



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



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

Département de Biologie

*Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité
biologique*

MEMOIRE

Présenté par

Mlle KADI Akila

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En BIOCHIMIE APPLIQUEE

Thème

**Contribution à l'étude phytochimique et à l'étude
de l'activité antioxydante des extraits de
Haplophyllum tuberculatum de la région d'Adrar**

Le 02/11/2020

Encadreur	Dr BENARIBA N.	MCA	Université de Tlemcen
Examineur 1	Dr. BELKACEM N.	MCB	Université de Tlemcen
Examineur 2	Dr. MEDJDOUB H.	MCB	Université de Tlemcen

Année universitaire 2019/2020

REMERCIEMENT

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a dotés de la merveilleuse faculté de raisonnement, de m'avoir donnée la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

Tout d'abord je tiens à présenter ma profonde gratitude à ma promotrice **Dr. Benariba N.** Maître de Conférences Classe A au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen. Je la remercie d'avoir accepté de diriger ce travail avec une disponibilité permanente et d'avoir m'accorder sa confiance et son soutien, aussi pour son sérieux et sa gentillesse, clair voyant et pour avoir été un vrai modèle par ses qualités humaines. Veuillez bien recevoir Mademoiselle mes plus profonds **remerciements** et respects.

Je tiens à remercier **Dr. BELKACEM N.** maître de conférences B au département de Biologie à l'université de Tlemcen, de me faire honneur et d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier aussi, **Dr. MEJDOUB, H.** maître de conférences B au département de Biologie à l'université de Tlemcen, de me faire honneur et d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier, **M^{elle} ZAZOUA L, Mr FEROUANI M. et Mr HABI S,** ingénieurs de laboratoire pédagogie de biochimie au département de biologie, pour leur disponibilité et leur aide au cours de la réalisation de ce travail.

Mes sincère remerciement **M^{elle} FEKHIKHER Z. et M^{elle} BENRAMDANE H.,** doctorantes en biochimie pour leur aide et leurs précieux conseils

RÉSUMÉ

L'objectif de la présente étude porte sur une analyse phytochimique de l'extrait aqueux et eau-acétone et leurs fractions n-butanol et acétate d'éthyle de la partie aérienne *Haplophyllum tuberculatum* ainsi que l'évaluation de leur activité antioxydante en utilisant le test antiradicalaire sur le DPPH et le pouvoir réducteur du fer par la méthode du FRAP.

Les résultats du dosage des polyphénols et de flavonoïdes dans les extraits testés, révèlent des teneurs élevées en polyphénols et en flavonoïdes. L'extrait aqueux et sa fraction n-butanol présentent respectivement les teneurs les plus élevées en polyphénols, 224,01 et 206,79 µgEAG/mgE, et en flavonoïdes 185,25 µg EC/mgE. L'extrait eau-acétone et ces fractions n-butanol et acétate d'éthyle reffermes des teneurs élevées en polyphénols et en flavonoïdes, mais moyennement faibles par rapport à celle de l'extrait aqueux.

Concernant les résultats de l'activité antioxydante, nous avons constaté que les concentrations testées pour l'extrait aqueux ont révélé une très faible activité sur le DPPH et le FRAP avec des valeurs de IC₅₀ respectivement de l'ordre de 948,06 µg/mL et 445,60 µg/mL. Les contrôles utilisés ont présentés de faibles valeurs de IC₅₀ acide ascorbique (3,73 µg/mL) pour le DPPH et le BHA (96,15 µg/mL) pour le FRAP.

A la lumière des résultats obtenus, nous avons constaté que les extraits de *Haplophyllum tuberculatum* sont riches en composés phénolique et en flavonoïdes en particulier l'extrait aqueux et sa fraction n-butanol. Cette richesse en composés phénolique n'a pas attribué à la plante une forte activité antioxydante, ce qui explique l'importance d'autres composants chimiques, sachant que cette plante est riche en alcaloïdes, et qui peuvent à *H. tuberculatum* d'autres propriétés biologiques.

Mots-clés : *Haplophyllum tuberculatum*, polyphénols totaux, flavonoïdes totaux, DPPH, FRAP.

ABSTRACT

The aims of the present study relates to a phytochemical analysis of the aqueous and hydro-acetone extracts and their fractions n-butanol and ethyl acetate obtained from the aerial part of *Haplophyllum tuberculatum*, as well as the evaluation of their antioxidant activity using the free radical scavenging activity on the DPPH and the reducing power of iron by the FRAP method.

The results of polyphenols and flavonoids content in the tested extracts revealed a high levels of these components. The aqueous extract and its n-butanol fraction have the highest levels of polyphenols, 224.01 and 206.79 $\mu\text{gEAG} / \text{mgE}$, and flavonoids 185.25 $\mu\text{g EC} / \text{mgE}$, respectively. The hydro-acetone extract and their n-butanol and ethyl acetate fractions contain high levels of polyphenols and flavonoids, which remain moderately low compared to that of the aqueous extract.

Regarding the results of the antioxidant activity, we found that the concentrations tested for the aqueous extract revealed a very low activity on DPPH and FRAP with IC50 values in the order of 948.06 and 445,60 $\mu\text{g/mL}$ respectively. The controls used showed low IC50 values, ascorbic acid (3.73 $\mu\text{g/mL}$) for the DPPH, and BHA (96.15 $\mu\text{g/mL}$) for the FRAP method.

In the light of the obtained results, we have seen that the extracts of *Haplophyllum tuberculatum* are rich in phenolic compounds and in flavonoids, especially the aqueous extract and its n-butanol fraction. This richness in phenolic compounds has not attributed to the plant a strong antioxidant activity, which explains the importance of other chemical components, knowing that this plant is rich in alkaloids, and which can give to *H. tuberculatum* other biological properties.

Keywords: *Haplophyllum tuberculatum*, total polyphenols, total flavonoids, DPPH, FRAP.

ملخص

تتعلق أهداف الدراسة الحالية بتحليل كيميائي نباتي لمستخلصات الأستيون المائي والهيدروكسيتون وجزئياتها n- بيوتانول وخلات الإيثيل التي تم الحصول عليها من الجزء الجوي من *Haplophyllum tuberculatum* ، وكذلك تقييم نشاطها المضاد للأكسدة باستخدام الجذور الحرة نشاط الكسح على DPPH وتقليل قوة الحديد بطريقة FRAP.

أظهرت نتائج محتوى البوليفينول والفلافونويد في المستخلصات المختبرة وجود مستويات عالية من هذه المكونات. يحتوي المستخلص المائي وجزئه n- بيوتانول على أعلى مستويات من البوليفينول ، 224.01 و 206.79 ميكروغرام / EAG ملغ ، وفلافونويد 185.25 ميكروغرام / mgE / EC ، على التوالي. يحتوي مستخلص الهيدرو أسيون وجزئياتها من البوتانول وخلات الإيثيل على مستويات عالية من البوليفينول والفلافونويدات ، والتي تظل منخفضة بشكل معتدل مقارنةً بالمستخلص المائي.

فيما يتعلق بنتائج نشاط مضادات الأكسدة ، وجدنا أن التراكيز المختبرة للمستخلص المائي كشفت عن نشاط منخفض جدًا على DPPH و FRAP بقيم IC50 بترتيب 948.06 و 445،60 ميكروغرام / مل على التوالي. أظهرت الضوابط المستخدمة قيم IC50 منخفضة ، وحمض الأسكوربيك (3.73 ميكروغرام / مل) لـ DPPH ، و BHA (96.15 ميكروغرام / مل) لطريقة FRAP.

في ضوء النتائج التي تم الحصول عليها ، رأينا أن مستخلصات *Haplophyllum tuberculatum* غنية بالمركبات الفينولية والفلافونويد ، خاصة المستخلص المائي وجزء n- بيوتانول. هذا الثراء في المركبات الفينولية لم ينسب للنبات نشاطًا قويًا مضادًا للأكسدة ، وهو ما يفسر أهمية المكونات الكيميائية الأخرى ، مع العلم أن هذا النبات غني بالقلويدات ، والتي يمكن أن تعطي للنبات السل خصائص بيولوجية أخرى.

الكلمات المفتاحية: *Haplophyllum tuberculatum* ، مجموع البوليفينول ، إجمالي الفلافونويد ، DPPH ، FRAP.

LISTE DES FIGURES

Figure n°01 : Les espèces réactives de l'oxygène, origine et système antioxydant cellulaire.....	4
Figure n°02 : Structures chimiques de quelques terpènes	5
Figure n°03: Structure chimique des alcaloïdes vrais (a), pseudo-alcaloïdes (b), proto-alcaloïdes (c).....	6
Figure n°04: <i>Haplophyllum tuberculatum</i> (Forsk.) A. Juss.....	7
Figure n°05: Structure chimique de certains alcaloïdes isolés de <i>Haplophyllum tuberculatum</i>	8
Figure n°06: Photos de <i>Haplophyllum tuberculatum</i> (région d'Adrar).....	10
Figure n°07: Montage de l'extraction par décoction sous reflux de la partie aérienne <i>H. tuberculatum</i>	12
Figure n°08: Montage de l'extraction liquide- liquide des extraits bruts de <i>H. tuberculatum</i>	13
Figure n°09: La réduction du DPPH par un antioxydant.....	16
Figure n°10: Courbe étalon de l'acide gallique.....	21
Figure n°11: Courbe étalon de la catéchine	21

LISTE DES TABLEAUX

Tableau n°01 : Principales espèces réactives oxygénées	2
Tableau n°02 : Activités biologiques des composés phénoliques.	5
Tableau n°04 : Exemples de quelques plantes qui ont une activité antiradicalaire sur le DPPH.	7
Tableau n°05: Composition chimique des huiles essentielles de <i>Haplophyllum tuberculatum</i>	7
Tableau n°6 : Mode opératoire du dosage de polyphénols.....	14
Tableau n°07: Mode opératoire du dosage de flavonoïdes totaux dans les extraits de <i>H. tuberculatum</i>	16
Tableau n°07: Mode opératoire du dosage de la mesure de l'activité antiradicalaire sur le DPPH.....	17
Tableau n°08: Mode opératoire de la méthode du FRAP.....	18
Tableau n°09: Caractéristiques des extraits de <i>H. tuberculatum</i>	20

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	2
MATÉRIEL ET MÉTHODE	11
1. Matériel végétal.....	11
2. Préparation des extraits	12
2.1 Extrait aqueux	12
2.2 Extraits eau-acétone	12
2.3 Préparation des fractions n-butanol et acétate d'éthyle	13
2.4 Calcul du rendement	23
3. Dosage de polyphénols et de flavonoïdes totaux dans les extraits de <i>Centaurea penguins</i> et de <i>Pinus halepensis</i>	13
3.1 Dosages de polyphénols totaux	14
3.2 Dosage de flavonoïdes totaux	15
4. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de <i>Haplophyllum tuberculatum</i>	16
4.1 Test de piégeage du radical libre DPPH	16
4.2 Test du pouvoir réducteur du Fer (FRAP : <i>Ferric reducing antioxidant power</i>)	17
RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS.....	20
1. Rendements des extraits de <i>Centaurea penguins</i>	20
2. Taux de polyphénols et flavonoïdes totaux dans les extraits de <i>Haplophyllum tuberculatum</i>	20
3. Effet de l'extrait aqueux de <i>H. tuberculatum</i> sur le piégeage du radical libre le DPPH ..	22
4. Effet de l'extrait eau-méthanol sur la réduction du fer FRAP	22
DISCUSSION	25
CONCLUSION	29
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	30



Les plantes médicinales constituent une source inépuisable de produits naturels caractérisés par leur diversité structurale et leurs vertus thérapeutiques, ces composés isolés de la médecine traditionnelle constituent le principe actif de nombreux médicaments pour le traitement de nombreuses maladies, tels que les maladies cardiovasculaires, le diabète sucré, le stress oxydant... (**Oubre et al., 1997, Pan et al., 2009**). De nos jours, plus de 50% des médicaments sont d'origine végétale, selon l'OMS, chez 80% de la population mondiale les médicaments développés principalement des plantes constituent la principale source des soins de santé (**Sewell et Rafieian-Kopaei, 2014, Jamshidi-Kia et al, 2018**).

Le stress oxydant, par définition, est un déséquilibre entre les antioxydants et les prooxydants (espèces réactives de l'oxygène) en faveur de ces derniers. La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux (**Favier, 2003**).

Le recherche de nouveaux médicaments plus efficaces, moins toxiques et moins couteux a attiré l'intérêt de la recherche scientifique dans le domaine pharmaceutique, et appliquer sur l'exploitation des plantes médicinales comme source de nouveaux principes actifs d'origine végétale. Les espèces végétales constituent une source inépuisable en molécules antioxydantes qui s'avèrent plus efficaces et moins toxiques (**Leeuwenburgh et Heinecke, 2001**).

L'objectif principal des recherches actuelles se résume à l'évaluation des activités biologiques des extraits de plantes médicinales endémiques ou locales, utilisées en médecine traditionnelle, afin de mettre en évidence leurs effets thérapeutiques. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés dans notre étude à l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Haplophyllum tuberculatum* récoltée dans la région d'Adrar.

Notre approche expérimentale consiste à déterminer la teneur en composés phénoliques dans les extraits de la partie aérienne de *H. tuberculatum* et à évaluer le pouvoir antioxydant de quelques extraits par la méthode de piégeage du radical libre DPPH et la méthode du FRAP.



Bibliographie



Le stress oxydatif est un déséquilibre profond de la balance pro-oxydant/antioxydant, associé à une production exagérée des agents oxydants et des radicaux libres non neutralisés. Ce qui provoque une altération des mécanismes de défense, et par conséquent l'incapacité de l'organisme à se défendre contre les agressions des pro-oxydants via un système antioxydant (Sies *et al.*, 2017). Il résulte d'un dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale, d'une activation des systèmes enzymatiques, d'une libération de fer libre à partir des protéines chélatrices ou d'une oxydation de certaines molécules comme le glucose et surtout d'une mauvaise alimentation pauvre en antioxydants (Pincemail *et al.*, 2002).

Les pro-oxydants majeurs qui sont à l'origine du stress oxydatif sont les radicaux libres. Définis comme des molécules chimiques qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe. Cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique (koechlin., 2006, Couaillet, 2015). Les radicaux libres, appelés également les espèces réactives oxygénées regroupent des formes radicalaires et non radicalaires (Tableau n°01).

Tableau n°01 : Principales espèces réactives oxygénées (Sies , 1996)

Espèces réactives oxygénées (ERO)	
Formes radicalaires	Formes non radicalaires
$\cdot\text{OH}$ Radical hydroxyle	H_2O_2 Peroxyde d'hydrogène
$\text{RO}\cdot$ Radical alkoxy	ROOH Peroxyde organique
$\text{ROO}\cdot$ Radical peroxy	HOCl Acide hypochloreux
$\text{O}_2^{\cdot -}$ Anion superoxyde	1O_2 Oxygène singulet
$\text{NO}\cdot$ Radical oxynitrique	ONOO^- Peroxynitrite

La production des radicaux libres peut avoir deux origines, exogène et endogène. La source endogène est représentée par la respiration mitochondriale dont la fuite des électrons, environ 0,4 à 4% réagit directement avec l'oxygène dissout dans le cytoplasme et donne naissance aux espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont anions superoxydes ($\text{O}_2^{\cdot -}$), ceux-ci conduisent, par la suite, à la production d'autres ERO comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (1O_2), le radical hydroxyle (OH°), l'acide hypochloreux, des dérivés nitrés (Haleng *et al.*, 2007). La source exogène est liée à une mauvaise hygiène de vie, à l'exposition excessive

aux radiations ionisantes (rayon X), la lumière UV, le tabac, les polluants photochimiques, et aussi certains médicaments toxiques (**Birben et al., 2012**).

Les espèces oxygénées réactives sont la conséquence inévitable de la consommation de l'oxygène moléculaire par l'organisme, leur production est permanente et physiologique (**Koechlin., 2006**). A l'état physiologique, les radicaux libres sont des modulateurs des voies de transduction du signal et de l'expression des gènes qui participent à l'homéostasie vasculaire. L'équilibre entre la production de ces espèces réactives et leur neutralisation est lié à la présence de nombreux systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (**Beaudeau et al., 2006**).

Pour se protéger des radicaux libres, l'organisme développe des mécanismes de détoxification contre les dommages oxydatifs, il s'agit des antioxydants qui peuvent ralentir ou empêcher l'oxydation des biomolécules en neutralisant les radicaux libres ou en empêchant l'accumulation des biomolécules oxydées et leurs fragments toxiques, ils agissent autant que piègeurs des radicaux libres, donneurs des électrons ou protons, inhibiteurs d'enzymes, ou comme agents chélateurs (**Karou et al., 2005, Lobo et al., 2010**).

L'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydants répartie en deux sources d'antioxydants ; l'une est exogène apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque; l'autre est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes (**Haleng et al., 2007**). **La figure n°01** résume tout ce qui est en relation avec le stress oxydatif, la source des radicaux libres, leur origine, leur rôles physiologique et pathologiques ainsi que les antioxydants enzymatiques et non enzymatique (**Petropoulos I, 2011**).

Les antioxydants peuvent également être issus du monde végétal. Plusieurs plantes possèdent des métabolites secondaires qui sont utilisés comme antioxydants naturels. Les antioxydants naturels sont moins toxiques et bien acceptés par l'organisme que les antioxydants de synthèse. En effet, ces substances naturelles trouvent leur application dans plusieurs domaines, surtout dans les industries pharmaceutique et alimentaire (**Marc et al., 2004 ; Hartmann, 2007**).

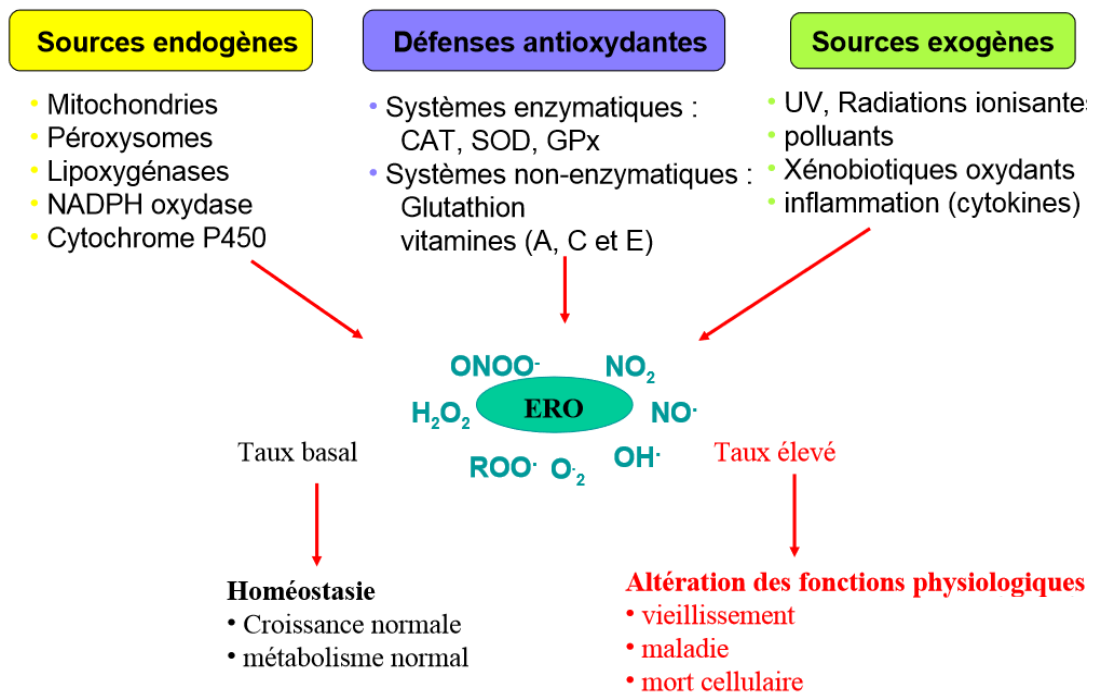


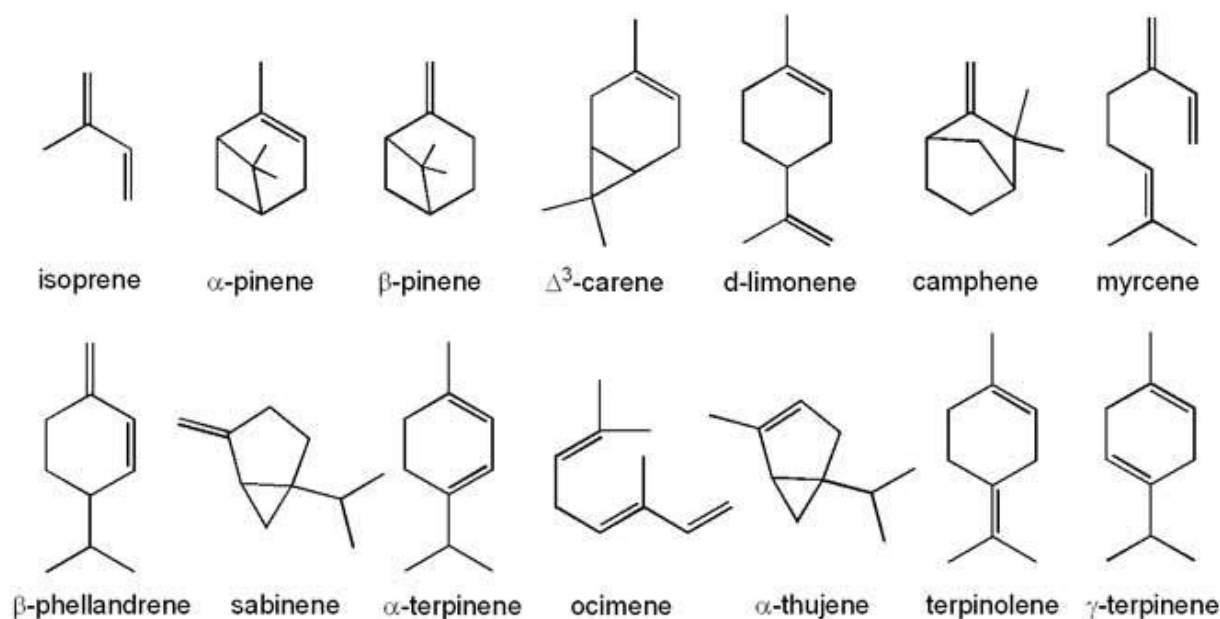
Figure n°01 : Les espèces réactives de l'oxygène, origine et système antioxydant cellulaire (Petropoulos, I. 2011).

Les métabolites secondaires constituent le principe actif de nombreux médicaments, antibiotiques, inhibiteurs enzymatiques, immuno-modulateurs, agents anti-tumoraux, ils sont divisés en trois grandes familles : les polyphénols, les terpénoïdes, et les alcaloïdes. Les polyphénols, caractérisés par la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles OH, ils sont représentés majoritairement par les flavonoïdes, les tannins, les acides phénoliques et stilbènes, qui suscitent un grand intérêt scientifique actuellement car ils sont considérés comme de puissant antioxydant, anti-inflammatoire, antidiabétique, anticancéreux... (Tableau n°02).

Les terpénoïdes sont formés par l'assemblage d'un nombre entier des unités isopréniques (C₅H₈)_n, ils sont classés dans les catégories suivantes selon le nombre d'unités condensées (Figure n°02) : les hémiterpénoïdes (C₅), monoterpénoïdes (C₁₀), sesquiterpénoïdes (C₁₅), diterpénoïdes (C₂₀), triterpénoïdes (C₃₀), tétraterpénoïdes (C₄₀) ou les polyterpénoïdes (nombre de carbones supérieur à C₄₀). Ces composés sont caractérisés par leur propriété antioxydante, anti-tumorale, anti-inflammatoire et analgésique (Krief, 2003).

Tableau n°02 : Activités biologiques des composés phénoliques (Bahorun, 1998).

Polyphénols	Activités
Acides phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes Antifongiques Antioxydantes
Coumarines	Protectrices vasculaires et anti-oedémateuses
Flavonoïdes	Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydantes
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène Antioxydantes Antitumorales Antifongiques Anti-inflammatoires
Tanins galliques et catéchiques	Antioxydantes

**Figure n°02 : Structures chimiques de quelques terpènes (Wilbon *et al.*, 2013).**

En ce qui concerne les alcaloïdes, qui figurent parmi les principes actifs les plus importants en pharmacologie et en médecine, sont des substances organiques azotées à propriétés basiques ou amers et ayant des propriétés thérapeutiques ou toxiques, ils sont répartis en trois types alcaloïdes vrais, pseudo-alcaloïdes et proto-alcaloïdes (**Figure n°03**). Les alcaloïdes sont

beaucoup plus utilisées comme anti-cancéreux, sédatifs et pour leur effet sur les troubles nerveux (Bruneton, 1999, Iserin *et al.*, 2001, Delille, 2007).

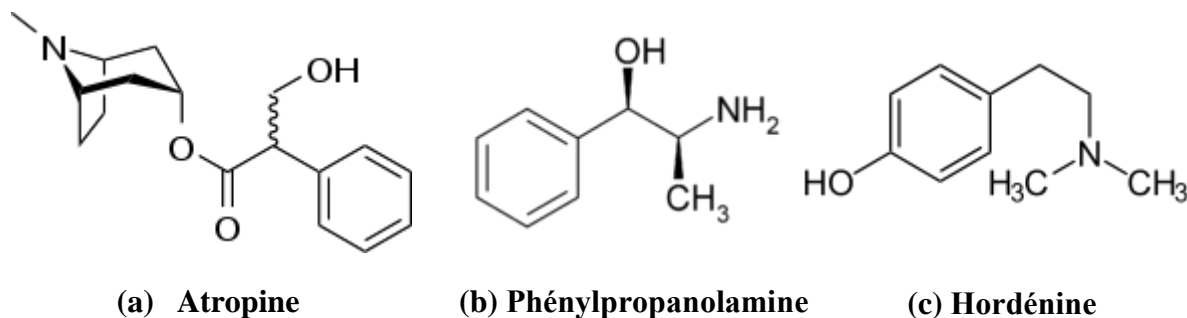


Figure n°3: Structure chimique des alcaloïdes vrais (a), pseudo-alcaloïdes (b), proto-alcaloïdes (c)

Au cours de ces dernières décennies, plusieurs recherches scientifiques ont été accordées et effectuées sur les plantes médicinales pour mettre en évidence leur effet des antioxydants et leur effet préventif contre plusieurs maladies tel que le diabète, les maladies cardiovasculaire, les maladies neurodégénératives, et même pour certaines type du cancer. **Le tableau n°03** résume les résultats de certains travaux scientifiques sur les plantes à activités antioxydantes en particulier le pouvoir antiradicalaire sur le DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl).

Actuellement, plusieurs plantes médicinales sont utilisées pour le traitement de diverses pathologies. L'Algérie quant à elle, connue par sa biodiversité végétale et son écosystème, est riche en espèce à visé thérapeutique. Dans le but d'étudier les propriétés biologiques ainsi que la phytochimie de quelques plantes médicinales Algériennes nous nous sommes intéressés à l'étude de la plante *Haplophyllum tuberculatum* récoltée dans la région de Adrar.

Haplophyllum tuberculatum (Forsk.) A. Juss. appartient à la famille des Rutaceae et au genre Haplophyllum. C'est une plante originaire de la région méditerranéenne et qui est largement ré pondue dans de nombreux régions du monde (Sud-ouest de l'Asie, Sud de l'Europe, Afrique du nord), en particulier dans les régions tempérées et tropicaux. En Algérie, cette espèce spontanée est très abondante, elle pousse spontanément dans les rocailles, les pelouses, les rochers et les collines sèches, et dans les zones montagneuses à l'intérieur de l'Atlas saharien et les terrains calcaires des régions méditerranéennes (Spiga Narjes 2016).

Tableau n°03 : Exemples de quelques plantes qui ont une activité antiradicalaire sur le DPPH
(Bentrar f. 2018)

Espèces	La partie utilisée	Effet antioxydant (réduction du DPPH)	Références
<i>Disthemonanthus benthamianus</i> (Leguminosae)	feuille	IC ₅₀ = 4,50µg/ml	Bidie et al, 2011
<i>Conocarpus erectus</i> (Combretaceae)	fruit	IC ₅₀ = 4µg/ml	El-Sayed et al, 2012
<i>Portulaca oleracea</i> (Portulacaceae)	Plante complète	IC ₅₀ = 12.67µg/ml	Sanja et al, 2009
<i>Pistacia atlantica</i> (Anacardiaceae)	feuille	IC ₅₀ = 2.90µg/ml	Rached, 2009
<i>Punica granatum</i> (Punicaceae)	écorce	IC ₅₀ = 0.094mg/ml	Ricci et al, 2006

H. tuberculatum anciennement appelée *Ruta tuberculatum* porte le nom vernaculaire français est « la rue du désert » et « le Masaka » ou « Fidjel » en arabe. C'est une plante herbacée vivace, parfois ligneuse à la base, atteignant 40 à 60 cm de haut, glabre ou à poils courts; tige habituellement très ramifiée depuis la base. Les Feuilles sont alternes et fortement odorantes, lobés ou parfois profondément découpés en 3 lobes. Les fleurs sont glabres, nombreuses et bien séparées, de couleur jaune vif (**Figure n°04**). Le fruit est sous forme de capsule de 3 à 5-lobes, contenant 5 à 10 graines réniformes, d'environ 1,5 mm de long, de couleur brun foncée à gris ou noir-brunâtre, densément sillonnées (**Schmelzer et Gurib-Fakim 2013**).



Figure n°04: *Haplophyllum tuberculatum* (Forsk.) A. Juss

En médecine traditionnelle *H. tuberculatum* est largement utilisée pour le traitement de diverses maladies. Les branches portant les fleurs et les fruits sont utilisées contre la fièvre dans la médecine traditionnelle égyptienne et comme antipoison local, contre les nausées et le vomissement, ils sont également utilisés comme contraceptif, contre la malaria, l'anémie, le rhumatisme, les douleurs de l'estomac, les parasites intestinaux et les problèmes oculaires et auriculaires. Tandis qu'au soudan et en Arabie saoudite la plante est utilisée comme

antispasmodique, dans le traitement des rhinites allergiques les problèmes respiratoires et gynécologiques montrant ainsi un très grand degré de variabilité dans ses usages traditionnels (Raissi *et al.*, 2016, Spiga Narjes 2016).

En Algérie une enquête ethnobotanique a révélé l'usage de cette espèce dans la pharmacopée traditionnelle de la région de Ourgla pour le traitement de plusieurs maladies, elle est utilisée comme antiseptique, dans les blessures et les ulcères, comme un calmant, un hypnotique neurologique, dans le traitement de la stérilité, le diabète, les ballonnements, la fièvre, les maladies du foie, les otites, rhumatisme, l'obésité, la constipation, l'hypertension artérielle, les maladies cardiaque, les piques des scorpions, la grippe, le vomissement, l'inflammation de la gorge... *H. tuberculatum* s'avère l'espèce médicinale la plus utilisée dans les soins du système nerveux, avec une fréquence de citation de 38.81% (Hadjadj, 2017).

La composition chimique de *H. tuberculatum* est diversifiée, dont la partie aérienne contient une gamme d'alcaloïdes quinoliniques, la skimmianine, haplophytine A, haplophytine B, flindersine, haplotubine, haplotubinone, et la kusunokinine (Figure n°05). Elle contient également du cholestérol, l'acide linoléique, l'acide palmitique, et la diphylline (un lignane), les méthoxyflavones, les flavonoles comme la quercétin et ces dérivés, l'acide cinnamique et l'acide benzoïque (Ali *et al.*, 2001; Eissa *et al.*, 2014 ; Schmelzer et Gurib-Fakim, 2013 ; Raissi *et al.*, 2016).

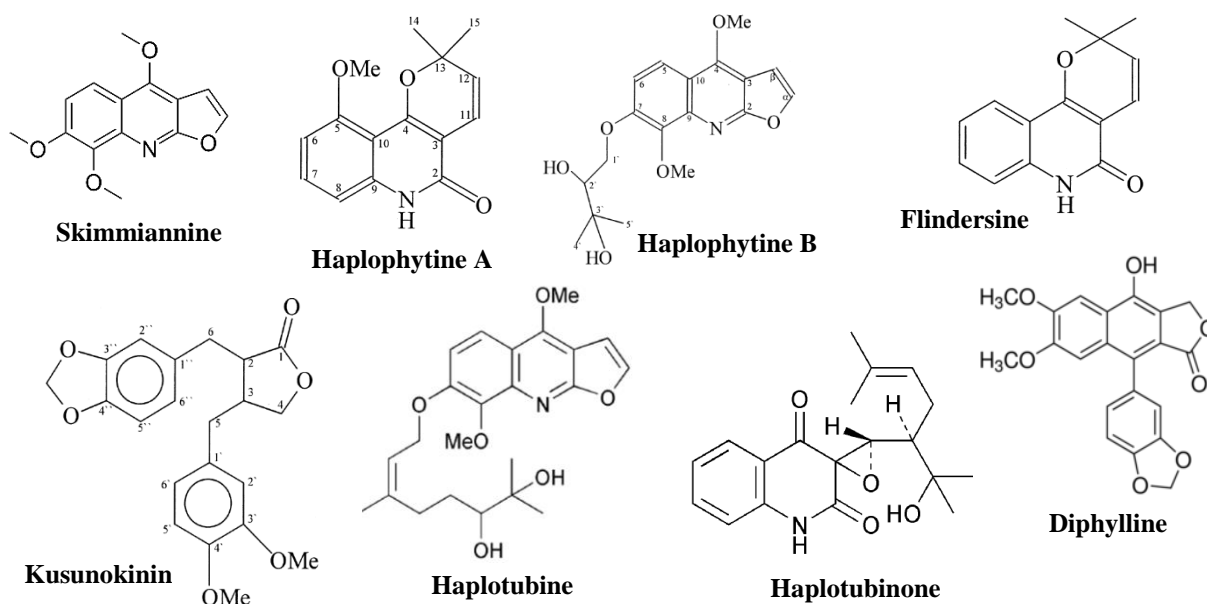


Figure n°05: Structure chimique de certains alcaloïdes isolés de *Haplophyllum tuberculatum* (Forsk.)
A. Juss (Ali *et al.*, 2001; Raissi *et al.*, 2016)

Les huiles essentielles obtenus à partir de *Haplophyllum tuberculatum* contiennent principalement des monoterpènes (77,8%), des sesquiterpènes (13,8%) et des hydrocarbures et ont une forte odeur de citron le tableau ci-dessous résume la composition chimiques des huilles essentielles de cette plante (**Hadjadj , 2017 ; Al-Rehaily et al , 2014**).

Tableau 04 : Composition chimique des huilles essentielles de *Haplophyllum tuberculatum* (**Al-Rehaily et al., 2014**)

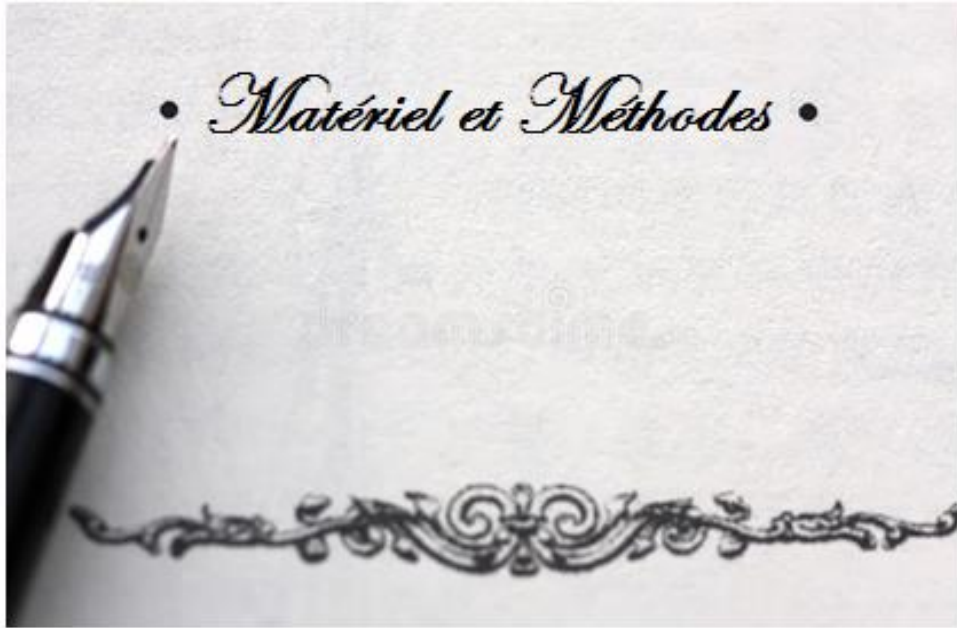
RRI	Compound	(%)
1014	Tricyclene	tr
1032	α -Pinene	2.4
1048	2-Methyl-3-buten-2-ol	0.7
1076	Camphene	0.6
1118	β -Pinene	2.3
1132	Sabinene	1.3
1146	δ -2-Carene	0.1
1159	δ -3-Carene	8.8
1174	Myrcene	10.1
1176	α -Phellandrene	3.7
1188	α -Terpinene	0.7
1195	Dehydro-1,8-cineole	0.3
1203	Limonene	6.6
1218	β -Phellandrene	6.9
1246	(Z)- β -Ocimene	0.3
1255	γ -Terpinene	0.1
1266	(E)- β -Ocimene	0.4
1280	p-Cymene	0.3
1286	Isoterpinolene	0.2
1290	Terpinolene	0.7
1327	3-Methyl-2-butenol	0.4
1391	(Z)-3-Hexenol	0.1
1483	Octyl acetate	0.4
1553	Linalool	0.7
1562	Octanol	0.1
1571	<i>trans</i> -p-Menth-2-en-1-ol	19.2
1588	Bornyl formate	0.1
1591	Bornyl acetate	0.5
1611	Terpinen-4-ol	0.3
1626	2-Methyl-6-methylene-3,7-octadien-2-ol	0.1
1638	<i>cis</i> -p-Menth-2-en-1-ol	13.2
1689	<i>trans</i> -Piperitol	4.0
1706	α -Terpineol	0.3
1748	Piperitone	4.1
1758	<i>cis</i> -Piperitol	6.4
2103	Guaiol	0.1
2622	Phytol	0.1
	Total	96.4

RRI: Indice de rétention relative calculé contre *n*-alkanes

Dans la littérature plusieurs travaux scientifiques ont révélés une variété d'activités biologiques de *Haplophyllum tuberculatum* liées à sa composition chimique diversifiée.

