Sun et al., 1998).

➤ Mode opératoire

Les teneurs en tanins condensés des différents extraits préparés des feuilles de *Cydonia oblonga* ont été déterminées par la méthode décrite par Sun et al., 1998.

- 50µl de chaque extrait préparé (1mg/ml) est ajouté à 1500µl de la solution de vanilline/méthanol (4%) (m/v)
- Après agitation du mélange à l'aide d'un vortex, 750µl d'acide chlorhydrique concentré (HCl à 35%) est ajouté au mélange.
- Le mélange est incubé pendant 20 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 550nm contre un blanc.

En parallèle et dans les mêmes conditions opératoires, une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant la catéchine comme étalon à un intervalle de concentration de 1 à 10mg/ml (Tableau 5).

Tableau 5 : Méthode de dosage des tanins condensés

	Gamme d'étalonnage (µg/ml)							Extraits(1mg/ml)		
	Blanc	1000	2000	4000	6000	8000	10000	EB	FAE	PR
Catéchine (µl)	-	50	50	50	50	50	50	-	-	-
Eau distillée(µl)	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrait (µl)	-	-	-	-	-	-	-	50	50	50
Vanilline/ Méthanol (µl)	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500
Agitation avec vortex										
HCl (35%)(µl)	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750
Incubation pendant 20min à température ambiante										
Mesure de l'absorbance à 550nm										

EB : extrait brut , FAE : fraction acétate d'éthyle , PR : phase résiduelle.

La teneur en tanins condensés est exprimée en en microgramme Equivalent catéchine par milligramme d'extrait (µg EC/ mg E).

4. Analyse statistique

Les calculs statistiques sont souvent utiles aux biologistes pour la détermination des valeurs normales ou plus exactement des valeurs de référence. Comme pour l'évaluation de précision et l'exactitude d'analyse.

Les différents dosages des composés phénoliques ont été répétés 3fois et les résultats sont exprimés en moyennes ± écart type.

- La moyenne :

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_i x_i$$

- L'écart type :

$$\sigma_x = \sqrt{Vx}$$

Résultats

et

Interprétations

1. Rendement d'extraction

L'extraction eau-méthanol (30/70 v/v), par infusion suivie d'une macération (48h), des feuilles de *Cydonia oblonga*, suivie par un fractionnement avec l'acétate d'éthyle, nous a permis de récupérer trois extraits : Extrait brut eau-méthanol (EB), sa fraction organique acétate d'éthyle (FAE) et la phase aqueuse résiduelle (PR).

Les rendements d'extraction des différents extraits préparés ont été calculés par rapport à la masse du matériel végétal initial.

Les résultats sont résumés dans le **tableau 6**.

Tableau 6 : Rendement d'extraction des différents extraits des feuilles de *Cydonia oblonga*.

Extraits	Matière végétale (g)	Rendements %
EB	20	14,16
FAE	20	2,14
PR	20	5,21

EB : extrait brut , **FAE** : fraction acétate d'éthyle , **PR** : phase résiduelle

D'après les résultats obtenus dans le tableau ci-dessus, nous avons noté que l'extrait brut eau-méthanol (EB) représente le rendement le plus élevé (14,16%), suivi par l'extrait aqueux de la phase résiduelle (PR) (5,21%). Tandis que l'extrait acétate d'éthyle (FAE) a présenté le rendement le plus faible (2,14%).

2. Caractéristiques des extraits obtenus

Le tableau ci-dessous regroupe les différentes caractéristiques (aspect, couleur et solvant de solubilité) des extraits étudiés des feuilles de *Cydonia oblonga*.

Tableau 7 : Caractéristiques des différents extraits préparés des feuilles de *Cydonia oblonga*

Extraits	Aspect	Couleur	Solvant
EB	Cristallisé	Marron foncé	Eau-distillée
FAE	Poudre	Marron foncé	DMSO + eau-distillé
PR	Cristallisé	Marron foncé	Eau-distillée

EB : extrait brut , **FAE** : fraction acétate d'éthyle , **PR** : phase résiduelle , **DMSO** : diméthyle sulfoxyde

D'après les résultats du **tableau 7**, nous avons noté que les 3 extraits possèdent la même couleur (marron foncé) avec un aspect différent (cristallisé pour l'extrait brut eau-méthanol et la phase aqueuse résiduelle et poudre pour la fraction organique acétate d'éthyle) et une solubilité différente (eau-distillée pour l'extrait brut et la phase résiduelle et DMSO + eau-distillée pour la fraction acétate d'éthyle).

