



Faculté : Sciences exactes et sciences de la nature et de la vie

Département : Biologie appliquée

Spécialité : Biologie moléculaire et cellulaire

Mémoire

De fin d'études en vue d'obtention du diplôme de

MASTER

Etude de la composition chimique et de l'activité
biologique de l'extrait éthanolique de *Ilex*
aquifolium L

Présenter par :

-Tounsi Saadane - Kaibi Charaf eddine - Siouan yasser

Devant le jury :

Mme. BOUCHIHA Hanane	MCA	Université de Tébessa	Présidente
M. GASMI Salim	MCB	Université de Tébessa	Examineur
Mme. BOUSSEKINE Samira	Pr	Université de Tébessa	Encadreur

Résumé

La présente recherche sert à étudier la composition chimique et de l'activité biologique de l'extrait éthanolique des feuilles de la plante *Ilex aquifolium* L. L'extrait éthanolique des feuilles de la plante est obtenu par macération à l'éthanol du broyat des feuilles bien séchées.

Le rendement d'extraction est équivalent à 12,77 %. L'analyse phytochimique qualitative montre la présence de plusieurs composants (flavonoïdes, polyphénols, alcaloïdes, saponosides, stérols, triterpènes, oses, holosides, terpénoïdes, tanins et autres) avec l'absence des composés réducteurs. Une chromatographie sur couche mince (CCM) révèle la présence de plusieurs familles des composants phénoliques.

L'étude quantitative de l'extrait comporte le dosage des polyphénols par la méthode de Folin Ciocalteu qui donne 106.8 mg Acide Gallique /g d'extrait, et des flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium qui révèle une concentration de 50.63 mg Quercétine /g d'extrait.

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante nous avons utilisé la technique de Piégeage du Radical Libre DPPH, qui montre une concentration inhibitrice de 50% des radicaux libres (IC_{50}) équivalente à 0.73mg d'extrait avec un pouvoir anti radicalaire (ARP) de 1.36 ce qui montre une capacité antioxydante relativement élevée.

D'après cette étude on conclue que les feuilles de la plante sont riches en composants phénoliques, qui sont à l'origine d'une activité antioxydante élevée et ce qui permet leur utilisation pour la prévention de plusieurs maladies.

Mot clé : *Ilex aquifolium* L, Etude phytochimique, activité antioxydante, CCM, plante médicinale.

Abstract

This study aims to investigate the phytochemical composition and biological activity of *Ilex aquifolium* L leaves ethanolic extract. The ethanolic extract was obtained by maceration of well-dried powdered leaves in ethanol solvent.

The extraction yield is about 12.77%. The phytochemical study showed the presence of various components (flavonoids, polyphenols, alkaloids, saponosides, sterols, triterpenes, oses, holosides, terpenoids, tannins and others) with the absence of reducing compounds. Thin layer chromatography (TLC) reveals the presence of several families of phenolic components.

The Determination of Total Phenolic compounds was investigated by Folin-Ciocalteu method. The results revealed the presence of 106.8 mg Gallic acid / g leaves extract. Moreover, flavonoids content were determined using aluminum trichloride method, which reveals a concentration of 50.63 mg Quercetin / g leaves extract.

The antioxidant activity was determined using DPPH method (Free Radical Scavenging technique). The results showed a significant antioxidant activity with an IC_{50} equal to 0.73mg and an anti-radical power (ARP) equal to 1.36.

Key words: *Ilex aquifolium* L, Phytochemical study, antioxidant activity, TLC , medicinal plant.

المخلص

تهدف الدراسة المقدمة إلى تحديد المركبات الكيميائية وتقييم النشاط البيولوجي للمستخلص الإيثانولي لأوراق نبات *Ilex aquifolium* L. وقد تم الحصول على المستخلص الإيثانولي لأوراق النبات عن طريق نقع الأوراق المجففة بعد المسحوقه جيداً.

معدل الاستخلاص كان بنسبة 12.77%. وأظهرت الدراسة الكشفية النوعية للمكونات وجود عدة منها (الفلافونويد ، بوليفينول ، القلوبات ، سابونوسيدات ، ستيروول ، ترايثيربين ، أوز ، هولوسيدات ، تربينويد ، تانين وغيرها) مع عدم وجود مركبات مرجعة ، اما الكشف الكروماتوغرافي على طبقة رقيقة (TLC) فأسفر عن وجود العديد من المكونات التي تنتمي لعائلة المكونات الفينولية.

تتضمن الدراسة الكمية للمستخلص تحديد كمية متعددات الفينول بطريقة Folin Ciocalteu والتي تعطي 106.8 مجم حمض جاليك / جم من المستخلص، بينما الفلافونويد بواسطة ثلاثي كلوريد الألومنيوم الذي يكشف عن تركيز 50.63 مجم كيرسيتين / جم من المستخلص.

لتقييم النشاط المضاد للأكسدة، استخدمنا تقنية تثبيط الجذر الحر DPPH، والتي تظهر تركيز مثبط بنسبة 50% من الجذور الحرة (IC_{50}) يعادل 0.73 ملجم من المستخلص، بطريقة أخرى، القوة المضادة للجذور (ARP) تبلغ 1.36 مما يدل على قدرة عالية نسبياً من مضادات الأكسدة.

الكلمات المفتاحية:

النشاط مضاد الاكسدة، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، تحديد المكونات الكيميائية، النباتات الطبية،

Ilex aquifolium

REMERCIEMENT

Tout d'abord, nous remercions Dieu Tout-Puissant, qui nous a accordé le succès, l'énergie, la fermeté, la volonté, la détermination, l'aide, la force, le courage et la patience afin facilité nos démarches pour pouvoir mener à bien ce travail modéré.

*Nous exprimons nos sincères remerciements et notre gratitude et appréciation à notre promotrice, le **professeur Boussekine Samira**, pour son accueil sa confiance et sa supervision ce travail.*

*Les membres du jury d'avoir accepté de juger et faire la lumière sur ce travail, **M. GASMI SALIM** comme un examinateur et **Mme BOUCHIHA HANANE** le président du jury.*

*Nous remercions et apprécions **Dr Karim Benkhdir** pour son aide et l'effort qu'il a fourni pour nous guider nous orienter, c'est vraiment énorme de son part.*

***Dr Okba louafi** pour son soutien ces explications et ces références fournit.*

Nous remercions tous les enseignants et techniciens du laboratoire, du Département de Biologie Appliquée, et notre sincère gratitude à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail, qu'elles soient de près ou de loin.

Dédicaces

Je Dédie Cette Réalisation Perpétuer A La Mémoire Du Défunt De Mon Grand-Père "Que Dieu Lui Fasse Miséricorde". Le Seul Havre De Paix Avec Lequel j'étais A l'aise, j'aimerais Qu'il Soit Présent Ici, Mais Le Dieu A Prédéterminé Et Il A Fait Ce Qu'il Voulait.

A Mes Parents Qui m'ont Consacré Leur Vie, Que Dieu Prolonge Votre Vie, En Particulier Ma Chère Mère, Source De Tendresse Et Source d'existence Et De Joie La Bougie Qui A Illuminé Ma Vie, Et A Mon Père, Source De Fierté, Mon Unique Soutien, La Boussole Qui M'a Guidé, Qui A Beaucoup Sacrifié Pour Faire De Moi Ce Que Je Suis. Merci Pour Votre Patience, Votre Confiance Et Votre Soutien Tout Au Long De Ma Carrière d'étudiant. En Gage De Mon Amour Et De Mon Respect, Pour Tous Ceux Qui Me Sont Chers.

Charaf

Pour moi les mots sont insuffisants pour que je m'exprime...

Je Dédie Cette expérience à celle qui a été le raison que je me trouve à L'université de Tébessa, elle ma donner le courage pour inscrire après une rupture de 6 ans. À ma femme HANANE BEKKEI.

A mes parents AHMED et NOURA, frères et sœurs qui me soutien toujours même à mon âge adulte.

A zinou (Saadi Mohammed El Zine) et YACINE AZZOUZE des vrais amis et collègues.

Saadane

Je Dédie Cette expérience à mes parents, mes frères et sœurs, à mes amis et tous ce qui m'aider de près ou de loin

Yasser

Table des matières

Résumé	
Abstract	
المخلص	
Liste des figures	i
Liste des tableaux	ii
Liste des abréviations	iii
Introduction	01
Partie I. Synthèse Bibliographique	
Chapitre I : plantes médicinales	
1. Définition d'une plante médicinale	02
2. Phytothérapie	02
3. Métabolites secondaires	02
3.1 Composés phénoliques	02
3.1.1 Polyphénols	03
3.1.2 Flavonoïdes	03
3.1.3 Tanins	04
Chapitre II : Plante Ilex aquifolium L	
1. Généralité	05
2. Origine et distribution des plantes	06
3. Place dans la systématique	08
4. Description Botanique de la plante	08
5. Composition Chimiques	10
6. l'Utilisation traditionnel des feuilles d'I. aquifolium L	10
7. Etudes précédant à propos de la plante I. aquifolium L	11
7.1 Etude de l'activité antimicrobienne de l'extrait de la plantes I. Aquifolium	11
7.2 Etude de l'activité antioxydante de l'extrait des grains de la plante I. aquifolium	12

