

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Abou-Bekr Belkaïd -Tlemcen

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



Mémoire

Pour l'obtention du diplôme de master en biologie

Option: «Nutrition et santé »

Thème

*Contribution à l'étude phytochimique et évaluation du pouvoir
antioxydant des alcaloïdes extraits d'*Osyris alba* L,
récoltée au niveau de la région de Beni-Snousse - Tlemcen*

Présenté par : M^{elle} DIH Amina

M^r BELGUENDOZ Amine

Soutenu le: 06 /07/ 2017, Devant le jury composé de :

M^{me} GHALEM M.	Maître de conférences B	Présidente
M^{me} LEMERINI W.	Maître de conférences B	Examinatrice
M^{me} KHALDI D.	Maître assistante A	Encadreur

Année universitaire : 2016 - 2017

Remerciement

Nous exprimons nos remerciements et nos sincères gratitudees à M^{me} KHALDI. D en tant que directrice du mémoire ; s'est toujours montrée à l'écoute et disponible tout au long de la réalisation de ce travail. Ainsi pour ses conseils et inspirations.

A M^{me} GHALEM M., pour avoir l'honneur de présider ce jury, qu'elle soit assurée de nos remerciements.

A M^{me} LEMERINI W., pour avoir accepté d'être membre de ce jury.

Nos remerciements vont également à M^{me} ATIK F., Directrice du laboratoire des produits naturels (LAPRONA).

A M^r BENAMMAR .C Chef de département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen.

Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à tous nos proches et amis, qui nous ont toujours soutenus et encouragés au cours de la réalisation de ce travail. Merci à toutes et à tous.

Dédicaces

Je commence ma dédicace au nom du Dieu et le salut sur Mohamed Le Messager du Dieu.
Je dédie ce modeste travail à mes parents qui sont toujours là à me consoler et m'encourager, qui donnent de précieux d'eux pour me voir réussir de jour en jour.

A mes chers frères « Mohamed Ali, Hatem Abd Salam et Nour El Yakine » que dieu les protègent.

A ma sœur « Kenza » et ma chère « Leila » qui m'ont supporté tout au long de ce projet avec un amour incessant et dévouement envers ma réussite.

A mon cher oncle « DIH Zine » qui m'a donné l'aide et le courage pour surmonter les situations pénibles.

A la famille « MEDJDOUBE » : le père Youcef, la mère Fatima, Houda et son mari, Lamia et son mari, Tèma et son mari Brahim, Nadir et Anouar. Les poussins « Amani, selsabil, Mohamed Tayeb, Youcef, Adem et Mahdi ».

A mes chères copines : Sana, Souhila, Soumeya et Ahlem.

A mes collègues : Hanaa, Mimouna, Asma et Mouni.

A mon binôme Amine.

A Madame KHALDI D. Je vous remercie énormément.

D. Amina

Dédicace

À ma religion : L'ISLAM, Mon Prophète : **Mohamed** ﷺ et tous mes frères : Les Musulmans.

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail tous d'abord A mon pays l'Algérie.

À mes très chers parents qui m'ont soutenus et encouragés durant toute la période de mes études et à qui je souhaite une longue et heureuse vie,

À ma deuxième chère famille qui s'appelle boukharechofa et spécialement pour ma deuxième mère Djamila et sa fille Alia

À ma chère soeur Yamna Et avec très joie à mes frères Ben Amar et Abd Latif

À toute ma famille paternelle Belguendouz et maternelle Ghounane

À mes amies d'université

À mes amis de la cité universitaire Belmimoune Mohamed et spécialement la chambre C51, Je trouve pas les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes (Mohamed Amine, Khireddine, et Okacha abdelhamide) pour moi des frères, et des amis sur qui je peux compter.

En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

À ma chère collègue Amina

À mon chère Encadreur M^{me} KHALDI. D

À tous mes enseignants depuis le primaire Jusqu'à l'université

B. Amine

Liste des abréviations

AA: Acide ascorbique

C.A.T: Capacité antioxydante totale

C: Concentration

cm: Centimètre

C(-): Contrôle négatif

C(+): Contrôle positif

D.O: Densité optique

D.P.P.H: 2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl

F: Facteur de dilution

g: gramme

Hcl: Acide chlorhydrique

h: Heure

IC₅₀: Concentration inhibitrice

l: Litre

M: Mole

mg: milligramme

MgSO₄ : Sulfate de Magnésium

ml: Millilitre

mm: Millimètre

mM: Milli mole

MS: Matière sèche

nm: Nanomètre

NH₄OH : Hydroxyde d'Ammonium

Liste des figures

Figure	Page
Figure 01 : Structure de quelques pseudo alcaloïdes	03
Figure 02 : Structure de quelques proto alcaloïdes	04
Figure 03 : La papavérine	05
Figure 04 : Hyoscyamus muticus	07
Figure 05 : Scopolia carniolica	07
Figure 06 : Batrachotoxine	08
Figure 07 : Dendrobates	08
Figure 08 : Pyocyanine	09
Figure 09 : Racine d' <i>Osyris alba</i>	12
Figure 10: Les fruits d' <i>Osyris alba</i>	12
Figure 11 : La partie aérienne d' <i>Osyris alba</i> (tige, rameaux, feuilles et fleurs)	13
Figure 12 : Echantillon séché et broyé	14
Figure 13 : Détermination gravimétrique de la teneur en humidité par étuvage à 105°C	15
Figure 14 : Dégraissage par le soxhlet	18
Figure 15 : Taux d'humidité et de matière sèche au niveau des écorces des racines d' <i>Osyris alba</i>	23
Figure 16 : courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour la CAT	27
Figure 17 : Courbe de piégeage de radical libre DPPH* par l'acide ascorbique	30
Figure 18 : Pourcentage d'inhibition de l'extrait éthanolique d' <i>Osyris alba</i> vis-à-vis du radical libre DPPH*	30
Figure 19 : Comparaison du pourcentage des IC50 de l'extrait alcaloïdique, l'acide ascorbique et Trolox	31

Liste des tableaux

Tableau	Page
Tableau 01 : Résultats du taux d'humidité et teneur en matière sèche	39
Tableau 02 : Tests phytochimiques et recherche des alcaloïdes	24
Tableau 03 : CAT - Capacité anti oxydante totale des alcaloïdes totaux extraits des écorces des racines <i>d'Osyris alba</i>	28
Tableau 04 : Pourcentage de réduction ou d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration des alcaloïdes totaux des racines <i>d'Osyris alba</i>	29
Tableau 05 : Pourcentage de réduction du radical libre DPPH en fonction de la concentration de standard l'acide ascorbique	29

Tableau de matière

	Page
Etude bibliographique	01
But et objectif de travail	10
Matériel et méthodes	11
1. Présentation du matériel végétal	11
2. Préparation du matériel végétal	13
3. Matériel et méthode appliqués	14
3.1. Détermination de la teneur en humidité et de la matière sèche	14
3.2. Recherche et test phytochimique pour les alcaloïdes	17
3.3. Dégraissage de la poudre d'échantillon et obtention du tourteau	18
3.4. Extraction sélective des alcaloïdes	19
3.5. Evaluation du pouvoir antioxydant	20
3.5.1. Capacité antioxydante totale (C.A.T)	20
3.5.2. Réduction et piégeage du radical libre DPPH	21
Résultats et discussion	23
1. Détermination de la matière sèche	23
2. Tests phytochimiques et recherche des alcaloïdes	24
3. Extraction sélective et rendement en alcaloïdes totaux	25
4. Evaluation du pouvoir antioxydant des alcaloïdes totaux	26
4.1. Capacité antioxydante totale (C.A.T)	27
4.2. Activité anti radicalaire- Piégeage du radical libre DPPH*	28
Conclusion	32
Références bibliographiques	34
Annexes	39

Etude bibliographique

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies (**Athamena, 2009**). Dans le monde, près de 80% de la population a recours aux plantes médicinales parce qu'elles ont pu démontrer une réelle efficacité (**Benaissa, 2008**).

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais représente une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (**Jean et al., 2005**).

Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, dont plus de 200000 molécules ont été identifiées. Classés selon leur appartenance chimique en composés phénoliques, alcaloïdes et terpénoïdes (**Amas, 1997**). Selon leurs origines biosynthétiques, les métabolites secondaires des plantes sont repartis en trois grandes familles chimiques : le composé aromatique (phénolique, l'acide shikimique ou les dérivés d'acétate), les terpénoïdes et stéroïdes, les composés azotés ou alcaloïdes.

Ces métabolites secondaires ont des fonctions très importantes pour la survie et la propagation des plantes qui les produisent, comme signaux chimiques, pour défendre leur producteur contre les herbivores et les pathogènes, comme ils participent à des réponses allélopathiques (compétition entre les plantes pour la germination et croissance), Certains assurent une protection contre les radiations solaires et d'autres encore facilitent la dispersion du pollen et des graines (**Jean et al., 2005**). Les métabolites secondaires sont aussi très exploités par l'homme dans les différents domaines : dans le domaine culinaire comme colorants et arômes, dans le domaine agricole comme herbicides et dans le domaine médicinale comme antibiotiques, antioxydants, drogues.....etc. (**Bruneton, 1993 ; Krief, 2003**).

Parmi ces substances nous nous sommes intéressés aux alcaloïdes, En raison de leur activité biologique puissante, bon nombre des quelque 12 000 alcaloïdes connus ont été exploités comme produits pharmaceutiques, stimulants, narcotiques et poisons. Si la notion d'alcaloïde est assez récente, la connaissance de la toxicité et des propriétés des plantes et des drogues à alcaloïdes est très ancienne : depuis des siècles, voire plusieurs millénaires

beaucoup de composés sont employés soit pour la guérison, soit comme poison, soit comme excitant. (Ex : la belladone) **(Dalton, 1979)**.

En 1803, Charles Derosne, pharmacien et industriel français, est le premier à isoler un alcali végétal en extrayant de l'opium un mélange de narcotine et de morphine, mais il attribue la nature alcaline de son extrait à des résidus de préparation **(Bruneton, 1999)**.

Entre 1817 et 1820, deux pharmaciens français, Pelletier et Caventou, découvrent une impressionnante série de composés actifs : caféine, émétine (de l'ipéca), strychnine (de la noix vomique), quinine (de l'écorce de quinquina) ; l'élucidation des structures chimiques des alcaloïdes ne débute qu'en 1870 avec celle de la plus simple, par Schiff. **(Bruneton, 1999)**.

