



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire de fin d'études

Présenté par :

Bouteldja Fayçal et Madeni Farouk

Pour l'obtention du diplôme de

Master en : BIOLOGIE

Spécialité : Biochimie appliquée

Thème

L'étude *in vitro* de l'activité antioxydantes anti-inflammatoire des polyphénols et caroténoïdes de la griffe de sorcière *Carpobrotus edulis* L.

Soutenu publiquement le : 15/09/2018

Devant le Jury

Président	Dr. Chaalal A	MCA	U. Mostaganem
Encadreur	Dr. Mokhtar MMCA		U. Mostaganem
Examinatrice	Mme Boukazoula NMAB		U. Mostaganem

Année universitaire 2017-2018

Remerciements

Au terme de ce modeste travail, nous tenons à remercier beaucoup notre promotrice M^{lle} Mokhtar Meriem. Pour avoir acceptée de nous encadrer ainsi que pour sa disponibilité, son suivi, son aide et conseils et surtout sa compréhension.

Nous tenons à remercier aussi :

- Le président du jury, Dr. Chaalal Ade nous avoir consacré de son temps et d'avoir accepté de présider le jury.
- L'examinatrice, Mme Boukazoula N d'avoir acceptée de juger notre travail.

Nous remercions la technicienne du laboratoire de biochimie 03 Mme Amir

Enfin, nous adressons tous nos remerciements à tous ceux qui ont participés de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Dédicaces

.....Dédicaces à nos familles, nos proches, ainsi que nos amis.

Liste des abréviations

% : Pour cent

A₀ : L'absorbance de FeCl₃.

A₁ : L'absorbance de FeCl₃ solution en présence de l'extrait

AA : Acide arachidonique

AAE : Equivalent d'acide ascorbique

°C:Degré Celsius

C .edulis: Carpobrotus. Edulis

CRP : Protéine C réactive

DPPH: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

EAG : Equivalent d'acide gallique

ED : Equivalent de Déclofinac

ERAs: Espèces réactives dérivées de l'azote

EROs : Espèces réactives dérivées de l'oxygène

Fe²⁺ :Fer ferreux

Fe³⁺ :Fer ferrique

FeCl₃ :Chlorure de fer

FM : Matière fraîche

FRAP:Ferricreducing-*antioxidant* power ou réduction du fer

G: Gramme

GR : Globule rouge

H: Heure

H₂O₂ :Peroxyde d'hydrogène

Hcl : Acide chlorhydrique.

H₃PMo₁₂O₄₀:Acide phosphomolybdique

H₃PW₁₂O₄₀ :Acide phosphotungstique

HO[•] : Radical hydroxyle

HOCl : 'Acide hypochloreux

IFN- :Interferon alpha

IL-4 : Interleukine 4

IL-5 : Interleukine 5

IL-6 : Interleukine 6

IL-8: Interleukine 8

IL-13: Interleukine 13

K₃Fe(CN)₆ :Solution de ferricyanure de potassium

LPS : Lipopolysaccharide

M₀ : Masse en gramme de la matière végétale initiale.

M₁ : Masse en gramme de l'extrait final.

Min : Minute

ml : Millilitre

mM :Millimolaire.

Mo₈O₂₃ :Molybdène

mMol :Millimole

Mg : Milligramme

NF- B : Facteur de transcription

Nm : Nanomètre

NO:NitricOxide.

NOS : Oxyde nitrique synthase ou monoxyde d'azote synthase

O₂:Oxygene

p/v : Poids /volume

pH : Potentiel d'hydrogène

R : Rendement de l'extraction en %

R² : Coefficient de corrélation

Redox : Réduction/ oxydation

RO[•] : Radical alkoxyle

ROO[•] :Radicaux peroxyde

SME : Stabilisation de la membrane des érythrocytes

TNF- : TumorNecrosis Factor ouFacteur de nécrose tumorale

µg : Microgramme

µL : Microlitre

W₈O₂₃ :Tungstène

La liste des tableaux

Tableau 1 :Structure des acides phénoliques.....	09
Tableau 2 : Sources principales de quelques caroténoïdes ayant une importance nutritionne	12
Tableau 3 :Rendement de l'extraction des polyphénols et des caroténoïdes.....	21
Tableau 4 : Polyphénols et flavonoïdes totaux de <i>Carpobrotus edulis</i> L.....	23
Tableau 5 :Détermination des Caroténoïdes totaux de <i>C. edulis</i> d'Ouriaa et Stidia.....	27
Tableau 6 :Activité antioxydante des polyphénols et caroténoïdes de <i>C.edulis</i>	30

La liste des figures

Figure 1 :Les principales classes de composés phénoliques.....	08
Figure 2 : Structure des flavonoïdes (aglycones) et position des principaux substituants	10
Figure 3 : Structures chimiques de quelques caroténoïdes	13
Figure 4 : <i>Carpobrotus edulis</i> de la région d'Ouriaa.....	15
Figure 5 : <i>Carpobrotus edulis</i> de la région de Stidia.....	15
Figure 6 :Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	22
Figure 7 :Courbe d'étalonnage de la quercétine	24
Figure 8 :La courbe d'étalonnage de la β -carotène.....	26
Figure 9 :Courbe d'étalonnage de trolox (test DPPH).....	29
Figure 10 : Courbe d'étalonnage de Fe (II) (test FRAP).....	29
Figure 11 Courbe d'étalonnage de Diclofénac (test de l'albumine).....	32
Figure 12 : Courbe d'étalonnage de la Diclofénac (SME).....	33

La table des matières

Introduction.....	01
<u>CHAPITRE I : Partie bibliographique</u>	
I.1. Les plantes extrêmophiles	04
I.1.1. Les plantes xérophytes.....	04
I.1. 2. Les halophytes.....	04
I.2. <i>Carpobrotus edulis</i>	05
I .2.1 Généralités.....	05
I. 2.2. Taxonomie.....	06
I. 2.3. Principaux constituants chimiques de <i>Carpobrotus edulis</i>	07
I. 3. Les polyphénols	07
I. 3.1. Généralités.....	07
I. 3.2. Classification	07
Les acides phénoliques.....	07
Les lignanes	09
Les coumarines	09
Tanins.....	09
Les flavonoïdes.....	10
I. 4. Les caroténoïdes.....	11
I. 4.1. Généralités.....	11
I. 4.2. Structure chimique.....	11
<u>Chapitre II :Matériels et méthodes</u>	
II. 1. Origine de la plante.....	15
II. 2. Extraction des polyphénols.....	16
II. 2.1 Détermination de rendement d'extraction	16

II. 2.2 Dosage des polyphénols totaux	17
II. 2.2.1 Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	17
II. 2.2.2 Calcul des polyphénols totaux	17
II. 3. Détermination des caroténoïdes totaux	17
II. 3. 1. Extraction des caroténoïdes totaux.....	17
II. 3.2 Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique.....	17
II. 4 Détermination des flavonoïdes totaux	17
II. 4. 1 Courbe d'étalonnage de la quercétine	17
II. 4. 2 Calcul des flavonoïdes des totaux	18
II. 5. Evaluation de l'activité antioxydante	18
II. 5. 1. Test de réduction du radical stable DPPH.....	18
II. 5. 2. Test de la réduction de fer (FRAP).....	19
II. 6. L'activité anti-inflammatoire	19
II. 6. 1. Test de la dénaturation d'albumine	19
II. 6. 2. Test de stabilisation de la membrane des érythrocytes.....	19

Chapitre III : Résultats et discussions

III.1. Calcul du rendement de l'extraction.....	21
III.2. Dosage des polyphénols totaux	22
III. 2. 1. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	22
III. 2.2. Quantification des polyphénols totaux	22
III. 3. Dosage des flavonoïdes totaux	23
III. 3. 1. Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	23
III. 3. 2. Quantification des flavonoïdes totaux	23
III. 4 Dosage des caroténoïdes totaux.....	25

III. 4. 1. Courbe d'étalonnage de la β -carotène.....	25
III. 4.2. Quantification des caroténoïdes totaux	25
III. 5. Evaluation de l'activité antioxydante	27
III. 6. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire	30
III. 6. 1. Test de la dénaturation d'albumine.....	31
III. 6. 2. Test de stabilisation de la membrane des érythrocytes (SME).....	31
Conclusion	35
Références bibliographiques	37

Résumé

Le but de ce travail est le dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux , ainsi que les caroténoïdes de la griffe de sorcière (*Carpobrotus edulis* L.) provenant de deux régions de Mostaganem (Oureah et Stidia) et l'évaluation de son activité antioxydante et anti-inflammatoire. Le contenu en polyphénols, flavonoïdes et caroténoïdes totaux a été dosé par des méthodes colorimétriques. Les résultats obtenus ont montré que *Carpobrotus edulis* récoltée à Stidia renferme une quantité de polyphénols et flavonoïdes totaux légèrement supérieure à celle d'Oureah. En revanche, les fleurs mauves d'Oureah sont plus riche en caroténoïdes que les fleurs jaune pâle de Stidia. L'activité antioxydante est évaluée par deux tests: DPPH, FRAP. Selon les résultats, les caroténoïdes de *C. edulis* présente un bon effet antioxydant comparé aux polyphénols. En ce qui concerne le pouvoir anti-inflammatoire, deux tests ont été utilisés : la dénaturation d'albumine et stabilisation de la membrane des érythrocytes. Les polyphénols et caroténoïdes de cette plante ont pu inhiber la dénaturation des protéines et stabiliser la membrane des érythrocytes, mais l'effet des caroténoïdes était plus important.

Mots clé : *Carpobrotus edulis*, polyphénols, caroténoïdes, activité antioxydante, activité anti-inflammatoire.

Abstract

The aim of this study is the determination of total polyphenols and flavonoids, as well as carotenoids of Ice plant (*Carpobrotus edulis* L.) collected from Oureah and Stidia (Mostaganem) and the evaluation of its antioxidant and anti-inflammatory activities. The polyphenols, flavonoids and carotenoids contents were determined by colorimetric methods. The obtained results showed that *C. edulis* from Stidia has higher levels of polyphenols and flavonoids. On the other hand, the pink flowers of Oureah are richer in carotenoids. The antioxidant activity was evaluated by two tests: DPPH, FRAP. According to the results, the carotenoids of *Carpobrotus edulis* have a good antioxidant effect compared to polyphenols. In which concern the anti-inflammatory activity, two tests were used: the denaturation of albumin and stabilization of the erythrocyte membrane. Both polyphenols and carotenoids extracts inhibit protein denaturation and were able to stabilize the erythrocyte membrane, but the effect of carotenoids was more important.

Keywords: *Carpobrotus edulis*, polyphenols, carotenoids, antioxidant activity, anti-inflammatory activity.

Introduction

Les produits d'origine naturelle prennent de plus en plus une place importante dans l'industrie pharmaceutique et agronomique. En effet, un certain nombre de produits chimiques issus de la synthèse organique nécessite une pharmacovigilance en raison de leurs effets indésirables.

Les stratégies de recherche de substances naturelles actives à partir de plantes sont souvent basées sur des approches ethnobotaniques, mettant en avant l'utilisation de ces plantes en médecine traditionnelle par les populations locales. Mais les plantes médicinales ne représentent pas l'unique réservoir en molécules potentiellement actives. De nouvelles approches ont fait leur preuve, notamment, la prise en compte de l'écosystème dans lequel se développent les espèces végétales.

En effet, l'exposition aux contraintes environnementales stimule, chez certains types de plantes, des réponses d'adaptation parmi lesquelles l'accumulation de molécules issues du métabolisme secondaire tels que les polyphénols et les caroténoïdes, qui se sont avérés actives contre différentes pathologies végétales et humaines.

De récentes études ont montré que ces micronutriments pouvaient agir indirectement sur le stress oxydant en stimulant l'expression et l'activité des systèmes de défense. Toutefois, il est désormais admis que leurs effets ne se limitent pas à leurs propriétés antioxydantes directes ou indirectes et de récentes données ont suggéré que les polyphénols avaient la capacité d'agir sur l'expression des gènes ainsi que sur de nombreuses voies de signalisation impliquées dans des processus pathologiques comme l'inflammation.

Des recherches approfondies sur les propriétés médicinales des polyphénols et des caroténoïdes sont en cours dans de nombreux pays. Les bienfaits de ces nutriments pour la santé sont surtout liés à leurs propriétés anti-oxydantes.

Carpobrotus.edulis, une des plantes qui suscite beaucoup d'intérêt pour son riche contenu de ces nutriments, la raison pour laquelle elle est largement utilisée traditionnellement dans plusieurs pays commel'Australie, ou le sud d'Afrique pour sa valeur médicinale.

Dans ce contexte, ce travail a eu pour objectif l'étude de l'activité antioxydante et anti-inflammatoire des polyphénols et des caroténoïdes de la griffe de sorcière (*Carpobrotus edulis* L.).

CHAPITRE I :

Partie bibliographique

I.1. Les plantes extrémophiles

Il s'agit de végétaux qui se développent de manière optimale dans des conditions abiotiques extrêmes, au sein desquelles d'autres végétaux ne peuvent subsister. Ce sont des plantes qui, de par la nature spécialement sévère de leur milieu, ont subi une forte pression de sélection qui s'est traduite par leur capacité d'adaptation. On distingue les halophytes, plantes tolérantes à la salinité, des xérophytes qui sont plutôt tolérantes aux conditions de sécheresse. Bien que tolérantes à des conditions abiotiques différentes, leur mécanisme de réponses à ces contraintes se rejoignent dans la mesure où la contrainte saline se traduit chez la plante par une situation de déficit en eau sur le plan physiologique (Flowers et *al.* 2015 ; Xu et *al.* 2016).

I.1.1. Les plantes xérophytes

Les xérophytes peuplent les biotopes secs ou arides correspondant à un manque d'eau ou à sa faible disponibilité, notamment les zones à pluviosité réduite et les zones arides et sahariennes. Leurs capacités à subsister à de telles conditions est régie par deux stratégies adaptatives, la limitation des pertes d'eau ou le stockage de l'eau. Les xérophytes qui sont capables de limiter les pertes d'eau sont dites sclérophytes. Ce sont des plantes coriaces caractérisées par un épiderme à cuticule épaisse qui permet de limiter la transpiration (Flowers et *al.*, 2015 ; Xu et *al.*, 2016).

I.1. 2. Les halophytes

Les halophytes, plantes natives des écosystèmes salins, présentent des intérêts économiques (alimentation humaine, fourragers), écologiques (fixation des sols et des dunes et aménagement des parcs) et médicinaux (source importante des substances bioactives) (Li et *al.*, 2010).

Les halophytes couvrent les sols salins, y compris les régions côtières, les marais et les sebkhas. La contrainte saline induit des changements au niveau du statut hydrique de la plante, réduit le contenu relatif en eau des feuilles, diminue la transpiration et l'absorption hydrique par les racines, d'où une convergence des mécanismes d'adaptation avec ceux des xérophytes. On retrouve donc des réponses au stress salin par la réduction des surfaces foliaires permettant la diminution des pertes d'eau, mais aussi des mécanismes de stockage de

l'eau grâce à la succulence caulinare et foliaire (parenchyme aquifère) (Vartanian et *al.*, 1984).

I.2. *Carpobrotus edulis*

I.2.1. Généralités

Carpobrotus edulis est une plante halophyte, herbacée, robuste, formant un tapis dense de feuilles persistantes qui peut s'étaler sur plusieurs mètres. Les tiges longues et ramifiées s'enracinent à chaque nœud et continuent leur croissance, dressée à leur extrémité, tandis que parties les plus anciennes se dessèchent ; la plante avance ainsi (Vilà et *al.*, 2008 ; Pirie et *al.*, 2014).

Les feuilles opposées sont succulentes, trigones, longues de 6 à 13 cm pour environ 1 cm de large ; légèrement recourbées en coupe et dentelées sur leur bords externes, c'est cette forme qui leur a valu le surnom de griffes de sorcière ; Elles ne griffent ou ne piquent pourtant pas du tout. La production de feuilles est si importante, qu'elles ont été envisagées comme fourrage (Pirie et *al.*, 2014).

Le réseau de racines est dense sur une profondeur de 50 cm. Les fleurs sont des marguerites isolées jaunes pâles tirant sur le rose. Elles atteignent 10 à 15 cm de diamètre. Elles donnent naissance à un fruit qui reste charnu, et jaunit à maturité, en forme de figue. Il est en forme de toupies de 3.5 cm de diamètre et porté par une tige ailée. Ces fruits produisent de nombreuses graines (1000 à 1800 graines par fruit, graine de 1mm de long).

Les espèces de *Carpobrotus* poussent sur la côte pacifique d'Amérique, en Afrique du Sud et en Australie méridionale. La plupart des espèces poussent dans les régions côtières, ainsi que dans les zones sablonneuses. Ils peuvent être utiles pour retenir le sable dérivant, et coloniser les zones rapidement perturbées où l'eau est peu disponible (Pirie et *al.*, 2014).

I.2.2. Taxonomie

Classification	
Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Caryophyllidae</i>
Ordre	<i>Caryophyllales</i>
Famille	<i>Aizoaceae</i>
Genre	<i>Carpobrotus</i>
Nom binominal	
<i>Carpobrotusedulis</i> (L.), N.E.Br., 1926	

I.2.3. Principaux constituants chimiques de *Carpobrotus edulis*

Cette plante contient de l'eau, des sels minéraux (Magnésium), des acides aminés (Proline), des acides phénoliques (acide ferulique), des flavonoïdes (rutine, neohesperidine, hyperoside, catechine et epicatechine), et des tanins. La plante produit généralement en réponse à un stress osmotique provoqué par la sécheresse ou par la salinité, des solutés compatibles tels que les sucres, les acides aminés, les polyols (myo-inositol, pinitol et ononitol), les bêtaïnes, la proline, et des ectoïnes dans les compartiments cytoplasmiques (Bohnert et shen, 2000 ;Bitrián et *al.*, 2012).

La plante accumule la proline comme soluté compatible en réponse à un stress osmotique qui est un acide aminé impliqué dans la production de collagène et la guérison des plaies, et est également un précurseur de l'hydroxyproline qui sert à maintenir et à guérir le cartilage, et à renforcer les articulations, les tendons et les muscles (Watanabe et *al.*, 1999 ; Arbona et *al.*, 2008).

Le fractionnement de l'extrait méthanolique des feuilles pourpres de la plante ont démontré la présence d'un composé phénolique reconnu comme un butylhydroxytoluène (BHT), un antioxydant puissant utilisé dans la conservation des aliments. Ce composé phénolique a présenté une activité antioxydant très élevée par rapport aux BHT synthétiques (Bouftira et *al.*, 2010).

I.3. Les polyphénols

I.3.1. Généralités

Les plantes sont connues pour produire un grand nombre de composés à faible poids moléculaire dont leurs structures ont été identifiées récemment, malgré leur exploitation et leur utilisation, depuis toujours, comme médicaments ou aliments (Garcia perez, 2012 ; Mokhtar, 2015). Parmi ces molécules on a les polyphénols, qui sont un groupe de composés phytochimiques d'origine naturelle, présents en grande quantité dans les fruits, les légumes et les produits naturels.

L'expression de « composés phénoliques » est utilisée pour toutes substances chimiques possédant dans sa structure un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles(-OH) (Bloor, 2001, Pelissero, 2014; Mokhtar, 2015).

I.3.2. Classification

Ils y'a plus de 8000 composés phénoliques répartis en plusieurs classes (figure 1), en fonction du nombre de noyaux phénoliques et des éléments structuraux reliés à ces noyaux ils sont classés en plusieurs familles dont celles des acides phénoliques (tableau1) et des flavonoïdes (figure2) sont représentatives (Robards et *al.*, 1999).

- Les acides phénoliques

On distingue deux classes d'acides phénoliques : les dérivés de l'acide benzoïque ou acides hydroxybenzoïques et les dérivés de l'acide cinnamique ou acides hydroxycinnamiques (tableau 1). Les premiers rentrent dans la structure de tanins hydrolysables et se trouvent dans des quantités généralement faibles dans les végétaux à l'exception de certains fruits rouges et du thé alors que les acides hydroxycinnamiques qui se trouvent rarement sous forme libre sont couramment rencontrés dans des fruits tels que les cerises, les pommes, les prunes etc...(Manach et *al.*, 2004 ; Mokhtar, 2015).

