



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Larbi Tébessi –Tébessa-
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Biologie Appliquée



MEMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie Appliquée

Option : Biochimie

Thème :

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

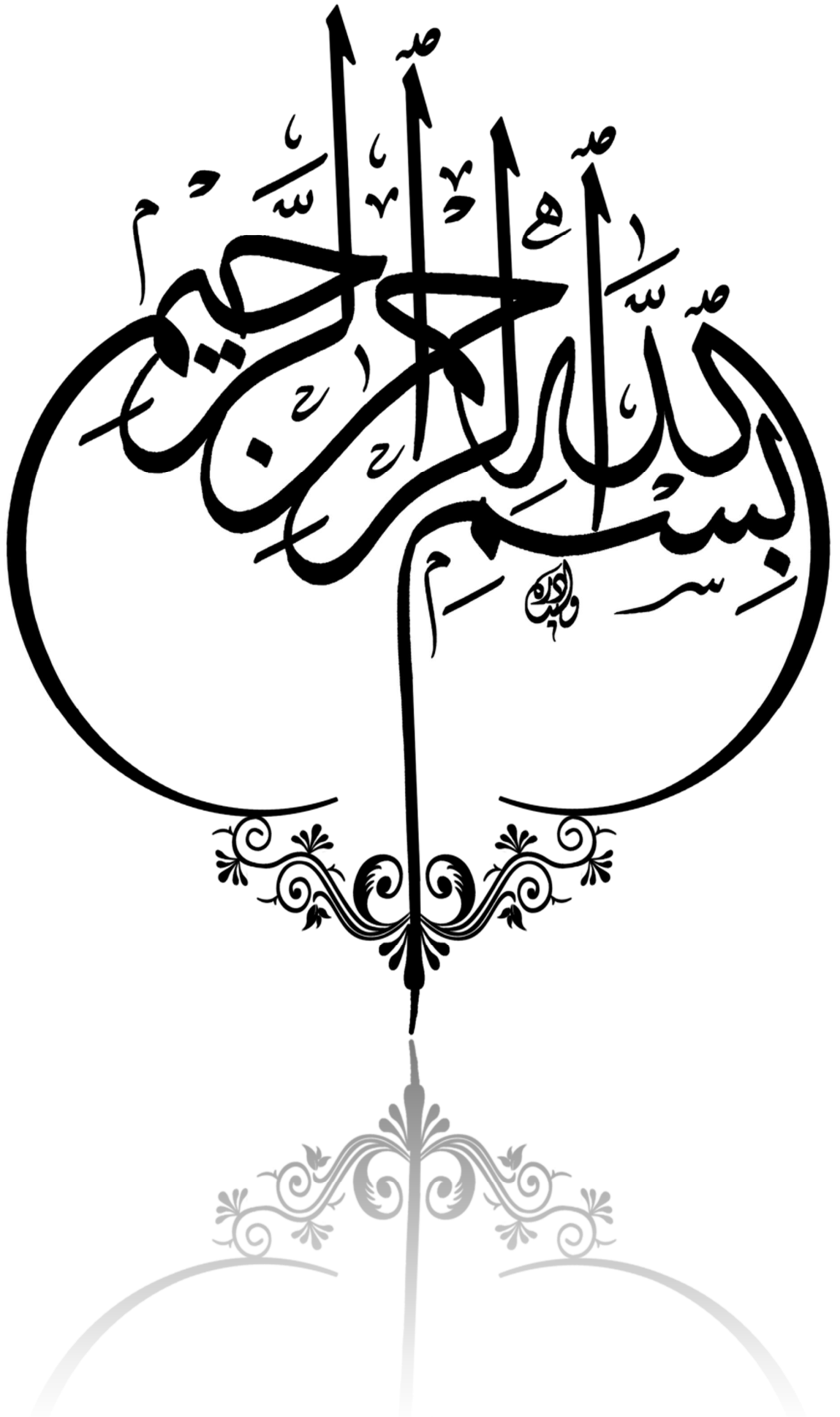
Présenté par :

Benaoua Meriem

Devant le jury :

| | | | |
|------------------------------|-----|-----------------------|-------------|
| Dr. Benlakhhal Amar | MAA | Université de Tébessa | Président |
| Pr. Boussekine samira | Pr | Université de Tébessa | Rapporteuse |
| Dr. Gherisi Bilel | MAA | Université de Tébessa | Examineur |

Date de soutenance : 14/06/2022



Remerciement

Tout d'abord on remercie Allah tout puissant de nous avoir donné la volonté, et la patience pour réaliser ce mémoire. Notre grand salut sur le premier éducateur notre prophète Mohammed que le salut soit sur lui.

Je tiens a remercie ma famille surtout mes parents pour son soutien aussi moral que financier et pour son sacrifice.

Nous adressons notre reconnaissance et nos remerciements a notre encadreur : **Professeur boussekine samira** d'avoir accepté de nous guider dans ce travail, en suivant toutes les étapes du travail et en fournissant un soutien et des conseils. Ainsi que pour sa gentillesse, sa disponibilité, ses conseils constructifs, et son attention. Nos remercions les membres de jury qui nous feront l'honneur de juger ce travail. d'avoir accepté de participer a la discussion de notre travail.

Nous remercions tous les enseignants qui nous ont fait profiter de leur savoir, tout au long de nos études et surtout le notre chef de département **Docteur sellami saïf - Eddine** pour leur encouragement et leur soutien.

Dédicace

J'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail :

A mon père Que Dieu lui fasse miséricorde et le place dans ses paradis,

A mon paradis qui m'ont éclairé le chemin de la vie par leur grand soutien, leur encouragements, leur dévouements exemplaires et leur énormes sacrifices qu'ils m'ont consentis durant mes études et qui ont toujours aimé me voir réussir. Je remercie pour tout ce qu'ils m'ont fait mes frères, ma belle sœur, mes chers collègues : monsieur saadane , charaf et yasser et sourour et l'administration de faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie.

Liste des Figure

| | | |
|------------------|--|----------|
| Figure 01 | Structure de Nicotine | 6 |
| Figure 02 | Exemple de saponines; saponine de soja | 7 |
| Figure 03 | Structure de base des flavonoïdes | 8 |
| Figure 04 | Exemple de les stéroïdes ; le cortisol | 8 |
| Figure 05 | Structure de base des stérols | 9 |
| Figure 06 | Structure de isoprène | 9 |
| Figure 07 | Structure de base de tanins condensés | 10 |
| Figure 08 | Structure de base de tanins Hydrolysables | 10 |
| Figure 09 | Structure moléculaire d'un coumarin | 11 |
| Figure 10 | Structure de base des composés phénoliques | 11 |
| Figure 11 | <i>Ilex aquifolium</i> L | 15 |
| Figure 12 | <i>Ilex aquifolium</i> L | 16 |
| Figure 13 | Répartition géographique mondiale de <i>Ilex aquifolium</i> L | 17 |
| Figure 14 | Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH | 23 |
| Figure 15 | Représentation graphique du rendement des feuilles d' <i>Ilex aquifolium</i> L après extraction aqueuse | 26 |
| Figure 16 | Représentation graphique de l'effet antiradicalaire avec IC50 d' <i>Ilex aquifolium</i> L sur le radical DPPH | 28 |
| Figure 17 | Chromatographie sur couche mince | 29 |
| Figure 18 | Courbe représente le pourcentage d'inhibition de radical DPPH en fonction des concentrations de l'extrait aqueux d' <i>Ilex aquifolium</i> . L | 33 |
| Figure 19 | Courbe d'étalonnage de l'acide gallique | 34 |
| Figure 20 | Courbe d' étalonnage de la quercétine | 34 |

Liste des Tableaux

| | | |
|-----------------------|---|-----------|
| Tableau 01 | Les Activités biologique de quelque métabolites secondaire | 12 |
| Tableau 02 | Classification Botanique de <i>Ilex aquifolium</i> L | 15 |
| Tableau 03 | Le Rendement de l'extrait aqueux d' <i>Ilex aquifolium</i> L | 26 |
| Tableau 04 | Résultats des tests phytochimiques | 27 |
| Tableau 05 | Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans l'extrait aqueux des feuilles d' <i>Ilex aquifolium</i> L | 27 |
| Tableau 06 | Résultat de la chromatographie sur couche mince | 29 |

Liste des abréviations

| | |
|--------------------------------|---|
| Ml | Millilitre |
| AlCl ₃ | Chlorure d'Aluminium |
| R | Rendement |
| UV | Ultra violet |
| I % | Pourcentage d'inhibition. |
| IC 50 | Concentration inhibitrice à 50 |
| HCL | Acide chlorhydrique |
| °C | Degré Celsius |
| DPPH | 1,1-DiPhenyl-2-PicrylHydrazyl |
| Mg | Microgramme |
| PH | Potentiel d'Hydrogène |
| T° | Température |
| % | le pourcentage |
| S1 | Système (15.5 ml)N. hexane, (7ml)de acétate éthyle,(2.5ml) Acide acétique |
| S2 | système 2 (19 ml)de toluène,(5ml)de acétone, (2.5 ml) de acide formique) |
| A acétique | Acide acétique |
| NH ₄ OH | Hydroxyde d'ammonium |
| SM | Solution mère |
| CCM | Chromatographie sur couche mince |
| mn | Minute |
| AlCl ₃ | Trichloride d'aluminium |
| Rf | Rapport frontal |
| FeCl ₃ | Chlorure de fer |
| GAE | Equivalent d'acide gallique |
| V | Volume |
| ACOET | Acétate d'éthyle |
| °C | Degré Celsius |
| N | Nombre de mol |
| g | Gramme |
| Ph | Potentiel Hydrogène |
| H ₂ SO ₄ | Acide sulfurique |
| nm | Nanomètre |
| % | Pourcentage |
| MnO ₄ ⁻ | Permanganate |

| | |
|------------|---------------------------|
| µl | Microlitre |
| EQ | Quercetine |
| Abs | Absorbance |
| APR | Puissance antiradicalaire |