3. Les tests phytochimiques

Les tests phytochimiques réalisés sur les différents extraits étudiés des feuilles de *Cydonia oblonga*, nous ont permis de mettre en évidence leurs compositions phytochimiques. Les résultats sont reportés dans le **tableau 8**.

Tableau 8 : Résultats des tests phytochimiques réalisés sur les 3 extraits des feuilles de *Cydonia oblonga*.

Tests		EB	FAE	PR
Alcaloïdes	Mayer	-	-	-
	Wagner	-	-	-
Tanins		+	+	+
Flavonoïdes		+	+	-
Quinones		+	+	+
Anthraquinones		-	-	-
Terpénoïdes		+	+	+
Saponines		-	+	-

EB : extrait brut, **FAE** : fraction acétate d'éthyle, **PR** : phase résiduelle, (+) : présence, (-) : absence.

Les résultats des tests phytochimiques exprimés dans le **tableau 8**, nous a révélé la présence des tanins, des quinones et des terpénoïdes dans les différents extraits préparés des feuilles de *Cydonia oblonga*.

De même, nous avons constaté que les flavonoïdes sont présents seulement dans l'extrait brut et la fraction acétate d'éthyle et les saponines sont présentes seulement dans la fraction organique.

Par contre les alcaloïdes et les anthraquinones sont notés absents dans les 3 extraits étudiés.

4. Dosage des composés phénoliques

Les dosages des composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins), de l'extrait brut eau-méthanol (EB), sa fraction organique acétate d'éthyle (FAE) et la phase aqueuse résiduelle (PR), des feuilles *Cydonia oblonga*, ont été réalisés par des méthodes colorimétriques.

Les teneurs sont déterminées à partir des équations de régression linéaire des courbes d'étalonnages d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux ($y = 0,0017x$, $R^2 = 0,993$) (**Fig. 12**) et de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes ($y = 0,003x$, $R^2 = 0,993$) (**Fig. 13**) et de la catéchine pour le dosage des tanins condensés ($y = 0,0001x$, $R^2 = 0,991$) (**Fig. 14**).

Les résultats obtenus sont exprimés en microgramme équivalent acide gallique par milligramme de l'extrait sec ($\mu\text{g EAG}/\text{mg E}$) pour le dosage de polyphénols totaux, et en microgramme équivalent catéchine par milligramme de l'extrait sec ($\mu\text{g E C}/\text{mg E}$) pour le dosage des flavonoïdes totaux et des tanins condensés.