L'isolement, au début des années cinquante, de la réserpine et le succès thérapeutique de celle-ci ont incité les phytochimistes à explorer systématiquement ce vaste domaine des alcaloïdes: le nombre des structures décrites ne cesse de progresser et les données structurales, biosynthétiques, synthétiques ou pharmacologiques sont maintenant tout à fait considérable **(Lin et al, 1984)**.

Au début du 19ème siècle, le terme d'alcaloïde a été introduit par W. Meisner, pour désigner des substances naturelles réagissant comme des bases, ce terme est dérivé de l'arabe al kaly qui signifie la soude et de grec eidos qui signifie l'aspect **(Bruneton, 1999)**.

Les alcaloïdes sont des composés organiques azotés d'origine naturelle, le plus souvent végétale, plus ou moins basiques, de distribution restreinte et dotés à faible dose de propriétés pharmacologiques marquées ; ils agissent comme des bases, comme des alcalis, ceci étant dû à la présence d'azote **(Cordell, 1981)**. Les alcaloïdes se présentent le plus souvent sous l'aspect de cristaux, insolubles dans l'eau mais soluble dans les solvants organiques **(François, 2011)**. De nombreux chercheurs ont pensé que des alcaloïdes avaient pour origine le seul règne végétal. Mais, avec la multiplicité des temps un certain nombre d'alcaloïdes a été isolé chez certains animaux **(Mann et al, 1994)**.

Ainsi, On divise les alcaloïdes en trois genres : les alcaloïdes vrais, les proto-alcaloïdes et les pseudo-alcaloïdes.

Les alcaloïdes vrais substances d'origine naturelle et de distribution restreinte, de structure complexe azotée et de caractère basique. Ils existent dans les plantes soit sous

forme libre soit sous forme de sels, soit comme N-Oxyde (**Badiaga, 2011**). Ayant pour origine biosynthétique un acide aminé, ils sont dotés d'une activité pharmacologique significative. La plus part présente un azote inclus dans un hétérocycle (**Jean, 1996**).

Les **pseudo-alcaloïdes** même caractéristiques que les vrais alcaloïdes, les pseudo-alcaloïdes ne sont pas dérivés d'acides aminés (**Bruneton . 1999**). Les alcaloïdes stéroïdes et les purines sont les représentants principaux de cette classe d'alcaloïdes (**Cyriel, 2001**).

Il s'agit dans la plupart des cas étudié, que ce sont des dérivés d'isoprénoïdes (alcaloïdes terpéniques) et du métabolisme de l'acétate (**Rakotonanahary, 2012**) (**Figure 01**).

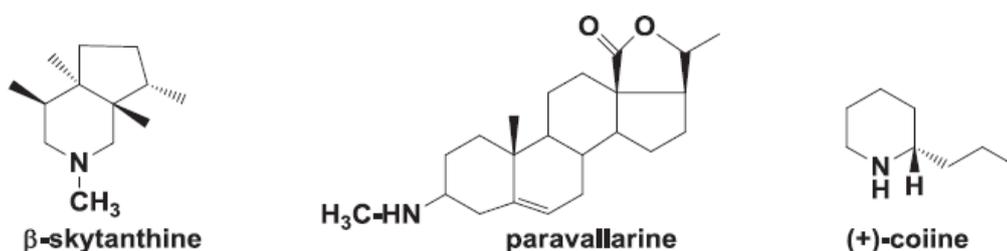


Figure 01 : structure de quelques pseudo alcaloïdes

Proto alcaloïdes sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un hétérocycle, basiques, élaborés *in vivo* à partir d'acide aminé, Ils dérivent aussi d'acides aminés. Ils sont souvent appelés « amines biologiques » et sont solubles dans l'eau (**Badiaga, 2011**) (**Figure 02**).

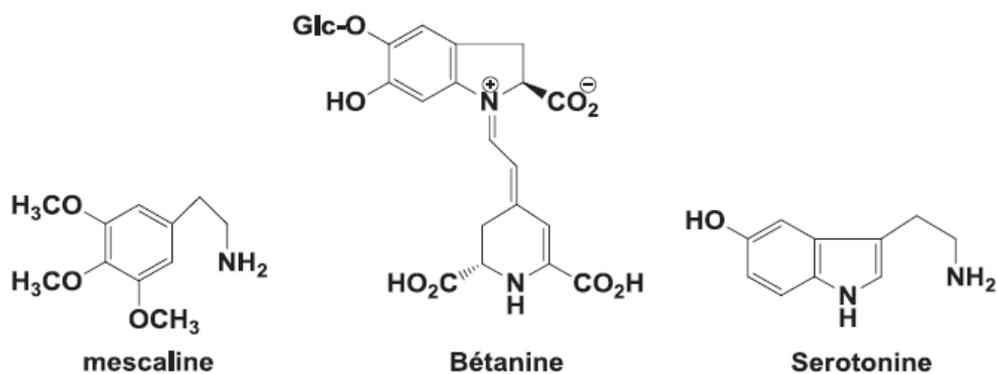


Figure 02 : Structure de quelques proto alcaloïdes

L'étude sur la localisation et la distribution des alcaloïdes montre qu'ils sont rarement libres dans la plante, ils existent sous forme de glycoses ou de sels d'acide citrique, malique, tartrique, etc. ou sont combinés avec les tanins (**Bruneton, 2009**).

Le plus souvent situées dans les tissus périphériques : écorces (tige ou racine), téguments (graine). La Basicité et les actions anti-métabolismes de la majorité de ces molécules imposent une répartition (stockage dans les vacuoles cellulaires), spécifique (laticifères) ou non (**Bruneton, 2009**).

En générale, les alcaloïdes sont produits dans les tissus en croissance : jeunes feuilles, jeunes racines. Puis, ils gagnent ensuite des lieux différents et, lors de ces transferts, ils peuvent subir des modifications.

Ainsi, la nicotine, produite dans les racines, migre vers les feuilles. Dans de nombreuses usines, les alcaloïdes se localisent dans les pièces florales, les fruits ou les graines, ces substances sont trouvées concentrées dans les vacuoles (**Krief, 2003**). Ce sont des composés relativement stables qui sont stockés dans les plantes en tant que produits de différentes voies biosynthétiques (**Mauro, 2006**). Au niveau de la plante, les alcaloïdes jouent un rôle essentiel dans la protection du végétale contre les animaux come agents phytophages ; ils ont également la plus importante des rôles produit d'excrétion du métabolisme azoté, Substance de réserve, Régulateurs de croissance (**Bruneton, 1999**). La nicotine ne permet pas la croissance des larves du tabac. (**Harborne et al., 1995**).

Selon **Da conceicao, (2010)** les alcaloïdes tout d'abord, ont des effets bénéfiques sur la plante synthétisante dont ils régulent la croissance et le métabolisme interne végétaux, ils désintoxiquent et transforment les substances nocives au végétal, ils protègent la plante contre les rayons UV, comme ils ont des effets contre les herbivores (**Mauro, 2006**). Comme agent agricoles, les extraits des alcaloïdes isolés et purifiés sont également appliqués comme insecticide efficace dans des serres.

Sur le plan thérapeutique, les alcaloïdes ont de nombreuses applications pharmaceutiques trouvées chez l'homme comme antalgiques (Morphine), vasodilatateurs (Vincamine), anti tumoraux (Taxol), spasmolytiques (Papavérine), émétiques (Emétine) et anti arythmiques (quinine) (**Kone, 2009**)(**Figure 03**). Ils sont aussi utilisés dans plusieurs médicaments, qui affectent chez l'être humain le système nerveux particulièrement les transmetteurs chimiques tels l'acétylcholine, la norépinephrine.

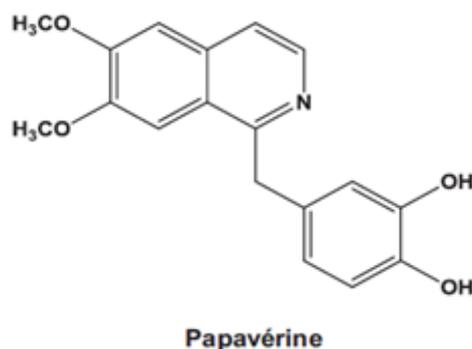


Figure 03 : La Papavérine

Dans de nombreux cas, il a prouvé que ces alcaloïdes servent de produits intermédiaires. Bien que nous ne savons toujours pas la fonction exacte des alcaloïdes dans les plantes. Il peut contenir plus de 100 usines alcaloïdes, mais en général, la concentration ne dépasse pas 10% du poids sec (**Badiaga, 2011**).

Aujourd'hui, il est estimé à plus de 10.000 alcaloïdes différents isolés déjà à partir de sources végétales, animales ou microbiennes (**Badiaga, 2011**) (**Figure 04,05 et 07**).

Pour les sources végétales, les alcaloïdes sont donc des composés essentiellement présents chez les angiospermes. Certaines familles ont une tendance marquée à élaborer des alcaloïdes : c'est vrais aussi bien chez les monocotylédones (ex : *Amaryllidaceae*, *Liliaceae*) que chez les dicotylédones (ex : *Annonaceae*, *Lauraceae*, *Loganiaceae*, *Solanaceae*, etc.). Plus rarement, ils sont présents dans tous les genres (*Papaveraceae*) **(Bruneton, 1987)**.

Certains alcaloïdes trouvés dans plusieurs espèces appartenant à des familles différentes, et parfois très loin taxonomiquement (Caféine), le plus souvent assez proche (Réticuline, Yohimbine). D'autres sont caractéristiques d'un type limité au sein de la famille (hysocamine) ou un groupe d'espèces du genre (thébaïne), et certains sont étroitement spécifiques (Morphine) **(Bruneton, 1987)**.

En général, tous les mêmes alcaloïdes végétaux ont connaissance de l'origine de la génétique biologique commune, même si elle semble être des structures complètement différentes. Pour une plante donnée, la teneur en alcaloïdes peut être très inégale selon les organes, certains pouvant être dépourvus. Il n'est pas rare de constater des différences qualitatives répétées, des dispositifs différents de la même plante contiennent des alcaloïdes différents. Quinine est un exemple typique de ce cas, il s'accumule dans les graines et l'écorce Kurchi (*Holarrhena pubescens*), alors qu'il est absent de la littérature **(Bruneton, 1987)**.

Les alcaloïdes pourraient être considérés comme de nouvelles sources de ces produits naturels. Il s'agit de *Hyoscyamus muticus* **(Figure 04)** et *Scopolia carniolica* **(Figure 05)** qui sont deux plantes très abondantes dans le Sahara. Ces espèces végétales peuvent être valorisées comme source d'alcaloïdes **(Étienne, 2005)**.