Partie II. Etude Expérimentale

Chapitre I : Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal	13
2. Méthodes d'étude	14
3. Etude Phytochimique des Extraits	14
3.1. Analyse Qualitative des Extraits	14
3.1.1. Alcaloïdes	14
3.1.2. Tanin	15
3.1.3. Flavonoïdes	15
3.1.4. Saponosides	15
3.1.5. Stéroïls et triterpènes	15
3.1.6. Composés réducteurs	15
3.1.7. Les coumarines	15
3.1.8. Oses et holosides	16
3.1.9. Mucilages	16
3.1.10. Terpénoïdes	16
3.2. Analyse Quantitative des Composants de l'extrait	16
3.2.1. Dosage des polyphénols	16
3.2.2. Dosage des flavonoïdes	17
3.2.3. Evaluation de l'activité anti-oxydante "Piégeage du radical libre DPPH"	17
3.2.4. Séparation et identification par chromatographie sur couche mince (C.C.M)	18
3.2.5 . Etude statistique	19

Chapitre II : Résultats

1. Détermination du Rendement de La Plante	20
2. Etude Phytochimique des Extraits	21
2.1. Analyse Qualitative	21
2.2. Analyse Quantitative	21

2.2.1. Dosage des polyphénols	21
2.2.2. Dosage des flavonoïdes	21
3. Evaluation de L'activité Antioxydante “Piégeage du Radical Libre DPPH”	22
4. Chromatographie Sur Couche Mince	24
Chapitre III : Discussion	
• Rendement de l'extrait	26
• Etude Phytochimique de l'extrait	26
• Analyse Quantitative	26
• Dosage des Polyphénols	
• Dosage des flavonoïdes	26
• Evaluation de L'activité antioxydante “Piégeage du Radical Libre DPPH”	27
• Essais de caractérisation par chromatographie sur couche mince (CCM)	28
Conclusion & Perspectives	29
Références Bibliographiques	30
Annexes	34

Liste des figures

N° de figure	Titres des figures	Page
Figure 1	Formule chimique brute d'une fonction phénol (C ₆ H ₅ OH)	03
Figure 2	Structure de base des flavonoïdes	04
Figure 3	La distribution d'ilex aquifolium L'espèce en Europe et Afrique du nord	07
Figure 4	Fleurs mâles d'ilex aquifolium L	09
Figure 5	Aspects morphologiques d'Ilex aquifolium L	09
Figure 6	Photo prise à l'endroit de récolte	13
Figure 7	L'évaporateur rotatif	14
Figure 8	Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH	18
Figure 9	Représentation graphique du rendement des feuilles d'Ilex aquifolium L après l'extraction éthanoïque	20
Figure 10	Représentation graphique de l'effet anti radicalaire avec IC ₅₀ d'Ilex aquifolium L sur le radical DPPH°	23
Figure 11	Représentation de la migration sous une lampe UV	25

Liste des tableaux

N° du tableau	Titre du Tableau	pages
Tableau 1	Classification botanique d'Ilex aquifolium	08
Tableau 2	Activité antioxydante de l'extrait des grains de la plante I. aquifolium L	12
Tableau 3	Le rendement d'extrait éthanolique d'Ilex aquifolium L	20
Tableau 4	Test préliminaires de présences des substances chimiques (Screening Chimique)	21
Tableau 5	Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans l'extrait éthanolique des feuilles d'Ilex aquifolium L	22
Tableau 6	L'activité antioxydant et le coefficient de détermination et pouvoir anti radicalaire de la plante I. aquifolium L	23
Tableau 7	Les différentes classes des composés contenus dans les extraits système 1	24
Tableau 8	Les différentes classes des composés contenus dans les extraits système 2	24

Liste des abréviations

ARP : Pouvoir anti radicalaire.

CMI : Concentration minimal inhibitrice

CCM : Chromatographie sur couche mince

DPPH : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl

EC50 : Concentration effective à 50%

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%

Mg EAG/g d'extrait : Milligramme d'équivalent acide gallique par gramme d'extrait

Mg EQ/g d'extrait : Milligramme d'équivalent quercétine par gramme d'extrait

RF : Rapport frontal

UV : Ultraviolet

Introduction

Introduction

La science est une entité unie, une seule source de la connaissance avec beaucoup des filières dans tous les domaines dont les nouvelles découvertes en sciences biologiques ont la même valeur et crédibilité en sciences chimiques et médicales en simultanéité l'un support et confirme les résultats de l'autre.

Le recours aux plantes médicinales dans la vie quotidienne était indispensable, infiniment précieux. C'est pour cela au tant que des biologistes il est porté à notre responsabilité de vérifier les plantes médicinales, leurs compositions en métabolites secondaires, activités biologiques, toxicité.

L'étude de l'activité biologique des plantes médicinales est une nécessité scientifique afin de déterminer les propriétés thérapeutiques de ces plantes. Car le but principal de l'étude des activités biologiques est de trouver des sources médicamenteuses à base de plantes qui sont efficaces à faibles doses et coût diminué pour remplacer les médicaments chimiquement synthétisés.

L'étude de l'activité biologique comporte aussi une étude phytochimique des composants principaux et des métabolites secondaires présence des substances et dosage de ces derniers.

Pour cela notre thème intitulée « Etude de la composition chimique et de l'activité biologique de l'extrait éthanolé de la plante *Ilex aquifolium* L » prend place.

Partie I:
Synthèse bibliographique

Chapitre I :
Plante Médicinale

1. Définition d'une plante médicinale :

Une plante médicinale est définie par la pharmacopée française comme une « drogue végétale au sens de la pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses ». Une « drogue végétale » est une plante ou une partie de plante, utilisées en l'état, soit le plus souvent sous la forme desséchée, soit à l'état frais. L'expression drogue végétale ou, plus couramment, drogue, désigne donc une matière première naturelle servant à la fabrication des médicaments. **(Mohamdi Z., 2013)**

Une « plante médicinale » est une entité végétale qu'il faut regarder comme un « être » particulier, adapté à son biotope, avec son port, ses couleurs, sa saveur, et son pouvoir d'agir sur la santé. **(Coqueret D., 2017)**

2. Phytothérapie :

La Phytothérapie est une médecine qui utilise des plantes - ou la seule "partie active" de ces plantes - ayant des propriétés thérapeutiques. Ces plantes sont appelées "plantes médicinales". Les préparations peuvent être obtenues par macération, infusion, décoction, ou sous forme de teinture, poudre totale, extraits, etc. Les plantes médicinales peuvent être des espèces cultivées mais dans la plupart des cas des espèces sauvages. **(Mohamdi Z., 2013)**

3. Métabolites secondaires :

Ces plantes médicinales contiennent un grand nombre de métabolites qui ont des intérêts multiples mis à profit en pharmacologie, dans l'industrie alimentaire et en cosmétologie. Parmi ces principes actifs, on retrouve les composés phénoliques, les coumarines, les alcaloïdes, les saponosides, les mucilages, les composés volatils, les stéroïdes et les terpènes. **(Koudoro et al., 2018)**

3.1. Composés phénoliques :

Les composés phénoliques représentent un terme générique qui désigne un ensemble vaste de substances aromatiques appartenant aux groupes des métabolites secondaires, souvent considérées comme métaboliquement inactives. Sur le plan structural, les composés phénoliques se caractérisent par la présence d'au moins un noyau aromatique à 6 atomes de carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de

substituants hydroxyles (**figure 01**). A l'heure actuelle, plus de 8000 composés répondant à ces critères ont été isolés et identifiés. (**Hassaine A., 2020**)

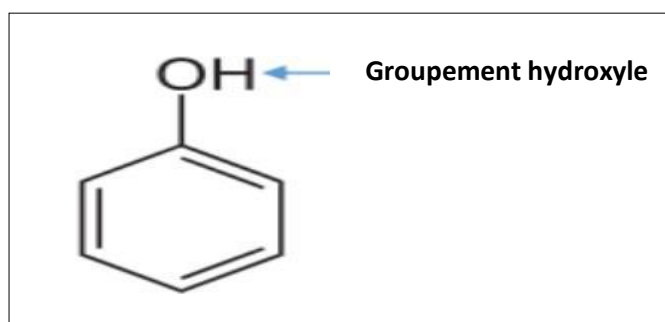


Figure 1 : Formule chimique brute d'une fonction phénol (C_6H_5OH). (**Hassaine A., 2020**)

3.1.1. Polyphénols :

Les polyphénols sont des phytomicro-nutriments synthétisés par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales. (**Gee et Johnson., 2001**)

Les polyphénols, qui forment une immense famille de plus de 8000 composés naturels, sont divisés en plusieurs catégories : les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols ; les tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes ; les acides phénoliques, les coumarines, les lignanes et d'autres classes existent en nombres considérables. (**Gee et Johnson., 2001**)

3.1.2. Flavonoïdes :

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux. Les flavonoïdes sont rencontrés dans les fruits (notamment du genre Citrus où ils représentent jusqu'à 1 % des fruits frais) et les légumes. Des boissons telles que le vin rouge, le thé, le café et la bière en contiennent également des quantités importantes. Les flavonoïdes sont retrouvés également dans plusieurs plantes médicinales. Des remèdes à base de plantes renfermant des flavonoïdes ont été (et sont) utilisés en médecine traditionnelle de par le monde. Les travaux relatifs aux flavonoïdes se sont multipliés depuis la découverte du « French paradox », correspondant à un bas taux de

mortalité cardiovasculaire observé chez des populations méditerranéennes associant une consommation de vin rouge à une prise importante des graisses saturées. (K. Ghedira., 2005)

Les flavonoïdes représentent la classe des pigments la plus répandue dans le monde végétal après la chlorophylle et les caroténoïdes. Ils sont impliqués dans l'action protectrice contre les effets nocifs de la lumière UV. De plus ils sont connus pour participer au processus de pollinisation ainsi qu'à la croissance des végétaux. (Stalikas, C.D., 2007)

Autrement dite sont des composés naturels polyphénoliques ayant en commun la structure du diphenyl propane (C6-C3-C6). Ou les deux noyaux benzéniques sont liés par un pont de 3 carbones.