Les extraits de *H. tuberculatum* montrent une toxicité sur sept lignées de cellules cancéreuses avec une importante valeur d'IC₅₀ de 31,64 µg/mL sur la lignée Hep-G2, cette espèce provoque une inhibition du cycle cellulaire en phase G₀/G₁ et en phase S (**Raissi et al., 2016**). Le 6-Methoxykaempferol-3-O-glucoside isolé de *Haplophyllum tuberculatum* a été déterminé comme puissant relaxant des contractions du muscle de l'utérus. La buchapine, un alcaloïde quinolone, isolé à partir de l'extrait méthanolique présente un effet anti-HIV sur des lymphoblastes de l'humain et les souches CEM-SS en présentant des valeurs de EC₅₀ de 0,94 µM, et IC₅₀ de 29 µM, respectivement. Quatre amides isolés de cette plante, il s'agit de veskamide, enferamide, becatamide, et oretamide, ont révélé leur potentiel contre l'effet apoptotique induit par le H₂O₂ sur les cellules PC-12 en culture (**Raissi et al., 2016**). Certains travaux scientifiques ont démontré un effet antifongique des huiles essentielles des sur *Candida krusei* à 30 µg/mL et 70 µg/mL (**Hamdi et al., 2017**).

• *Matériel et Méthodes* •



La partie expérimentale de la présente étude a été réalisée au niveau du laboratoire de biochimie au département de biologie, Faculté SNV-STU à l'université de Tlemcen. Le plan expérimental de cette étude s'est déroulé comme suit :

- Une étude phytochimique qui porte sur une préparation des extraits à partir de la partie aérienne de *Haplophyllum tuberculatum*, ainsi que le dosage de polyphénols et de flavonoïdes totaux.
- Une étude biologique, qui porte sur l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante en utilisant le test du DPPH et du FRAP.

1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé au cours de cette étude est la partie aérienne (feuilles et tiges) d'*Haplophyllum tuberculatum* (**figure n°06**) récoltée durant le mois de Janvier et Février 2020 dans la région de « Ouwlahe Ahmed et Zaglo » à la wilaya d'Adrar. La plante a été identifiée par Dr. Baba Ali Ibrahim, au laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen (Algérie).

Au laboratoire, à l'abri de lumière et à température ambiante, le matériel végétal récolté est séché, pendant quelques jours pour obtenir une meilleure extraction et préserver au maximum l'intégrité des molécules. L'échantillon est finement découpé (déchiqueté) en petites morceaux et conservé à température ambiante jusqu'au jour de la préparation des extraits.



Figure n°06: Photos de *Haplophyllum tuberculatum* (sur le champ de la récolte, région d'Adrar)

2- Préparation des extraits

Au cours de cette étude nous avons préparé à partir de la partie aérienne d'*Haplophyllum tuberculatum* deux extraits, un extrait aqueux et un extrait eau-acétone et leurs fractions organiques, n-butanol et acétate d'éthyle.

L'extraction chimique est un phénomène physique très important, qui a pour but d'extraire, de séparer et de dissoudre les composants chimiques. C'est une opération de transfert ou d'échange de matière entre une phase solide, qui contient la matière à extraire et une phase liquide, le solvant d'extraction.

2.1. Extrait aqueux

50g de la matière végétale est mélangée avec 450ml d'eau distillée dans un ballon est soumis à une extraction par décoction sous reflux pendant 30min. Après extraction et refroidissement de l'extrait obtenu, la solution est filtrée puis centrifugée pendant 5 min à 3000 tours. L'évaporation à sec du surnageant a été réalisé par séchage dans une étuve à 40,5°C quelque jours et à la fin récupérer de l'extrait sous forme d'une poudre.

2.2. Extrait eau-acétone

50g de la matière végétale est mélangé avec 500 ml d'un mélange du solvant eau/acétone (30:70 ; v/v) puis porté à une extraction par décoction sous reflux pendant 30min et sous agitation (**Figure n°07**). Après filtration et centrifugation l'extrait hydro-organique récupéré a été concentré au rotavapeur, puis évaporé dans une étuve à 35 °C pendant quelques jours.



Figure n°07 : Montage de l'extraction par décoction sous reflux de la partie aérienne *H. tuberculatum*

2.3. Préparation des fractions n-butanol et acétate d'éthyle

Les fractions acétate d'éthyle (**F AcEt**) et n- butanol (**F n-BuOH**) de *H. tuberculatum* sont obtenues par extraction liquide/liquide de l'extrait brut eau-acétone et l'extrait aqueux (**Figure n°08**), préparés précédemment, en utilisant trois fois l'acétate d'éthyle (v/v). La phase aqueuse récupérée, est par la suite fractionnée trois fois avec du n-butanol (v/v). Après fractionnement, les phases organiques sont évaporées à sec et les fractions sont récupérées sous forme solide de couleur verte foncée.



Figure n°08 : Montage de l'extraction liquide- liquide des extraits bruts de *H.tuberculatum*

2.4. Calcule du rendement

Le rendement de chaque extrait préparé exprimé en pourcentage (%) est calculé selon la formule suivante :

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

R(%) : Rendement exprimé en %

M : Masse en gramme de l'extrait sec résultant

M₀ : Masse en gramme du matériel végétal utilisé

3. Dosage de polyphénols et de flavonoïdes totaux dans les extraits de *Haplophyllum tuberculatum*

L'objectif de ce dosage est la détermination de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux dans les extraits préparés.

3.1. Dosages de polyphénols totaux

Principe

Le dosage de polyphénol repose sur la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, C'est un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxyde bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (MO_8O_{23}). La coloration présente un maximum d'absorption à 700 nm dont l'intensité de coloration est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés présents dans l'échantillon (Boizot et Charpentier, 2006).

Le tableau n°5 résume le mode opératoire du dosage de polyphénols cité ci-dessous (Benariba et al., 2013). Une gamme étalon de l'acide gallique a été utilisée à différents concentrations (50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 $\mu\text{g/ml}$).

Tableau n°5 : Mode opératoire du dosage de polyphénols

Concentration Acide gallique ($\mu\text{g/ml}$)	50	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	Extrait	Blanc
Volume de l'acide gallique (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1		
Extrait (ml)												0,1	
Blanc : eau distillée (ml)													0,1
$Na_2 CO_3$ (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
1^{ère} incubation à température ambiante ; pendant 5min													
Folin ciocalteu (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
2^{ème} incubation à température ambiante ; à l'obscurité ; pendant 30min													
Mesure de l'absorbance au spectrophotomètre à 700 nm													

Les résultats sont exprimés en microgrammes équivalent d'acide gallique par milligrammes ($\mu\text{g EAG/mg E}$) de l'extrait en utilisant la formule suivante :

$$\text{Polyphénols } (\mu\text{g EAG/mg E}) = a * f / c$$

a : concentration des polyphénols ($\mu\text{g/ml}$) déterminée à partir de la courbe d'étalon.

F : facteur de dilution (22)

C : concentration de l'extrait (1mg/ml)

3.2. Dosage de flavonoïdes totaux

La quantification des flavonoïdes est estimée par la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl_3) et la soude (NaOH). Les flavonoïdes forment un complexe jaune-orange avec le trichlorure d'aluminium et un complexe de couleur rose avec la soude qui absorbe à 510 nm (Kim et al., 2003).

Le dosage de flavonoïdes totaux a été réalisé selon le protocole de Benariba et al., (2013) résumé dans le tableau n°06. La gamme étalon de catéchine a été préparée dans les mêmes conditions opératoires à des concentrations croissantes (2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g/ml}$).

Tableau n°06: Mode opératoire du dosage de flavonoïdes totaux dans les extraits de *H. tuberculatum*

Catéchine ($\mu\text{g/ml}$)	50	100	300	400	500	600	700	800	900	1000	Extrait	Blanc
Volume de la catéchine (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		
Extrait (ml)											0,5	
Eau distillée ml (le tube blanc)												0,5
Eau distillée	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
NaNO_2 (ml)	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
1^{ère} incubation pendant 6 min à température ambiante												
AlCl_3 (ml)	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
2^{ème} incubation pendant 6 min à température ambiante												
NaOH (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Ajuster le volume total à 2500 μl et 3^{ème} incubation à température ambiante pendant 15min												
Lecture au spectrophotomètre à 510nm												

Les résultats obtenus exprimés en μg équivalent de catéchine / mg d'extrait sont calculés selon la formule suivante :

$$\text{Flavonoïdes } (\mu\text{g equ Cat/mg extrait}) = a * f / c$$

a : Concentration de flavonoïdes (équivalent de catéchine/mg d'extrait) déterminée à partir de courbe étalon

f : Facteur de dilution ($\times 10$)

c : Concentration de l'extrait.

4. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Haplophyllum tuberculatum*

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante. Dans notre étude la mise en évidence de l'activité antioxydante des différents extraits préparés a été effectuée par des tests *in vitro* en utilisant le test du piégeage des radicaux libres sur le DPPH, et le pouvoir réducteur du fer (FRAP).

4.1. Test du piégeage du radical libre DPPH

Principe

Le 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl ou le DPPH c'est un radical libre stable qui présente une coloration violette foncée en solution méthanolique, qui absorbe environs de 517 nm. La présence de composés anti-radicalaires réduit le radical DPPH, qui change de couleur en jaune pâle (**Figure n°9**). Le piégeage du radical libre DPPH est une méthode largement utilisée dans l'étude de l'activité antioxydante sert à calculer le pourcentage de réduction du radical DPPH $^{\bullet}$ et leur concentration inhibitrice à 50% (**Popovici et al. 2009**).

