الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de BIOCHIMIE

N°……/SNV/2024

MÉMOIRE

Pour l'obtention du Diplôme de

MASTER

Filière : Science biologique

Spécialité: Biochimie Appliquée

THÈME

Activités antioxydantes et anticoagulantes des extraits des polyphénols du *Cratægus Azarolus* L.

Présenté par

Djellabi Radhia Ouiam & Djilani Nour El houda

Soutenue publiquement le 30/06/2024

Devant le jury

Président BELATTAR Noureddine	Grade	Pr. UFA Sétif 1
Encadreur GHERAIBIA Sara	Grade	MCB. UFA Sétif 1
Examinatrice AGGOUN Loubna	Grade	MAA. UFA Sétif 1

2023/2024


بسم الله الرحمن الرحيم

Remerciement

Avant tout, nous remercions ***Allah****, le Tout-Puissant, de nous avoir donné la santé, la force, le courage et la patience nécessaires pour accomplir ce modeste travail*

Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre encadreur, Dr ***Gheraibia Sara****, pour sa gentillesse, la confiance et l'intérêt qu'elle nous a témoignés tout au long de ce travail, ainsi que pour son aide précieuse et ses conseils pertinents.*

Nous exprimons nos profonds remerciements aux membres de jury Pr ***Belattar Noureddine*** *et Dr* ***Aggoune Loubna*** *pour avoir accepté de juger notre travail.*

Nous tenons à remercier toute l'équipe du laboratoire de biochimie, sous la direction du Professeur ***Belattar Noureddine,*** *pour son soutien et son aide tout au long de la période de pratique.*

Nous n'oublions pas de remercier tous les enseignants du département de biochimie, faculté SNV, en particulier Pr. ***Charef Noureddine*** *et Pr.* ***Gasmi Lakhdar****.*

Enfin, nous remercions tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à réaliser ce travail.





Dédicace

Je dédie ce travail

*À mes chers **parents**, qui m'ont toujours encouragée et soutenue tout au long de mes études, pour tous les sacrifices qu'ils ont consentis pour mon instruction et mon bien-être. J'espère qu'Allah vous protège, vous accorde une longue vie et vous garde en bonne santé.*

*À mes très chers frères **Sofiane** et **Acil**.*

*Dédicace spéciale à ma chère amie **Alia**, pour notre amitié et tous les moments inoubliables que nous avons partagés ensemble pendant nos 12 ans d'étude. Je suis extrêmement reconnaissante de t'avoir à mes côtés.*

*À ma chère amie **Malak**, pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble.*

*À mon chère binôme **Nour**, avec qui j'ai partagé de bons souvenirs et des moments difficiles pour réaliser ce travail.*

À tous mes amis, à tous ceux que j'aime.

À tous mes enseignants, du primaire à l'université.

À toute la promotion de biochimie appliquée 2024.

Wiam





Dédicace

Avec une profonde reconnaissance et une gratitude infinie, je commence par remercier ***Allah****, le Tout-Puissant, pour Ses bénédictions immenses et Sa guidance infaillible tout au long de ce parcours.*

Je dédie ce mémoire de fin d'étude : A mes chers parents ***Aziz*** *et* ***Souad*** *Merci d'avoir toujours été là pour moi, de m'avoir offert les moyens de réussir et de m'avoir inspiré à poursuivre mes rêves. Votre dévouement et votre amour sont les fondations sur lesquelles repose ce travail.*

À mes sœurs ***Khadidja*** *et* ***Aicha*** *et à mon frère* ***Amine****, Votre présence, vos rires et vos encouragements ont été une source de motivation constante. Vous avez été mes compagnons de route, mes confidents et mon soutien indéfectible. Ce mémoire est pour vous, en signe de reconnaissance et d'affection profonde.*

À mes deux familles ***Djilani*** *et* ***Guemeida*** *merci pour votre encouragement.*

À mes incroyables sœurs ***Nour*** *et* ***Nada*** *et* ***ghozlane****,a vous qui avez partagé avec moi les défis, les succès et les moments de doute de ces années universitaires, je dédie ce mémoire. Votre amitié a été une ancre de stabilité et une source constante de motivation.*

