



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABOU BAKER BELKID DE TLEMCEN

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



Département de biologie

Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master en biochimie appliquée

Présenté par

- *Cherif djazia*
- *Abdelali asma*

Thème

**Etude comparative de l'impact de la méthode
d'extraction sur le rendement, la composition et
l'activité biologique de *Rhamnus alaternus***

Soutenu souvent : 05 juillet 2021
Composé de :

Présidente	Melle Benariba N	Maître de conférences A	Université de Tlemcen
Examinatrice	Mme Belkacem N.	Maître de conférences B	Université de Tlemcen
Encadreur	Mme Meliani N.	Maître de conférences B	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2020-2021

Remerciement

Tout d'abord, louange à ALLAH qui nous a guidés sur le droit chemin tout au long du travail et qui nous a donné la volonté et le courage pour accomplir ce modeste travail.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements, ma vive reconnaissance et ma sincère gratitude à Mme Meliani Nawal, maitre de conférences B au Département de chimie, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, pour avoir accepté de diriger ce travail, pour son aide, ses encouragements, ses précieux conseils, sa patience, tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Que nous vifs remerciements aillent à Mlle BENARIBA. Qui nous nous a fait l'honneur de présider le jury. Nous lui adressons également nos hommages les plus respectueux

À Mme Belkacem. Qui nous a fait l'immense honneur d'accepter d'être examinatrice de ce mémoire

Dédicace

Grace à dieu tout puissant, nous dédions ce modeste travail à toutes les personnes qui nous ont aidés de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire plus particulièrement : À mes très chers parents.

À mon très cher papa : je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, tes conseils, tes sacrifices illimités.

À ma chère maman : je te remercie pour ton encouragement, tes conseils, tes sacrifices je suis là aujourd'hui grâce à toi.

À mon cher frère unique Farhadinne : qui n'a mis aucun refus à me porter aide et assistance je te remercie pour ton appui et ton encouragement

À mes chères sœurs Ghizlene, Loubna : pour leur soutien et amour.

À mes chères amies Imene, Ilham, Chahinez, Sara qui ont partagé avec moi des moments inoubliables de joie et de bonheur.

Djazia

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à mes très chère parents qui m'ont toujours soutenu au long de ma vie, nulle dédicace ne puisse exprimés ce que je leur dois, pour leur amour soutien et encouragement, que Dieu les préserve et leur procure santé et longue vie.

A ma sœur Abir, mon frère Abdenour et mon très cher grand père et ceux qui mon supporté et encouragé tout au long de mon parcours.

A la mémoire de ma chère grand-mère.

A tous les membres de ma famille.

A tous mes amies.

A toutes personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merci !

Asma

Liste des figures

Figure 01 : Différents classes des composés poly phénolique.....	04
Figure 02 : Structure chimique de l'acides hydrobenzoïque.....	06
Figure 03 : Principaux acides hydroxy cinnamiques.....	06
Figure 04 : Structure chimique de flavonoïdes.....	07
Figure 05 : Structure de base des principaux flavonoïdes.....	07
Figure 06 : Structure chimique de quelques tannins hydrolysable.....	08
Figure 07 : Structure chimique de tannins condensés.....	09
Figure 08 : Structure de base des coumarines.....	10
Figure 09 : Structure chimiques de quelques anthocyanidines.....	11
Figure 10 : Structure de l'isoprène.....	12
Figure 11 : Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant.....	14
Figure 12 : Mécanisme montrant un stress oxydant au sein d'une cellule.....	15
Figure 13 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie.....	16
Figure 14 : Principaux étapes de production des espèces réactives de l'oxygène.....	22
Figure 15 : Structure de la vitamine E.....	23
Figure 16 : Structure de la vitamine C.....	23
Figure 17 : Structure chimique de la beta carotène.....	24
Figure 18 : <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	27
Figure 19 : La partie aérienne de <i>Rhamnus alaternus</i> a) sèche b) poudre.....	30
Figure 20 : Montage de reflux (extrait aqueux).....	32
Figure 21 : Protocole expérimentale d'extraction.....	34
Figure 22 : Montage d'hydro distillation (type clevenger).....	37
Figure 23 : Forme réduite du radical DPPH.....	39
Figure 24 : Réduction du radical DPPH violet au jaune.....	40
Figure 25 : Spectrophotomètre U.V visible.....	40
Figure 26 : Réduction du fer FRAP de bleu vert au jaune.....	42
Figure 27 : Les rendements des différents extraits de la plante.....	43
Figure 28 : Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'acide ascorbique.....	48

Figure 29 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'extrait aqueux de <i>R. alaternus</i> (sous reflux).....	48
Figure 30 : Pourcentages d'inhibition en fonction de différente concentration de l'extrait aqueux de <i>R.alaternus</i> macération.....	49
Figure 31 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'extrait brut méthanolique de <i>R.alaternus</i> sous reflux.....	49
Figure 32 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'extrait brut méthanolique par macération...	50
Figure 33 : Pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'huile essentielle.....	50
Figure 34 : Pouvoir réducteur des extraits obtenus par reflux par la méthode FRAP.....	54
Figure 35 : Pouvoir réducteur des extraits obtenus par macération par la méthode FRAP.....	54
Figure 36 : Le pouvoir réducteur du standard « Acide ascorbique».....	55

Liste des tableaux

Tableau 1 : Structure et squelettes des principales classes de composé phénolique...	05
Tableau 2 : Les différents types des alcaloïdes classés selon la forme et l'origine.....	13
Tableau 3 : Exemples d'espèces non radicalaires oxygénés.....	18
Tableau 4 : Exemples d'espèces radicalaires oxygénés.....	19
Tableau 5 : Les facteurs influençant sur les ERO.....	19
Tableau 6 : Les noms vernaculaires de <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	27
Tableau 7 : La classification botanique de la plante <i>Rhamnus alaternus</i>	28
Tableau 8 : Les caractéristiques géographiques des stations d'études.....	30
Tableau 9 : Masse et rendement des différents extraits bruts de la plante.....	44
Tableau 10 : Rendement d'huile essentielle.....	45
Tableau 11 : Tests phytochimiques des extraits sous reflux de la plante.....	46
Tableau 12 : Test phytochimique des extraits par macération à température ambiante de la plante.....	46
Tableau 13 : les Valeurs des IC50 et le pouvoir anti radicalaire (PAR) des différents extraits et de l'huile essentielle de <i>R.alaternus</i> et de l'acide ascorbique.....	52

Liste des abréviations

AAR : Activité anti-radicalaire.

ABTS^{•+}: 2, 2'-azynobis-[3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid].

AND : acide désoxyribonucléiques.

BHA : Le butylhydroxyanisole.

BHT : Le butylhydroxytoluène

CAT : La catalase.

DO : Densité optique.

DPPH[•] : 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

EA : Extrait aqueux.

EM : Extrait méthanolique.

ERO : Les espèces réactives oxygénées.

Fe²⁺ : Ions ferreux.

FeCl₃ : Le chlorure ferrique.

FRAP : Ferric Reducing-Antioxidant Power.

GPx : La glutathion peroxydase.

GSH : Glutathion réduit.

GSHPX : Glutathion peroxydases.

GSSG : Glutathion-disulfure.

HCl : Le chlorure d'hydrogène.

HE : Huile essentielle.

HgCl₂ : Chlorure de mercure.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

I % : Pourcentage d'inhibition.

IC₅₀ : Concentration d'inhibition de 50% des radicaux libres.

KI : Iodure de potassium.

LASNABIO : Laboratoire de Substances Naturelles et Bioactives.

LDL : lipoprotéine de basse densité (low density lipoprotein).

NaCl : Chlorure de sodium.

NH₄OH : Hydroxyde d'ammonium.

NO[•] : Monoxyde d'azote.

O₂ : Oxygène moléculaire.

O₂^{•-} : Le radical superoxyde.

R^{mt} : Rendement.

R. alaternus : *Rhamnus alaternus* L.

RL : radicaux libres.

RLO : radicaux libres de l'oxygène.

ROS : reactive oxygen species.

SH : sulfhydryles.

SOD : Superoxyde dimustase.

TRAP : Paramètre de piégeage du radical total.

TBHQ : 2-Terbiobutyle 4 hydroquinone.

UV : Ultraviolet.

Liste des unités

% : Pourcentage

C° : Degré Celsius

g : Gramme

H : Heure

L : Litre

mg : Milligramme

ml : Millilitre

min : Minute

Da : Dalton

nm : Nanomètre.

µg : microgramme.

Liste des tableaux de l'annexe

1. Test DPPH :

- **Tableau 1** : reflux aqueux
- **Tableau 2** : macération aqueux
- **Tableau 3** : reflux méthanolique
- **Tableau 4** : macération méthanolique
- **Tableau 5** : huile essentielle
- **Tableau 6** : acide ascorbique

2. Test FRAP :

- **Tableau 7** : reflux aqueux
- **Tableau 8** : reflux méthanolique
- **Tableau 9** : macération aqueux
- **Tableau 10** : macération méthanolique
- **Tableau 11** : acide ascorbique

Liste des figures de l'annexe

- **Figure 01** : Lampe UV
- **Figure 02** : Test coumarine
- **Figure 03** : Test FRAP
- **Figure 04** : Test phytochimique
- **Figure 05** : Rota vapeur

Table des matières

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Liste des abréviations.

Introduction générale.....	01
-----------------------------------	-----------

Première partie : Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Généralité sur les plantes médicinales et les métabolites secondaire

I.1.Définition des plantes médicinales.....	03
I.2.Métabolisme secondaire	03
I.3.Les composés phénoliques	03
I.3.1.Principales classes des polyphénols.....	05
I.3.2.Les acides phénoliques.....	05
I.3.3.Flavonoïdes	08
I.3.4.Les tannins	08
I.3.5.Coumarines.....	09
I.3.6.Quinones	10
I.3.7.Anthocyanes.....	10
I.3.8.Huile essentielle.....	11
I.3.8.1.propriétés physiques.....	11
I.3.8.2.Composition chimique des huiles essentielles.....	11
I.4.Les terpènes.....	12
I.5.Les saponines.....	12
I.6.Les alcaloïdes.....	12

Chapitre 2 : stress oxydatif

Introduction	14
II.1.Source de radicaux libres	15

II.1.1.Les sources endogènes.....	16
II.1.2.Les sources exogènes.....	17
II.2.Les cibles biologiques des ERO.....	17
II.2.1.Les lipides.....	17
II.2.2.Les protéines.....	17
II.2.3.L'ADN.....	18
II.3.Les espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	18
II.3.1.Les différents dérivés d'ERO	18
II.3.2.les facteurs influençant le stress oxydatif.....	19
II.4.Les antioxydants.....	19
II.4.1.Définition.....	19
II.4.2.Les antioxydants de synthèses.....	20
II.4.3.Les antioxydants naturels.....	20
II.4.3.1.Les antioxydants enzymatiques.....	20
II.4.3.2.Les antioxydants non enzymatiques.....	22
II.5.Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante in vitro.....	24

Chapitre 3 : Présentation de la plante étudiée

III.1.Généralité sur la famille Rhamnacée.....	26
III.2.Description botanique.....	26
III.3.Nomenclature.....	27
III.4.Classification botanique.....	28
III.5.Habitat et distribution géographique.....	28
III.6.Usage thérapeutique.....	28
III.7.Les Travaux antérieur sur <i>R.alaternus</i>	29

Deuxième partie : Partie expérimentale

Matériel et méthodes

I.Matériel et méthodes.....	30
I.1.Matériel végétal.....	30

I.1.1.Origine géographique et période de récolte de la plante.....	30
I.1.2.Identification botanique.....	30
I.1.3.Préparation des échantillons.....	30
I.2.Méthode d'analyse.....	31
I.2.1.Extraction.....	31
I.2.1.1.Préparations de l'extrait aqueux sous reflux.....	31
I.2.1.2.Préparation de l'extrait aqueux par macération.....	31
I.2.1.3.Préparation de l'extrait méthanolique sous reflux.....	31
I.2.1.4.Préparation de l'extrait méthanolique par macération.....	33
I.3.Calcul des rendements en extraits bruts secs.....	33
I.4.Screening photochimique.....	35
I.5.Extraction d'huile essentielle	36
I.5.1.Calcul du rendement de l'huile.....	37
I.6.Evaluation de l'activité antioxydante	38
I.6.1.Étude de l'activité antioxydante	38
I.6.1.1.Piégeage du radical DPPH.....	38
I.6.1.2.Méthode de la réduction du fer FRAP.....	40

Résultats et discussion

Introduction.....	43
I.1.Rendement des extraits bruts secs.....	43
I.2.Rendement d'huile essentielle	45
I.3.Tests phytochimiques	45
I.4.Etude du pouvoir anti-radicalaire	47
I.4.1.Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	47
I.4.2.Le pouvoir réducteur du fer	53
Conclusion.....	57
Références bibliographiques.....	59

Introduction
générale

Introduction

Depuis la plus haute antiquité, l'homme a appris à exploiter les plantes qu'il a trouvées à sa disposition pour subvenir à ces besoins nutritionnels, et a acquises la capacité à différencier entre les plantes toxiques et les plantes à caractères bénéfiques pour maintenir sa survie (**Desmier, 2016**).

A travers les siècles, les grandes civilisations ont su agrandir leur connaissance et développer des techniques d'exploitation des plantes aux vertus thérapeutiques dont la société moderne en profit encore, grâce aux avancées scientifiques, des études plus approfondis en permis de mieux comprendre les effets des plantes médicinales en étudiant les substances contenues dans les plantes, et d'identifier les principes actifs. Pour ensuite les utilisés comme agents préventives, tels que les antioxydants, qui agissent comme des agents vitales possédant la capacité de protéger l'organisme humain des dommages que le stress oxydatif induit par les radicaux libres est susceptible de causer, c'est pour cela qu'il existe de nos jour un intérêt croissants vis-à-vis des antioxydants (**Desmier, 2016**).

La flore algérienne est considérée parmi les flores les plus riches du bassin méditerranéen pour sa diversité taxonomique à laquelle s'additionne la tradition d'utilisation des plantes (**Bedou, 2015**).

Notre étude va se baser essentiellement sur l'évaluation de l'activité antioxydante du *Rhamnus alaternus* collecté dans la ville de Tlemcen, c'est une plante médicinale qui pousse dans le bassin méditerranéen, elle est très utilisée en Algérie pour ses propriétés médicinales et thérapeutiques.

Ce travail de recherche est scindé en trois parties :

La première partie est dédiée à la synthèse bibliographique elle est subdivisée en 3 chapitres :

Le 1^{er} présente un aperçu général de la plante médicinale et les métabolites secondaires, le 2^{ème} comprennent un rappel sur l'activité antioxydante et le dernier est une description botanique détaillée de la plante étudiée.

La deuxième partie est expérimentale, elle est consacrée à :

- L'extraction de la matière végétale à l'eau et au méthanol par reflux et par macération à température ambiante.
- Tests phytochimiques.
- Extraction de l'huile essentielle par hydro distillation.

Introduction

- Etude du pouvoir antioxydant in vitro de la plante par mesure du pourcentage d'inhibition du radical DPPH, et le pouvoir réducteur (FRAP).

Dans la troisième partie, nous présenterons les résultats obtenus avec des illustrations graphiques et leur interprétation et nous terminerons par une conclusion et perspectives.

Première partie

synthèse

bibliographique

*Chapitre 1 : Généralité sur
les plantes médicinales et les
métabolites secondaires*

I.1. Définition des plantes médicinales

Les plantes médicinales sont définies comme des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses qui leur permettent de soulager, prévenir ou guérir certains problèmes de santé **(Dutertre, J. M-J. 2011)**.

Une « drogue végétale » est une plante ou une partie de plante, utilisée, soit le plus souvent sous la forme desséchée, soit à l'état frais **(Sofowora, 2010)**. Elle peut s'utiliser de différentes manières (infusion, macération, décoction...) **(Beloued, A. 2001)**.

La phytothérapie correspond à l'utilisation des plantes dans le but de traiter ou prévenir les maladies. Les parties utilisées sont les feuilles, fleurs et sommités fleuries, racines ou plantes entières. Des plantes spontanées ou cultivées peuvent être utilisées mais les conditions réglementaires de culture propre doivent être exigées **(Létard et al, 2015)**.

I.2. Métabolisme secondaire

Les métabolites secondaires sont des molécules nécessaires aux plantes pour se défendre contre les agressions extérieures et sont des agents protecteurs contre le stress physique. Ils appartiennent à divers groupes chimiques, alcaloïdes, composés phénoliques et terpènes **(Macheix, 2005)**.

I.3. Les composés phénoliques

Les polyphénols ou composés phénoliques représentent un groupe de métabolites secondaires complexes, sont largement répondeu dans le règne Végétal **(Sonia et jean, 2011)**.

Ils sont caractérisés par leur structure de base constituée d'un cycle aromatique hydroxylé, le phénol. Lorsqu'ils comportent plus d'un noyau benzénique, ces composés sont qualifiés de polyphénols **(El Gharras, 2009 ; Legrand, 2015)**. Ils sont issus de deux grandes voies métaboliques : la voie du shikimate et celle de l'acétate **figure : 1 (Bruneton, 1999)**.

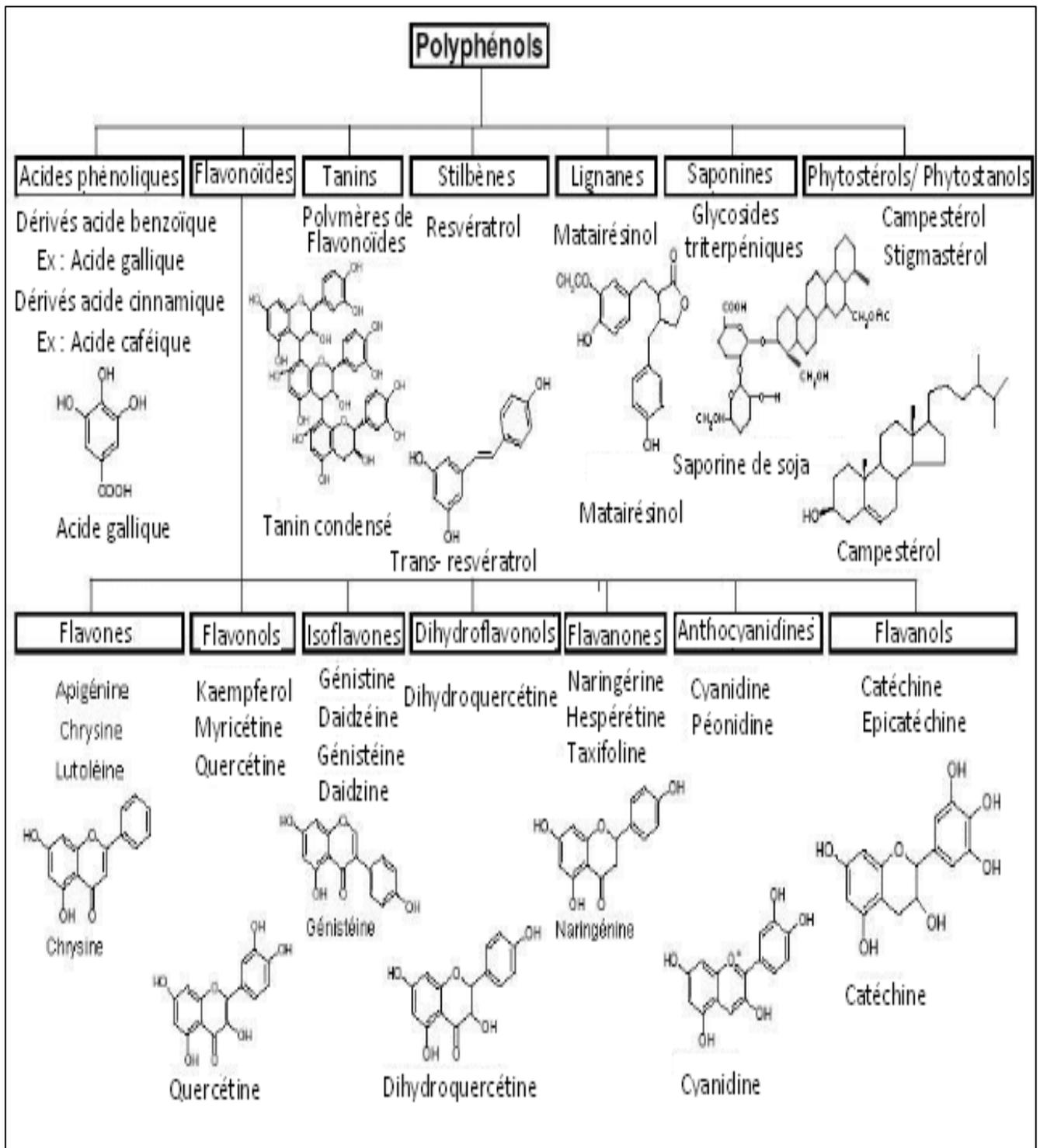


Figure 01 : Différents classes des composés poly phénoliques. (Bruneton, 1999).

I.3.1. Principales classes des polyphénols

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en plusieurs classes dont la plupart ont des représentants chez de nombreux végétaux. Les premiers critères de distinction entre ces classes concernent le nombre d'atomes de carbone constitutifs et la structure de base du squelette carboné. (Tableau 1) (Macheix, 1996).

Tableau 1 : Structure et squelettes des principales classes de composés phénoliques (Macheix, 1996).

Squelette carboné	classe	structure
C6	Phénols simples	Catéchol
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	p-Hydroxybenzolque
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques coumarines	Acide caféique Scopline
C6-C2-C6	Stiblènes	Résvertol
C6-C3-C6	Flavonoïdes	kamphérol
(C6-C3) ₂	Lignanes	pinorésinol
(C6-C3) _n	Lignines	
(C15) _n	Tanins	Tanin gallique Proanthocyanidine

I.3.2. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont les principaux polyphénols alimentaires (Watson *et al*, 2013). On distingue deux classes : les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques.

• Les acides benzoïques :

Ce sont des dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, dont leur structure chimique de type C₆C₁. Ces composés rencontrés couramment sous forme libre ou sous forme esters. Les principales acides hydroxybenzoïques sont vanillique, p-hydroxybenzoïque, syringique, protocatéchique, gentisique et gallique (Bruneton, 1993).

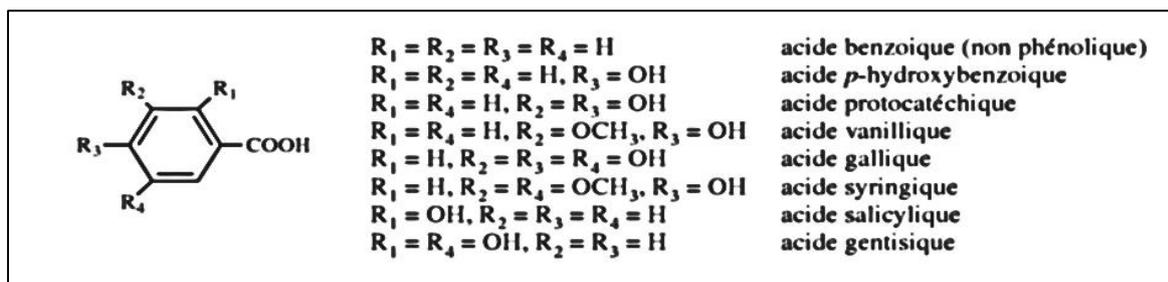


Figure 02 : Acides hydrobenzoïques

• Les acides cinnamiques :

Ce sont des dérivés hydroxylés de l'acide cinnamique qui sont caractérisés par un squelette de type C₆C₃. Les principales acides hydroxycinnamiques sont : acides p-coumarique, caféique, férulique, sinapique (Bruneton, 1993). L'acide cinnamique et caféique sont des représentants communs d'un groupe de dérivés de phénylpropane, à l'état d'oxydation le plus élevé (Cowan, 1999).

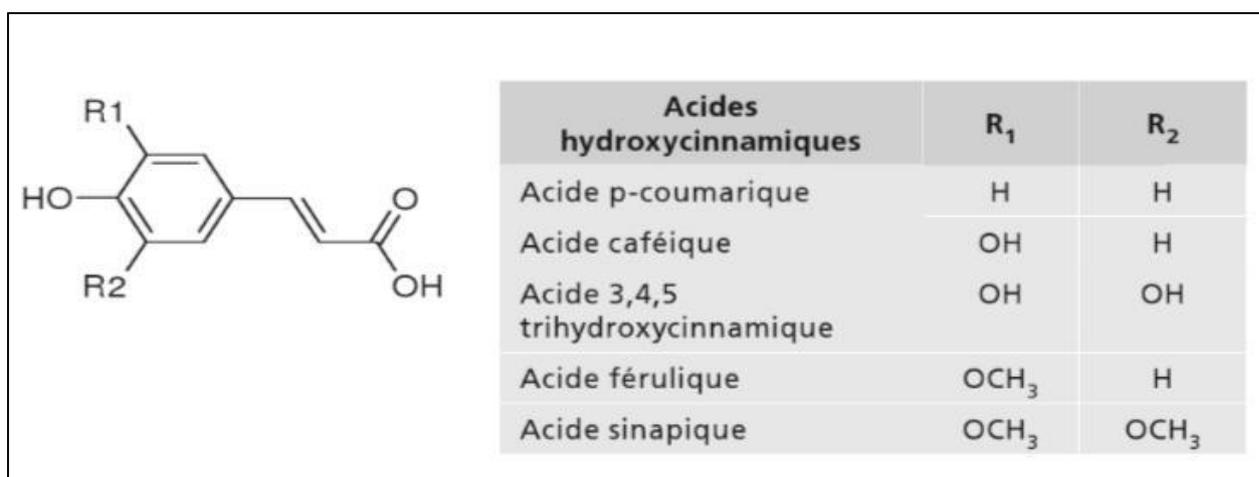


Figure 03 : Principaux acides hydroxycinnamiques

I.3.3. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques généralement présents dans les plantes vasculaires sous forme de pigment responsable de la coloration jaune, rouge et orange de différents végétaux, ils peuvent être libres ou glycosylés. Ils comprennent deux noyaux benzéniques (A et B) liés par trois carbones en chaîne C6-C3-C6 (Ghedira, 2005).

Les flavonoïdes possèdent plusieurs activités biologiques intéressantes telles que l'activité antimicrobienne (Ulanowska, Tkaczyk *et al.* 2006), antifongique (Ortuño, Báidez *et al.* 2006), anti-inflammatoire (Park, Lee *et al.* 2008) et une activité contre la peroxydation lipidique et l'atteinte hématologique (Park, Lee *et al.* 2008).

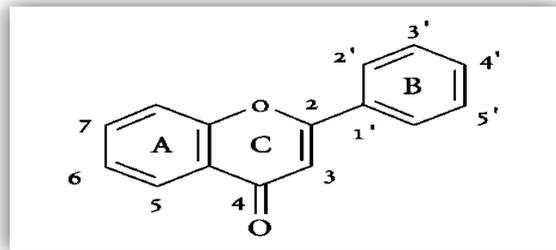


Figure 04 : Structure chimique des flavonoïdes (ghedira, 2005)

Selon leur squelette de base, les flavonoïdes peuvent être divisés en six classes, dont on caractérise principalement : les flavonols, les flavones, flavane-3-ols, flavanones, anthocyanidines et les isoflavones (Figure 05).

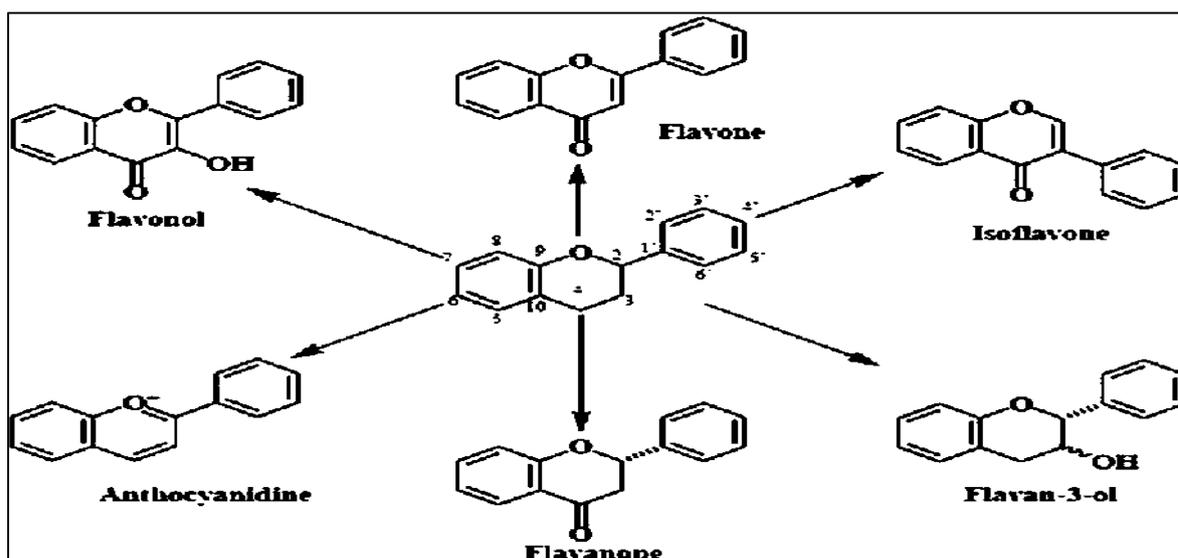


Figure 05 : Structures de base des principaux flavonoïdes

I.3.4. Les tannins

Les tannins sont des composés phénoliques hydrosolubles ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 Da, une propriété de précipiter la gélatine et d'autres protéines et de se colorer par les sels ferrique (**Krief, 2003**). Les tanins sont très répandu dans le règne végétal, Ils sont présents dans divers organes : les feuilles, les fruits, l'écorce, les racines et les graines. (**Khanbabaea et Ree, 2001**).

On distingue deux groupes de tannins différents par leur structure et par leur origine biogénétique :

- **Tannins hydrolysables :**

Sont des oligos ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénolique. Le sucre est généralement le D-glucose et l'acide phénolique est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins soit l'acide ellagique dans le cas des tannins classiquement dénommés ellagitannins (**Bruneton, 1993 ; Cowan, 1999**).

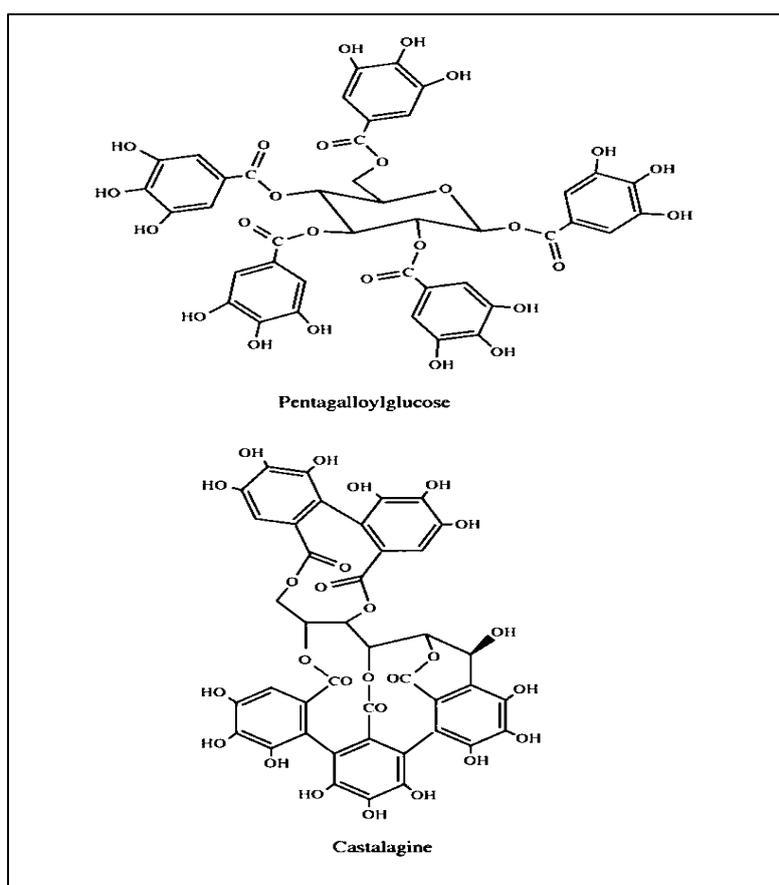


Figure 06 : Structure chimique de quelque tannins hydrolysable

- **Tannins condensés ou tannins catechiques ou proanthocyanidols :**

Les tannins condensés ou proanthocyanidols sont des polymères flavaniques constitués d'unité de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone, le plus souvent en position C4-C8 ou C4-C6 (Bruneton, 1999).

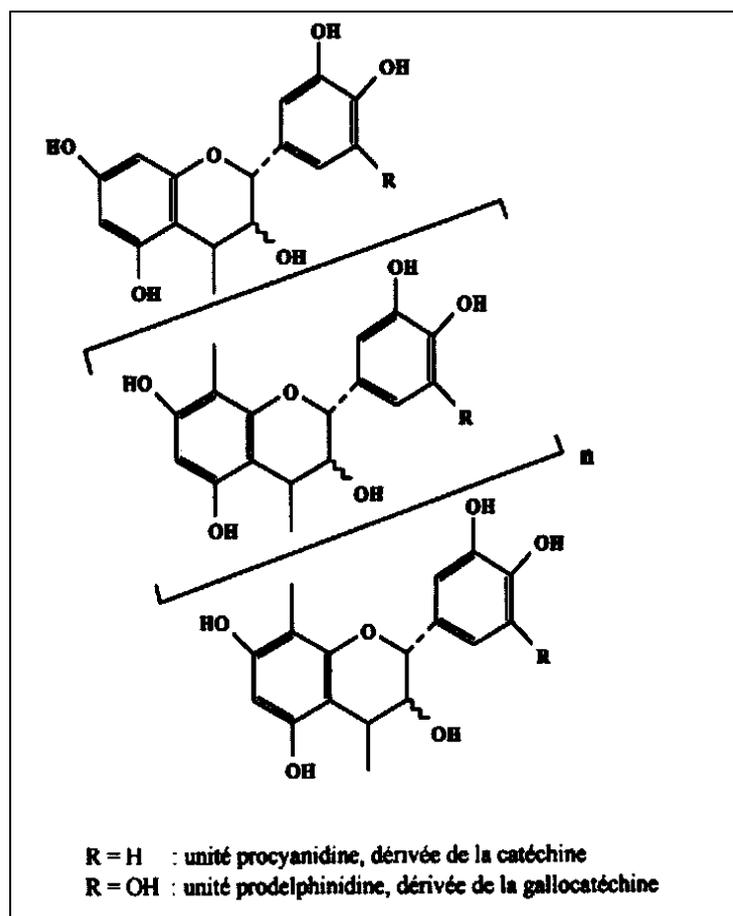


Figure 07 : Structure chimique de tannins condensés

I.3.5. Coumarines

Ce sont des molécules largement distribuées dans tout le règne végétal. Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base benzo-2-pyrone (C6-C3) Caractérisés par une intense fluorescence bleue en lumière ultraviolette (Muanda, 2010).

Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et dans les solvants organiques, tandis que les formes hétérocycliques sont plus au moins solubles dans l'eau (Crozier, 2006 ; Bruneton, 2009).

La structure des coumarines permet une fonction préventive contre la peroxydation des lipides membranaires et une capacité à capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et

peroxydes (Attou, 2011). Elles sont responsables de l'odeur caractéristique du foin (Cowan, 1999).

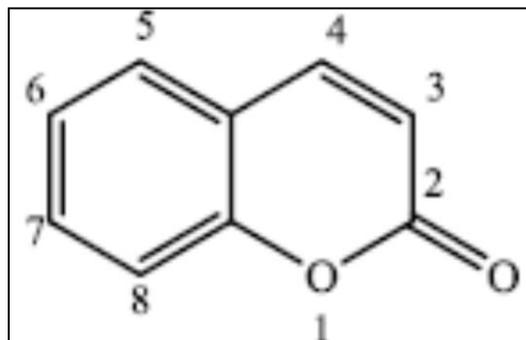


Figure 08 : Structure des coumarines (Iwueke et Nwodo, 2008).

I.3.6. Quinones

Ce sont des cycles aromatiques avec deux substitutions cétoniques (Arif *et al*, 2009). Elles sont caractérisés par un motif 1,4-dicéto cyclohexa-2,5-diéniq (para-quinones) ou, éventuellement, par un motif 1,2-dicéto cyclohexa-3,5-diéniq (ortho-quinones) (Bruneton, 1993). Elles sont ubiquitaire dans la nature, principalement dans le règne végétal et sont fortement réactifs (Cowan, 1999).

I.3.7. Anthocyanes

Ce sont des pigments vacuolaires, qui sont responsables de la coloration rouges, roses, mauves, pourpres, bleus ou violets de la plupart des fleurs et des fruits (Bruneton, 1993).