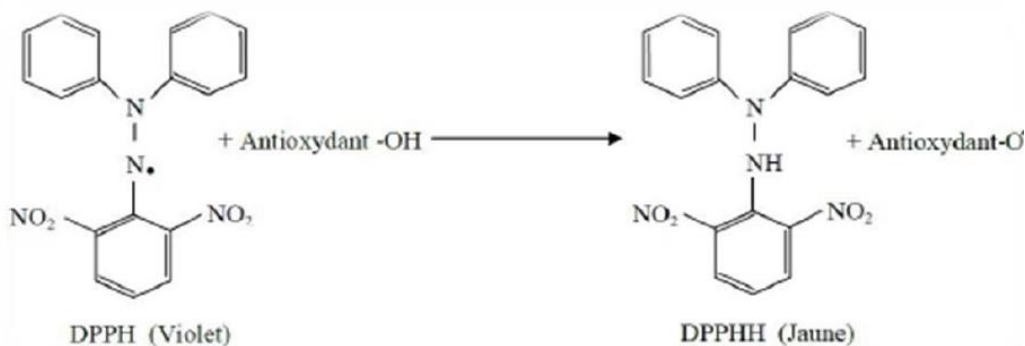


Figure n°09 : La réduction du DPPH par un antioxydant (**Popovici et al. 2009**).

Le mode opératoire a été réalisé selon le Protocole (**Benariba et al., 2013**) cité dans le tableau ci-dessous. Dans les mêmes conditions opératoires, l'acide ascorbique utilisé comme contrôle positif, est préparé à différentes concentrations (10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 µg/ml).

Tableau n°07: Mode opératoire du dosage de la mesure de l'activité antiradicalaire sur le DPPH

Acide ascorbique (µg/ml)	10	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	Extrait	Blanc
Acide ascorbique(ml)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05		
Extrait(ml) Différentes concentrations												0,05	
Contrôle négatif: MeOH (ml)													0,05
Volume du DPPH (ml)	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95
Incubation pendant 30 min à température et la lumière													
Mesure de l'absorbance à 517 nm													

La moyenne de l'absorbance de chaque échantillon permettra le calcul du pourcentage de réduction selon la formule suivante :

$$\text{DPPH}\% = ((A_{\text{cont}} - A_{\text{ext}}) / A_{\text{cont}}) \times 100$$

DPPH% : Pourcentage de réduction du DPPH.

A. contr : Absorbance du témoin négatif.

A. ext : Absorbance de l'extrait.

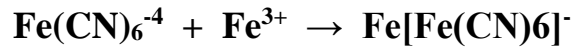
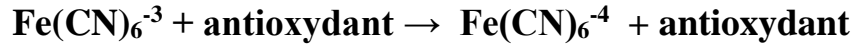
La valeur de IC₅₀ (concentration inhibitrice à 50 %) : permet de calculer la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de la forme radicalaire du DPPH. Elle est déterminée graphiquement par la régression linéaire des graphes tracés (**Bentrar , 2018**).

4.2. Test du pouvoir réducteur du Fer (FRAP : Ferric reducing antioxidant power)

Principe

Le pouvoir antioxydant d'un extrait est associé en partie à son pouvoir réducteur sachant que le Fe³⁺ assure la formation d'OH par la réaction de fenton, sa réduction en Fe²⁺ évite la production de ce radical. Cette technique est basée sur la capacité réductrice du fer ferrique (Fe³⁺) présent

dans le complexe ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}). Cette réaction est révélée par un virage de couleur du jaune au bleu vert du pruciane bleu ($Fe [Fe(CN)_6]^-$) qui est mesuré au spectrophotomètre à 700nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Li et al, 2008)



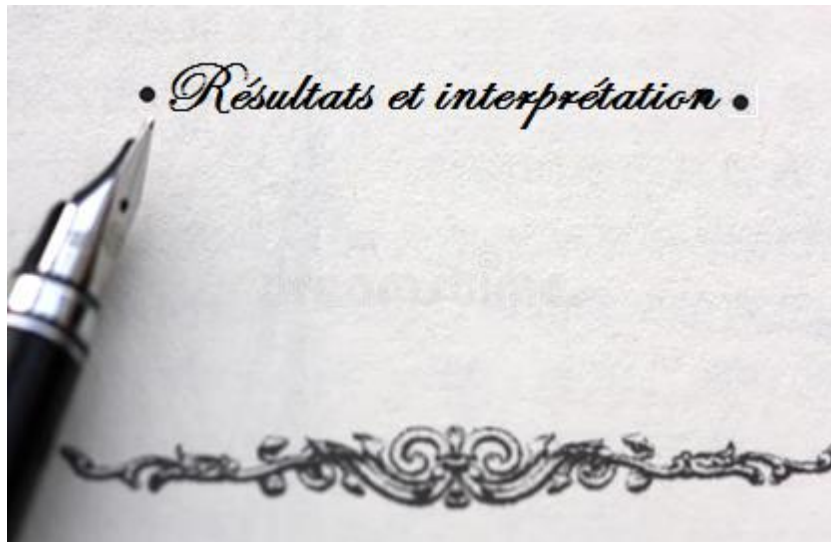
L'évaluation de l'activité antioxydante par la réduction du fer a été réalisé selon le protocole de Bourkhiss et al, (2010) résumé dans le tableau suivant. Comme contrôle positif le BHA (Butyl hydroxy Anisol) a été préparé dans les mêmes conditions à différentes concentrations (20, 40, 60, 80, 100 ; 120, 140, 160, 180, 200µg/ml).

Tableau n°08: Mode opératoire de la méthode du FRAP

Concentration de BHA et Acide ascorbique (µg/ml)	10	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	Extrait	Blanc
Volume du BHA (ml)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
Extrait (µl)												100	
Tube blc: Eau Distillée (µl)													100
PBS (µl)	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
$K_3Fe(CN)_6$	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Incubation dans l'étuve pendant 20 min à 50°C													
TCA	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Centrifugation des tubes pendant 10 min à 2000tour/min													
Surnageant (µl)	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
Eau distillée (µl)	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
FeCL3 (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Mesure de l'absorbance à 700 nm													

Les résultats sont exprimés en IC₅₀ : concentration inhibitrice de l'extrait, fraction ou molécule de référence correspondant à une absorbance égale à 0,5.

• *Résultats et interprétation* •



1. Rendements des extraits de *Haplophyllum tuberculatum*

Les extraits eau-acétone et ces fractions acétate d'éthyle et n-butanol sont obtenus par extraction de la partie aérienne de *H. tuberculatum*. Les caractères physico-chimiques de chaque extrait ont été résumés dans le **tableau n°09**. Selon le tableau, l'extrait eau-acétone a donné un rendement élevé 16,34%, tandis que, les fractions n-butanol et acétate d'éthyle ont donnés des rendements plus faibles 7% et 9,79%, respectivement.

Tableau n°09: Caractéristiques des extraits de *H. tuberculatum*

Extrait	Aspect	Couleur	Rendement (%)	Solubilité
Eau-acétone	Pâte	Vert foncé	16,34	eau-acétone
Fraction n- butanol de l'extrait eau-acétone	Poudre	Vert	7	Eau distillée
Fraction acétate d'éthyle de l'extrait eau- acétone	Pâte	Vert foncé	9,79	eau-acétone
Extrait aqueux	Poudre	Vert d'artre	17,9	Eau distillée
Fraction n- butanol de l'extrait aqueux	Poudre	Marron foncé	9,16	-

Les extraits eau-acétone et acétate d'éthyle sont récupérés sous forme d'une poudre de couleur verte. Ils sont solubles dans les solvants eau-acétone et eau-distillée, respectivement.

2. Taux de polyphénols et flavonoïdes totaux dans les extraits de *Haplophyllum tuberculatum*

Les résultats obtenus concernant le dosage du polyphénol et de flavonoïdes totaux, déterminés par l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique et de la catéchine, sont exprimés en µg équivalent acide gallique par milligramme d'extrait sec (µg Eq AG/mg E) pour les polyphénols, et en µg équivalent de catéchine par milligramme d'extrait sec (µg Eq Cat/mg E) pour les flavonoïdes (**Figure n°10 et 11**).

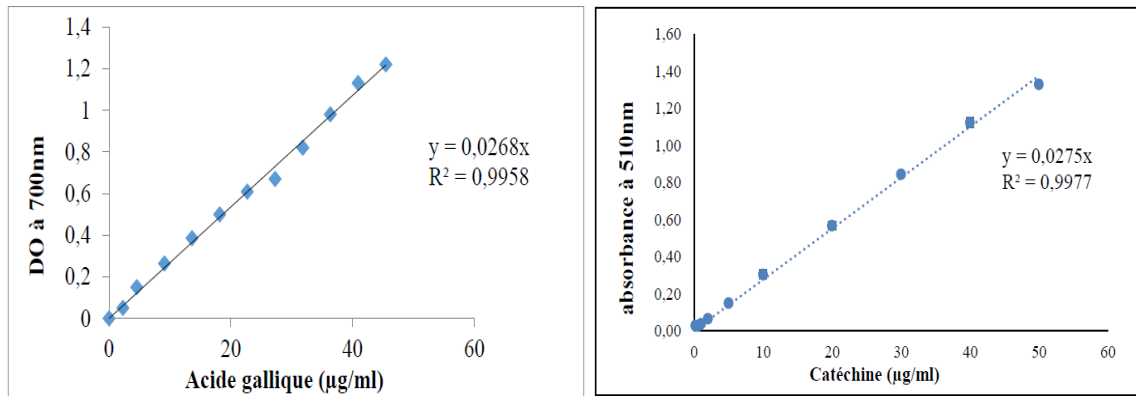


Figure n°10: Courbe étalon de l'acide gallique **Figure n°11:** Courbe étalon de la catéchine

Selon les résultats représentés dans le **tableau n°10**, on remarque que les teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux varient considérablement entre les extraits et les fractions. L'extrait aqueux et sa fraction n-butanol présentent des teneurs élevées en polyphénols 224,01 µg Eq AG / mg d'extrait et 206,79 µg.Eq Cat / mg d'ext en flavonoïdes. La fraction **n-butanol** de l'extrait aqueux renferme 185,25 01 µg Eq AG / mg d'extrait de polyphénols. L'extrait eau-acétone révèle le taux le plus faible en polyphénols et flavonoïdes, les fractions de cet extrait renferment des taux comparables en polyphénols 162,26 µg Eq AG / mg d'extrait, la fraction n-butanol renferme un taux élevé en flavonoïdes 169,82 µg.Eq Cat / mg d'ext.

Tableau n°10: Taux de polyphénols et flavonoïdes totaux dans les extraits de *H. tuberculatum*.

	Polyphénols (µg EAG/mg)	Flavonoïdes (µg EC/mg E)
Eau-acétone	86,83 ± 0,004	122,06 ± 0,004
Fraction n-butanol	162,72 ± 0,007	169,82 ± 0,001
Fraction Acétate éthyle	162,26 ± 0,006	74,91 ± 0,008
Aqueux	224,01 ± 0,227	206,79 ± 0,157
Fraction n-butanol	185,25 ± 0,022	—

Selon les résultats obtenus on note la richesse des extraits testés de *H. tuberculatum* en polyphénols et en flavonoïdes en particulier l'extrait aqueux et sa fraction n-butanol, ce qui explique que les flavonoïdes constituent une classe majoritaire de polyphénols dans cette plante.

3. Effet de l'extrait aqueux de *H. tuberculatum* sur le piégeage du radical libre le DPPH

Les résultats de la capacité antiradicalaire de vitamine C et de l'extrait aqueux de *H. tuberculatum* sur DPPH sont représentés dans les **tableaux 11 et 12**, respectivement.

Tableau 11: Effet antioxydant de l'acide ascorbique sur la réduction du DPPH exprimé en pourcentage.

Acide ascorbique ($\mu\text{g/ml}$)	1	1,5	2	3	3,5	4	4,5	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Inhibition DPPH %	7 \pm 0,002	9 \pm 0,02	21,89 \pm 0,01	21,47 \pm 0,01	30,98 \pm 0,009	61,77 \pm 0,02	66,67 \pm 0,04	3,73

Dans le **tableau n°12**, les concentrations testées de l'extrait aqueux sur la réduction du DPPH ont présenté un effet inhibiteur du radical DPPH très faible avec des pourcentages de réduction qui ne dépassent 10%. La valeur d'IC₅₀ déterminée est de l'ordre de 948,06 $\mu\text{g/mL}$.

Tableau n°12: Effet de l'extrait aqueux de *H.tuberculatum* sur la réduction de DPPH exprimé en pourcentage.

Extrait aqueux ($\mu\text{g/mL}$)	50	100	150	200	300	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Inhibition DPPH %	5,21 \pm 2,91	7,43 \pm 1,64	5,30 \pm 3,21	3,38 \pm 0,70	9,77 \pm 13,95	948,06

4. Effet de l'extrait eau-méthanol sur la réduction du fer FRAP

Les résultats obtenus révèlent une forte activité réductrice du BHA (molécule de référence) à faible concentration (**tableau n°13**), Cette activité est ainsi exprimée par la concentration efficace IC₅₀ déterminée graphiquement et qui correspond à une absorbance de 0,5 à 700 nm,

Tableau 13: Effet du BHA sur la réduction du fer (test du FRAP)

BHA ($\mu\text{g/ml}$)	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	EC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
Abs (700nm)	0,091 \pm 0,05	0,150 \pm 0,06	0,214 \pm 0,06	0,402 \pm 0,04	0,537 \pm 0,03	0,615 \pm 0,03	0,721 \pm 0,04	0,806 \pm 0,02	0,951 \pm 0,03	1,060 \pm 0,09	96,15

Les résultats mentionnés dans le **tableau 14** correspondent aux absorbances de l'extrait aqueux de *H. tuberculatum* sur la réduction du fer (FRAP). Les valeurs d'absorbances obtenus indiquent une activité réductrice du fer très faible de cet extrait. La valeur d'EC50 déterminée est de l'ordre de 445,60 µg/ml.

Tableau 24: Absorbances de l'effet de l'extrait aqueux sur la réduction de fer (FRAP).

Extrait aqueux (µg/ml)	50	100	150	200	300	EC ₅₀
Abs (700nm)	0,010 ± 0,003	0,017 ± 0,008	0,007 ± 0,005	0,015 ± 0,013	0,008 ± 0,005	445,60



L'évaluation des plantes médicinales pour leurs activités biologiques a augmenté considérablement en Algérie. Ceci révèle que les molécules isolées à partir des plantes médicinales sont certainement intéressantes et très importantes pour être utilisées comme thérapie alternative ou comme principe actif de nouveaux médicaments d'origine végétale **(Houghton, 2000)**.

Le présent travail a pour objectif l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et organiques de *H. tuberculatum*, récoltée dans la région d'Adrar, sur le DPPH et sur le FRAP ainsi que la détermination du taux de polyphénols et de flavonoïdes.

L'étude phytochimique a montré un rendement variable entre 7 et 17%, cette variation du rendement est d'un extrait à l'autre est due principalement aux solvants d'extraction utilisés, dont les solvants les plus polaires montrent un rendement d'extraction important par rapport aux solvants moins polaires. La différence de polarité des solvants utilisés permet l'extraction d'une large gamme de métabolites secondaires **(Bruneton, 2009, Green, 2004)**.

Parmi l'ensemble des métabolites secondaires détectés, les composés phénoliques représentés majoritairement par les flavonoïdes suscitent un grand intérêt du fait de leur puissante activité antioxydant. Dans notre étude nous avons déterminé dans les extraits analysés le taux de polyphénols et flavonoïdes totaux. Cette analyse quantitative a indiqué une forte teneur pour aqueux et sa fraction du n-butanol par rapport à l'extrait eau-acétone et ses fractions n-butanol et acétate d'éthyle. Le rendement, la composition, ainsi que la quantité des métabolites secondaires d'un extrait peut être influencé par plusieurs facteurs tels que le temps et la méthode d'extraction, la température polarité du solvan) ainsi que la nature du sol et l'écologie du matériel végétale utilisé **(Benaziza ,2017)**.

La comparaison des résultats avec la bibliographie ne peut avoir lieu car il n'y a pratiquement aucun travail scientifique sur la détermination du taux de polyphénol et de flavonoïdes totaux dans *Haplophyllum tuberculatum*.

La teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux dans les différents extraits *Haplophyllum tuberculatum* nous a incités à déterminer leur pouvoir antioxydant. Qui a été évaluée seulement pour l'extrait aqueux en utilisant le test du piégeage du radical libre DPPH, le test du pouvoir réduction du fer (PFRAP)

La méthode DPPH utilisée dans notre étude est basée sur l'utilisation du radical DPPH, fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques. Elle s'effectue par la détermination de la réduction du radical DPPH• ou par la détermination de la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50% du DPPH• en déterminant l'IC₅₀. La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que son IC₅₀ est faible (**Popovici et al, 2009, Djedoui ,2017**).

Concernant l'activité antioxydante de l'extrait aqueux sur le DPPH, nous avons remarqué une très faible activité, malgré que cet extrait est très riche en composés phénoliques et en flavonoïdes. Ces résultats nécessitent de refaire ce test avec des concentrations élevées pour vérifier son effet antioxydant. Selon la bibliographie *H. tuberculatum* espèce riche en alcaloïdes par rapport aux flavonoïdes, ce qui peut expliquer le faible effet antiradicalaire de l'extrait aqueux.

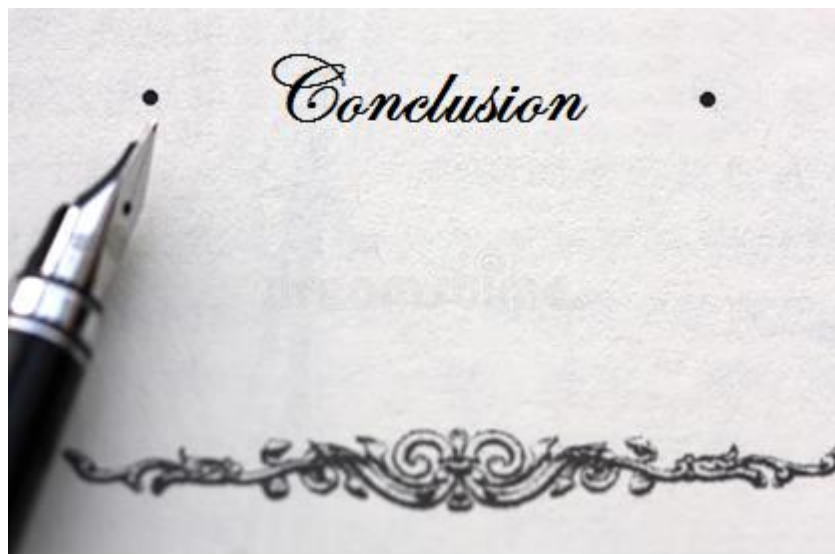
La capacité antioxydante des polyphénols est reliée à leur structure chimique et à la configuration des groupements hydroxyle sur les cycles, ils assurent la réduction des radicaux libres par transfert d'hydrogène de la fonction hydroxyle, et il se produit suite à cette réaction des molécules stables (RH) et des radicaux flavoxyle (FLO•) qui se transforment en composés non réactifs et subissent des changements structuraux sur le noyau aromatique ou en interagissant entre eux (**Belarbi ,2020**).

Concernant l'activité réductrice du fer, nous avons remarqué que l'extrait aqueux de *H. tuberculatum* malgré sa richesse en composés phénoliques et en métabolites secondaires n'assure aucun pouvoir réducteur de fer remarquable. Ce qui révèle que cet extrait est incapable de réduire les ions ferriques (Fe³⁺) et donc incapable de neutraliser les radicaux libres en leur donnant des électrons. Cet effet est probablement lié à la composition chimique de cette espèce, qui est riche en alcaloïdes.