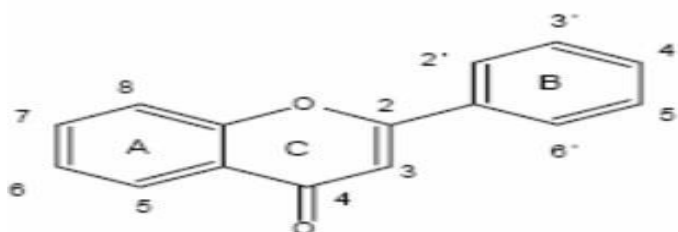


Figure 2 : Structure de base des flavonoïdes (Hassaine A., 2020).

3.1.3. Tanins :

Les tanins sont des composés phénoliques d'un poids moléculaire compris entre 500 et 20000 Da; ils doivent leur nom à leur capacité à précipiter les protéines. Ils sont largement présents dans les diverses espèces botaniques, notamment chez les végétaux supérieurs. (Messaoudan ., 2019)

Dans la grande diversité des tanins végétaux, deux groupes se distinguent.

Les tanins hydrolysables : Ce sont des polyesters de glucides et d'acides phénols, ils sont facilement hydrolysables par les acides et les enzymes en oses (généralement le glucose) et en acides phénols. Selon la nature de l'acide phénol on distingue :

- Tanins galliques ou gallo-tanins. Ils libèrent par hydrolyse l'acide gallique et leurs dérivés galloylés.
- Tanins ellagiques ou ellagi-tanins. Ils libèrent par hydrolyse le sucre accompagné de l'acide gallique, les acides ellagique, hexahydroxydiphénique, valonique etc.

Les tanins condensés : Les tanins condensés sont des composés non hydrolysables ayant un poids moléculaire plus élevé, issus de la polymérisation d'unités flavan-3-ols en dimères, oligomères (2-10 monomères) et polymères (>10 monomères), qui sont hydroxylés en position 3. Cette condensation leur confère une structure voisine à celle des flavonoïdes (**Figure 2**). La variation structurelle des tanins condensés est due aux différentes unités, aux positions, orientations et types des liaisons inter-flavonoïdes. Les unités flavan-3-ols les plus courantes trouvées dans les tanins condensés comprennent la catéchine, l'epicatéchine, la gallocatéchine et l'épigallocatéchine (**Figure 2**). (**Naumann et al., 2017**)

Les phlorotanins C'est un groupe de tanins récemment isolé chez différents types d'algues. (**Messaoudan ., 2019**)

Chapitre II :
Plante Ilex Aquifolium

1. Généralité

Ilex aquifolium L (Aquifoliaceae), le houx européen, ou bien Le houx anglais était un favori pour une utilisation lors de festivals à Roman une fois. Les premiers Grecs l'appelaient Holly Agria, ce qui signifie sauvage houx ou houx des champs. Les Romains ont inventé le mot Agri - folium puis aquifolium d'acutum, signifiant pointu, et folium, une feuille, d'où le nom spécifique. Il est un arbuste ou un petit arbre au feuillage persistant, Ses feuilles vert foncé brillantes servent d'ornement pour Noël. Fleurs petites et blanches ou roses et odorantes apparaissent entre avril et juillet. Bien connu pour ses baies rouges qui sont les symboles de l'hiver d'environ 8 mm de diamètre, qui poussent pendant la période août-décembre. Il présente des fruits dangereux provoquant des troubles digestifs et nerveux.

Dans la médecine populaire, les feuilles d'*I. aquifolium L* ont été utilisées pour leurs propriétés thérapeutiques Ils sont considérés comme antipyrétiques, astringents et diurétiques, Ils étaient également utilisés pour traiter les fièvres intermittentes, les rhumatismes et le bronchite ou comme agents expectorants. **(Alikaridis., 1987)**

Autrement, les feuilles et les fruits d'*I. aquifolium L* ont également été utilisés pour traiter les cancers du foie, de l'estomac et des intestins que la jaunisse et le paludisme. **(Nahar et al., 2005)**

Divers extraits de feuilles d'*I. aquifolium L* (hexane, chloroforme, acétate d'éthyle et éthanol) ont montré des activités antibactériennes modérées. **(Erdemoglu et al., 2009)**. Cependant, *I. aquifolium L* affiche un niveau élevé de toxicité. Par exemple, on rapporte que des enfants ont été empoisonnés après avoir ingéré des fruits de houx et présentait des symptômes tels que diarrhée, vomissements et troubles gastro-intestinaux causés par un cyano-glycoside, 2-β-D-glucopyranosyloxy-p-hydroxy-6,7-dihydromandelonitrile. **(Palu et al., 2019)**

2. Origine et distribution de la plante :

I. aquifolium L, est une espèce méditerranéenne et atlantique, surtout dans le Nord-Ouest d'Afrique, d'Asie occidentale et d'Europe. La présence de cet arbuste à l'ouest Européenne est indigène. **(Aas G., 2021)** À l'Afrique du Nord, au massif du Caucase, au Nord de l'Iran et dans certains endroits en Chine. **(F Zhang et al., 2021)**

Il est vraisemblablement arrivé aux Etats-Unis avec les premiers colons anglais. Un peu partout en France et en Europe, rarement en région méditerranéenne. Europe occidentale (Scandinavie, Grande Bretagne jusqu'au Caucase), Europe méridionale, Asie Mineure (jusqu'en Perse), Afrique du Nord et Asie septentrionale. **(Brunu A., 2011)**

Il est naturel en Australie, en Nouvelle-Zélande, en Amérique du Nord (les unités d'état) et dans le Pacifique Centre-Nord (Hawaii). Il est cultivé de la Virginie au Texas, sur la côte Pacifique et en Colombie-Britannique. On le trouve en Catalogne, dans toutes les régions, des vallées pré-côtières aux Pyrénées, à l'exception des terres de Lleida. **(González et Pallisé, 2014)**

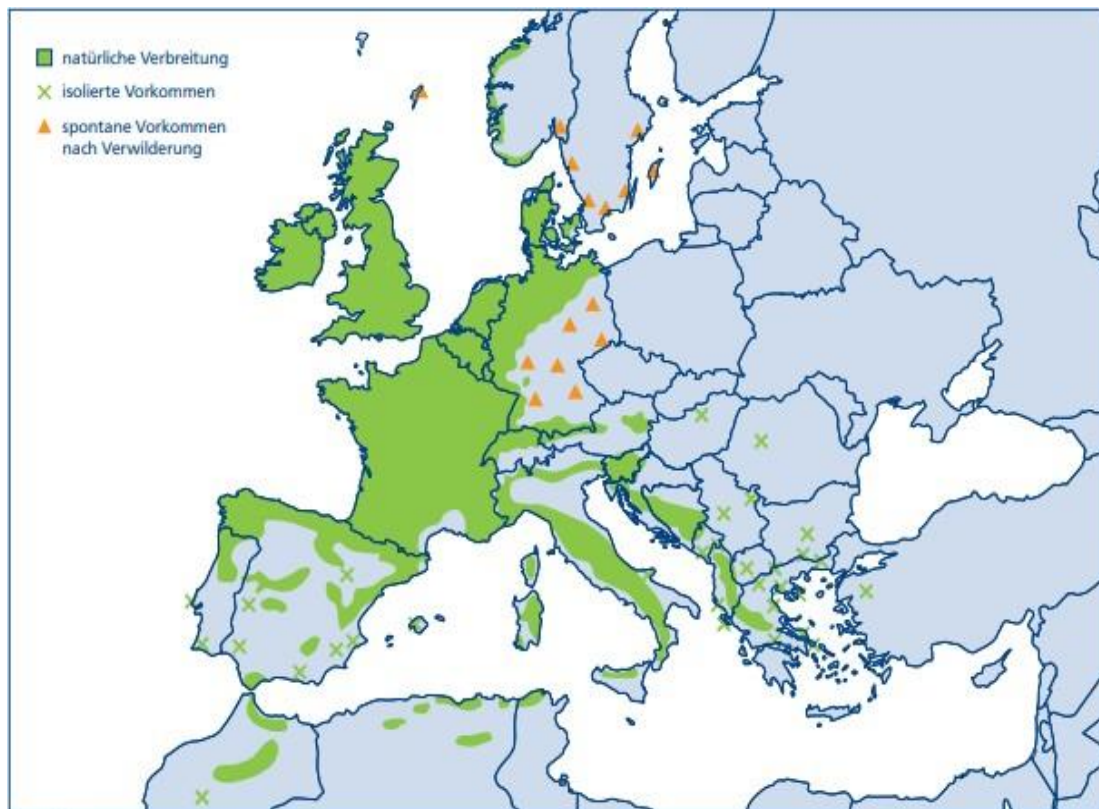


Figure 3 : La distribution d’ilex aquifolium L en Europe et Afrique du nord. **(Aas G., 2021)**

3. Place dans la systématique :

Tableau 1 : Classification botanique d'*Ilex aquifolium L.* (Ould hennia et Boubekki., 2018)

Règne	Plantes
Sous –règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous –classe	Rosidae
Ordre	Celastrales
Famille	Aquifoliaceae
Genre	<i>Ilex</i>
Espèce	<i>Ilex aquifolium</i>