Ils existent sous forme d'hétérosides appelés les anthocyanosides et leurs génines (les anthocyanidols) sont des dérivés du cation 2-phényl-benzopyrylium plus communément appelé cation flavylum. Ces pigments montrent des signaux visuels qui attirent les animaux pollinisateurs (insectes, oiseaux) (Brouillard *et al*, 1997 *in* Bahorum, 1997).

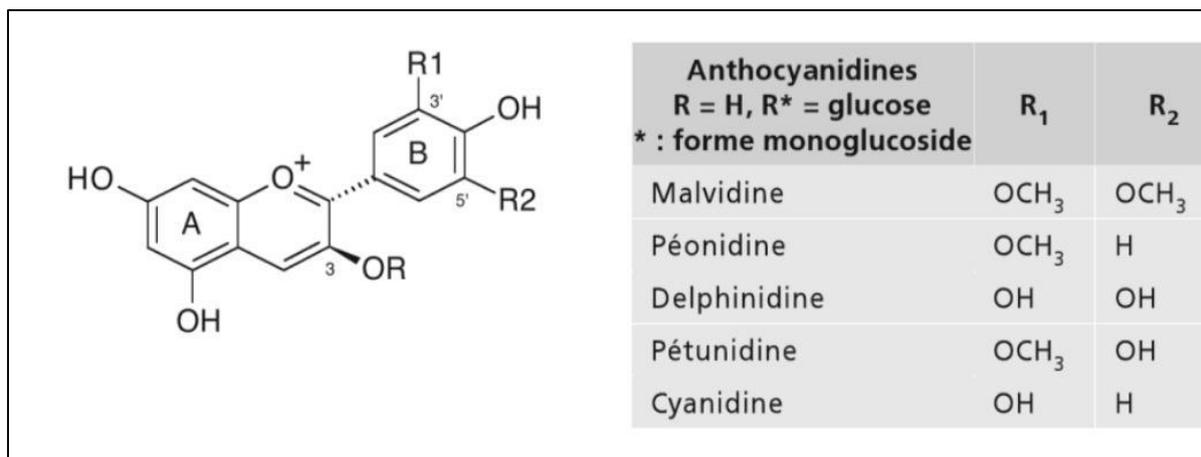


Figure 09 : Structure chimiques de quelques anthocyanidines (sarni-manchado et cheynier, 2006)

I.3.8. Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes des substances volatiles et composés lipophiles extraites de plantes par hydrodistillation ou entraînement à la vapeur. Ils sont incolores ou jaune clair et sont caractérisés par l'odorants. Ils peuvent avoir des activités antioxydantes, antiseptiques, antimicrobiennes, antifongiques, anti-inflammatoires ou répulsives.

I.3.8. 1. Propriétés physiques

Les HE sont volatiles et odorantes ce qui les différencie des huiles fixes, leur densité inférieur en général à celle de l'eau. Elles ne sont que rarement colorées soluble dans les solvants organiques et dans les alcools. Elles sont liposolubles, leur indice de réfraction élevé. Elles sont liquides à température ambiante (**Pharmacopée Européenne, 2010**).

I.3.8.2. Composition chimique des huiles essentielles

Il s'agit d'un mélange variable et complexe des composants dépendant à deux groupes qui sont caractérisés par des origines biogénétiques différentes : les composés aromatiques dérivés du phénylpropane et les composés terpéniques (**Cu, 1990**).

I.4. Les terpènes

Les terpènes sont classés dans la catégorie des métabolites secondaires. Leur classification est basée sur le nombre de répétitions de l'unité de base isoprène (à 5 atomes de carbone) (**Harkati, 2011**). On distingue : les monoterpènes en C 10, les sesquiterpènes en C15, les diterpènes en C 20, les triterpènes en C30 et tétraterpènes en C 40 (**Rahmani, 2017**).

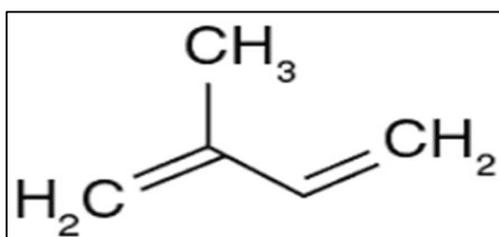


Figure 10 : Structure de l'isoprène (**Morot-Gaudry, 2006**).

I.5. Les saponosides

Les saponosides constituent un vaste groupe d'hétérosides très fréquents chez les végétaux. Ils sont caractérisés par leurs propriétés tensioactives. Ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes.

Les saponosides peuvent être classés en deux groupes selon la nature de leur génine : saponosides à génine stéroïdiques et saponosides à génine triterpéniques (**Bruneton, 1999**).

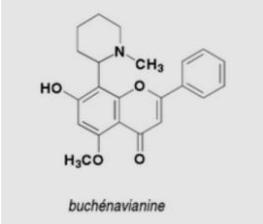
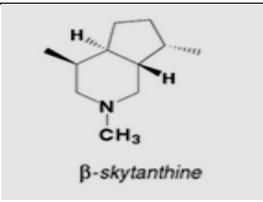
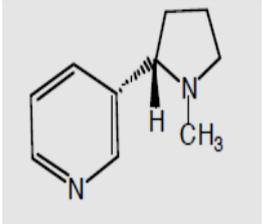
Les saponines sont utilisées traditionnellement pour leurs propriétés molluscicides, antimicrobiennes, insecticides, hémolytiques (**Vincken et al, 2007**), anti-inflammatoire (**Das et al, 2012**), anti tumoral et cytotoxique (**Chwalek et al, 2006**).

I.6. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques d'origine naturelle contenant un ou plusieurs atomes d'azote avec un caractère basique de degré plus ou moins fort.

Les alcaloïdes sont classés selon leur forme et leur origine biosynthétique, On distingue trois types d'alcaloïdes représenté dans le tableau : 02 (**Bruneton, 2009 ; Ghedjati, 2018**).

Tableau 02 : Les différents types des alcaloïdes classés selon la forme et l'origine
(Bruneton, 2009 ; Ghedjati, 2018)

Type	Définition	Exemple
Les alcaloïdes vrais	Issus du seul règne végétal et sont bio synthétiquement formés, ils sont formés à partir des acides aminés	 <p><i>buchénavianine</i></p>
Les pseudo-alcaloïdes	possèdent les mêmes caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ils ne dérivent pas des acides aminés.	 <p><i>β-skytanthine</i></p>
Les proto-alcaloïdes	Ce sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclut dans le système hétérocyclique, ils ont un caractère basique	

Chapitre 2 : Stress oxydatif

- **Introduction**

L'oxygène est un élément indispensable à la vie, il permet aux cellules du corps d'exercer leurs activités en leur fournissant de l'énergie.

Toutefois, une partie de cet oxygène produit dans des conditions physiologiques des métabolites particulièrement toxiques appelés espèces réactives de l'oxygène ou ROS (reactive oxygen species) (Lesgards, 2000), qui contribuerait au développement et la progression de plusieurs maladies graves en particulier le cancer, les maladies neurodégénératives comme la maladie de l'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Charcot (Guinebert *et al.*, 2005), les maladies inflammatoires, le diabète, le vieillissement et l'altération de l'ADN (Favier, 2003).

Les radicaux libres constituent une proportion importante des espèces réactives de l'oxygène, un RL est une substance chimique atome ou molécule portant un ou plusieurs électrons célibataires sur sa couche périphérique lui conférant une grande instabilité et donc une forte réactivité sur les molécules biologiques (figure 01) (Desmier, 2016).

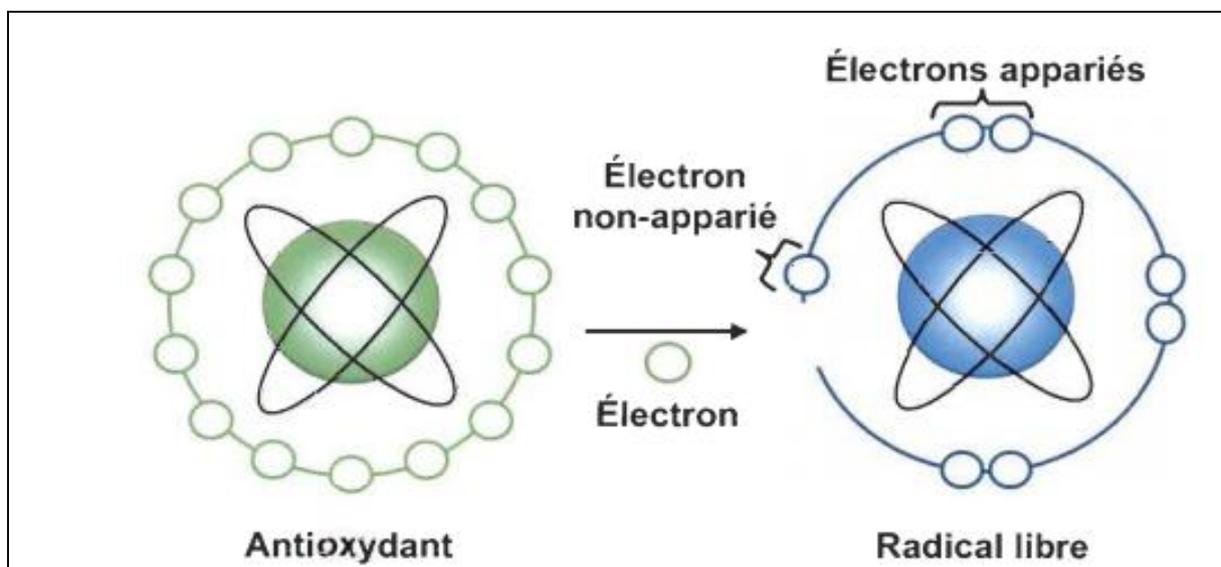


Figure 11 : Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant (Carange, 2010).

Ces radicaux libres sont produits par l'organisme en permanence à faible dose, c'est une conséquence normale du métabolisme aérobie, cette production est maîtrisée par des systèmes de défense, cependant dans certain cas la balance antioxydants/ pro-oxydants se déséquilibrent, soit par déficit en antioxydants, soit par une surproduction immense de radicaux, l'excès de ces radicaux est communément appelé « stress oxydatif » (**figure 12**) (**Gutteridge, 1993**).

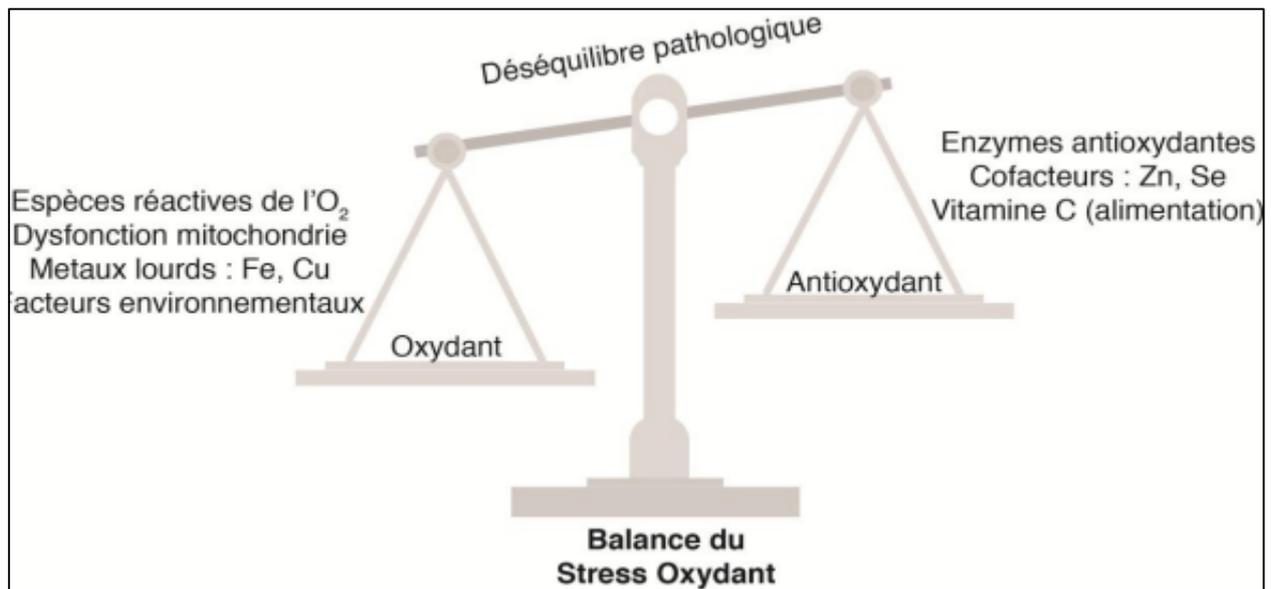


Figure 12 : Mécanisme montrant un stress oxydant au sein d'une cellule (**Garrel, 2017**)

II.1. Source de radicaux libres

La production physiologique de radicaux libres se fait en continue dans le corps et augmente avec l'élévation de la consommation d'oxygène (**Gauche et Hausswirth, 2006**), de nombreux mécanismes et systèmes sont responsables de cette production (**figure 13**).

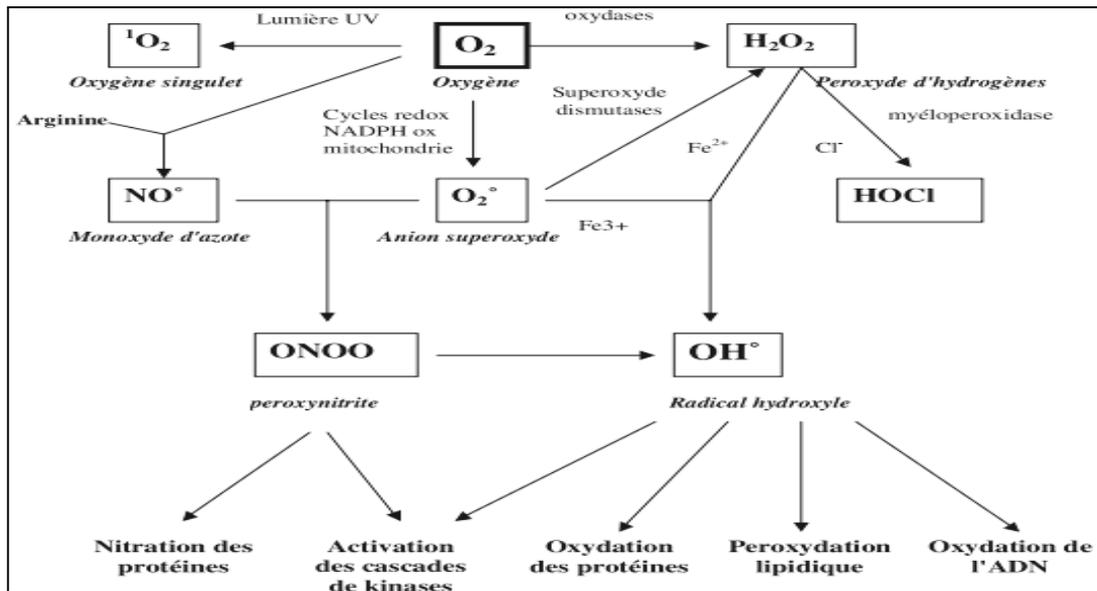


Figure13 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l’oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003).

II.1.1. Les sources endogènes

- **La mitochondrie :**

Elle est considérée comme la plus grande source productrices d’ERO qui génère environ 0,4 à 4% des électrons libérés de la mitochondrie qui passeront directement dans le cytoplasme, ces électrons vont réagir avec l’oxygène dissous et donneront naissances a des espèces oxygénés actives (Delattre et al ,2005) .

- **Le NADPH oxydase :**

Le NADPH oxydases est un complexe enzymatique membranaire, il catalyse la réaction d’oxydation du NADH par l’O₂ ce qui produit du O₂⁻, NADP⁺ et du H⁺ selon la réaction suivante :



Le H⁺ et le NADP⁺ vont ensuite réagir entre eux pour former du H₂O₂.



II.1.2. Les sources exogènes

Les radicaux libres exogènes proviennent au cours d'une exposition à des agressions de l'environnement tels que les agents infectieux (xénobiotiques, insecticides, pesticides...), les rayonnements UV, irradiation gamma, l'ingestion d'alcool, des toxiques comme le NO₂, le NO...

II.2. Les cibles biologiques des ERO

La génération de radicaux libres oxygénés se fait en continu, toutes les biomolécules à doubles liaisons sont particulièrement affectées par les radicaux libres, ce qui rend ces produits chimiques hautement réactifs à l'ADN, aux lipides et aux protéines (**Favier, 2003**) qui constituent les trois grandes cibles des ERO et entraînent des dommages irréversibles comme l'oxydation de l'ADN, la peroxydation lipidique et la carbonylation des protéines (**Mougeolle, 2015**).

II.2.1. Les lipides

Les acides gras polyinsaturés (-CH=CH-CH₂-CH=CH-) sont particulièrement réactifs avec les ERO, leur oxydation est appelée peroxydation lipidique (ou lipoperoxydation) (**Bensakhria, 2018**).

L'attaque des radicaux libres au sein des liaisons lipidiques membranaires provoque une cascade de peroxydation, causant un désordre complet au niveau de la membrane (**Davies, 2000**).

• Quelques conséquences de la peroxydation lipidiques

- Dysfonctionnements cellulaires.
- Modification de la structure des lipoprotéines.
- Amplification des dommages cellulaires.

II.2.2. Les protéines

Les acides aminés soufrés et aromatiques sont des cibles potentielles par les ERO ils sont très sensibles à leur attaque due à l'abondance du groupement sulfhydryles (SH) dans leurs structures (**Haleng et al, 2007**).

- **Quelques conséquences :**
 - Perte d'activité enzymatique.
 - Perturbations métaboliques.
 - Perte de spécificité ligand-récepteur.

II.2.3. L'ADN

L'ADN nucléaire et mitochondrial est aussi une cible majeure des ERO.

- **Quelques conséquences :**
 - Cassures chromosomiques.
 - Mutations.
 - Dysfonctionnement mitochondriale.

II.3. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

II.3.1. Les différents dérivés d'ERO

Les ERO regroupent les dérivés non radicalaires ne possédant pas d'électron célibataire ils peuvent être dérivés de l'oxygène, du chlore, et de l'azote (**tableau 03**).

Elles regroupent aussi des dérivés radicalaires ou radicaux libres de l'oxygène (RLO) possédant un électron célibataire (**tableau 04**).

