



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



LASNABIO

UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCCEN

MEMOIRE

Présenté à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

MASTER EN CHIMIE

Spécialité: Chimie des produits naturels

Par :

Mr. Soulimane Karam Adel

Sur le thème

Etude chimique et activité anti oxydante de *Rhus pentaphylla* Desf.

Soutenue publiquement le 26 Juin 2018 à Tlemcen devant le jury composé de :

Mr Bensaid Okkacha	Professeur	Université de Tlemcen	President
Mr Ghalem Said	Professeur	Université de Tlemcen	Examineur
Mr Selles Chaouki	Professeur	Université de Tlemcen	Encadreur

Laboratoire LASNABIO
BP 119, 13000 Tlemcen – Algérie

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je remercie Dieu pour m'avoir donné la santé, le courage et la volonté pour achever ce travail, qui a été réalisé au sein du laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives «**LASNABIO** » de la faculté des sciences, Université de Tlemcen dont je remercie son directeur **Pr. Saïd Ghalem**.

Ce mémoire a été réalisé sous l'encadrement du **Pr. Chaouki Selles**. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour m'avoir encadré et veillé au bon déroulement de ce travail. Merci d'avoir toujours été disponible et pour m'avoir guidé par vos conseils et orientations.

J'exprime mes sincères remerciements au **Pr. Amine Dib** de m'avoir aidé durant mes deux années de master.

Que les membres de jury trouvent ici l'expression de mon profond respect et de mes remerciements les plus sincères pour l'intérêt qu'ils portent pour juger ce modeste travail, en l'occurrence : **Pr. Okkacha Bensaid** et **Pr. Saïd Ghalem**.

Mes vifs remerciements vont à M^{lle} **Nassima Benmansour**, pour son orientation et son aide.

Que Mademoiselle **Imen Terbeche** Ingénieur de laboratoire, reçoive ma vive reconnaissance pour son aide techniques si précieuse.

Un grand merci à tous mes amis de la promotion du Master CPN, Je vous remercie tout simplement d'être vous-même et pour les moments inoubliables que nous avons partagés ensemble.

Merci à ceux et celles qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin dans mon travail, je les remercie du fond du cœur.

Dédicaces

*A mes parents, que dieu les garde,
en témoignage de ma profonde affection.
Qu'ils sachent que ce travail est en partie le fruit de leur soutien.*

*Mes remerciements s'adressent également à ma famille,
Qui sont toujours là pour moi*

A mes frères.

A mes chers amis.

Sommaire

Introduction générale

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Etude botanique

I. Famille des Anacardiaceae.....	02
I.1. Genre <i>Rhus</i>	02
I.2. Caractères botaniques de la famille.....	02
I.3. Présentation de l'espèce <i>Rhus pentaphylla</i> Desf.....	02
I.3.1. Etymologie.....	02
I.3.2. Ecologie et habitat.....	02
I.3.3. Classification systématique.....	03
I.3.4. Description botanique.....	03
I.3.5. Utilisations traditionnelles.....	03
I.3.6. Travaux scientifiques réalisés sur <i>Rhus pentaphylla</i> Desf.....	04

Chapitre II : Métabolites chimiques

II. Polyphénols.....	06
II.1. Flavonoïdes.....	06
II.1.1. Structure et classification.....	06
II.1.2. Principales classes de flavonoïdes.....	06
II.2. Tanins.....	07
II.3. Huiles essentielles.....	07
II.3.1. Méthodes d'extraction.....	07
II.4. Acides gras et insaponifiables.....	08
II.4.1. Acides gras.....	08
II.4.2. Insaponifiables.....	08

Chapitre III : Activité antioxydante

III. Antioxydants.....	09
III.1. Définition.....	09
III.2. Mécanisme d'action.....	09
III.3. Radicaux libres.....	09

Partie II : Partie Expérimentale

Chapitre IV : Matériel et méthodes

IV.1. Matériel végétal.....	10
IV.2. Criblages photochimiques.....	10
IV.2.1.1. Préparation des extraits bruts	10
IV.2.1.2. Extraction par macération.....	11
IV.2.2. Tests de caractérisation.....	12
IV.3. Dosages des métabolites secondaires.....	16
IV.3.1. Dosages des polyphénols totaux	16
IV.3.2. Dosages des flavonoïdes.....	17
IV.3.3. Dosage des tanins.....	17
IV.4 Huiles essentielles et hydrolat.....	18
IV.4.3. Procédé d'obtention de l'extrait d'hydrolat.....	19
IV.5. Analyse de l'huile essentielle et l'hydrolat par CPG-SM.....	19
IV.6. Extraction des acides gras et des insaponifiables.....	19
IV.7. Évaluation de l'activité antioxydante.....	20
IV.7.1. Test de piégeage du radical libre DPPH.....	20
IV.7.2. Test de la réduction du fer FRAP.....	21

Chapitre V : Résultats et discussion

V.1. Calcul du rendement.....	22
V.2. Criblage phytochimique.....	22
V.3. Résultats des dosages.....	23
V.4. Huiles essentielles et hydrolat.....	23
V.5. Acides gras et insaponifiables.....	24
V.5.2 Analyse des acides gras par CPG-SM.....	25
V.6. Évaluation de l'activité antioxydante.....	25
V.6.1 Méthode du piégeage du radical libre DPPH.....	25
V.6.2. Méthode de réduction des ions ferriques FRAP.....	27

Conclusion générale

Références bibliographiques

Annexe

Liste des Figures

Figure 1	:	<i>Rhus pentaphylla</i>	03
Figure 2	:	Structure de base des flavonoïdes	06
Figure 3	:	Structure de base des flavones	07
Figure 4	:	Structure de base des flavonols	07
Figure 5	:	Montage de soxhlet	10
Figure 6	:	Montage du reflux	11
Figure 7	:	Montage de l'hydrodistillation	18
Figure 8	:	% d'inhibition du radical DPPH de l'huile essentielle et hydrolat	26
Figure 9	:	% d'inhibition du radical DPPH de l'extrait méthanolique	26
Figure 10	:	% d'inhibition du radical DPPH de l'extrait aqueux	26
Figure 11	:	% d'inhibition du radical DPPH des tanins	28
Figure 12	:	% d'inhibition du radical DPPH de l'extrait butanolique	26
Figure 13	:	% d'inhibition du radical DPPH de l'extrait acétate d'éthyle	26
Figure 14	:	Pouvoir réducteur du fer de l'huile essentielle et de l'hydrolat	27
Figure 15	:	Pouvoir réducteur du fer de l'extrait méthanolique	27
Figure 16	:	Pouvoir réducteur du fer de l'extrait aqueux	27
Figure 17	:	Pouvoir réducteur du fer des tanins	27
Figure 18	:	Pouvoir réducteur du fer de l'extrait butanolique	28
Figure 19	:	Pouvoir réducteur du fer de l'extrait acétate d'éthyle	28

Liste des Tableaux:

Tableau 1	:	Rendement en (%) des extraits bruts sec des feuilles et des racines	22
Tableau 2	:	Résultats de tests phytochimiques	22
Tableau 3	:	Résultats des dosages	23
Tableau 4	:	Compositions de l'huile essentielle et de l'hydrolat.	24
Tableau 5	:	Rendement des acides gras et insaponifiables	24
Tableau 6	:	Composition en acides gras des racines de <i>Rhus Pentaphylla</i>	25
Tableau 7	:	Valeurs d'IC ₅₀ des différents extraits par la méthode DPPH.	28
Tableau 8	:	Valeurs d'IC ₅₀ des différents extraits par la méthode FRAP.	29

Liste des abréviations:

C	:	Concentration.
DPPH	:	2, 2-Diphényl-1- Picrylhydrazyle.
FRAP	:	Ferric Reducing Ability of Plasma.
CPG	:	Chromatographie en Phase Gazeuse.
CPG-MS	:	Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse.
g	:	Ggramme.
IC ₅₀	:	Concentration d'inhibition de 50% des radicaux libres.
L	:	Litre.
M	:	Molarité.
mg	:	Milligramme.
ml	:	Millilitre.
min	:	Minute.
MeOH	:	Methanol.
nm	:	Nanomètre.
N	:	Normalité.
V	:	Volume.
μL	:	Microlitre.
Km	:	Kilometre
n-buOH	:	n-Butanol
Ac-Et	:	Acétate d'éthyle
HE	:	Huile essentielle
Hy	:	Hydrolat
IR _a ^c	:	Indice de retention

INTRODUCTION GENERALE

Depuis notre existence, l'homme a vite connu l'utilité et l'intérêt des plantes. En effet, la biodiversité représente une ressource naturelle essentielle à la production alimentaire, à la production de médicaments, à l'industrie et à la recherche scientifique [1].

Grace à leurs principes actifs très variés, les plantes font l'objet de beaucoup d'études scientifiques qui ne cessent d'augmenter. Par le passé, ces études ont abouti à des résultats phénoménaux et ont permis la découverte des milliers de substances qui sont devenues indispensables à notre vie [1].

Le nord ouest Algérien possède une flore riche et diversifiée où beaucoup de plantes ne sont pas encore valorisées. L'étude qui fait l'objet du présent mémoire rentre dans le cadre de la valorisation d'une plante algérienne pour la recherche de molécules bioactives nouvelles d'origine végétale.

Nous nous sommes donc intéressés à l'investigation phytochimique et l'évaluation des activités antioxydantes de quelques extraits d'une plante de la région de Tlemcen : *Rhus pentaphylla* Desf. A notre connaissance, aucun travail n'a été rapporté sur la composition chimique de l'huile essentielle de *R. pentaphylla* obtenue par hydrodistillation et de son hydrolat ainsi que sur son activité antioxydante. Par ailleurs, ses acides gras n'ont pas encore été étudiés. +

Notre étude sera répartie en trois parties principales :

La première est consacrée à une synthèse bibliographique menée essentiellement sur l'espèce en question.

La deuxième concerne le travail expérimental qui consiste à :

- Faire un criblage phytochimique préliminaire pour déceler les différents groupes chimiques présents dans chaque espèce.
- Extraire les huiles essentielles de *R. pentaphylla* et de son hydrolat ainsi que les acides gras et la détermination de leurs compositions chimiques par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
- Investiguer la classe des polyphénols par leur extraction et leur dosage.
- Evaluer *in vitro* les propriétés anti-oxydantes des différents extraits par deux méthodes différentes : DPPH et FRAP.

Dans la troisième partie, une discussion sera donnée et une conclusion résumera l'essentiel du travail réalisé.

Partie I : Synthèse bibliographique

CHAPITRE I : Étude botanique

I. Famille des *Anacardiaceae*:

La famille botanique des Anacardiaceae compte des arbres et des arbustes qu'on trouve très fréquemment dans les régions tropicales et subtropicales et dans les régions de l'hémisphère Nord tempéré [2].

La composition de cette famille n'est pas connue exactement et diffère d'un auteur à l'autre. D'après Guyots (1992), il est mentionné que cette famille a 60 genres et 600 espèces, et selon Mabberley (1987) il compte 73 genres et 850 espèces dont le genre le plus grand dans cette famille est *Rhus* dont on compte une centaine d'espèces. Selon Pell (2004), cette famille contient 82 genres et 700 espèces [3].