4. Description Botanique de la plante

Grand arbuste ou arbre De la famille (Aquifoliacées) à feuilles persistantes atteignant 24m de haut, souvent de forme pyramidale, avec des feuilles vertes épaisses et brillantes, de petites fleurs blanches et des baies rouges. La plante est généralement à tige unique, mais peut germer dans des fourrés à plusieurs tiges. L'écorce est lisse et verte sur les jeunes branches, devenant grise avec l'âge. Les feuilles sont alternes, simples (simples) et persistantes. Les limbes des feuilles sont de forme (ovale) à presque rectangulaire, 4-8cm de long et 3-5cm pouces de large. Les bords des feuilles sont ondulés et à dents épineuses, mais les feuilles peuvent aussi être lisses. Bordé (entier) sur la même plante. Les dents épineuses sont triangulaires, grossières, raides, pointues et généralement moins de 20 par feuille adulte. Les tiges des feuilles (pétioles) sont courtes. La face supérieure de la feuille est brillante, vert foncé, épaisse et cireuse, sans

poils, et la face inférieure est vert terne sans poils. (Gray, Andrew N.,2011)

Les fleurs sont parfumées et disposées en longues grappes ramifiées où les feuilles s'attachent aux branches (aisselle), avec des fleurs mâles et femelles séparées plantes (dioïques). Les fleurs sont petites, 0.6cm pouce de diamètre, avec 4 pétales blancs fusionnés à la base, 4 sépales également soudés à la base, et 4 étamines sur les fleurs mâles



Figure 4 : Fleurs mâles d’ilex aquifolium (photo personnel)

Fruits et graines : Le fruit est rond, rouge et ressemble à une baie (drupe) avec des sépales persistants, 0.8cm de diamètre et avec 4 (2–8) graines dures à parois épaisses. (Gray, Andrew., N2011)



Figure 5 : Aspects morphologiques d’Ilex aquifolium L. (Brunu A., 2011)

C'est une plante dioïque, ce qui signifie qu'il y a des houx qui portent des fleurs femelles (n'ayant que l'ovaire, le style et le stigmate) et les houx portant des fleurs mâles (ayant uniquement les étamines et les anthères). Sur plantes femelles, à fleurs fécondées (pour avoir les plantes fructifères des deux sexes doivent être proches), les fruits naissent, qui sont des drupes globuleux, pédonculé, ombiliqué, rouge vif à bleuté (à maturité). **(Brunu A., 2011)**

5. Composition chimiques :

Plusieurs études sur la composition chimique d'*I. aquifolium L* ont rapporté la présence dans la plante d'anthocyanes, des flavonoïdes, des terpénoïdes, des stérols, d'acides aminés, d'alcaloïdes, d'acides gras, d'alcools, des glucides, des caroténoïdes, des glycosides cyanogènes, des phénols et d'acides phénoliques. **(Sun et al., 2000)**

La plupart des composés triterpénoïdes des plantes médicinales sont des glycosides de saponine avec l'attachement de diverses molécules de sucre à l'unité triterpénique. **(Lindsey et al., 2003)**

La plante contient un principe amer, l'ilicine, Alcaloïdes. **(Ould hennia et Boubekki., 2018)**, plus l'ilexanthine (colorant jaune), la théobromine (dans les feuilles) et l'acide caféique (à ne pas confondre avec le café ou la caféine). La théobromine a des effets bronchodilatateurs, elle a donc été utilisée dans le traitement de l'asthme. L'extrait éthanolique du fruit du houx contient des glycosides cyanogènes. L'analyse de l'extrait méthanolique de graines de houx a révélé deux dérivés phénylacétiques aux propriétés antioxydante, l'acide 2,4-dihydroxyphénylacétique et son ester méthylique. **(Nahar et al., 2005)**

I. aquifolium L contenait l'acide ursolique comme composant principal, qui était suivi par l'acide oléanolique et quelques composants mineurs tels que l' α -amyrine et les esters de β -amyrine et le β -sitostérol. **(Palu et al., 2019)**

6. l'Utilisation traditionnel des feuilles d'*I. aquifolium L* :

Les progrès dans l'élucidation des constituants chimiques d'ilex espèce offre un aperçu possible de la base chimique probable de l'usage traditionnels de ces plantes. Les feuilles d'*I. aquifolium L* ont été traditionnellement utilisées comme :

Diaphorétiques, expectorantes, fébrifuges et toniques, elles sont considérées comme sudorifiques, elles ont donc été utilisées contre les rhumes catarrhaux, la pleurésie, la fièvre intermittente, la variole, les rhumatismes pour leurs propriétés antipyrétiques, ainsi qu'un astringent, et un diurétique, **Waud (1931,1932)** a rapporté qu'une poudre séchée émulsion issue des feuilles et des baies de *I. aquifolium L* et *I. opaca* à l'action pharmacologique de la digitaline. Selon des auteurs, l'explication pouvait être trouvée dans la mesure où les vitamines adéquates étaient tirées du maté, qui était utilisé comme boisson. (**Alikaridis F., 1987**)

7. Etudes précédants à propos de cette plante :

Parmi les études précédentes effectuées à propos de plant *Ilex aquifolium L*. On peut citer ces deux études :

7.1. Etude de l'activité antimicrobienne de l'extrait de la plantes *Ilex aquifolium L* :

Cette étude est réaliser par (**Erdemoglu et al., 2009**) démontre que l'extrait de la plante *I. aquifolium* a un pouvoir antimicrobienne modéré, les méthodes et résultats sont comme suite :

Une extraction par L'éthanol, l'acétate d'éthyle, le chloroforme et le n-hexane ont était préparés à partir des feuilles d'*I. aquifolium L*, ils ont été testés contre (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium* et *Candida albicans*) pour l'évaluation antibactérienne et antifongique à l'aide de la sensibilité du bouillon de microdilution essai.

L'activité antimicrobienne des extraits bruts d'*I. aquifolium L* a été évaluée par dosage à l'Alamar bleu sur microplaque. Les résultats ont montré que les extraits testés, à l'exception du n-hexane, possédaient une activité antibactérienne et antifongique modérée variant de 62,5 à 250 µg/ml.

En revanche, l'extrait éthanoïque de feuilles présentait une valeur de concentration minimale inhibitrice (CMI) contre *Mycobacterium tuberculosis H₃₇Ra* de 200 µg/ml.

7.2 Etude de l'activité antioxydante de l'extrait des grains de la plante :

L'activité antioxydante de l'extrait des grains de la plante a été testée par (Nahar et al) en 2005 révèle un pouvoir modéré de l'extrait les méthodes et résultats sont présentés comme suit :

L'extrait au méthanol des graines d'*Ilex aquifolium L* a donné deux dérivés antioxydants de l'acide phénylacétique ; acide 2,4-dihydroxyphénylacétique (1) et acide 2,4-dihydroxyphénylacétique ester méthylique (2). Les deux dérivés sont déterminés par l'analyse HPLC et les structures ont été déterminées par des méthodes spectroscopiques, dans le test DPPH pour l'activité antioxydante, les valeurs IC₅₀ de 1 et 2 étaient de $1,50 \times 10^{-3}$ et $2,55 \times 10^{-3}$ mg/ml, respectivement, comparativement à $2,88 \times 10^{-5}$ mg/ml de quercétine, un référence antioxydant naturel.

Tableau 2 : Activité antioxydante de l'extrait des grains de la plante *I. aquifolium L*. (Nahar et al., 2004)

L'extrait	Dérivé	IC ₅₀
Méthanolique	acide 2,4-dihydroxyphénylacétique	$1,50 \times 10^{-3}$
	acide 2,4-dihydroxyphénylacétique ester méthylique	$2,55 \times 10^{-3}$
Quercétine		$2,88 \times 10^{-5}$

Partie II :
Etude Expérimentale

Chapitre I :
Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des feuilles de la plante *Ilex aquifolium* L. identifiées selon le Guide illustré de la flore algérienne 2012, récolté à Seraidi, wilaya d'Annaba à (36°55N, 7°38E) le 26/01/2022



Figure 6: Photo prise à l'endroit de récolte. (Commune de Seraidi, Annaba)

2. Préparation de l'extrait :

Après lavage des feuilles de la plante récoltée, elles ont été séchées à l'abri de la lumière du soleil puis broyées en poudre. Le broyat obtenu constitue la matière sèche qui va servir à la préparation de l'extrait éthanolique comme suit :

- 100g de poudre de la plante est Macéré dans 500ml d'éthanol pure à 96% pendant 24h. Après filtration, le filtrat est évaporé dans un rotavapor à 45°C puis lyophilisé, le lyophilisat est pesé pour calculer le rendement de l'extraction.

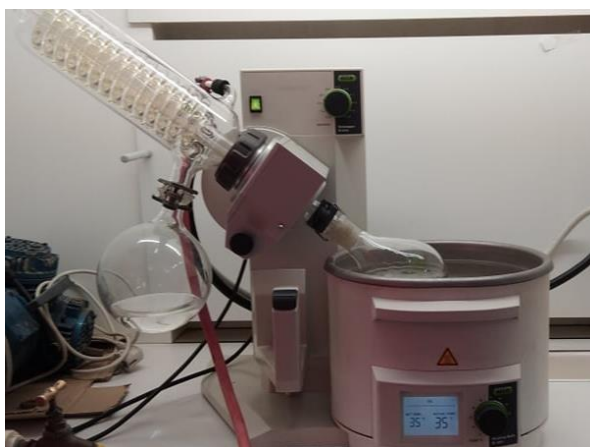


Figure 7: L'évaporateur rotatif. (Photo prise au labo 13)

Suite à cette extraction on a obtenu notre extrait éthanolique

3. Etude phytochimique des extraits

3.1 Analyse qualitative

Tests préliminaires de la composition chimique de l'extrait :

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur une solution de l'extrait éthanolique, selon les méthodes décrites par **Trease et Evans (1983)**.

3.1.1. Alcaloïdes :

Evaporer 20 ml de l'extrait méthanolique de chaque plante à sec, ajouter 5 ml d'HCl (2N) au résidu et chauffer dans un bain marie. Filtrer le mélange et réaliser les tests avec le réactif de Mayer. Introduire 1 ml de filtrat dans un tube à essais puis

ajouter 5 gouttes de réactif. La présence d'alcaloïdes est indiquée par la formation d'un précipité blanc jaunâtre.