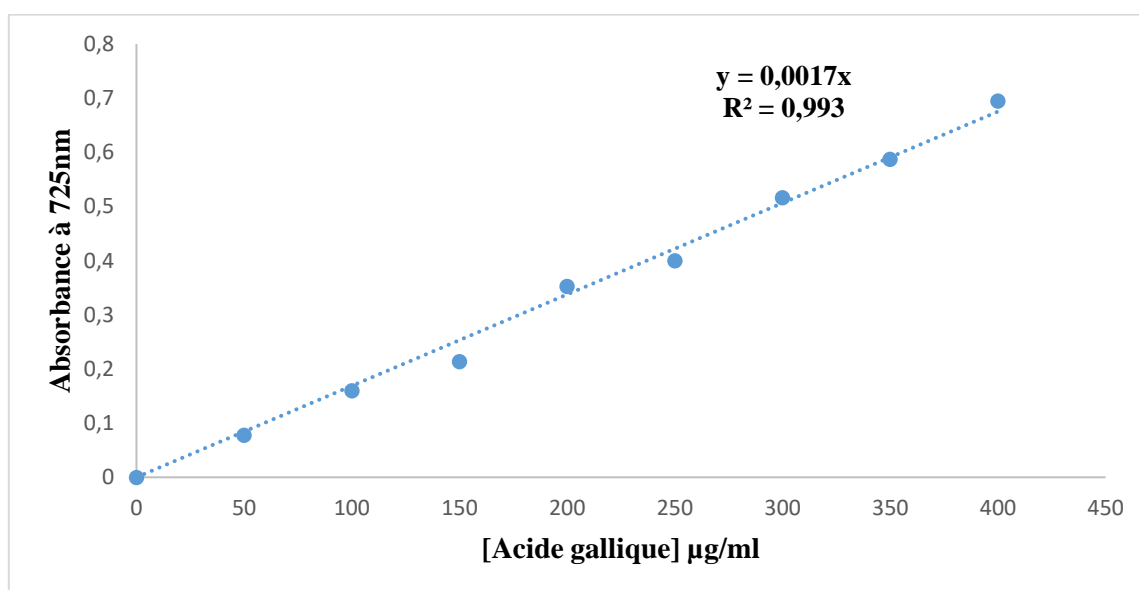


Figure 12 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

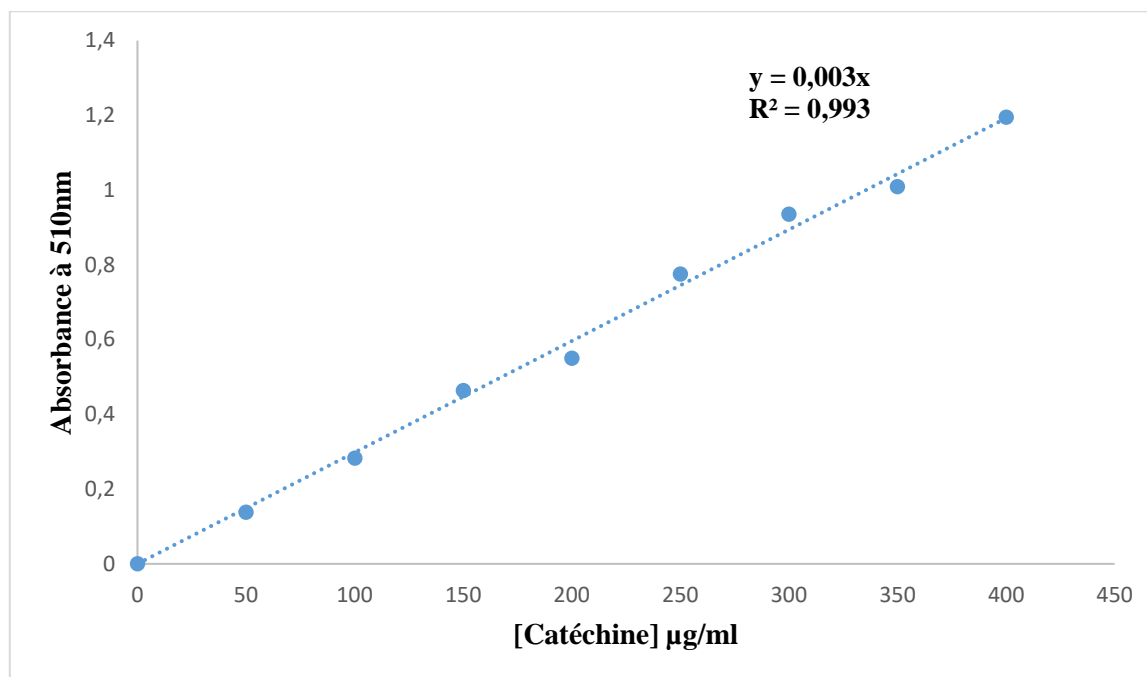


Figure 13 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes totaux.