I.1. Genre *Rhus*[4] :

Le *Rhus* est constitué d'arbres ou d'arbustes, appelés sumacs qui signifie la couleur rouge, car les plantes de ce genre ont une forte concentration en tanins, ce genre comporte 125 espèces.

En Algérie, on trouve principalement trois types de *Rhus* : *Rhus coriaria*, *Rhus tripartitum* et *Rhus pentaphylla* [4].

I.2. Caractères botaniques de la famille :

Les plantes de cette famille sont des plantes ligneuses. Elles sont dotées de canaux sécréteurs oléo résineux qui contiennent généralement de la résine ou même de la cire, et une sève laiteuse, mais qui peuvent parfois être nocives ou créer des réactions allergisantes [4].

Les feuilles des plantes de cette famille ont un système de feuillage sans stipules. Les feuilles poussent de façon alternée. Le fruit est petit et comestible pour la plupart des espèces [4].

I.2. Présentation de l'espèce *Rhus Pentaphylla* [5]:

- Autre nom communs : Sumacs, ou Summaq
- Non scientifique : *Rhus Pentaphylla* (Jacq.), *Rhus pentaphyllum*.
- Non vernaculaire : Tizra, Tizraha, Taza, jdari, sommacco cinquefogliato

I.2.1. Étymologie :

Le nom de cette plante est constitué de trois parties, *Rhus*, *penta* et *phylla*. *Rhus* est le genre botanique de cette plante qui provient du syriaque et signifie rouge car les graines sont caractérisées par la couleur rouge. *Penta* veut dire cinq et *phylla* signifie feuille. Il s'agit donc du *Rhus* à cinq feuilles [6].

I.2.2. Écologie et habitat :

Cette plante pousse généralement avec l'arganier et *Pistacia lensiscus* L, sa présence dans un sol est un indicateur que c'est un sol peu fertile est qui n'est pas bon pour la plantation en général. Elle est souvent présente dans les sols rocaillieux plus ou moins, dans les forêts arides et

dans les montagnes basses à moins de 1 Km de hauteur. A Tlemcen, elle est présente plutôt dans la région de Zarifet, de Ghazaouet et Beni-saf [7].

I.2.3. Classification systématique :

Règne	plantae
Sous-règne	Angiospermes
Division	Eudicots
Classe	Eudicots
Sous-classe	Magnoliophyta
Ordre	Sapindales
Famille	Anacardiaceae
Genre	Rhus

I.2.4. Description botanique :

C'est un arbrisseau épineux et touffu de la famille des Anacardiaceae qui peut atteindre 5 à 6 m. Ses feuilles caduques sont en 5 folioles cunéiformes de 5-7 fois plus longues que larges, entières ou plus ou moins dentées au sommet. Le fruit est une drupe jaune-rougeâtre globuleuse [4].



Figure 1 : *Rhus pentaphylla*

I.2.5. Utilisations traditionnelles :

Rhus Pentaphylla est une plante médicinale connue pour sa grande concentration en tanins et dont les extraits sont utilisés pour le tannage [8]. Les racines, les feuilles et les écorces de cette plante depuis longtemps sont utilisés en décoction contre les troubles gastriques et gastro-intestinaux [9]. Les fruits de cette plante ont un effet remarquable contre les diarrhées [9]. Les femmes des campagnes ont l'habitude d'utiliser cette plante en cuisine [10].

I.2.6. Travaux scientifiques réalisés sur *Rhus pentaphylla* :

L'espèce dont nous nous sommes intéressés, appartient à la famille des Anacardiaceae ; il s'agit de *Rhus pentaphylla* Desf.. Les travaux scientifiques publiés sur cette famille sont largement inférieurs à ceux rapportés sur d'autres familles comme les Asteraceae ou les Fabaceae. Suite à une recherche bibliographique approfondie, *R. pentaphylla* Desf. Reste jusque-là, très peu étudiée.

Jusqu'à présent, les efforts de recherche effectués sur les extraits du genre *Rhus* révèlent un potentiel prometteur pour cette famille de plantes à fournir des produits naturels renouvelables avec des activités biologiques très diverses. En effet, les propriétés antioxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoires des extraits de *Rhus* sont bien documentées [11-14].

Par ailleurs, des études faites sur les effets hypolipidémiques de *Rhus* sur des animaux ont donné des résultats prometteurs [15-16].

D'autre part, des tests *in vitro* et *in vivo* sur des cellules humaines et des rats des tiges de *Rhus oxyacantha* ont montré des potentiels cardioprotecteurs [17].

D'autres activités ont aussi été investiguées ; il s'agit des effets antitumoral, hypoglycémiant et antidiarrhéique [18-19].

En dépit des travaux antérieurs qui se sont concentrés surtout sur les activités biologiques et sur, seulement quelques membres de cette grande famille de plantes, l'étude phytochimique des membres du genre *Rhus* a permis quand même d'identifier plusieurs types de composés bioactifs. En effet, les composés phénoliques, les triterpènes ainsi que les flavonoïdes sont quasi présents [20-21].

Ces études ont permis d'identifier plus de 200 composés dont des acides organiques, des acides phénoliques et des dérivés de flavonoïdes, des tanins hydrolysables avec des anthocyanines et des dérivés terpéniques [22-23].

Cependant, les données phytochimiques existantes sur *R. pentaphylla* restent limitées.

Une étude a montré que les extraits aqueux de graines, de feuilles et de racines de *R. pentaphylla* sont riches en tanins, en flavonoïdes et en coumarines et par conséquent possèdent une activité antibutyrylcholinestérasique importante qui pourrait être utilisée pour le traitement de la maladie [24].

Dans une investigation phytochimique de *R. pentaphylla*, Oukacha et al. ont évalué les polyphénols et les flavonoïdes présents dans les feuilles et dont les quantités respectives sont de 39.33 ± 0.66 et

7.45 ± 0.53 $\mu\text{g}/\text{mg}$. D'autre part, l'activité antioxydante par deux méthodes différentes DPPH et FRAP, a donné respectivement les valeurs 80.12 ± 0.24 % et 932.41 ± 5.15 $\mu\text{mole}/\text{g}$ [25].

Concernant le profil aromatique des membres du genre *Rhus*, la littérature rapporte très peu de travaux sur ce sujet. En effet, les fractions volatiles et les huiles essentielles de fruits de *Rhus coriaria* d'Italie et de Turquie ont été caractérisées par analyse chromatographique CPG et CPG-SM. Les résultats obtenus montrent que la composition de l'huile essentielle en provenance du *Rhus* d'Italie est caractérisée par une quantité élevée de composés non terpéniques (de 27,5 à 55,1%), suivis par les sesquiterpènes et les diterpènes. Par contre, les volatiles présentent une variabilité chimique où les monoterpènes ont été identifiés comme étant la principale classe de constituants des fruits recueillis dans deux des quatre régions (42,1% à 59,9%), tandis que les composés non terpéniques prédominaient dans les deux autres sites (46.1–52.8%) [26].

Pour les échantillons en provenance des différentes régions de Turquie, les auteurs ont indiqué une grande variabilité observée dans la composition en huile essentielle. Cependant, les hydrocarbures monoterpéniques étaient présents comme principaux constituants dans les échantillons analysés (limonène (9,4%), nonanal (10,7-13,1%) et (Z) -2-décenal (9,9-42,3%), ainsi que le cembrène (6,3%) [27-28].

Pour la plante *Rhus pentaphylla*, elle n'est pas aromatique, même si pendant le séchage de plusieurs jours, les tiges coupées donnent une saveur caractéristique.

Quant à ses huiles essentielles et son hydrolat ainsi que ses acides gras, la littérature ne rapporte à ce jour, aucune étude permettant la détermination de leurs compositions chimiques.

Chapitre II : Métabolites chimiques

Les métabolites secondaires sont nécessaires pour la plante, ils ont pour activité de protéger la plante contre les animaux ou insectes, ou la soigner, se sont des molécules organiques, et ils sont classés en trois grandes familles qui sont les polyphénols, les alcaloïdes et les terpènes.

II. Polyphénols :

Les polyphénols constituent la grande majorité des métabolites secondaires. Ils sont responsables d'un grand nombre d'activités présentes dans les plantes, et ils sont caractérisés par un ou plusieurs noyaux benzéniques attachés à un groupement OH. On compte plus de 8000 composés connus à ce jour dans la famille des polyphénols [29].

II.1. Flavonoïdes :

Les flavonoïdes nommés aussi bioflavonoïdes, sont la plus grande sous famille des polyphénols. Généralement, ces molécules sont responsables de la coloration des fleurs et aussi des fruits [30].

II.1.1. Structure et classification :

Ils ont une structure bien définie qui est de deux cycles aromatiques mis en relation par trois autres carbones pour redevenir de type C₆-C₃-C₆. Souvent, on trouve relié à cette chaîne une partie hétérocyclique C₅ ou C₆ (cycle contenant l'oxygène généralement) [30].

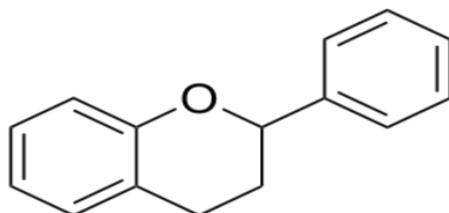


Figure 2 : Structure de base des flavonoïdes

II.1.2. Principales classes de flavonoïdes :

a) Les flavones et les flavonols :

Parmi les classes des flavonoïdes majoritairement on a les flavones et flavonoles qui constituent plus de 90 % des flavonoïdes. La structure de base de ces molécules est définie par deux groupements hydroxyle sur le carbone C₅ et C₇ de la structure des flavonoïdes [31].

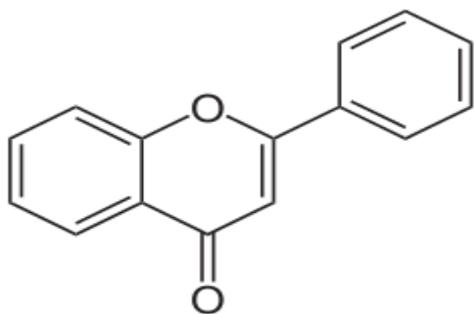


Figure 3 : Structure de base des flavones

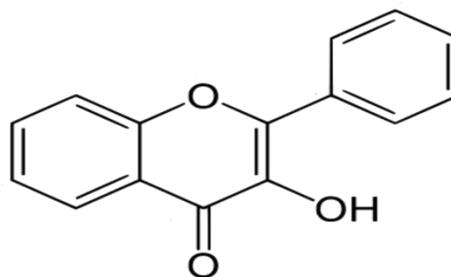


Figure 4 : Structure de base des flavonols

b) Les flavanones et les dihydroflavonols :

Ils respectent aussi la forme de base des flavonoïdes mais on les reconnaît par une liaison double CC entre C₂ et C₃. Ce sont des molécules asymétriques, et on peut trouver une variété de composés qui appartient à cette structure de base avec des ramifications de groupement hydroxyle comme les flavones et flavonols, on peut séparer les dihydroflavonols des flavanones par un groupement hydroxyle sur le carbone C₃ des dihydroflavonols [31].