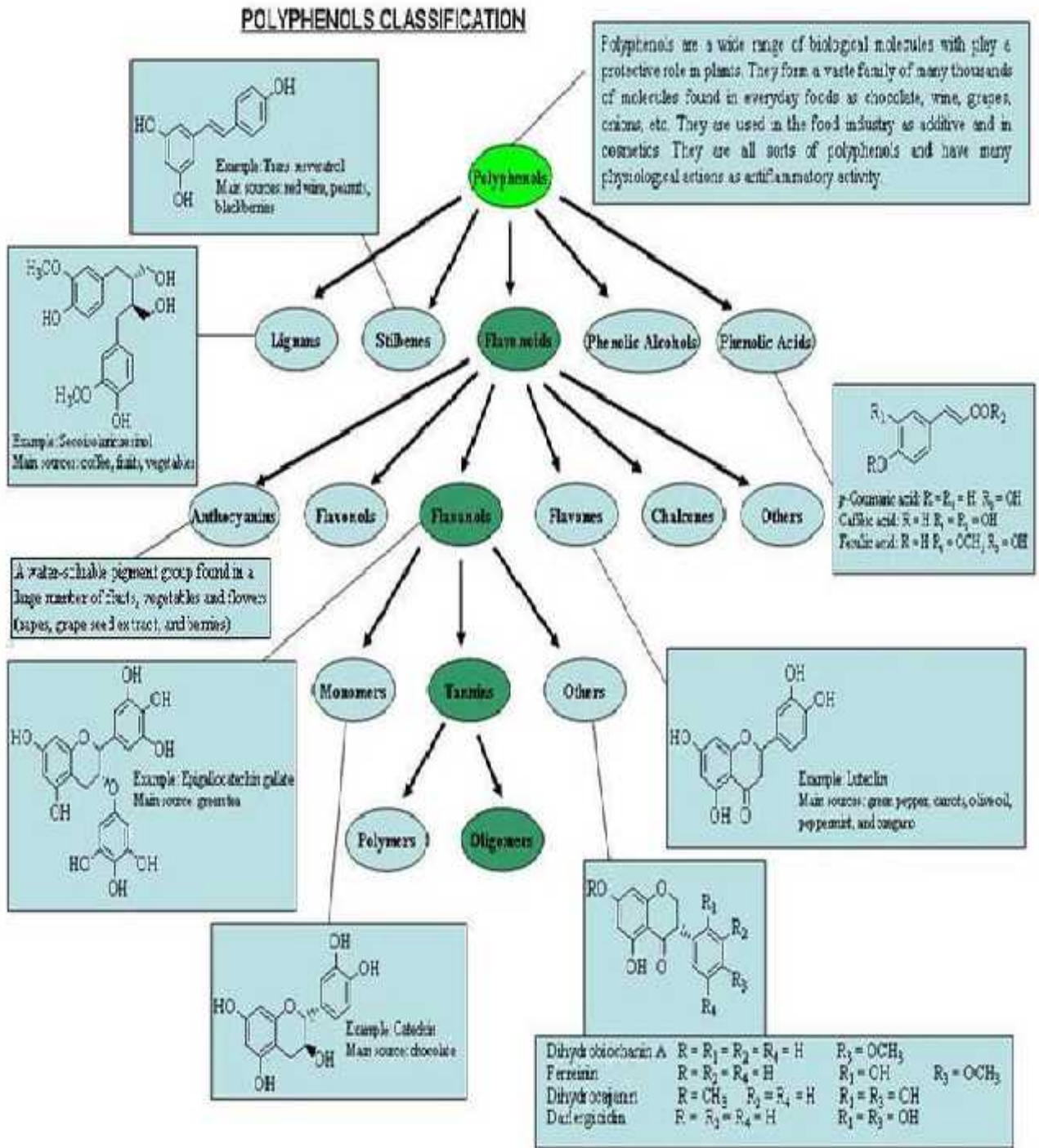


Figure 1 : Les principales classes de composés phénoliques (Ferrazzano et al., 2011).

- **Les lignanes**

Ces composés de haut poids molécules contribuent à former, avec la cellulose et les dérivés hémicellulosiques, la paroi des cellules végétales. Ce sont des polymères tridimensionnels résultant de la condensation (copolymérisation) de trois alcools phénylpropéniques(Nkhili, 2009).

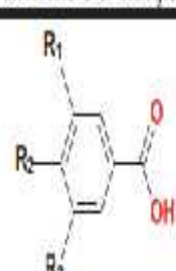
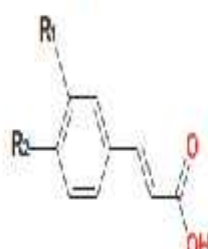
- **Les coumarines**

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés. Ils ont été isolés pour la première fois par Vogel en 1820 dans le *Coumarounaodorata*. Aujourd'hui, près de 1000 composés coumariniques sont isolés dans plus de 800 espèces de plantes et dans les microorganismes. (Muanda, 2010).

- **Tanins**

Ils représentent un groupe hétérogène assez difficile à définir de façon rigoureuse et concise car il n'y a pas de structure chimique de base. Leurs structures chimiques sont en effet variées et rassemblées en famille en fonction d'activités communes (Nkhili, 2009).

Tableau 1: Structure des acides phénoliques (Grigoras, 2012).

Acides phénoliques	Structure chimique	Exemples
Acides hydroxybenzoïques		$R_1 = R_3 = H ; R_2 = OH$: Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Acide galique $R_1 = R_2 = OH ; R_3 = H$: Acide protocatéchuïque $R_1 = H ; R_2 = OH ; R_3 = OCH_3$: Acide vanillique $R_1 = R_3 = OCH_3 ; R_2 = OH$: Acide syringique
Acides hydroxycinnamiques		$R_1 = R_2 = H$: Acide cinnamique $R_1 = OH ; R_2 = H$: Acide coumarique $R_1 = R_2 = OH$: Acide caféique $R_1 = OCH_3 ; R_2 = OH$: Acide férulique

- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les composés polyphénoliques les plus abondants contenus dans les végétaux. Leur structure (figure 2) comprend un squelette composé de deux cycles aromatiques (A et B) porteurs de plusieurs fonctions phénol et réunis par une chaîne de trois atomes de carbone, ces derniers étant le plus souvent engagés dans un hétérocycle avec un atome d'oxygène (Stoclet et Chini-Kerth, 2011). Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Mokhtar, 2015).

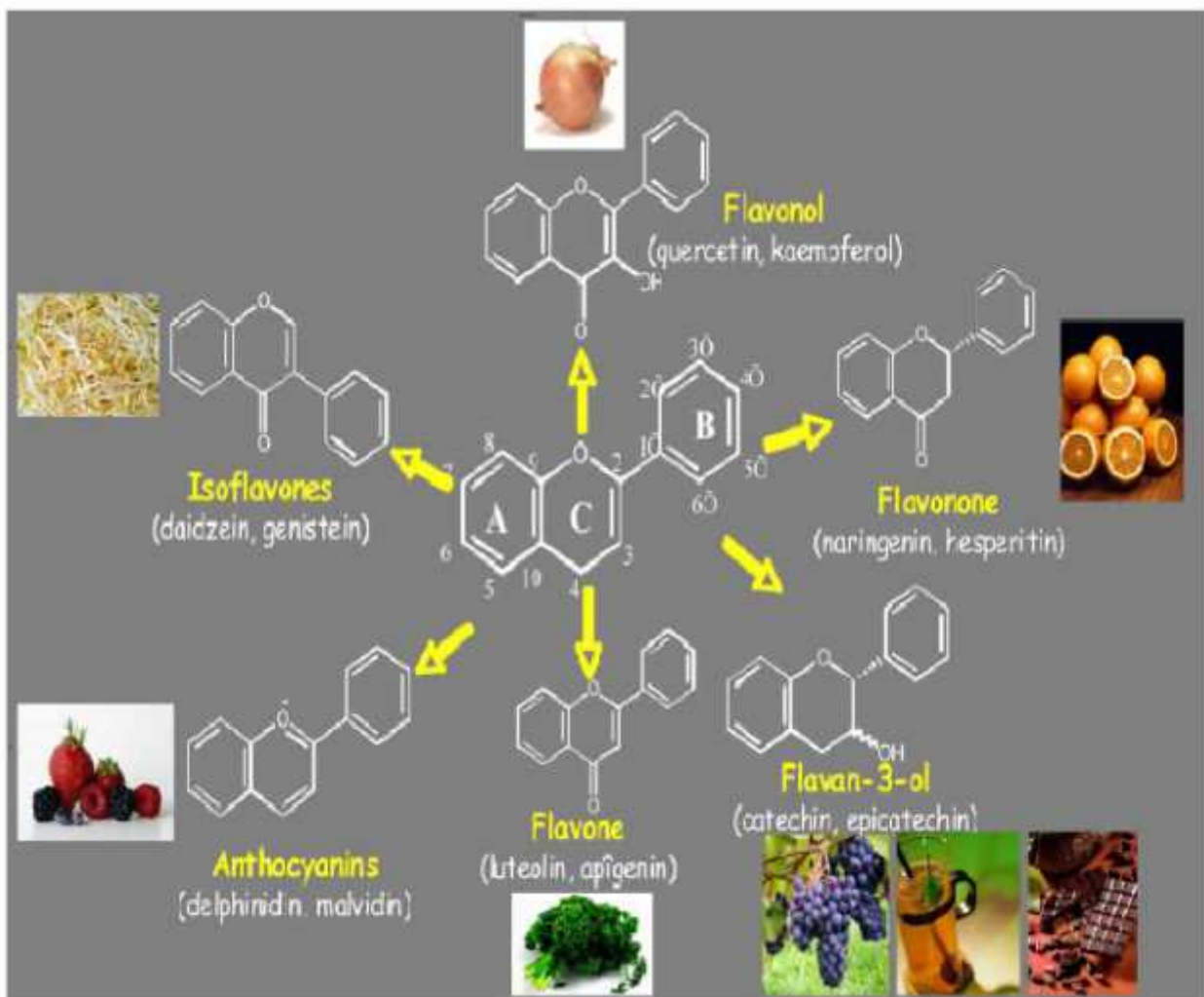


Figure 2 : Structure des flavonoïdes (aglycones) et position des principaux substituants (Stoclet et Chini-Kerth, 2011).

I.4. Les caroténoïdes

I.4.1. Généralités

Caroténoïde est un mot dérivé de "*Daucus Carota*" le nom latin de la carotte dont le - carotène fut extrait et isolé, pour la première fois, en 1831 par Wackenroder. Plus de 700 membres de cette famille sont aujourd'hui connus et la structure chimique de 500 d'entre eux est pleinement élucidée (Britton, 2004 ; Mokhtar, 2015) (tableau2).

Les caroténoïdes représentent un groupe de micronutriments qui peuvent se trouver dans plusieurs fruits et légumes ou ils sont à l'origine de leur coloration qui varie du jaune au rouge violacé (Maiani et *al.*, 2009). Plusieurs effets bénéfiques sur la santé ont été associés des aliments riches en caroténoïdes (Lemmens *et al.*, 2014).

Les caroténoïdes sont des métabolites secondaires principalement synthétisés par les végétaux et, dans une moindre mesure, par des levures, champignons, algues marines, microalgues ou certaines espèces bactériennes (Mokhtar, 2015). La couleur de certains crustacés (Homard, langouste), de poissons (saumon) ou d'oiseaux (flamant, cardinal) est due à des caroténoïdes présents dans leur alimentation. Lorsqu'un caroténoïde est associé à une protéine, la coloration peut être bleue ou verte (Reynaud, 2009).