3.1.2 Tanin :

Agiter 2 ml de la solution à tester avec 2ml eau distillée, ajouter 2 à 3 gouttes de solution de FeCl₃. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-noire ou verdâtre

3.1.3 Flavonoïdes :

Macérer 10g de la poudre sèche dans 150 ml d'HCl dilué à 1% pendant 24h, filtrer et procéder au test suivant : prendre 10 ml du filtrat, rendu basique par l'ajout du NH₄OH en utilisant le pH mètre. Un test positif est révélé par l'apparition d'une couleur jaune dans la partie supérieure de tube à essai. (Edeoga1 et al., 2005)

3.1.4 Saponosides :

5 ml de la solution à tester sont bien mélangés avec 10 ml d'eau distillée pendant 2 min. La formation d'une mousse persistante après 15 min confirme la présence des saponosides.

3.1.5 Stérols et triterpènes :

Dans un bécher, introduire 5ml de l'extrait à analyser, ajouter 5ml d'anhydride acétique, 5ml de chloroforme et 1 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄) concentré dans la paroi de bécher sans agiter. Laisser reposer 20 min. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact deux liquides et une coloration violette de la couche surnageante révèlent la présence de stérols et triterpènes.

3.1.6 Composés réducteurs :

Dans un tube à essai, ajouter 1ml de liqueur de Fehling (0,5ml réactif A et 0,5ml réactif B) à 1ml d'extrait à analyser et incuber l'ensemble 08 min dans un bain marie bouillant.

L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs.

3.1.7 Les coumarines :

Introduire 1 ml d'extrait dans un tube, ajouter 0,5 ml de NH₄OH, mélanger et observer sous UV à 366 nm. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines.

3.1.8 Oses et holosides :

Introduire les 5 ml de décocté aqueux à 10% au résidu obtenu dans un bécher de 100ml et évaporer à sec au bain-marie, 2 à 3 gouttes de H₂SO₄ et après 5 minutes, additionner 03 à 04 gouttes d'éthanol. Le développement d'une coloration rouge révèle la présence d'oses et holosides. (Karumi et al., 2004)

3.1.9 Mucilages

Introduire 1 ml du décocté à 10 % dans un tube à essai et ajouté 5 ml d'éthanol absolu. Après une dizaine de minutes, l'obtention d'un précipité floconneux par mélange, indique la présence de mucilages.

3.1.10 Terpénoïdes

Dans un tube à essai, ajouter à 2 ml d'extrait, 2ml de chloroforme et 2 ml d'acide sulfurique concentré. La formation d'un anneau marron-rouge à l'interphase indique la présence des terpénoïdes.

NB : Ces tests sont en relation avec l'intensité du précipité, de turbidité et la coloration est proportionnelle à la quantité de la substance recherchée. Ainsi :

- Une réaction faiblement positive est représentée par : +.
- L'absence de la substance est représenté par : -

Les réactions de caractérisation ont permis de mettre en évidence plusieurs groupes chimiques.

3.2 Analyse Quantitative

3.2.1 Dosage Des Polyphénols :

La teneur en composés phénoliques des extraits a été estimée par la méthode de Folin-ciocalteu selon (Li et al., 2007) basée sur la réduction en milieux alcalin de la mixture phosphotungstic (WO₄⁻²) phosphomolybdic (MnO₄⁻²) du réactif de Folin par les groupement oxydables des composés poly phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon. (George et al., 2005)

Brièvement, 1 ml de réactif de Folin (dilué 10 fois) est ajouté à 200 µl d'échantillon ou de standard (préparés dans le méthanol) avec des dilutions

convenables, Après 4 min, 800 µl d'une solution de carbonate de sodium sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 heures d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 765nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de la droite d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-200 µg/ml) et est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait.

3.2.2 Dosage Des Flavonoïdes :

L'évaluation quantitative des flavonoïdes dans les deux extraits selon la méthode du trichlorure d'aluminium (**Bahorun et al., 1996**). Brièvement, les échantillons sont préparés par la dissolution de 1mg (extrait) / ml (méthanol). 1 ml de chaque échantillon est ajouté 1 ml de la solution d'AlCl₃. Dix minutes après le début de la réaction, l'absorbance est lue à 430 nm.

Une gamme étalon est établie séparément avec la quercétine (0-40 µg/ml), pour calculer la concentration des flavonoïdes dans chaque extrait. Les résultats du dosage sont exprimés en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de lyophilisat.

3.2.3 Evaluation de l'activité antioxydante « Piégeage du radical libre

DPPH » :

Pour étudier l'activité antiradicalaire de l'extrait, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH comme un radical libre relativement instable qui absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm. Le test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette), en présence des molécules dites anti oxydantes afin de mesurer leur capacité à le réduire. La forme réduite (diphénylpicryl-hydrazine: de couleur jaune) n'absorbe plus à 515 nm, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance (**Sanchez- moreno., 2002**).

25 µl des solutions d'extraits ou standard (acide ascorbique) sont ajoutés à 975 µl DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant la solution de DPPH et du méthanol est mesurée à 517 nm. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous. (**Mansouri et al., 2005**) :

$$\% \text{ d'activité antiradicalaire} = \frac{(\text{Abs contrôle}) - (\text{Abs échantillon})}{(\text{Abs contrôle})} \times 100$$

L'activité antioxydante de l'extrait vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée par spectrophotométrie en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm.

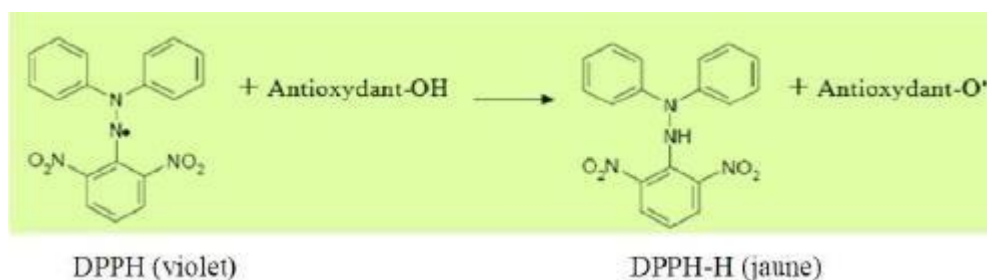


Figure 8: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH

Pour l'évaluation de cette activité, on a préparé une gamme de dilutions allant de 0 à 2 mg/ml pour l'acide ascorbique et l'extrait. Les différentes densités optiques ont permis de tracer une courbe d'allure exponentielle, ce qui signifie l'existence d'une relation proportionnelle entre le pourcentage de réduction du radical libre et la concentration de l'extrait dans le milieu réactionnel.

- **Calcul des IC50**

IC50 (concentration inhibitrice de 50 %), aussi appelée EC50 (Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH.

Les IC50 sont calculées graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testées (**Torres et al., 2006**)

N.B: L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif.

3.2.4 Séparation et identification par chromatographie sur couche mince (C.C.M) :

C'est une méthode rapide de contrôle dont l'adsorbant ou phase stationnaire est constitué d'une couche mince et uniforme, de 0,25 mm d'épaisseur, de silice séchée, finement pulvérisée et appliqué sur un support approprié (feuille d'aluminium ou de verre). La phase mobile ou éluant se propage à la surface de la plaque par capillarité. Phase stationnaire Des plaques de silice Kiesel gel 60F254 de 0,2 mm d'épaisseur

(Merck) ont été employées pour la chromatographie sur couche mince en phase normale.

Phase mobile : Solvants : Acétate d'éthyle - méthanol - eau distillée aux Proportions de : (100V : 135V : 10V).

- Dépôts de la solution à tester
- Déposer 8µl de chaque extrait sur la plaque à l'aide d'un capillaire.
- Déposer 8 µl de quercétine (la référence standard).

A- Migration

Introduire la plaque dans la cuve à chromatographie contenant l'éluant approprié. La phase mobile parcourt alors la phase stationnaire provoquant ainsi une succession de partage des constituants entre les deux phases, ce qui permet une séparation des constituants entre les deux phases.

B- Révélation

Pour révéler les taches de substances sur la plaque, on utilise soit la détection UV, soit la Ninhydrine (**Oomah, 2003**) Après évaporation de l'éluant, les plaques sont pulvérisées par la Ninhydrine.

3.2.5 : Etude statistique

L'étude statistique a été réalisée avec le logiciel Graph Pad Prism 8.0.1. une analyse de variance a été faite par un test One Way ANOVA suivi par un test post-hoc de Dunnett.

Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SEM . Les différences ont été considérées significatives à $P \leq 0.05$.

Chapitre II:

Résultats

1. Détermination de rendement :

L'extrait éthanoïque récupéré après évaporation à sec et sous pressions réduite suivis d'une lyophilisation a été pesé pour déterminer le poids sec résultant, cet extrait renferme les flavonoïdes et les composés phénoliques.