II.2. Tanins :

Après les flavonoïdes, les tanins sont aussi des métabolites secondaires très importants pour la plante. D'une structure polyphénolique, ils ont une propriété astringente qui a pour effet d'éloigner les animaux ou les insectes herbivores. Aussi, ils ont généralement une forte couleur qui pigmente la peau [32].

II.3. Huiles essentielles :

L'huile essentielle, appelée aussi essence végétale, est un liquide organique huileux hydrophobe, constitué majoritairement de composés terpéniques ; molécules à base d'un motif terpénique C₅.

L'utilisation des huiles essentielles ne cesse d'augmenter en aromathérapie, en parfumerie ou en pharmacie et aussi dans le domaine du cosmétique. Leur utilisation est liée aux différentes activités dont elles sont dotées [33].

II.3.1. Méthodes d'extraction [34] :

Il existe plusieurs méthodes de distillation dont voici les principales:

II.3.1.1. L'entraînement à la vapeur d'eau :

L'extraction basée sur le fait que la plupart des composés volatils contenus dans les végétaux sont entraînés par la vapeur d'eau, du fait de leurs points d'ébullition relativement bas ainsi de leur caractère hydrophobe.

II.3.1.2. L'hydrodistillation :

Le principe de l'hydrodistillation consiste à immerger la biomasse végétale dans un ballon rempli d'eau, que l'on porte ensuite à l'ébullition.

II.3.1.3. Autres :

- La distillation à vapeur saturée.
- L'hydrodiffusion.
- L'expression à froid

II.4. Acides gras et insaponifiables :

II.4.1. Acides gras :

Les acides gras composent la partie huileuse lourde de la plante. Il s'agit de grosses molécules regroupées généralement en triester du glycérol. Les acides gras naturels possèdent une chaîne carbonée allant de 4 à 36 atomes de carbone. Ils constituent également des sources importantes d'énergie métabolique [35].

II.4.2. Insaponifiables :

Ce sont des molécules organiques insolubles dans l'eau. C'est un mélange complexe constitué d'alcools gras, de stérols, des triterpènes, de vitamines, et d'autres fractions. Ils ont des utilisations diverses, surtout dans le domaine du cosmétique [35].

Chapitre III : Activité antioxydante

III. Antioxydants :

III.1. Définition :

Les molécules antioxydantes sont des molécules très utiles pour le corps humain. Elles ont le pouvoir de diminuer les rancissements, et aussi inhiber la réaction de la peroxydation lipidique, et ça, sans qu'il ait des effets secondaires néfaste sur les aliments. Les antioxydants sont de bons conservateurs car ils ont l'effet de prolonger la conservation des aliments [36].

III.2. Mécanisme d'action :

Le principe d'une molécule antioxydante c'est qu'elle stoppe la réaction d'oxydation d'une autre substance en s'oxydant elle-même. En effet, les molécules antioxydantes ont tendance à s'oxyder plus rapidement que les autres substances. Ce pouvoir est du généralement, grâce à leur cycle aromatique qui est riche en électrons [37].

III.3. Radicaux libres :

Un radical libre est une espèce chimique qui a un ou plusieurs électrons qui ne sont pas appariés. Il est instable et cherche toujours à attirer les électrons pour saturer sa couche externe [38].

Partie II : ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre IV : Matériel et Méthodes

IV.1. Matériel végétal :

IV.1.1 Origine géographique et période de récolte de la plante :

La récolte de la plante pour l'étude a été faite en Février 2017 autour de la localité de Marsat Ben M'hidi à environ 90 km au nord ouest de Tlemcen, Algérie (100 m, 35 ° 03'25.7 "N 2 ° 12'40.6" W).

IV.1.2 Identification botanique :

Le matériel végétal a été authentifié par des botanistes appartenant aux deux laboratoires: "Laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes" et "Laboratoire de Gestion Conservatoire des Eaux, Sols et Forêts et Développement Durable des régions montagneuses de la région de Tlemcen", Université de Tlemcen.

IV.1.3 Préparation du matériel végétal :

Une fois transportés au laboratoire, les racines ont été séparées de la partie aérienne, lavées rapidement sous l'eau du robinet, rincées abondamment à l'eau distillée, puis essuyées avec du papier Joseph. Le matériel végétal a été séché à l'air dans une pièce ventilée et conservé à l'abri de la lumière et de la poussière jusqu'à utilisation. Pour extraire les acides gras et d'autres composés polyphénoliques, différentes parties séchées de *R. pentaphylla* ont été broyées en utilisant un mixeur de laboratoire pour obtenir des poudres fines, qui ont été conservées dans des dessiccateurs fermés à une température basse avant utilisation.

IV.2. Criblages phytochimiques :

IV.2.1.1. Préparation des extraits bruts :

1- Extrait au solvant organique :

L'extraction se fait à chaud à l'aide d'un soxhlet. On place 10 g de la matière végétale broyée, dans une cartouche poreuse qu'on met à l'intérieur du siphon. On ajoute 100 ml du solvant correspondant qui, après extraction on filtre la solution obtenue et on la concentre à l'évaporateur rotatif. L'extrait obtenu est stocké dans un flacon stérile [29].



Figure 5 : Montage de soxhlet.

2- Extrait aqueux :

La préparation de l'extrait aqueux est faite par reflux pendant une heure du mélange de 10 g de la matière végétale broyée avec 100 ml de l'eau distillée. Après filtration sur du papier-filtre, la solution récupérée est centrifugée pendant une dizaine de minutes à 3900 tours par minute. On récupère la solution qui surnage et on fait une deuxième filtration sur du papier-filtre, le produit obtenu sera transvasé et étalée dans des boîtes de pétri, et sera placée dans l'étuve à 40 °C, jusqu'à évaporation totale de l'eau. L'extrait obtenu est conservé dans le dessiccateur [40].



Figure 6 : Montage du reflux.

IV.2.1.2. Extraction par macération :

1) Dégraissage du matériel végétal [41] :

Le dégraissage s'est fait par le soxhlet. On met 10 g de la matière végétale broyée, dans une cartouche poreuse et on ajoute 100 ml de l'hexane. Le mélange est chauffé pendant 4h, puis, on évapore le solvant. Le résidu obtenu sera récupéré et stocké dans un flacon stérile.

2) Extraction des flavonoïdes [42] :

dans un ballon on met 2 g de la matière végétale broyée dégraissée, on ajoute 80 ml du méthanol et 20 ml d'eau, le mélange ensuite laissé pour macération pendant 48 h, à température ambiante, ensuite l'extrait obtenue est filtrée et concentrée jusqu'à l'évaporation du méthanol et on procède comme suit :

a) Extrait à l'acétate d'éthyle :

Dans une ampoule à décanter, on mélange l'extrait concentré obtenu avec 50 ml d'acétate d'éthyle et on récupère la fraction d'acétate d'éthyle. On lave trois fois, la fraction d'acétate d'éthyle récupérée et on la concentre à sec. Le résidu obtenu sera ensuite récupéré par 2 ml du méthanol et stocké dans un flacon stérile.

b) Extrait au butanol :

Après le lavage par l'acétate d'éthyle, la phase aqueuse restée est lavée trois fois par le butanol et la phase organique récupérée sera concentrée. Le résidu obtenu sera ensuite récupéré par 2 ml du méthanol et stocké dans un flacon stérile.

3) Extraction des tanins [43]:

L'extraction des tanins s'effectue par une macération de 72 h. On mélange de 2.5g de la matière végétale broyée avec 100 ml d'un mélange constitué d'acétone et d'eau distillée (10/4 V/V). Après 3 jours, la solution filtrée est ensuite concentrée. La solution aqueuse restante sera lavée par 15 ml de dichlorométhane CH_2Cl_2 ce qui permettra d'éliminer de la solution tous les acides gras qui peuvent être présents.

La phase aqueuse sera lavée deux fois par 15 ml d'acétate d'éthyle, ensuite la phase d'acétate d'éthyle récupérée sera évaporé à sec, le résidu obtenu est ensuite pris dans 2 ml d'éthanol et stocké.

IV.2.1.3 Calcul du rendement :

Le rendement d'extraction est le rapport entre la masse d'extrait pur obtenue divisée par la masse de la matière végétale utilisée pour cette extraction, et la formule est comme suit :

$$R(\%) = (M/M_0) \times 100$$

R : Rendement en %,

M : Masse en gramme de l'extrait sec résultant,

M_0 : Masse en gramme de la matière végétale obtenue après dégraissage.

IV.2.2. Tests de caractérisation :

Les tests phytochimiques sont faits pour déterminer la présence ou l'absence de familles de molécules ou groupes chimiques dans l'extrait de la plante en question. Généralement, ces tests sont des réactions complexations ou de précipitation qui, pour les premières, aboutissent à des complexes insolubles caractérisés par une couleur bien définie. Cela est du à la formation de conjugaisons ou à une instauration qui vas être créé par la réaction. Les réactions de précipitation seront révélées par un solide qui précipite au fond du tube à essais.

IV.2.2.1. Épuisement par l'éthanol :

L'extrait éthanolique qui est obtenu par soxhlet va être le sujet des tests suivants :

1. Alcaloïdes sels : [44]

Le test d'alcaloïdes se fait par le suivant :

-on prend 20 ml de l'extrait éthanolique et on le soumet à une évaporation jusqu'à l'évaporation totale de tout l'éthanol présent dans la solution.

-on ajoute 5 ml de l'acide chlorhydrique, au résidu obtenu, et on chauffe le mélange dans un bain marie.

-après une filtration on ajoute quelques gouttes de NH_4OH à 10 % et on mesure le pH, on ajoute jusqu'à pH =9, ensuite dans une ampoule à décanter on fait un lavage de la solution par l'éther diéthylique, ensuite la phase étherée est récupérée et concentrée à l'évaporateur rotatif à sec.

Le résidu obtenu est ensuite pris dans 2ml de HCl à 2 % et cette solution sera séparée en deux parties :

-la première partie sera traitée par le réactif de Mayer, on doit observer un précipité blanc qui va indiquer la présence des alcaloïdes.

- la deuxième partie est traitée par le réactif de Wagner, on doit observer un précipité brun qui va confirmer la présence des alcaloïdes.

2. **Flavonoïdes [45] :**

On prend 5 ml de l'extrait méthanolique et on ajoute 1 ml de l'acide chlorhydrique à 37 %, on ajoute ensuite un demi-gramme de tournure de magnésium, si on observe une couleur rose ou rouge après environ 3 minutes, ça révèle la présence des flavonoïdes dans l'extrait.

3. **Tanins [44] :**

Dans un tube à essai on ajoute a 1ml de l'extrait éthanolique, 2ml d'eau et aussi quelque gouttes d'une solution diluée de FeCl_3 et ensuite on observe la couleur obtenue, si on voit une coloration bleue verte, ça indique la présence des tanins catéchiques dans la solution, si par contre la couleur est bleue foncée voir noire, ça indique la présence des tanins galliques dans la solution.