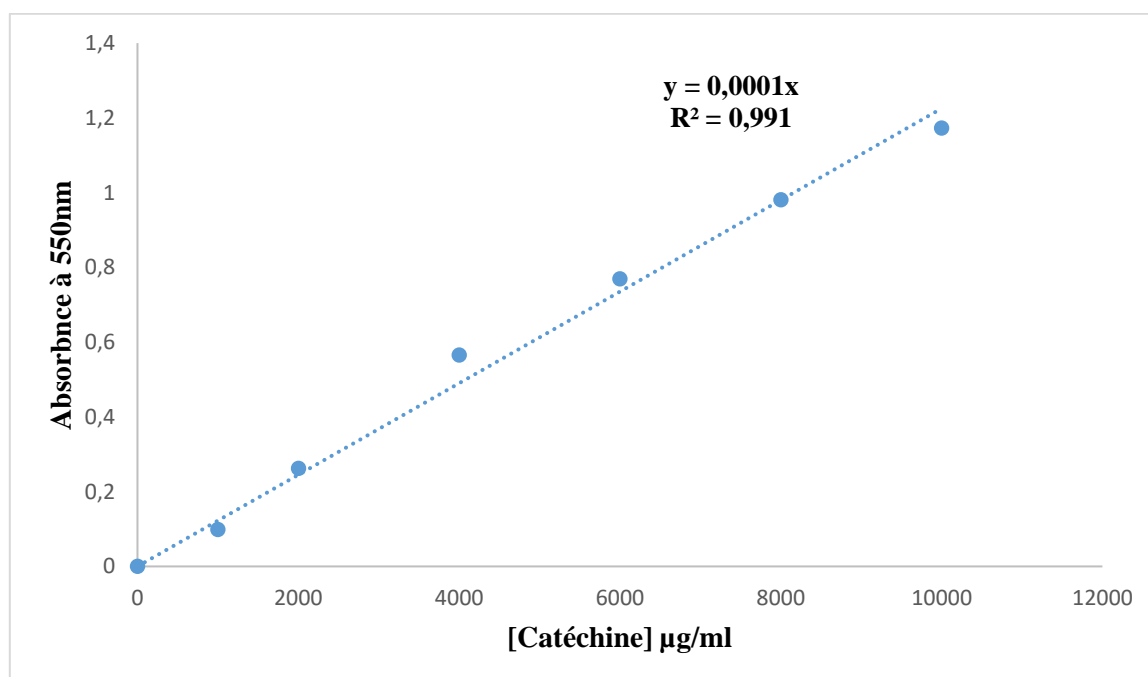


Figure 14 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés.

Le tableau 9 résume les teneurs en composés phénoliques, déterminées à partir des courbes d'étalonnage, des extraits étudiés des feuilles de *Cydonia oblonga*

Tableau 9 : Taux de polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés dans les extraits des feuilles de *Cydonia oblonga*

Extraits	Polyphénols totaux ($\mu\text{g E AG/mg E}$)	Flavonoïdes ($\mu\text{g E C/mg E}$)	Tanins condensés ($\mu\text{g E C/mg E}$)
EB	503,47 \pm 11,58	225,1 \pm 7,7	178,8 \pm 78,8
FAE	1026,1 \pm 37,52	391,06 \pm 21,4	300,8 \pm 28,6
PR	448,1 \pm 24,70	118,06 \pm 18,93	136,4 \pm 40,4

EB : extrait brut, **FAE** : fraction acétate d'éthyle, **PR** : phase résiduelle

Les résultats exprimés dans le tableau ci-dessus, nous ont montré que la fraction acétate d'éthyle présente les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés avec des taux d'ordre de 1026,1 \pm 37,52 $\mu\text{g EAG/mg E}$, 391,06 \pm 21,4 $\mu\text{g EC/mg E}$ et 300,8 \pm 28,6 $\mu\text{g E C/mg E}$, respectivement, suivi par l'extrait brut eau-méthanol avec une teneur moyenne d'ordre de 503,47 \pm 11,58 $\mu\text{g E AG/mg E}$ en polyphénols totaux, 225,1 \pm 7,7 $\mu\text{g E C/mg E}$ en flavonoïdes et 178,8 \pm 78,8 $\mu\text{g E C/mg E}$ en tanins condensés. Tandis que la phase résiduelle présente les teneurs les plus faibles en polyphénols totaux en flavonoïdes et en tanins condensés.

Discussion

L'importance des plantes médicinales dans le monde est très accentuée dans ces dernières années malgré le progrès de la médecine moderne. En Algérie, la connaissance et l'usage de ces plantes constituent un patrimoine précieux pour l'être humain dans le traitement de nombreuses maladie (**Saad et al., 2006**).

Cydonia oblonga, connu sous le nom de « Safarjal » (**Marwat et al., 2009**), est une plante qui appartient à la famille des rosacées (**Yüksel et al., 2013**), moyennement répandue en Afrique du Nord est plus particulièrement en Algérie.

Elle est considérée comme une plante médicinale en raison de ses diverses propriétés thérapeutiques ; antidiabétique, anticancéreuse, anti-inflammatoire...ect (**Khoubnasabhafari et Jouyban, 2011**).

Le travail que nous avons entrepris a pour objectif de réaliser un screening phytochimique ainsi que des dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés, d'extrait brut eau-méthanol (30/70 v/v), sa fraction organique acétate d'éthyle et la phase aqueuse résiduelle préparés par infusion suivie d'une macération, à partir des feuilles de *Cydonia oblonga* récoltées dans la région de Tlemcen.