Tableau 03 : Exemples d'espèces non radicalaires oxygénés

Dénomination	Formule chimique
Le peroxyde d'hydrogène	H ₂ O ₂
L'oxygène singulet	¹ O ₂
L'acide hypochlorique	HOCl
Le nitreperoxyde	ONOOH
Le peroxydinitrite	ONOO ⁻
L'ion hypochlorite	ClO ⁻

Tableau 04 : Exemples d'espèces radicalaires oxygénés

Dénomination	Formule chimique
Le radical perhydroxyle	$\text{HO}_2\cdot$
L'anion superoxyde	$\text{O}_2^{\cdot-}$
Le radical hydroxyle	$\text{OH}\cdot$

II.3.2. Les facteurs influençant le stress oxydatif

Plusieurs facteurs peuvent influencer la production des espèces réactives de l'oxygène, le tableau 05 indique quelques-uns :

Tableau 05 : Les facteurs influençant sur les ERO

Facteurs intensifiant la production des ERO	Facteurs réduisant la production des ERO
<ul style="list-style-type: none"> • L'activité sportive intense. • L'hypertension artérielle. 	<ul style="list-style-type: none"> • Malnutrition. • Déficits enzymatiques.

II.4. Les antioxydants

II.4.1 Définition

Les antioxydants sont définis par **Halliwell** comme « toute substance qui en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé retarde ou inhibe l'oxydation de ce substrat », ils sont des composés puissants ils interviennent en protégeant les cellules des dégâts causés par les radicaux libres (**Halliwell, 2019**).

Quelques antioxydants sont synthétisés par le corps humains comme les enzymes, d'autres telles que les minéraux, les vitamines, et les composés phénoliques doivent être apportés par l'alimentation.

Les antioxydants peuvent être classés selon leurs natures chimiques (naturelles et de synthèses) :

II.4.2. Les antioxydants de synthèses

Les principaux antioxydants synthétiques incluent le butyl hydroxy anisole (BHA), le butyl hydroxy toluène (BHT) très utilisés dans l'industrie agroalimentaire, ils sont stable dans les conditions opératoires de la plupart des procédés industriels, ils sont aussi moins chers et très efficaces par rapport aux antioxydants naturels, le 2-tertiobutyle-4-hydroxyquinone (TBHQ) et les gallates de propyle, d'octyle et de dodécyle sont également des antioxydants synthétiques. (karray, 2013).

Actuellement l'utilisation des antioxydants synthétiques est remise en cause après que des études ont montrés qu'ils peuvent présentées des risques toxicologiques potentiels et de cancérisation à haute dose et donc leur utilisation est en baisse (karray, 2013).

II.4.3. Les antioxydants naturels

L'organisme possède des systèmes de défense très efficaces. Il existe deux classes : les antioxydants enzymatiques qui sont principalement les super oxydes dismutases, la catalase, les glutathions peroxydases et les antioxydants non-enzymatiques (vitamine E, vitamine C...).

II.4.3.1. Les antioxydants enzymatiques

➤ La catalase (CAT) :

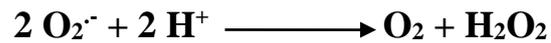
C'est une enzyme intracellulaire présente principalement dans les hématies et les peroxysomes hépatiques, elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en libérant de l'oxygène et de l'eau elle ne l'élimine pas totalement.



Les catalases sont moins efficaces que les glutathion peroxydases (Goudable, 1997).

➤ Les super oxydes dismutases (SOD) :

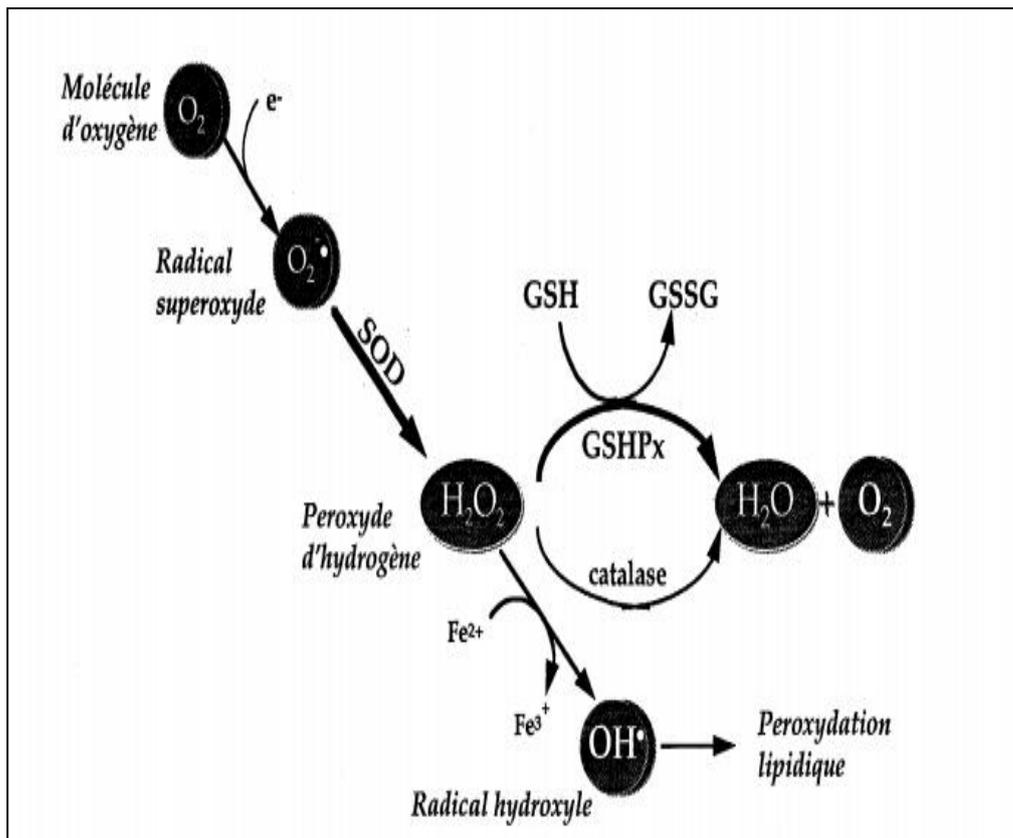
Sont des métalloprotéines assurant la dismutation des O_2^- en O_2 et en H_2O_2 (Haleng et al.2007) selon la réaction suivante :



➤ **Les glutathion peroxydase (GPX) :**

Ce sont des sélénoprotéines capable d'assurer la réduction du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et les hydroxydes lipidiques par la déshydrogénation du glutathion (GSH) qui agit comme cofacteur aidant à transférer l'oxygène.

Le stress oxydant peut engendrer une modification de synthèse des glutathions peroxydases ou une inactivation de l'enzyme selon sa nature et son intensité (**Goudable, 1997**).



GSH : glutathion réduit ; **GSSG** : glutathion oxydé ; **GSHPX** : glutathion peroxydases

Figure 14 : Principaux étapes de production des espèces réactives de l'oxygène (Goudable, 1997).

II.4.3.2. Les antioxydants non enzymatiques

➤ La vitamine E :

La vitamine E ou α -tocophérol est le principal antioxydant de la famille des tocophérols, sa structure moléculaire est composée d'un noyau chromonal (extrémité hydrophile) et une chaîne phytyle (extrémité hydrophobe) (figure15).

La vitamine E permet de diminuer la peroxydation lipidique dans la membrane cellulaire et les LDL, suite à une attaque radicalaire causant une peroxydation lipidique l' α -tocophérol libère son hydrogène qui se trouve dans le noyau phénolique en réduisant le radical RO_2^{\bullet} (Bourguerne, 2012 ; Do et al.2015).

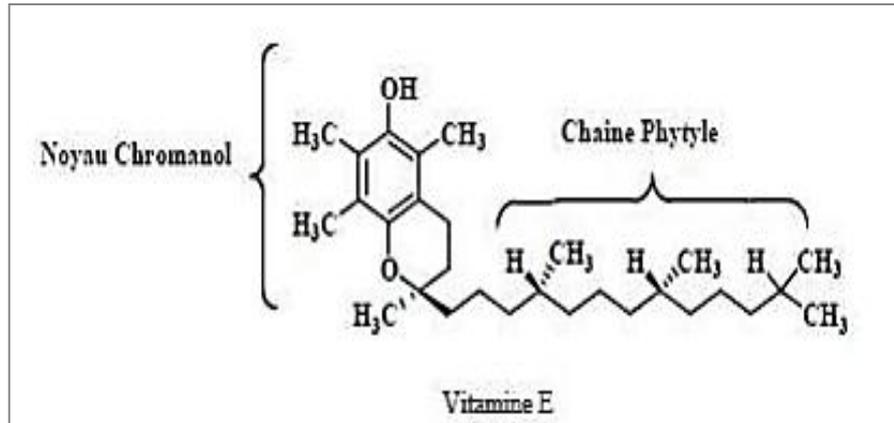


Figure 15 : Structure de la vitamine E (Lópezet al. 2005)

➤ La vitamine C :

Chimiquement parlant il s'agit de l'acide ascorbique et de l'acrobate, c'est une vitamine hydrosoluble elle agit principalement comme piègeur direct des espèces réactives de l'oxygène majoritairement l'O₂⁻.

L'acide ascorbique présent une fonction importante de cofacteur enzymatique en tant qu'agent réducteur (Chen et al.2015).

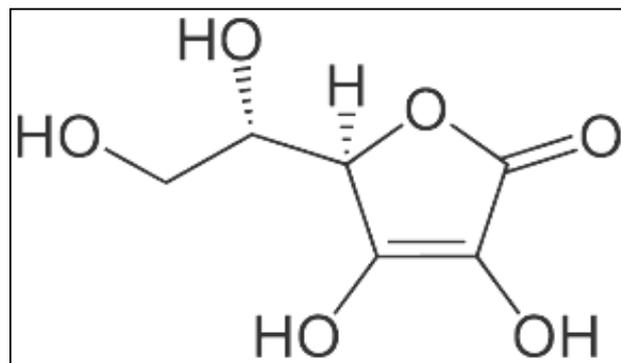


Figure 16 : Structure de la vitamine C (Vertuaniet al, 2004)

➤ Le β- carotène :

C'est un précurseur de vitamine A, il est apporté par l'alimentation, il comporte une chaîne constituée de huit unités isopréniques, et une série de onze doubles liaisons (figure 17) il peut capter l'oxygène singlet sous faible pression d'oxygène (Goudable, 1997).

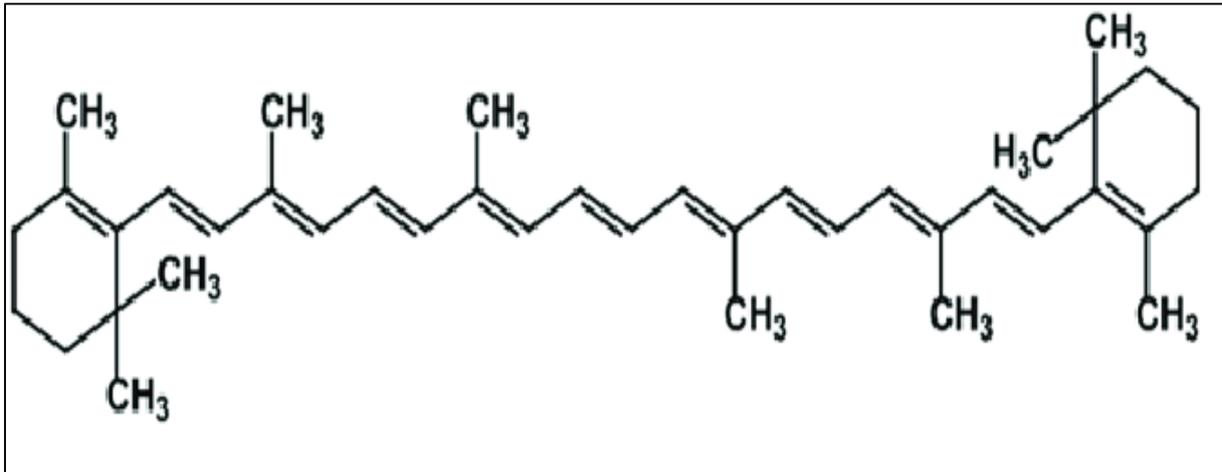


Figure 17 : Structure chimique de la beta carotène. (Shankaranarayanan, 2018)

➤ **Les oligo-éléments :**

Les oligo-éléments (zinc, cuivre, sélénium...) constituent une classe de nutriments ils réagissent comme des cofacteurs d'enzyme, ils jouent un rôle important dans la lutte contre les radicaux libres (Haleng, 2007).

➤ **Les tanins :**

C'est des donneurs de protons de radicaux libres lipidiques produits lors de la peroxydation, un radical libre de tanin plus stable est alors formé et par conséquent la réaction en chaîne de l'auto-oxydation des lipides est arrêtée (Diallo, 2005).

II.5. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante in vitro

Il existe de nombreuses méthodes pour évaluer l'activité antioxydante, parmi ces méthodes, nous citons :

- la méthode FRAP (pouvoir antioxydant de réduction du fer).
- la méthode du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).
- la méthode d'ABTS (2,2-azinobis (3-éthyle-benzothiazoline-6-sulphonate) ou TEAC (Capacité antioxydante équivalente de Trolox).
- La méthode de Blanchiment du β -carotène.
- la méthode TRAP (Paramètre du piégeage du radical totale).

- la méthode TOSC (Capacité du piégeage des oxy-radicaux totaux).
- la méthode de DMPD (Balayage du radical cation N, N- dimethyl-p-phenylenediamine).
- la méthode d'hémolyse.
- la méthode photochimiluminescence (PCL).

Chapitre 3 :
Présentation de la
plante étudiée

III. Présentation de la plante étudiée

III.1. Généralité sur la famille rhamnacée

La famille Rhamnacée est une famille de plante dicotylédone qui contient environ 950 espèces et 45 genres, parmi les Rhamnacée on caractérise essentiellement : *Rhamnus* (150 espèces), *Phytolacca* (150 espèces), *Zizyphus* (100 espèces), *Gouania* (60 espèces), *Pomaderris* (55 espèces) (**Spichiger, R. 2004**).

Cette famille est quasiment cosmopolite en termes d'arbres, des arbustes, ou des plantes herbacées, souvent épineux, ou des lianes à vrilles, volubiles, ou étayée par les branches axillaires, parfois à nodules symbiotiques abritant des bactéries fixatrices d'azotes Elle est dispersé un peu partout dans le monde, mais plus particulièrement dans les régions tropicales et subtropicales (**Judd et al. 2002**).

III.2 Description botanique

Rhamnus alaternus est un arbuste toujours vert, d'origine méditerranéenne (**Bas et al. 2009**), qui peut atteindre 5 mètres de haut, ayant des feuilles coriaces, persistantes, alternes, épaisses, elles sont ovales et légèrement dentées.

L'inflorescence est en petite grappe qui est réfléchi si elle comporte des fleurs mâles, ou dressée si elle comporte des fleurs femelles. La fleur est généralement dioïque et mono-sexuée, petite et de couleur jaunâtre (**Ait Youssef, 2006**).

Cette floraison se produit entre mars et avril. (**Beloued, A. 2001**). Ses fruits charnus mûrissent à la fin du printemps et le début de l'été (**Gulias et al. 2004**).

La récolte des baies se produit en septembre et octobre que l'on récolte pour leurs propriétés thérapeutiques (**Bardin .2004**).



Figure 18 : *Rhamnus alaternus*

III.3. Nomenclature

Les noms vernaculaires du *R.alaternus* sont cités dans le (Tableau 6).

Tableau 6 : les noms vernaculaires de *Rhamnus alaternus* L

Noms communs	Nerprun, Bourg-épine, épine de cerf (Bardin, 2004)
Nom kabyle	Imlillesse, mlillesse
Noms arabe	Méliles, Qaced (Beloued, 2001); Ouchbat el safar (Said <i>et al.</i> , 2002); Oud el khir (Beloued, 2001; Ben Ammar <i>et al.</i> , 2008; Ben Ammar <i>et al.</i> , 2009)
Noms français	Nerprun méditerranéen (Izhaki <i>et al.</i> 2002)
Noms anglais	Mediterranean Buckthorn (Akerreta, 2009)
Nom Italien	Alaterno, Legno Puzzo

III.4. Classification botanique

Le tableau ci-dessous présente la classification botanique de la plante *Rhamnus alaternus* (Yi-ling et Pan-kai, 1982).

Tableau 7 : La classification botanique de la plante *Rhamnus alaternus*

Taxon	Nom
Règne	<i>Plantae</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Rhamnales</i>
Famille	<i>Rhamnaceae</i>
Genre	<i>Rhamnus</i>
Espèce	<i>Rhamnus alaternus</i>

III.5. Habitat et distribution géographique

Rhamnus alaternus L. à une large distribution méditerranéenne on le retrouve sur la côte sud de l'Europe et dans les pays d'Afrique du Nord **Guilias et al, (2004)** en France il est focalisé en Isère, en Ardèche et en Bretagne. Il est très commun en Algérie, il pousse principalement dans les forêts et les rocailles (**Ait Youssef M.2006**).

III.6. Usage thérapeutique

Le *Rhamnus alaternus* L. est beaucoup utilisé dans la médecine traditionnelle dans de nombreux pays Africains. La plante est employée en tant qu'agent : diurétique, laxatif, hypotensif et pour le traitement des troubles hépatiques et dermatologiques (**Ben Ammar et al, 2008**). Les tiges et les feuilles de *Rhamnus alaternus* étaient utilisées en Algérie par les constantinois, contre la jaunisse et les troubles hépatiques provoqué par le paludisme. Le fruit était utilisé en Algérie comme purgatif doux ; au Maroc dans le Haut Atlas et le Moyen Atlas, il est toujours employé comme laxatif (**Ait Youssef, 2006**).

III.7. Les Travaux antérieur sur *R. alaternus*

Des études phytochimiques réalisées par **Ben Ammar et al. (2008)** sur les extraits de la partie aérienne et les racines de *R. alaternus* a démontré la présence de diverses quantités d'antraquinones, de coumarines, de tannins et en particulier des flavonoïdes.

D'autre étude sur *Rhamnus alaternus* qui est caractérisée par des quantités abondantes de composés phénoliques particulièrement les tanins, les anthraquinones telles que l'émodin, chysophanol, alaternin et physcion qui sont les quatre anthraquinones aglycones isolés des parties aériennes de *Rhamnus alaternus* (**Izhaki et al. 2002**).

Par ailleurs, des études in vitro ont affirmé que les extraits organiques de *R. alaternus* inhibent significativement l'activité des carboxyles estérases, enzymes largement distribuées dans les tissus animaux, Cette propriété inhibitrice est attribuée aux flavonoïdes qui exercent une activité non compétitive (**Stocker et al. 2004**).