4. **Composés réducteurs [46] :**

La révélation des composés réducteurs dans l'extrait est faite par l'ajout dans un tube à essais de 1 ml de l'extrait méthanolique dilué avec 2 ml d'eau distillée et une vingtaine de gouttes de la liqueur de Fehling. Le mélange est chauffé dans un bain-marie jusqu'à ébullition. Un précipité rouge brique indique un test positif.

5. **Anthracénosides, coumarines et anthocyanosides [44] :**

- On mélange 25 ml de l'extrait éthanolique avec 15 ml de l'acide chlorhydrique. Le tout est porté à reflux pendant une demi-heure.

- La solution est laissée refroidir à l'air libre. Dans une ampoule à décompter, on fait un triple lavage par 15 ml d'éther diéthylique. Pour déterminer la présence de ces familles, on fait le suivant:

a) Les coumarines :

On effectue une évaporation à sec de la solution d'éther diéthylique récupérée, on ajoute au résidu obtenu 2 ml d'eau distillée ensuite on sépare cette solution sur 2 tubes :

-1 ml de la solution aqueuse dans un tube à essai est préservé comme témoin.

-1 ml de la solution aqueuse dans un autre tube à essai et on ajoute un demi-millilitre de NH_4OH 10%.

- À l'aide d'une lampe UV, on observe une fluorescence dans le deuxième tube qui va indiquer que le test est positif pour les coumarines.

b) Les anthracénosides :

Le test est fait par le mélange de 8 ml de l'extrait méthanolique avec le réactif de Bornträger. Si on observe une coloration vive variant de l'orange-rouge au violet-pourpre, ça va nous indiquer qu'il y a une quantité des anthracénosides présente dans la plante.

c) Les anthocyanosides :

Les anthocyanosides peuvent être utilisés comme des indicateurs pour un titrage acido-basique, ce qui va nous révéler leur présence on fait un titrage par NaOH, de la solution aqueuse à laquelle on a ajouté un peu de HCl concentré, si on observe un changement de couleur à pH entre le 4 et le 6 du rouge vers le bleu, le test sera marqué comme positif.

6. Stérols et stéroïdes [47] :

Pour les stérols et stéroïdes, on fait deux tests qui peuvent révéler leur présence dans l'extrait :

a) Premier test

- Evaporation de 10 ml de l'extrait éthanolique à sec.
- Récupération du résidu obtenu dans 10 ml de chloroforme anhydre.
- Filtration pour éliminer toutes les impuretés qui peuvent être présentes.
- A 5 ml de cette solution, on ajoute 5 ml d'anhydride acétique puis on met juste quelques gouttes de H₂SO₄ concentré pour acidifier le milieu. On agite pendant une minute et on laisse la réaction s'effectuer à température ambiante pendant quelques minutes (20-40 minutes).

Le test est marqué comme positif si on observe une coloration violacée fugace qui vire un peu vers le vert.

b) Deuxième test

- Evaporation de 10 ml de l'extrait éthanolique à sec.
- Ajout au ballon d'évaporation, un demi-millilitre d'anhydride acétique, et un même volume de chloroforme. Après une faible agitation, la solution est filtrée et le produit est traité par la réaction de Libermann-Burchardt.

On peut observer deux couleurs après cette réaction :

- Une couleur verte-bleue nous indique la présence des hétérosides stéroïdiques dans l'extrait.
- Une couleur verte-violette nous indique la présence des composés triterpéniques dans la solution.

IV.2.2.2. Epuisement par l'eau :

On prend 1g d'extrait aqueux et on le fait dissoudre dans 20 ml d'eau distillée et on effectue les tests suivant :

1. Amidon [48] :

L'amidon est un homopolymère de D-glucose ce qui lui donne la caractéristique de constituer une réserve d'énergie pour les végétaux, et pour s'assurer de sa présence dans l'extrait, on procède comme suit : On prend 5 ml de l'extrait aqueux et on ajoute 10 ml d'une solution saturée de NaCl. On fait chauffer le mélange dans un bain-marie jusqu'à l'ébullition et ensuite on ajoute le réactif d'amidon. S'il y a une présence d'amidon dans le milieu, on doit observer une coloration bleue violacée.

2. Saponosides [49] :

Pour faire le test de saponoside on doit mesurer la mousse qui peut être produite après une forte agitation de l'extrait :

Dans un tube à essais, on prend 1 ml d'extrait aqueux et on ajoute 2 ml d'eau distillée. On applique une forte agitation pour environ une minute. Après, on laisse le mélange reposer pour une vingtaine de minutes, ensuite par rapport à la hauteur de la mousse, on détermine la présence des saponosides :

- Absence de mousse : le test sera marqué comme négatif (-).
- 1 cm d'épaisseur de mousse : le test sera marqué comme faiblement positif (+).
- entre 1 et 2 cm d'épaisseur de mousse : le test sera marqué comme positif (++)
- supérieur à 2 cm d'épaisseur de mousse : le test sera marqué comme fortement positif (+++).

3. Les tanins [46] :

Le test des tanins s'effectue par le mélange de 1 ml d'extrait aqueux et 1 ml d'eau distillée. On ajoute une ou deux gouttes d'une solution 1 % de FeCl_3 . On s'attend à observer une couleur bleue verte ou un vert foncé qui va indiquer une présence de tanins.

4. Les anthraquinones [44] :

Pour la détermination de la présence des anthraquinones, on procède comme suit :

- Dans un tube à essais, on ajoute à 1 g de la matière végétale, 10 ml de KOH 0.5 M et 1 ml de l'eau oxygénée à 5 %.
- On chauffe le mélange jusqu'à l'ébullition et après, on laisse le mélange refroidir à température ambiante. Après filtration, on ajoute au filtrat quelques gouttes d'acide acétique.
- La solution obtenue est ensuite lavée avec 10 ml du toluène.
- La fraction de toluène obtenue est agitée en présence de 5 ml de NH_4OH .

S'il y a présence des anthraquinones, on doit observer une couleur rouge au niveau de la couche alcaline.

IV.2.2.3. Epuisement par l'éther diéthylique :

L'extrait étheré est soumis à trois tests phytochimiques qui sont les suivants :

1) Acides gras [50] :

- On prend 20 ml de l'extrait de l'éther de pétrole et on le concentre dans un évaporateur rotatif.
- On récupère le résidu obtenu dans le méthanol et on ajoute à la solution une solution basique de NaOH.
- Après, on dilue la solution avec un peu d'eau et dans une ampoule à décompter on fait une extraction avec l'éther diéthylique. La phase étherée est évaporée à sec. Le résidu obtenu doit être gras ce qui va nous indiquer la présence des acides gras dans la matière végétale traitée.

2) Huiles volatiles [50] :

Pour révéler la présence de l'huile volatile dans la plante, on doit concentrer à sec 20 ml de l'extrait étheré.

Le résidu obtenu sera repris avec 2 ml de l'éthanol, puis à l'aide d'un évaporateur rotatif, on concentre la solution alcoolique. Le test est positif si on obtient un résidu aromatique.

3) Alcaloïdes bases [44] :

A l'aide d'un évaporateur rotatif, on évapore à sec 10 ml de l'extrait étheré. Ensuite, on dissout l'extrait sec obtenu dans 1.5 ml d'acide chlorhydrique 0.2%. On ajoute à la solution, une ou deux gouttes de réactif de Mayer.

IV.2.3. Réactifs de caractérisation : (voir annexe 1)

IV.3. Dosages des métabolites secondaires :

IV.3.1. Dosages des polyphénols totaux : [42]

On estime la quantité des composés phénoliques totaux qui peuvent être extraits de la matière végétale par le réactif de Folin-Ciocalteu en utilisant la spectrophotométrie UV-Visible.

IV.3.1.1. Mode opératoire :

On prépare le mélange de 0.2 ml de l'extrait aqueux et 0.8 ml de Na_2CO_3 à 7.5 % dans un tube à essais, et on applique une forte agitation. On ajoute ensuite 1 ml de la solution diluée de Folin-Ciocalteu (solution de Folin-Ciocalteu 10/eau distillée 90) (V/V), puis on laisse le mélange à température ambiante pendant 2 heures. Ensuite, on fait la lecture à 760 nm contre un blanc.

IV.3.1.2. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique :

Au laboratoire et aux mêmes conditions utilisées pour le dosage des polyphénols totaux, une gamme d'étalons allant de 0.01 à 0.2 mg/ml d'acide gallique, a été établie afin de permettre le dosage des composés phénoliques qui sont contenus dans chaque extrait.

Les résultats en équivalent-mg d'acide gallique sont exprimés par gramme d'extrait.

$$T = C \times \frac{V \times D}{P_s}$$

Où : T sera la teneur de l'extrait en polyphénols totaux.

C est la concentration des polyphénols totaux déduite de la courbe et exprimée en équivalent d'acide gallique.

V est le volume de l'extrait étudié,

D est le facteur de dilution utilisé dans cette expérience,

P_s est le poids initial de la matière sèche utilisée pour la préparation de l'extrait.

IV.3.2. Dosages des flavonoïdes [51] :

IV.3.2.1. Mode opératoire :

On ajoute à 1ml de l'extrait méthanolique dans un tube à essais 1ml de AlCl₃ dissous dans le méthanol (2 %), après une forte agitation du mélange, on le laisse 10 minutes pour incubation, ensuite on fait la lecture à 430 nm.

IV.3.2.2. Courbe d'étalonnage de la quercétine :

Aux mêmes conditions opératoires effectuées sur les flavonoïdes, on a fait la courbe d'étalonnage de la quercétine contre un blanc en variant la concentration de 2.5 à 40 µg/ml (par dilution d'une solution mère à 400 µg/ml). Les valeurs de la teneur des flavonoïdes extraites depuis cette courbe seront exprimés en µgEq/g d'extrait.

IV.3.3. Dosage des tanins [52] :

La méthode utilisée pour la détermination de la teneur en tannins, est la méthode à la vanilline en milieu acide. Le principe de cette méthode est que la vanilline a la capacité de former des complexes avec les tanins condensés en milieu acide. Les complexes produits seront colorés et on peut faire la lecture à 500 nm.

IV.3.3.1. Mode opératoire :

Dans un erlenmeyer, on introduit 5 ml du réactif d'analyse qui contient : 2.5 ml de la solution de vanilline à 1% mélangée à 2,5 ml de la solution de HCl à 8% (8 ml de HCl complétés à 100 ml avec du méthanol). On ajoute 1 ml de l'échantillon (préparé dans le méthanol) et on agite le mélange pendant une minute. On additionne 5ml de la solution de HCl à 4%. L'erlenmeyer est ensuite introduit au bain marie à 30°C et laissé pendant 20 min La lecture des absorbances est faite à 500 nm.