L'analyse qualitative réalisée sur les trois extraits préparés à partir des feuilles des *Cydonia oblonga*, a révélé la présence de certains métabolites secondaires tels que les tanins, les flavonoïdes, les quinones libres et les terpénoïdes. En outre, elle a marqué l'absence des alcaloïdes et des anthraquinones.

A titre comparatif, nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Ashraf et al., (2016)** qui ont confirmé la présence des tanins, des flavonoïdes, des quinones libres et des terpénoïdes.

Par contre les résultats des tests phytochimiques obtenu par **Mehraz, (2017)** sur des coings macérés dans l'eau distillée ont montré la présence des alcaloïdes et des glucosides et l'absence des quinones libres et des saponines.

L'analyse quantitative des différents extraits de la partie aérienne de *Cydonia oblonga* a montré que la fraction acétate d'éthyle possède les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux, en flavonoïdes totaux et en tanins condensés avec des valeurs d'ordre de $1026,1 \pm 37,52 \mu\text{g E AG/mg E}$, de $391,06 \pm 21,4 \mu\text{g E C/mg E}$ et de $300,8 \pm 28,6 \mu\text{g E C/mg E}$ respectivement.

Une recherche sur le dosage des polyphénols totaux menée par **Hamauzu et al., 2005** sur l'extrait eau-acétone des fruits du cognassier, a noté une teneur plus importante en polyphénols totaux d'ordre de $302,7 \text{ mg E AG/100g E}$.

De plus, les résultats du dosage obtenu par **Mir et al., 2016** sur l'extrait hydrométhanolique des fruits de la même plante, récoltée durant le mois de juin, constatent que le taux des polyphénols totaux est d'ordre de 67,44 mg E AG/100g E.

En ce qui concerne le dosage des flavonoïdes, sur l'extrait brut eau-méthanol des feuilles de *Cydonia oblonga*, les valeurs trouvées dans la présente étude sont loin de celles citées par **Benzarti et al., 2015** ; et qui ont enregistré un taux de 17,6 mg E Quercétine/g E.

Une étude faite par **Beddour et Belrechide (2018)** sur l'extrait eau-éthanol des coings a noté une teneur en tanins condensés d'ordre de $55,18 \pm 3.56$ mg E Cyanidine/100g E.

Dans d'autres études, les teneurs en composés phénoliques des feuilles de *Cydonia oblonga* ont été analysées par HPLC/UV ; **Oliveira et al.,(2007)** ont trouvé des teneurs en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique très élevées variant de 4,9 à 16,5g/kg de matière sèche, **Costa et al.,(2009)** ont rapporté une teneur en polyphénols totaux d'ordre de 35g/kg de la matière sèche de l'extrait méthanolique.

Les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés varient d'une plante à une autre, cela peut être dû aux différents paramètres dont la période de récolte, les facteurs climatiques, les différents modes d'extraction et le type de solvant utilisé (**Lee et al., 2003 ; El Ebrihimi et al., 2008 ; Miliuskas et al., 2014**).

L'extraction des composés phénoliques est une étape cruciale pour la valorisation de ces principes actifs. Elle dépend de la méthode et du solvant utilisé tout en préservant leurs propriétés biologiques (**Mahmoudi et al.,2013**).

Par ailleurs, le fractionnement par l'acétate d'éthyle s'est avéré meilleur d'après les résultats du dosage des composés phénoliques obtenus dans la présente étude.

Conclusion

et

Perspectives

Le monde végétal reste toujours une source importante des principes actifs dotés de nombreuses propriétés thérapeutiques.

La présente étude a pour but d'évaluer qualitativement et quantitativement des substances bioactives contenues dans l'extrait brut hydro-méthanolique, sa fraction organique acétate d'éthyle et de la phase aqueuse résiduelle, préparés par infusion suivie d'une macération des feuilles de *Cydonia oblonga*, récoltées dans la région de Tlemcen.