I.4.2. Structure chimique

Les caroténoïdes sont des composés chimiques généralement en C40 constitués par 8 unités isopréniques (CS) jointes de façon à ce que la séquence soit inversée au centre. L'organisme humain est incapable de les synthétiser, ils sont fournis par l'alimentation (figure 13)(Reynaud, 2009 ; Mata-Gómez et *al.*, 2014).

Les caroténoïdes se divisent en deux classes de structure chimique différente : les carotènes, hydrocarbures insaturés, et les xanthophylles, dérivés oxygénés (Simonovska et *al.*, 2013). La structure des caroténoïdes les plus courants est donnée en Figure 3.

Tableau 2:Sources principales de quelques caroténoïdes ayant une importance nutritionnelle (Britton *et al.* 2009).

Caroténoïde	Sources alimentaires	Teneur*
β-Carotène	Abricot, brocoli, carotte, chou, mangue, huile de palme, épinard, patate douce	++++
	Chou de Bruxelles, mangue, pêche, poivron	+++
	Goyave, laitue, orange, papaye, petits pois, courge, tomate	++
	Beurre, pamplemousse, mandarine	+
β-Cryptoxanthine	Kaki, cerise de cayenne	+++
	Papaye, poivron, courge, mandarine	++
Lutéine	Brocoli, légumes-feuilles, poivron	++++
	Jaune d'oeuf, courge	++
Lycopène	Tomate, pastèque	++++
	Carotte, goyave	+++
	Pamplemousse rose, papaye,	++
	Abricot, kaki	+
Zéaxanthine	Poivron	++++
	Kaki, courge, maïs	++

* ++++ : teneur très élevée (>2 mg/100g de matière fraîche) ; +++ : teneur élevée (0,5 à 2 mg/100g) ; ++ : teneur modérée (0,1 à 0,5 mg/100g) ; + : faible teneur (0 à 0,1 mg/100g)

CHAPITRE II :

Matériels et méthodes

II. 1. La récolte de la plante

La griffe de sorcière (*carpobrotus.*) a été récoltée en mois de mai 2018, au niveau de Mazaghran dans la wilaya de Mostaganem, dans deux de ses plages : Stidia et Ouriaa.



Figure 4 : *Carpobrotus edulis* de la région d'Ouriaa.



Figure 5 : *Carpobrotus edulis* de la région de Stidia.

II. 2. Extraction des polyphénols

L'extraction des polyphénols a été effectuée selon la méthode de Mokhtar *et al.* (2014). 100g de feuilles fraîches broyées de *carpobrotus* des deux régions a été mélangée avec 200 mL de 0.05% (v/v) HCl/solvant (10:90) dans un sonicateur pendant 30min. Deux extractions ont été effectuées, la première avec le méthanol et la deuxième avec l'acétate d'éthyle. Les deux extraits ont été par la suite filtrés avec un papier Whatman (No. Z146374-100EA) et combinés. Le mélange a été évaporé avec un rotavapor à une température de 40°C.

II. 2.1 Détermination de rendement d'extraction :

Le rendement de l'extraction des polyphénols et des caroténoïdes a été exprimé en pourcentage et calculé selon la formule suivante :

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

R : rendement de l'extraction en %

M₁ : masse en gramme de l'extrait final.

M₀ : masse en gramme de la matière végétale initiale.

II. 2.2 Dosage des polyphénols totaux

II. 2.2.1 Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique a été effectuée en lisant l'absorbance des différentes concentrations (25, 50, 100 mg/ml) de l'acide gallique à une longueur d'onde de 725 nm.

II. 2.2.2 Calcul des polyphénols totaux

Le contenu en polyphénols totaux de l'extrait de *carpobrotus edulis* a été déterminé selon la méthode colorimétrique de Gutfinger (1981) en utilisant le réactif de Folin-

Ciocalteu. En milieu alcalin, les polyphénols réduisent l'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) et l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) de ce réactif en un mélange bleu d'oxyde de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}).

Un volume de 100 μ L de l'extrait est mélangé avec 4,9 ml d'eau distillée et 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu. Après une agitation vigoureuse du mélange suivie d'un repos de 3 minutes, 1 mL de solution de carbonate de sodium (35% p/v) est additionnée et le mélange a été complété par de l'eau distillé pour avoir un volume final de 10 mL. Après 30 min d'incubation en obscurité, l'absorbance a été mesurée à 725 nm. La teneur en phénols totaux de l'extrait est déterminée graphiquement et exprimée en termes d'équivalent d'acide gallique (mg /g d'extrait).

II. 3. Détermination des caroténoïdes totaux

II. 3. 1. Extraction des caroténoïdes totaux

La prise de 85g des fleurs de *C. edulis* récoltées de deux régions (Ouriaa et Stidia), les met dans un bécher, on les ajoute après 100 ml de méthanol, 100 ml de acétate éthyle, et 100 ml d'éther de pétrole ; On laisse le mélange se filtrer pendant 1 h, puis on refait le même procédé une deuxième fois. après on met les deux extraits dans plusieurs tubes pour une centrifugation de 15 min à 1500g , à la fin de la centrifugation , on récupère la phase supérieure . l'absorbance a été mesurée à 470 nm.

II.3.2 Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique

L'acide ascorbique est utilisé comme standard dans ce test. La courbe d'étalonnage est effectuée en lisant l'absorbance à une longueur d'onde de 470 nm

II. 4 Détermination des flavonoïdes totaux

II. 4. 1 Courbe d'étalonnage de la quercétine

La courbe d'étalonnage de la quercétine a été effectuée en lisant l'absorbance des différentes concentrations de quercétine (25, 50, 100 mg/mL) à une longueur d'onde de 415 nm.

II. 4. 2 Calcul des flavonoïdes des totaux

Le taux des flavonoïdes totaux a été estimé selon la méthode de Dowd adaptée par Arvouet-Grand et *al.*, (1994). Elle se base sur les propriétés chélatrices de l'ion aluminium. 1 ml de l'extrait phénolique a été mélangé avec le même volume du chlorure d'aluminium (2%). Après 10 min, l'absorbance a été mesurée à 415 nm contre un blanc qui contient l'échantillon sans le chlorure d'aluminium. Le taux des flavonoïdes a été exprimé par mg d'équivalent de quercétine / g d'extrait.

II. 5. Evaluation de l'activité antioxydante

Différentes techniques sont employées pour mesurer l'activité antioxydante des polyphénols et caroténoïdes de *carpobrotus*. Dans notre étude, on s'est basé sur deux méthodes : DPPH, et FRAP

II. 5. 1. Test de réduction du radical stable DPPH

La capacité à piéger le radical DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl) des polyphénols a été évaluée selon le protocole décrit dans la littérature par Siracusa et *al.* (2011). Un volume de 37.5 µL d'extrait a été ajouté à 1.5 mL de solution de DPPH (0.1 mM). Après 20 min d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 517 nm. Les résultats sont exprimés en mM Trolox équivalent par gram d'extrait.

II. 5. 2. Test de la réduction de fer (FRAP)

L'activité anti oxydante des deux extraits a été évaluée en utilisant la méthode FRAP. Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible. Il est universel peut être appliqué aussi bien chez les plantes que les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux (Li et *al.*, 2008).

La présence des réductants dans les extraits provoque la réduction de fer Fe^{3+} complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu vert dans le milieu réactionnel à 700 nm. En d'autre terme, le système $FeCl_3/K_3Fe(CN)_6$ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semi quantitative » des concentrations des polyphénols, qui participent à la réaction redox (Amarowicz et *al.*, 2004).

D'après la courbe d'acide ascorbique (méthode démontré en annexe1) on mesure le pouvoir réducteur des deux extraits selon leur absorbance.

Les valeurs présentées selon les figures 20 et 21, montrent le pouvoir réducteur des deux extraits à différentes concentrations.

II. 6. L'activité anti-inflammatoire

L'effet *in-vitro* anti-inflammatoire des polyphénols et caroténoïdes de *carpobrotus edulis* a été mesuré par les testssuivants :

II. 6. 1. Test de la dénaturation d'albumine

Un volume de 1 mL de l'extrait a été mélangé avec 1 mL de solution d'albumine (1mM). Après 15 min d'incubation (27°C), les tubes sont incubés à une température de 60°C pendant 10 min. L'absorbance est mesurée à 660 nm. Le diclofénac est utilisé comme standard. Les résultats sont exprimés en mMoldiclofénac équivalent par gramme d'extrait.

II. 6. 2. Test de stabilisation de la membrane des érythrocytes

La solution de globules rouges (GR) est préparée en mélangeant un volume de sang avecun volume de solution d'ALSEVER (2% dextrose, 0,8% citrate de sodium, 0,05% acide citrique et 0,42% chlorure de sodium dans 100 mL d'eau distillé). Après 5min de centrifugation à 3000g. Un volume de 0,5 ml de l'extrait ou du standard (diclofénac) est ajouté à un 1mL du tampon phosphate (PH = 7,4), 2 ml de solution hypo saline (0,36%) et 0,5 mL de la solution GR. Après 30 min d'incubation à 37°C, en effectue une centrifugation pendant 20 min à 3000g. L'absorbance est mesurée à 560 nm. Le Diclofénac a été utilisé comme standard. Les résultats sont exprimés en mMoldiclofénac équivalent par gram d'extrait (Yoganandam et *al.*, 2010).

Chapitre III :

Résultats et discussions

Les métabolites secondaires se définissent comme les molécules produites par des organismes vivants (plantes, champignons, bactéries...) ne jouant pas de rôle direct pour les fonctions vitales de l'organisme, c'est-à-dire la nutrition, la croissance, et la reproduction. Ces métabolites peuvent être classés en plusieurs grandes familles, dont les plus importantes en termes de nombre de structures connues sont les composés phénoliques (tanins, flavonoïdes...).

La griffe de la sorcière (*Carpobrotusedulis*L.) est une plante très riche en principes actifs, particulièrement les polyphénols et les caroténoïdes. Le but de ce travail était l'extraction de ces substances bioactives à partir de *C. edulis* provenant de deux régions de Mostaganem (Oureah et Stidia) et l'évaluation de leurs activités antioxydante et anti-inflammatoire par la suite.

III.1. Calcul du rendement de l'extraction

Après l'extraction des polyphénols et des caroténoïdes, le rendement a été calculé selon le rapport entre la masse de l'extrait final par rapport à la matière végétale initiale. Les résultats sont montrés dans le tableau 3.