IV.3.3.2. Courbe d'étalonnage de la catéchine :

Pour effectuer la courbe d'étalonnage de la catéchine, on doit appliquer les mêmes conditions opératoires et utiliser la catéchine comme contrôle positif, contre un blanc dans les mêmes

conditions sans catéchine. La gamme utilisée était de 0.06 jusqu'à 0.3 mg/ml, la solution mère a été de concentration 4.4 mg/ml.

IV.4 Huiles essentielles [41] :

IV.4.1 Procédé d'extraction :

Pour l'extraction des huiles essentielles il existe plusieurs méthodes connues dont l'extraction par micro ondes, l'extraction par CO₂, l'extraction par ultrasons, l'hydrodistillation et plusieurs autres méthodes moins connues.

Pour notre étude, la méthode utilisée a été l'hydrodistillation en utilisant un montage de type clewenger. Il est constitué d'un chauffe ballon qui contient un ballon de 6L, surmonté d'un clewenger.



Figure 7 : Montage de l'hydrodistillation

Le principe d'extraction est basé sur l'éclatement des cellules de la matière végétale par la chaleur de l'eau dont la vapeur va entraîner les molécules volatiles jusqu'au réfrigérant où elles seront condensées en une substance organique appelée l'huile essentielle. Cette dernière sera séparée de l'hydrolat par simple décantation et remontera à la surface.

L'huile essentielle récupérée est débarrassée de traces d'eau par l'ajout d'un desséchant (sulfate de magnésium anhydre). L'huile essentielle récupérée sera conservée dans un pilulier en verre ambré à 0 °C jusqu'à son utilisation.

IV.4.2. Calcul du rendement :

Le rendement de l'hydrodistillation est le pourcentage du rapport entre la masse pure obtenue de l'huile essentielle après évaporation du solvant sur la masse initiale de la matière végétale utilisée pour l'hydrodistillation.

$$R(\%) = (M_f/M_0) \times 100\%$$

R: Rendement de l'huile essentielle,

M_f : Masse finale obtenue de l'huile essentielle,

M_0 : Masse initiale de la matière végétale.

IV.4.3. Procédé d'obtention de l'extrait d'hydrolat [43] :

La quantité de l'hydrolat récupérée a été purifiée par une extraction liquide-liquide par l'éther diéthylique dans une ampoule à décompter. La quantité de l'éther utilisé pour chaque lavage est le tiers en volume de la quantité de l'hydrolat qu'on veut purifier. Ensuite, la phase organique récupérée sera concentrée au rotavapeur et l'hydrolat récupéré sera stocké dans un pilulier en verre nettoyé et pesé préalablement.

$$R_H = (V/V_0) \times 100\%$$

R_H : Rendement de l'hydrolat.

V : Volume total de l'hydrolat purifié avec l'éther diéthylique

V_0 : Volume de l'hydrolat avant purification.

IV.5. Analyse de l'huile essentielle et l'hydrolat par CPG-SM [53] :

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode de chromatographie utilisée spécialement pour la séparation des composés volatiles comme les huiles essentielles. Elle nous permet de calculer les indices de rétention pour chaque composé, et à partir des aires dans le chromatogramme, on peut aussi avoir une idée plus au moins claire sur l'abondance d'un composé dans l'huile. La CPG couplée à la spectrométrie de masse peut nous donner une idée plus claire sur les composés présents dans l'huile car elle va nous donner les spectres de masse correspondants à chaque molécule.

IV.5.1. Conditions opératoires :

Le chromatographe est de marque Perkin-Elmer (Waltham, MA, USA) Autosystem

XL, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et deux colonnes capillaires en silice fondue, polaire Rtx-wax, polyéthylenglycol et apolaire Rtx-1 (DB5), polydiméthylsiloxane).

Programmation de température : de 60 à 230 °C à 2°C/min Température de l'injecteur : 280 °C.

Température du détecteur : 280°C.

Injection : mode split (1:50).

Gaz vecteur : Hélium (1ml/min). Volume injecté : 0.2 µL.

IV.6. Extraction des acides gras et insaponifiables [54]:

IV.6.1. Extraction des insaponifiables :

A partir d'un gramme de l'extrait hexanique, on fait le mélange avec 50ml de KOH dans le méthanol d'une concentration de (2 mol/L). On laisse le mélange pendant une heure de reflux, ensuite on fait un lavage par 20 ml de l'eau distillée. Après, les insaponifiables sont extraits avec un triple lavage par 20 ml d'éther diéthylique, ensuite le solvant est éliminé au rotavapor, puis pesé.

IV.6.2. Extraction des acides gras :

La solution savonneuse obtenue du premier lavage des insaponifiables est acidifiée avec de l'acide chlorhydrique 1N, jusqu'à pH 5-6. On devra voir une précipitation des acides gras, ensuite on fait un triple lavage par 20 ml de l'éther diéthylique, la fraction étherée récupérée est séchée par l'ajout de MgSO₄. Une fois le solvant évaporé.

Les acides gras sont transformés en leurs esters méthyliques par addition d'une solution méthanolique de BF₃ à 10 % et les esters méthyliques obtenus sont extraits trois fois avec 50 ml d'hexane. La couche organique est séchée sur Na₂SO₄ et évaporée.

Calcul du rendement:

Le rendement est le rapport de la quantité de l'extrait recueillie après extraction sur la quantité de la biomasse, exprimée en pourcentage.

$$\text{Rendement (\%)} = (\text{P1} - \text{P2}) / \text{P3} \times 100$$

P1 : poids du ballon après évaporation ;

P2 : poids du ballon avant évaporation (vide);

P3 : poids de la matière végétale de départ.

IV.7. Évaluation de l'activité antioxydante :

On peut déterminer le pouvoir antioxydant d'une substance par plusieurs méthodes dont une grande majorité est détectable par UV-Visible. Elles sont généralement basées sur une différence de couleur qui peut être déterminée avec précision par l'UV-Visible. Pour notre part, les deux méthodes utilisées sont le FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power) qui est basé sur la détermination du pouvoir du composé qu'on veut étudier sur les ions de fer et le DPPH qui est le test de piégeage des radicaux libres.

IV.7.1. Test de piégeage du radical libre DPPH [55] :

Pour chaque extrait, on prépare un mélange de 2 ml, dont 1.95 ml est constitué d'une solution de DPPH dans le méthanol 0,0025 g/L, et 0.05ml de l'extrait. Le test sera fait contre un contrôle négatif qui contient 1.95 ml de la solution du DPPH semblable pour les autres tests à laquelle on ajoute 0.05ml du méthanol pure. On laisse la réaction s'effectuer pendant une trentaine de minutes à une température ambiante et à l'abri de la lumière. La lecture se fera à 517 nm, le contrôle positif est présenté par une solution de l'acide ascorbique qui est antioxydant standard. La lecture des valeurs de l'absorbance est faite dans les mêmes conditions que tous les autres tests, les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%).

$$\text{I(\%)} = [(\text{absorbance contrôle} - \text{absorbance test}) / (\text{absorbance contrôle})] \times 100$$

Calcul de la concentration IC₅₀ :

L'IC50 est la valeur qui détermine la concentration de l'extrait responsable de 50 % d'inhibition des radicaux DPPH. Elle est calculée graphiquement, par la régression linéaire graphique tracés, donnant le pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations.

IV.7.2. Test de la réduction du fer FRAP [56] :

Pour effectuer le test de FRAP, on doit préparer le mélange qui est constitué de 1 ml de l'extrait avec 2.5 ml de la solution tampon phosphate, à une concentration de 0.2 M (pH 6.6). On ajoute ensuite 2.5 ml de $K_3Fe(CN)_6$ à 1%, le mélange ensuite sera incubé pendant une vingtaine de minutes à 50 °C et à l'abri de la lumière, ensuite pour stopper la réaction on ajoute 2.5 ml d'acide trichloroacétique à 10 %. Le mélange est centrifugé pendant une dizaine de minutes à 3000 tours par minute. Ensuite, on prend 2.5 ml du liquide surnageant auquel on ajoute le même volume en eau distillée et 0.5 ml de $FeCl_3$ à 1 %.

La lecture se fera à 700 nm contre un blanc qui sera préparé dans les mêmes conditions opératoires.

Chapitre V : Résultats et discussion

V.1. Calcul du rendement :

Les rendements des extraits bruts secs des deux parties feuilles et racines sont exprimés en pourcentage et présentés dans le tableau suivant:

Extrait	Rendement (%)	
	Feuilles	Racines
Méthanolique	22	21.8
Aqueux	12	6
Tanins	9	12
Fraction n-buOH	7	3
Fraction Ac-Et	9	7

Tableau 1: Rendement en (%) des extraits bruts sec des feuilles et des racines.

Les résultats montrent que les rendements en extrait méthanolique sont les plus élevés pour les deux parties feuilles et racines. L'extraction des tanins a donné des taux élevés 12% pour les racines et 9% pour les feuilles. Nous remarquons que les racines possèdent un rendement en fraction d'acétate d'éthyle 7% supérieur à celui de la fraction au n-butanol 3%. D'autre part, les feuilles possèdent un rendement en fraction d'acétate d'éthyle 9% plus important que celui présenté par les feuilles en fraction au n-butanol 7%.

Nous constatons que les feuilles possèdent une teneur en flavonoïdes plus importante que celle des racines.

V.2. Criblage phytochimique:

Les résultats des tests phytochimiques ont été effectués sur les feuilles et les racines de *Rhus pentaphylla* sont regroupés dans le tableau 2:

Familles	Résultats	<i>Rhus pentaphylla</i>	
		Racines	Feuilles
Flavonoïdes		++	+++
Tannis		+++	+++
Anthocyanosides		-	-
Anthracénosides		-	-
Antraquinones		-	-
Coumarines		-	-
Alcaloïdes		-	-
Saponosides		-	-
Stérols et stéroïdes		+++	+++
Acides gras		+	+
Huiles volatiles		-	++
Composés réducteurs		+++	+++

Amidon	-	-
Mucilage	++	+++

Tableau 2: Résultats des tests phytochimiques

Réaction faiblement positive : +

Réaction fortement positive : +++

Réaction négative : -

Réaction moyennement positive : ++

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur différents extraits préparés à partir des feuilles et des racines de la plante. On a utilisé des solvants de polarités différentes: eau, éthanol, et éther diéthylique, ainsi que des réactifs spécifiques de révélation.

Les résultats montrent une forte présence des tanins, des stérols et stéroïdes et des composés réducteurs. La présence des flavonoïdes dans les feuilles est forte alors qu'elle est faible dans les racines. Les tests d'amidon, des coumarines, des alcaloïdes, les osides, produisent une inférence négative.

Par ailleurs, la plante est riche en composés phénoliques tels que les tanins et les flavonoïdes dont les propriétés antioxydantes sont importantes.

V.3.Résultats des dosages :

	Polyphénols (mg EqG/g)	Tanins (mg EqC/g)	Flavonoïdes (mg EqQ/g)
Feuilles	26.93	13.52	8.52
Racines	44.00	39.74	2.61

Tableau 3: Résultats de dosage des composés phénoliques.

Les extraits de notre plante possèdent une teneur plus élevée en polyphénols et tanins.