A la lumière des résultats obtenus, nous avons conclu que :

- L'extrait brut a présenté le meilleur rendement d'extraction d'ordre de 14,16%, tandis que l'extrait organique acétate d'éthyle a présenté le plus faible rendement (2,14%).
- Du point de vue phytochimique, les feuilles de *Cydonia oblonga* sont riches en tanins, flavonoïdes, quinones et en terpénoïdes.
- La fraction organique acétate d'éthyle possède les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux $1026,1 \pm 37,52 \mu\text{g E AG/mg E}$, en flavonoïdes totaux $391,06 \pm 21,4 \mu\text{g EC/mg E}$ et en tanins condensés $300,8 \pm 28,6 \mu\text{g E C/mg E}$.

En perspective, ces résultats restent préliminaires. Il est souhaitable de compléter cette étude par d'autres travaux :

- Réaliser une étude phytochimique plus approfondie pour l'identification et la caractérisation des composés actifs.
- Evaluer la toxicité des extraits.
- Rechercher des activités biologiques des extraits préparés de cette plante.
- Etudier la pharmacocinétique des principes actifs pour la détermination des doses thérapeutiques.

Références

Bibliographiques

Abbou F., 2016 : Etude phytochimique, évaluation de l'activité antiradicalaire et recherche d'effet hémolytique d'extraits isolés de la partie aérienne d'*Ajuga Iva L.* Schreb. (Chendgoura). Mémoire de Master en Biochimie appliquée. Département de Biologie. Université de Tlemcen (Algérie).

Achat S., 2014: Polyphénols de l'alimentation: extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. Thèse de Doctorat en Technologie Alimentaire. Science alimentaire. Université d'Avignon et des pays de Vaucluse : 211p.

Aguillar M., 2007: H2- Erythrocytes-MB7: Hématologie H2- Faculté de Médecine Montpellier-Nimes.

Al-snafi A.E., 2016: The medical importance of *Cydonia oblonga*. A review. IOSR Journal of Pharmacy: 6: 87-99.

Amrane H., Babahani M., 2017: Recherche des extraits végétaux à activités anti hémolytique. Mémoire de Master en Biochimie appliquée. Département de Biologie physico-chimie. Faculté SNV. Université Bejaia (Algérie).

Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., Masella R., 2007: Polyphenols, dietary sources and bioavailability. Instituto Superior di Sanita. Rome, Italy; 43: 348-361.

Ashraf M.U., Gulzar M., Hussain M.A., Bukhar N.A., 2016: *Cydonia oblonga* M., A medicinal plant rich in phytonutrients for pharmaceuticals. A review. Frontier in Pharmacology ; 7: 163-180.

Beddour L., Belrechid F., 2018 : Elaboration d'un yaourt brassé au coing. Mémoire de Master en Production et transformation laitières. Département des Sciences alimentaire. Université de Bejaia (Algérie).

Bennick A., 2002: Interaction of plant polyphenol with salivary proyeins. Crit. Rev. Oral Bio. Med; 13(2): 184-196.

Benzie IFF., Watchel-Galor S., 2011: Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press.

Bruneton J., 2008 : Pharmacognoise : phytochimie, plante médicinale. 3^{ème} Ed Paris. Lavoisier Tech et Doc.

Chabane S., 2016: Etude phytochimique et recherché d'effet hémolytique des extraits isolés de la partie aérienne d'*Artemisia absinthium L* (Chiba). Mémoire de Master en Biochimie appliquée. Département de Biologie. Faculté SNV. Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen (Algérie).

- Chevallier., 2011** : Encyclopédie des plantes médicinales. Edit. Larousse. Paris; 16; 293-295.
- Costa R.M., Magalhaes A.S., Pereira J.A., Andrade P.B., Valentao P., Carvalho M., Silva B.M., 2009**: Evaluation of free radical-scavenging and anti-hemolytic activities of Quince (*Cydonia oblonga*) leaf: a comparative study with green tea (*Camellia sinensis*). Food Chem. Toxicol; 47: 860-865.
- Curini M., Cravotto G., Epifano F., Giannone G., 2006**: Chemistry and biological activity of natural and synthetic prenyloxy coumarins. Curr. Med. Chem; 13(2): 199-222.
- Daleke D.L., 2008**: Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. Curr. Opin. Hematol; 15(3): 191-195.
- Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.J., 1963**: The preparation and chemical characteristics of haemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. Archives of biochemistry and biophysics: 100; 119-130.
- Donald P., 2000**: Medicinal plants and phyto-medicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. Briskin. American Society of Plant Physiologists ; 124 : 507-514.
- Elalaoui R. ; 2015** : Contribution à la recherche d'effet hémolytique à partir d'extraits de *Berberis vulgaris* L. Mémoire de master en Biochimie appliquée. Département de Biologie. Faculté SNV-STU. Université Tlemcen (Algérie).
- Elgsaeter A., Stokke B.T., Mikkelsen A., Branton D., 1986**: The molecular basis of erythrocyte shape. Science; 234(4781): 1217-1223.
- Erdman J., Balentine J.D., Arab L., Dwyer J.T., Folts J., Harnly., Hollman J.P., Keen L.C., Maaza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., Williamson G., Burrowes J., 2007**: Flavonoids and heart health: Proceeding of the ILSI North American flavonoids workshop, Washington. Journal of Nutrition ; 137: 718-737.
- Evreinoff V., 1960**: Contribution à l'étude du Cognassier. Journal d'agriculture tropicale et de botanique appliquée ; 7 : 269-298.
- Fattouch S., Caboni P., Coroneo V., Tuberoso C.I., Angioni A., Dessi S., et al., 2007**: Antimicrobial activity of Tunisian Quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenolic extracts. J.Agric. Food Chem ; 55: 963-969.
- Gaucher C., 2007**: Relation cellules endothéliales/ substituts sanguins: Implication des contraintes de cisaillement ou de l'hypoxie, et évaluation de la cytotoxicité d'hémoglobine de nouvelle génération. Thèse de Doctorat en Bioingénierie. Ecole doctorale Biologie-Santé-Environnement. Université Henri Poincaré –Nancy I-.

- Giada R., 2013:** Food phenolic compound: main classes, sources and their antioxidants power; 93-95.
- Gupta A. P., Pandotra P., Kushwaha M., Khan S., Sharma R., Gupta S., 2015:** Alkaloids: A source of Anticancer Agents from Narure; 341-431.
- Haddouchi F., Chaouche T., Halla N., 2016:** Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. *Phytothérapie* ; 1-9.
- Hamauzu Y., Yasui H., Inno T., Kume C., Omanyuda M., 2005:** Phenolic profile, antioxidant property, and anti-influenza viral activity of Chinese Quince (*Pseudocydonia sinensis* Schneid), Quince (*Cydonia oblonga* Mill), and Apple (*Malus domestica* Mill) Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 53: 928-934.
- Harbone J.B., 1998:** *Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis.* 3ème Ed. Chapman and hill; 303.
- Khoubnasabjafari M., Jouyban A., 2011:** A review of phytochemistry and bioactivity of Quince (*Cydonia oblonga* Mill). *J.Med. Plant Res* ; 5: 3577-3594.
- Krief S., 2003:** *Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observation de l'alimentation de chimpanzés (Pan troglodytes schweinfurthii) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de Doctorat ; muséum national d'histoire naturelle (France).*
- Kuypers F.A., 2008:** Red cell membrane lipids in haemoglobin pathies. *Curr. Mol. Med*; 8(7): 633-638.
- Lee S.E., Hyum J.H., Ha J.S., Kim J.H., 2003:** Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Science*; 73: 167-179.
- Macheix J., Fleuriet A., Jay-Allemand C., 2005:** *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. (PRUR presses phytochimique).*
- Magalhaes A.S., Silva B.M., Pereira J.A., Andrade P.B., Valentao P., Carvalho M., 2009:** Protective effect of Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit against oxidative haemolysis of human erythrocytes. *Food Chem. Toxicol* ; 47: 1372-1377.
- Mahmoudi S., Khali M., Mahmoudi N., 2013 :** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L). *Revue « Nature et Technologies ». B-Science Agronomiques et Biologiques*; 35-40.