L'activité antioxydante de polyphénols spécifiquement de flavonoïdes dépend généralement de leur structure chimique et la distribution de leurs groupements hydroxyl, en effet les groupements 3 et 4- orthodihydroxy sur le cycle B et le groupement 4- carboxy sur le cycle C sont responsables de l'effet scavenger des radicaux libres tandis que le groupement 3-OH et/ou 5-OH sur le cycle C est très intéressant pour l'effet antioxydant. L'absence de structures O-dihydroxy sur le cycle B donne une structure catéchol sur le cycle A qui peut largement compenser l'activité antioxydante des flavonoïdes (**Benariba ,2013**). Le noyau

catéchol est associé à l'activité réductrice du fer dont les extraits qui contiennent ce noyau ont montré une augmentation du pouvoir réducteur à un pourcentage de 36% (**Benaziza ,2017**).

De nombreuses études réalisées sur les produits chimiques d'origines naturels ont prouvé que se sont certes, les polyphénols qui sont responsable de l'activité antioxydante, cependant il a été établi que plusieurs familles de métabolites secondaires tels que les alcaloïdes et les saponosides peuvent présenter une activité antioxydante. Chaque métabolite se caractérise par une action qui lui est propre et qui devient plus importante en combinaison avec un autre, ce qui reflète l'effet synergique ou additif de ces molécules et qui peuvent influence l'activité antioxydante (**Benaziza ,2017**).



L'objectif de la présente étude porte sur une analyse phytochimique des extraits de la partie aérienne de *Haplophyllum tuberculatum* ainsi que l'évaluation de leur activité antioxydante en utilisant le test antiradicalaire sur le DPPH et le pouvoir réducteur du fer par la méthode du FRAP.

Les résultats du dosage des polyphénols et de flavonoïdes dans les extraits testés, révèlent des teneurs élevées dans les extraits préparés, où l'extrait aqueux est plus riche par rapport aux extraits organiques. Les résultats de l'activité antioxydante ont révélé une faible activité sur le DPPH et le FRAP. la richesse en composés phénolique n'a pas attribué à *H. tuberculatum* une forte activité antioxydante.

En perspective cette préliminaire, nécessite d'éventuelles étude qui s'intéressent à ;

- L'utilisation des concentrations élevées des extraits testés pour vérifier leur effet antioxydant
- L'utilisation d'autres méthodes d'extraction pour la récupération d'autres familles de composés phytochimiques
- Effectuer une analyse chromatographique des extraits préparés
- Tester d'autres activités biologiques d' *Haplophyllum tuberculatum* (antimicrobienne, antidiabétique, anti-inflammatoire,...).

- 1) **Ali, M. S., Pervez, M. K., Saleem, M., & Tareen, R. B. (2001).** Haplophytin-A and B: the alkaloidal constituents of *Haplophyllum acutifolium*. *Phytochemistry*, 57(8), 1277-1280.
- 2) **Al-Rehaily, A. J., Alqasoumi, S. I., Yusufoglu, H. S., Al-Yahya, M. A., Demirci, B., Tabanca, N., & Temel, H. E. (2014).** Chemical Composition and biological activity of *Haplophyllum tuberculatum* Juss. essential oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(3), 452-459.
- 3) **Bahorun, T. (1998, March).** Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. In *Second Annual Meeting of Agricultural Scientists* (Vol. 83).
- 4) **Beaudeau, J. L., Delattre, J., Therond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Legrand, A., & Peynet, J (2006).** Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 21(3), 144-150.
- 5) **Belarbi Asma (2020).** Contribution à l'étude phytochimique et à l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Pinus halepensis* et *Centaurea penguins*. Master Biochimie Appliquée. Université de Tlemcen.
- 6) **BENARIBA, N. (2013).** Contribution à l'étude de l'effet antidiabétique des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* Chez le rat Wistar rendu diabétique par la streptozotocine (Doctoral dissertation). Université de Tlemcen.
- 7) **Benariba, N., Djaziri, R., Bellakhdar, W., Belkacem, N., Kadiata, M., Malaisse, W. J., & Sener, A. (2013).** Phytochemical screening and free radical scavenging activity of *Citrullus colocynthis* seeds extracts. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3(1), 35-40.
- 8) **Benaziza, A. (2017).** Contribution à l'étude phytochimique et l'activité antioxydante des extraits de feuilles et de cônes de *Pinus halepensis* (Pin d'Alep) (mémoire de master, université de Tlemcen). 77.
- 9) **Bentrar Faiza (2018).** Contribution à l'étude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante et inhibitrice et l' α -amylase des extraits de cônes de *Pinus halepensis* (Pin d'Alep). Master Biochimie Appliquée. Université de Tlemcen.
- 10) **Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012).** Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.*, 5(1), 9-19. doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613
- 11) **Boizot N., Charpentier J (2006).** Méthode rapid d'évaluation du contenu en composés phénoliques des oranges d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, INRA, 79-82.

- 12) **Bourkhiss, M. B., Hnach, M., Paolini, J., Costa, J., Farah, A., & Satrani, B. (2010).** Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters du Maroc. *Bulletin de la Société royale des sciences de Liège*.
- 13) **Bruneton J (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3e éd. France : Tech & Doc – Lavoisier.
- 14) **Couaillet, L. (2015).** Le stress oxydant au cours du diabète de type 2. Application à la détermination de l'excrétion urinaire de 8-isoprostane chez le patient diabétique.
- 15) **Delille L (2007).** Les plantes médicinales d'Algérie. Éd.BERTI, Alger, 122 P.
- 16) **Djedoui Faiza (2018).** Contribution à l'étude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante et inhibitrice et l' α -amylase des extraits de *Ammi visnaga*. Master Biochimie Appliquée. Université de Tlemcen.
- 17) **Eissa, T. F., González-Burgos, E., Carretero, M. E., & Gómez-Serranillos, M. P. (2014).** Biological activity of HPLC-characterized ethanol extract from the aerial parts of *Haplophyllum tuberculatum*. *Pharmaceutical Biology*, 52(2), 151-156.
- 18) **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108.
- 19) **Hadjadj Soumia (2017).** Analyses phytochimiques et activités biologiques des extraits de deux plantes médicinales du Sahara septentrional Est Algérien (Doctoral dissertation). Université de Ourgla.
- 20) **Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007).** Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-38
- 21) **Hamdi, A., Majouli, K., Flamini, G., Marzouk, B., Marzouk, Z., & Heyden, Y. V. (2017).** Antioxidant and anticandidal activities of the Tunisian *Haplophyllum tuberculatum* (Forssk.) A. Juss. essential oils. *South African Journal of Botany*, 112, 210-214.
- 22) **Hartmann, T. (2007).** From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68, 2831-2846.
- 23) **Iserin P., (2001).** Encyclopédie des plantes médicinales. Ed.Larousse-Bordas, Paris : 275 p.
- 24) **Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., & Amini-Khoei, H. (2018).** Medicinal plants: Past history and future perspective. *J Herbmed Pharmacol.*, 7(1), 1-7.
- 25) **Karou, D., Dicko, M. H., Sempore, J., & Traore, A. S. (2005).** Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*, 4(8), 823-828.

- 26) **Kim D O Jeong S W, et Lee C Y. (2003).** Antioxydant capacity of phenolique photochemicals from various cultivars of plums. *food chemistry*, 81,321,326
- 27) **Koechlin-Ramonatxo, C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20, 165-177.
- 28) **Krief S. (2003).** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observation de l'alimentation de chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de Docteur du muséum national d'histoire naturelle, 343p.
- 29) **Leeuwenburgh, C., & Heinecke, J. W. (2001).** Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Current medicinal chemistry*, 8(7), 829-838.
- 30) **Li HB, Wong CC, Cheng KW, Feng C (2008).** Antioxidant properties *in vitro* and total Phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *Lebensmittel- Wissenschaft and Technology*, 41 (3) : 385-390.
- 31) **Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010).** Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118.
- 32) **Oubre AY, Carlson TJ, King SR, Reaven GM (1997).** From plant to patient: an ethnomedical approach to the identification of new drugs for the treatment of NIDDM. *Diabetologia*, 40 : 614-617.
- 33) **Pan L, Carcache EJ de Blanco et Kinghorn AD (2009).** Plant-Derived Natural Products as Leads for Drug Discovery. In : Osbourn AE et Lanzotti V, éditeurs. *Plant-derived Natural Products ; Synthesis, Function, and Application*. London New York : Springer. p. 547 – 551.
- 34) **Petropoulos, I. (2011).** Stress oxydant et Vieillesse. *Module de gérontologie fondamentale. Cours de Biologie cellulaire*. Paris: Université Pierre et Marie Curie.
- 35) **Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., & Defraigne, J.-O. (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16, 223-239.
- 36) **Popovici C, Saykova I, Tylkowski B (2009).** Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue du Génie Industriel*, 4 : 26-39. *Rad. Res.*
- 37) **Raissi, A., Arbabi, M., Roustakhiz, J., & Hosseini, M. (2016).** *Haplophyllum tuberculatum*: An overview. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 5(4), 125-130.
- 38) **Schmelzer, G. H., & Gurib-Fakim, A. (2013).** *Plantes médicinales 2* (Vol. 11). PROTA.

- 39) **Sewell, R. D., & Rafieian-Kopaei, M. (2014).** The history and ups and downs of herbal medicines usage. *J HerbMed Pharmacol.*, 3(1), 1-3.
- 40) **Sies H (1996).** éditeur. Antioxidant in disease mechanisms and therapy, Adv Pharm. New York: Academic Press.
- 41) **Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017).** Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*, 86, 715-748.
- 42) **Spiga Nardjes (2016).** Effet *in vitro* de l'extrait méthanolique des feuilles et des tiges de *Ruta chalepensis*, *Ruta angustifolia* et *Happlophyllum tuberculatum* vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radici lycopersici*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* et *Pectobacterium cacaerotoavorum*. Master en sciences agronomiques Spécialité : Protections des cultures. Université de Mostaganem.
- 43) **Wilbon, P. A., Chu, F., & Tang, C. (2013).** Progress in renewable polymers from natural terpenes, terpenoids, and rosin. *Macromol. Rapid Commun.*, 34, 8-37.