Nous remarquons que les racines sont les plus riches en tanins (39.74 mg EqC/g). Par contre, les flavonoïdes sont en quantité acceptable dans les feuilles mais faible dans les racines avec des valeurs respectives de 8.52 mg EqQ/g et 2.61mg EqQ/g.

V.4. Huiles essentielles et hydrolat:

V.4.1.Extraction des huiles essentielles et d'extrait d'hydrolat:

L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation au moyen d'un Clevenger (extraction solide-liquide) et de l'hydrolat par extraction liquide-liquide en utilisant l'éther diéthylique a donné un rendement faible de 0.02 %.

V.4.2.Analyse de l'huile essentielle et de l'hydrolat par CPG-SM:

L'huile essentielle et l'hydrolat ont été injectés dans les conditions opératoires décrites auparavant.

Les résultats sont présentés dans le tableau 4:

Pic	Composés	IR	HE %	Hy %
1	2-Phényléthanol	1082	0.2	2.5
2	linalool	1087	0.4	4.6

3	isophorone	1129	0.2	1.6
4	borneol	1150	0.5	2.6
5	terpinen-4-ol	1161	0.6	2.8
6	alpha terpineol	1172	0.5	5.2
7	lyratyl acetate	1256	0.3	2.1
8	2-tridecanone	1492	0.1	4.1
9	spathulenol	1564	14.9	14.2
10	Acide hexadecanoïque	1963	31.5	4.2
	Total identifiés %		96.9	92.5
	Diterpènes oxygénés		0.6	0.3
	Sesquiterpènes		40.1	30.1
	Sesquiterpènes oxygénés		30.3	30.1
	Sesquiterpènes hydrocarbonés		9.8	/
	Monoterpènes		6	29.8
	Monoterpènes oxygénés		3.8	29.8
	Monoterpènes hydrocarbonés		2.2	/
	Composés non terpéniques		50.2	32.3
	Non terpéniques oxygénés		46.7	32.3
	Non terpéniques hydrocarbonés		3.5	/
	Alcools		32.8	60

Tableau 4: Compositions de l'huile essentielle et de l'hydrolat.

Dans le tableau, les composés les plus importants sont listés suivant l'ordre de leur temps de rétention.

L'analyse des échantillons par CPG et CPG-SM a permis une identification des composés représentant respectivement 96.9 % et 92.5% de la composition totale de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat.

Dans l'huile essentielle, l'acide hexadecanoïque et le spathulenol, apparaissent comme les constituants majoritaires (31.1 % et 14.9 % respectivement).

Pour l'hydrolat, le composé majoritaire est le spathulenol, avec un pourcentage de 14.2 %, alors que les autres composés se trouvent à de faibles pourcentages.

V.5.Acides gras et insaponifiables :

V.5.1. Rendement des extractions:

	Rendement (%)	
	Acide gras	Insaponifiables
Racines	25	15

Tableau 5: Rendement des acides gras et insaponifiables.

Les résultats montrent que le rendement des acides gras est de 25 % et les insaponifiables est de 15 %.

V.5.2 Analyse des acides gras par CPG-SM:

Les résultats de la composition en acides gras sont exposés dans le tableau 6.

Pic	Composés	IR _a ^c	Racines (%)
1	Acide nonanoïque (C9:0)	1214	10.1
2	Acide decaoïque (C10:0)	1279	9.7
3	Acide palmitoléique (C16:1)	1904	9.1
4	Acide palmitique (C16:0)	1939	43.2
	Total identifiés %		91.2
	Acides gras saturés		76.1
	Acides gras monoinsaturés		13.4
	Acides gras polyinsaturés		1.7

Tableau 6: Composition en acides gras des racines de *Rhus Pentaphylla*

Le total des composés identifiés est de 91.2 %. Le composé le plus présent est l'acide palmitique dont le pourcentage est de 43.2%, suivi par l'acide nonanoïque, l'acide décanoïque, et l'acide palmitoléique avec des pourcentages respectifs de 10.1%, 9.7% et 9.1%.

V.6. Évaluation de l'activité antioxydante :

V.6.1 Méthode du piégeage du radical libre DPPH :

L'activité antioxydante des différents extraits de *Rhus Pentaphylla* a été évaluée par spectrophotométrie suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune, mesurable à 517 nm.

Les valeurs d'IC₅₀ représentent la concentration de l'extrait pour laquelle 50 % des radicaux libres seront réduits. Plus la valeur d'IC₅₀ est faible, plus l'activité antioxydante est forte.

Les résultats obtenus sont mentionnés dans le Tableau 7 et illustrés par les figures 08, 09, 10, 11, 12,13.

Extraits	Partie utilisée	IC ₅₀ (mg/ml)
Acide Ascorbique (A.A)	/	0.07
Extrait d'hydrolat	Feuilles	6.40
Huile essentielle	Feuilles	21.90
Extrait méthanolique	Racines	0.11
	Feuilles	1.06
Extrait aqueux	Racines	0.71
	Feuilles	1.32
Extrait en tanins	Racines	0.01
	Feuilles	0.09
Extrait d'acétate d'éthyle	Racines	0.10
	Feuilles	0.12
Extrait au n-butanol	Racines	0.10
	Feuilles	0.16

Tableau 7 : Valeurs d'IC₅₀ des différents extraits par la méthode DPPH.

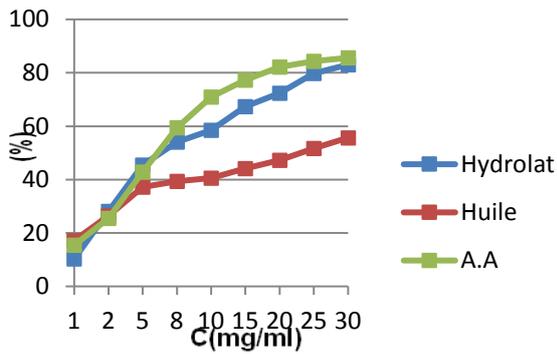


Figure 08: % d'inhibition du DPPH de l'huile essentielle et de l'hydrolat.

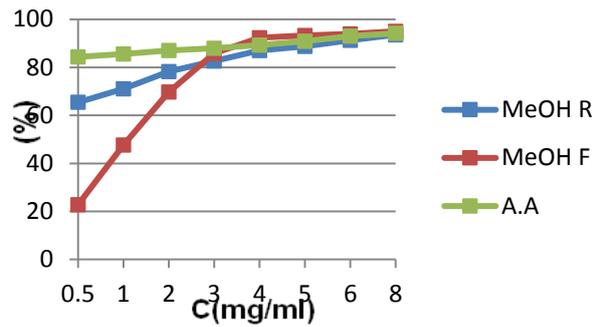


Figure 09: % d'inhibition du DPPH de l'extrait méthanolique

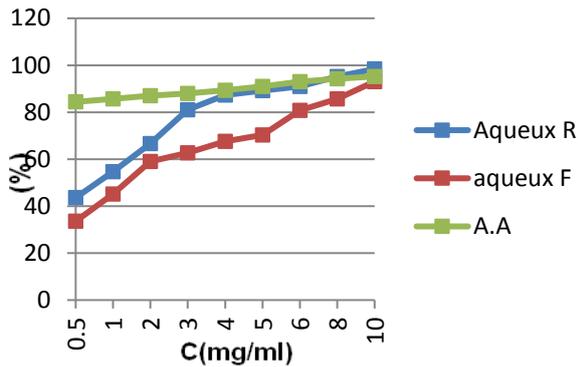


Figure 10: % d'inhibition du DPPH de l'extrait aqueux

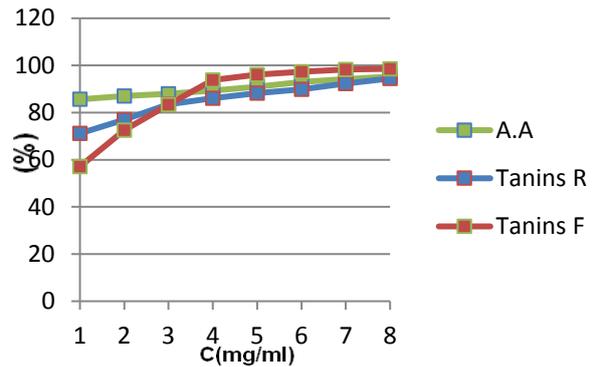


Figure 11: % d'inhibition du DPPH des tanins

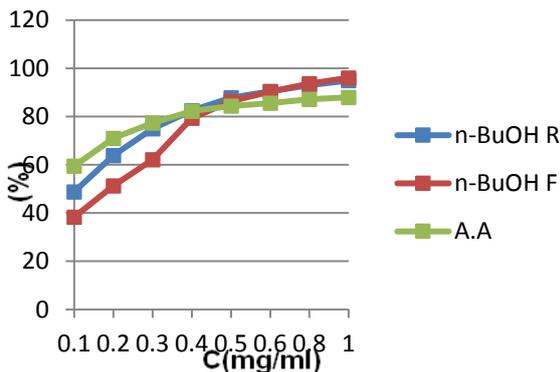


Figure 12: % d'inhibition du DPPH de la fraction butanolique

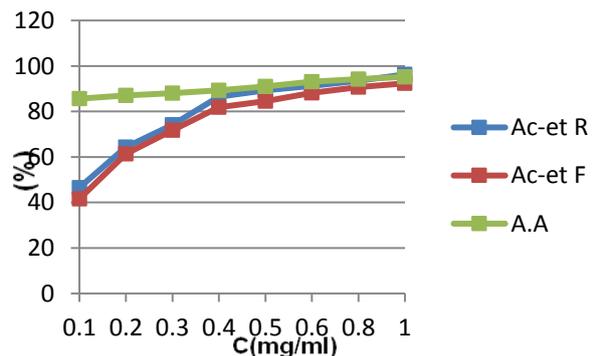


Figure 13: % d'inhibition du DPPH de la fraction acétate d'éthyle

Les courbes de l'activité antioxydante sont exprimées en pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait utilisé. L'acide ascorbique est pris comme antioxydant de référence.

L'interprétation des courbes montre que l'activité antioxydante des extraits augmente avec l'augmentation de leurs concentrations pour se stabiliser à la fin.

Le test au DPPH révèle que l'huile essentielle et l'hydrolat sont les deux extraits les moins actifs comme piègeurs du radical DPPH.

En ce qui concerne les polyphénols, qu'il s'agisse de tanins, d'extraits à l'acétate d'éthyle ou de la fraction butanolique, les deux parties de la plante manifestent une activité antioxydante très intéressante.

Par ailleurs, l'extrait méthanolique présente un pouvoir antiradicalaire supérieur à celui de l'extrait aqueux.

V.6.2.Méthode de réduction des ions ferriques FRAP :

Les réducteurs présents dans les extraits des plantes provoquent la réduction de fer ferrique Fe³⁺ en fer ferreux. L'évolution de la couleur bleue a été évaluée en mesurant sa densité dans le milieu réactionnel à 700 nm.