Hyoscyamus muticus

Cette espèce, originaire des régions désertiques d'Égypte et d'Iran, figure à la Pharmacopée indienne, à la Pharmacopée internationale et à la Pharmacopée belge. Elle est utilisée surtout comme source d'hyoscyamine et d'atropine : 0,5 à plus d'1 % d'alcaloïdes totaux dont 90 % d'hyoscyamine dans les feuilles **(Étienne, 2005)**.



Figure 04: *Hyoscyamus muticus*

Scopolia carniolica

C'est une plante d'Europe centrale, connue sous le nom de "Belladone de Hongrie", parce que ses feuilles ont été substituées à celles de la Belladone. Les feuilles et les parties souterraines sont assez riches en alcaloïdes constitués par un mélange (Étienne, 2005).



Figure 05 : *Scopolia carniolica*

Il y a longtemps, les alcaloïdes considérés comme des produits du métabolisme des plantes processus seuls. En fait, certains animaux contiennent des structures alcaloïde. Dans certains cas, ce sont les produits formés à partir des alcaloïdes présents dans les végétaux inclus dans le régime alimentaire de l'animal, c'est celui des alcaloïdes pyrrolizidiniques présents chez certains papillons. Les arthropodes sécrètent les alcaloïdes à faible quantité dans leurs glandes exocrines.

Nous pouvons citer les coléoptères, neuroptères. Ces alcaloïdes sont de bas poids moléculaire (pyrrolidines, les pipéridines, les pyrroles, indolizidines, pyrazines), ils sont suffisamment volatils pour former des signaux chimiques, les éléments de défense (allomones) et communication (phéromones) (**Bruneton, 2009**).

L'on rattache même aujourd'hui aux alcaloïdes des composés d'origine animale telle la batrachotoxine extraite de peaux de certains batraciens (dendrobates) et salamandres, ils sont très rares chez les mammifères. Certains insectes comme les fourmis (fourmis de feu ou solenopes invica), les coccinelles, les mille-pattes et certains organisme marins (unicellulaire ou les éponges) en contiennent également (**Bruneton, 2009**).

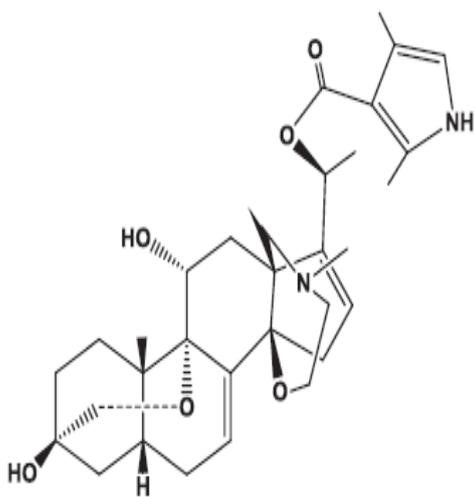


Figure 06 : Batrachotoxine

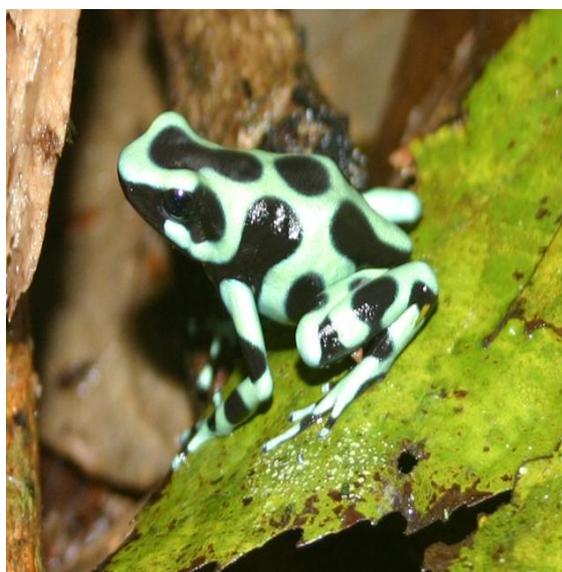


Figure 07 : Dendrobates

Dans les sources microbiennes, les alcaloïdes sont exceptionnels chez les bactéries (ex :pyocyanine de *Pseudomonas aeruginosa*)(**Figure 08**), et assez rares chez les champignons (moisissures) (ex : spordiesmines, roquefortine, psilocine etc) (**Bruneton, 1999**).

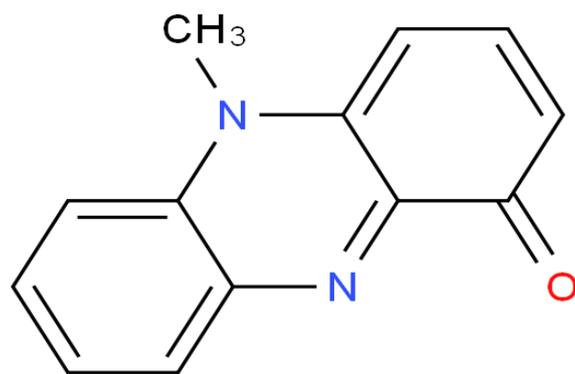


Figure 08 : Pyocyanine

But et objectif de ce travail

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives. Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes (**Bahorun et al., 1996**).

En Algérie, l'industrie pharmaceutique, mais également des médecins et des chimistes cherchent à mieux connaître le patrimoine des espèces spontanées utilisées en médecine traditionnelle. Leurs modes d'utilisation, leurs indications dans diverses pathologies ainsi les principes actifs sont étudiés depuis une vingtaine d'années (**Maizak et al, 1993**).

C'est dans ce contexte, que notre travail s'est penché sur la valorisation d'un sous-produit à haute valeur ajoutée, les écorces des racines *d'Osyris alba*, et cela à travers un ensemble de tests chimiques et analyses qui permettent la détection, la détermination de la teneur des alcaloïdes, molécules bioactives à multi usage, ainsi que l'évaluation de son pouvoir antioxydant en utilisant deux méthodes classiques :

La méthode de piégeage du radical libre DPPH

La capacité anti oxydante totale C.A.T

Matériel & Méthodes

Le travail qui fait objet de notre étude était réalisé au niveau de Laboratoire des Produits Naturels **LAPRONA**. Adapté par l'équipe des analyses physicochimique des plantes et leurs propriétés nutritionnelles au Département de Biologie de l'Université de Tlemcen, Algérie.

La présente étude s'est intéressée à la recherche, l'extraction et la détermination quantitative des alcaloïdes à partir des écorces de la racine d'*Osyris alba*, ainsi la détermination de son pouvoir antioxydant en utilisant deux méthodes classiques très connues dans la littérature : la capacité antioxydante totale (C.A.T) et le piégeage du radical libre (D.P.P.H).

1. Présentation du matériel végétal :

Osyris alba (nommé aussi le Rouvet blanc) est une plante, toujours verte. Elle appartient également à la famille des Santalacées qui subdivisé en six ou sept types selon les classifications (**Mabberley, 1997**). C'est un arbre ou arbuste, dont la longueur est comprise entre 50 et 150 cm. Ces feuilles sont lancéolées ou lancéolées-linéaires. Le fruit charnu rougeâtre d'où vient le nom OSYRIS (**Quezel et Santa, 1963**).

Cette espèce se développe sur le pourtour méditerranéen et que l'on trouve en Charente-Maritime et dans le nord de la Gironde (**Quezel et Santa, 1963**). Elle est largement répandue dans le sud de l'Europe, en Afrique du Nord et en Asie du Sud-ouest et dans différentes localités en Turquie (**Aronne et al, 1993**). On la trouve dans toute la région méditerranéenne (Espèce méditerranéenne présente en altitude dans le Sahara central), assez commun dans le Maroc; la Tunisie ; l'Algérie et jusqu'à la Libye (**Quezel et Santa, 1963**). Elle est également basée aussi en Espagne *Osyris quadripartita*. En Algérie, *Osyris alba* est très commune au Tell Algérien, mais très rare dans le secteur de Sahara centrale (**Quezel et Santa 1963**). Ce type formant également des peuplements denses qui se développent d'une manière commune dans une certaine mesure dans les forêts et les arbustes dans la région de Tlemcen.

Les racines de cette plante naissent éparées sur de longs rhizomes qui rampent sous terre à une faible profondeur; elles consistent en fibres peu ramifiées. Les parties fines des racines portent des suçoirs qui pénètrent dans les parties souterraines des diverses plantes sur lesquelles il est parasite. Ses tiges et rameaux présentant des côtes. Elles sont vertes

anguleuses à rameaux effilés, dont les fleurs naissent en grand nombre le long des rameaux dans leur partie supérieure.



Figure 09 : Racine d'*Osyris alba*

Les feuilles sont étroites, linéaires, lancéolées, nombreux, petites, à une seule nervure ; Aiguës, pointues au sommet d'un vert bleuâtre et alternes (**Figure 11**).

Le fruit est une drupe rouge de 8-10 mm à noyau blanc et d'abord charnus à la maturité. Ils se dessèchent ensuite rapidement et deviennent durs entourés par des petites feuilles allongées. La fructification de fruit sera en août-septembre (**Quezel et Santa, 1963**) (**Figure 10**).



Figure 10 : Les fruits d'*Osyris alba*

Les fleurs sont petites (50-150 mm), dioïques ou monoïque, jaunâtres, odorantes (à odeur de miel), les mâles nombreuses, pédicellées. Forment des grappes axillaires le long des rameaux supérieurs ; quelque fois elles sont hermaphrodites. Elles se montrent du mois d'avril au mois de juin-Août (**Ozenda, 1991**) (**Figure 11**).



Figure 11 : La partie aérienne d'*Osyris alba* (tige, rameaux, feuilles et fleurs)

2. Préparation du matériel végétal :

Les racines d'*Osyris alba* ont été récoltés au mois de Février 2017 de la région de Beni Snous –Tlemcen-(Nord-Ouest Algérien).

Ces racines ont subi une série de traitements pour l'obtention d'une poudre fine dont le but est d'extraire les alcaloïdes.

Après avoir bien nettoyés des poussières et d'autres impuretés, les écorces sont détachés des racines et séchées à l'abri de la lumière et l'humidité pendant quelques jours, Après L'échantillon est broyé jusqu'à obtention d'une poudre fine. La poudre ainsi obtenue est conservée dans des flacons en verre étiquetés, bien hermétique à l'abri de la lumière vue son utilisation ultérieure.



Figure 12 : Echantillon séché et broyé

3. Matériels et méthodes appliqués

3.1. Détermination de la teneur en humidité et de la matière sèche

Le taux d'humidité est le rapport du poids perdu au cours du séchage au poids frais de l'échantillon, ce rapport est multiplié par 100 (**Bergoin, 2005**).