Tableau 3: Rendement de l'extraction des polyphénols et des caroténoïdes

Région	polyphénols	caroténoïdes
Oureah	4.1%	1.29%
Stidia	3.72%	2.62%

III.2. Dosage des polyphénols totaux

III.2. 1. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique a été effectuée en lisant l'absorbance des différentes concentrations de ce standard à une longueur d'onde de 725 nm ; le coefficient de corrélation obtenu était : $R^2 = 0,999$; et l'équation est égale à $Y = 0,004 X + 0,031$ (Figure 6).

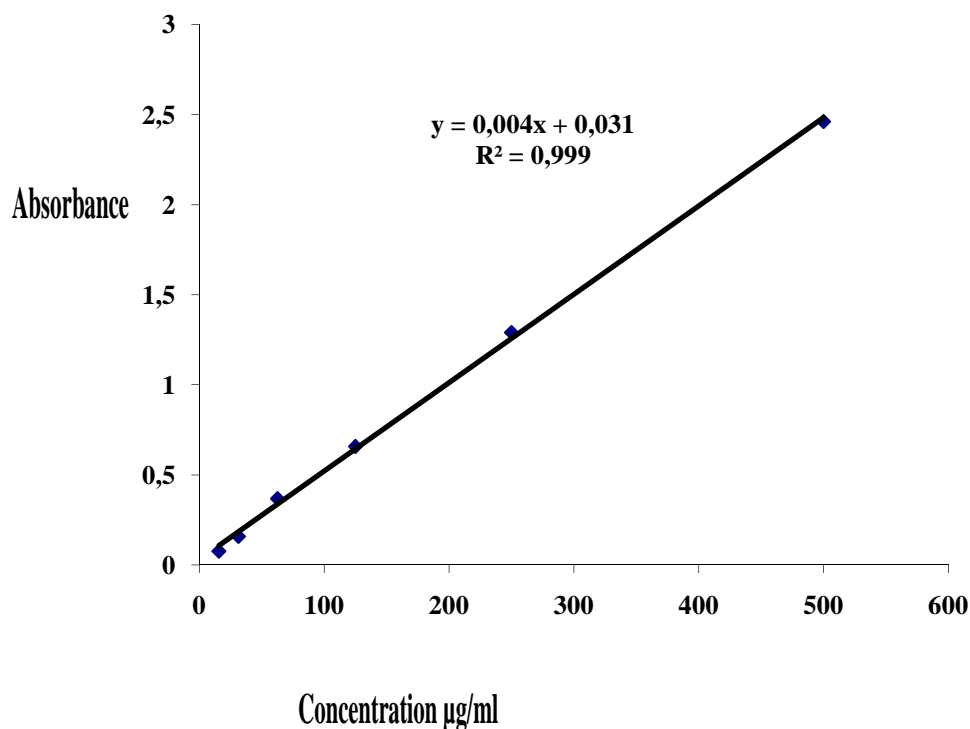


Figure 6: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

III.2.2. Quantification des polyphénols totaux

Les plantes sont connues pour produire un grand nombre de composés à faible poids moléculaire dont la structure ne fut que récemment déterminée ; et ceci malgré leur exploitation et leur utilisation ancestrale, comme médicaments ou aliments (Garcia- Pérez, 2008). Parmi ces molécules on a les polyphénols, qui sont un groupe de composés phytochimiques, présents en grande quantité dans les fruits, les légumes et les produits naturels (Vauzour, 2014).

Le contenu en polyphénols totaux de l'extrait de *Carpobrotus* a été déterminé selon la méthode colorimétrique de Gutfinger (1981) en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Pour cela, la courbe d'étalonnage de l'acide gallique a été utilisée.

Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalent de l'acide gallique par g d'extrait. Les résultats sont présentés dans le tableau 4. L'extrait de *Carpobrotusedulis* provenant de Stidia est plus riche en polyphénols avec 14.08 mg EAG/g d'extrait alors que l'extrait de Oureah contenait $13.10 \pm$ mg EAG/g et. Ces taux restent supérieurs à celui trouvé par Meddebetal. (2017) soit 1.84 ± 5 mg / g.

Tableau 4 : Polyphénols et flavonoïdes totaux de *Carpobrotusedulis*L.

	Région	Polyphénols totaux (mg EAG/g E)	Flavonoïdes totaux (mg EQ/g E)
<i>Carpobrotusedulis</i>	Oureah	13.10 ± 0.92	4.43 ± 0.14
	Stidia	14.08 ± 0.74	4.48 ± 0.12

III.3. Dosage des flavonoïdes totaux

III.3. 1. Courbe d'étalonnage de la quercétine

La courbe d'étalonnage de la quercétine a été effectuée en lisant l'absorbance des différentes concentrations de quercétine à une longueur d'onde de 415 nm. Le coefficient de corrélation R^2 était 0.999 et l'équation $Y = 0,019 + 0,029x$ (figure 7).

III. 3. 2. Quantification des flavonoïdes totaux

Il existe dans les aliments plusieurs centaines de polyphénols (plus de 500 y ont été caractérisés aujourd'hui), principalement des flavonoïdes. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. On les trouve dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastides particuliers, les chromoplastes. Dans les aliments, ils sont souvent présents sous forme d'hétérosides (Stoclet et Schini-Kerth, 2011). Le taux des flavonoïdes totaux a été estimé selon la méthode de Dowd adaptée par Arvouet-Grand et al., (1994).

Le contenu en flavonoïdes totaux de *Stidia* est toujours légèrement supérieur que celui d'Oureah (4.48 et 4.43 mg EAQ/g d'extrait respectivement). Omoruyi *et al.*, (2012) ont dosé le contenu flavonoïdique des extraits aqueux, éthanol, acétone et hexane de *C. edulis*. Ils ont trouvé des valeurs de l'ordre de 0.29, 0.28, 0.65, et 1.19 EAQ/g respectivement.

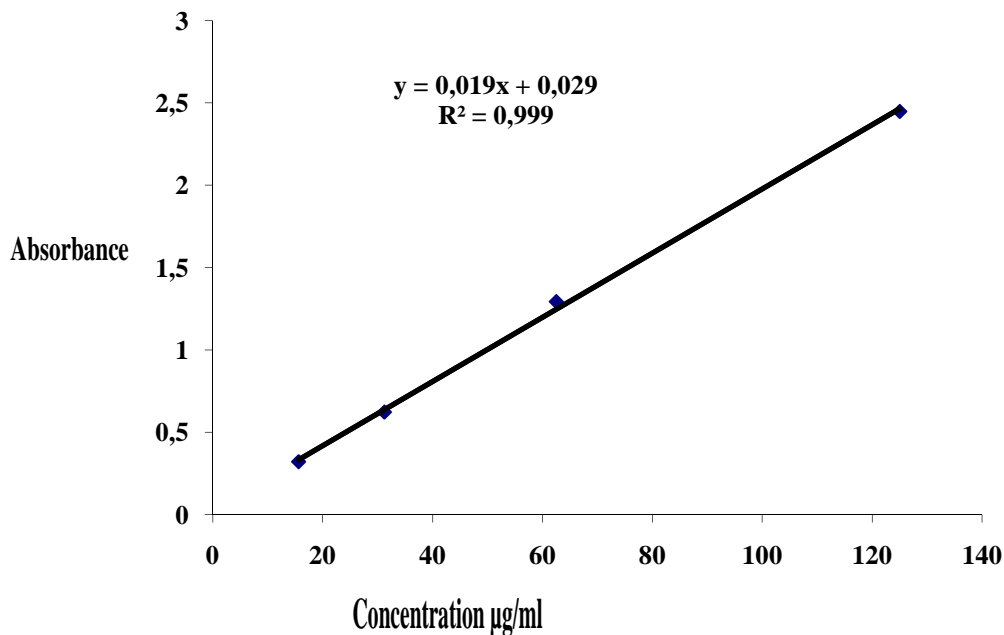


Figure 7 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

En effet, les stress hydriques et salins affectent négativement les contenus en polyphénols dans les tissus des végétaux non tolérants à la salinité et à la sécheresse. La diminution des composés phénoliques prend origine de la perturbation des principaux processus de l'activité vitale de la plante suite à un choc hydrique ou salin (Ksouri *et al.*, 2012).

La capacité photosynthétique des plantes se voit toujours diminuée dans ces conditions, de ce fait, les produits initiaux de la biosynthèse des polyphénols pourraient faire défaut. La baisse de la transpiration et la fermeture des stomates sont aussi observées. Ils sont suivis d'une augmentation de la température au niveau des feuilles qui pourrait être une cause de la diminution des taux de polyphénols. Les contraintes de salinité et de sécheresse peuvent également engendrer un choc osmotique (Ksouri *et al.*, 2012).

L'ensemble de ces phénomènes sont observées à une très faible échelle chez les halophytes et les xérophytes. A titre d'exemple, une xérophyte, *Gossypium anomalum* (*Malvacées*) soumise à un choc hydrique, n'a montré qu'une très faible diminution de son contenu en polyphénols ; alors que d'autres espèces de *Gossypium* qui ne sont pas résistantes à la sécheresse ont montré une baisse importante en polyphénols.

Pour certaines halophytes, l'accumulation en composés phénoliques est stimulée dans des conditions de salinité accentuées. L'exemple de *Anethum graveolens* cultivée dans un milieu à forte salinité, s'est montré capable de quadrupler le contenu phénolique dans les racines et de le tripler au niveau des pousses (Mehr et al., 2012). Cet enrichissement en polyphénols totaux est un mécanisme d'adaptation des plantes à la salinité car les composés phénoliques améliorent les effets ioniques de NaCl dans les tissus (Parida et al., 2004).

III.4 Dosage des caroténoïdes totaux

III.4. 1. Courbe d'étalonnage de la β -carotène

La courbe d'étalonnage de la β -carotène est effectuée en lisant l'absorbance à une longueur d'onde de 470 nm (figure 8).

III.4.2. Quantification des caroténoïdes totaux

Les caroténoïdes font partie de la famille des terpénoïdes caractérisés par leur nature polyinsaturée. Ils sont très largement répandus dans la nature. Ils sont à l'origine des teintes brillantes jaunes, oranges et rouges de nombreux fruits comestibles (oranges, abricots...), de légumes (carottes, tomates,...), et de fleurs.

Les caroténoïdes alimentaires sont apportés en grande majorité par les fruits et légumes, et si on en dénombre une quarantaine dans l'alimentation humaine, seule une vingtaine ont été identifiés dans le sang et les tissus humains (Grolier et al., 1997 ; Khachik et al., 1997).

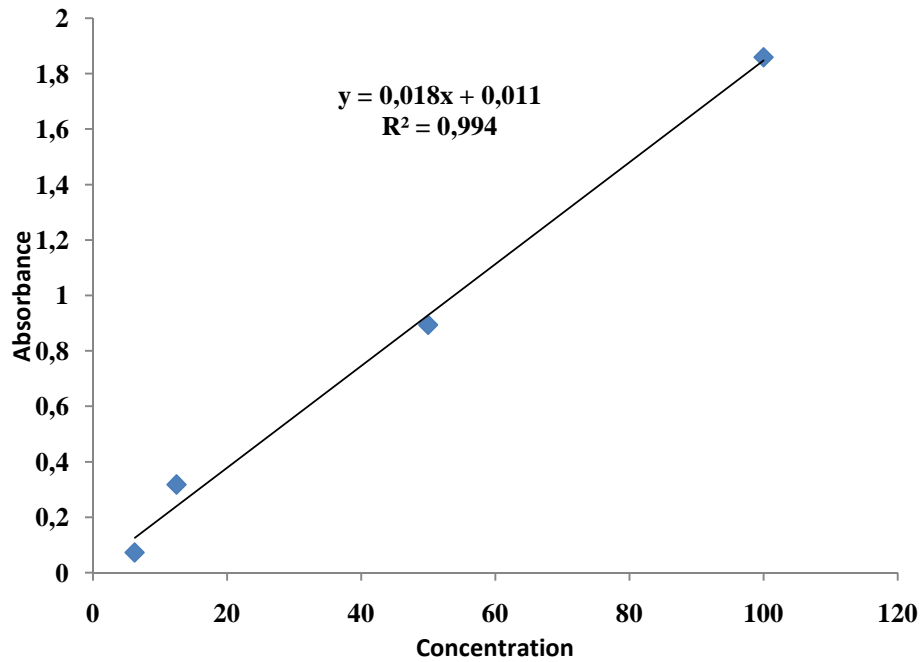


Figure 8: La courbe d'étalonnage du β -carotène.

Leur structure permet de piéger les espèces réactives de l'oxygène protégeant ainsi la cellule. Cet effet antioxydant présente un avantage pour toutes les espèces aérobies qu'elles soient ou non photosynthétiques. Certains caroténoïdes sont des éléments nutritifs importants pour l'homme et les animaux puisqu'ils servent de précurseurs à la vitamine A, le rétinol.

Les résultats des caroténoïdes totaux des fleurs de *C. edulis* des deux régions sont présentés dans le tableau 5. Le contenu en caroténoïdes de la région d'Oureah est supérieur à celui de Stidia. Cette différence ne réside pas seulement sur le plan quantitatif mais aussi qualitatif vu que la couleur des deux fleurs diffère.

Les fleurs de Stidia sont jaune pâles, ce qui indique la présence de la lutéine, β -carotène, flavoxanthine, antheraxanthine et zéaxanthine. Alors que violaxanthine, luteine, antheraxanthine et β -carotène sont à l'origine de la couleur rose des fleurs d'Oureah (OHMIYA, 2011).

Tableau 5 : Détermination des Caroténoïdes totaux de *C. edulis* d'Oureah et Stidia

Région	Caroténoïdes (mg EC/g E)
Oureah	0.85± 0.09
Stidia	0.78± 0.05

III. 5. Evaluation de l'activité antioxydante

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires (Sanchez-Moreno, 2002 ; Popovici et *al.*, 2009 ; Mokhtar et *al.*, 2015).

Le stress oxydant, défini comme le résultat d'un déséquilibre entre la production de composés pro-oxydants et leur élimination par les antioxydants, joue un rôle central dans de nombreuses pathologies telles que l'athérosclérose, le diabète de type 2, les pathologies neurodégénératives, les maladies inflammatoires chroniques intestinales ou encore la dégénérescence maculaire (Khandhadia et *al.*, 2010).

Il a également été montré que le stress oxydant jouait un rôle central dans l'initiation, la progression et la malignité de nombreux cancers (Grek et *al.*, 2010). Afin de maintenir l'homéostasie redox de la cellule, il existe de nombreux systèmes de défense antioxydante endogènes ou exogènes, enzymatiques ou non (Rezaie et *al.*, 2012).

Un antioxydant biologique se définit comme une substance qui, lorsqu'elle est « présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat ». L'effet antioxydant des fruits et légumes est dû en partie à des micronutriments tels que les polyphénols, les vitamines C et E, les caroténoïdes... (Rice-Evans et *al.*, 1995).

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode universelle, unique et fiable traduisant la capacité antioxydante. En effet, pour juger de l'effet antioxydant global d'un extrait d'une ressource végétale ou alimentaire, l'utilisation de plusieurs tests d'activité est nécessaire (Rezaire, 2012). L'activité antioxydante de l'extrait phénolique et caroténoïde de *Carpobrotus edulis* a été évaluée selon deux tests : DPPH et FRAP.

La courbe d'étalonnage (figure 9) a été réalisée en utilisant le trolox comme standard et les résultats du test de DPPH sont exprimés en mMtrolox équivalent. Pour le test de FRAP, la courbe d'étalonnage du Fe (II) a été utilisée (figure 10).

Selon les résultats (tableau 6), la griffe de sorcière possède un bon effet antioxydant. Pour les polyphénols, l'extrait de *Stidia* a exercé un effet antioxydant légèrement plus important, cela peut être expliqué par les résultats de polyphénols totaux étant donné que l'extrait de *Stidia* renfermait plus de polyphénols. Par contre, les caroténoïdes d'Oureah ont donné plus d'effet antioxydant que celui de *Stidia* car il était plus riche en caroténoïdes totaux.

Mais d'une façon générale, les caroténoïdes de *Carpobrotus* ont un effet antioxydant plus important que les polyphénols. Le b-carotène et les caroténoïdes ont un effet antioxydant lié principalement à une réaction avec les radicaux libre peroxy. Le b-carotène utilise l'énergie du radical O⁻ pour changer de conformation (passage de la forme cis à une forme trans) (Greff, 2012).

Les polyphénols ayant des stœchiométries élevées ont une capacité importante à piéger les radicaux libres par transferts multiples d'atomes H ou d'électrons du phénol de départ et de certains de ses produits d'oxydation, comme dans le cas de la quercétine (Goupy et al., 2009; Achat, 2013).

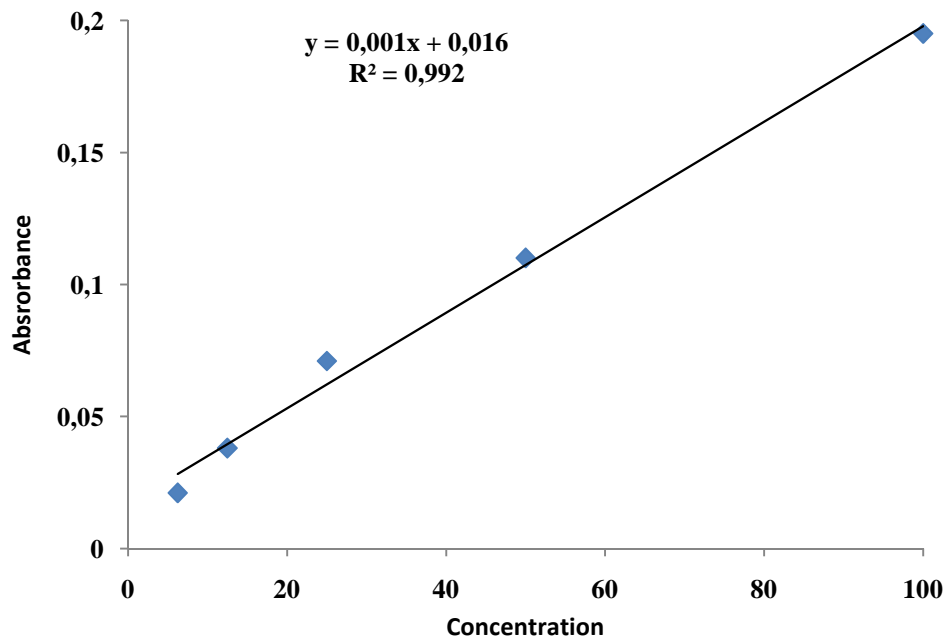


Figure 9: Courbe d'étalonnage de trolox (test DPPH)

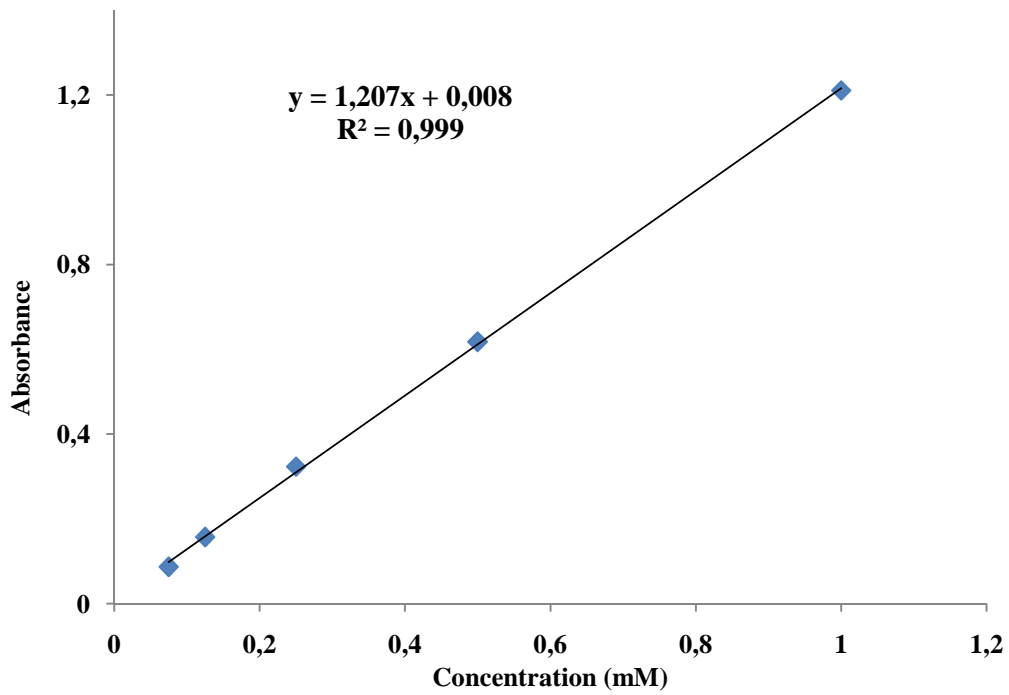


Figure 10: Courbe d'étalonnage de Fe (II) (test FRAP)

Tableau 6 : Activité antioxydante des polyphénols et caroténoïdes de *C.edulis*.

		Polyphénols	Caroténoïdes
DPPH (mM TE/g E)	Oureah	2.24±0.34	5.06±0.78
	Stidia	2.36± 0.58	2.84± 0.29
FRAP (mM Fe ²⁺ e/g)	Oureah	1.24±0.12	4.34±0.45
	Stidia	1.82±0.15	3.54±0.36

Le système antioxydant des halophytes et des xérophytes met en œuvre différentes lignes de défense antioxydantes. Celles-ci comprennent des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques qui contrôlent les niveaux des oxydants et réparent les dommages oxydatifs cellulaires. La composante non enzymatique est représentée par les antioxydants de faible poids moléculaire qui sont connus par leur rôle de piègeurs de radicaux libres tels que les vitamines C et E, les terpènes et les phénols (Matkowski, 2008).

III.6. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

L'inflammation est un ensemble de réactions générées par l'organisme en réponse à une agression subie. Celle-ci peut être d'origine extérieure comme une blessure, une infection, un traumatisme, ou provenir de l'intérieur de l'organisme lui-même comme dans des pathologies auto-immunes.

Les réactions inflammatoires sont déclenchées dans le seul but de défendre l'organisme. Lorsqu'elles sont visibles, elles se manifestent classiquement par 4 signes cliniques : une rougeur, une douleur, une tuméfaction et une augmentation de la chaleur à leur niveau.

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée selon deux tests : la dénaturation d'albumine et stabilisation de la membrane des érythrocytes.

III. 6. 1. Test de la dénaturation d'albumine

L'albumine est la protéine la plus abondante (60%) dans le sang. Elle est fabriquée par les hépatocytes (les cellules du foie), mais peut aussi provenir de l'alimentation (on la trouve par exemple dans le blanc d'œuf ou encore dans le lait). Elle est coagulable sous l'action de la chaleur, des acides minéraux, de l'alcool, de l'éther. Cette protéine est soluble dans l'eau et dans les solutions faiblement concentrées de sel.

La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation. La production d'antigènes dans les maladies inflammatoires peut-être due à la dénaturation des protéines. Le mécanisme possible de la dénaturation consiste à l'altération des liaisons électrostatiques qui maintiennent la structure tridimensionnelle des protéines (Bagad et *al.*, 2011).

Le Diclofénac a été utilisé comme standard et les résultats ont été exprimés en mMol de Diclofénac équivalent par gram d'extrait (figure 11). *Carpobrotusedulis* possède une bonne activité anti-inflammatoire équivalente à $0,32 \pm$ mg ED/g et 0.75 mg ED/g d'Oureah et *Stidia* respectivement pour les polyphénols. L'effet des caroténoïdes restent toujours plus important avec des valeurs de l'ordre de 0.808 mg ED/g et 0.36 mg ED/g pour Oureah et *Stidia*.

III.6. 2. Test destabilisation de la membrane des érythrocytes (SME)

Les lysosomes sont des organites cellulaires de 0,2 à 0,5 micron présents dans le cytosol de toutes les cellules eucaryotes, animales, à l'exception des hématies (« globules rouges »). Ils ont pour fonction d'effectuer la digestion intracellulaire grâce à une quarantaine d'enzymes, dont des lipases, des protéases, des nucléases, des glycosidases, des phosphatases et des sulfatases.

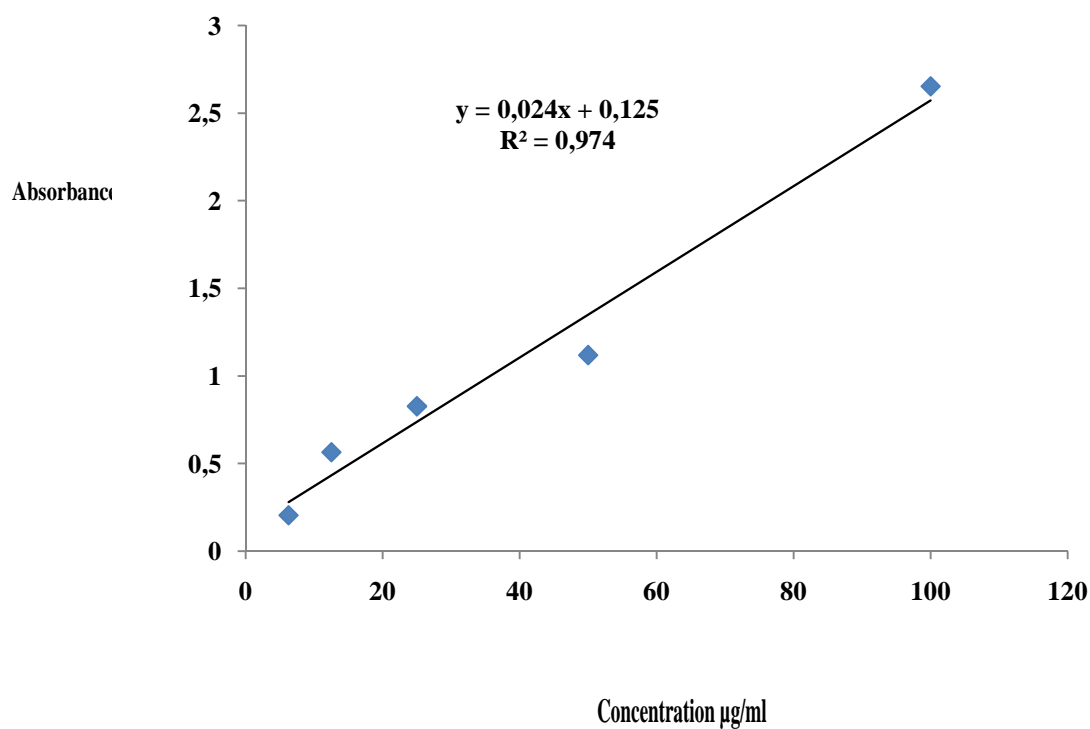


Figure 11: Courbe d'étalonnage de Diclofénac (test de l'albumine)

Comme résultat de réponse inflammatoire, les enzymes lysosomales sont libérées. Ces enzymes engendrent plusieurs désordres. La membrane des érythrocytes est analogue à la membrane lysosomale et sa stabilisation implique que l'extrait peut aussi bien stabiliser les membranes lysosomales (**Leelaprakash and Mohan Dass, 2011**).

Le diclofénac a été utilisé comme standard (figure 12), et les résultats ont été exprimés en mMol de Diclofénac. Les polyphénols et les caroténoïdes exercent un bon effet stabilisateur de la membrane des érythrocytes ($0.092 \pm 0,012$ et $0.11 \pm 0,009$ mg ED/g E pour Oureah et Stidia), et ($0.132 \pm 0,014$ et $0.101 \pm 0,014$ mg ED/g E pour Oureah et Stidia) respectivement.

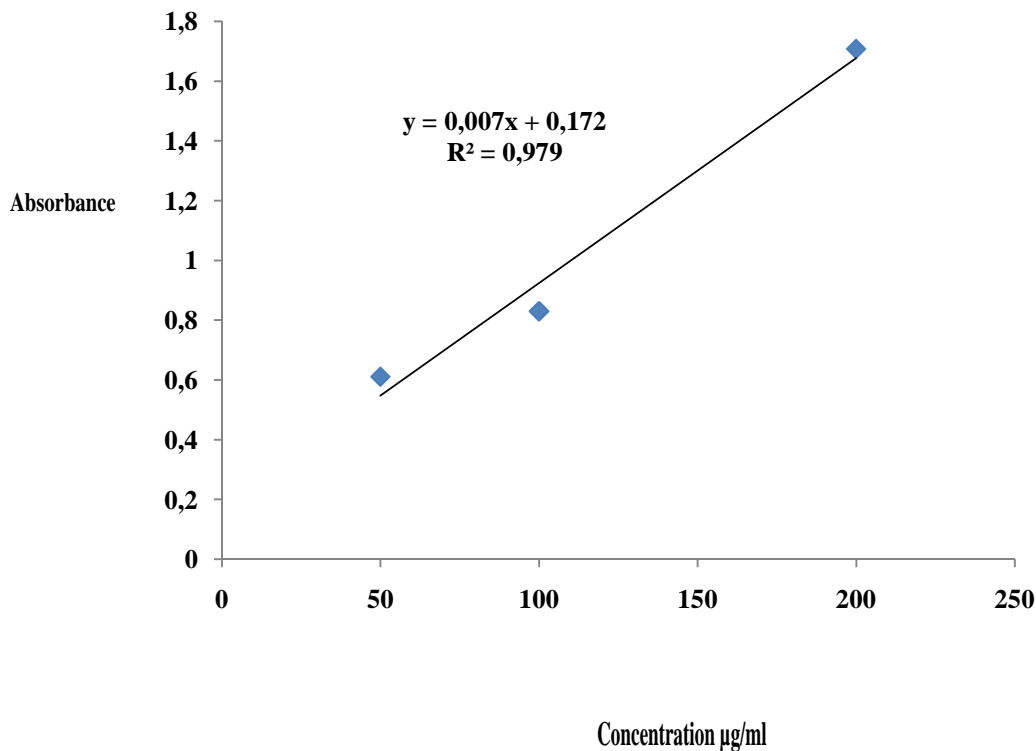


Figure12: Courbe d'étalonnage de la Diclofénac (SME).

Les propriétés antioxydantes des polyphénols ont longtemps été considérées comme étant le principal phénomène expliquant leurs effets protecteurs. Cependant, de nombreuses études ont pu montrer que les polyphénols et leurs métabolites agissaient également comme des modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation.

Les études menées chez l'homme sain ont montré que le suivi d'un régime riche en fruits et légumes était inversement corrélé aux marqueurs de l'inflammation (CRP, IL-6) dans le plasma (Salas-Salvado *et al.*, 2008).

Des études *in vitro* et *in vivo* ont permis de montrer que les polyphénols et les caroténoïdes pouvaient agir sur les activités enzymatiques du métabolisme de l'acide arachidonique (AA) : phospholipase A2, cyclooxygénase et lipoxygénase. Ils agissent également sur la production de $\cdot\text{NO}$ en modulant l'activité des NOS. Une inhibition de ces enzymes par les polyphénols réduit ainsi la production d'AA, de $\cdot\text{NO}$, de prostaglandines et de leucotriènes, médiateurs de l'inflammation (Guo *et al.*, 2009).

Des études menées *in vitro* ont également montré que des flavonoïdes comme la lutéoline ou l'apigénine inhibaient la production de cytokines telles que IL-4, IL-5 et IL-13, que la quercétine inhibait la production de TNF- α par des macrophages stimulés au lipopolysaccharide (LPS), que le kaempférol inhibait l'expression et la sécrétion du TNF- α , de l'IL-1 ou de l'IL-6 dans les mastocytes (Gonzalez-Gallego et *al.*, 2010).