A mon cher binôme, ***Wiam*** *Pour sa entente et sa sympathie.*

Nour el Houda



Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antioxydante et anticoagulante après un screening phytochimique et la quantification des composés bioactifs, notamment les polyphénols et les flavonoïdes, de trois extraits phénoliques (aqueux, hydro-éthanolique et hydro-méthanolique) des feuilles de *Crataegus Azarolus* récoltées dans la région de Beni-Aziz, wilaya de Sétif. L'extraction, effectuée par ultrasons après une délipidation par Soxhlet, a montré des rendements de 10,11 %, 20,37 % et 17,28 % respectivement pour les extraits aqueux, hydro-éthanolique et hydro-méthanolique. La teneur en polyphénols totaux la plus élevée a été enregistrée pour l'extrait hydro-méthanolique, suivi par l'extrait aqueux et enfin l'extrait hydro-éthanolique, qui a donné un taux proche de celui de l'eau. En ce qui concerne les flavonoïdes, la teneur la plus élevée a été obtenue avec l'extrait aqueux, suivi par l'extrait hydro-éthanolique et l'extrait hydro-méthanolique. Le screening phytochimique a révélé la présence de tanins, coumarines et sucres réducteurs dans les trois extraits. En revanche, les saponines et les anthocyanes étaient présents uniquement dans les deux extraits hydro-alcooliques et absents dans l'extrait aqueux. Les alcaloïdes et l'amidon étaient totalement absents de ces extraits. L'activité antioxydante a été évaluée par deux tests : DPPH et Phénanthroline.les résultats indiquent que les trois extraits possèdent une activité antiradicalaire vis-à-vis du DPPH. L'extrait aqueux était le plus actif avec une IC50 de 87,22 µg/ml, suivi par l'extrait hyro-éthanolique (IC50 = 365,37 µg/ml) et l'extrait hydro-méthanolique (IC50 = 559,15 µg/ml). Les résultats de test Phénanthroline montrent que tous les extraits sont capables de réduire le fer et de former un complexe Fe^{2+}phénanthroline, l'extrait hydro-éthanolique présentant la meilleure activité de réduction du fer. L'activité anticoagulante des extraits phénoliques a également été évaluée in vitro, Les résultats indiquent que les trois extraits possèdent une activité anticoagulante relativement importante et dose-dépendante.

Mots clés : *Crataegus Azarolus*, polyphénols,screening phytochimique, activité antioxydante, activité anticoagulante.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم النشاط المضاد للأكسدة والمضاد للتخثر لثلاثة مستخلصات فينولية (مائي وإيثانولي المائي وميثانولي المائي) من أوراق *Cratægus Azarolus* االتي تم حصادها في منطقة بني عزيز بولاية سطيف، وذلك بعد فحص المواد الكيميائية النباتية وتحديد كمية المركبات النشطة بيولوجياً، وخاصة البوليفينول والفلافونويد. أظهر الاستخلاص، الذي تم إجراؤه بواسطة الموجات فوق الصوتية بعد إزالة الدهون، إنتاجية بلغت 10.11% و 20.37% و17.28% للمستخلصات المائية والإيثانولي المائي والميثانولي المائي على التوالي. تم تسجيل أعلى محتوى إجمالي من البوليفينول في المستخلص الميثانولي يليه المستخلص المائي وأخيراً المستخلص الإيثانولي المائي الذي أعطى مستوى قريب من مستوى الماء. أما بالنسبة لمركبات الفلافونويد، فقد تم الحصول على أعلى محتوى في المستخلص المائي، يليه المستخلص الإيثانولي المائي ثم المستخلص الميثانولي المائي. كشف الفحص الكيميائي النباتي عن وجود العفص والكومارين والسكريات المختزلة في المستخلصات الثلاثة. إلا أن الصابونين والأنثوسيانين كانا موجودين فقط في المستخلصين الكحوليين وغابوا في المستخلص المائي. وكانت القلويدات والنشا غائبة تماماً من هذه المستخلصات. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام طريقتين DPPH وphananthroline . تشير النتائج إلى أن جميع المستخلصات الثلاثة لها نشاط جيد في مسح الجذور الحرة ضد DPPH. وكان المستخلص المائي هو الأكثر نشاطاً حيث بلغ تركيزه IC50 87.22 ميكروغرام/مليلتر، يليه المستخلص الإيثانولي المائي (IC50 = 365.37ميكروغرام/مليلتر) والمستخلص الميثانولي المائي (ميكروغرام/مليلتر IC50 = 559.15). تُظهر نتائج طريقة الفينانثرولين أن جميع المستخلصات قادرة على اختزال الحديد وتكوين مركب Fe^{2+}الفينانثرولين، حيث أظهر المستخلص الإيثانولي المائي أفضل نشاط لاختزال الحديد. كما تم تقييم النشاط المضاد للتخثر للمستخلصات الفينولية في المختبر، تشير النتائج إلى أن جميع المستخلصات الثلاثة لها نشاط مضاد للتخثر يعتمد على الجرعة العالية نسبياً.