❖ Principe :

Dans une étuve réglée à une température de 100°C à 105°C et sous pression atmosphérique, on a effectué la dessiccation de l'échantillon à analyser jusqu'à l'obtention d'une masse pratiquement constante. On a utilisé des vases de tare on les plaçant dans un dessiccateur contenant le gel de silice qui sert à absorber l'humidité atmosphérique (**Audigie et al., 1980**).

❖ Mode opératoire :

Les vases de tare sont séchées au sein de l'étuve à 100°C pendant 30 minutes. On a laissé les couvercles des vases inclinés.

Peser les vases de tare avec leurs couvercles (**P1**), après leur refroidissement dans un dessiccateur pendant 20 à 30 minutes ;

Chaque vase est mené de 2g de l'échantillon moulu, on ferme avec les couvercles et on les pèse (**P2**) ;

les vases contenant les échantillons sont placés dans l'étuve pendant 3 heures à 105°C avec couvercles inclinés. Puis on met rapidement les couvercles afin de les refroidir dans le dessiccateur pendant 15 minutes et on pèse (**P3**).

Remettre les vases avec couvercles inclinés dans l'étuve durant 1 heure et peser comme précédemment.

La différence entre deux pesées doit être inférieure à 2 mg, sinon l'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'un poids constant.



Figure 13 : Détermination gravimétrique de la teneur en humidité par étuvage à 105°C

Expression des résultats :

Le taux d'humidité (%) d'un échantillon de matériel végétal est donné par la formule suivante:

$$\text{Taux d'humidité (\%)} = [(P_2 - P_3) / (P_2 - P_1)] \times 100$$

Dont :

P1 : masse en g de la vase de tare.

P2 : masse en g de la prise d'essai avant séchage.

P3 : masse en g de la prise d'essai après séchage.

A partir de la teneur en humidité on peut déterminer le taux de matière sèche qui est donné par la formule suivante:

$$\text{Taux de matière sèche (\%)} = 100 - \text{Taux d'humidité (\%)}$$

3.2. Recherche et test phytochimique pour les alcaloïdes

❖ Principe :

L'examen phytochimique permet de détecter la présence ou l'absence des alcaloïdes. Il est réalisé, généralement sur des extraits déjà préparés par épuisement à chaud (reflux 1 heure) ou par macération à la température ambiante (12 heures).

Ils sont basés sur : les essais de solubilité, des constituants de la plante, vis-à-vis des solvants organiques de polarité différente: l'eau, l'éthanol, et l'éther di éthylique ; Réaction de coloration et/ou de précipitation.

❖ Mode opératoire :

Dans un ballon surmonté d'un réfrigérant 5g d'échantillon séché à l'air sont séquentiellement extraits par reflux en utilisant 200ml de chaque solvant (eau distillée, éthanol et l'éther di-éthylique) Les extraits brutes sont filtrés, concentrés, à l'aide d'un rotavapeur, et stocker à 4°C et utiliser pour les analyses ultérieurs (**Trease et Evans, 1987**).

Dans un bain-marie on mélange 0.2ml de l'extrait aqueux, éthanolique, étherique avec 5ml d'une solution aqueuse de HCl préparée à 1% (en utilisant un agitateur avec barreau magnétique).

Après filtration un volume de 1ml du filtrat est traité par 3 gouttes du tétra-iodo-mercurate de potassium connu sous le nom du **réactif de Mayer**, alors que l'autre quantité (1ml) est traitée par le **réactif de Wagner**. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une turbidité (+), ou d'une floculation (++) , ou d'un précipité (+++) de couleur blanchâtre avec le cas du réactif de Mayer ou noirâtre avec le cas du réactif de Wagner (**Sofowara, 1993 ; Harborne, 1973**).

3.3. Dégraissage de la poudre d'échantillon et obtention du tourteau :

L'élimination de la matière grasse de la poudre d'échantillon à analyser est une étape clé qui précède l'extraction des alcaloïdes, elle est considérée comme un facteur d'optimisation de l'extraction des différents métabolites primaires et secondaires, les corps gras forment des émulsions dans les solvants d'extractions et on obtient des phases non miscibles qui empêchent l'extraction totale des métabolites secondaires (**Yu et Dahlgren, 2005**).

Remarque : le mot tourteau signifie la poudre de plante dégraissée.

Le dégraissage est effectué dans un extracteur de type soxhlet en utilisant un solvant organique

Le n-hexane (spécifique pour les plantes), la durée du dégraissage dépend de la richesse de la plante en matière grasse, elle est entre 6h à 12h (**Lecoq, 1965**). La poudre obtenues après le dégraissage est appelée le tourteau et elle va servir pour l'extraction des alcaloïdes (**Figure 14**).

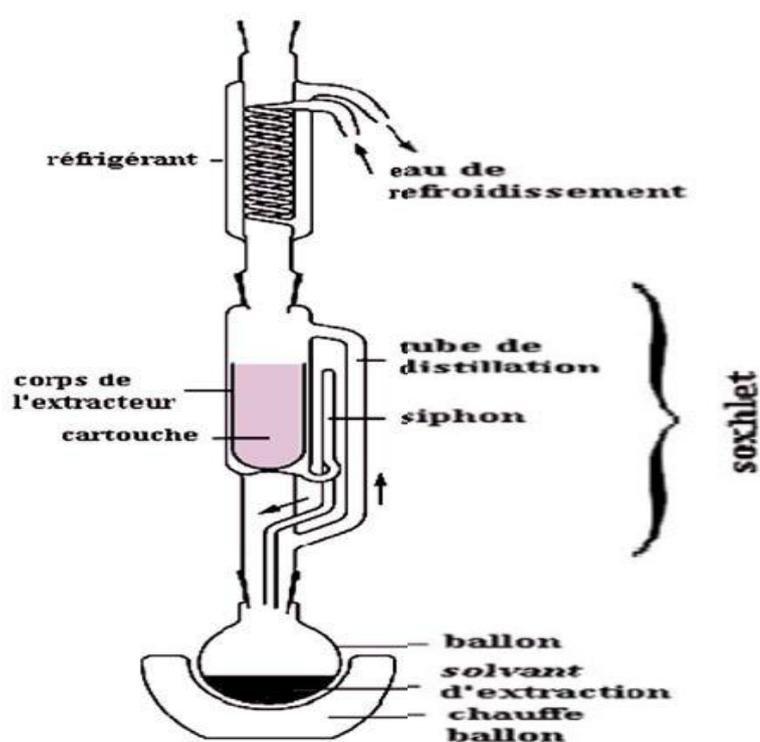


Figure 14 : Dégraissage par le soxhlet

3.4. Extraction sélective des alcaloïdes

❖ Principe :

L'extraction des alcaloïdes est basée sur le fait que le matériel végétal renferme déjà des alcaloïdes sous forme des sels ainsi sur leur basicité. L'extraction consiste à un épuisement des alcaloïdes par une solution alcoolique acidifiée. L'étape de purification est assurée par alcalinisation on utilisant une base concentrée et une filtration dans une ampoule à décanter. Le résidu précipité représente les alcaloïdes totaux (**Bruneton, 1999**).

❖ Mode opératoire :

Dans un bécher, mettre 5g de matière végétale dégraissée ensuite ajouter 250ml de HCl à 2% et 110ml d'Acétate d'éthyle ; le tout est conservé à 4°C pendant 10 heures ;

Filtrer le mélange et récupérer la solution extractive (alcaloïdes sels + impuretés) ;

A l'aide d'un PH-mètre Ajuster le pH de l'extrait (pH=8) en ajoutant quelques gouttes d'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) ;

Dans une ampoule à décanter, extraire trois fois la solution en ajoutant 50ml d'Acétate d'éthyle ;

Débarrasser l'eau par l'ajout d'une pincée de MgSO₄ et filtrer encore une fois ;

Après l'évaporation de la phase organique (l'acétate d'éthyle) on obtient un résidu précipité au fond du ballon qui représente les alcaloïdes totaux (**Harborne, 1998**).

❖ **Expression des résultats :**

Le résidu précipité au fond du ballon lors d'extraction des alcaloïdes nous a permis de déduire le rendement en alcaloïdes totaux suivant la formule suivante :

$$\text{Rendement (Rdt) \%} = \frac{P_3 - P_2}{P_1} \times 100$$

Dont :

P1 : La prise d'essai (g)

P2 : Poids du ballon vide (g)

P3 : Poids du ballon à la fin d'opération (g)

3.5. Evaluation du pouvoir antioxydant

3.5.1. Capacité antioxydante totale (C.A.T)

❖ **Principe :**

La capacité antioxydante totale (CAT) des extraits est évaluée par la méthode de (**Prieto et al., 1999**). Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate à molybdène Mo (V) MoO²⁺ en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) à PH acide.

❖ **Mode opératoire :**

Dans un tube à vis un volume de 0.3 ml de chaque fraction, préparée à une concentration de 1 mg/ml, est mélangé avec 3 ml de solution du Réactif (0.6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium) .

Ensuite, les tubes sont vissés à demis et incubés dans un bain Marie à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 3 ml de la solution du réactif et 0.3 ml du méthanol et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon.

L'étalonnage consiste à préparer une gamme de concentration croissante d'acide ascorbique (0.01 mg/ml,.....,1 mg/ml), 3ml du Réactif de molybdate/phosphate doit être ajoutée à chaque concentration, après agitation et homogénéisation les tubes vissés vont subir les mêmes conditions que l'échantillon. La courbe d'étalonnage est tracée en utilisant le programme d'Excel, l'équation déterminée à partir de la courbe d'étalonnage $[A=f(C)]$ (absorbance en fonction des concentrations) nous a permet de calculer la capacité antioxydante totale de chaque fraction.

La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalents d'acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg EAA/ g MS). Les essais sont répétées 3 fois.

3.5.2. Réduction et piégeage du radical libre DPPH

❖ Principe :

Le DPPH* (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) est pratiquement, le radical libre le plus stable.

En solution (le méthanol ou l'éthanol) le DPPH* est caractérisé par une couleur violette dont l'intensité est mesurée à 515 à 517nm.

En présence d'un donneur d'hydrogène, le DPPH* est réduit à la forme non radicalaire de couleur jaune pale (forme d'hydrazine). Ce passage de la première forme à la deuxième, est accompagné d'une diminution de l'absorbance (DO) qui peut s'exprimer par le pourcentage de réduction de DPPH*.

Conventionnellement une grande capacité de piégeage (réduction) des radicaux libres est considérée comme une grande activité antioxydante (Lee et al.; 2004).