Les valeurs des IC₅₀ obtenues sont reportées dans le Tableau 8 et illustrés par les figures 19, 20, 21, 22, 23,24.

Extraits	Partie utilisée	IC ₅₀ (mg/ml)
Acide Ascorbique (A.A)	/	0.01
Hydrolat	Feuilles	0.44
Huile essentielle	Feuilles	0.72
Extrait méthanolique	Racines	0.10
	Feuilles	1.12
Extrait aqueux	Racines	0.38
	Feuilles	1.85
Extrait en tanins	Racines	0.03
	Feuilles	0.04
Extrait d'acétate d'éthyle	Racines	0.22
	Feuilles	0.34
Extrait n-butanol	Racines	0.10
	Feuilles	0.14

Tableau 8 : Valeurs des IC₅₀ des différents extraits par la méthode FRAP.

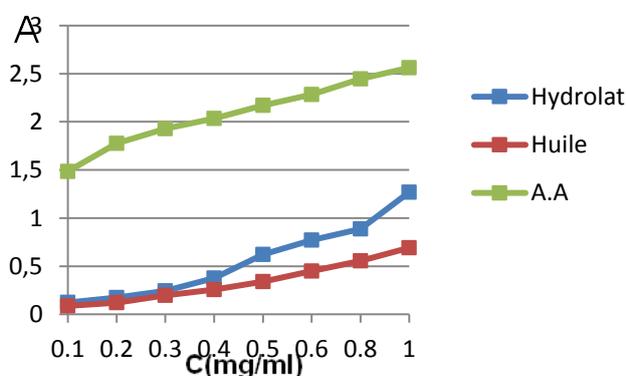


Figure 14: Pouvoir réducteur du fer de l'huile essentielle et l'hydrolat

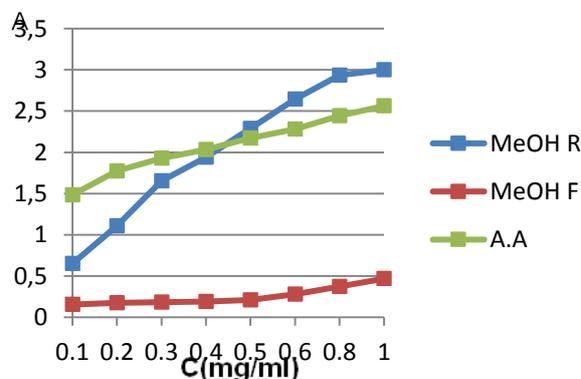


Figure 15: Pouvoir réducteur du fer de l'extrait méthanolique

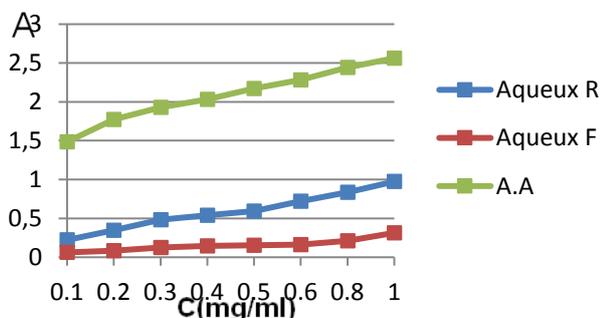


Figure 16: Pouvoir réducteur du fer de l'extrait aqueux

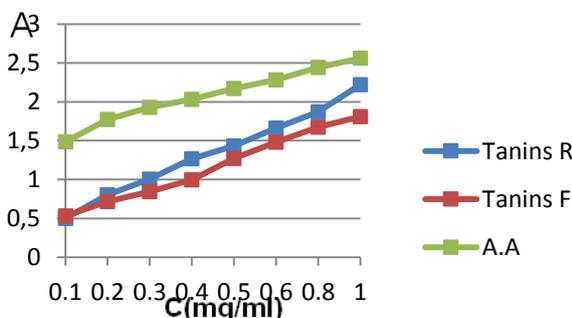


Figure 17: Pouvoir réducteur du fer des tanins

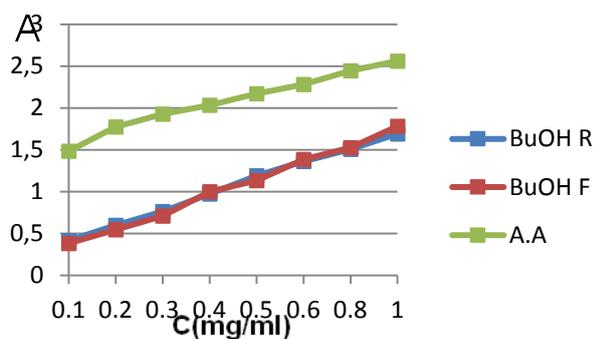


Figure 18 Pouvoir réducteur du fer l'extrait butanolique

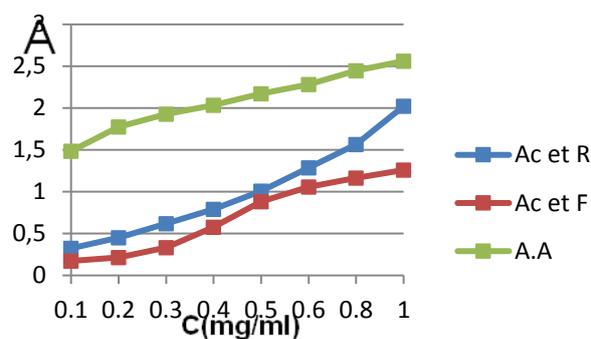


Figure 19: Pouvoir réducteur du fer de l'extrait acétate d'éthyle

La lecture des courbes montre que la capacité de réduire le fer des extraits augmente avec l'augmentation de leurs concentrations.

Il ressort des résultats obtenus, que les tanins des deux parties de la plante ont révélé une capacité à réduire le fer proche de celle de l'acide ascorbique et plus importante que celles des autres extraits. Parmi les autres extraits, ce sont les extraits au n-butanol des deux parties de la plante, et l'extrait méthanolique des racines qui présentent les meilleurs pouvoirs antioxydants.

Conclusion générale

Conclusion générale

L'étude faite dans ce mémoire rentre dans le cadre des travaux de recherche ayant comme objectif la valorisation de la flore de la région de Tlemcen.

Nous nous sommes intéressés à une plante de la famille des Anacardiaceae; *Rhus pentaphylla* Desf.

Sur la base d'une recherche bibliographique détaillée, il a été montré que *R. pentaphylla* reste très peu étudiée. En effet, et jusqu'à ce jour, l'huile essentielle, l'extrait d'hydrolat, ainsi que les acides gras n'ont jamais fait l'objet d'aucune étude.

Après un criblage phytochimique basé sur des réactions de coloration et/ou de précipitation et réalisé sur la plante, plusieurs familles chimiques ont été identifiées: les tanins, les stérols et stéroïdes et les composés réducteurs. Si les flavonoïdes sont présents dans les feuilles, ils sont en faible quantité dans les racines. Par ailleurs, les tests d'amidon, des coumarines, des alcaloïdes, les osides, produisent une inférence négative.

Les extraits de *R. pentaphylla* possèdent une teneur élevée en tanins dans les racines alors que les flavonoïdes sont en quantité acceptable dans les feuilles.

L'analyse par CPG et CPG-SM des huiles essentielles, de l'extrait d'hydrolat ainsi que des acides gras a montré que l'acide hexadécanoïque (31.1 %) et le spathulenol (14.9 %), apparaissent comme les constituants majoritaires de l'huile essentielle.

Pour l'hydrolat, le spathulenol constitue le composé majoritaire à un pourcentage de 14.2 %. En ce qui concerne les acides gras, le composé le plus présent est l'acide palmitique (43.2%). Afin d'évaluer l'activité antioxydante de nos extraits, deux méthodes différentes (DPPH et FRAP) ont été employées. Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle et l'extrait d'hydrolat sont les moins actifs comme piègeurs du radical DPPH. Par contre, les tanins, les extraits à l'acétate d'éthyle ou la fraction butanolique, des deux parties de la plante sont d'une activité antioxydante très intéressante.

La deuxième méthode utilisée a montré que les tanins des deux parties de la plante ont révélé une capacité à réduire le fer proche de celle de l'acide ascorbique et plus importante que celles des autres extraits. Parmi les autres extraits, ce sont les extraits au n-butanol des deux parties de la plante, et l'extrait méthanolique des racines qui présentent les meilleures activités antioxydantes.

Les résultats obtenus ont permis de mieux connaître la plante investiguée dont les huiles essentielles, l'extrait d'hydrolat, ainsi que les acides gras ont été identifiés pour la première fois.

En perspectives, nous envisageons d'élargir le spectre des activités biologiques et définir les molécules qui en sont responsables.

Enfin, nous souhaitons que ce modeste travail contribuerait à la valorisation de la flore du nord ouest Algérien qui est en nette régression.

Références bibliographiques

- [1]: BELBACHIR K., Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Mentha rotundifolia* L. (Domrane) de la région de Tlemcen, Université Abou Bekr Belkaid, 2013, 2P.
- [2]: BRUCE S. et al., Pericarp structure and generic affinities in the Anacardiaceae, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 1990.
- [3]: KPEMISSI AMANA E., Les anacardiaceae du togo : études botaniques, écologiques et propriétés antifongiques, Université de Reims, 2007, 25P.
- [4]: Quezel P., Santa S., Nouvelle flora de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome I, Ed. CNRS, Paris, 1962, p. 521, 611.
- [5]: Viegi L. et al., Preliminary study of plants used in ethnoveterinary medicine in tunisia and in italy, *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 2014.
- [6]: <https://www.teline.fr/fr/photos/anacardiaceae/searsia-pentaphylla#photo-7>
- [7]: Henaoui S. et al., Contribution to a kinematic study of the phytodiversity in tlemcen region (northwest algeria), *International journal of advanced research*, 2015.
- [8]: Gattefossé J., Région naturelle et centre touristique, 76P.
- [9]: Lahsissene H. et al., Catalogue des plantes medicinales utilisees dans la region de zaër (maroc occidental), *Lejeunia*, 2009.
- [10]: Alaoui A. et al., Le rôle de la femme dans le développement local et la préservation des ressources forestières, *Forêt méditerranéenne t. XXXIII*, 2009. 375P.
- [11]: Lee, J.C. et al., Identification of *Rhus verniciflua* Stokes compounds that exhibit free radical scavenging and anti-apoptotic properties. *Biochim.Biophys*, 2002, *Acta*. 1570, 181–191P.
- [12]: Rayne S. et al., Biological activities of extracts from sumac (*Rhus* spp.): a review, *Plant Foods Hum Nutr*, 2007,62(4):165–75.
- [13]: El-Mokasabi F. et al., The state of the art of traditional herbal medicine in the Eastern Mediterranean Coastal Region of Libya, *Middle-East J. Sci. Res* 2,2014, 575–582P.
- [14]: Mahjoub M.A. et al., Antiinflammatory and antioxidant activities of some extracts and pure natural products isolated from *Rhus tripartita*, (Ucria). *Med. Chem. Lett.* 19, 2010 271–282P.
- [15]: [PS O. et al., Hypolipidemic and antioxidative effects of the plant glycoprotein (36 kDa) from *Rhus verniciflua* Stokes fruit in Triton WR-1339- induced hyperlipidemic mice, *BiosciBiotechnolBiochem*, 2006,70(2),447–56.
- [16]: Shafiei M. et al., Lipid-lowering effect of *Rhus coriaria* L. (sumac) fruit extract in hypercholesterolemic rats, *Pharmazie*, 2011,66 (12):988–92.
- [17]: Shahat A.A. et al., Treatment with *Rhus tripartita* extract curtails isoproterenol-elicited cardiotoxicity and oxidative stress in rats, *BMC Complement. Altern.Med.*, (2016) , 16 351P.