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Liste des Figures | |
| Liste des tableaux | |
| Liste des abréviations | |
| Table des matières | |
| Résumé | |
| Introduction | 2 |
| Partie I. Recherche bibliographique | 3 |
| Chapitre I. Les plantes médicinales | 4 |
| 1. Définition et utilisation des plantes médicinales | 4 |
| 2. Historique de les plantes médicinales | 4 |
| 3. Phytothérapie | 5 |
| 4. Eléments actifs des plantes médicinales | 6 |
| 4.1 Les métabolites primaires | 5 |
| 4.2 Les métabolites secondaires | 6 |
| | |
| Chapitre II. Généralité sur la plante : <i>Ilex aquifolium</i> L | 16 |
| 1. Classification de la plante | 17 |
| 2. Caractérisation botanique de l' <i>Ilex aquifolium</i> L | 19 |
| 3. Description géographique de l' <i>Ilex aquifolium</i> L | 16 |
| 4. Utilisation médicinales de l' <i>Ilex aquifolium</i> L | 20 |
| 5. Composition phytochimique de la plante | 20 |
| 6. Activité biologique de l' <i>Ilex aquifolium</i> L | 21 |
| Partie II. Etude expérimentale | |
| Chapitre I. Matériels et méthodes | 23 |
| I. Matériels | 23 |
| • Matériel végétal | 23 |
| II. Méthodes | 23 |
| 2.1.Extraction par macération à l'eau | 23 |
| 2.2 Étude phytochimique de l'extrait de la plante | 23 |
| III.Analyse de l'extrait | 26 |
| 3.1.Dosage des polyphénols | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.Dosage des flavonoïdes | 26 |
| 3.3.Evaluation de l'activité antioxydante | 27 |
| • Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) | 27 |
| • Calcul des IC50 | 28 |
| 3.4.Séparation et identification par chromatographie sur couche mince (C.C.M) | 28 |
| Résultats et discussion | 30 |
| Conclusion et perspectives | 39 |
| Références bibliographiques | |

Résumé

L'objectif de cette recherche est l'étude de la composition chimique et l'activité biologique de l'extrait aqueux de la partie aérienne de l'espèce *Ilex aquifolium* L, c'est une plante médicinale de famille des aquifoliacées. Occupent une place importante en médecine traditionnelle grâce à leur richesse en métabolites secondaires et leurs activités biologiques. L'analyse des résultats montre un rendement élevé de l'extrait aqueux (15.22%), une richesse des feuilles de la plante par les alcaloïdes, tanins, flavonoïdes, saponosides, stérols, triterpènes, coumarins, oses ou holosides, mucilage, Terpenoïdes avec absence de composés réducteurs. En particulier les résultats de dosage des polyphénols totaux réalisés par la méthode de Folin Ciocalteu révèlent que l'extrait aqueux des feuilles d'*Ilex aquifolium* L contient une quantité élevée équivalente de $102,2 \pm 0.88$ mg d'équivalent d'acide gallique / g de matière sèche.

Le résultat de dosage des flavonoïdes de l'extrait aqueux des feuilles de la plante *Ilex aquifolium* L montre : $62,86 \pm 1.0$ mg EQ/g extrait .

Sachant que la chromatographie sur couche mince réalisée pour l'extrait aqueux et éthanolique de la même plante ne montre aucune migration des composants de l'extrait aqueux par rapport à ceux de l'extrait éthanolique.

De plus l'extrait aqueux des feuilles de la plante étudiée présente une forte activité antioxydante (avec une concentration inhibitrice $IC_{50} = 0.53$ mg / ml)

On peut conclure que l'extrait aqueux des feuilles de la plante *Ilex aquifolium* L est riches en composés phénoliques, avec un pouvoir antioxydant élevé, ce qui permis leur utilisation pour prévenir plusieurs maladies qui peuvent être causée par un stress oxydant.

Mot clés : *Ilex aquifolium* L , Extrait aqueux , Activité antioxydante , Tests phytochimique , composés phénoliques

Abstract :

The objective of this research is the study of the chemical composition and biological activity of the aqueous extract of the aerial part of the species *Ilex aquifolium* L, it is a medicinal plant of the family of aquifoliaceae. Occupy an important place in traditional medicine thanks to their richness in secondary metabolites and their biological activities. analysis of the results shows a high yield of the aqueous extract (15.22%), a richness of the leaves of the plant by alkaloids, tannins, flavonoids, saponosides, sterols, triterpenes, coumarin, oses or holosides, mucilage, terpenoids with no reducing compounds. in particular the results of the determination of total polyphenols carried out by the method of folin - ciocalteu reveal that the aqueous extract of the leaves of *Ilex aquifolium* L contains an equivalent high amount of 102.2 0.88 mg of gallic acid equivalent/ g of dry matter.

The result of determination of flavonoïd of the aqueous extract of the leaves of the plant *Ilex aquifolium* L shows: 62.86 1.0 mg eq/g extract.

knowing that the thin-layer chromatographies performed for the aqueous and ethanolic extract of the same plant shows no migration of the components of the aqueous extract compared to those of the ethanolic extract.

in addition, the aqueous extract of the leaves of the studied plant has a strong antioxidant activity (with an inhibitory concentration $ic_{50} = 0.53$ mg/ ml) it can be concluded that the aqueous extract of the leaves of the plant *Ilex aquifolium* L is rich in phenolic compounds, with a high antioxidant power, which allowed their use to prevent several diseases that can be caused by oxidizing stress.

Keywords: *Ilex aquifolium* L, aqueous extract, phytochemical tests , antioxidant activity.

ملخص:

الهدف من هذا البحث هو دراسة التركيب الكيميائي والنشاط البيولوجي للمستخلص المائي للجزء العلوي من النوع *Ilex aquifolium* L، وهو نبات طبي من عائلة Aquifoliacées. تحتل مكانة مهمة في الطب التقليدي بفضل ثرائها في المستقلبات الثانوية وأنشطتها البيولوجية. أظهر تحليل النتائج إنتاجية عالية للمستخلص المائي (15.22٪)، ثراء أوراق النبات بالقلويدات، العفص، الفلافونويد، السابونوزيدات، الستيرولات، الترايتيربين، الكومارين، الجوز أو الهلوسيدات، الصمغ، التربينويدات مع غياب اختزال المركبات. على وجه الخصوص، تكشف نتائج اختبار البوليفينول الكلي الذي تم إجراؤه بواسطة طريقة Folin Ciocalteu أن المستخلص المائي لأوراق *Ilex aquifolium* L يحتوي على كمية مكافئة عالية تبلغ 102.2 ± 0.88 مجم من مكافئ حمض الغال / جم من المادة الجافة.

تظهر نتيجة فحص الفلافونويد للمستخلص المائي لأوراق نبات *Ilex aquifolium* L: 62.86 ± 1.0 mg EQ /g. مع العلم أن كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التي تم إجراؤها للمستخلص المائي والإيثانولي لنفس النبات لا تظهر أي هجرة لمكونات المستخلص المائي مقارنة بتلك الموجودة في المستخلص الإيثانولي.

بالإضافة إلى ذلك، يحتوي المستخلص المائي لأوراق النبات المدروس على نشاط مضاد للأوكسدة قوي (مع تركيز مثبط $IC_{50} = 0.53$ مجم / مل)

يمكن الاستنتاج أن المستخلص المائي لأوراق نبات *Ilex aquifolium* L غني بالمركبات الفينولية، ذات القدرة العالية المضادة للأوكسدة، مما يسمح باستخدامها للوقاية من الأمراض التي يمكن أن تسببها الإجهاد التأكسدي. الكلمات المفتاحية: *Ilex aquifolium* L، مستخلص مائي، الاختبارات الكيميائية النباتية، نشاط مضاد للأوكسدة.



Introduction

Introduction

Introduction

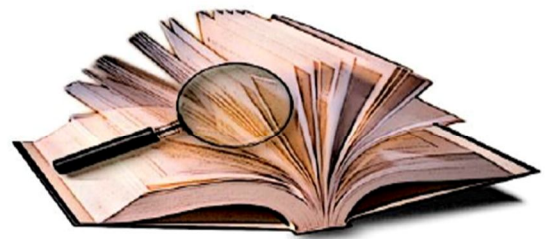
Dans le monde, les plantes médicinales utilisées comme médicaments (**Tahri et al., 2012**), constituent une source inépuisable de molécules à activités biologique et pharmacologique très variées (**Ghedadba et al., 2015**). Ces molécules jouent un rôle très important dans la thérapie traditionnelle (**Abderrazak et al., 2016**), grâce à leurs propriétés curatives (**Janice Taïle., 2021**). Le genre *Ilex* comme de la famille des Aquifoliaceae est largement répandu dans la plupart des régions non tropicales du monde. L'espèce la plus connue dans la littérature occidentale est le houx européen ou anglais, *Ilex aquifolium* L. avec ses drupes rouges caractéristiques (baies) et ses feuilles largement utilisées dans les décorations de Noël. Utilisé dans la médecine traditionnelle comme antioxydant, anti-inflammatoire, antibactérien, hypolipémiant, régulateur du microbiote intestinal, anticancéreux, protecteur cardiovasculaire, anti-obésité, anti-diabétique, neuroprotecteur (**Ren-You Gan et al., 2018**).

La composition chimique a étudié certaines parties de la plante, telles que les feuilles et les tiges, indiquent qu'elles contiennent de nombreuses substances bioactives, comme les saponines, les polyphénols, les glycosides, les alcanes, les esters, les cétones, les aldéhydes et les lipophiles et les flavonoïdes (**Natalia et al., 2021**).

Notre objectif s'intéresse à l'étude de l'activité biologique et phytochimique de l'extrait aqueux des feuilles de la plante *Ilex aquifolium* L.

La première partie est consacrée à une recherche bibliographique sur ; les plantes médicinales et la plante *Ilex aquifolium*. L.

La deuxième partie qui concerne une étude expérimentale consiste à décrire le matériel et les méthodes utilisés au cours de cette recherche, présentation des résultats obtenus et leurs discussion et finalement une conclusion générale et des perspectives.



Partie I : Recherche bibliographique

Chapitre 1. Plantes médicinales

1. Définition et utilisation les plantes médicinales

Les plantes médicinales ; ceux sont tous des plantes contenant un ou plusieurs substances utilisées pour traiter différentes maladies (**Chaachouay N. 2020**).

Ces métabolites sont : les phénols (simples phénols, acides phénoliques, quinones, flavonoïdes, flavones, flavonols, tannins et les coumarines), les alcaloïdes, les terpénoïdes et polypeptides.(**M. Toure , 2015**)

Depuis le début des temps, de grandes civilisations (chinoise, égyptienne, babylonienne, grecque, romaine, etc.) ont misé sur les plantes médicinales pour leurs propriétés thérapeutiques, cosmétiques, chimiques, diététiques, pharmaceutiques, agro-alimentaires et industrielles. (**Lahsissene et al. , 2009**)

Actuellement, cette médecine à base de plantes regagne en popularité, et c'est grâce à des études scientifiques basées sur des méthodes analytiques et de nouvelles expérimentations que le monde médical en apprend davantage sur la validité des prescriptions empiriques des plantes médicinales. (**Lahsissene et al.,2009**).

Généralement, en médecine traditionnelle, la partie raciniennes qui contient le plus de principes actifs est la plus employé (**Ouhadi et al.,2021**)

Médecine Traditionnelle ; En réalité, la médecine traditionnelle est un concept qui déborde largement le champ de la santé pour se placer au plus vaste niveau socioculturel, religieux, politique et économique. Dans les pays développés où la médecine traditionnelle n'a pas été incorporée au système de santé national, la médecine traditionnelle est souvent appelée médecine « complémentaire », « alternative » ou « non conventionnelle ». (**Bensalek et al .,2018**).

2 . Historique des plantes médicinales

les plantes médicinales a longtemps été transmis progressivement et de génération à la production, une connaissance humaine est progressivement avec la formation de civilisations et la fourniture de plus d'installations. Les plantes

médicinales sont utilisées comme un examen médical des ressources dans presque toutes les cultures. Assurer la sécurité, la qualité et l'efficacité des médicaments (Fatemeh et al., 2018). Les plantes médicinales sont le patrimoine local dans de nombreux pays en développement dans de nombreux pays asiatiques de la médecine traditionnelle à être largement utilisé, même si la médecine allopathique est souvent facilement. La médecine traditionnelle, aussi connu comme la médecine indigène ou populaire comprend médicinales systèmes de connaissances qui se sont développées au fil des générations avec diverses sociétés avant l'ère de la médecine moderne. En malaisie, les formes traditionnelles de malaise, chinoise et indienne.

La médecine sont largement utilisés (Pakhriazad et al., 2019). Les plantes médicinales ont sans aucun doute été considéré par les êtres humains depuis les temps anciens. Ça peut dire que, avant l'histoire et depuis le début des humains reconnu et exploité les plantes autour d'eux pour comme carburant, des vêtements, des abris et de la nourriture, ils ont pris conscience de leurs propriétés plus ou moins. Les plantes médicinales ont été transformé en l'une des plus anciennes sciences dans les pays comme la Chine, la Grèce, l'Egypte et l'Inde. (Fatemeh et al., 2018)

3 . La phytothérapie

Le terme « Phytothérapie », provient du grec « python » qui signifie « plante » et « therapein » qui signifie « soigner » .

La

phytothérapie peut être définie comme une discipline allopathique visant à prévenir et à traiter des conditions fonctionnelles et/ou pathologiques à l'aide de plantes, de parties de plantes ou de préparations à base de plantes. Selon l'OMS la phytothérapie utilisée par 70 % de la population mondiale.

On peut la distinguer en trois types de pratiques ;

- **Une pratique traditionnelle** ; parfois très ancienne basée sur l'utilisation des plantes selon les vertus découvertes empiriquement.

Une pratique basée sur les avancées et les preuves scientifiques, qui recherchent des principes actifs extraits des plantes.

- **Une pratique de prophylaxie** ; déjà utilisée dans l'antiquité. c'est notamment le cas dans la cuisine, avec l'usage d'Ail, du Thym, du Gingembre ou simplement du Thé vert ... Une alimentation équilibrée et contenant certains éléments actifs étant une phytothérapie prophylactique (**Bensalek et al.**, 2013

4 .Les éléments Actifs des plantes médicinales

4.1 Les métabolites primaire

Ce sont des molécules organiques naturelle qui se trouvent dans l'organisme végétale .qui regroupe toutes les vois qui synthétisé toutes les molécules indispensables pour la croissance et le développement des plantes (**Benzaoui et al.**, 2021) en proviennent ont donc un rôle clé et bien établi chez tous les végétaux (acides aminés et protéines, acides gras, sucres et polysaccharides...(Mathilde .2018) Les métabolites primaire sont hautement conservés et directement nécessaires à la croissance et au développement des plantes(Matthias .2020)

4.2 Les métabolites secondaire

Ceux sont des composés naturels synthétisés par les végétaux, nécessaire pour la défense contre les agressions extérieures représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans différents domaines de la pharmacologie ou de l'industrie alimentaire. Devisé en trois grand famille ;

- Les composés phénoliques ou aromatiques : tanins, quinones, coumarines, flavonoïdes.
- Les composés azotés : alcaloïdes.
- Les composés terpéniques et leurs dérivé(Titi et al., 2021)

4.2.1 Alcaloïdes :

Le mot « alcaloïde » est pratiquement synonyme du mot « drogue » ; Les alcaloïdes sont des complexes d'azote présents dans la nature qui ont de puissants effets physiologiques. La majorité d'entre eux sont des poisons végétaux très actifs avec un mécanisme d'action spécifique. Les alcaloïdes sont des alcaloïdes naturels que l'on trouve principalement dans les plantes. Ensuite, il y a trois grandes catégories à considérer :- Alcaloïdes vrais : Dérivé d'acide aminé et Hétérocycle azoté. (**Saouli, 2019**) exp : la nicotine

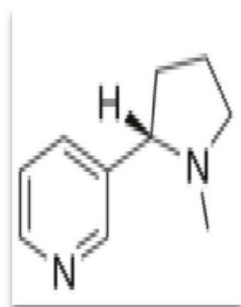


Figure 1. Exemple des Alcaloïdes , structure de Nicotine (KABOUCHE et al., 2019)

4.2.2. Saponines :

Le nom saponine dérive du mot latin « sapo » signifie savon, car ces composés moussent une fois agités avec de l'eau. Ils se composent d'aglycones non polaires, liés à un ou plusieurs sucres. Est un glycoside de stéroïde ou de triterpène. Fondamentalement, on distingue les saponines stéroïques et les saponines triterpéniques (**François, 2010**) facilitent l'absorption d'autres substances par la muqueuse de l'intestin mais elles ne sont pas absorbées. (**Chaachouay , 2020**)

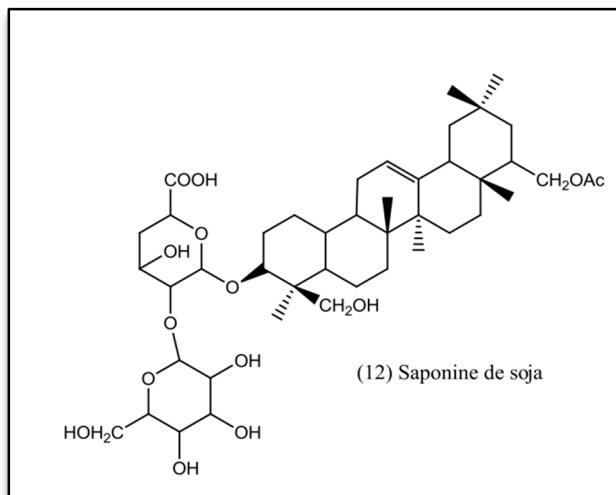


Figure 02 : Exemple de saponines ; saponine de soja (François.,2010)

4.2.3. Flavonoïdes

Sont des composés naturels polyphénoliques. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Structuralement, il est généralement sous forme libre ou sous forme d'un glycoside. Ils sont localisés dans divers organes des plantes telle que, racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits . Tous les flavonoïdes dérivent de l'enchaînement benzo- γ -pyrone .classé en plusieurs groupes ; les flavonols , les flavonons, les Flavones. Les Anthocyanidines. Les Flavonoïdes possède une activité très important, ils sont utilisés comme :Antivirales. Antispasmodiques. Antitumorales. Anti agrégation plaquettaires. Antiallergiques. Hypocholestérolémiantes. Anti-inflammatoires. Anti-hypertensives. Anti-oxydante et antimicrobiennes.(**Gagui et al., 2021**)

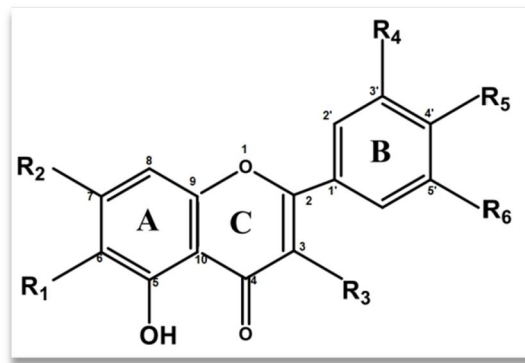


Figure 03. Structure de base des flavonoïdes (ELKALI et al .,2021)

4.2.4 Stéroïdes

C'est un groupe de lipides dérivant de triterpénoïdes (lipides à 30 atomes de carbones), majoritairement le squalène. Ils se caractérisent par un noyau cyclopentanophénanthrénique hydrophobe (cortisol) hydrogéné. (François2010) présentant dans la règne animal et végétale

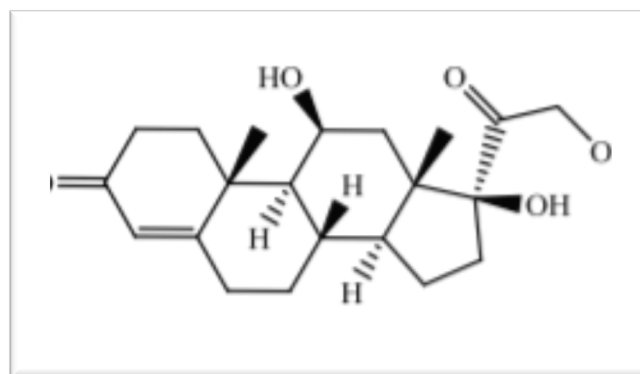


Figure 04 : Structure de base de stéroïde (Elkali et al., 2021)

4.2.5 Stérols

Un stérol est un lipide possédant un noyau de stérane dont le carbone 3 est porteur d'un groupe hydroxyle. Pratiquement tous les stéroïdes végétaux sont hydroxylés en C-3 et sont en fait des stérols. Dans le règne animal, les stéroïdes ont une importance profonde comme hormones, coenzymes et provitamines. Cependant, le rôle des phytostérols est moins bien compris. Il est prouvé que

certains des phytostérols sont efficaces contre les maladies cardiovasculaires (Kone et al., 2018)

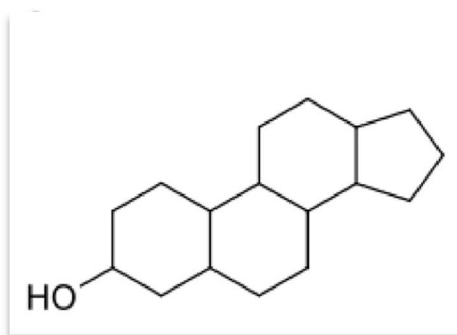


Figure 05 : structure de base des stérols (Nahdi et al., 2020)

4.2.6 Terpènes

Les terpènes, ou isoprénoïdes, sont l'une des classes les plus diverses de métabolites secondaires. Leur squelette carboné est constitué d'unités isopréniques reliées, c'est ce que l'on appelle la règle de l'isoprène. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former des cycles. Ils sont des arômes et des parfums, des antibiotiques, des hormones végétales et animales, des lipides membranaires, des attracteurs d'insectes, des antis alimentaires et des médiateurs des processus essentiels de transport d'électron. Ainsi, les terpènes peuvent être classés en hémiterpènes (C5), monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), sesterpènes (C25), triterpènes (C30), tétraterpènes (C40). (Kone et al., 2018)

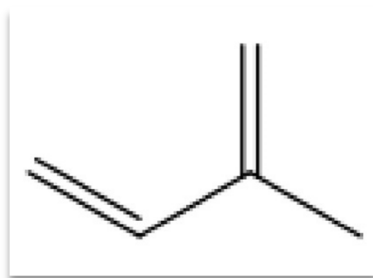


Figure 06 : Structure de isoprène (GUETTAF et al., 2020)

4.2.7 Tanins

Les tanins sont des polyphénols hydrosolubles de masse molaire compris entre 500 et 300 g/mol qui présentent classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autre protéines » (**Rouina et al ., 2021**) . Il contient une grande quantité d'hydroxyle et d'autre groupes appropriés tels que le carboxylate pour former des complexes forts avec des protéines et des macromolécules, l'acide gallique, le gaïacil syringyl et le chrysilique sont les principaux ingrédients des tanins repartis en deux classes selon leur structure (**Menaa et al.,2020**).

- **Les tanins condensés** ; résultent de la polymérisation de molécules alimentaires de flavones (flavonesol-sflavone ol-4, flavone diol-3,4), ils sont désignés aussi sous le nom de tanins « catéchique »(**Merabet et al., 2021**)

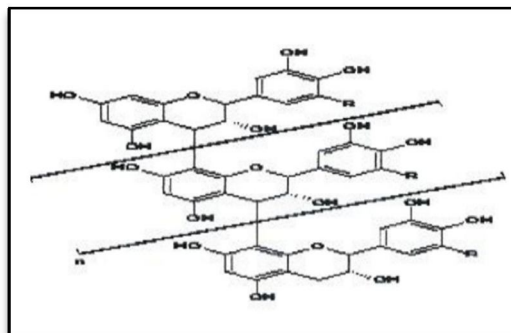


Figure 07 : structure de base de tanins condensés (Boubendir et al., 2021)

- **Les Tanins Hydrolysables** ; ce sont des hétéropolymères possédant un noyau central d'acide tannique carbohydrate (D-glycose).l'acide phénolique par hydrolyse (acide, alcaline ou enzymatique) (**Menaa et al.,2020**).

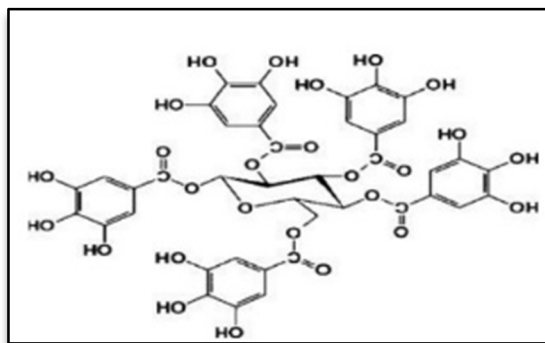


Figure 08 : structure de base des tanins hydrolysables (Boubendir et al., 2021)

4.2.8 Coumarins

composé phénolique retrouvée chez plusieurs espèce végétales , possédant des différents propriétés Elles sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxyles (Boumidouna et ., al 2019) Ce sont des dérivés naturels des benzopyrones . Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaire et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxyles.(Banga et al., 2021)

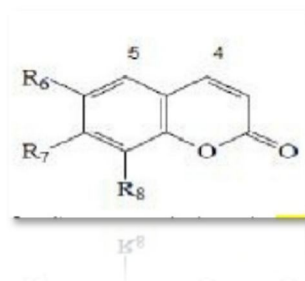


Figure 09 : Structure moléculaire d'un coumarin (Boumidouna et ., al 2019)

4.2.9 Polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires. Ils constituent un des groupes le plus nombreux et largement distribué des substances dans le royaume des végétaux avec plus de 8000 structures phénoliques présents dans tous les organes de la plante . Il existe différentes classes de composés phénoliques, notamment : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tannins, les stilbènes, les lignanes, les

saponines, les phytostérols ou bien phytostanols. Les plus importants sont : les acides phénols, les flavonoïdes et les tannins. (Chaabane et al.,2020)

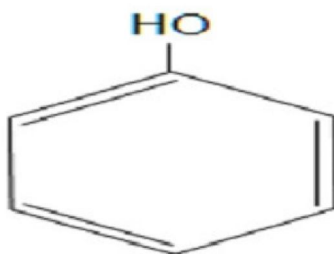


Figure 10 : Structure de base des composés phénoliques (HAMZA Asma.2019)

Ces composés montrent des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux, anti-allergènes, vasodilatateurs et des antioxydants (Chaabane et al., 2020)

Tableaux 01 : Les Activités biologique de quelque métabolites secondaires

| Les Polyphénols | Activités |
|--------------------|---|
| Flavonoïdes | Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoire Hypotenseurs et diurétiques Antioxydantes |
| Coumarines | Protectrices vasculaires Antiœdémateuses |
| Anthcyanes | Protectrices capillaroveineux |
| Tanins | Antioxydants |
| Proanthocyanidines | Effets stabilisants sur le collagène Antioxydantes Antitumorales Antifongiques Anti-inflammatoires |

Chapitre II

Chapitre II.

Généralités Sur la plante Ilex aquifolium ;

Ilex aquifolium . L (*Aquifoliaceae*) est un petit conifère un arbre réparti sur le nord-ouest, le centre et le sud de l'Europe et l'Afrique du Nord, où on le trouve associée à une grande variété de sols et de plantes types de communautés . Feuilles peut être soit épineux, avec un nombre variable de épines le long de la marge, ou non épineuses avec des marges(Carlos et al.,2012) Le genre est connu pour ses nombreuses activités biologiques comme antioxydant, antimicrobien, cytotoxique, antiagrégant plaquettaire, anti-inflammatoire etc. La plupart des plantes de ce genre sont de riches source de triterpénoïdes et de saponines. En outre, ces plantes contiennent également des flavonoïdes, des alcaloïdes, des anthocyanes et d'autres composés phénoliques dans quantité infime. Les constituants bioactifs ou extraits de plantes eux-mêmes, sous forme de plantes médicinales de ce genre, ont été validés pour le traitement de diverses maladies et ceux-ci seraient utilisés comme une nouvelle formulation pour le roman découverte de médicaments dans les industries pharmaceutiques (**Sudhir et al ., 2012**)

Chapitre II.

Classification de la plante : Espèces à l'étude-Holly, *Ilex aquifolium* L. (Aquifoliaceae), est un dioecieux arbre à feuilles persistantes à feuilles larges. Il se produit en Europe et en Afrique du Nord et est également couramment cultivé. Le genre *Ilex* est entièrement dioïque bien qu'occasionnellement arbres hermaphrodites et les changements de sexe mâle-femelle ont été observés. Les fleurs sont groupées à l'aisselle positions sur les tournages réalisés l'année précédente. Le fruit, qui mûrit en automne, est une drupe contenant quatre pyrènes, qui sont typiquement des oiseaux Dispersé. (JOSE' et al 1998).

Tableaux 02 : Classification Botanique de *Ilex aquifolium* *Ilex aquifolium* (Ould hennia et al.,2018)

| | |
|--------------------|----------------------|
| <i>Règne</i> | <i>Plantae</i> |
| <i>Sous-Règne</i> | <i>Tracheobionta</i> |
| <i>Division</i> | <i>Magnoliophyta</i> |
| <i>Classe</i> | <i>Magnoliopsida</i> |
| <i>Sous-Classe</i> | <i>Rosidae</i> |
| <i>Ordre</i> | <i>Celastrales</i> |
| <i>Famille</i> | <i>Aquifoliaceae</i> |
| <i>Genre</i> | <i>Ilex</i> |



Figure 11. *Ilex aquifolium* (Ould hennia et al,2018)



Figure 12. *Ilex aquifolium* (Peter Pröbstle . 2021)

1. Caractérisation Botanique de l'*Ilex aquifolium* L

Ilex (*I. aquifolium* L., *I. aquifolium* 'Argentea Marginata' and *I. × meserveae* 'Blue Angel') (Emil et al., 2021) ou Le houx commun ou est un arbuste à croissance très lente, à port buissonneux, dont la taille adulte est généralement de quatre à six mètres. Le houx peut vivre jusqu'à 300 ans. Son écorce est gris pâle et lisse. Ses feuilles alternes, simples, ont un pétiole court et un limbe de 5 à 7 cm de long, coriace, de forme générale ovale, au bord ondulé et épineux, parfois lisse sur les individus âgés. D'un vert brillant foncé (luisant) à leur face supérieure, plus pâles sur leur face inférieure, elles sont munies d'épines acérées. C'est une espèce dioïque, Les fleurs blanches, de petite taille (6 mm de diamètre environ), Les fruits rouge éclatant, parfois jaunes sont toxiques.(Ould hennia et al,2018). Qui poussent pendant la période des mois d'août-décembre et les fleurs apparaissent entre avril et juillet. (Doreen et al., 2019)

2. Description géographique de l'*Ilex aquifolium* L

Le genre *Ilex* comprend environ 810 espèces poussant et présentes dans le climats tempérés et subtropicaux des deux hémisphères . La diversité la plus importante de l'espèce *Ilex* se trouve en Amérique du Sud et en Asie de l'Est. En Pologne, le genre houx n'est pas présent sur les peuplements naturels mais, en raison de la climat de transition, il a été cultivé sous plusieurs espèces à feuilles

Chapitre II.

persistantes, qui poussent le mieux dans les régions les plus chaudes de l'ouest et du sud-ouest de la Pologne, qui sont caractérisée par des hivers relativement doux. *Ilex aquifolium* pousse dans les climats tempérés et subtropicaux, habitant principalement l'ouest d'Europe, de l'Espagne et de la France à l'ouest de la Norvège, les montagnes de l'Atlas en Afrique, et les parties nord de la Turquie et du Caucase (Natalia et ., al 2021).



Figure 13 . Répartition géographique mondiale de *Ilex aquifolium* (Gregor Aas . 2021)

3. Utilisation médicinales de *Ilex aquifolium* L

Depuis longtemps en médecine traditionnelle le houx commun il étaient également utilisées pour leur propriétés thérapeutique comme ;antipyrétique, astringents et diurétiques. Et pour traiter les fièvre, et le rhumatisme .

Les feuilles et les fruits utilisée pour traiter ; l'estomac, les intestins ,les cancers du foie (Doreen et al.,2019) les fruits parfois toxique.

4. Composition phytochimique de la plante de *Ilex aquifolium* L

En fonction de l'origine des différentes voies biochimiques, les métabolites produits par les plantes peuvent être divisés en trois groupes chimiques : les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques .

Des études phytochimiques réalisées sur *I. aquifolium* ont révélé la présence de diverses métabolites secondaires tels que les terpénoïdes, les anthocyanes, les flavonoïdes et les stérols . Il a été démontré que les espèces européennes d'*Ilex* contiennent une grande quantité de fractions polyphénoliques telles que comme la rutine, l'acide quinique et ses esters de caféoyl, les triterpènes glycosidiques. (*Natalia et al., 2021*). et les acides gras, alcools, glucides, caroténoïdes, cyanogène, des glucosides, les acides aminés , caroténoïdes, cyanogène des glucosides, et les stérols. (*Nurgün . 2008*).

5. Activités biologiques de *Ilex aquifolium* L

Dans certains études les extraits des feuilles de *Ilex aquifolium* dans plusieurs solvants organiques ont montré une activité antibactérienne contre les bactéries comme ; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella Typhimurium* et *Candida albicans*(*Natalia et al., 2021*) .et aussi une activité antifongique et anti-inflammatoire (*Emil et al.,2021*)

Partie II. Etude Expérimentale

Matériel et Méthode

I. Matériel et Méthode

1.1. Matériel végétale ;

Dans cette étude, l'échantillon du matériel végétal c'est la plantes de *Ilex aquifolium* L à été récoltés dans la wilaya de Annaba la région de Seraïdie . Le moins de janvier 2022. La plante à débarrassé de tous les éléments étrangers et séché à l'aire libre pendant 30 jours puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine.

II. Méthode

2.1 Extraction par macération à l'eau

Selon la méthode décrit Par (Coulibaly et *al.*, 2011)100 g de la poudre végétale broyé. Sont misent à macérer dans 500 ml d'eau distillée sous agitation magnétique chauffante jusqu'à ébullition pendant 20 mn.

Le macérât aqueux obtenu est soumis à la double filtration sur papier filtre . Les filtrats obtenus sont concentrés à l'évaporateur rotatif (Rotavapor) à la température de 45°C et 50°C respectivement puis séchage à l'étuve (45 °C) pendant 24 h, l'extrait brut a été stocké dans des flacons stériles. Après avoir déterminer le rendement d'extrait puis le conservé (**Chaabane et *al.*, 2020**)

Le Rendement %= (le poids de ballon après évaporation - le poids du ballon vide) / le poids de matière végétales .calculé par rapport à100 g du poids sec de la plante.

2.2 Étude phytochimique de l'extrait de la plante :

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur une solution de l'extrait aqueux dissout dans l'eau distillée , selon méthodes décrites par **Trease et Evans (1983)**.

Matériel et Méthode

2.2.1 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.

2.2.2 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 bleue-noire ou verdâtre.

2.2.3 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].

2.2.4 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.

2.2.5 Stérois 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 stérois et triterpènes.

Matériel et Méthode

2.2.6 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.

2.2.7. Coumarines

Introduire 1 ml d'extrait dans un tube, ajouter 0,5 ml de NH_4OH , mélanger et observer sous UV à 366 nm. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines.

2.2.8. 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 H_2SO_4 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]

2.2.9. 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.

2.2.10. 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 terpenoïdes.

Matériel et Méthode

III. Analyse de l'extrait

3.1. 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 milieu alcalin de la mixture phosphotungstic (WO_4^{-2}) phosphomolybdic (MnO_4^{-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 μ l d'échantillon ou de standard (préparés dans le méthanol) avec des dilutions convenables, Après 4 min, 800 μ l 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 μ g/ml) et est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait.

3.2. Dosage des flavonoïdes

L'évaluation quantitative des flavonoïdes dans les deux extraits selon la méthode du trichlorure d'aluminium (Baharun 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' $AlCl_3$. 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 μ g/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.

Matériel et Méthode

3.3. Evaluation de l'activité antioxydante

- **Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) :**

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.

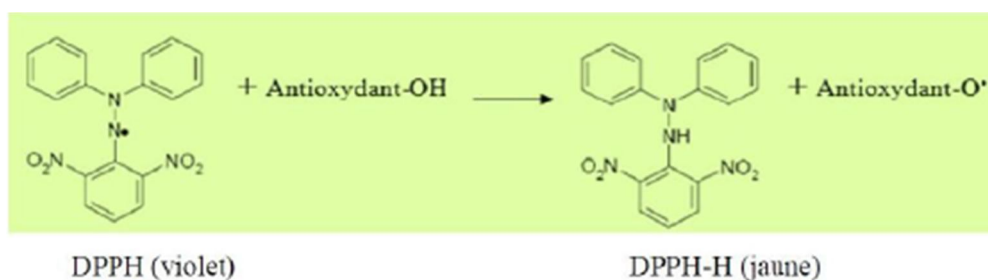


Figure 14 . Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

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

Matériel et Méthode

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.

- **Calcul de ARP** : C'est la puissance antiradicalaire ($1/IC50$)

3.4.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 Kieselgel 60F254 de 0,2 mm d'épaisseur (Merck) ont été employées pour la chromatographie sur couche mince en phase normale.

Phase mobile : Solvant: 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

Matériel et Méthode

une succession de partage des constituants entre les deux phases, ce qui permet une séparation des constituants entre les deux phases.

B- Révélations

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.

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 franchement positive est représentée par : +++.
- Une réaction moyennement positive est représentée par : ++.
- 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.

Résultat et discussion.

Résultat et discussion

I. Résultats

1.1. Détermination du rendement de la plante :

L'extrait aqueux 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 (tableau 04 et figure 15)

Tableau 03 : Le rendement d'extrait aqueux d'*Ilex aquifolium* L

| Quantité d'extrait a partir de 100 g de la poudre des feuilles | <i>Ilex aquifolium</i> L |
|--|--------------------------|
| Rendement en gramme (g) | 15.22 |
| Rendement en pourcentage (%) | 15,22 |

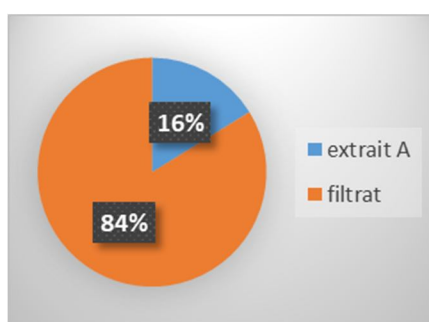


Figure 15 . Représentation graphique du rendement des feuilles d' *Ilex aquifolium* L après extraction aqueuse.

1.2. Etude phytochimique de l'extrait

1.2.1. Analyse qualitative :

Les tests phytochimiques réalisés sur l'extrait éthanolique des feuilles d'*Ilex aquifolium* L révèlent la présence de plusieurs familles de composés. Les résultats montrent la présence des flavonoïdes, tanins, mucilages, coumarines, stérols, terpènes, saponosides, alcaloïdes et oses et holosides avec absences des composés réducteurs (tableau 05).

Résultat et discussion

Tableau 04 : Résultats des tests phytochimiques

| N° | Composant | Extrait aqueux |
|----|------------------------|----------------|
| 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 | + |

1.3.Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalciu montre, en plus de sa sensibilité, une reproductibilité puisque l'absorbance est étroitement corrélée à la concentration de l'acide gallique utilisé dans la gamme étalon, $r^2 = 0.99$ (Annexe)

Les résultats de dosage de polyphénols révèlent que l'extrait aqueux des feuilles d'*Ilex aquifolium* L contient $102,2 \pm 0.88$ mg d'équivalent d'acide gallique / g de lyophilisat.

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 $r^2 = 0.99$ (Annexe). Les teneurs en flavonoïdes varient dans les mêmes proportions que celle des polyphénols: les résultats révèlent la présence de $62,86 \pm 1.0$ mg EQ/g extrait (tableau 06 , figure).

Résultat et discussion

Tableau 05 : Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans l'extrait aqueux des feuilles d'*Ilex aquifolium* L

| | Teneur en polyphénols (mg EAG /g) | Teneur en flavonoïdes (mg EQ/g extrait) |
|-----------------------------|-----------------------------------|---|
| d' <i>Ilex aquifolium</i> L | 102.2 ± 0.88 | 62,86 ± 1,0 |

1.4. Évaluation de l'activité antioxydante (DPPH)

L'activité anti radicalaire in vitro des flavonoïdes 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 est observé pour *Ilex aquifolium* L est de (33,21%), mais il reste un pouvoir inférieur à celui qu'exerce l'acide ascorbique (73,52%). Ce test nous a permis de déterminer la concentration inhibitrice piégeant 50% du radical DPPH°(IC50) qui était de (0,53 mg/ml) pour *Ilex aquifolium* L contre (0,032 mg/ml) pour l'acide ascorbique (**Figure 14**).

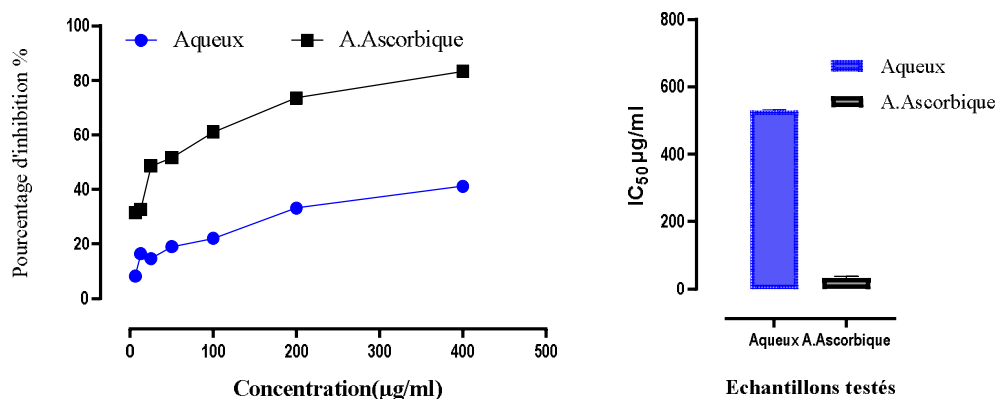


Figure 16 .Représentation graphique de l'effet antiradicalaire avec IC₅₀ d'*Ilex aquifolium* L sur le radical DPPH°

Calcul de ARP : C'est une paramètres de la puissance antiradicalaire (1/IC50)de l'extrait aqueux de la plante de *Ilex aquifolium* L.

$$ARP=1/IC50$$

$$= 1.89 \text{ mg /ml}$$

Résultat et discussion

II. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Tableau 06 : Résultat de la chromatographie sur couche mince de l'extrait aqueux

| S1 (Extrait aqueux) | Rapport frontal | Les composés |
|---------------------|-----------------|--|
| 1 : 4.3 | 0.47 | Acide p-coumarique 3.7 Dihydroxyflavone |
| 2 : 2.2 | 0.24 | Morine, Flavone |

La chromatographie sur couche mince c'est une méthode de séparation des plusieurs constitution facile et rapide pour identifier les composés d'un mélange, les deux extrait subit une séparation selon les deux systèmes 1 et 2 .

Les composés ce identifiée selon la comparaison les Rf des deux extrait éthanolique et aqueux avec Rf de standard, les résultats obtenus présentés dans le tableau. La présence des tâches indique la présence des métabolites secondaires.

Par le biais du système 1 et 2 on observe l'extrait éthanolique analysé montre la présence de 7 composés de différents Rf, par apport l'extrait aqueux et montre la présence seulement de 2 composés.

Il est préférable d'employer des mélanges de solvants organiques appropriés avec l'eau, sachant que la majorité des polyphénols ne sont pas hydrosolubles. L'eau augmente la solubilité des flavonoïdes, et elle dépend du nombre de groupement du poids moléculaire et de la longueur de la chaîne carbonée du squelette de base (Bennouna et *al.* , 2021)

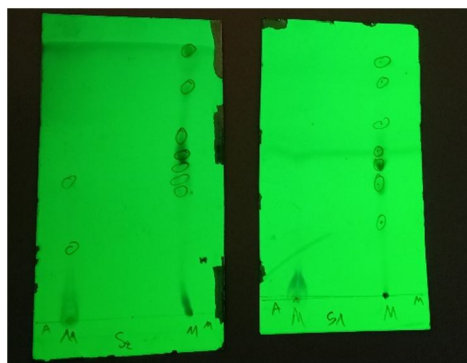


Figure 17 : Chromatographie sur couche mince

Discussion :

La caractérisation de nouvelles molécules bioactives à partir d'extraits de plantes, qui sont des mélanges complexes, fait intervenir différentes étapes dont les principales sont l'extraction, l'identification de ces molécules bioactives par des analyses phytochimique et l'évaluation de leurs activités biologiques par différents tests *in vitro* et *in vivo*.

Le rendement de l'extraction aqueuse par rapport au poids sec de la poudre végétale des feuilles de la plante *Ilex aquifolium L* est de l'ordre de 15.22 %. Différent à celui de Anna et *al.*, 2015), qui ont travaillé sur plusieurs espèces du même genre et ont trouvé un rendement équivalent à 21.8 % pour *Ilex aquifolium*, 24.3 % pour l'espèce *Ilex paraguariensis* et 12.8 % pour l'espèce *Ilex meserveae*.

Le Rendement d'extraction est influencé par plusieurs facteurs: la méthode d'extraction utilisée, la température, le pH, la taille des particules dans l'extrait, le temps de l'extraction, et la nature du solvant..

Le Screening phytochimique consiste à détecter des métabolites secondaires dans notre extrait par des réactions qualitatives. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette. (Boumidouna et *al.*, 2020)

Résultat et discussion

Le screening phytochimique réalisé, a révélé la richesse de notre plante *Ilex aquifolium* L en métabolites secondaire comme : les flavonoïdes, tanins, mucilages, , stérols, terpènes, saponosides , alcaloïdes et oses et holosides .

En comparant nos résultats avec d'autres études, on trouve que les plantes de ce genre contiennent principalement des polyphénols et alcaloïdes. (**Ren-You et al., 2018**) . et des quantités considérables de terpénoïde, du sucre et des profils d'acides phénoliques . et des saponines (**Sudhir et al., 2012**)et(**Natalia et al ., 2021**) de *Ilex aquifolium* L et *Ilex paraguariensis* et *I. kudingcha*

D'après nos résultats, l'extrait aqueux montre une activité antioxydante élevée avec une activité inhibitrice $IC_{50} = 0.53$ mg/ml mais qui reste toujours inférieure à celle du l'acide ascorbique (standard) avec une activité inhibitrice $IC_{50} = 0.032$ mg / ml .