Les extraits de *R alaternus* ont un potentiel antioxydant lié à la composition de la plante en flavonoïdes et phénols (**Ben Ammar, et al. 2008 ; Bhourri et al.2012**).

Elle contient trois flavonoïdes tri-glycosidique, le Kaempferol 3-O- β -isorhamminoside, rhamnocitrin 3-O- β -isorhammininoside et le rhamnetin-3-O- β -isorhamminoside, d'autre part trois flavonoïdes aglycones ont été identifiés : l'apigénine, le kaempferol et la quercétine (**Ben Ammar et al. 2009**).

En outre, des études révèlent que l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* entraîne une activité antimicrobienne contre une gamme très vaste des microorganismes, notamment les bactéries résistantes aux multiples antibiotiques, (**Percival, 2004**).

Partie expérimentale
Matériel et méthodes

I. Matériel et méthodes

I.1. Matériel végétal

I.1.1. Origine géographique et période de récolte de la plante

Cette étude a été réalisée sur la plante médicinale du genre *Rhamnus alaternus* L. qui a été récoltée au mois de février 2021 dans la région de Zariffet de la wilaya de Tlemcen.

Tableau 8 : Les caractéristiques géographiques des stations d'études

Plante	Station	Latitude(N)	Longitude(W)	Altitude(Km)
<i>Rhamnus alaternus</i>	Zariffet	34°47'55"	1°26'01"	2.84

I.1.2. Identification botanique

L'identification des espèces a été réalisée au niveau du laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels, Université ABOU BEKR BELKAID -Tlemcen-(Algérie) par le professeur Hassani F.

I.1.3. Préparation des échantillons

La partie aérienne de la plante a été séchée à l'air libre, à l'ombre et à température ambiante pendant 15 jours, Une fois séchées les différents organes de la plante étudiée ont été soumis aux extractions.



Figure 19 : la partie aérienne de *Rhamnus alaternus* a) sèche b) broyée

I.2. Méthode d'extraction

I.2.1. Extraction

Les extraits utilisés au cours de notre étude sont préparés selon plusieurs modes d'extraction : en macération ou sous reflux. En utilisant deux solvants de polarité différente (l'eau et le méthanol).

I.2.1.1. Préparations de l'extrait aqueux sous reflux

Dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant, une quantité de 10g de poudre *R. alaternus* a été mis en présence de 200 ml d'eau distillée. Le mélange a été porté à reflux pendant une heure. Après refroidissement à température ambiante, l'extrait aqueux obtenu a été filtré à l'aide d'un papier wattman N°03. Ensuite le filtrat est récupéré et versé dans une boîte à pétri et mis dans une étuve à 40°C pendant 48 h pour sécher. L'extrait sec est conservé dans un pilulier au réfrigérateur (Jouad et al.2002).

I.2.1.2. Préparation de l'extrait aqueux par macération

10g de poudre de *R.alaternus* sont macérés dans 200mL d'eau distillée. Le mélange est maintenu sous agitation magnétique pendant 24 heures à une température ambiante. Après la macération, le macérât obtenu a été filtré à l'aide d'un papier wattman N°3. Ensuite le filtrat est récupéré et versé dans une boîte à pétri et mis dans une étuve à 40°C pendant 48 h pour sécher. L'extrait sec est conservé dans un pilulier au réfrigérateur.

I.2.1.3. Préparation de l'extrait méthanolique sous reflux

10g de poudre *R. alaternus* a été mis en présence de 100 ml de méthanol. Le mélange a été porté à reflux pendant une heure. Après refroidissement à température ambiante, l'extrait méthanolique obtenu a été filtré, le filtrat obtenu a été séché en évaporant le solvant dans le rota vapeur.

I.2.1.4. Préparation de l'extrait méthanolique par macération

On prépare 10g de poudre de *R.alaternus*, qui a été mis à macérer dans 100 ml de méthanol à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 24 heures, avec un maximum d'agitation. Ensuite le mélange est filtré sur papier Wattman (n°3). Les filtrats obtenus sont évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température de 40 - 50 °C.

L'extrait sec est conservé au réfrigérateur (Belhattab *et al*, 2004 ; Ben Ammar *et al*, 2008).



Figure 20 : Montage de l'extraction sous reflux (extrait aqueux)

I.3. Calcul des rendements en extraits bruts secs

Le rendement des extraits bruts (aqueux et méthanolique) exprimé en (%) de la plantes a été déterminé par la formule suivante :

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

- **R (%)** : rendement exprimé en %.
- **M** : masse en gramme de l'extrait sec récupéré.
- **M₀** : masse en gramme du matériel végétal sec pour chaque extrait **Carrée et al, 1953**).

Matériel végétal de *Rhamnus alaternus*

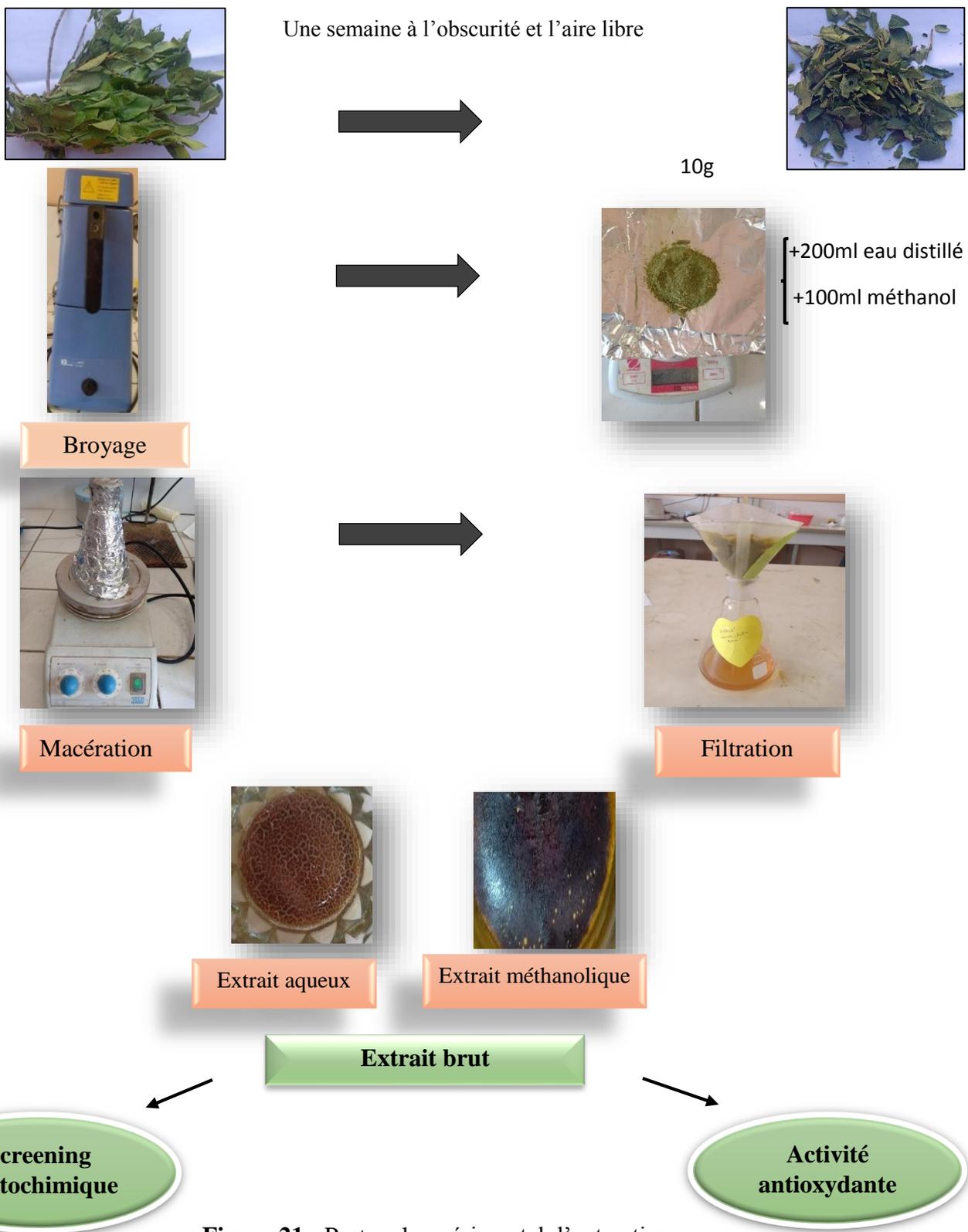


Figure 21 : Protocol expérimental d'extraction

I.4. Screening photochimique

Les quatre extraits préparés ont fait l'objet de quelques tests phytochimiques à fin de mettre en évidence la présence ou l'absence de certaines familles chimiques. Pour cela nous avons réalisé sur nos extraits des tests qualitatifs basés sur des réactions de coloration ou de précipitation et l'examen sous la lumière UV visible.

- **Les flavonoïdes**

À 5 ml de chaque extrait, on ajoute quelques gouttes d'HCl concentré et 0.5milligrammes de tournures de magnésium. L'apparition d'une couleur rouge-rose confirme la présence des flavonoïdes (Karumi et al.2004).

- **Les alcaloïdes**

On ajoute 5 ml d'HCl 1% à 1ml de chaque extrait, chauffer le mélange au bain marie, puis on divise chaque extrait en deux volumes égaux. Un volume est traité par le réactif de Mayer, l'autre par le réactif de Wagner. La formation d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes.

Les réactifs de Mayer et de Wagner sont préparés comme suit :

- Réactif de Mayer :**

Dissoudre 1.358 g d'HgCl₂ dans 60ml d'eau distillée puis 5g de KI dans 10ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et ajuster le volume total à 100 ml.

- Réactif de Wagner :**

Dans 75 ml d'eau distillée, dissoudre 2 g de KI et 1.27 g d'I₂. Le volume obtenu est ajusté à 100 ml avec l'eau distillée. (Majob, 2003).

- **Tanins**

1 ml de chaque extrait avec 2 ml d'eau distillée et 2 à 3 gouttes de la solution de FeCl₃ diluée à 1%, agiter et laisser reposer quelques minutes. Un test positif est confirmé par l'apparition d'une couleur verdâtre confirme la présence des tanins catéchiques, ou bleu – noirâtre qui indique l'existence des tanins galliques (Karumi et al.2004).

- **Coumarines**

Dissoudre le résidu de chaque extrait dans l'eau chaude, diviser le volume en deux tubes.

On ajoute à un des tube 0.5 ml de NH₄OH 10% et le deuxième tube représente un témoin, ensuite on prélève une goutte de chaque tube et la déposé sur un papier filtre qui sera observé sous la lumière U.V à 366 nm. La fluorescence des taches montre la présence des coumarines (Bruneton, 1999).

- **Anthraquinones**

Leur détection consiste à ajouter quelque goutte de HCl à 0,5 ml de chaque extrait. Un test positif est révélé par l'apparition d'un précipité de couleur rouge (Oloyede, 2005).

- **Saponosides**

La détection des saponosides est réalisée en ajoutant un peu d'eau distillée à 2 ml de chaque extrait, ensuite agiter fortement pendant 20 secondes et laisser reposer 20 mn. La formation d'une mousse persistante révèle la présence des saponosides (Mamadou, 2005).

- **Hétérosides**

3 ml de chaque extrait à tester sont mélangés avec 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré. La présence des triterpènes hétérosidiques est indiquée par l'apparition d'une coloration rouge marron.

- **Amidon**

Le test effectué consiste à ajouter 5 ml de chaque extrait à 10 ml d'une solution de NaCl saturée, chauffer le mélange dans un bain marie jusqu'à ébullition, ensuite ajouter le réactif d'amidon. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue violacée.

I.5. Extraction d'huile essentielle

L'huile essentielle de *R. alaternus* a été obtenue par la méthode d'hydrodistillation, à l'aide d'un appareil de type Clevenger. Elle consiste à immerger la matière végétale 250g (séchées et découpées en petit morceaux) dans un ballon rempli d'eau. Le tout est porté à ébullition pendant 4h à 5h. Les vapeurs hétérogènes sont condensée par un réfrigérant. L'eau et l'huile se séparent par différence de densité. L'huile essentielle obtenue est conservée à -4°C jusqu'à son usage.

I.5.1. Calcul du rendement de l'huile essentielle

Le pourcentage en huile essentielle est calculé par la formule :

$$R (\%) = (MHE/MMV) \times 100$$

- MHE : masse de l'huile essentielle obtenue
- MMV : masse de la matière végétale utilisée



Figure 22 : Montage d'hydrodistillation (type clevenger)

I.6. Evaluation de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, l'activité antioxydante in vitro des huiles essentielles, de l'extrait aqueux et de l'extrait méthanolique.

Dans notre étude on utilise deux techniques chimiques : le piégeage du radical libre DPPH, la réduction de fer FRAP.

I.6.1. Étude de l'activité antioxydante

I.6.1.1. Piégeage du radical DPPH

Le DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) est souvent le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité de l'analyse. La méthode de DPPH présente plusieurs avantages du fait qu'elle soit indépendante, simple et rapide. Le test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette) en présence des molécules dites « antioxydantes » afin de mesurer leur capacité à réduire ce radical (**Figure 23**). La forme réduite (de couleur jaune) n'absorbe plus, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde. (**Chaouche, 2013**).

- **Principe :**

DPPH est un radical libre stable, il présente un maximum d'absorbance dans l'intervalle 515 - 520 nm, caractérisé par une couleur violette intense et possédant un électron non apparié sur l'un des atomes d'azote, permet de mesurer un pouvoir anti radicalaire.

Elle repose sur la réduction du radical DPPH (couleur violet) en DPPH-H (forme non radicale) de couleur jaune. Le virage vers cette coloration est proportionnel à la capacité des antioxydants qui se traduit par une diminution de l'absorbance à 517 nm (**Popovici et al. 2009**).

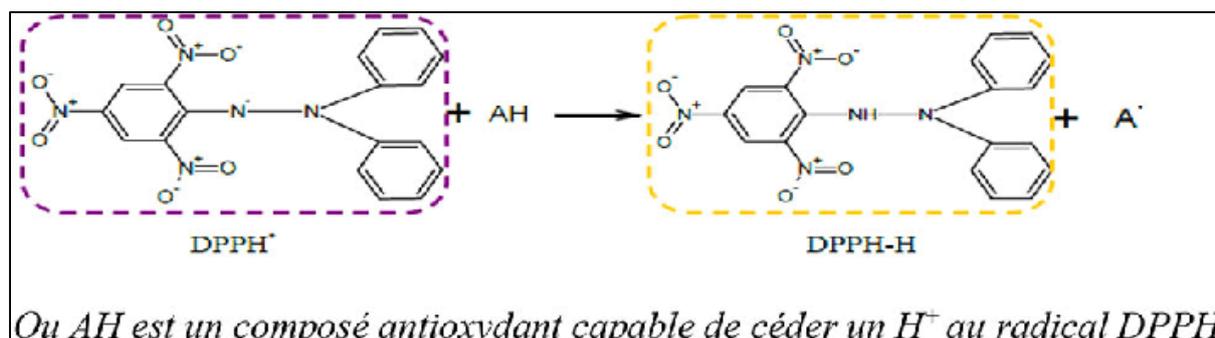


Figure 23 : Forme réduite du radical DPPH

- **Protocole :**

- **Préparation de la solution de DPPH :**

0,006g de DPPH ont été dissout dans 100 ml d'éthanol 96% (v/v), le mélange a été placé sous agitation pour avoir une solution parfaitement soluble, après nous le mettons dans un flacon opaque et on recouvre avec du papier aluminium et nous le conservant dans le frigo afin d'empêcher toute dégradation.

- **Mode opératoire :**

Une solution éthanolique de DPPH est mélangée avec différentes concentrations des extraits aqueux et méthanolique de *R. alaternus*. Dans des tubes à hémolyses 1 ml de chaque dilution des extraits sont ajoutés à 1 ml de la solution éthanolique de DPPH puis laisser incubé durant 30 min à l'abri de la lumière à température ambiante. Lire l'absorbance à 517 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible contre un blanc qui contient de l'éthanol pur. Le contrôle négatif est composé de 1 ml d'éthanol et 1 ml de la solution de DPPH, l'acide ascorbique (contrôle positif) et l'huile essentielle sont préparé dans les mêmes conditions opératoires.



Figure 24 : Réduction du radical DPPH violet au jaune



Figure 25 : Spectrophotomètre U.V visible

L'activité de piégeage des radicaux libres a été exprimée en pourcentage selon la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{Abs C} - \text{Abs P}}{\text{Abs C}} \times 100$$

- **Abs C** : absorbance de control
- **Abs P** : absorbance de produit

IC₅₀ ou concentration inhibitrice de 50 % : IC₅₀ sont calculés graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés.

La valeur de l' IC₅₀ la plus faible correspond à l'efficacité de l'extrait la plus élevée.

I.6.1.2. Méthode de la réduction du fer FRAP

La méthode de pouvoir réducteur de fer est basée sur le changement de coloration lors de la réduction du fer de forme ions ferriques (Fe³⁺) en ions ferreux (Fe²⁺) en présence d'un antioxydant (Chung *et al*, 2006, Benzie et Devaki, 2018). La forme réduite donne une couleur bleu vert du fer ferreux (Fe²⁺). L'intensité de cette coloration est mesurée à 700 nm.

Protocole :**Préparation des solutions :**

- la solution de trichloracétique TCA (10%) : 5g de TCA a été mis dans une fiole jaugée de 100 ml et complété par l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.
- la solution de chlorure ferrique FeCl_3 (0,1%) : 0,1g de FeCl_3 a été solubilisé dans l'eau distillée dans une fiole jaugée de 100 ml.
- la solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1%) : 1g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ a été dissous dans 100 ml d'eau distillée.
- solution tampon : on mélange 28,39g de NaH_2PO_4 solubilisé dans 1L d'eau distillée avec 23,99g de Na_2HPO_4 solubilisé également dans 1L d'eau distillée dont le pH=6,6.

Mode opératoire :

Dans les tubes hémolytique on introduit 1ml de chaque dilution des extraits de la plante, on ajoute 0.5 ml de tampon phosphate (0,2M, PH= 6,6), et 0,5ml d'une solution du ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%). Le mélange obtenu est incubés à 50°C pendant 20min.ensuite, on ajoute à chaque tube 0.5ml d'une solution de TCA (10%) pour stopper la réaction, on centrifuge le mélange à 3000 tpm pendant 10 minutes et puis on laisse reposer pendant 10min.

On prend 1ml de surnageant de chaque tube, on ajoute 1ml d'eau distillée et 0,2 ml de solution de FeCl_3 (0,1%).

La lecture a été effectuée par la mesure de l'absorbance à 700 nm.

Le blanc est préparé de la même façon sauf que l'extrait est remplacé par le solvant (éthanol).



Figure 26 : Réduction du fer FRAP de bleu vert au jaune

Expression des résultats

Les courbes [% inhibition = f (concentrations)] et l'histogramme sont tracés par le logiciel Excel 2013.

Résultats et discussion

- **Introduction**

Les objectifs de cette étude sont variés, faire des extractions de la plante *R.alaternus* par différentes méthodes (sous reflux, macération, hydrodistillation) et différents solvant (eau, méthanol), réaliser un criblage phytochimique des différents extraits bruts (aqueux et méthanolique), déterminer le rendement de ces extraits et de l'huile essentielle, ainsi l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits bruts et de l'huile essentielle par deux méthode DPPH et FRAP.

II.1. Rendement des extraits bruts secs

Dans ce travail nous avons obtenu quatre extraits de différents aspects pour chaque méthode ce qui nous a permis de déterminer les rendements des extraits bruts secs .Les résultats obtenus sont illustrés sur la figure N°27.

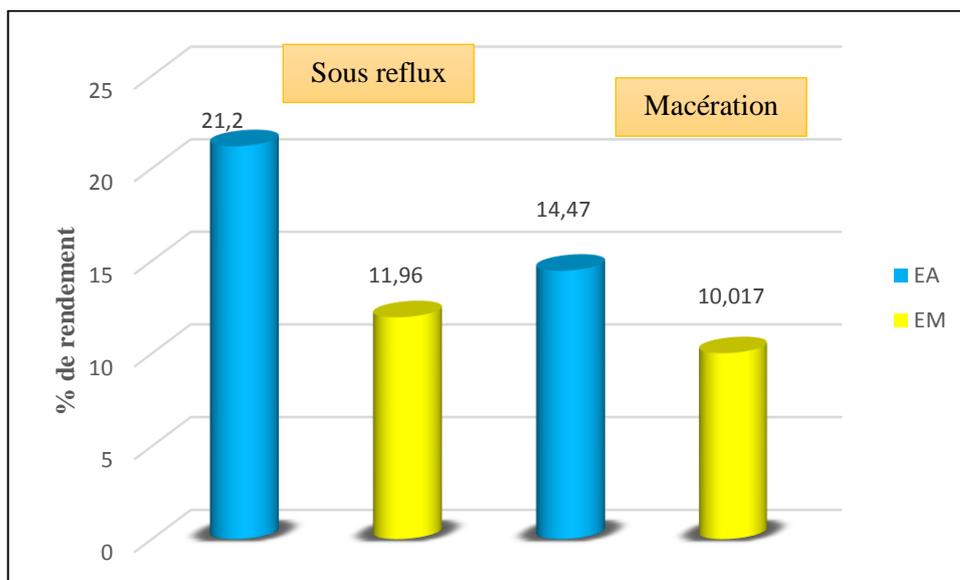


Figure 27 : Les rendements des différents extraits de la plante

Tableau 9 : Masse et rendement des différents extraits bruts de la plante

Méthode	Les extraits de la plante	La masse(g)	Le rendement(%)
Sous-reflux	EA	2,12	21.1
	EM	1.19	11.96
Macération	EA	1.447	14.47
	EM	1.0017	10.017

D'après le tableau (9) et l'histogramme (29) les résultats obtenus montrent que les rendements en extrait aqueux et méthanolique de la partie aérienne de *R.alaternus* été de 21.1% et 11.96%, respectivement, on remarque que le rendement de l'extrait aqueux est supérieur par rapport à celui de l'extrait méthanolique.

D'autre part, la méthode de macération à température ambiante a montré que le rendement obtenu de l'extrait aqueux (14.47%) est meilleur que celui de l'extrait méthanolique (10.017%).

Il a été affirmé que pour les extractions à température élevée permettait d'obtenir des rendements plus élevés en extrait brut que lorsqu'ils sont obtenus à température ambiante (**Majhenic et al.2007**).

Dans une étude réalisée par **Ben Ammar et ses collaborateurs (2008)** sur la même espèce (*R.alaternus*) originaire de Tunisie, la macération des feuilles dans le méthanol suivi par le butanol a donné un rendement de 9 %. Ce rendement est presque similaire à celui donné par notre étude sur l'extrait méthanolique.

Une macération dans le méthanol et d'autre dans l'eau distillée réalisée par **Boussahel et ses collaborateurs (2013)** sur la même espèce récolté à Bordj Bou Arreridj a donnée des rendements de 14,48% et 14,20% respectivement. Le rendement est de l'ordre de 14% pour les deux solvants par contre dans notre étude c'est l'extrait aqueux qui donne le meilleur rendement que ce soit à chaud ou à froid.

La différence de rendement entre les extraits est due à des paramètres à savoir : méthode d'extraction, nature de solvant, période de récolte **Nacz et Shahidi. (2004)**, en comparant avec les études citées auparavant la différence des rendements pour la même plante et en

utilisant les mêmes solvants est due probablement à la nature du sol et du climat ainsi à la période de récolte (Chavan *et al.* 2001).

II.2. Rendement de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle à partir de la partie aérienne de *R.alaternus* par hydro distillation en utilisant un montage de type Clevenger donne une huile essentielle de couleur jaune blanchâtre et qui a donné un rendement très faible de 0.1%.

Tableau 10 : Rendement de l'huile essentielle

La masse de la plante	La masse d'huile essentielle	Rendement(%)
250g	0.2825g	0.113%

II.3. Tests phytochimiques

Le screening phytochimique qui a pour but la mise en évidence de la présence ou l'absence des différents métabolites secondaires dans nos extraits. La recherche de ses composés est basée sur des phénomènes de précipitation ou de colorations par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés ou des examens sous lumières ultraviolettes.

Les résultats des tests phytochimiques réalisés sur le matériel végétal de *Rhamnus alaternus*, de l'extrait aqueux et de l'extrait méthanolique sont résumés dans les deux tableaux : 11,12.

Tableau 11 : Tests phytochimiques des extraits sous reflux de la plante

Métabolites secondaires recherchés		<i>Rhamnus alaternus</i>	
		EA	EM
alcaloïdes	Test de Mayer	-	-
	Test de Wagner	-	+
Saponosides		+	+
tannins		+	+
Flavonoïdes		+	+
Amidon		-	-
Hétérosides		+	-
Anthraquinones		-	-
Quinones		-	-
Coumarines		+	-

Tableau 12 : Tests phytochimiques des extraits par macération de la plante

Métabolites secondaires recherchés		<i>Rhamnus alaternus</i>	
		EA	EM
alcaloïdes	Test de Mayer	-	-
	Test de Wagner	-	+
Saponosides		+	-
tannins		+	+
Flavonoïdes		+	+
Amidon		-	-
Hétérosides		-	-
Anthraquinones		-	-
Quinones		-	-
Coumarines		+	-

+ Présent

-absent

Les tests phytochimiques réalisés sur les différents extraits préparés, par reflux et par macération dans différents solvants (eau et MeOH), de la partie aérienne de *R.alaternus* ont montré la présence des tannins dans tous les extraits sous reflux et macérés qui sont confirmés par la couleur bleu noir qui caractérise les tannins galliques.

La présence des flavonoïdes qui sont détectés par sa coloration rouge rose, et pour les saponosides l'apparition d'une couche de mousse de 1 cm a été remarquée que dans l'extrait aqueux.

Nous remarquons aussi la présence des hétérosides dans l'extrait aqueux et leur absence dans l'extrait méthanolique. Par contre l'amidon coumarine, quinone, anthraquinone sont totalement absents.

En revanche, les résultats obtenus confirment que les composés chimiques détectés dans les extraits méthanolique et aqueux de la même espèce sont proches aux travaux antérieurs de **Ben Ammar et ses collaborateurs (2007)** qui ont démontrés que l'extrait aqueux et méthanolique des feuilles de la même espèce originaire de Tunisie contient plusieurs substances phénoliques, notamment les flavonoïdes et les tanins.

Une autre étude réalisée par **Khettal et ses collaborateurs (2011)** a montré que l'extrait éthanolique des feuilles de *R.alaternus* récoltée en Algérie riche en composés phénoliques.

II.4. Etude du pouvoir anti-radicalaire

L'activité anti-radicalaire des extraits de *Rhamnus alaternus* a été évaluée in vitro par deux méthodes : le piégeage du radical libre DPPH et le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP).

II.4.1. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

L'activité antioxydante des différents extraits de la plante *Rhamnus alaternus* a été réalisée spectrophotométriquement en mesurant les valeurs du piégeage du radical libre DPPH à une longueur d'onde 517nm. La capacité à piéger ces radicaux libre est proportionnelle à la concentration.

Lors de notre travail, la mesure de l'absorbance des extraits préparés à différentes concentrations, nous permis de tracer des courbes et cela après avoir effectué des calculs de

pourcentages d'inhibition en utilisant la formule citée dans le protocole. Les courbes présentent la variation des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits obtenus. Les résultats sont résumés dans les figures ci-dessus :

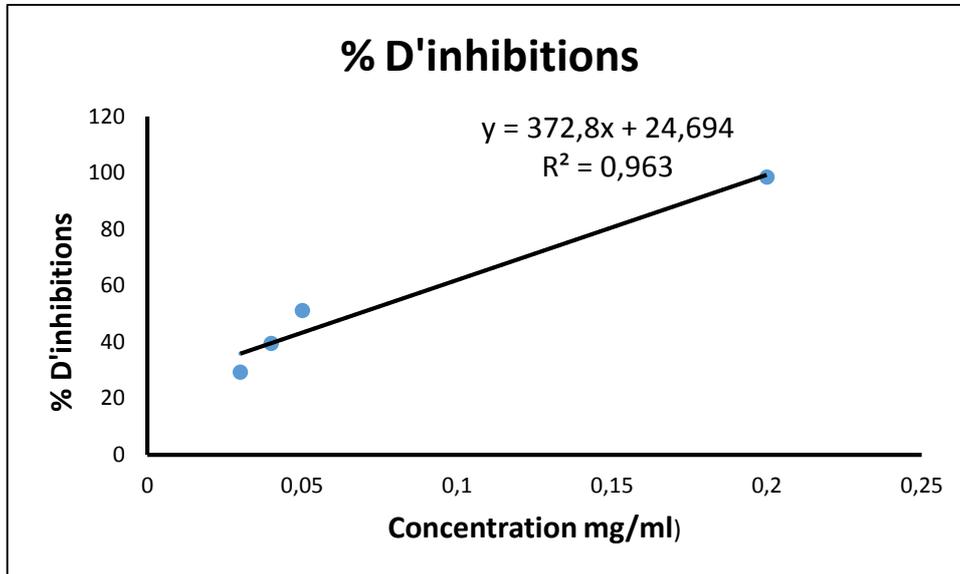


Figure 28 : Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'acide ascorbique

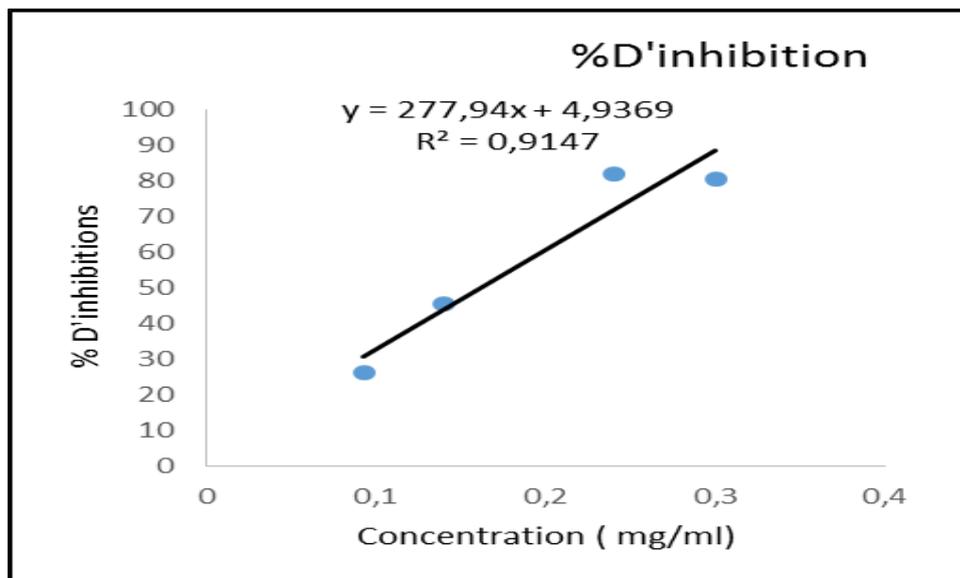


Figure 29 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'extrait brut aqueux de *R. alaternus* sous reflux

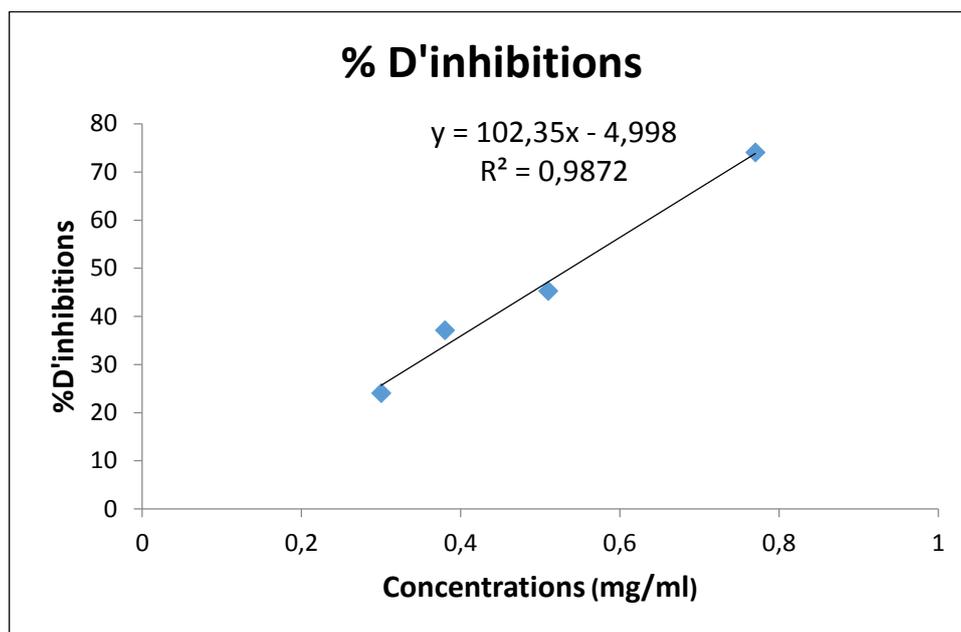


Figure 30 : Pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait aqueux de *R.alaternus* par macération

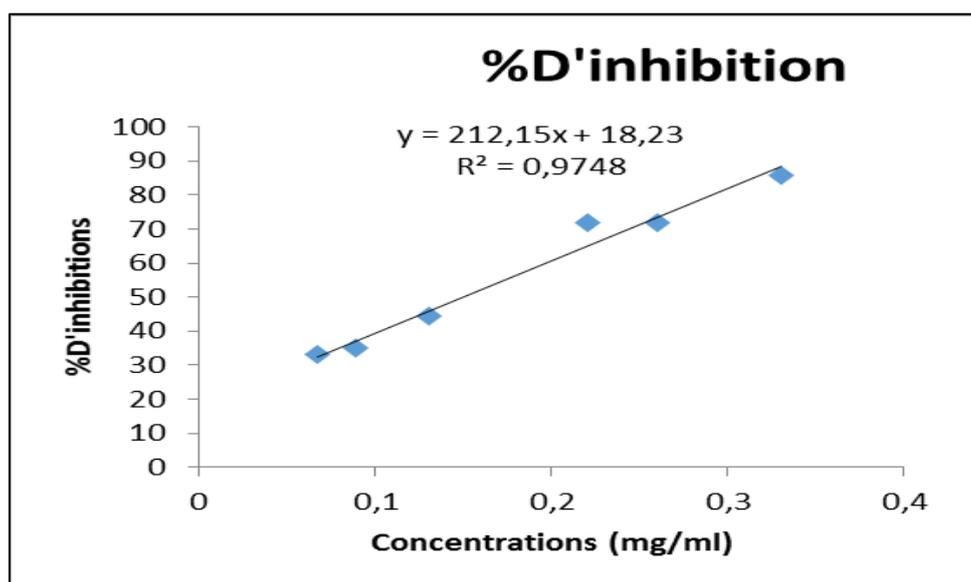


Figure 31 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'extrait brut méthanolique de *R.alaternus* sous reflux

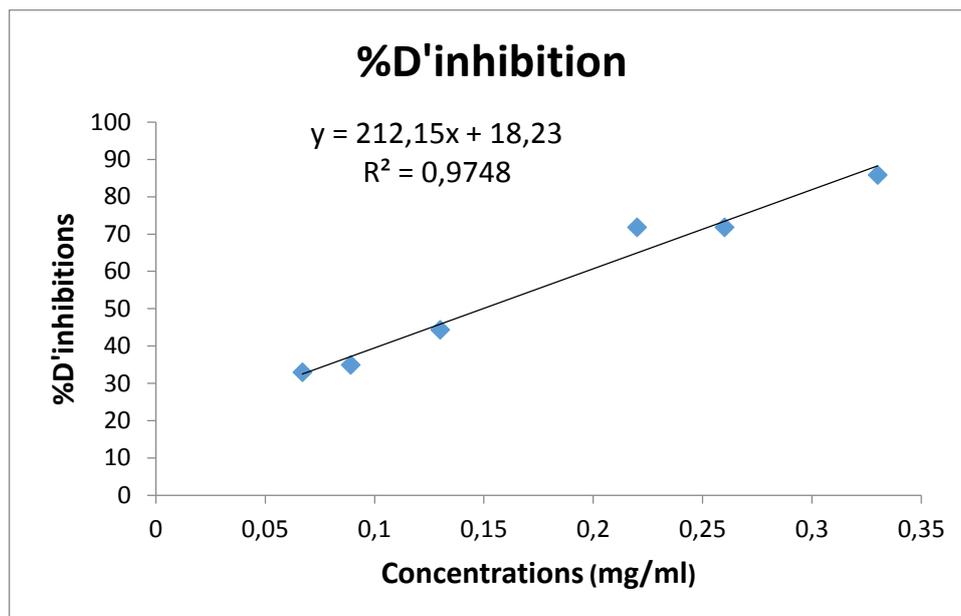


Figure 32 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'extrait brut méthanolique par macération

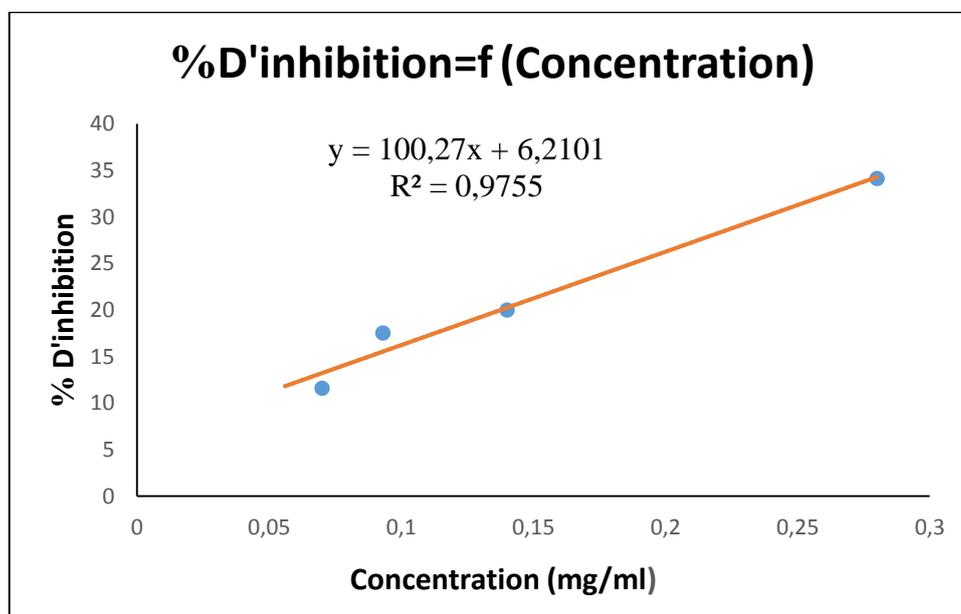


Figure 33 : Pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'huile essentielle

A partir de ces figures, nous remarquons que l'extrait méthanolique présente une forte activité anti radicalaire vis-à-vis du DPPH avec un taux de 85,88 % à une dose de 0.3 mg /ml, par contre l'extrait aqueux présente un pourcentage d'inhibition de 74.11% à une même concentration. Tandis que l'extrait aqueux et méthanolique sous reflux donnent des pourcentages d'inhibition de 80.52 % et 60.14,% respectivement à une concentration de 0.3 mg/ml.

Par contre, l'acide ascorbique peut atteindre un taux de 96.36% à une faible concentration (0.03mg/ml).

Ces résultats montrent que le pourcentage d'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration.

- **Détermination des IC₅₀ des extraits :**

L'activité anti radicalaire des différents extraits du *R.alaternus* est déterminée à partir des IC₅₀ et qui est définie comme étant la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radicale DPPH. Elle est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante.

Plus l'IC₅₀ est petite plus l'activité antioxydante d'un extrait est grande. (Kumbhare *et al.* 2012).

- Le calcul du pouvoir anti radicalaire ARP :

$$\text{ARP} = 1 / \text{IC}_{50}$$

Tableau 13 : les Valeurs des IC₅₀ et le pouvoir anti radicalaire (PAR) des différents extraits et de l'huile essentielle de *R.alaternus* et de l'acide ascorbique

	Extrait	IC ₅₀ (mg /ml)	AAR
Sous reflux	EA	0.162	6.17
	EM	0.288	3.47
Macération	EA	0.537	1.86
	EM	0.140	7.14
	Acide ascorbique	0.067	14.92
	Huile essentielle	0.431	2.32

Selon les résultats obtenue dans le tableau, EA macéré présent une valeur d'IC₅₀ (0.537mg/ml) donc de plus faible activité anti-DPPH. Suivi par EM sous reflux avec une IC₅₀ (0.288mg/ml), 0.162 mg/ml pour EA sous reflux et 0.140 mg/ml pour EM macéré.

L'acide ascorbique marque la plus faible IC₅₀ (0.067mg/ml), donc l'activité anti-DPPH La plus puissante. Tandis que l'huile essentielle correspond à une concentration qui permet d'inhiber 50% des radicaux libre égale à 0.431mg/ml supérieure à celle de l'acide ascorbique avec une activité anti radicalaire de 2,32 donc une capacité antioxydante faible pour ce dernier (Belhadj, S., 2019).

Les valeurs IC₅₀ de l'activité antioxydante des feuilles de *Rhamnus alaternus* obtenues sont comparées avec une étude Ben Ammar et ses collaborateurs (2008) sur les feuilles de la même espèce de plante de Tunisie a présenté une IC₅₀ de 19 µg/ml, lorsque l'extraction a été menée par le méthanol suivie par une extraction dans le butanol. Cette valeur est inférieure à nos résultats.

Le même groupe de chercheurs a également montré d'autres résultats pour l'écorce et les racines mixtes : une fois extraite avec du méthanol puis avec du butanol, la IC₅₀ était de 7 µg /ml. Cette valeur est aussi inférieure à nos résultats.

Dans une autre étude réalisée par **Boussahel et ses collaborateurs (2013)** qui ont trouvé une $IC_{50} = 0,398 \pm 0,007$ et $0,082 \pm 0,0006$ mg/ml pour l'extrait méthanolique et aqueux respectivement. Ces valeurs sont comparables et proches à nos valeurs.

D'autre étude a été menée par **Kosalec et ses collaborateurs (2013)** ainsi que, **Khettal et ses collaborateurs (2011)**, ont montré une IC_{50} de $78,7 \pm 3,16$ μ g/ml et 50 μ g/ml respectivement. Ces valeurs trouvées en microgramme sont nettement inférieures aux résultats donnés par nos extraits.

II.4.2. Le pouvoir réducteur du fer

L'activité antioxydante des extraits méthanolique et aqueux de *Rhamnus alaternus* a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Cette dernière est un test simple, reproductible et rapide. C'est une méthode basée sur la capacité des antioxydants à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} .

Dans nos travaux, nous avons évalué l'activité antioxydante de différents extraits (eau, méthanol) par la méthode FRAP. Notre choix s'est porté sur l'acide ascorbique (un puissant antioxydant) comme contrôle. Les valeurs obtenues permettent de tracer la courbe DO en fonction des différentes concentrations de l'extrait.

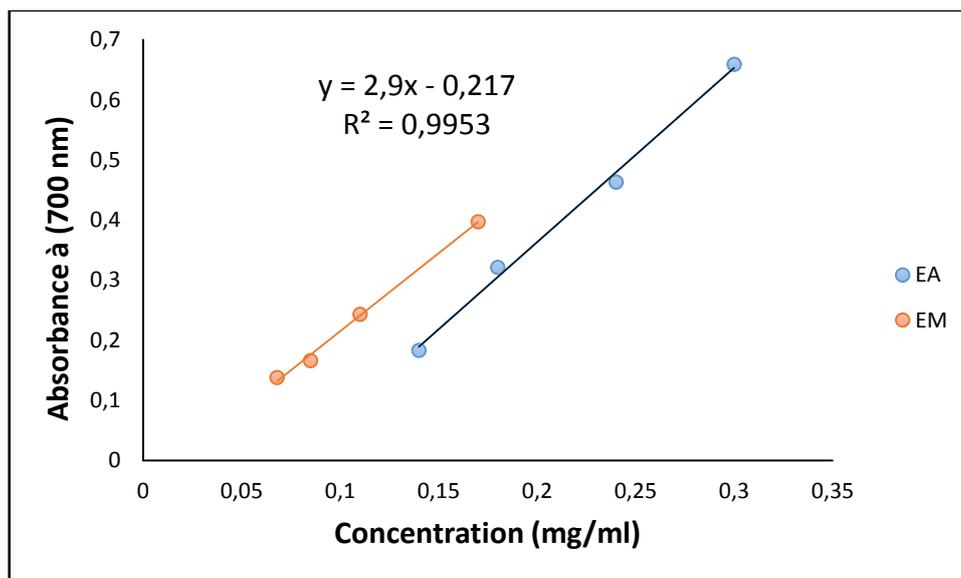


Figure 34 : Pouvoir réducteur des extraits obtenus par reflux par la méthode FRAP

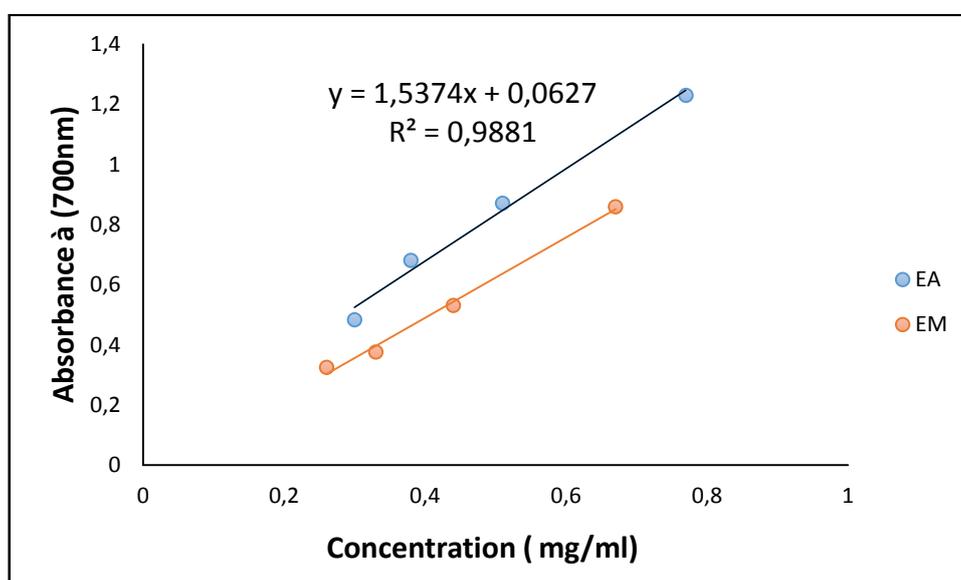


Figure 35 : Pouvoir réducteur des extraits obtenus par macération par la méthode FRAP.

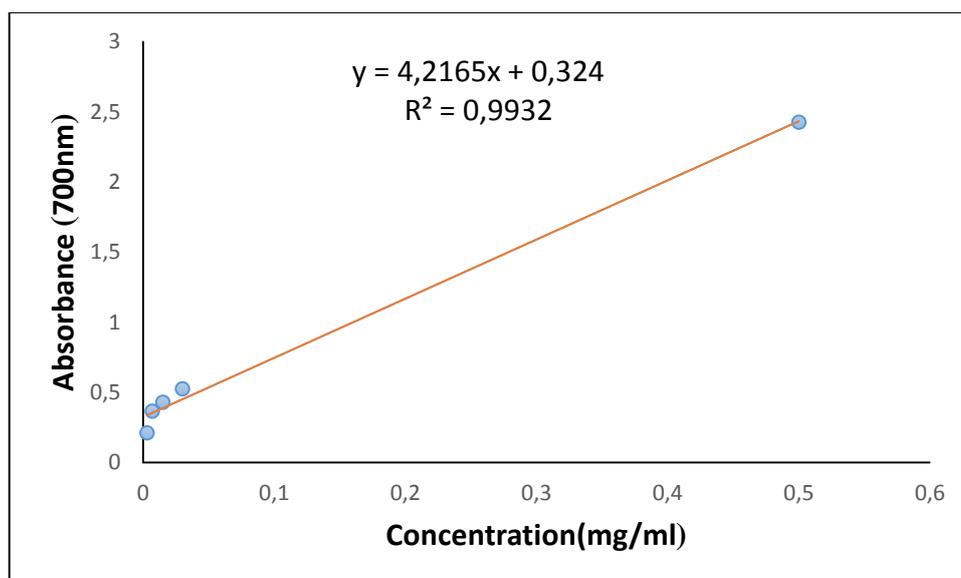


Figure 36 : Le pouvoir réducteur du standard
« Acide ascorbique »

Les résultats obtenus à partir des courbes représentées dans la **figure N° 34/35/36** présentent une réduction du Fe^{+3} en Fe^{+2} qui est proportionnelle avec l'augmentation de la concentration en extraits.

D'après le graphique de la **figure N° 34**, nous remarquons que le pouvoir réducteur de l'extrait aqueux et de l'extrait méthanolique obtenus par reflux augmente avec l'augmentation de la concentration dont l'extrait aqueux représente l'activité la plus importante par rapport à l'extrait méthanolique qui est plus faible et ne dépasse pas une DO de 0.397 à une concentration de 0.17 mg/ml. Tandis, la capacité de réduction du fer est largement inférieure à celle de l'acide ascorbique.

D'après le graphique de la **figure N°35**, Les résultats montrent que les deux extraits obtenus par la méthode de macération, présentent une capacité à réduire le fer plus faible que l'acide ascorbique. Cependant, l'extrait aqueux de la partie aérienne de la plante représente un pouvoir réducteur de fer qui reste supérieur à celle de l'extrait méthanolique, les valeurs maximales de DO égales à 1.2 et 0.859 à une concentration de 0.77 et 0.67mg/ml respectivement.

L'extrait aqueux se caractérise par une forte activité antioxydante par rapport à l'extrait méthanolique. Nous remarquons aussi que le pouvoir réducteur obtenu par l'acide ascorbique est très puissant avec une DO de 2.427 par rapport aux deux autres extraits (méthanolique et aqueux) **figure N°36**.

*Conclusion et
perspectives*

Conclusion et perspective

Conclusion et perspectives :

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs usages thérapeutiques. Une étude des effets antioxydants concerne une plante qui appartient à la famille des Rhamnacees, employée en Algérie et connue pour ses propriétés thérapeutiques.

Dans ce contexte nous avons consacré notre travail en première partie à l'extraction de la partie aérienne de la plante, en utilisant deux solvants de polarités différentes (méthanol et l'eau distillée) et deux méthodes d'extraction à température ambiante et à chaud (sous reflux) pour évaluer l'effet de la méthode d'extraction. Nous avons obtenues quatre extraits distingués par leurs aspects et leurs couleurs dans chaque méthode ainsi une extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation a été effectuée.

Les résultats du rendement des extraits montrent que le rendement le plus élevé est celui donné par la technique d'extraction sous reflux 21.1% pour l'extrait aqueux, d'une manière générale, nous avons remarqué que le rendement de l'extraction change selon la technique d'extraction utilisée et la nature de solvant tandis que le rendement d'huile essentielle est faible.

De plus, un criblage phytochimique a été réalisé pour mettre en évidence les différents composés présents dans la plante. Les résultats obtenus indiquent la richesse de notre espèce en polyphénol principalement les tanins galliques, les flavonoïdes et les saponosides.

Enfin, nous avons évalué l'activité antioxydante des différents extraits de *R.alaternus* selon deux méthodes : le piégeage du radical libre DPPH et la réduction du fer. Les résultats de la méthode dite DPPH ont montré que tous les extraits de la plante présente une activité antioxydante dont EM correspond à la meilleure activité antioxydante avec une IC50 égale à 0.14mg/ml et un PI atteint 85.88% lorsque la concentration est de 0.3mg/ml, alors que l'activité antioxydante la plus faible enregistrée pour l'EA avec une IC50 égale à 0.537 mg/ml. Concernant l'huile essentielle, a montré un pouvoir antioxydant très faible égale à 2,32mg/ml avec une IC50 plus élevée par rapport à l'acide ascorbique (0,431 mg/ml) et donc cette activité absolument faible à celle de référence qui est l'acide ascorbique. Pour les résultats du FRAP, tous les extraits présentes une capacité de réduction du fer.

Conclusion et perspective

Comme perspective on peut présenter :

- Dosage des polyphénols.
- Réalisation des Tests *in vitro* de l'activité antioxydante par d'autres méthodes : Blanchiment du β -carotène, TRAP (Paramètre du piégeage du radical totale), la méthode d'hémolyse.
- Evaluation des activités biologiques dont l'activité antimicrobienne, antifongique.
- Etude de la toxicité de cette plante.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- Ait Youssef M., Plantes médicinales de Kabylies. *Edition Ibis Press*. ISBN: 978- 9961-57-259-7 Paris. 18. **2006**.
- Akerreta S., *Etnobotánicafarmacéutica en Navarra:delusotradicional de las plantas medicinales a su evidenciacientífica*(Ph.D.thesis). Faculty of Science, University of Navarra, p. 831, Pamplona, Spain. **2009**.
- Arif T., Bhosale JD., Kumar N., Mandal TK., Bendre RS., Lavekar S., Dabur R. Natural products- antifungal agents derived from plants. *J Asian Nat ProdRes*. 11, 7: 626-638.**2009**.
- Attou, A. Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Rutachalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent.**2011**.
- Bahorun, T. Substances naturelles actives : La flore mauricienne, une source
- Bas J.M., Oliveras J., Gomez C., Myrmecochory and short-term seed fate in *Rhamnusalaternus*: ant species and seed characteristics. *ActaOecologica*. 35: 380-384. **2009**.
- Bedou, F., Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius* L. et *Anvillea radiata* Coss. & Dur. Doctorat, Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. (**2015**).
- Belhadj,S. . Contribution à l'étude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de la plante médicinale *Sonchusoleraceus* L. (El-tifaf) Mémoire de master en biologie. Option:biochimie appliqué. Université AbouBekeBelkaid, Tlemcen.**2019**.
- Beloued A., *Les plantes médicinales d'Algérie*. Ben Aknoun, Alger: Ed. OPU, **2001**.
- Ben Ammar R., Bhourri W., Ben Sghaier M., Boubaker J., Skandrani I., Neffati A., Bouhleb I., Kilani S., Mariotte A.M., Chekir-Ghedira L., Dijoux-Franca M.G. etGhedira K., Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnusalaternus* L. (Rhamnaceae): a structure-activity relationship study. *Food Chem.*, 116: 258–264. **2009**.
- Ben Ammar R., Bouhleb I., Valenti K., Ben Sghaier M., Kilani S., Mariotte A-M, Dijoux-Franca M-G., Laporte F., Ghedira K. et Chekir-Ghedira L., Transcriptional response of genes involved in cell defense system in human cells stressed by H₂O₂ and pre- treated

with (Tunisian) *Rhamnus alaternus* extracts: Combination with polyphenolic compounds and classic in vitro assays. *Chemico-Biological Interactio.*, 168:171-183. **2007**.