Le rendement exprimé en pourcentage a été déterminé par rapport à 100g de la poudre fine. Subissant une extraction douce à température ambiante durant 24 heures (répétée trois fois), **voir tableau 3 et figure 9**

Tableau 3 : Le rendement d'extrait éthanoïque d'Ilex aquifolium L

	Ilex aquifolium L
Rendement en gramme (g)	12.774
Rendement en pourcentage	12.77%

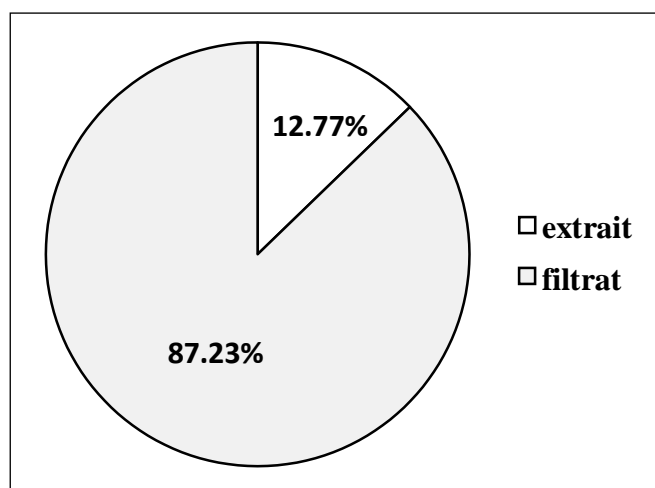


Figure 9: Représentation graphique du rendement des feuilles d'Ilex aquifolium L
Après l'extraction éthanoïque

2. Etude Phytochimique de L'extrait

2.1. Analyse qualitative :

L'étude phytochimique qualitative montre la présence de plusieurs composants (flavonoïdes, polyphénols, alcaloïdes, saponosides, stérols, triterpènes, oses, holosides et les terpénoïdes les tanins et autres) avec l'absence des composés réducteurs.

Tableau 4 : Test préliminaires de présence des substances chimique (Screening Chimique)

N°	Composant	Extrait éthanolique
01	Alcaloïdes	+
02	Tanin	+
03	Flavonoïdes	+
04	Saponosides	+
05	Stérols et triterpènes	+
06	Composé réducteur	-
07	Les coumarines	+
08	Oses et holosides	+
09	Mucilages	+
10	Terpénoïdes	+

2.2. Analyse Quantitative:

2.2.1 Dosages Des Polyphénols :

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu montre en plus de sa sensibilité, une reproductivité puisque l'absorbance est étroitement corrélée à la concentration de l'acide gallique utilisé dans la gamme étalon, $r = 0.99$ (Annexe).

Les résultats de dosage de polyphénols révèlent que l'extrait éthanolique des feuilles d'Ilex aquifolium L contient $106,8 \pm 5,85$ mg d'équivalent d'acide gallique / g de lyophilisat. Tableau 5

2.2.2 Dosages Des flavonoïdes :

L'évaluation quantitative des flavonoïdes (la quercétine sert de standard) montre une corrélation positive entre la variation de ce flavonoïde (0 à 40 $\mu\text{g/ml}$) et l'absorbance avec un coefficient de corrélation $r = 0.99$ (Annexe)

Les teneurs en flavonoïdes varient dans les mêmes proportions que celle des polyphénols : les résultats révèlent la présence de 50.63 ± 9.32 mg Q/g extrait. Voir Tableau 5

Tableau 5: Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans l'extrait éthanolique des feuilles d'Ilex aquifolium L

	Teneur en polyphénols (mg EAG /g)	Teneur en flavonoïdes (mg Q/g extrait)
Ilex aquifolium L	$106,8 \pm 5,85$	50.63 ± 9.32

3. évaluation de l'activité antioxydante :

La méthode de DPPH basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron. la forme non radicalaire DPPH-h est formée.

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique de plante ilex aquifolium L a été fait en comparaison avec celle d'un fort antioxydant ; l'acide ascorbique.

La réduction du radical libre DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence des extraits.

L'activité antioxydante de notre extrait est exprimée en IC_{50} , et est de 0.73mg/ml, elle définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% des radicaux libres de DPPH. Cette IC_{50} est déterminée graphiquement en comparaison avec celle de l'acide ascorbique (0.032mg/ml).

Un autre paramètre exprime la puissance anti radicalaire a été calculée à partir du premier paramètre noté : "ARP" (pouvoir anti radicalaire, égale à $1/IC_{50}$). Plus ces valeurs ne tendent pas et s'éloignent du zéro, plus la puissance antioxydante augmente. Les résultats du test sont représenté au **tableau 6** et **figures 10** suivant :

Tableau 6: L'activité antioxydante et le coefficient de détermination et pouvoir anti radicalaire de la plante *I. aquifolium L*

Plante	Extrait	IC ₅₀	ARP
I. aquifolium L	Extrait Ethanoïque	0,73 mg/ml	1.36
	Acide Ascorbique	0,032mg/ml	31.25

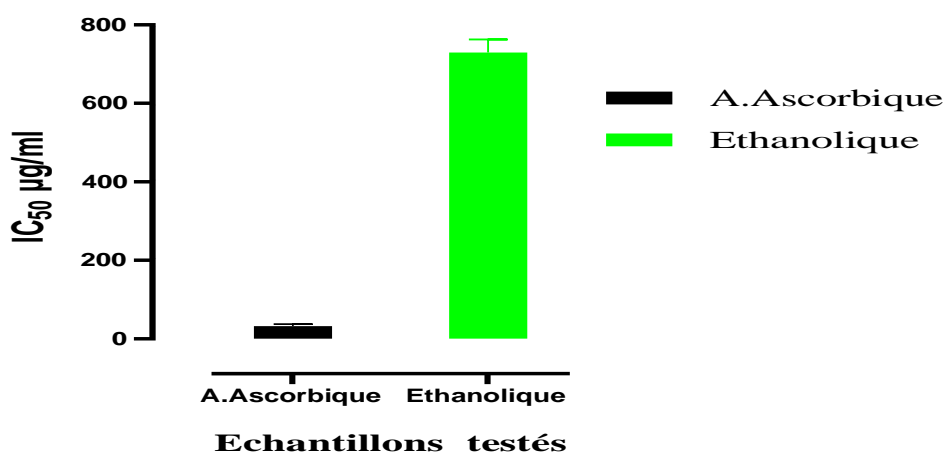
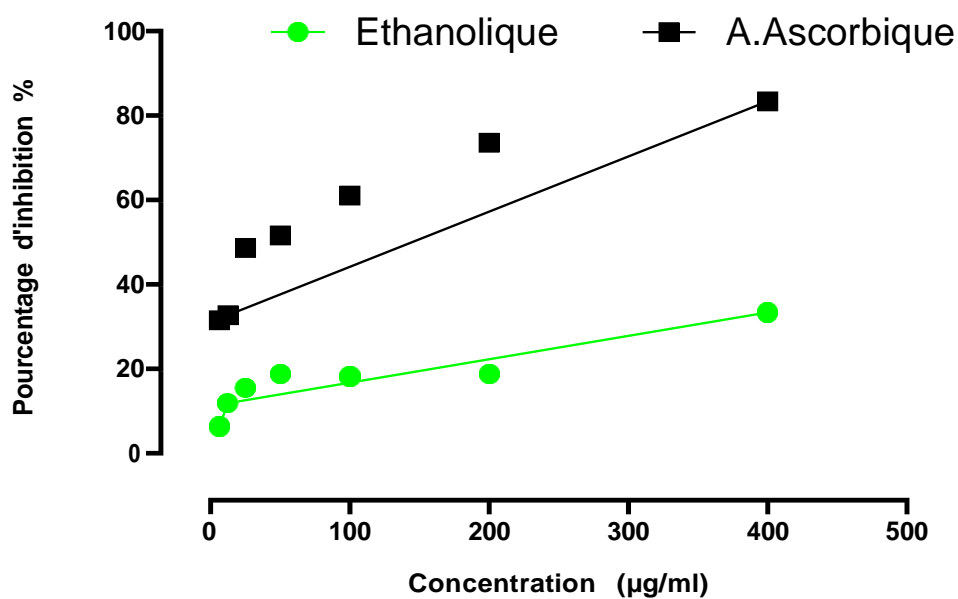


Figure 10: Représentation graphique de l'effet anti radicalaire avec IC₅₀ d'Ilex aquifolium L sur le radical DPPH°

4. Essais de caractérisation par chromatographie sur couche mince (CCM) :

L'identification des composants de l'extrait se fait par la mesure de la distance de migration des ions des composants sur une plaque de silice, les résultats sont présentés dans les **tableaux 7 et 8** et **figure 11**

Tableau 7 : Les différentes classes des composés contenus dans les extraits système 1

système 1 : éthanoïque : 8,4 (distance de solvant) :	
$8/8,4 = 0,95$	Flavone
$7,2/8,4 = 0,85$	3-hydroxy-flavone
$5,8/8,4 = 0,69$	acide-p-coumarique et famille d'acide phénolique
$5/8,4 = 0,59$	6- hydroxy-flavone et 3-6-dishydroxy-Flavone
$4,4/8,4 = 0,52$	Nargénine
$3,7/8,4 = 0,44$	famille de flavonoles /k-aemphénol-flavonole
$2,5/8,4 = 0,29$	quercétine (famille des flavonole).

Tableau 8 : Les différentes classes des composés contenus dans les extraits système 2

système 2 : méthanolique : 9 (distance de solvant)	
$8,6/9 = 0,95$	Flavone
$7,4/9 = 0,82$	Flavone
$5,7/9 = 0,63$	Flavonole
$5,6/9 = 0,62$	Flavonole
$4,7/9 = 0,52$	6-hydroxy-flavone
$4,3/9 = 0,47$	acide-p-coumarique et 3-7 dishydroxy-flavone
$3,9/9 = 0,43$	Nargénine
$4,3/9 = 0,47$	Nargénine
$2,2/9 = 0,24$	morine (famille des flavone)

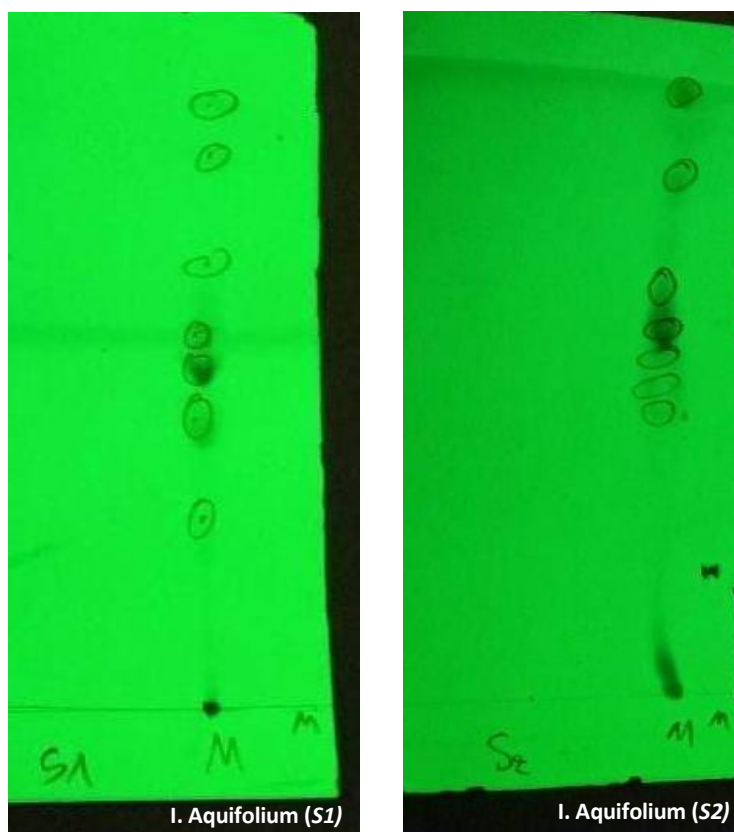


Figure 11: Représentation de la migration sous une lampe UV.
(Photo prise au labo 13)

Chapitre III:

Discussion

- **Rendement de l'extrait :**

L'extraction éthanolique a donné un rendement équivalent à 12.77 gramme d'extrait par 100g de lyophilisat, ce rendement est inférieur à celui obtenu par **Erdemoglu N** et ces collaborateurs en 2009, qui ont travaillé sur l'extrait éthanolique de la même plante et ont obtenu un rendement de 18.3%. Alors qu'**A Zwyrzykowska** et al., en 2015 ont effectués une extraction méthanolique des feuilles de la même plante et ont déclaré un rendement de 21.8%.

Les différences sont peut-être dues au type de solvant, les conditions d'extractions et la nature de la plante de chaque endroit (l'Afrique du nord pour nous, l'Europe pour **Nurgün Erdemoglu** et l'Asie pour **A Zwyrzykowska**)

- **Etude Phytochimique de l'extrait :**

Les résultats représentés dans **le tableau 4** montrent la présence des composants (flavonoïdes, polyphénols, alcaloïdes, saponosides, stérols, triterpènes, oses, holosides, terpénoïdes et les tanins), avec l'absence des composés réducteurs.

Cela confirme les recherches de **Alikaridis** en **1987** qui a étudié la composition chimique d'*I. Aquifolium* L et à mentionner la présence d'anthocyanes, des flavonoïdes, des terpénoïdes, des stérols, d'acides aminés, d'alcaloïdes, d'acides gras, d'alcools, des glucides, des caroténoïdes, des glycosides cyanogènes, des phénols et d'acides phénoliques.

La présence des composés phénoliques est confirmée par la chromatographie sur couche mince (CCM).

- **Analyse Quantitative :**

- **Dosage des Polyphénols :**

L'extrait éthanolique de la plante *I. aquifolium* L représente une teneur en polyphénols de 106.80 mg AG/g Ex, cette teneur est supérieure à celle de l'extrait méthanolique de la même plante (38.789 mg AG/g Ex) trouvée par **Zwyrzykowska** et ses collaborateurs **2015**. Alors que **Berté** et ces collaborateur en **2011** ont réalisé une étude à propos de la plante *Ilex paraguariensis* A une plante de la même famille Aquifoliaceae en utilisant la même méthode que nous (Folin Coicalteau) et ont trouvé une teneur de 178.32 mg Catéchine/g Ex. une autre étude réalisée par **BASSANI** et ces

collaborateur à propos de la plante *Ilex paraguariensis* A en **2014** annonce que le dosage des polyphénols du 349.92 à 428.31 mg/l d'extrait aqueux.

Les taux se rapproche entre notre teneur et celle trouvée par **Berté** même si ce n'est pas la même plante (même famille) qui a utilisé la méthode de Folin Coicalteau. Ce qui confirme nos résultats.

○ **Dosage des flavonoïdes :**

La quantité des flavonoïdes l'extrait contient est de 50.63mg Qe/g Ex, cette teneur est dans le même écart que les polyphénols.

BASSANI et al., en **2014** ont trouvé que la plante *Ilex paraguariensis* A qui est de la même famille que *Ilex aquifolium* L est riche en flavonoïdes et que cette richesse est corrélée avec la richesse en polyphénols. C'est bien le cas de notre recherche, la plante *Ilex aquifolium* L est riche en polyphénols et flavonoïdes.

• **Evaluation de L'activité antioxydante "Piégeage du Radical Libre DPPH" :**

L'activité anti radicalaire in vitro est évaluée par la diminution du taux de DPPH dosé après l'addition de l'extrait à différentes concentrations. Le pouvoir anti radicalaire le plus élevé a une concentration de 0,2 mg /ml est observé pour *Ilex aquifolium* L est de (18,80%), mais il reste un pouvoir inférieur à celui qu'exerce l'acide ascorbique (73,52%), pour la même concentration. Ce test nous a permis de déterminer la concentration inhibitrice piégeant 50% du radical DPPH° (IC₅₀) qui était de (0,73 mg/ml) pour *Ilex aquifolium* L contre (0,032 mg/ml) pour l'acide ascorbique.

Berté en **2011** a trouvé un IC₅₀ de 2.52mg/ml pour une étude de l'activité antioxydante de la plante *Ilex paraguariensis* A (la plante la plus proche de la famille Aquifoliaceae) par la méthode de Piégeage Du Radical Libre DPPH. **Milioli et al., 2009** ont étudié l'activité antioxydante de la plante *Ilex paraguariensis*, la valeur IC₅₀ était 27.3µg/ml utilisant la même méthode (DPPH).

Les variations entre les valeurs IC₅₀ des trois études nous mène a recommandé des nouvelle études par des méthodes différentes.

- **Essais de caractérisation par chromatographie sur couche mince (CCM) :**

Notre étude révèle la présence de plusieurs familles des composés phénoliques dans l'extrait éthanolique des feuilles de la plante *I. aquifolium* L dont on cite : (flavone 3-hydroxy-flavone, acide-p-coumarique, 6- hydroxy-flavone et 3-6-dishydroxy-flavone, Nargénine, famille de flavonoles /k-aemphénol-flavonole, quercétine).

Zwyrzykowska et ces collaborateurs ont réalisé un test CCM pour l'espèce *ilex aquifolium* L. en **2015**. Et ils déclarent les familles de (Quinicacid, Neochlorogenicacid, Chlorogenicacid, Cryptochlorogenicacid, Dicafeicacid, Rutin, Quercetin-3-O-hexoside, DicafeoylquinicAcid).

Cette variation des composants confirme la richesse de la plante *ilex aquifolium* L par des composés phénoliques qui sont à l'origine de l'activité anti oxydante élevés.

Conclusion

&

Perspectives

Conclusion & Perspectives :

Récemment, les plantes médicinales ont gagné une popularité dans la médecine traditionnelle et moderne, c'est pour cela l'étude de la composition chimique et de l'activité biologique est devenue une obligation pour ces plantes.

Notre étude de l'activité biologique de l'extrait éthanolique de la plante *Ilex aquifolium* L se résume en :

- ❖ un rendement d'extraction de 12.77%
- ❖ l'étude phytochimique montre la présence de plusieurs composants (flavonoïdes, polyphénols, alcaloïdes, saponosides, stérols, triterpènes, oses, holosides et les terpénoïdes, les tanins et autres) avec l'absence des composés réducteurs.
- ❖ l'analyse quantitative de l'extrait révèle une teneur en polyphénols de 106.8 mg AG/g Ex et de 50.63 mg Qe/g Ex des flavonoïdes.
- ❖ l'évaluation de l'activité antioxydante par le piégeage du radical libre DPPH montre une activité relativement élevée avec un IC50 de 0.73mg par rapport à un control positif (l'acide ascorbique) dont l'IC50 est de 0.032mg.
- ❖ la chromatographie sur couche mince a permis de détecter la présence de plusieurs familles des composés phénoliques.

Enfin, nous recommandons à l'avenir une étude approfondie dont elle comporte une étude de l'activité antioxydant des extraits par des différents solvants, une caractérisation par un test HPLC, une étude in vivo de l'extrait de plante (toxicité et activité anti inflammatoire). Et probablement une étude comparative entre notre plante du climat humide et celle de climat sec.