❖ **Mode opératoire : (Sanchez-Moreno et al, 1998)**

100 µl d'extrait de différentes concentration (entre 0,01 à 1 mg / ml), est ajoutée à 3ml de solution méthanolique de DPPH (0,025 g / l). Après agitation et homogénéisation, les échantillons ont été maintenus à l'obscurité à température ambiante pendant 30 min. L'absorbance a été mesurée à 515nm, en utilisant un spectromètre UV / Vis JENWAY 6405, et comparée à un contrôle négatif sans extrait [C-] (100 µl de méthanol + 3 ml de solution de DPPH). L'absorbance du contrôle négatif a été mesurée à t = 0 min. Un blanc a été préparé pour chaque échantillon en utilisant du méthanol au lieu de la solution de DPPH (100 µl d'échantillon + 3 ml de méthanol).

L'acide ascorbique préparé dans le méthanol a été utilisé comme contrôle positif [C +] également connu sous le nom de composé de référence ou de standard; 100 µl d'acide ascorbique ont été préparés à des concentrations (entre 0,01 à 1 mg / ml) et ont été ajoutés à 3 ml de solution de DPPH. Les essais sont répétées 3 fois.

❖ **Expression des résultats:**

Une diminution de l'absorbance du mélange réactionnel a été considérée comme une forte activité antioxydante. Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH (PI%) est donné par la formule suivante (Yen et Duh, 1994).

$$\text{PI (\% (DPPH))} = \left[\frac{A_{(t_0) \text{ contrôle-}} - A_{(t_{30}) \text{ Echantillon ou contrôle +}}}{A_{(t_0) \text{ contrôle-}}} \right] \times 100$$

Dont :

A Contrôle - : Absorbance du Control négative mesuré à $t = 0$

A Contrôle + : Absorbance d'extrait ou de standard (acide ascorbique) à $t=30$ minutes

A partir de la variation du pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration de l'extrait ou de standard (l'acide ascorbique) nous traçons une courbe à partir de laquelle on détermine graphiquement l'IC50 qui est définie comme étant la concentration efficace de l'antioxydant (l'extrait ou standard) nécessaire pour réduire ou inhiber 50% du DPPH.

Résultats & Discussion

1. Détermination de la matière sèche

L'appréciation de la teneur en matière sèche repose sur la détermination du taux d'humidité contenue dans l'échantillon à analyser, et qui accélère la germination et favorise le développement des microorganismes.

La détermination du taux d'humidité au niveau des écorces des racines d'*Osyris Alba* a montré des proportions moyennes estimées à 07,402% (**Figure 15**).

A partir de ces valeurs on a pu déterminer le pourcentage en matière sèche (MS) qui s'est révélé très important (92.598%).

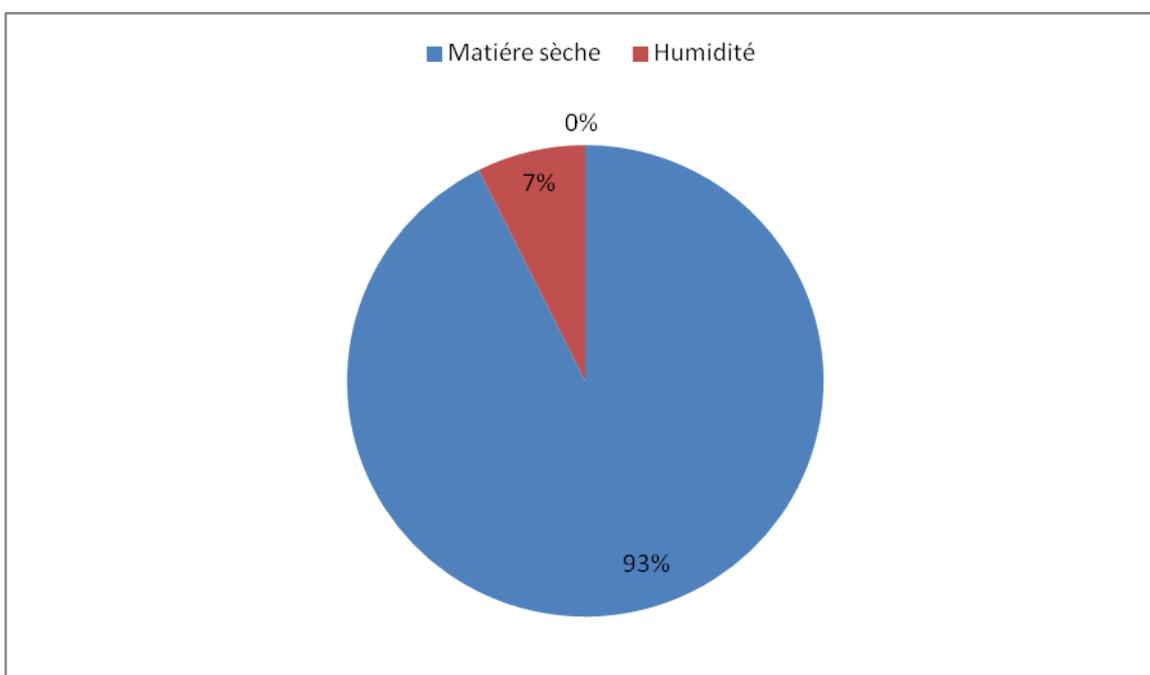


Figure 15 : Taux d'humidité et de matière sèche au niveau des écorces des racines d'*Osyris alba*

La variation de la teneur en matière sèche chez différentes espèces peut être liée aux conditions climatiques au site de récolte, ainsi que les conditions de stockage qui modifient les teneurs en matières sèches (MS) (**Jimenez et al. 1977**).

Ce paramètre a une grande importance pour l'extraction des alcaloïdes, car une teneur en eau très élevée est considérée comme un élément gênant du rendement de l'extraction (**Cork et Krockenberger, 1991**).

2. Tests phytochimiques et recherche des alcaloïdes

Les résultats des réactions de caractérisation des alcaloïdes recherchés dans la poudre des racines *Osyris alba* sont inscrits dans le tableau suivant :

Tableau 02: Tests phytochimiques et recherche des alcaloïdes

Recherche des Alcaloïdes	Poudre des écorces racines d' <i>Osyris alba</i>
Eau distillée	+++
Ethanol	+++
Ether di éthylique	-

D'où :

(+++): Fortement positif ;

(++): Moyennement positif ;

(+): Faiblement positif ;

Grace au screening phytochimique effectué, on a pu détecter la présence des alcaloïdes dans les extraits aqueux et éthanolique des écorces des racines d'*Osyris alba* alors qu'ils sont absents dans l'extrait éther di éthylique d'*Osyris alba* (**Tableau 02**). En effet, ce test nous a orienté sur la qualité des alcaloïdes qu'on a dans les écorces des racines et qu'ils sont de nature sels puisqu'ils sont solubles et présents en fortes teneurs dans les parties polaires (aqueuses et éthanoliques) alors on note l'absence des alcaloïdes de type bases qui préfèrent les solvants apolaires comme l'éther di éthylique (**Bruneton, 1998**).

Nos résultats sont comparables avec ceux obtenus avec (**Kichou, 2012**) qui ont travaillé sur les écorces des racines de la même espèce. Selon les travaux de (**Iwoshina et al., 2008**) ont trouvé que les parties aériennes d'*Osyris alba* sont également riches en alcaloïdes.

Enfin, l'analyse phytochimique vient de confirmer la richesse de la partie souterraine (les écorces des racines) d'*Osyris alba* en matière d'alcaloïdes ce qui nous a motivé à réaliser leur extraction sélective.

Remarque : A notre connaissance, il n'existe aucun rapport dans la littérature concernant l'estimation quantitative et l'évaluation de l'activité antioxydante des alcaloïdes totaux extraits de l'écorce des racines d'*Osyris alba*.

3. Extraction sélective et rendement en alcaloïdes totaux

L'extraction sélective a permis l'isolement des alcaloïdes totaux présents au niveau des écorces de la racine d'*Osyris alba* ainsi la détermination gravimétrique de leur rendement exprimé en pourcentage par rapport à la matière sèche (MS%).

L'estimation de la teneur en alcaloïdes totaux au niveau des écorces des racines du Rouvet blanc (*Osyris alba*) a donné une valeur considérable qui est égale à une moyenne de **0.83%**, cela confirme les tests phytochimiques effectués auparavant.

Selon la littérature (**Bruneton,1999**) et (**Badiaga,2011**) ; les teneurs en alcaloïdes au niveau des plantes ne doit pas dépasser les **10%** du poids sec généralement, elles sont entre (**0.5 -10%**) . Les variations des teneurs en alcaloïdes au niveau des plantes dépendent généralement du mode opératoire utilisé particulièrement la méthode d'extraction qui influence beaucoup les teneurs en alcaloïdes. La source de la plante et les conditions de récolte et de stockage jouent également un rôle important (**Jimenez et al., 1977**).

De plus et pour une plante donnée, la teneur en alcaloïdes peut être très inégale selon les organes, certains pouvant être dépourvus. Il n'est pas rare de constater des différences qualitatives répétées ; des dispositifs différents de la même plante contiennent des alcaloïdes différents (**Bruneton, 1987**).

Les alcaloïdes sont rarement libres dans la plante, ils existent sous forme de glycoses ou de sels d'acide citrique, malique, tartrique, etc. ou sont combinés avec les tanins (**Bruneton, 2009**), le plus souvent situées dans les tissus périphériques : écorces (tige ou racine), téguments (graine). En générale, les alcaloïdes sont produits dans les tissus en croissance : jeunes feuilles, jeunes racines. Puis, ils gagnent ensuite des lieux différents et, lors de ces transferts, ils peuvent subir des modifications (**Krief, 2003**).

4. Evaluation du pouvoir antioxydant des alcaloïdes totaux

Les plantes agissent comme source d'antioxydant. Actuellement, les scientifiques favorisent le développement d'une nouvelle génération de substances anti oxydantes d'origine végétale pour remplacer celles de synthèse. De même, un certain nombre de secteurs industriels se tournent de nouveau vers l'incorporation de ces molécules aux caractéristiques biologiques intéressantes dans leurs formulations (**Taviano et al., 2013**). Il est évident que les activités anti oxydantes des extraits de plantes qui sont multifonctionnels ne peuvent être caractérisées par une seule méthode, mais au moins deux systèmes ont été recommandés pour la détermination de l'activité antioxydante pour établir l'authenticité (**Schlesier et al., 2002**).