الكلمات المفتاحية : *Cratægus Azarolus*، بوليفينول ، فحص كيميائي نباتي، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للتخثر.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the antioxidant and anticoagulant activity after phytochemical screening and quantification of bioactive compounds, notably polyphenols and flavonoids, of three phenolic extracts (aqueous, hydro-ethanolic and hydro-methanolic) from *Crataegus Azarolus* leaves harvested in the Beni-Aziz region, wilaya of Sétif. Extraction, carried out by ultrasound after Soxhlet delipidation, showed the yields of 10.11 %, 20.37 % . The highest total polyphenol content was recorded for the methanolic extract, followed by the aqueous extract and finally the ethanolic extract, which yielded a level close to that of water. As for flavonoids, the highest content was obtained with the aqueous extract, followed by the hydro-ethanolic and hydro-methanolic extracts. Phytochemical screening revealed the presence of tannins, coumarins and reducing sugars in all three extracts. On the other hand, saponins and anthocyanins were present only in the two alcoholic extracts and absent in the aqueous extract. Alkaloids and starch were totally absent from these extracts. Antioxidant activity was assessed using two tests : DPPH method and Phenanthroline method. The results indicate that all three extracts have good free radical scavenging activity against DPPH. The aqueous extract was the most active with an IC50 of 87.22 µg/ml, followed by the hydro-ethanolic extract (IC50 = 365.37 µg/ml) and the hydro-methanolic extract (IC50 = 559.15 µg/ml). The results of the Phenanthroline method show that all the extracts are capable of reducing iron and forming a Fe^{2+}phenanthroline complex, with the hydro-ethanolic extract showing the best iron reduction activity. The anticoagulant activity of the phenolic extracts was also assessed in vitro, the results indicate that all three extracts have a relatively high dose-dependent anticoagulant activity.

Keywords : *Crataegus Azarolus*, polyphenols, phytochemical screening, antioxidant activity, anticoagulant activity.

Liste des abréviations

$A_{0.5}$: Concentration de l'échantillon donnant une absorbance de 0,5

Abs : Absorbance

ADN : Acide Désoxyribonucléique

$AlCl_3$: Trichlorure d'Aluminium

BHA : Butyl Hydroxy Anisole

BHT : Butyl Hydroxy Toluène

CAT : Catalase

ERO : Espèces Réactifs de l'oxygène

Fe^{+3} : lons ferriques

Fe^{2+} : lons ferreux

I% : Pourcentage d'inhibition

IC50 : Concentration inhibitrice à 50%

MF : Matière fraiche

MS : matière sèche

ROS ; Réactive Oxygen Species

Liste des figures

Figure N°	Titre	Page
01	*Cratægus Azarolus et Cratægus Monoguna*	**03**
02	Les Fleurs d'azérolier	**05**
03	Les Feuilles d'azérolier	**05**
04	Les Fruits et les graines d'azérolier	**06**
05	Structure de base d'un flavonoïde	**12**
06	Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques	**14**
07	Structures chimiques des acides hydroxycinnamiques	**14**
08	Structure du comarine	**15**
09	Structure de tanin hydrolysable	**15**
10	Structure de tanin condense	**16**
11	Structure du stilbène	**16**
12	Structures monomères de lignine	**17**
13	Balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants	**18**
14	Schéma simplifié de la cascade de coagulation	**22**
15	Broyage de la plante	**24**
16	Éxtraction de la matière grasse	**25**