Conclusion

La connaissance et l'usage des plantes médicinales constituent un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique est très accentuée dans ces dernières années grâce aux thérapeutiques qu'elles procurent. Cette diversité en propriétés biologiques est liée certainement aux vertus thérapeutiques attribuées à une gamme de molécules bioactives synthétisées par la plante non seulement comme des agents chimique contre les maladies, les herbivores et les prédateurs mais aussi comme des agents médicinaux tels que les antioxydants.

L'objectif de cette étude est d'évaluer les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires d'une plante très répandue sur les rives de la Méditerranée, et bien évidemment sur le long littoral de Mostaganem : la griffe de sorcière *Carpobrotus edulis*. Cette plante contient de nombreux métabolites secondaires responsables de plusieurs vertus médicinales comme les polyphénols et les caroténoïdes.

Dans un premier lieu, une extraction des polyphénols à partir des feuilles fraîches, et des caroténoïdes des fleurs a permis d'avoir un rendement d'extraction des polyphénols de 4.1% et 3.72% ; et des caroténoïdes de 1.29% et 2.62% pour Oureah et Stidia respectivement .

L'extrait de *Carpobrotus edulis* provenant de Stidia est plus riche en polyphénols avec 14.08 mg EAG/g d'extrait alors que l'extrait d'Oureah contenait $13.10 \pm$ mg EAG/g. Pour les flavonoïdes, 4.48 et 4.43 mg EAQ/g d'extrait ont été enregistrés respectivement. En ce qui concerne les caroténoïdes, il s'est avéré que les fleurs d'Oureah étaient plus riches.

Après le dosage des substances actives, nous avons voulu explorer son potentiel thérapeutique, donc nous avons évalué deux activités biologiques intéressantes avec impacts prometteurs de cette plante, l'activité antioxydante et anti-inflammatoire.

L'activité antioxydante a été évaluée avec deux tests : DPPH et FRAP. La griffe de sorcière possède un bon effet antioxydant. Pour les polyphénols, l'extrait de Stidia a exercé un effet antioxydant légèrement plus important, cela peut être expliqué par les résultats de polyphénols totaux étant donné que l'extrait de Stidia renfermait plus de polyphénols. Par

contre, les caroténoïdes d'Oureah ont donné plus d'effet antioxydant que celui de Stidia car il était plus riche en caroténoïdes totaux.

L'activité anti-inflammatoire a été démontrée selon deux tests : la dénaturation d'albumine et la stabilisation de la membrane des érythrocytes. Les résultats montrent que les polyphénols et les caroténoïdes de *Carpobrotus edulis* ont pu empêcher l'albumine de se dénaturer et ont pu stabiliser la membrane des érythrocytes.

Pour conclure, les résultats nous indiquent la possibilité d'exploiter ces molécules bioactives tant que des antioxydants par l'industrie pharmaceutique et cosmétique, ou pour lutter contre l'inflammation, en produisant des médicaments anti-inflammatoires à base de cette plante. Ainsi, les perspectives futures sont dans un premier temps, une étude analytique par chromatographie pour identifier ces polyphénols et caroténoïdes responsables de ces activités biologiques. Et pour aller plus loin dans un deuxième temps, nous considérons qu'une étude *in vivo* est indispensable pour mieux cerner son potentiel antioxydant et anti-inflammatoire.

Les Références bibliographiques

A.D. Pirie, N.W. Davies, K.D.K. Ahuja, J. Pittaway, M.J. Adams, C.M. Shing, C. Narkowicz, et al., (2014) Hypolipidaemic effect of crude extract from *Carpobrotus rossii* (pigface) in healthy rats, *Food Chem. Toxicol.* 66 134–139.

Arvouet-Grand A., Vennat B., Pourrat A., Legret P., 1994 - Standardization d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants, *Journal de Pharmacie de Belgique*, 49, p. 462-468

Behnlian D., Schlemmer U., (2009). Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition & Food Research* 53, S194-S218

Bitrián M., Zarza X., Altabella T., Tiburcio A. F., Alcázar R. (2012). Polyamines under abiotic stress: metabolic crossroads and hormonal crosstalks in plants. *Metabolites* 2 516–528.

Bohnert, HJ et Cushman, JC. (1999). Le Cometh Ice Plant: Leçons de la tolérance au stress abiotique *Journal of Plant Growth Regulation*. 19 : 334-346.

Bouffira I, Mgaidi I, and Sfar S (2010). Dosage of 2,6-Bis (1,1-Dimethylethyl)-4 Methylphenol (BHT) in the Plant Extract *Mesembryanthemum crystallinum*. *Journal Of Biomedicine and Biotechnology*, Volume 2010, Article ID 142486, 5 pages.

Ferrazzano G.F., Amato I., Ingenito A., Zarrelli A., Pinto G. & Pollio A. (2011). Plant Polyphenols and Their Anti-Cariogenic Properties. A Review. *Molecules*. 16, 1486-1507

Flowers T. J., Munns R., Colmer T. D. (2015). Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. *Ann. Bot.* 115, 419–431. 10.1093/aob/mcu217

Grek CL, Tew KD (2010). "Redox metabolism and malignancy." *Curr Opin Pharmacol*, 10:362-368

Grolier P, Duszka C, Borel P, Alexandre-Gouabau MC, Azais- Braesco V. (1997) *In vitro* and *in vivo* inhibition of *b*-carotene dioxygenase activity by *canthaxanthin* in rat intestine. *Arch Biochem Biophys* ; 348 : 233-8.

Khachik F, Spangler CJ, Smith JC Jr, Canfield LM, Steck A, Pfander H. (1997) Identification, quantification and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Anal Chemi* ; 69 : 1873-81.

Ksouri R, Megdiche W, Jallali I, Debez D, Magné M, Hiroko I, Abdelly C H (2012) Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications, *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(4), 289-326.

Li, R., Shi, f. & Fukuda, k. (2010). — interactive effects of various salt and alkali stresses on growth, organic solutes and cation accumulation in a halophyte *Spartina alterniflora* (Poaceae). *Envir. & Exper. Bot.*, 68 : 66-74.

Maiani G., Caston M.J.P., Catasta G., Toti E., Cambrodon I.G., Bysted A., Granado-Lorencio F., Olmedilla-Alonso B., Knuthsen P., Valoti M., Bohm V., Mayer-Miebach E., (2009). Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition & Food Research* 53, S194-S218

MUANDA, F (2010). IDENTIFICATION DE POLYPHENOLS, EVALUATION DE LEUR ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET ETUDE DE LEURS PROPRIETES BIOLOGIQUES. Thèse de Doctorat : SPÉCIALITÉ: Chimie organique. METZ :Ecole doctorale SESAMES, 239 P.

Meddeb E, Charni M, Ghazouani T, Cozzolino A, Fratianni F, Raboudi F, Nazzaro F, Fattouch S. (2017) Biochemical and Molecular Study of *Carpobrotus edulis* Bioactive Properties and Their Effects on *Dugesia sicula* (Turbellaria, Tricladida) Regeneration.

Mehr Z S, Khajeh H, Esmailzadeh B S, Sabbagh. S K (2012) Changes on proline, phenolic compounds and activity of antioxidant enzymes in *Anethum graveolens* L. under salt stress, *International journal of Agronomy and Plant Production*, 3 (S), 710-715.

Mokhtar M. (2015). Identification et propriétés biologiques des principes actifs du piment (*Capsicum annum* L.). Thèse de L'Université de Mostaganem.

M. Vilà, A.K.D. Siamantziouras, G. Brund, I. Camarda, P. Lambdon, F. Médail, E. Moragues, et al., (2008) Widespread resistance of Mediterranean island ecosystems to the establishment of three alien species, *Divers. Distrib.* 14 839–851.

NKHLI, Ez-zohra (2009). Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de Doctorat : Spécialité: Sciences des Aliments. MARRAKECH: UNIVERSITÉ CADI AYYAD - FACULTÉ DES SCIENCES SEMLALIA, 328 P.

OHMIYA A. (2011). Diversity of Carotenoid Composition in Flower Petals. *JARQ* 45 (2), 163 – 171

Omoruyi, B.E., Bradley, G., and Afolayan, A.J (2012). Antioxidant and phytochemical properties of *Carpobrotus edulis* (L.) bolus leaf used for the management of common infections in HIV/AIDS patients in Eastern Cape Province. *BMC Com. and Alt. Med.*, 12:215 ID10/ 680354.

Parida A K, Das A B, Sanda Y, Mohanty P (2004) Effects of salinity on biochemical components of the mangrove, *Acerascorniculatum*, *Aquatic Botany*, 80, 77-87.

Robards K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem* 1999; 66: 401–436

Sanchez-Moreno C., Larrauri Jose A ., Saura-Calixto F. A(1998) Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture* , 76(2), 270-276.

Stoclet, V. Schini-Kerth J.-C.(2011) *Annales Pharmaceutiques Françaises*, Volume 69, Issue 2, March 2011, Pages 78-90

Vartanian N, Lemée G (1984) La notion d'adaptation à la sécheresse, *Bulletin de la Société Botanique de France - Actualités Botaniques*, 131:1, 7-15

Watanabe, M., Sugimura, K. and Yamanoha, B.(1999). Effect of acute deficiency of dietary proline on proline balance in the rat small intestine and liver. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 82 : 294-304

Xu C., Tang X., Shao H., Wang H. (2016). Salinity tolerance mechanism of economic halophytes from physiological to molecular hierarchy for improving food quality. *Curr. Genomics* 17, 207–214. 10.2174/1389202917666160202215548

Résumé

Le but de ce travail est le dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux, ainsi que les caroténoïdes de la griffe de sorcière (*Carpobrotus edulis* L.) provenant de deux régions de Mostaganem (Oureah et Stidia) et l'évaluation de son activité antioxydante et anti-inflammatoire. Le contenu en polyphénols, flavonoïdes et caroténoïdes totaux a été dosé par des méthodes colorimétriques. Les résultats obtenus ont montré que *Carpobrotus edulis* récoltée à Stidia renferme une quantité de polyphénols et flavonoïdes totaux légèrement supérieure à celle d'Oureah. En revanche, les fleurs mauves d'Oureah sont plus riches en caroténoïdes que les fleurs jaunes pâles de Stidia. L'activité antioxydante est évaluée par deux tests : DPPH, FRAP. Selon les résultats, les caroténoïdes de *C. edulis* présentent un bon effet antioxydant comparé aux polyphénols. En ce qui concerne le pouvoir anti-inflammatoire, deux tests ont été utilisés : la dénaturation d'albumine et la stabilisation de la membrane des érythrocytes. Les polyphénols et caroténoïdes de cette plante ont pu inhiber la dénaturation des protéines et stabiliser la membrane des érythrocytes, mais l'effet des caroténoïdes était plus important.

Mots clé : *Carpobrotus edulis*, polyphénols, caroténoïdes, activité antioxydante, activité anti-inflammatoire.