C'est dans ce contexte qu'on s'est intéressé à la valorisation des alcaloïdes totaux extraits des écorces des racines d'*Osyris alba* toute en évaluant leur activité antioxydante à travers deux méthodes spectro-photométriques :

- 1- La méthode de la Capacité Anti oxydante Totale CAT qui permet l'estimation de la quantité des espèces anti oxydantes des extraits alcaloïdiques ;
- 2- La méthode de piégeage ou nettoyage du radical libre DPPH* par les antioxydants existant dans l'extrait analysé.

4.1. CAT - Capacité anti oxydante totale

La méthode de la Capacité Anti oxydante Totale CAT permet la détermination de la quantité des espèces anti oxydantes existantes dans les extraits alcaloïdiques. La capacité antioxydante totale des alcaloïdes totaux d'*Osyris alba* a été exprimée en équivalents d'acide ascorbique. A cet effet, une courbe d'étalonnage a été effectuée en parallèle, dans les mêmes conditions, en utilisant l'acide ascorbique comme étalon (**Figure 08**).

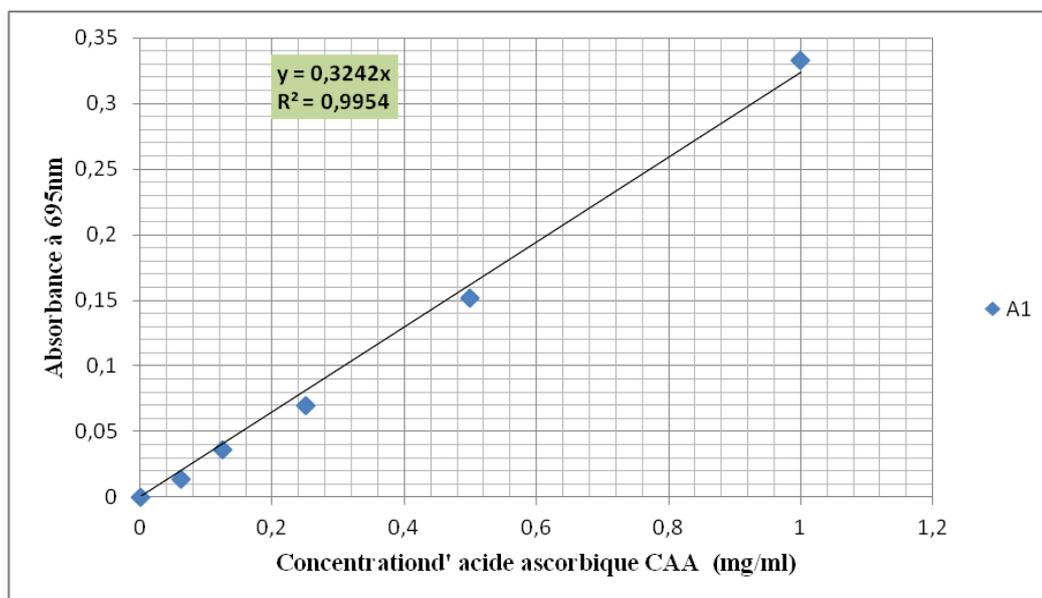


Figure 16 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour la CAT

L'équation déduite de la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique ($A = 0.3242 r2 = 0.995$) permet de calculer:

La concentration des espèces anti oxydantes alcaloïdiques exprimée en mg/ml :

$$C \text{ mg / ml} = [A / 0.3242] ;$$

La concentration des espèces anti oxydantes exprimée en mg Equivalent Acide - Ascorbique par g de matière sèche: $C \text{ mg EAA/ g MS} = [C \text{ mg / ml. } V \text{ ml. } F / \text{MS g}]$

A: absorbance; Vi: volume initial; F: facteur de dilution; MS: matière sèche.

Les résultats de la capacité anti oxydante sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 03: CAT - Capacité anti oxydante totale des alcaloïdes totaux extraits des écorces des racines *d'Osyris alba*.

CAT	CAT mg EAA/ml (C mg/ml)	CAT mg EAA/g MS (C mg/g)
Alcaloïdes totaux	2.326 ± 0.0759	15.3515 ± 0.5014

Selon les résultats, l'étude de la capacité anti oxydante CAT des extraits alcaloïdiques a montré leur richesse en substance anti oxydante exprimée en acide ascorbique qui est estimée à 15.35 mg EAA/g MS.

Les travaux de **(Benhammou et al.,2013)** réalisés sur les alcaloïdes totaux d'*Anabasis articulata* ont montré une capacité anti oxydante totale CAT égale à 2.86 mg EAA/g MS ces valeurs sont nettement inférieure à nos résultats.

4.2. Activité anti radicalaire des extraits alcaloïdiques des racines d'*Osyris alba* (Piégeage du radical libre DPPH*)

Le DPPH* est un radical libre stable, largement utilisé comme outil pour estimer les activités de piégeages et nettoyages des radicaux libres par les antioxydants **(Krishnaiah et al.,2010)**.

Après 30 min d'incubation, nous avons remarqué que l'extrait alcaloïdique et la solution d'étalon qui est ici l'acide ascorbique ; présentent un effet dose –dépendant, c'est-à-dire que le pourcentage de réduction du DPPH* augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait alcaloïdique et aussi celle de l'étalon (acide ascorbique).

A la plus forte concentration 25 µg/ml, le pourcentage d'inhibition ou de réduction (PI%) est de l'ordre 92.1% **(Tableau 04)**, alors que l'acide ascorbique à une concentration de 7.5µg/ml assure une réduction de 96.64% **(Tableau 05)**.

Tableau 04 : Pourcentage de réduction ou d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration des alcaloïdes totaux des racines d'*Osyris alba*

mg/ml ALCT	0	0,39	0,78	1,5625	3,125	6,25	12,5	25
PI%	0	11,444	15	20,3	37,33	33,94	58,58	92,1

Ou ALCT : alcaloïdes totaux

Tableau 05 : Pourcentage de réduction du radical libre DPPH en fonction de la concentration de standard l'acide ascorbique

AA [$\mu\text{g/ml}$]	1,25	2,5	5	7,5
% PI DPPH	23,2409	38,3795	75,586	96,64

Ou AA : acide ascorbique

La détermination de la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire (ou inhiber) 50% du DPPH* exprimé en IC50 est indispensable pour l'évaluation de l'activité anti oxydante.

Ce paramètre est déterminé graphiquement sur les graphes tracés pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait alcaloïdique (**Figure 17**).

L'IC50 est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande.

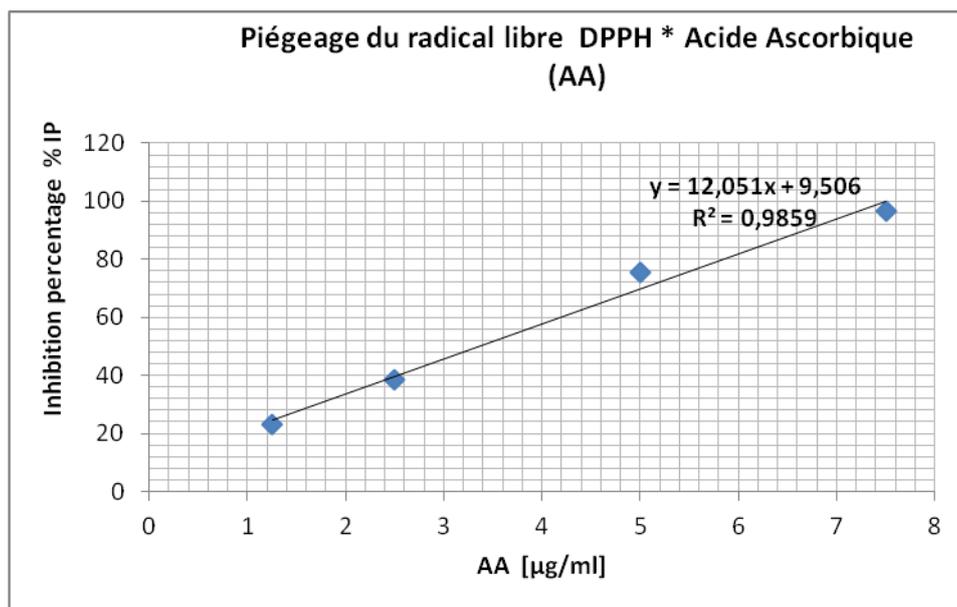


Figure 17: Courbe de piégeage du radical libre DPPH* par l'acide ascorbique

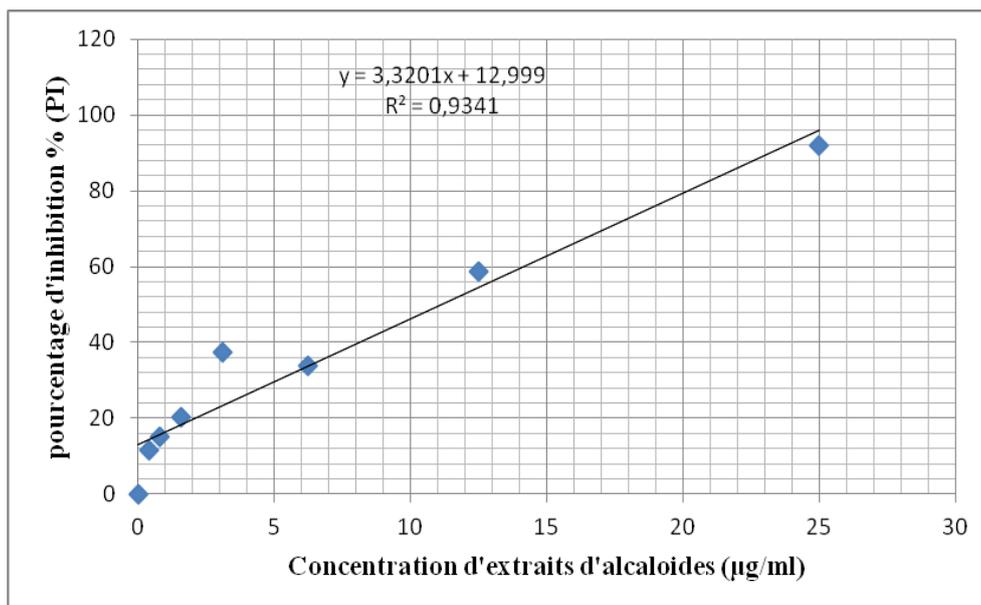


Figure 18: Pourcentage d'inhibition de l'extrait éthanolique d'*Osyris Alba* vis-à-vis du radical libre DPPH*

Les résultats des IC50 des alcaloïdes totaux ALCT qui sont représentés dans la (**figure 19**), indiquent une valeur supérieure à l'acide ascorbique AA estimée à 10.32µg/ml, alors que l'acide ascorbique assure une réduction de 50% du DPPH* à faible concentration 3.25µg/ml. Par comparaison avec un autre standard (le Trolox) on a trouvé que notre valeur est nettement inférieure à l'IC50 du Trolox 42µg/ml (**Rached et al., 2016**).

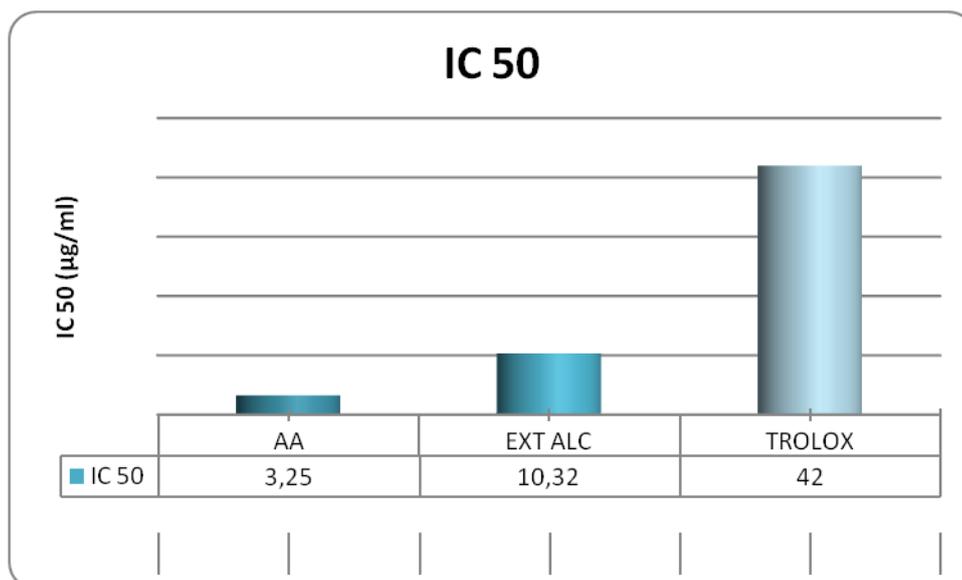


Figure 19 : Comparaison du pourcentage des IC50 de l'extrait alcaloïdique, l'acide ascorbique et trolox

Les valeurs De l'IC50 de notre extrait alcaloïdique sont nettement supérieures de l'IC50 de l'acide ascorbique. Contrairement à l'acide ascorbique qui présente un effet antioxydant à faible concentration (3.25 µg/ml), l'extrait des alcaloïdes totaux agissent à une haute concentration (10.32µg/ml), ceci est lié principalement à leur composition chimique complexe et diversifiée renfermant plusieurs composés qui peuvent par leur effet synergique ou additif, assurer un effet global apparent (**Benariba, 2013**).

Selon les résultats de l'activité antioxydante des alcaloïdes totaux extraits des racines d'*Osyris alba* on peut conclure et dire que la richesse des extraits alcaloïdiques en matière d'espèces antioxydante déduite par la CAT - capacité antioxydante totale CAT, ainsi que le fort pouvoir anti radicalaire évalué par la méthode de piégeage du radical libre DPPH* fait de cet extrait une source naturelle d'antioxydant qui peut remplacer les molécules synthétiques et confirme l'usage thérapeutique des écorces des racines d'*Osyris alba* par la population locale qui se réfèrent principalement aux plantes médicinales de la région.

Conclusion générale

Dans ce présent travail nous sommes intéressé à l'extraction et à la de détermination de la teneur en alcaloïdes au niveau des écorces des racines d'*Osyris alba L*, ainsi qu'à l'évaluation de leur activité antioxydante en utilisant deux méthodes classiques : la capacité antioxydante totale C.A.T et le piégeage du radical libre DPPH.

Dans le choix d'une méthode, on s'est basé sur plusieurs critères : la simplicité, l'efficacité, la certitude de la méthode d'analyse, l'appareillage exigé, le degré d'automatisation, le mécanisme d'action mis en jeu, l'interprétation des résultats et d'autres.

Les analyses effectuées durant notre pratique sont : la détermination du taux d'humidité, les tests phytochimiques, l'extraction sélectives des alcaloïdes et l'évaluation de leur activité antioxydante.

La détermination du taux d'humidité au niveau des écorces des racines d'*Osyris Alba* a montré des proportions moyennes estimées à 07,402%.

A partir de ces valeurs on a pu déterminer le pourcentage en matière sèche (MS) qui s'est révélé très important (92.598%).

Grace au screening phytochimique effectué, on a pu a détecter la présence des alcaloïdes dans les extrait aqueux et éthanolique des écorces des racines d'*Osyris alba* alors qu'ils sont absents dans l'extrait éther di éthylique d'*Osyris alba*. En effet, ce test nous a orienté sur la qualité des alcaloïdes qu'on a dans les écorces des racines et qu'ils sont de nature sels puisqu'ils sont solubles et présents en fortes teneurs dans la parties polaires (aqueuses et éthanoliques).

Par contre on note l'absence des alcaloïdes de type bases qui préfèrent les solvants apolaire comme l'éther di éthylique.

L'estimation de la teneur en alcaloïdes totaux au niveau des écorces des racines du Rouvet blanc (*Osyris alba*) a donné une valeur considérable qui est égale à une moyenne de **0.83%**.

En ce qui concerne l'activité antioxydante, l'étude de la capacité anti oxydante CAT des extraits alcaloïdiques a montré leur richesse en substance antioxydante exprimée en acide ascorbique qui est estimée à 15.35 mg EAA/g MS.

Compte à l'activité anti radicalaire, les résultats des IC₅₀ des alcaloïdes totaux ALCT indiquent une valeur supérieur à l'acide ascorbique AA estimée à 10.32µg/ml, alors que l'acide ascorbique assure une réduction de 50% du DPPH* à faible concentration 3.25µg/ml.

Par comparaison avec un autre standard (Trolox), on a trouvé que notre extrait est fortement actif que le Trolox IC50 (42µg/ml), puisqu'il présente une valeur d'IC50 (10.32µg/ml) nettement inférieure à ce dernier.

Selon les résultats de l'activité antioxydante des alcaloïdes totaux extraits des racines d'*Osyris alba* on peut conclure et dire que la richesse des extraits alcaloïdiques en matière d'espèces antioxydante déduite par la CAT - capacité antioxydante totale CAT, ainsi que le fort pouvoir anti radicalaire évalué par la méthode de piégeage du radical libre DPPH* fait de cet extrait une source naturelle d'antioxydant qui peut remplacer les molécules synthétiques et confirme l'usage thérapeutique des écorces des racines d'*Osyris alba* par la population locale qui se réfèrent principalement aux plantes médicinales de la région.

Ce travail reste préliminaire et on comptant le compléter par l'étude des alcaloïdes de plusieurs échantillons de différentes régions algériennes, ainsi d'étudier les différents organes de cette plante et également l'identification des différents antioxydants présents dans cette plante.

Références Bibliographiques

1. **Athamena S., 2009.** Etude quantitative des flavonoïdes des graines de *Cuminum cyminum* et les feuilles de *Rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique. Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de Magister en Biologie, Option Biochimie appliquée, Université EL-HADJ LAKHDAR-Batna. 88p.
2. **Benaissa O., 2011.** Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. Activité biologique. Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences en Chimie Organique, Option Phytochimie, Université Mentouri-Constantine. 242p.
3. **Jean J.M., Annie F., Chrystian J.L.,2005.** Les composés phénoliques des végétaux. P203-204.
4. **Amas, 1997.** Food and agricultural Research Council, réduit, Mauritius VI.
5. **Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Technique et documentation lavoisier, Paris, p 915.
6. **Krief S., 2003.** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal. Thèse pour l'obtention de doctorat, Muséum National d'histoire naturelle. 32p.
7. **Dalton D.R., 1979.** The alkaloids- The fundamental chemistry, a biogenetic approach, Marcel, New York.
8. **Bruneton J.,1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plante médicinales. 3^{ème} édition. Edition Technique et documentation, Paris, P 783-823.
9. **Lin M., Lui X., Yu D.Q., 1984.** Alkaloids of *Nauclea officinallis*. *Planta Med.*, 50, p459-461.
10. **Cordell G.A.,1981.** Introduction to alkaloids, a biogenetic approach, John Wiley, New York.
11. **François C., 2011.** Guide nutritionnel des plantes sauvages et cultivées.
12. **Mann J., Davidsn R., Hobbs J.B, Banthorpe D.V., Harbone J.B., 1994.** Natural products, Longman, Ch.7, P389.
13. **Badiaga M.,2011.** Etude ethnobotanique, phytochimique et activité biologique de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Université Blaise Pascal- Clermont-Ferrand. P 10, 16, 17,18.
14. **Jean-Louis G., 1996.** Biochimie Végétal, Masson, Paris, partie 3 P221.
15. **Cyril T., 2001.** Etude des métabolismes primaires et secondaires des racines transformées de *Catharanthus Roseusen* vue du développement d'un modèle cinétique, Université de Montréal. 28p.

16. **Rakotonanahary M.,2012.** Thèse présentée pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie diplôme d'état, Université de Joseph Fourier.P 16,19,27,28.
17. **Bruneton J.,2009.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, Paris, 4^{ème} édition Lavoisier.
18. **Mauro N.M., 2006.** Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+) anatoxine-a et la (±) – camptothécine. Thèse présentée pour l'obtention du doctorat, Université Joseph Fourier Grenoble, P 13,16-28.
19. **Kone D., 2009.** Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes – extraction identification d'alcaloïdes- caractérisation, quantification des polyphénols: étude de leur activité antioxydante. thèse présentée pour l'obtention de doctorat, Université de Bamako.

20. **Harborne J.B, Herbert B., 1995.** Phytochemical dictionary : A Handbook of biocative compounds from plants. Bristol: Taylor & Francis.
21. **Bruneton J.,1987.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, Paris 1^{ère} édition Lavoisier.
22. **Etienne J.,2005.** Solanacées médicinales, philatélie, Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. P 144,311-332
23. **Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J.C., Pinkas M., 1996.** Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations, *Arznei. Forschung*, 46. P 1086-1089.
24. **Maizak K., Brac De la Perriere, Hammiche V., 1993.** Pharmacopée traditionnelle : Sahara septentrional. Acte de 2^{ème} colloque européen d'ethnopharmacologie, Heidelberg. P 169-181.
25. **Mabberley D.J., 1997.** A classification for edible Citrus. *Telopea* 7: P 167-172.
26. **Quezel P., et Santa S., 1962; 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I et Tome II. CNRS, Paris. 187p.
27. **Aronne, G., Wilcock, C. C., & Pizzolongo, P. (1993).** Pollination biology and sexual differentiation of *Osyris alba* (Santalaceae) in the Mediterranean region. *Plant systematics and evolution*, 188(1-2), 1-16.
28. **Ozende P., 1991.** Flore et végétation du Sahara. 3^{ème} édition de la flore du Sahara , Paris, Ed. du CNRS.662p.