17	Extraction des composés phénoliques par ultrasons	**27**
18	Protocle d'extraction des composes phénoliques	**27**
19	Forme réduite du radical DPPH	**31**
20	Formation du complexe ferreux-phénanthroline en présence d'un antioxydant	**32**
21	Test colorimétrique des ions ferreux à la phénanthroline	**32**
22	Évaluation du L'activité anticoagulante	**33**
23	Teneur en lipides des feuilles de *C. Azarolus*	**34**
24	Rendements d'extraction des composés phénoliques de Cratægus Azarolus L., pour les trois solvants.	**35**
25	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	**36**
26	Resultats des dosages des polyphenols en µg EAG/mg d'extrait	**37**
27	Courbe d'étalonnage de la rutine	**38**
28	Résultats des dosages des flavonoïdes en µg Eq Rut/mg d'extrait	**39**
29	Pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH en fonction des differentes concentrations des trois extraits de *C.Azarolus*.	**44**
30	Valeurs des IC50 du test DPPH	**45**
31	Valeurs des $A_{0.5}$ extraits et de BHT du test Phénanthroline	**46**
32	Capacité anticoagulante des extraits de *C.Azarolus*	**47**

Liste des tableaux

Tableau N°	Titre	Page
01	Composition vitaminique des fruits d'azérole	**07**
02	Teneur en éléments minéraux de fruit d'azéroler	**07**
03	Principale classes de flavonoïde	**13**
04	Facteurs de la coagulation	**21**
05	Résultats du screening phytochimique des trois extraits de *C. Azarolus*	**41**

Sommaire

Remerciement

Dédicace

Résumé

ملخص

Abstract

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Synthèse bibliographique

I.1. l'Aubépine 3

I.2. Cratægus Azarolus L 3

I.2.1. Étymologie et classification 3

I.2.2. Description Botanique 4

I.2.3. Répartition géographique 6

I.2.4. Composition chimique de *Crateagus Azarolus* 6

I.2.5. Les Activités biologiques et propriétés thérapeutiques du *Cratægus Azarolus* 8

II. Métabolites secondaire 10

II.1. Alcaloïdes 10

II.2. Terpènes 10

II.3. Polyphénols 11

II.3.1. Flavonoïdes 11

II.3.2. Acides phénoliques 13

II.3.2. Coumarines 14

II.3.4. Tanins 15

II.3.5. Stilbènes 16

II.3.6. Lignanes et lignines 16

III. Les activités biologiques 17

III.1. L'activité antioxydante 17

III.1. Stress oxydatif 17

III.1.2. Radicaux libres 18

III.1.3. Anti-oxydants 18

III.1.4. Classification des antioxydants 19

III.2. Activité anticoagulante 20

III.2.1. Système de Coagulation 20
III.2.2. Déroulement de la coagulation 21
III.2.4. Les anticoagulants 22
Matériel et méthodes
I.Matériel Végétal 24
I.1. La récolte 24
II. Méthodes 24
II.1. Séchage et broyage 24
II.2. Délipidation 24
II.3. Extraction des composés phénoliques 26
II.4. Dosage des composés phénoliques 28
II.4.1. Dosage des phénols totaux 28
II.4.2. Dosage des flavonoïdes 28
II.5. Screening phytochimique 29
II.6. Evaluation de L'activité antioxydante 30
II.6.1 Activité antiradicalaire par le test DPPH 30
II.6.2. Test de Phénanthroline 32
II.7. Evaluation de l'activité anticoagulante 33
Résultats et Discussion
III.1. Rendement 34
III.1.1. Rendement de l'extraction du lipide 34
III.1.2. Rendement d'extraction des composés phénoliques 35
III.2. Quantification des composés phénoliques 36
III.2.1. Dosage du polyphénols totaux 36
III.2.2. Dosage du flavonoïde 38
III.3. Screening phytochimique 39
III.4. Evaluation de l'activité antioxydante 44
III.4.1. Test au radical DPPH 44
III.4.2. Activité de phénanthroline 46
III.5. Evaluation de l'activité Anticoagulante 47
Conclusion et Perspectives 49
Références Bibliographique 51