Références

Bibliographiques

Références Bibliographiques :

- Aas, G. (2021).** Die Europäische Stechpalme (*Ilex aquifolium*): Verbreitung, Morphologie und Ökologie. LWF Wissen, (85), 7-13.
- Alikaridis, F. (1987).** Natural constituents of *Ilex* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 20(2), 121-144.
[https://doi.org/10.1016/0378-8741\(87\)90084-5](https://doi.org/10.1016/0378-8741(87)90084-5)
- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Etlucur, M. (1996).** Oxygen Species Scavenging Activity Of Phenolic Extracts From A Withomorgans And Pharmaceutical Preparations *ArNeimittel- Forschung*, 46 (11), 1086- 1089.
- BASSANI, D. C., NUNES, D. S., & GRANATO, D. (2014).** Optimization of Phenolics and Flavonoids Extraction Conditions and Antioxidant Activity of Roasted Yerba-Mate Leaves (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) using Response Surface Methodology. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 86(2), 923–934. doi:10.1590/0001-3765201420130019
- Berté, K. A. S., Beux, M. R., Spada, P. K. W. D. S., Salvador, M., & Hoffmann-Ribani, R. (2011).** Chemical Composition and Antioxidant Activity of Yerba-Mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., Aquifoliaceae) Extract as Obtained by Spray Drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5523–5527.
doi:10.1021/jf2008343
- Brunu A., 2011.** Systématique, distribution, écologie et les aspects de la gestion des forêts d'ifs (*Taxus baccata* L.) et le houx (*Ilex aquifolium* L.) en Sardaigne, thèse de doctorat, Università degli Studi di Sassari, Italy.
doi:10.1002/ptr.2166
- Dom COQUERET** « Sur l'INTERÊT d'AVOIR RECOURS aux PLANTES MEDICINALES » 24 juillet 2017.
- Edeoga1 H.O., Okwu D. E. EtMbaebie B.O. (2005).** Phytochemical Constituents Of Some Nigerian Medicinal Plants. *African Journal Of Biotechnology* Vol. 4 (7); P: 685-68.
DOI: 10.5897/AJB2005.000-3127

Erdemoglu, N., Iscan, G., Sener, B., & Palittapongarnpim, P. (2009). Antibacterial, antifungal, and antimycobacterial activity of *Ilex aquifolium* leaves. *Pharmaceutical Biology*, 47(8), 697–700.

<https://doi.org/10.1080/13880200902930431>

Gee, J. M., & Johnson, I. T. (2001). Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. *Current medicinal chemistry*, 8(11), 1245-1255.

<https://doi.org/10.2174/0929867013372256>

George S., Brat P., Alter P EtAmiot J.M. (2005) .Rapid Determination Of Polyphénols And vitamin C In Plant-Derived Products. *J. Agr. Food Chem.* 53; P: 1370-1373.

<https://doi.org/10.1021/jf048396b>

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

<https://doi.org/10.1007/s10298-005-0096-8>.

Guide illustré de la flore algérienne ; février 2012. N° ISBN : 978-2-7466-4242-3

Gray, Andrew N. Non native invasive plants of Pacific coast forests: A field guide for identification. Vol. 817. US Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station, 2011.

Hao, D.; Gu, X.; Xiao, P.; Liang, Z.; Xu, L.; Peng, Y. Research progress in the phytochemistry and biology of *Ilex* pharmaceutical resources. *Acta Pharmacol. Sin.* 2013, 3, 8–19.

<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2012.12.008>

Karumi, Y. (2004). Identification of Active Principles of *M. balsamina* (Balsam Apple) Leaf Extract Y. Karumi," PA. Onyeyili and "VO Ogugbuaja. *Journal of Medical Sciences*, 4(3), 179-182.

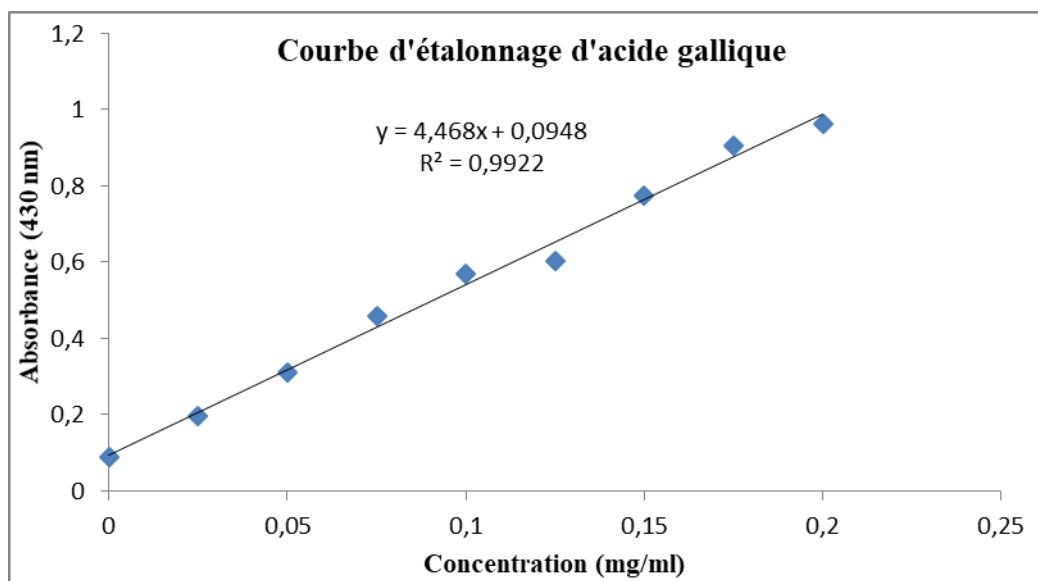
Koudoro, Y. A., Bogninou, G. S. R., Bossou, A. F. A. D., Agbangnan Dossa, C. P., Olayé, T., & Bothon, F. T. D. (2019). et coll. métabolites secondaires, activités antibactérienne et antiradicalaire des extraits de l'écorce de tronc de *Acaciapolyacantharecoltée* au Bénin. *Int. J. Adv. Res.*, 7(10), 1087-1092.

- Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F Et Jiang Y. (2007).**
Evaluation Of Antioxidant Capacity And Total Phenolic Content Of Different Fractions Of Selected Microalgae. Food chem. 102; P: 771-776.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.022>
- Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E Et Kefalas P. (2005).** Phenolic Profile And Antioxidant Activity Of The Algerian Ripe Date Palm Fruit (Phoenix Dactylifera); Food Chemistry 89; P: 411-420.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.051>.
- MESSAOUDENE Lynda** « Composés phénoliques de quatre espèces cultivées : optimisation de l'extraction et étude des activités antioxydante ». Thèse doctoral 2019 ECOLE NATIONAL D'AGRONOMIE-EL HARRACHE.
- Milioli, E. M., Cologni, P., Santos, C. C., Marcos, T. D., Yunes, V. M., Fernandes, M. S., ... Costa-Campos, L. (2007).** Effect of acute administration of hydroalcohol extract of *Ilex paraguariensis* St Hilaire (Aquifoliaceae) in animal models of Parkinson's disease. Phytotherapy Research, 21(8), 771–776.
<https://doi.org/10.1002/ptr.2166>
- Mohammedi zohra** « Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie » Thèse de Doctoral 2013 Université de Tlemcen.
- Nahar, L., Russell, W. R., Middleton, M., Shoeb, M., & Sarker, S. D. (2005).** Antioxidant phenyl acetic acid derivatives from the seeds of *Ilex aquifolium*. Acta Pharmaceutica, 55(2), 187-193.
- Naumann, H. D., Tedeschi, L. O., Zeller, W. E., Huntley, N. F. 2017.** The role of condensed tannins in ruminant animal production: advances, limitations and future directions. Revista Brasileira de Zootecnia, 46, 929-949.
DOI: 10.1590/S1806-92902017001200009
- Oomah, B. D. (2003).** Processing of flax seed fiber, oil, protein, and lignan. Flax seed in human nutrition, (Ed. 2), 363-386.
- Ould hennia Chahrazed et Boubekki Hadjira.,** « inventaire des plantes à caractère médical rencontrées dans les forêts de Mostaganem et l'activité antibactérienne des deux plantes de la famille des Cistacées ». Mémoire de Master 2018. Université de Mostaganem.

- Palu, D., Bighelli, A., Casanova, J., & Paoli, M. (2019).** Identification and Quantitation of Ursolic and Oleanolic Acids in *Ilex aquifolium* L. Leaf Extracts Using ¹³C and ¹H-NMR Spectroscopy. *Molecules*, 24(23), 4413.
doi:10.3390/molecules24234413.
- Rira, M. (2019).** Les tanins hydrolysables et condensés: une piste pour la réduction de la production du méthane entérique par les ruminants en milieu tropical (Doctoral dissertation, Université Clermont Auvergne).
- SANCHEZ-MORENO C. (2002).** Methods Used To Evaluate The Free Radical Scavenging Activity In Foods And Biological Systems. *International Journal Of Food Science And Technology* .8; P: 121-137.
<https://doi.org/10.1106/108201302026770>
- Stalikas, C. D. (2007).** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Séparation Science*, 30(18), 3268–3295.
doi:10.1002/jssc.200700261.
- TORRES R. (2006).** Antioxidant Activity Of Coumarins And Flavonols From The Resinous Exudates Of *Haplopappus Multifolius*; *Phytochemistry* 67; Ed: ELSEVIER; P: 984-987.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.03.016>
- Trease, G. E., Et Evans, W. C.(1983).**Textbook Of Pharmacognosy (Ballieretmdall) London 57- 59.
- Zhang, F., Zhou, Y., Chen, H., Li, N., Wang, C., Lu, X., & Li, Y. (2021).**The complete chloroplast genome of *Ilex* “Tall Boy”, *Ilex aquifolium* × *Ilex latifolia* (Aquifoliaceae). *Mitochondrial DNA Part B*, 6(1), 229–230.
doi:10.1080/23802359.2020.1852898.
- Zwyrzykowska, A., Kupczyński, R., Jarosz, B., Szumny, A., &Kucharska, A. Z. (2015).** Qualitative and quantitative analysis of polyphenolic compounds in *Ilex* Sp. *Open Chemistry*, 13(1).
<https://doi.org/10.1515/chem-2015-0142>

Annexe

Annexe 1 : courbe d'étalonnage d'acide gallique



Annexe 2 : courbe d'étalonnage de la quercétine