- 29. Bergoin LEFORT, M.,2005.** Application du concept de raffinage végétal au safran du Quercy (*Crocus sativus*) pour la valorisation intégrée des potentiels aromatiques et colorants. Thèse présentée pour obtenir le titre de Docteur De L'Institut National Polytechnique De Toulouse, Ecole doctorale : Sciences des Procédés, Spécialité : Sciences des Agroressources. 2005. pp.1-329.
- 30. Audigie C.L., Figarelle J. Zons Zani F., 1980.** Manipulation d'analyses biochimiques Ed. Doin, Paris. P88-97.
- 31. Trease E., Evans W.C.,1987.** Pharmacognosy . Billiare.Tindall . LONDON 13TH Ed. P 61-62.
- 32. Sofowara A.,1993.** Medicinal plants and traditional medicine in Africa. Spectrum Books Ltd, Ibadan, Nigeria. P289.
- 33. Harborne, J.B.,1973.** Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. Chapman and Hall. London, pp. 221-232
- 34. Yu Z., Dahlgren R.A., 2005.** Evaluations of methods for measuring polyphenols in copper foliage. J. Chem. Ecol.26: 2119-2140.
- 35. Lecoq ,1965.** Manuel d'analyses alimentaires et d'expertises usuelles.
- 36. Harborne, J.B., 1998.** Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. Third Edition. ISBN: 0-412-57260-5 (HB) and 0-412-57270-2 (PB). 203-214.
- 37. Prieto P.,Pineda M.,Aguilar M., 1999.** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry 269 (2): 337–341.
- 38. Lee K.W., Kim Y.J., Lee C.Y., 2004.** Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxydant capacity than teas and red wine. J. Agric. Food Chem.51. P 7292-7295.
- 39. Sanchez-Diaz A., Gonzalez I., Arellano M., Moreno S., 1998.** The Cdk inhibitors p25rum1 and p40SIC1 are functional homologues that play similar roles in the regulation of the cell cycle in fission and budding yeast. *J Cell Sci* 111 (Pt 6):843-51.
- 40. Yen G.C., Duh P.D., 1994.** Scavenging effect of methanolic extract of peanut hulls on free radical and active oxygen species. J. Agri.Food thec;42. P629-632.
- 41. Jimenez G., 1977.** Agroquimica tecnologia alimentos, 3.P 363-371.

42. **Cork S.J., Kricenberger A.K., 1991.** Methods and pitfalls of extracting condensed tannins and other phenolics from plants: insights from investigations on eucalyptus leaves. *Journal of chemical ecology*. 17 (1): 123-134.
43. **Kichou A., 2012.** Contribution à l'étude des composés phénoliques de deux plantes de la région de Tlemcen « *Quercus ilex* » et « *Osyris alba* ». Mémoire présenté vue l'obtention de diplôme de master II. Université Abou-Bekr Belkaid- Tlemcen.
44. **Iwashina T, Hiyama A., Wachida J., Omi H., Watanabe T., Serigano K., Tamura F., Sakai D., 2008.** *Biochemical Systematics and Ecology* 36 (2008) 146 -147
45. **Taviano MF, Marino A, Trovato A, Bellinghieri V, Melchini A, Dugo P, Cacciola F, donato P, Mendello L, Guvenc A, De-Pasquale R, Miceli N, 2013.** *Juniperus oxycedrus*, L. subsp. *Oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *Macrocarpa* ball. "berries" from turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activités. *Food and Chemical Toxicology*, 58: 22-29.
46. **Schlesier K., Harwat M., Bohm V., Bitsch R. 2002.** Assesment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Res.* 36:177–187.
47. **Benhammou N., Ghambaza N., Benabdelkader S., Atik-Bekkara F., Kadifkova Panovska T., 2013.** Phytochemicals and antioxidant properties of extracts from the root and stems of *Anabasis articulata*, *International Food Research Journal* 20(5): 2057-2063.
48. **Krishnaiah D., Sarbatly D., Nithanandam R., 2010.** A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod.Process.* 89, 217-233.
49. **Rached W., Calhelha R.C., Fernandes A., Carvalho A.M., Benaceur M., Marouf A., A. Barros A., Santos-Buelga C., Ferreira I.C.F.R., 2016.** Phytochemical characterization and bioactive properties of *Osyris quadripartita Salzm.ex Decne.* leaves from Algeria. *Journal of RSC Advances*. pp 72768-72776.
50. **Benariba N., 2013.** contribution a l'étude de l'effet antidiabétique des extraits des graines de *Citrullus colocynthis* chez le rat Wistar rendu diabétique par la streptozotocine. Thèse présentée pour l'btention d'un diplôme de Doctorat en Sciences Option Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Abou Bekr Belkaid6-Tlemcen. P 51.149p.

Annexes

Tableaux :

Tableau 1: Résultats du taux d'humidité et teneur en matière sèche

	Poids en g de la vase de tare (P1)	Poids en g de la prise d'essai avant séchage (P2)	Poids en g de la prise d'essai après séchage (P3)	Taux d'humidité (%)	Taux de matière sèche (%)
Résultats	80.306	82.319	82.170	7.402	92.598

Préparation des réactifs:

1-Réactifs de Mayer:

Dissoudre 1.358 g de **Hg Cl₂** dans 60ml d'eau distillée;

Dissoudre 5 g de **KI** dans 10ml d'eau distillée;

Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100ml d'eau distillée.

2-Réactifs de Wagner:

Dissoudre 2 g de **KI** et 1.27 g de **I₂** dans 75 ml d'eau distillée;

Ajuster le volume total à 100ml d'eau distillée.

3- Réactif de « Phosphate Molybdate » :

Pour préparer ce réactif il faut procéder à la préparation des solutions suivantes :

- Solution « A » Acide sulfurique 0,6M : prendre 3,263ml (H₂SO₄) + 100 ml d'eau distillé
- Solution « B » Sodium triphosphate 28 nM : prendre 0.459 g (Na₃PO₄) et ajuster à 100 ml d'eau distillé.
- Solution « C » Ammonium molybdate 4nM : prendre (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 0.494 g et l'ajuster a 100 ml d'eau distillé

On met des quantités égales (50ml) de l'acide sulfurique (0,6mM), de Sodium Trisodique (28mM), et d'Ammonium Molybdate (4mM).

4- Préparation de la solution DPPH

La solution du DPPH est fraîchement préparée et conservé à l'obscurité

- Peser de 0.044 g de poudre DPPH.
- Ajuster à 50ml de méthanol dans un Bécher.
- Poser le Bécher sur l'agitateur pour bien mélanger la solution.
- Laisser le bécher dans l'obscurité avant l'usage.

Résumé

المخلص

أوزيريس ألبا من عائلة الصندليات هي نبتة معروفة لدى السكان المحليين القاطنين في منطقة بني سنوس وعين غرابة الواقعة في الجنوب الغربي لولاية تلمسان. منذ القدم استخدمها السكان الاصليون في الطب العشبي كمقوي للضعف العام وكمضاد للأنيميا و الالتهابات خاصة المعوية منها. وفي هذا الصدد قمنا باستخلاص مركب القلويد من قشرة الجذور وبعد ذلك قمنا بدراسة نشاطها المضاد للأكسدة عن طريق القدرة العامة المضادة للأكسدة و عن طريق النشاط المضاد للشقوق الحرة المعروف ايضا بطريقة تنظيف الشق الحر (دي بي. بي. اش). بعد التحاليل اظهرت النتائج نشاطا معتبرا لمستخلص القلويد كمنظف قوي للشق الحر و اكدت غناه بالمواد المضادة للأكسدة. من خلال هذه النتائج يمكننا اعتبار قشور جذور نبتة الاوزيريس البيا كمصدر هام وطبيعي للمواد المضادة للأكسدة مما يؤكد لنا اهمية هذه النبتة في الطب الشعبي العشبي.

الكلمات المفتاحية : اوزيريس البيا , قشرة الجذور, النشاط المضاد للأكسدة, تنظيف الشقوق الحرة , دي بي بي اش, القدرة المضادة للأكسدة القلويد

Résumé

Osyris alba (Rouvet blanc), de la famille des santalacées, est une plante connue par la population locale, qui habite la région des montagnes de Beni Snousse (Sud ouest de la Wilaya de Tlemcen. Depuis des centaines d'années les habitants originaires de cette région avaient utilisé les écorces des racines de cette plante comme fortifiant et anti anémique et comme anti inflammatoire intestinal. Notre contribution vise la détermination quantitative des alcaloïdes extraites de ces écorces, ainsi qu'à l'évaluation de leur l'activité anti oxydante. L'activité antioxydante a été estimée par deux méthodes spectrophotométriques, la méthode de DPPH et de capacité anti-oxydante totale (CAT). Les résultats d'analyse, ont montré que l'extraits alcaloïdiques exerce une forte activité de piégeage des radicaux libres DPPH en comparaison avec le Trolox.les résultats de la capacité antioxydante totale viennent de montrer la richesse de l'extrait alcaloïdique en matière anti oxydante exprimée en acide ascorbique.

A partir de ces résultats intéressants on peut dire que les ecroces des racines de l'*Osyris alba* sont considérés comme une source d'antioxydants naturels.

Mots clefs : *Osyris alba*, Ecorces des racines, Alcaloïdes, activité anti-oxydante, radical libre DPPH, CAT.

Summary

Osyris alba is a plant known by the local population, which inhabits the region of the mountains of Beni Snousse (South west of the Wilaya of Tlemcen.) For hundreds of years the inhabitants of this region had used the root bark of this plant as a fortifying, anti anemic and as an intestinal anti-inflammatory.

Our contribution aims at the quantitative determination of the alkaloids extracted from these barks, as well as on the evaluation of their antioxidant activity.

The antioxidant activity was estimated by two spectrometric methods, the DPPH and total antioxidant capacity (TAC) method. The results of the analysis showed that the alkaloid extract exerted a high DPPH free radical scavenging activity in comparison with the Trolox standard.

From TAC method, the results show the richness of this extract in antioxidants substances expressed in ascorbic acid. From these interesting results it can be said that the root bark of *Osyris alba* are considered as a source of natural antioxidants.

Keywords: *Osyris alba*, Root bark, Alkaloid extract, antioxidant activity, free radical DPPH, CAT.