Le pouvoir anti radicalaire le plus élevé est observé pour *Ilex aquifolium* L est de (33,21%), mais il reste un pouvoir inférieur à celui qu'exerce l'acide ascorbique (73,52). Par rapport l'étude de Stéphanie et al., 2009) sur *Ilex paraguariensis* qui a montrée un pouvoir antioxydant de l'ordre de (71.75 %). Ce test nous a permis de déterminer la concentration inhibitrice piégeant 50% du radical DPPH°(IC_{50}) qui était de (0,53 mg/ml) pour *Ilex aquifolium* L par rapport à l'acide ascorbique (0,032 mg/ml). Ce résultat est inférieur à celui de **Lutfun et al ., (2005)** qui est de $1,50 \cdot 10^{-3}$ et de $2,55 \cdot 10^{-3}$ mg mL⁻¹ pour la même espèce. .

Nos résultats de dosage des polyphénols totaux de l'extrait aqueux de la plante *Ilex aquifolium* L qui varient entre $102,2 \pm 0.88$ mg d'équivalent d'acide gallique / g de lyophilisat . Inférieur à celui trouvé par (**Stéphanie et al., 2009**) **qui est** de l'ordre de (202.6 ± 5.16) mg d'équivalent d'acide gallique / g matière sèche de(*Ilex paraguariensis*) .

Dans notre travail les résultats de travail montre une teneur des flavonoïdes de l'extrait aqueux des feuilles de la plante de *Ilex aquifolium* L : $62,86 \pm 1.0$ mg EQ/g .supérieur à celle de (**Lutfun et al ., 2005**) qui est de entre (1.5×10^{-3} ,

Résultat et discussion

2.55×10^{-3} and 2.88×10^{-5} mg /ml⁻¹) comparables avec les résultats de (**Avaliação et al., 2022**) qui est de l'ordre de $44,07 \pm 5,56$ mg QE / g de l'extrait aqueux de la plante *Ilex paraguariensis* et inférieur à celle de (**Débora C et al., 2013**) varié de 268,06 à 421,75 mg CTE / L de thé de *Ilex paraguariensis* .

Nos résultats de chromatographie sur couche mince de l'extrait aqueux des feuilles de la plante *Ilex aquifolium* L montre une migration de deux composés (par apport l'extrait éthanolique. Comparables à ceux de (**Lutfun et al., 2005**) de l'extrait de DCM (dichlorométhane) contenaient principalement des alcanes à longue chaîne et des alcools gras, des acides et les esters . Par à apport les résultats de (**Anna et al., 2015**)Jusqu'à 20 composés polyphénoliques ont été identifiée dans les feuilles de *Ilex aquifolium* L

Conclusion et prescriptives

Conclusion et prescriptives

Conclusion et prescriptives

De nos jours les plantes médicinales restent la source prédominante dans les recherches scientifiques et biomédicales.

Dans la présente étude la plante médicinale *Ilex aquifolium L* collecté le moins de janvier 2022 à l'Est de l'Algérie. à été utilisée pour déterminer les composition chimiques ainsi que l'évaluation des activités biologique et thérapeutique de la partie aérienne de la plante de *Ilex aquifolium L* .

Dans ce contexte :

Les tests phytochimiques à été réalisé montre la richesse de l'extrait aqueux des feuilles de la plante de *Ilex aquifolium L* en différents métabolites secondaire tel que : les alcaloïdes, tanins, polyphénols, flavonoïdes, saponosides , terpenoïdes, mucilage, coumarins, stéroles, oses, holosides et l'absence des composé réducteurs.

phytochimique et au pouvoir antioxydant de la plante de *Ilex aquifolium L*. Cette diversité explique les grandes utilisations en médecine traditionnelle.

L'extraction aqueux montré un rendement élevé de l'ordre de 15 .22 % . que l'extraction éthanolique qui montre une faible rendement de 13 .79 % .

-Concernant l'activité antioxydant, nous avons étudié le pouvoir antioxydante de la partie aérienne de l'extrait aqueux de la plante de *Ilex aquifolium L* par la capacité de piégeage de radical DPPH

qui montré une activité antioxydante la plus élevée, par un concentration inhibitrice $IC_{50} = 0.53$ mg /ml

- le dosage de polyphénols totaux montre une teneurs élevé de l'extrait aqueux équivalente de $102,2 \pm 0.88$ mg d'équivalent d'acide gallique / g de matière sèche.

- Ainsi , le dosage de flavonoïdes montre une teneur élevé de l'ordre de : $62,86 \pm 1.0$ mg EQ/g

Conclusion et prescriptives

-Alors que l'étude chromatographique sur la couche de mince qui montre l'absence de migration de composés l'extrait aqueux par rapport à une migration élevée des composés de l'extrait éthanolique de nos collègues

On peut conclure que, les résultats totaux obtenus au cours de cette étude est ouvert montre que la plante médicinale *Ilex aquifolium L* très riche en différents métabolites secondaires bioactives et des composants antioxydants très forts qui peuvent être utilisés en plusieurs domaines médicaux et thérapeutiques, pharmaceutiques et industriels

En prescriptives, nous recommandons à l'avenir une étude in-vivo telle que : une activité anti-cancéreuse, anti-inflammatoire , anti-diabétique ... ainsi que : L'identification des composants par la chromatographie sur couche mince et l'évaluation de l'activité antioxydante par : la méthode de ABTS , Frap..

ANNEXE

Annexes :

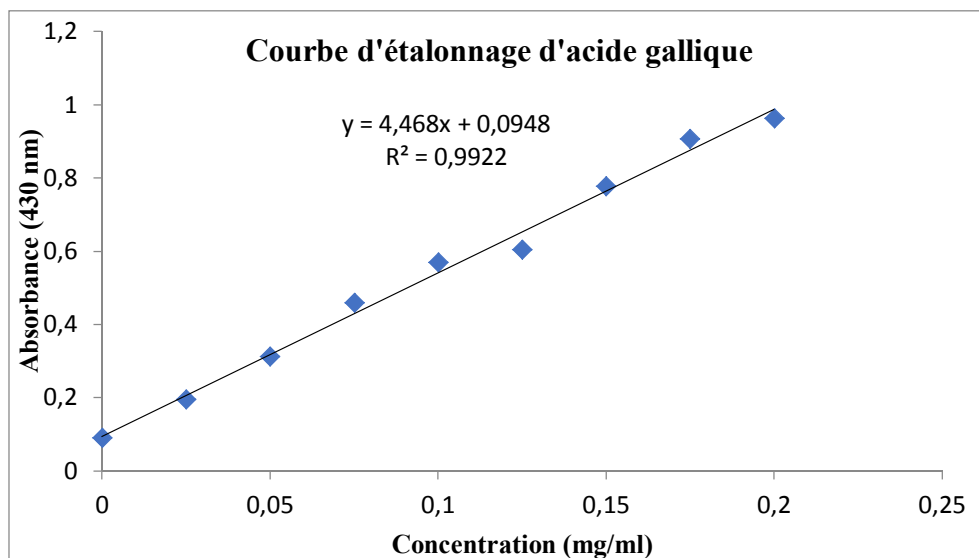


Figure 19 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

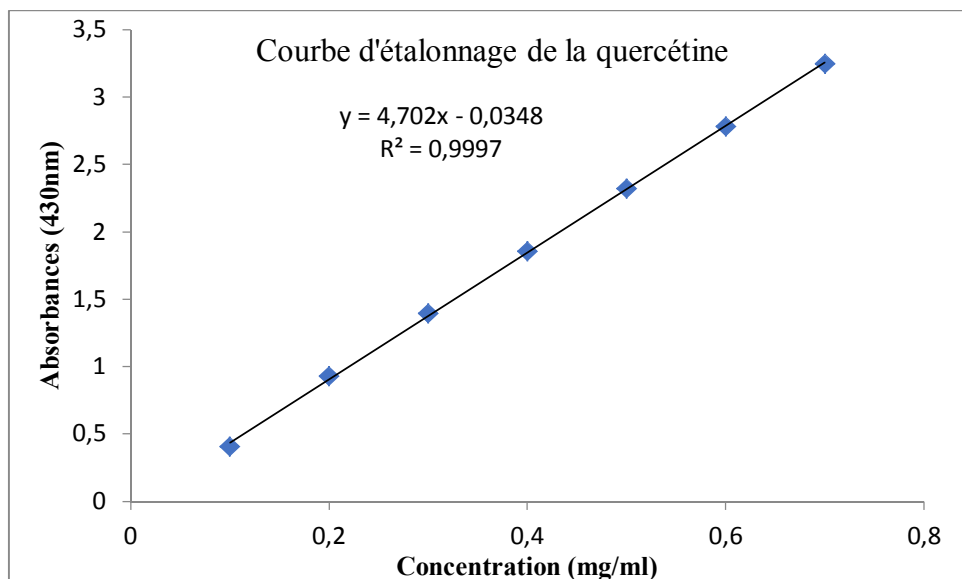


Figure 20 : Courbe d' étalonnage de la quercétine

Référence Bibliographique

Référence Bibliographique

A

Abderrazak El Alami , Farouk Loubna et Abderrahman Chait

Ammari, H. 2021. Étude phytochimique de la plante« *Artemisia campestris* L . mémoire de master. Page 19.

B

Bahorun, T.,Gressier, B.,Trotin, F., Brunet,C., Dine, T., etLucur, M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts fromh a wthomorgans and pharmaceutical preparations *Ar neimittel- 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, 923-934.

Bensalek,F.(2014).L'utilisation des plantes médicinales pour le traitement des troubles fonctionnels intestinaux dans le contexte marocain . Thèse de doctorat. Page 34 , 36 ,37.

Boubendir,F et *al.*(2021). Etude de l'activité biologique des métabolites secondaires d'une plante médicinale : *Olea europaea* L. mémoire de master .

Boulouaret,W,. et *al* (2020) . Etude chimique et biologique des huiles essentielles et des métabolites secondaires de deux plantes médicinales : *Myrtus communis* L. et *Mentha pulegium* . Mémoire de master université Mohammed Seddik Ben Yahia – Jijel

Boumidouna,A et *al.* (2019). Contribution à l'étude phytochimique (par chromatographie à couche mince : CCM), des activités antibactériennes et des activités antioxydantes de l'extrait des feuilles de myrte (*Myrtus Cummnis* L.) de la région du nord constantinoise.C (A) page 19 mémoire de master. Université de djelfa.

Référence Bibliographique

C

Chaachouay , N. (2020) Etude floristique et ethnomédicinale des plantes aromatiques et médicinales dans le Rie (Nord du Maroc).Thèse de doctorat.

D

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

E

Edeogal H.O., Okwu D. E. et Mbaebie B.O. (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* Vol. 4 (7); p: 685-68.

El Alami, A., et al. Etude ethnobotanique sur les plantes médicinales spontanées poussant dans le versant nord de l'Atlas d'Azilal (Maroc) 4:2 (2016) 271-282.DOI:10.1025/ajnp.2016.4.2.282

Elkali, M. , et al (2021) . Screening phytochimique et biologique des flavonoïdes page 09 mémoire de master . Université de M 'sila .

Erb, M., & Kliebenstein, D. J. (2020). Plant secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: the blurred functional trichotomy. *Plant physiology*, 184(1), 39-52.

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

G

Gagui, A., et al (2021) Etude phytochimique de la plante *Rétama sphaerocarpa* (L) Boiss et évaluation de son activité antibactérienne . Mémoire de master université de M'sila.

Référence Bibliographique

Gan, R. Y., Zhang, D., Wang, M., & Corke, H. (2018). Health benefits of bioactive compounds from the genus *Ilex*, a source of traditional caffeinated beverages. *Nutrients*, *10*(11), 1682.

Geogr S., Brat P., Alter P et Amiot J.M. (2005) .Rapid determination of polyphénols and Vitamin C in plant-derived products. *J. Agr. Food Chem.* *53*; p: 1370-1373.

Ghedadba, N., Hambaba, L., Ayachi, A. *et al.* Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie* *13*, 118–129 (2015).

<https://doi.org/10.1007/s10298-015-0944-4>

GUETTAF , A. *et al* (2020). Biologie et métabolisme secondaire de genre *Daucus*. mémoire de master 2020 page 33.

H

Herrera, C. M., & Bazaga, P. (2013). Epigenetic correlates of plant phenotypic plasticity: DNA methylation differs between prickly and nonprickly leaves in heterophyllous *Ilex aquifolium* (Aquifoliaceae) trees. *Botanical Journal of the Linnean Society*, *171*(3), 441-452.

J

Jain, P. K., & Joshi, H. (2012). Coumarin: chemical and pharmacological profile. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *2*(6), 236-240.

Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., & Amini-Khoei, H. (2018). Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of herbmed pharmacology*, *7*(1).

Janice ,T.2021.Étude des altérations fonctionnelles des cellules endothéliales Cérébrales en condition hyperglycémique associée au diabète : rôle protecteur des polyphénols de plantes médicinales . Thèse de doctorat. page 149.

Référence Bibliographique

K

K Kothiyal, S., C Sati, S., SM Rawat, M., D Sati, M., K Semwal, D., B Semwal, R., ... & Kumar, A. (2012). Chemical constituents and biological significance of the genus *Ilex* (Aquifoliaceae). *The Natural Products Journal*, 2(3), 212-224.

Krief, S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. page 7. Thèse de doctorat. université MNHN PARIS, 2003.

L

LAHSISSENE H., KAHOUADJI A., TIJANE M. & HSEINI S., «CATALOGUE DES PLANTES MEDICINALES UTILISÉES DANS LA RÉGION DE ZAËR (MAROC OCCIDENTAL)», *Lejeunia, Revue de Botanique* [En ligne], N° 186 (décembre 2009), URL : <https://popups.uliege.be/0457-4184/index.php?id=701>.

DOI:10.1025/ajnp.2016.4.2.282

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. *Foodchem.* 102; p: 771-776.

M

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.

Mauro, N. M. (2006). Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs: la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine. *Th. Doctorat, université Joseph Fourier-GRENOBLE, 1*, 186.

Référence Bibliographique

MEHANIE, M.(2015) Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'Eucalyptus camendulensis dans la région de Ouargla page 29 30 31 .

Muanda, F. N. (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. *Université Paul Verlaine-Metz*, 238.

N

Nabila TAHRI*, Abdelkrim EL BASTI, Lahcen ZIDANE, Atmane ROCHDI, Allal DOUIRA . Etude Ethnobotanique Des Plantes Medicinales Dans La Province De Settat (Maroc). 2012. 12 (2): 192-208 . doi

Nahar, L., Russell, W. R., Middleton, M., Shoeb, M., & Sarker, S. D. (2005). Antioxidant phenylacetic acid derivatives from the seeds of *Ilex aquifolium*. *Acta Pharmaceutica*, 55(2), 187-193.

Nahdi . K ., et al (2020) Extraction et caractérisation d'huile essentielle de fenouil vulgare page 24.mémoire de master. *Univérsité Oum El Bouaghi*, .
Nguinambaye, M. M., Nana, R., Savadogo, A., Djinet, I. A., & Tamini, Z. (2015). Composés organiques et activités antioxydantes de *Ampelocissus multistriata* du Tchad. *Journal of Applied Biosciences*, 91, 8470-8492. Doi : [10.4314 / jab.v91i1.7](https://doi.org/10.4314/jab.v91i1.7).

O

Obeso, J. R. N., Alvarez-Santullano, M., & Retuerto, R. N. (1998). Sex ratios, size distributions, and sexual dimorphism in the dioecious tree *Ilex aquifolium* (Aquifoliaceae). *American Journal of Botany*, 85(11), 1602-1608. Doi : [10.2307 / 2446488](https://doi.org/10.2307/2446488) .

P

Pachura N, Kupczyński R, Sycz J, Kuklińska A, Zwyrzykowska-Wodzińska A, Wińska K, Owczarek A, Kuropka P, Nowaczyk R, Bąbalewski P, Szumny A. Biological Potential and Chemical Profile of European Varieties of *Ilex*. *Foods*.

Référence Bibliographique

2021 Dec 25;11(1):47. doi: 10.3390/foods11010047. PMID: 35010173; PMCID: PMC8750822.

Pachura N, Kupczyński R, Sycz J, Kuklińska A, Zwyrzykowska-Wodzińska A, Wińska K, Owczarek A, Kuropka P, Nowaczyk R, Bąbelewski P, Szumny A. Biological Potential and Chemical Profile of European Varieties of *Ilex*. *Foods*. 2021 Dec 25;11(1):47. doi: 10.3390/foods11010047. PMID: 35010173; PMCID: PMC8750822.

Paluch, E., Okińczyc, P., Zwyrzykowska-Wodzińska, A., Szperlik, J., Żarowska, B., Duda-Madej, A., ... & Szumny, A. (2021). Composition and Antimicrobial Activity of Ilex Leaves Water Extracts. *Molecules*, 26(24), 7442.

S

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.

Santos, A. F., Schiefer, E. M., Surek, M., Martins, C. A. F., Worfel, P. R., Sasaki, G. L., ... & de Souza, W. M. (2022). Chemical, biological, and pharmacological evaluation of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis*, St. Hill.(Aquifoliaceae). *Research, Society and Development*, 11(2), e3011225335-e3011225335. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25335>

T

Taïlé, J. (2021). *Étude des altérations fonctionnelles des cellules endothéliales cérébrales en condition hyperglycémique associée au diabète: rôle protecteur des polyphénols de plantes médicinales* (Doctoral dissertation, Université de la Réunion)

Titi, S., et al (2021). Etude de l'activité biologique des métabolites secondaires d'une plante médicinale: *Olea europaea* L. Boubendir Faiza Titi Sabrina page 9 .Mémoire de master. Université de Jijel.

Référence Bibliographique

TORRES R. (2006). Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudates of *Haplopappus multifolius*; *Phytochemistry* 67; Ed: ELSEVIER; p: 984-987

Toure, D. (2015). *Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques medicinales de côte d'ivoire* (Doctoral dissertation, Université Felix Houphoeut Boigny, Côte d'Ivoire).

Trease, G. E., et Evans, W. C.(1983).Textbook of Pharmacognosy (BalliereTmdall) London 57- 59.

Y

Yao, X., Song, Y., Yang, J. B., Tan, Y. H., & Corlett, R. T. (2021). Phylogeny and biogeography of the hollies (*Ilex* L., Aquifoliaceae). *Journal of Systematics and Evolution*, 59(1), 73-82.

Yao, X., Song, Y., Yang, J. B., Tan, Y. H., & Corlett, R. T. (2021). Phylogeny and biogeography of the hollies (*Ilex* L., Aquifoliaceae). *Journal of Systematics and Evolution*, 59(1), 73-82.p 73.

Yinyang, J., Mpondo, E. M., Tchatat, M., Ndjib, R. C., Ottou, P. M., & Dibong, S. D. (2014). Les plantes à alcaloïdes utilisées par les populations de la ville de Douala (Cameroun). *Journal of Applied Biosciences*, 78, 6600-6619.

Z

Zaki, P. H., Gandaseca, S., Rashidi, N. M., & Ismail, M. H. (2019). Traditional usage of medicinal plants by Temiar tribes in the State of Kelantan, Peninsular Malaysia. *Forest and Society*, 3(2), 227-234.

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). DOI: 10.1515/chem-2015-0142