- Marwat S.K., Khan M.A., Ahmad M., Zafar M., Fazal-ur-rehman., Sultana S., 2009:** Fruit plant species mentioned in the Holy Quran and A hadith and their ethno medicinal importance. *Am.Eurasian. J.Agric* ; 5: 284-295.
- Medkour T., 2008 :** Modélisation Mathématique et Stimulation Numérique de la Polymérisation de l'Hémoglobine Drépanocytaire. Thèse de Doctorat en Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire. Université de ParisXII.
- Mehraz R., 2017:** Evaluation des activités biologiques des extraits du fruit du Cognassier. Mémoire de Master en Microbiologie appliquée. Département de Biochimie Microbiologie. Université de Tizi-Ouzou (Alagérie).
- Mezzour H., Belhaj Khelifa A., Neffati F., Douk W., Ben Amor A., Najjar M.F., 2005:** Détermination de l'hémoglobine plasmatique et évaluation spectrophotométrique de l'hémolyse en biochimie clinique. *Revue Francophone des Laboratoires*; 59-64.
- Middleton E., Kandaswami C., Oharides T.C., 2000:** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev*; 52: 673-751.
- Miliauskas G., Venskutonis P.R., Van Beek T.A., 2004:** Screening of radical scavenging activity of some medicinal plants and aromatic plant extract. *Food Chem*; 85: 231-237.
- Mir S., Wani S., Wani T., Ahmad M., Gani A., Massodi F., Nazir A., 2016:** Comparative evaluation of the proximate composition and antioxidant properties of processed products of quince (*Cydonia oblonga* Miller). *International Food Research Journal*; 23: 816-821.
- Nickavar B., Alinaghi A., Kamalinejad M., 2008:** Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* species. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*; 7(3): 203-209.
- Nosto A., Gernamo M., Angelo V., Marino A., Canamelle M., 2000:** Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lettres en microbiologie appliquée* ; 30(5): 379.
- Odil M., 2004:** Biosynthèse des isopenoïdes: Synthèse d'analogues du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate, inhibiteurs potentiels de la voie du méthylerythriol phosphate. Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur ; 17-22.
- Oliveira A.P., Pereira J.A., Andrade P.B., Seabra R.M., Silva B.M., 2007:** Phenolic profile of *Cydonia oblonga* Miller leaves. *J.Agric. Food Chem*; 55: 7926-7930.
- Orhan E., Nardemir G., Agar G., Ercisli S., 2014:** Genetic variation among quince (*Cydonia oblonga* Mill) genotypes sampled from the Coruh valley in Turkey. *Genet Mol Res* ; 13(2): 445-900.

- Peronny S., 2005:** La perception gustative et la consommation des tanins chez le MAKI (*Lemur catta*). Thèse de Doctorat de Muséum national d'histoire naturelle. Discipline Eco-Ethologie ; 151.
- Postman J., 2009:** *Cydonia oblonga*: The unappreciated quince. *Arnoldia*; 67: 2-9.
- Quideau S., Deffieux D., Douat-Casassus C., Pouységu L., 2011:** Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie. International Edition*; 50(3): 586-621.
- Rajnarayana K.M., Sripalreddy M.R., Chaluvadi D.R., Krishna J., 2001:** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian of pharmacology* ; 33: 2-16.
- Rakotonanahary M., 2012:** *Peumus blodus* M: de la botanique à la thérapeutique: état de connaissances en 2012. Thèse de Doctorat en Pharmacie : Diplôme d'état. Université Joseph Fourier ; 16, 19, 27, 28.
- Ramachandra Rao S., Ravishankar G.A., 2002:** Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*; 20: 101-153.
- Rother R.P., Bell L., Hillmen P., Gladwin M.T., 2005:** The clinical sequelae of intravascular haemolysis and extracellular plasma haemoglobin: a novel mechanism of human disease. *Jama*; 293: 1653-1662.
- Saad B., Azaizeh H., Abu-hijele G., Said O., 2006:** Safety of traditional Arab Herbal medicine. Evidence- Based Complement. *Alternated.Med*; 3(4): 433-439.
- Silva B.M., Andrade P.B., Mendes G.C., Seabra R.M., Ferreira M.A., 2002:** Phenolic profile of quince fruit (*Cydonia oblonga* Miller) Pul and Peel. *J.Agric. Food Chem*; 50: 4615-4618.
- Singh B., Sharma R., 2014:** Plant terpenes, defence responses, polygenetic analysis, regulation and clinical application. A review. *Biotech*; 5: 129-151.
- Tabuti J.R.S., Lye K.A., Dhillon S.S., 2003:** Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, used and administration. *J.Ethnopharmacol*; 88: 19-44.
- Yuksel C., Mutaf F., Demirtas I., Ozturk G., Pektas M., Ergul A., 2013:** Characterization of Anatolian traditional quince cultivars, based on microsatellite markers. *Genet Mol Res*; 12(4): 5880-8000.
- Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W., 1999:** The determination of flavonoids contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*; 64: 555-559.