- Ben Ammar R., Kilani S., Abdelwahed A., Hayder N., Mahmoud A., Chibani J., Chekir-Ghedira L. et Ghedira k., In vitro Mutagenicity, Antimutagenicity and free Radical scavenging Activities of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) Extracts. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8(3): 439-445. **2005**.
- Ben Ammar R., Kilani S., Bouhlel I., Ezzi L., Skandrani I., Boubaker J., Ben Sghaier M., Naffeti A., Mahmoud A., Chekir-Ghedira L. and Ghedira K., Antiproliferative, Antioxidant, and Antimutagenic Activities of Flavonoid-Enriched Extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L.: Combination with the Phytochemical Composition. *Drug, Chem. Toxicol.*, 31: 61-80. **2008**.
- Bensakhria, Ayoub. Toxicologie Générale - Le Stress Oxydatif. **2018**.
- Benzie, I.F., & Devaki, M. The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications. Measurement of antioxidant activity & capacity: recent trends and applications. Wiley, New York, pp. 77-106. **2018**.
- Boussahel, S., Dahamna, S., Ruberto, G., Siracusa, L., Harzallah, D., Phytochemical study and antioxidant activities of leaves extracts from *Rhamnus alaternus* L. *Pharmacognosy Communications* 3: 46-47. **2013**.
- Bruneton J., Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Editions TEC & DOC, 3ème édition, PP 783- 785. **1999**.
- Bruneton, J. Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 2ème édition. **1993**
- Bruneton J., Pharmacognosie : phytochimie, plantes medicinales. 4ème Ed Paris. **2009**
- Carrée, P. Précis de technologie et de chimie industrielle. Tome II. Ed. Ballière J. B. et fils. 432 pages. **1953**.
- Chaouche, T. Contribution à l'étude des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales. Thèse doctorat. Option : biochimie. Université Abou-bakr -belkaïd. **2013**.
- Chung Y., Chien C., Teng K. Chou T. Antioxydant and mutagenic properties of *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb and Zucc. *Food Chemistry*. 97 : 418-425. **2006**.
- Chwalek M., Lalun N., Bobichon H., Ple K., Voutquenne-Nazabadiokoet L., Structure-activity relationships of some hederagenindiglycosides: Haemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction. *Biochimica et Biophysica Acta* 1760 (2006) 1418-1427. plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology* 94. 219-243. **2006**.

- Cowan, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. MicrobiolRe*, 12
Crozier A., Chifford M.N., Ashihara H. Plant Secondary Metabolite: Occurrence, Structure and Role in the human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd. **2006**.
- Cu, J. Q. Extraction de compositions odorantes végétales par divers solvants organiques (Doctoral dissertation, Toulouse, INPT). **1990**.
- Das T K., Banerjee D., Chakraborty D., Pakhira M C, Shrivastava B, Kuhad R C., Saponin: Role in Animal system. *Vet. World*. 5(4): 248-254. **2012**
- Davies, K.J. Oxidative stress, antioxydants defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBM Life*, 50, 279-89. **2000**.
- Delattre J, Beaudoux, J.L., & Bonnefont-Rousselot, D. Radicaux Libres et Stress oxydant (Aspects Biologiques Et Pathologiques) Tac & Doc. **2005**.
- Desmier T. Les antioxydants de nos jours : définition et applications. Thèse de Doctorat en pharmacie. **2016**.
- Diallo A. Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* WILLD. (MYRTACEAE). Thèse de Doctorat en Pharmacie. Faculté de médecine, de pharmacie et d'Odonto-stomatologie de Bamako, Mali. **2005**.
- Dutertre J. M-J., Enquête prospective au sein de la population consultant dans les cabinets de médecine générale sur l'île de la Réunion : à propos des plantes médicinales, utilisation, effets, innocuité et lien avec le médecin généraliste. Thèse de doctorat. Université Bordeaux 2, France. **2011**.
- El Gharras, H. Polyphenols: Food sources, properties and applications-a review. *International Journal of food science & Technology*, 44(12), 2512-2518. **2009**
- Favier A., Le stress oxydant. Interêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Clinique*. 108-115. **2003**
- Garrel C, Bigard X. 7 Stress oxydatif et micronutriments antioxydants. *Nutr Sport* ; 151. **2017**.
- Gauché, E, Hausswirth, C Stress oxydant complémentation nutritionnelle en antioxydants et exercice. *Science & motricité Revue scientifique de l'Association des Chercheurs en Activités Physiques et Sportives*, EDP sciences, pp.43-66. **2006**.
- Ghedira, K., Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie* 3(4), 162-169. **2005**.
- Goudable, J, Favier, A. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme* pp.115-120. **1997**.

- Gulias J., Traveset A., Riera N. et Mus M., Critical Stages in the recruitment process of *Rhamnusalaternus*L. *Annals of Botany*, 93: 723-731. **2004.**
- Gutteridge J.M., Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence, *Free Radic Res Commun*, 19:141-158. **1993.**
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., Chapelle, J.P. Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège* 62 : 628-638. **2007.**
- Halliwell, B., How characterize a biological antioxidant, *Free. Rad Res. Comm.*,9,1-32.**1999.**
- Harkati, B. Valorisation et identification structural des principes actifs de la plante de la famille des Asteraceae : *Scorzoneraundulate*. Thèse de Doctorat. Université Mantouri de constantine. 128P.**2011.**
- Izhaki I., Tsahar E., Irena P. et Jacob F., Within population variation and interrelationships between morphology, nutritional content, and secondary compounds of *Rhamnusalaternus* fruits, *New Phytologist*, 156: 217-223. **2002.**
- Jouad, H., Maghrani, M., et Eddouks, M., Hypoglycaemic effect of *Rubusfruticosus* L. and *Globulariaalypum* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 81, 351-6. **2002.**
- *Journal of Royal Society of Chemistry*.18: 641-649. (Cited In DjemaiZoueglache S.**2008.**
- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P.E. et Donoghue M.J., *Plant Systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA. p 576. **2002.**
- Karumi Y., Onyeyili PA., Ogugbuaja VO., Identification of active principales of *M. balsamina* (Balsam apple) leaf extract. *J Med Scien* 2004; 4: 179- 182. **2004.**
- Khanbabae, K., and Ree T.V. Tannins:Classification And Defenition.**2001.**
- Khettal, B., Zaidi, A., Tacherfiout, M., et Sobhi, W., Effet des extraits de feuilles de *Rhamnus Altarnus* à activités antioxydant et antilipasique sur la masse corporelle et le métabolisme des lipides des souris nourries avec un régime enrichie en carbohydrates. *Nutrition clinique et metabolism*, 28 : S 149-150. **2011.**
- Kosalec, I., Kremer, D., Locatelli, M., Epifano, F., Genovese, S., Carlucci, G., Randić, M and ZovkoKonc'ic, M., Anthraquinone profile, antioxidant and antimicrobial activity of bark extracts of *Rhamnusalaternus*,*R. fallax*, *R. intermedia* and *R. pumila*. *Food Chemistry*, 136: 335–341.**2013.**

- Krief, S. Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pantroglodytes Schweinfurthi*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées (Doctoral dissertation, Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS).**2003.**
- Lesgards J.F., Contribution à l'étude du statut antioxydant de l'homme ; aspects chimiques et biochimique. Thèse de doctorat, 19-20. **2000.**
- Létard, J.C., Costil, V., & Dalbiès, P. Phytothérapie-principes généraux. HEGEL.**2015.**
- Macheix J.-J., Fleuriet F. et Jay-Allemand C., Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques, p 134. **2005.**
- Macheix j.-j .Les composés phénoliques des végétaux : quelles perspectives à la fin du XXème siècle?, *Acta Botanica Gallica*, 143:6, 473-479.**1996.**
- Majob F., Kamalinejab M., Ghaderi N., Vahidipour H.R., Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranien Journal of Pharmaceutical Research*. 77-82. **2003.**
- Mamadou A. O., Étude phytochimique et de l'activité antipaludique in vivo et in vitro de *Momordica balsamina* Linn. (Cucurbitaceae). Université de BAMAKO. Faculté de médecine, de pharmacie et d'odonto-stomatologie. 48-49-50. **2005.**
- Morot-Guadry J. F. Les végétaux, un nouveau pétrole ? Editions Quae.**2016.**
- Muanda, F. N. Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques (Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat, Université Paul Verlaine-Metz, 55-86.**2010.**
- Naczk, M. and Shaidi, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*. 1054 :095-111.**2004.**
- Oloyede, O.I., Chemical Profile of Unripe Pulp of *Carica papaya*. *Pakistan journal of nutrition*. 4: 379-381. **2005.**
- Ortuno A., Baidez A., Gomez, P., Arcas, M. C., Porras, I., Garcia-Lidon, A., Del Rio, J. A.. Citrus *paradisi* and citrus *sinensis* flavonoids.**2006.**
- Park, H. H., Lee, S., Son, H. Y., Park, S. B., Kim, M. S., Choi, E. J., Hyun, M. C. Flavonoids inhibit histamine release and expression of pro inflammatory cytokines in mast cells. *Archives of pharmacological research* .31, 1303-1311.**2008.**
- Percival S.L., *Microbiology of waterborne diseases*. Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press. p 480. **2004.**

- Popovici C., Saykova I. and Tylkowski B., Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel* 4 : 25-39. **2009**.
- Prior, R L., Wu, X., Schaich, K .Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Agric. Food Chem.*, 53, 4290-4302. **2005**.
- Rahmani, H .Contribution à l'étude phytochimique et valorisation de l'espèce *Agave americana L. dans l'Ouest Algérien*. Thèse de doctorat. Option : Gestion, Valorisation des Ressources Naturelles et Développement Durable. Université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbes. **2017**.
- Said O., Khalil, K., Fulder, S. et Azaizeh, H., Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the west bank region. *Journal of Ethnopharmacology*, 83: 251-265. **2002**.
- Sarni-Manchado, P., & Cheynier, V. Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec & Doc, Paris. 2-10 p. **2006**.
- Shankaranarayana J, Krishnakumar, Arunkanth ET Chellappan, Dinesh. Beta Carotene- Therapeutic Potential and Strategies to Enhance Its Bioavailability. **2018**.
- Sofowora A. Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Edition Karthala p. 22. **2010**.
- Sonia C. et Jean C. Polyphénols et procédés. LAVOISIER ; 336 p. **2011**.
- Spichiger R., Préface. In : Aeschimann, D., Lauber K., Moser D.M. et Theurillat J-P., *Flora alpina. Atlas des 4500 plantes vasculaires des Alpes*. 1 : 7-8. Belin, Paris. **2004**.
- Stocker P., Yousfi M., Djerridane O., Perrier J., Amziani R., El Boustani S., Moulin A., Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Biochimie*, 86: 919-925. **2004**.
- Vertuani, Silvia & Angusti, Angela & Manfredini, Stefano. The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview. *Current pharmaceutical design*. **2004**.
- Vincken J.P., Heng L., De Groot A., Gruppen H. Review Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* 68, 275–297. **2007**.
- Waston, R. R., Preedy, V. R . and Zibadi, S. Polyphenol in Human Health and Disease. *Edition Academic Press is an Imprint of Elsevier*. **2013**.
- Yi-ling C., Pan-Kai C., Ramnaceae. In: Chen Yin-ling, ed, *Fl. Reipubl. Popularissim*, 48 (1) : 1-169. **1982**.

Annexe

1. Test DPPH

- **Tableau 1 : Reflux aqueux**

Concentration (mg/ml)	0.3	0.24	0.14	0.0925
DO	0.140	0.129	0.391	0.40
% PI	80.52	82.05	45.61	26.28

- **Tableau 2 : Macération aqueux**

Concentration (mg/ml)	0.77	0.51	0.38	0.3
DO	0.211	0.446	0.512	0.619
% PI	74.11	45.28	37.17	24.05

- **Tableau 3 : Reflux méthanolique**

Concentration (mg/ml)	0.34	0.17	0.11	0.085	0.068
DO	0.340	0.591	0.733	0.723	0.828
% PI	60.14	30.36	14.06	15.24	2.93

- **Tableau 4 : Macération méthanolique**

Concentration (mg/ml)	0.33	0.26	0.089	0.067
DO	0.102	0.118	0.552	0.569
% PI	85.88	71.83	35	33

- **Tableau 5 : Huile essentielle**

Concentration (mg/ml)	0.43	0.28	0.14	0.093	0.07
DO après 1h 30min		0.777	0.944	0.973	1.043
% PI	50	34.15	20	17.54	11.61

- **Tableau 6: Acide ascorbique**

Concentration (mg/ml)	0.2	0.08	0.06	0.05	0.04	0.03
% PI	98.36	97.84	65.54	51.03	39.40	29.28

Annexe

2. Test FRAP

- **Tableau 7 : Reflux aqueux**

Concentration (mg/ml)	0.3	0.24	0.18	0.14
DO	0.659	0.436	0.321	0.183

- **Tableau 8 : Reflux méthanolique**

Concentration (mg/ml)	0.17	0.11	0.085	0.068
DO	0.397	0.243	0.166	0.138

- **Tableau 9 : Macération aqueux**

Concentration (mg/ml)	0.77	0.51	0.38	0.3
DO	1.23	0.871	0.68	0.483

- **Tableau 10 : Macération méthanolique**

Concentration (mg/ml)	0.67	0.44	0.33	0.26
DO	0.859	0.531	0.376	0.325

- **Tableau 11 : Acide ascorbique**

Concentration (mg/ml)	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	0.007	0.003
DO Essai 1	2.301	2.469	2.341	1.835	1.032	0.835	0.632	0.561	0.331
DO Essai 2	2.297	2.427	2.381	1.774	0.906	0.526	0.430	0.365	0.212

Annexe



Figure 01 : Lampe UV

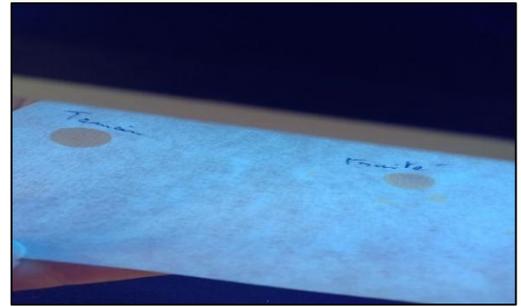


Figure 02 : Test coumarine

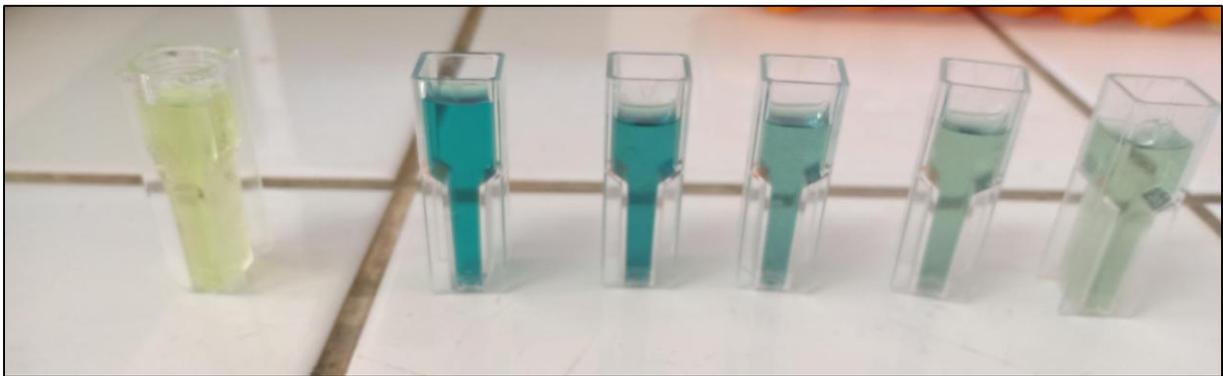


Figure 03 : Test FRAP



Figure 04 : Test phytochimique



Figure 05 : Rota vapeur

Résumé :

L'objectif de notre travail est l'étude phytochimique et l'activité antioxydante des extraits bruts de la partie aérienne de *Rhamnus alaternus* appelé Méliès appartenant à la famille des rhamnacées et utilisée dans la médecine traditionnelle.

Les extraits bruts qui ont été préparé par deux méthodes d'extraction la macération à froid, et la décoction sous reflux en utilisant deux solvants de différentes polarités à savoir l'eau et le méthanol. Ensuite l'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation donne un rendement faible de 0.1%.

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur les extraits bruts et révèlent la présence des flavonoïdes et des tannins.

L'activité antioxydante a été réalisée par deux méthodes le piégeage du radical libre et la réduction de fer FRAP qui ont montré que tous les extraits de la plante possèdent une activité antioxydante et une capacité réductrice de fer.

Mot clé : *R.alaternus*, activité antioxydante, DPPH, FRAP.

Summary :

The objective of our work is the phytochemical study and the antioxidant activity of crude extracts of the aerial part of *Rhamnus alaternus* called Méliès belonging to the rhamnaceae family and used in traditional medicine.

The crude extracts which were prepared by two extraction methods, cold maceration, and decoction under reflux using two solvents of different polarities namely water and methanol. Then the extraction of the essential oil by hydrodistillation gives a low yield of 0.1%.

The phytochemical tests were carried out on the crude extracts and reveal the presence of flavonoids and tannins.

Antioxidant activity was achieved by two methods - free radical scavenging and FRAP iron reduction which showed that all plant extracts possess antioxidant activity and iron reducing capacity.

Keyword : *R.alaternus*, antioxidant activity, DPPH, FRAP.

ملخص:

الهدف من عملنا هو الدراسة الكيميائية النباتية والنشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات الخام للجزء الجوي من *Rhamnus alaternus* المسمى Méliès الذي ينتمي إلى عائلة rhamnaceae والمستخدم في الطب التقليدي. المستخلصات الخام التي تم تحضيرها بطريقتين استخلاص، النقع البارد، وديكوتيون تحت التكتيف الراجع باستخدام مذيبات مختلفة القطبية هما الماء والميثانول. ثم ينتج عن استخراج الزيت العطري عن طريق التوسيع المائي عائداً منخفضاً يبلغ 0.1%.

أجريت الاختبارات الكيميائية النباتية على المستخلصات الخام وأظهرت وجود مركبات الفلافونويد والعفص. تم تحقيق النشاط المضاد للأكسدة من خلال طريقتين -إزالة الجذور الحرة وتقليل الحديد FRAP والتي أظهرت أن جميع المستخلصات النباتية تمتلك نشاطاً مضاداً للأكسدة وقدرة على تقليل الحديد.

الكلمة الرئيسية : *R.alaternus*, نشاط مضاد للأكسدة، DPPH ، FRAP