- [18]: Giancarlo, S. et al., Formerly natural product letters. hypoglycaemic activity of two spices extracts: *Rhus coriaria* L. and *Bunium persicum* Boiss, *Nat. Prod. Res*, 2006, 20 (9), 882–886P.
- [19] Ben Barka Z. et al., Evaluation of the anti-diarrheal activity of the hydromethanolic root extract of *Rhus tripartita* (Ucria) (Anacardiaceae, *OlfaTebourbiBiomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 83, 827–834P.
- [20]: Abu-Reidah I.M. et al., HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L (Sumac) fruits. *Food Chem*. 2015, 166,179–191P.
- [21]: Itidel, C. et al., Z., Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content variation among Tunisian natural populations of *Rhus tripartite* (Ucria) Grande and *Rhus pentaphylla* Desf, *Ind. Crops Prod*, 2013, 51,171–177P.
- [22] :Kossah, R. et al., Comparative study on the chemical composition of Syrian sumac (*Rhus coriaria* L.) and Chinese sumac (*Rhus typhina* L.) fruits. *Pak, J. Nutr*, 2009, 8, 1570–1574P.
- [23]: Mavlyanov S.M., Anthocyanins and organic acids of the fruits of some species of sumac, *Chem.Nat. Compd*, 1997, 33, 209P.
- [24]: Ben Mansour H. S. et al., *Microbiol. Antimicrob.*, 2011, 32,1-10P.
- [25]: Amri O. et al., Antifungal and antioxidant activities of some aromatic and medicinal plants from the southwest of Morocco, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2015, 7(7):672-678P.
- [26]: Giovanelli S. et al., Aroma profile and essential oil composition of *Rhus coriaria* fruits from four Sicilian sites of collection, *Industrial Crops and Products* , 2017, 97, 166–174P.
- [27]: [Kurucu, S. et al., The essential oils of *Rhus coriaria* L. (Sumac). *J. Essent. Oil Res*, 1993, 5, 481–486P.
- [28]: Bahar, B. et al., Flavour characterization of sumach (*Rhus coriaria* L.) by means of GC/MS and sensory flavour profile analysis techniques. *Int. J. Food Prop*, 2009, 12, 379–387P.
- [29]: Pffirgiorgio P. et al., Plant polyphenols: structure, occurrence and bioactivity, *ITB-CNR, Via FJli Cervi*, 9, 2013, 257-304P.
- [30]: Ghedira K., Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique, *Phytothérapie* 4, 2005, 162-169P
- [31]: Bruneton J., *Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales –*, 3ème Ed. Techniques et documentations, 1999,227-310-312-313-314, 494P.
- [32]: Joseph H., polyphenols in cereals and legumes, 1980, 15-18P.
- [33]: Coffi K. et al., Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*, *C. R. Chimie* 7, 2004, 1039–1042P.

- [34]: Abbes A., Evaluation de l'activite antioxi jize, huiles essentielles d'ammoides verticillata « noukha » de la region de tlemcen, Université Abou Bekr Belkaid, 2014, 17-18P.
- [35]: Chekroun N., Détermination de la capacité antioxydante des huiles végétales : Huile Afia, Université Abou Bekr Belkaid, 2013, 10-13P.
- [36]: Okezie I., Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease, JAOCS 2, 1998, 199-207P.
- [37]: Slobodan V. et al., H-Atom Transfer Is A Preferred Antioxidant Mechanism of Curcumin, J. Am. Chem. Soc. 121, 1999, 9677-9681 P.
- [38]: Halliwell B., Free radicals, antioxidants, and human disease : curiosity, cause, or consequence ?, The Lancet 344, 1994, 721-724P.
- [39]: Ravi V. et al., Anti-Inflammatory Effect of Methanolic Extract of Solanum nigrum Linn Berries, International Journal of Applied Research in Natural Products 2, 2009, 33-36P.
- [40]: Kumaran A. et al., Antioxidant and free radical scavenging activity of anaqueous extract of Coleus aromaticus, Food Chemistry 97, 2006, 109–114P.
- [41]: Selles C., Valorisation d'une plante médicinale à activité antidiabétique de la région de Tlemcen : Anacyclus pyrethrum L. Application de l'extrait aqueux à l'inhibition de corrosion d'un acier doux dans H₂SO₄ 0.5M, Université Abou Bekr Belkaid, 2012, 214p.
- [42]: Boonyadist V. et al., Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of Moringa oleifera leaf extract by the appropriate extraction method, Industrial Crops and Products 44, 2013, 566-571P.
- [43]: Shu-Yan Z. et al., Low concentration of condensed tannins from catechu significantly inhibits fatty acid synthase and growth of MCF-7 cells, Biochemical and Biophysical Research Communications 371,2008, 654–658P
- [44]: Ayoola G.A. et al., Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of Some Selected Medicinal Plants Used for Malaria Therapy in Southwestern Nigeria, Tropical Journal of Pharmaceutical Research 7, 2008, 1019-1024P.
- [45]: Bruneton J., Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales. 2emeéd. Tec. et Doc., Lavoisier, 1993.
- [46]: Trease E. et al.,Pharmacognosy Billiaire. Ed. Billiaire, 1987.
- [47]: Linden G. et al., Biochimie agro-industrielle. Valorisation alimentaire de la production agricole.1er Ed, 1994.
- [48]: Guignard J-L.,Abrégé de biochimie végétale. 2ème Ed, 1979.
- [49]: Mojab F., Phytochemical Screening of Some Species of Iranian Plants, Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2003, 77-82P.
- [50]: Harbone J.B.,Comparative Biochemistry of the flavonoids. Academic Press, 1967.

[51]: ZhiBiao Yi. et al., In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of Pericarpium Citri Reticulatae of a new Citrus cultivar and its main flavonoids, LWT 41, 2008, 597–603P.

[52]: Martin L. et al., A Critical Evaluation of the Vanillin Reaction as an Assay for Tannin in Sorghum Grain, J. Agric. Food Chem.. 26 , 1978, 1214-128P.

[53]:Taieb J. al., Evaluation analytique de dix troussees de dosage direct de la testosterone ."comparaison la CPG/SM, Immunoanal Biol Spéc, 2011, 338-344P

[54]: Bendiabdellah A., Etudes chimique et biologique des extraits de trois Daucus (D. crinitus, D. muricatus et D. carotassphispanicus) de la région de Tlemcen Université Abou Bekr Belkaid, 2014, 70P.

[55]: Sanchez-Moreno C. et al.,A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, Journal Science Technology International, 1998, 121-137P.

[56]: Singleton V. L. et al., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents, American Journal of Technology and Viticulture, 1965,144-153P.

Annexe

Annexe 1

-Réactifs de Wagner : on fait dissoudre 2 g de KI et 1.27 g d'I₂ dans 75 ml d'eau, la solution ainsi obtenue est ajoutée à 100 ml d'eau. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité blanc.

-Réactif de Mayer : on dissout 1.358 g de HgCl₂ dans 60 ml d'eau et 5 g de KI dans 10 ml d'eau, on mélange ensuite les deux solutions et on ajuste le volume total à 100 ml d'eau. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif une trouble plus un précipité blanc.

-Réactif d'amidon : une solution de 1.2 g d'iode dans 50 ml d'eau distillée contenant 2.5 g d'iodure de potassium. Chauffer dans un bain marie, 5 ml de la solution à tester avec 10 ml de la solution d'une solution de NaCl saturé jusqu'à l'ébullition.

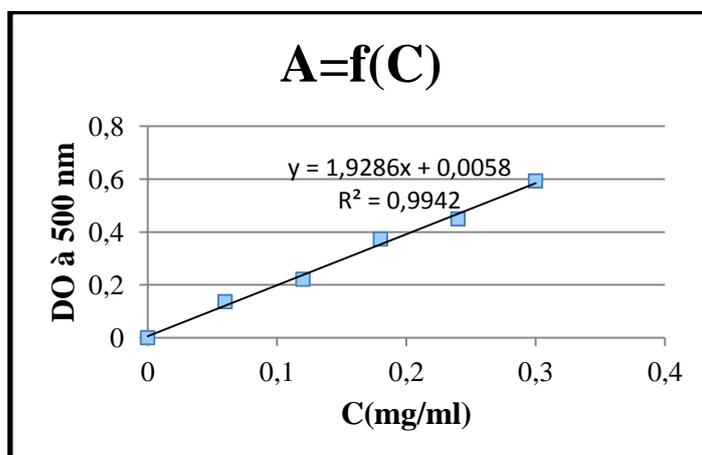
-Réaction de liqueur de Fehling : Mélanger 5 ml de liqueur Fehling A avec 5 ml de liqueur Fehling B. Le caractère réducteur des aldoses ou des cétones donne un précipité rouge brique.

-Réaction de Libermann-Burchardt : Mélanger 5 ml de la solution à tester avec 5ml d'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter et laisser reposer la solution 30 minutes à 21°C.

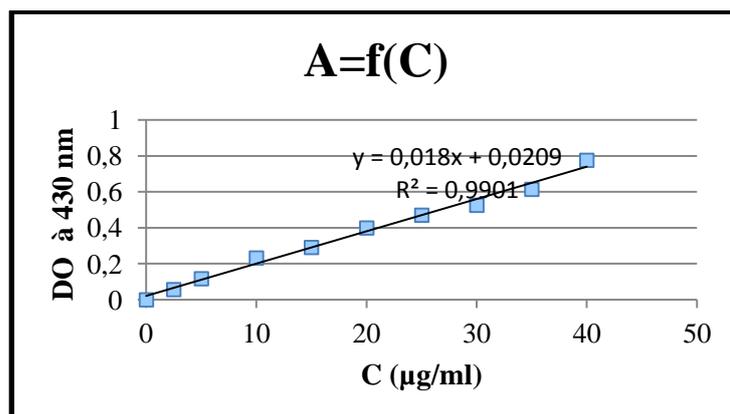
-Réaction de Bornträger : En milieu alcalin aqueux (NH₄OH), les anthracénosides donnent à la solution une teinte vive variant, selon la structure et les substituants de la quinone, de l'orangé rouge au violet pourpre plus ou moins violacé.

Annexe 2

❖ Courbe d'étalonnage de la catéchine :



❖ La courbe d'étalonnage de la quercétine :



❖ La courbe d'étalonnage de l'acide gallique:

