



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

**UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCCEN**

# MEMOIRE

Présenté à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

**MASTER EN CHIMIE**

Spécialité: Chimie Pharmaceutique

Par :

**M<sup>elle</sup> MEHTARI Imane**

Sur le thème

---

**Caractérisation chimique, évaluation de l'activité  
antioxydante et isolement des molécules majoritaires  
présentent dans l'extrait à l'hexane des racines de la  
*Rhaponticum acaule***

---

Soutenu publiquement le 07 Juillet 2021 à Tlemcen devant le jury composé de :

M <sup>r</sup> DIB Mohamed El Amine	Professeur	Université de Tlemcen	Président
M <sup>me</sup> TABET ZATLA Amina	MCA	Université de Tlemcen	Encadrante
M <sup>me</sup> BENDIABDELLAH Amel	MCB	Université de Tlemcen	Examinatrice

# Dédicace

*J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail aux deux personnes les plus chers à mon cœur, mon père et ma mère, qui m'ont beaucoup soutenues dans mes études en m'offrant les meilleures conditions de travail, ainsi que dans ma vie, sans eux je n'aurais été ce que je suis aujourd'hui.*

*À mes chers petits frères Abderrahim et Rachid que j'aime beaucoup.*

*À mon binôme et très cher ami Ali, qui a toujours été là dans les moments difficiles de nos études et qui m'a donné et me donne toujours le courage d'aller vers l'avant.*

*À la mémoire de mes grands-parents paternelle que Dieu les accueille dans son vaste paradis, et mes grands-parents maternelle que Dieu les garde.*

*À mes deux copines de cœur Narimene et Djazia.*

*À ma famille.*

*À mon encadrante madame TABET ZATLA Amina qui m'a beaucoup aidée.*

*Et à toute personne qui a pu m'aider durant tout mon parcours universitaire.*

## Remerciements

Je remercie tout d'abord le bon Dieu le tout puissant de m'avoir donné patience, courage et motivation pour faire ce travail.

Je tiens à remercier en premier lieu mon encadrante M<sup>me</sup> TABET ZATLA Amina, Docteur à l'Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, qui m'a donnée toute son attention, sa confiance et son aide, je tiens à lui exprimer toute ma gratitude.

Je remercie également les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail :

À Pr. DIB Mohamed El Amine de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

J'exprime aussi mes sincères remerciements à Dr. BENDIABDELLAH Amel d'avoir accepté d'examiner et discuter ce travail.

Je tiens à remercier M<sup>me</sup> MERED Meriem Professeur au département de chimie, Faculté des sciences, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, pour ces conseils et son aide précieuse.

Je remercie le doyen de la faculté des sciences Pr ARRAR Zoheir et notre responsable de formation Dr. KENICHE Assia.

Un grand merci à toute personne qui a participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

# Sommaire

Introduction générale.....	1
<b>Chapitre I: Synthèse bibliographique</b>	
1. Plantes médicinales .....	3
a. Définition .....	3
b. Les avantages des plantes médicinales .....	3
c. Les inconvénients des plantes médicinales.....	3
d. Intérêt de l'étude des plantes médicinales.....	4
2. La phytothérapie.....	4
a. Définition .....	4
b. Différents types de la phytothérapie .....	4
c. Avantages de la phytothérapie.....	5
d. Inconvénients de la phytothérapie .....	6
3. Métabolites secondaires.....	6
a. Composés phénoliques.....	6
b. Les alcaloïdes.....	9
c. Les terpénoïdes.....	9
4. Description botanique de la plante étudiée: la <i>Rhaponticum Acaule</i> .....	10
a. Introduction.....	10
b. Classification.....	10
c. Description botanique.....	10
d. Floraison et répartition géographique.....	11
e. Les genres <i>Rhaponticum</i> en médecine traditionnelle.....	11
5. Activité antioxydante.....	12
a. Les antioxydants.....	12
b. Les radicaux libres.....	12
c. Le stress oxydatif.....	13
6. Travaux antérieurs.....	13
a. Rendement.....	13
b. La composition chimique.....	14
c. Activité antioxydante.....	15

## Chapitre II: Matériel et méthodes

1. Extraction par macération .....	17
a. Principe .....	17
b. Mode opératoire.....	17
c. Détermination de rendement.....	17
2. Tests phytochimiques.....	18
a. Les terpènes.....	18
b. Les alcaloïdes.....	18
c. Les tannins.....	18
d. Les flavonoïdes.....	18
e. Les quinoléines.....	18
f. Les saponines.....	18
3. Evaluation de l'activité antioxydante par test au DPPH .....	19
a. Principe .....	19
b. Mode opératoire .....	20
c. Expression des résultats .....	21
4. Réduction du fer par la méthode FRAP (Ferric reducing antioxidant power).....	21
a. Principe .....	21
b. Mode opératoire.....	21
5. Chromatographie sur colonne .....	22
a. Définition de la chromatographie .....	22
b. Chromatographie sur colonne.....	22
c. Chromatographie analytique sur couche mince (CCM) .....	23
6. Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (CPG/SM).....	24
a. Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	24
b. Spectrométrie de masse (SM).....	24
c. Couplage CPG / SM.....	24

## Chapitre III: Résultats et discussion

1. Rendement.....	26
2. Résultats des tests phytochimiques .....	26
3. Evaluation de l'activité antioxydante.....	28
a. Par la méthode du DPPH .....	28
b. Par la méthode de FRAP .....	30
4. Chromatographie sur colonne .....	31

<b>Conclusion.....</b>	<b>33</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>34</b>

## ملخص

يركز عملنا على *Rhaponticum acaule* وهو نبات طبي ينتمي الى عائلة Astéracées . تستخدم هذه النبتة في طب الأعشاب وفي امراض مختلفة. الهدف من هذه الدراسة هو المساهمة في التحليل الكيميائي، نشاطه المضاد للاكسدة وعزل المنتج الرئيسي لهذا النوع.

أظهر التحليل الكيميائي النباتي لمستخلص الهيكزان وجود فلويدات وتربينويدات، وهما مستقلبان ثانويان مهمان للغاية يتمتعان بخصائص دوائية. أظهرت النتائج تأثيراً معتدلاً لمضاد الاكسدة بطريقة DPPH و طريقة FRAP مع اتخاذ مض الاسكوربيك كمرجع.

من ناحية أخرى ، تمكنا من عزل المنتج الرئيسي لهذا النوع عن طريق كروماتوجرافيا العمود ، مع عائد 8%.  
الكلمات المفتاحية: *Rhaponticum acaule* ، الاختبارات الكيميائية النباتية ، نشاط مضادات الأكسدة ، كروماتوجرافيا العمود.

## Résumé

Notre travail porte sur la *Rhaponticum acaule* (L) DC qui est une plante médicinale appartenant à la famille des Astéracées. Elle est très utilisée en phytothérapie dans diverses pathologies. L'intérêt de notre étude est de contribuer à l'analyse phytochimique, à son activité antioxydante et à l'isolation du produit majoritaire de cette espèce.

L'analyse phytochimique de l'extrait à l'hexane a révélé la présence d'alcaloïdes et des terpénoïdes, deux métabolites secondaires très intéressants qui sont dotés de propriétés pharmacologiques.

Les résultats ont montré un effet antioxydant modéré par les deux méthodes DPPH et celle de la réduction du fer par rapport à l'acide ascorbique qui a été utilisé comme référence.

D'autre part, nous avons pu isoler le produit majoritaire de cette espèce par une chromatographie sur colonne, avec un rendement de 8%.

**Mots clés:** *Rhaponticum acaule*, tests phytochimiques, activité antioxydante, chromatographie sur colonne.

## Abstract

Our work focuses on *Rhaponticum acaule* (L) DC which is a medicinal plant belonging to the Asteraceae family. It is widely used in herbal medicine in various pathologies. The interest of our study is to contribute to the phytochemical analysis, to its antioxidant activity and to the isolation of the major product of this species.

Phytochemical analysis of the hexane extract revealed the presence of alkaloids and terpenoids, two very interesting secondary metabolites which have pharmacological properties.

The results showed a moderate antioxidant effect by both DPPH methods and that of iron reduction compared to ascorbic acid which was used as a reference.

On the other hand, we were able to isolate the majority product of this species by column chromatography, with a yield of 8%.

**Key words:** *Rhaponticum acaule*, phytochemical tests, antioxidant activity, column chromatography.

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Acide hydroxycinnamique.....	7
<b>Figure 2:</b> Acide hydroxybenzoïque.....	7
<b>Figure 3:</b> Structures chimiques des principaux flavonoïdes.....	8
<b>Figure 4:</b> Structure chimique de tanins condensés.....	8
<b>Figure 5 :</b> Structure chimique des tannins hydrolysables.....	8
<b>Figure 6:</b> Structure chimique de la molécule d'isoprène.....	9
<b>Figure 7:</b> La <i>Rhaponticum acaule</i> .....	11
<b>Figure 8:</b> Les différentes étapes de macération.....	17
<b>Figure 9:</b> Tests phytochimiques.....	19
<b>Figure 10:</b> Forme réduite du radical DPPH.....	19
<b>Figure 11:</b> Mode opératoire pour la préparation de la solution du DPPH, de l'extrait ainsi que la mesure avec le spectrophotomètre.....	20
<b>Figure 12:</b> Réduction du fer par la méthode FRAP.....	22
<b>Figure13:</b> Colonne chromatographique.....	23
<b>Figure 14 :</b> Schéma de la CPG / SM.....	25
<b>Figure15:</b> Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'extrait à l'hexane.....	28
<b>Figure 16:</b> Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'acide ascorbique.....	29
<b>Figure 17:</b> Pouvoir réducteur de l'extrait à l'hexane de la <i>Rhaponticum acaule</i> .....	30
<b>Figure 18:</b> Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique.....	31

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Classification de la <i>Rhaponticum acaule</i> .....	10
<b>Tableau 2:</b> La teneur en composés phénolique de la <i>Rhaponticum acaule</i> .....	14
<b>Tableau 3:</b> Activité antioxydante des extraits organiques de <i>R. acaule</i> .....	15
<b>Tableau 4:</b> Rendement de l'extrait à l'hexane des racines de la <i>Rhaponticum acaule</i> .....	26
<b>Tableau 5:</b> Résultats des tests phytochimiques de l'extrait à l'hexane de la <i>Rhaponticum acaule</i> .....	27
<b>Tableau 6:</b> Résultats de l'activité antioxydante par la méthode du DPPH.....	28
<b>Tableau 7:</b> Les valeurs des concentrations d'inhibitions IC <sub>50</sub> .....	29
<b>Tableau 8 :</b> Résultats de l'activité antioxydante par la méthode de FRAP.....	30
<b>Tableau 9:</b> Nombre de fractions collectées et leurs nombres de taches.....	32

## *Introduction générale*

---

La médecine traditionnelle est toujours l'un des remèdes efficaces que nos ancêtres pratiquaient auparavant. Cette pratique s'appelle la phytothérapie, c'est le domaine de la médecine qui utilise les plantes pour traiter les maladies grâce à leurs propriétés thérapeutiques et nutritives. En effet, environ 95% de la population des pays en voie de développements a recours à ces plantes pour les soins primaires non seulement par manque d'accès aux médicaments prescrits mais aussi à cause de leur efficacité. Une estimation d'au moins 25% de tous les médicaments modernes sont dérivés soit directement ou indirectement des plantes médicinales grâce à l'utilisation et à l'application de nouvelles technologies basée sur les connaissances traditionnelles [1]. De plus l'utilisation des médicaments allopathiques est exagérée, ce qui entraîne des effets secondaires et des réactions indésirables des médicaments. Pour éviter de telles réactions, l'utilisation de la phytothérapie est indiquée [2].

Ces dernières années, plusieurs molécules importantes issues du règne végétal sont commercialisées comme médicaments: le taxol issu de l'if (*Taxus baccata* L) pour ses propriétés anticancéreuses, l'artémisinine isolée d'une armoise (*Artemisia annua* L.,) pour ses propriétés antimalariques, la galanthamine extraite de la perce-neige (*Galanthus nivalis* L.,) pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. On trouve aussi d'autres médicaments commercialisés sous forme d'extraits standardisés comme le millepertuis (*Hypericum perforatum* L.,) pour soigner la dépression ou *Ginkgo biloba* L. pour mieux se concentrer [3].

La recherche de nouvelles molécules actives implique donc la mise en place d'une stratégie et des moyens pour faire non seulement le criblage des extraits végétaux d'une part et d'autre part des tests biologiques reproductibles tels que les effets antioxydants, antimicrobiens, antifongiques. Cette approche sera illustrée par la recherche de nouvelles substances actives extraites des plantes algériennes vu que l'Algérie est l'un des pays les plus riches en plantes médicinales en raison de sa flore diversifiée. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre présent travail.

La plante médicinale qui a fait l'objet de notre travail est la *Rhaponticum acaule* aussi connue sous le nom de *Leuzea acaulis* L. ou *Centaurea chamaerhaponticum* Ball [4]. Elle appartient à la famille des astéracées qui comprend environ 25 espèces dans le monde, principalement réparti en Asie orientale et centrale, dans les montagnes sibériennes, en Mongolie, en Australie orientale et en Afrique du Nord [5]. Beaucoup d'études dans la littérature ont montré que plusieurs espèces de ce genre sont utilisées dans la médecine traditionnelle [2]. Elle possède une activité très recherchée dans les plantes médicinales, qui est l'activité antioxydante. L'évaluation de cette activité demeure très intéressante, elle peut faire

donc l'intérêt de nombreuses études. Car actuellement elle est considérée comme un défi scientifique important, et ses tests ont été largement développés pour déterminer la valeur et l'efficacité de nouveaux composés. Par ailleurs, d'après nos recherches bibliographiques sur les travaux effectués sur cette plante nous avons constaté que la chimie de cette espèce reste insuffisamment étudiée.

Ce présent travail s'inscrit dans le cadre général des travaux qui consiste à valoriser les ressources naturelles d'origine végétale, il se subdivise en trois parties principales:

**La première** est une synthèse bibliographique qui met en œuvre une revue de la littérature sur la plante qui a fait l'objet de notre étude. Et qui comporte dans un premier temps une description botanique de la plante et ses propriétés thérapeutiques. Suivi d'une présentation de l'activité antioxydante et les différents travaux antérieurs qui ont été réalisé sur la *R. acaule*. Dans la **seconde partie**, nous détaillons le matériel et les méthodes employées.

Et la **troisième partie** présente une synthèse des principaux résultats obtenus sur:

- La préparation de l'extrait à l'hexane de la *R. acaule* ainsi qu'une caractérisation chimique qualitative de l'espèce par des tests phytochimiques.
- L'évaluation de l'activité antioxydante par les deux méthodes DPPH et la méthode de FRAP.
- L'isolement de la molécule majoritaire présente dans l'extrait à l'hexane par une chromatographie sur colonne.

**Chapitre I:**  
**Synthèse bibliographique**

## **1. Plantes médicinales**

### **a. Définition**

Les plantes médicinales sont des plantes qui possèdent des parties ayant des propriétés médicamenteuses [6]. On les trouve dans différents secteurs sous formes de principes actifs, d'extraits, des huiles essentielles, des solutions aqueuses ou organiques ou même telles qu'elles sont. Elles contiennent au niveau de ses organes des principes actifs utilisables à des fins thérapeutiques. C'est des plantes qui sont utilisées pour prévenir, soigner et soulager divers maux.

Les plantes qui sont employées par le monde à des fins médicinales sont d'environ 35000 espèces, ce qui constitue un large éventail de biodiversité qui est utilisé par les êtres humains. Elles continuent de répondre à des besoins très importants malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne [7].

Depuis presque 150 ans, ces plantes ont fourni à la pharmacie des médicaments de très grande efficacité. Aujourd'hui, d'innombrables travaux sont menés dans le domaine de l'ethnopharmacologie. Leur but est de montrer que les plantes utilisées et qui ont été testées peuvent être d'une part, des plantes efficaces dans les modèles pharmacologiques et d'autre part elles peuvent être quasiment dépourvues de toxicité [8].

### **b. Les avantages des plantes médicinales**

Les plantes médicinales qui sont souvent utilisées ne provoquent que très peu ou aucun effet indésirable : c'est l'un de leurs principaux avantages. De plus, l'interaction de plusieurs constituants commence à être mieux comprise et acceptée scientifiquement [9], mais par opposition à certaines croyances populaires, beaucoup de plantes peuvent avoir des effets immédiats sur l'organisme [10].

Par contre, les médicaments chimiques ont une action plus directe puisqu'ils sont formulés pour être immédiatement absorbés par le corps humain. Il est donc plus facile de connaître leur composition exacte et leurs conditions de conservation [11].

### **c. Les inconvénients des plantes médicinales**

Certaines plantes médicinales ne sont pas dangereuses, mais il existe certaines espèces comme la belladone ou le colchique qui sont toxiques et elles sont utilisées que sous des formes bien contrôlées et exclusivement commercialisées en pharmacie. Si ces plantes sont cueillies et employées d'une manière inconsidérée, cela peut aboutir à des intoxications graves et mortelles [12].

#### **d. Intérêt de l'étude des plantes médicinales**

La plupart des plantes contiennent des substances qui agissent sur le corps humain et animal. Elles sont utilisées en médecine classique et en phytothérapie. Elles présentent des avantages que les médicaments n'ont pas [13].

La raison principale est que les principes actifs végétaux proviennent de processus biotiques qui est très répandus dans le monde vivant, alors que pour les médicaments de synthèse sont des xénobiotiques aux effets secondaires très mal maîtrisés [14].

Les plantes médicinales sont très importantes pour la recherche pharmaceutique et la synthèse de nouveaux médicaments utilisé comme agents thérapeutiques ou comme matière première pour un modèle pour les composés actifs [15].

### **2. La phytothérapie**

#### **a. Définition**

La phytothérapie est une discipline allopathique visant à traiter et à prévenir certains troubles fonctionnels ou certains états à partir des plantes [16].

Le mot phytothérapie provient du grecs « phyton » qui signifie « plante » et « therapein » qui signifie « soigner ». C'est une méthode alternative de traitement par des médicaments d'origine chimique. En général le médicament est obtenu en extrayant ces parties de la plante : racines, feuilles, écorce, fruits... contenant les principes actifs.

Aujourd'hui les médicaments chimiques ne proviennent que de la nature et bien souvent des plantes, dans le domaine des maladies internes, dermatologie et cosmétologie, et aussi en balnéothérapie [17].

#### **b. Différents types de la phytothérapie**

Il existe plusieurs types de phytothérapie [18]:

- Aromathérapie : c'est une thérapie à base d'essences de plantes, d'huiles essentielles ou de substances aromatiques secrétées par de nombreuses familles de plantes, ces huiles sont des produits complexes qui sont souvent utilisé à travers la peau.
- Gemmothérapie : elle est fondée sur l'utilisation d'extrait alcoolique de tissus jeunes de végétaux comme les bourgeons et les radicules.
- Herboristerie: c'est une méthode de phytothérapie classique et ancienne. L'herboristerie se sert de la plante fraîche ou séchée, elle utilise la plante entière ou une partie de celle-ci. La préparation est basée sur des méthodes simples, généralement à base d'eau :

décoction, infusion, macération. Ces préparations se présentent sous forme de gélule de poudre de plante sèche que le sujet avale.

- Homéopathie : elle utilise principalement les plantes d'une façon prépondérante, mais non exclusive, les trois quarts des souches sont d'origine végétale, le reste sont d'origine minérale et animale.
- Phytothérapie pharmaceutique: elle a recours aux produits d'origines végétales obtenus par extraction, qui sont dilués dans de l'éthanol ou dans un autre solvant. Ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour produire un effet soutenu et rapide. Ils se présentent sous forme de sirop, de gouttes, de gélules...

### **c. Avantages de la phytothérapie**

- Bien que la médecine moderne ait fait de grands progrès, la phytothérapie peut fournir de multiples avantages. N'oublions pas que, sauf pour les cent dernières années, les hommes n'ont pas eu que les plantes pour se soigner, que ça soit pour des maladies bénignes tels que le rhume ou la toux, ou plus sérieuses telles que la tuberculose et le paludisme.
- La phytothérapie qui repose sur des remèdes naturels est bien acceptée par le corps humain, et généralement liée aux traitements classiques. Aujourd'hui, elle connaît un renouveau extraordinaire en occident, en particulier dans le traitement des maladies chroniques tels que l'asthme ou l'arthrite [19].
- Les huiles essentielles occupent une place importante dans notre vie quotidienne, les hommes les utilisent autant pour se parfumer, pour la nourriture ou même pour se soigner. Beaucoup de travaux ont été faits dans ce sens, du fait de la grande importance des huiles essentielles dans divers secteurs économiques, tels que l'industrie de la parfumerie et de la cosmétique, l'industrie alimentaire et l'industrie pharmaceutique [20].
- L'association d'un traitement phytothérapeutique renforce l'efficacité du remède chimique, et peut diminuer ses effets secondaires. Il est possible d'adapter les posologies du remède chimique une fois qu'il est associé au traitement à base de plante. En plus, la phytothérapie peut être une alternative aux molécules de synthèse lorsque celles-ci ne sont plus tolérées ou acceptées par le malade. On peut citer comme exemple le cas des antidépresseurs, des anti-inflammatoires, ou encore des anxiolytiques [21], selon une étude des résultats ont montrés que 10 à 20% des hospitalisations sont dues aux effets indésirables des médicaments chimiques [15].

#### **d. Inconvénients de la phytothérapie**

La phytothérapie est une thérapie qui peut être toxique, c'est pour ça qu'elle exige un certain nombre de précautions :

- ❖ Avoir une bonne connaissance des plantes car certaines d'entre elles peuvent être toxiques ou peuvent manifester des réactions allergiques à certains sujets.
- ❖ Il faut être très attentif aux doses, en particulier pour les enfants, les femmes enceintes et les personnes âgées.
- ❖ Certaines plantes ne peuvent pas être utilisées en même temps avec d'autres médicaments, et peuvent présenter une certaine toxicité si le dosage est augmenté ou si le temps de traitement est prolongé [22].

### **3. Métabolites secondaires**

La vie sur terre est liée rigoureusement à la fabrication des plantes. Ces plantes peuvent produire des substances naturelles très variées. Ces substances sont appelées métabolites secondaires représentant une source de molécules très importante qui est utilisable par l'homme, et elle est en particulier illustrée dans le domaine thérapeutique [23].

Ces composés se trouvent dans différentes parties de la plante (racines, tiges, feuilles...). Peu importe les parties et les formes sous lesquelles ces substances sont métabolisées, ils sont infiniment complexes du point de vue structure et composition chimique.

Ces métabolites existent dans diverses parties de la plante, mais ils sont répartis selon leurs rôles et cette répartition change d'une plante à une autre [24]. Cependant, des milliers de constituants sont produits par ces métabolites, dont seulement quelques-uns d'entre eux sont responsables de l'effet thérapeutique [25].

Ces substances sont fabriquées en faible quantité, et ils sont répartis selon leur appartenance chimique [26,27]. Ces classes sont : les composés phénoliques, les alcaloïdes et terpènes. Chacune d'elles renferme une grande variété de composés qui possèdent une gamme très large d'activités en biologie humaine [27,28].

#### **a. Les composés phénoliques**

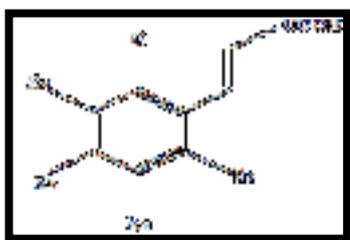
Les polyphénols sont considérés comme des composés quasi-universels des végétaux. Ils se répartissent structurellement en plusieurs catégories, en commençant par des composés qui présentent un simple noyau phénolique (tel que l'acide gallique) à des composés complexes polymériques comme les tanins. Ces composés constituent les principes actifs de plusieurs plantes médicinales [29].

Les principales classes des composés phénoliques sont : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tannins.

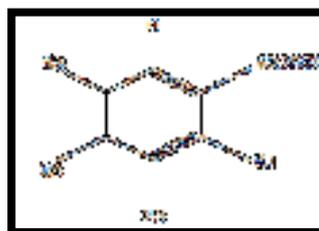
➤ Les acides phénoliques

Les composés phénoliques sont un grand groupe de substances organiques cycliques, ils sont caractérisés par d'un ou de plusieurs cycles benzéniques qui portent un ou plusieurs groupement hydroxyles qui est libres ou qui participe dans une autre fonction : ester, éther, hétéroside[30]. Effectivement, les composés phénoliques, constituent la catégorie la plus nombreuse et la plus répandues dans le règne végétal, qui compte plus de 8000 structures phénoliques connus [31]. Ils sont représentés en deux sous classes qui sont [32] :

- ❖ L'acide hydroxy-cinnamique.
- ❖ Les dérivés de l'acide hydroxy-benzoïque.



**Figure 1:** Acide hydroxycinnamique



**Figure 2:** Acide hydroxybenzoïque

➤ Les flavonoïdes

Les flavonoïdes, du latin flavus qui veut dire jaune, sont des substances fréquemment colorées et très répandues dans le règne végétale [33]. Toutefois, il comporte des composés de couleurs différentes et même incolores [34], ils appartiennent à une classe de faible poids moléculaire [35].

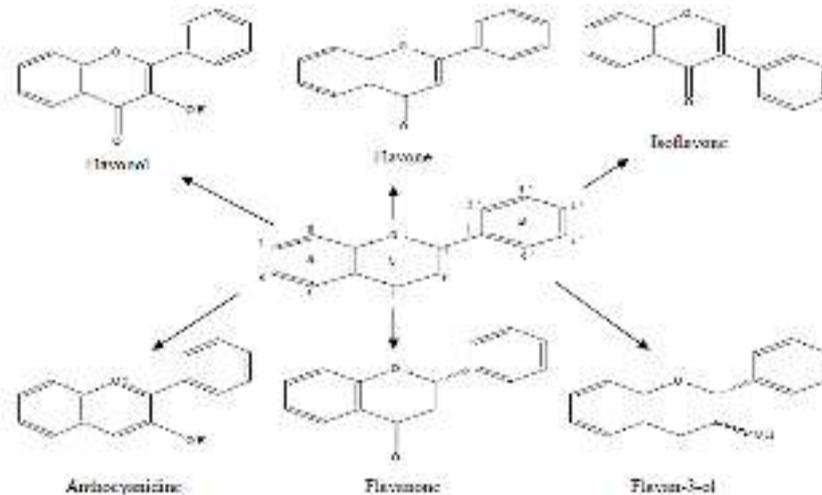
Près de 4000 flavonoïdes ont été identifiés, ils sont situés dans différentes organes (racines, bois, fleurs, feuilles, tiges et fruits) [36]. La fonction primordiale de ces substances est la coloration des plantes [37].

Les flavonoïdes possèdent un squelette de base qui comporte quinze atomes de carbones, constitués de deux noyaux aromatiques et un hétérocycle central de type pyrane. Ils forment une structure du type C6-C3-C6 [38].

Plusieurs classes de flavonoïdes existent, on peut les divisés en six classes principales :

- ❖ Les flavones.
- ❖ Les flavonols.
- ❖ Les flavan-3-ols.

- ❖ Les isoflavones.
- ❖ Les flavanones.
- ❖ Les anthocyanidines.



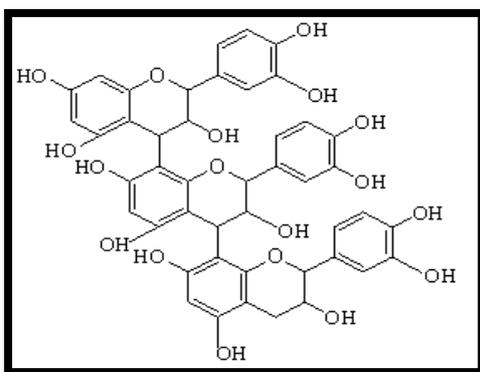
**Figure 3:** Structures chimiques des principaux flavonoïdes[39]

➤ Les tannins

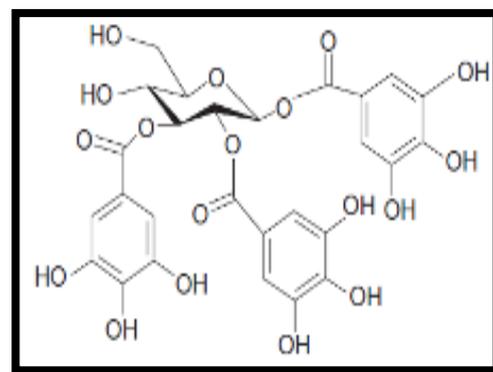
Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure divers et de haut poids moléculaire [40]. Leurs propriétés principales est la combinaison aux protéines [41], cette combinaison est effectuée par l'intermédiaire de liaison hydrogène entre le groupement NH<sub>2</sub> des protéines et les groupements OH des tanins [33].

Les tanins sont divisés structurellement en deux groupes :

- ❖ Les tanins condensés.
- ❖ Les tanins hydrolysables.



**Figure 4:** Structure chimique de tanins Condensés



**Figure 5:** Structure chimique des tannins hydrolysables

## b. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des molécules qui sont caractérisées par la présence un atome d'azote, elles sont d'origine naturelle et elles sont caractérisées par leur forte activité biologique. Elles ont un caractère basique car l'atome d'azote est un accepteur de proton. Malgré que quelques composés azotés soient non cycliques, la plupart d'entre eux sont hétérocycliques tel que la mescaline et la colchicine soient qui sont parfois classés dans les alcaloïdes. Près de 10000 alcaloïdes existent sur terre [42].

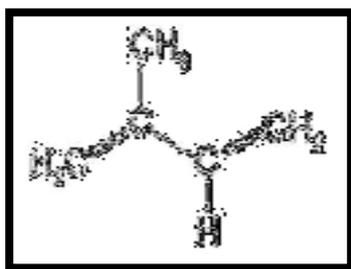
Nous pouvons les trouver dans différentes parties de la plante, mais chez quelques espèces, ils s'accumulent uniquement dans les racines, les écorces, les fruits ou dans les feuilles [43].

Trois grandes catégories d'alcaloïdes existent, et ils sont classés selon la position de l'azote :les alcaloïdes vrais, les pseudo-alcaloïdes, et les proto-alcaloïdes.

- Les alcaloïdes vrais: ils sont dérivés d'acides aminés et possèdent un atome d'azote contenu dans les hétérocycles. Ils existent dans les plantes sous formes libres ou sous forme de sel. Ce groupe représente le plus grand nombres d'alcaloïdes [44].
- Pseudo-alcaloïdes: ils représentent généralement la majorité des caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ils ne dérivent pas des acides aminés.
- Proto-alcaloïdes: ce sont des amines simples qui ne contiennent pas d'azote dans le système hétérocyclique, ils ont une réaction basique et sont produits par les acides aminés *in vivo* [45].

## c. Les terpénoïdes

Les terpénoïdes forment une famille de composés qui sont très répandues dans le monde végétal. Leur particularité structurale principal est la présence d'une unité isoprénique dans leurs squelettes à 5 atomes de carbones (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>) [46].



**Figure 6:** Structure chimique de la molécule d'isoprène.

Selon le nombre d'unités isopréniques qui constituent les terpénoïdes, nous pouvons distinguer les monoterpènes (C<sub>10</sub>), les sesquiterpènes en (C<sub>15</sub>), les diterpènes (C<sub>20</sub>), les triterpènes (C<sub>30</sub>), les tétraterpènes (C<sub>40</sub>) et les polyterpènes qui comportent plus de 500 carbones.

#### 4. Description botanique de la plante étudiée: la *Rhaponticum acaule*

##### a. Introduction

*Rhaponticum acaule* (L) DC, également connu sous le nom de *Leuzea acaulis* L. ou *Centaurea chamaerhaponticum* Ball [4],[47], appartient à la famille des Astéracées qui est une famille importante de plantes à fleurs et qui est considérées comme la plus grande familles d'angiospermes. Elle fait partie des plantes aromatique.

C'est une espèce endémique, communément appelée Tafgha. Elle grandit dans des zones géographiques en Afrique du Nord [5].

##### b. Classification

**Tableau 1:** Classification de la *Rhaponticum acaule*

<b>Règne</b>	<i>Plantae</i>
<b>Sous-règne</b>	<i>Tracheobionta</i>
<b>Division</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Classe</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Sous-classe</b>	<i>Asteridae</i>
<b>Ordre</b>	<i>Asterales</i>
<b>Famille</b>	<i>Asteraceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Rhaponticum</i>
<b>Espèce</b>	<i>Rhaponticum acaule</i>

##### c. Description botanique

La *R. acaule* est une herbe parfumée et vivace qui est disposée en rosette sur le sol. C'est une plante herbacée monocéphalique et n'a pas de tige, ce qui lui donne une caractéristique qui lui permet d'être distingué des autres espèces [5].

Elle possède de grandes feuilles pennatiséqués de 10 à 15 cm. Le capitule est gros et solitaire de 5-6 cm de diamètre et il est disposé au centre de la rosette avec des réceptacles charnus et velus [2].



Figure 7: La *Rhaponticum acaule*

#### **d. Floraison et répartition géographique**

Cette plante est l'une des plus remarquables plantes aromatiques de floraison printanière précoce de Mars à Mai. Elle pousse à l'état sauvage en rosette sur les pentes des collines, des champs et des pâturages sablonneux. C'est une espèce endémique d'Afrique du Nord répartis dans le nord et le centre de la Tunisie [4], et aussi dans le nord-ouest région de la Libye [5] l'ouest de l'Algérie et le Maroc.

Les répartitions géographiques, les exigences environnementales et les cycles de vie sont très diversifiés chez les *Rhaponticum* et les genres apparentés. Ils sont naturellement répartis dans le monde entier Afrique du Nord (y compris les îles Canaries), l'Eurasie, Sibérie et Extrême-Orient, Caucase, l'Asie orientale et l'Australie. Elles poussent dans les déserts ou montagnes, et elles sont soit largement distribués, soit étroitement endémiques. Ils peuvent être pérennes ou annuelles, et leur habitude est arbustive ou hémicryptophyte de 10 cm à > 1 m de hauteur [48].

#### **e. Les genres *Rhaponticum* en médecine traditionnelle**

Les rapports de la littérature suggèrent l'utilisation répandue des espèces de *Rhaponticum* en médecine traditionnelle. Nous pouvons cités quelques-uns [5] :

- ❖ *R. uniflorum*, connu en Chine comme *Qizhouloulu* est utilisée pour la désintoxication, polyarthrite rhumatoïde, fièvre, lactation et anti-athérosclérose [5], [49].

- ❖ *R. carthamoides* est connu sous le nom de racine de Maral en Sibérie et Mongolie. Elle a traditionnellement été utilisée pour améliorer les performances physiques et sexuelles, et améliorer également l'humeur et la concentration. Elle est aussi utilisée comme tonique et anabolisant [3].
- ❖ Une enquête menée par des herboristes a révélé que les racines de *R. acaule* ont été écrasées mélangées avec du miel et sont utilisés comme apéritif, cholagogue, dépuratif, digestif, estomacique et tonique [49,50].

## 5. Activité antioxydante

### a. Les antioxydants

L'antioxydant (AOX) est une molécule qui a la capacité de ralentir ou d'empêcher l'oxydation d'autres substances chimiques en contact avec elle [51]. Il est utilisé pour réduire le stress oxydatif dans notre corps.

Les différents types et sources d'antioxydants sont : enzymatiques et non enzymatiques.

### b. Les radicaux libres

Les réactions des radicaux libres peuvent être observées partout chez les êtres vivants, elles sont plus ou moins directement liées à la reproduction, à la transformation des gènes et à la protection de l'organisme contre les maladies.

Ce sont des substances chimiques (molécules ou atomes) qui portent des électrons non appariés. En raison de la capacité des électrons à se réapparier, cette propriété rend ces substances hautement réactives, ce qui déstabilisent les autres molécules [52].

Ils existent deux sources de radicaux libres :

- Les radicaux libres de source exogène [53]
- ❖ Rayonnement lumineux ionisant: les rayons X et  $\alpha$  ionisants peuvent générer des radicaux libres oxygénés (RLO) en divisant les molécules d'eau. Quand il s'agit des rayons UV, ils forment des RLO en activant des molécules photo sensibilisantes.
- ❖ Le stress: est causé par un facteur personnel ou émotionnel, d'un traumatisme physique...
- ❖ Les substances chimiques :tels que les insecticides, herbicides...
- ❖ L'alcool, le tabac: l'oxydation s'effectue au niveau du cytochrome P450. La fumée des cigarettes contenant du cuivre et du fer stimule la production des radicaux OH•.
- ❖ Les médicaments: les médicaments qui contiennent du fer administrés quantité grande conduisent à la formation de OH• toxique pour l'organisme.

- ❖ Les particules inhalées : la silice, l'amiante... sont susceptibles d'accroître la phagocytose.

- Les radicaux libres de sources endogènes

Différents mécanismes physiologiques produisent les radicaux libres comme : la réaction inflammatoire, la défense antibactérienne, la régulation des fonctions cellulaires létales telle que la mort cellulaire... etc. La plupart de ces radicaux sont formés au cours de métabolisme de l'oxygène (réduction de l'oxygène moléculaire en eau) dans les mitochondries.

Une molécule d'oxygène nous produit deux molécules en présence de quatre électrons comme nous le montre la réaction suivante [53,54] :



### c. Le stress oxydatif

- Définition

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre les capacités de défense antioxydant du corps et la production des espèces radicalaires. Les espèces réactives produisent de l'oxygène qui est utile mais qui peut être fatal pour l'organisme lorsqu'il y'aura une absence et une production excessive du mécanisme de défense [55].

- Stress oxydatif et maladies associés

Le stress oxydatif fait une partie intégrante dans plusieurs maladies; parmi ces maladies nous pouvons citer le diabète, la carcinogénèse, les maladies cardiovasculaires, les maladies auto-immunes (sclérose en plaque), les maladies du système nerveux, les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson...), les problèmes de vision (cataracte), l'immunodépression (SIDA), les maladies respiratoires, les troubles rénaux, les maladies inflammatoires...[53].

## 6. Travaux antérieurs

### a. Rendement

- ❖ Des travaux ont été effectués sur cette plante sur différentes parties. Les résultats été différents pour chaque partie et sur différentes parties. Nous rapportons dans le tableau suivant la composition de diverses parties de cette plante sur différents extraits. Ce travail a été effectué par Bendimered-Mouttas qui a travaillé sur les composés bioactifs et l'étude de l'activité antioxydante de la *Rhaponticum acaule* [49].

**Tableau 2:** La teneur en composés phénoliques de la *Rhaponticum acaule*

<i>R. acaule (L)</i>		Rdt (%)
Capitule	Extrait méthanolique	20.18 ± 2.13
	Ethyle	6.96 ± 1.68
	Extrait de butanol	7.14 ± 0.26
	Extrait de tanin	3.00 ± 0.09
Feuille	Extrait méthanolique	23.96 ± 2.04
	Ethyle	6.04 ± 0.40
	Extrait de butanol	8.32 ± 0.34
	Extrait de tanin	3.59 ± 0.16
Racine	Extrait méthanolique	15.49 ± 1.44
	Ethyle	1.16 ± 0.01
	Extrait de butanol	1.51 ± 0.33
	Extrait de tanin	1.18 ± 0.30

- ❖ Un autre travail réalisé par Benyelles. B a montré que le rendement de l'huile essentielle des racines de la *Rhaponticum acaule* a été de 0,025%, ce travail porte sur une étude comparative utilisant HS-SPME/GC/GC-MS et techniques d'hydrodistillation sur l'huile essentielle des racines de la *R. acaule* [48].
- ❖ Dans le même contexte, le rendement total de l'huile essentielle de la fraction volatiles de la plante obtenues à partir du capitule et de la partie aérienne était de 0,16% et 0,024 % respectivement sur une étude menée par Boussaada. O sur la composition chimique et l'activité antimicrobienne de composants volatils des capitules et des parties aériennes de *Rhaponticum acaule* [2].
- ❖ Le rendement total de la fraction volatile obtenue à partir d'une partie de *R. acaule* était de 0,018%, dans une autre étude effectuée par Mosbah. H qui consiste à l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de la *Rhaponticum acaule*, son effet antioxydant et ces propriétés d'inhibition enzymatique [5].

### **b. La composition chimique**

Les racines de l'huile essentielle de la *R. acaule* ont été analysée par la CPG/SM, qui a révélé que cette huile contenait 42 composés volatils et semi-volatils et ils ont été répartis par classes chimiques distincts : quatorze alcools, six cétones, sept aldéhydes, trois composés terpéniques, quatre alcènes, cinq alcynes, un furane, un alcane et un éther [48].

Tandis que l'analyse par CPG et CPG/SM pour la fraction volatile qui contenait le capitule et la partie aérienne a révélé la présence de 65 composants différents, dont 57 d'entre eux ont été identifiés. Les résultats ont révélé que cette huile a été caractérisée par la prédominance des

diterpénoïdes avec un pourcentage de 23,7% dans l'huile du capitule et de la partie aérienne, les composés aromatiques présent à 22,5% dans le capitule et 23,6% dans la partie aérienne et les sesquiterpènes oxygénés été présent à 22,5 % et 21,3 % respectivement [2].

### c. L'activité antioxydante

Les résultats obtenus par la littérature sur l'activité antioxydante ont été réalisé sur les extraits organiques en utilisant deux méthodes conventionnelles qui sont la méthode du DPPH et la méthode de FRAP. Les résultats ont été regroupé dans le tableau suivant :

**Tableau 3:** Activité antioxydante des extraits organiques de *R. acaule* [49]

<i>R. acaule</i> (L.) DC		IC <sub>50</sub> DPPH (mg/mL)	IC <sub>50</sub> FRAP (mg/mL)
Capitule	Extrait méthanolique	0.76 ± 0.01	1.84 ± 0.19
	Ethyle	0.37 ± 0.01	1.36 ± 0.08
	Extrait de butanol	0.57 ± 0.01	1.51 ± 0.02
	Extrait de tanin	0.35 ± 0.00	1.15 ± 0.05
Feuille	Extrait méthanolique	0.80 ± 0.03	2.61 ± 0.03
	Ethyle	0.67 ± 0.00	1.79 ± 0.01
	Extrait de butanol	0.58 ± 0.02	1.88 ± 0.06
	Extrait de tanin	0.38 ± 0.01	1.32± 0.03
Racine	Extrait méthanolique	0.31 ± 0.05	1.06 ± 0.02
	Ethyle	0.36 ± 0.02	1.19 ± 0.01
	Extrait de butanol	0.42 ± 0.04	1.76 ± 0.01
	Extrait de tanin	3.95 ± 0.01	2.39± 0.02
Acide ascorbique	/	0.18 ± 0.09	0.79 ± 0.05

La capacité la plus élevée à piéger le DPPH a été observée dans l'extrait phénolique des racines avec une valeur de 0,31 mg/mL, suivi de l'extrait de tannin du capitule avec une valeur de 0,35 mg/mL.

La présence de composés phénoliques dans la partie aérienne de la *R. acaule* est la raison pour laquelle cette plante possède une activité antioxydante car les composés phénoliques peuvent piéger le radical et le stabiliser.

Pour la méthode de FRAP, la valeur la plus basse de la IC<sub>50</sub> a été signalée dans l'extrait méthanolique des feuilles. Tandis que la valeur la plus élevée a été signalée par les racines avec une valeur de 1,06 mg/mL. Tous les extraits présentaient un certain degré de capacité à donner

des électrons, mais les capacités étaient inférieures à celle de l'acide ascorbique avec une valeur de 0,79 mg/ mL.

## **Chapitre II:**

# **Matériel et méthodes**

## 1. Extraction par macération

### a. Principe

La macération est un processus d'immersion d'un solide dans un solvant à température ambiante, pour un certain temps et dans le but d'extraire les constituants solubles.

La quantité de solvant requise est environ de dix à vingt fois la masse de l'échantillon traité [56].

### b. Mode opératoire

La macération consiste à tremper 300g des racines de la *Rhaponticum acaule* dans l'hexane à température ambiante pendant trois semaines. Une filtration est ensuite effectuée dans un erlen munie d'un entonnoir avec du papier filtre. Le solvant est récupéré avec un évaporateur rotatif pour récupérer l'extrait.



Figure 8 : Les différentes étapes de macération

### c. Détermination du rendement

Le rendement est calculé par la formule suivante [57] :

$$R (\%) = (M_{\text{ext}} / M_{\text{éch}}) * 100$$

Avec :

R : C'est le rendement en %.

$M_{\text{ext}}$ : C'est la masse de l'extrait après évaporation du solvant en gramme.

$M_{\text{éch}}$ : C'est la masse sèche de la plante en gramme.

## **2. Tests phytochimiques**

Afin de prouver s'il existe certains composés appartenant à la famille chimique des métabolites secondaires, nous avons utilisé des tests phytochimiques spécifiques à chaque famille de composés basés sur les réactions de précipitation ou de coloration avec l'utilisation de méthodes décrites dans la littérature [58].

### **a. Les terpènes**

Dans un tube à essai, introduire 1ml d'extrait, 2 mL de chloroforme et 3 mL d'acide sulfurique. La formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase signifie que les terpènes sont présents dans l'extrait.

### **b. Les alcaloïdes**

Le test des alcaloïdes est réalisé par deux réactifs qui sont : le réactif de Mayer et le réactif de Wagner donnant des réactions de précipitations.

Dans deux tubes à essais différents, prendre 0.5 mL de l'extrait et les introduire dans les deux tubes précédents.

Le premier tube est traité par le réactif de Wagner et le deuxième par le réactif de Mayer.

La formation d'un précipité brun ou blanc respectivement révèle la présence d'alcaloïdes.

### **c. Les tannins**

Introduire 1ml d'extrait dans un tube à essai, ajouter 0.5 mL de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ). L'apparition d'une couleur verdâtre ou bleu-noirâtre indique la présence des tannins.

### **d. Les flavonoïdes**

Introduire dans un tube à essai 1ml de l'extrait, ajouter 1ml de HCl (1%) et 3 copeaux de magnésium. La formation d'une couleur rouge ou jaune indique la présence des flavonoïdes.

### **e. Les quinoléines**

Dans un tube à essai, introduire 1 mL d'extrait et ajouter quelques gouttes de NaOH. L'apparition d'un couleur jaune rouge ou violette indique la présence de quinoléines.

### **f. Les saponines**

Dans un tube à essai, introduire 5 mL d'extrait à tester, agité pendant quelques secondes ensuite laissé au repos pendant 15min. si une mousse apparait, cela indique la présence des saponines.



Figure 9: Tests phytochimiques

### 3. Evaluation de l'activité antioxydante par test au DPPH

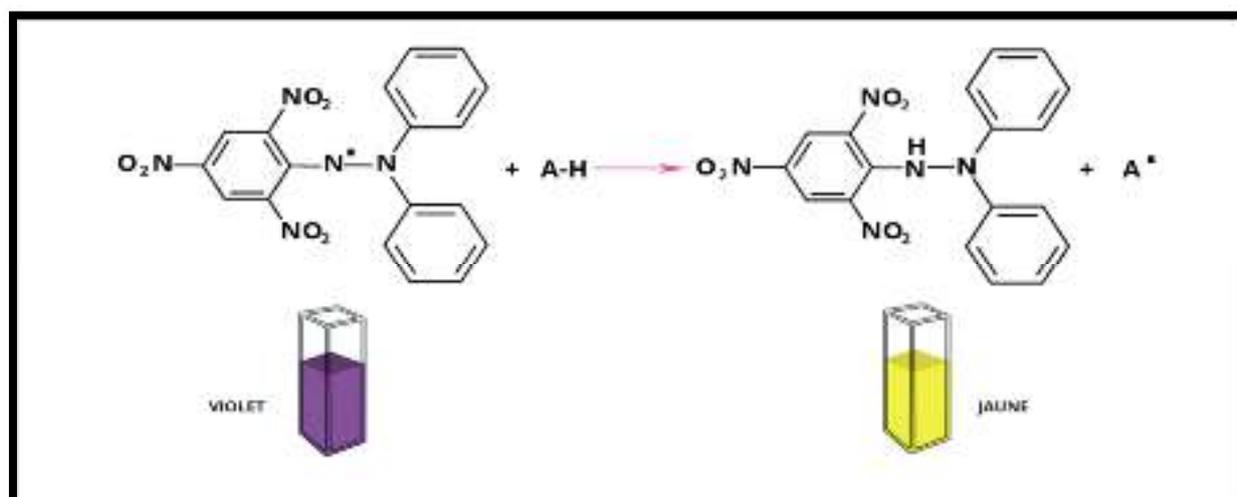


Figure 10 : Forme réduite du radical DPPH

#### a. Principe

Le pouvoir antiradicalaire de l'extrait végétal est évalué par la capacité de piégeage du radical libre DPPH. C'est une méthode qui consiste à mesurer la capacité d'un antioxydant à réduire le radical chimique DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) à l'aide de spectrophotométrie UV-visible, avec la mesure de la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence de l'extrait [59].

L'électron du groupe 2,2-diphényl-1-pyridohydrazine (DPPH) présent dans un atome du pont d'azote n'est pas apparié. En présence de piègeur de radical libre, le DPPH initialement violet se réduit en DPPH-H de couleur jaune pâle [60].

**b. Mode opératoire [61]**

- Préparation de la solution de DPPH : La solution du DPPH a été préparée dans l'acétate d'éthyle à une concentration de 0,03 mg/mL. La solution a été ensuite incubée au réfrigérateur pendant 30min.
- Préparation de l'extrait: Dilution de 300mg d'extrait dans 2 mL d'acétate d'éthyle pour la préparation de la solution mère, ensuite on prend 1mL de cette solution et on lui ajoute 1 mL d'acétate d'éthyle. On refait la même opération avec les cinq autres tubes restants. On ajoute 1 mL de DPPH dans chaque tube et on les met sous incubation pendant 30min.
- Mesures spectrométriques: La lecture de l'absorbance est faite à 517nm contre un blanc qui ne contient que l'acétate d'éthyle. L'acide ascorbique représente le contrôle positif d'une solution d'un antioxydant standard dont la mesure de l'absorbance a été faite dans les mêmes conditions que celles des échantillons.



**Figure 11** : Mode opératoire pour la préparation de la solution du DPPH, de l'extrait ainsi que la mesure avec le spectrophotomètre

### **c. Expression des résultats**

#### ➤ Calcul des pourcentages d'inhibition

La formule du pourcentage d'inhibition du DPPH est la suivante [62] :

$$I (\%) = [(A_b - A_e) / A_b] \times 100$$

Avec:

I (%) : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH ;

A<sub>b</sub> : Absorbance du contrôle ;

A<sub>e</sub>: Absorbance de l'échantillon.

#### ➤ Calcul des concentrations efficaces IC<sub>50</sub>

Concentration inhibitrice de 50 % ou IC<sub>50</sub> est utilisée pour le calcul de la concentration de l'échantillon qui est nécessaire pour réduire 50% des radicaux DPPH. Cette concentration est calculée graphiquement par la régression linéaire des graphes tracés et le pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des échantillons utilisées [63].

## **4. Réduction du fer par la méthode FRAP (Ferric reducing antioxidant power)**

### **a. Principe**

La capacité réductrice d'un extrait est liée à son pouvoir anti radicalaire. C'est une technique qui permet de mesurer la capacité d'un extrait à réduire le fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) présent dans le complexe [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>) [64]. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur de l'extrait testé.

### **b. Mode opératoire [65]**

On prend 250 mg de l'extrait et nous le diluons dans l'éthanol, on obtient alors la solution mère. On prend ensuite 0.5 mL de cette solution et on ajoute 0.5mL d'éthanol. On refait cette opération avec les tubes restant.

1 mL de l'extrait est mélangé avec 1.25 mL d'une solution tampon (0,2 M ; pH : 6,6) et 1.25 mL d'une solution de ferricyanure de potassium [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] à 1 %. Les tubes sont ensuite incubés dans une étuve à 50 °C pendant 20 minutes. Après refroidissement des tubes à température ambiante, 1.25 mL TCA (acide trichloracétique) à 10 % est ajouté pour stopper la réaction. Agiter les tubes pendant dix minutes. Nous prélevons 0,5 mL du surnageant auxquels nous ajoutons 1.25 mL d'eau distillée. Nous additionnons après au mélange 0.25 mL de chlorure de fer (FeCl<sub>3</sub>) à 0,1 %. La lecture de l'absorbances est effectuée

contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions.



**Figure 12:** Réduction du fer par la méthode FRAP

## **5. Chromatographie sur colonne**

### **a. Définition de la chromatographie**

La chromatographie est une méthode d'analyse physique fondée sur la séparation des composants du mélange. Les différents composants de ce mélange sont appelés solutés, et le fluide (liquide ou gaz) est appelé phase mobile, il sépare et entraîne les composants. Ils interagissent ou non avec une phase fixe que l'on appelle phase stationnaire qui exerce un effet retardateur sur eux [66].

### **b. Chromatographie sur colonne**

- Principe : Le botaniste Mikhail Tswelt a exécuté cette technique en 1906, et elle est appliquée dans nos laboratoires jusqu'à nos jours [67]. Cette technique est basée sur le phénomène d'absorption, dans lequel les molécules sont aspirées vers le bas de la colonne chromatographique à une vitesse variable en fonction de leur affinité pour l'absorbant et leur solubilité dans l'éluant, les produits non polaires sont élués les premiers. La chromatographie sur colonne est une méthode pour séparer les composants d'un mélange en migrant dans un dispositif composé de deux phases :

Phase stationnaire: il s'agit d'un support solide, qui est la colonne contenant une quantité de gel silice.

La phase mobile : Qui représente le solvant d'éluion utilisé, qui est généralement un mélange de deux solvants polaire apolaire.

- Protocole : On commence tout d'abord par remplir la colonne avec le gel de silice en mettant dans un bécher le gel de silice en poudre, et en ajoutant le solvant qui est l'éther de pétrole dans notre cas qui joue le rôle d'éluant. Ensuite on ajoute notre extrait dans la colonne. Le solvant doit être ajouté au fur et à mesure que l'extrait soit entraîné vers le bas de la colonne. De petites fractions sont recueillies à la fin et doivent être soumis à un control chromatographique sur couche mince.



**Figure 13** : Colonne chromatographique

### **c. Chromatographie analytique sur couche mince (CCM)**

- Principe: La méthode est basée sur la séparation des différents composants de l'extrait en fonction de leur mobilité dans la phase mobile (généralement un mélange de solvants), adapter au type de séparation requis et à son affinité pour la phase stationnaire qui peut être un gel de polyamide ou de silice [66].
- Protocole: Les fractions récupérées de la colonne vont être suivis par une CCM. On prépare tout d'abord la cuve chromatographique. On dépose ensuite de chaque fraction un échantillon dans la plaque, on la met dans la cuve et on suit le développement chromatographique. Les taches sont révélées sous une lampe UV.

## **6. Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (CPG/SM)**

### **a. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

La chromatographie en phase gazeuse est une technique d'analyse par séparation qui s'applique aux composés à l'état gazeux [68]. Un appareil de chromatographie en phase gazeuse se compose de trois parties qui sont l'injecteur, la colonne et le détecteur à travers lesquelles le gaz vecteur entraîne les substances du mélange à séparer. L'hélium est le gaz vecteur qui est le plus utilisé, les autres gaz sont l'hydrogène, l'azote et l'argon. Le débit du gaz est réglé par un régulateur. Le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée de la colonne chromatographique qui contient des substances actives solides ou liquides appelée phase stationnaire, ensuite il est transporté à travers celle-ci à l'aide de gaz vecteur. Les molécules du mélange vont être séparées et vont être sorties de la colonne les unes après les autres après un certain temps et cela dépend de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules.

### **b. Spectrométrie de masse (SM)**

La spectrométrie de masse est une technique destructive qui permet un accès simultané à la masse moléculaire de la substance et l'obtention de ses données structurales : la substance ionisée est dans un état excité, c'est ce qui provoque sa fragmentation. L'analyse de ces fragments nous renseigne sur la structure de la molécule. Chaque ion formé se caractérise par son rapport masse/charge ( $m/z$ ). L'appareil peut séparer ces ions via un champ magnétique et de les détecter/caractériser qualitativement et quantitativement.

### **c. Couplage CPG/SM**

La technique démarre comme une chromatographie en phase gazeuse normale. Un échantillon sous forme liquide volatil est inséré en tête de colonne dans l'injecteur à l'aide d'une micro-seringue. La colonne chromatographique est balayée en continu par le gaz vecteur, les divers composants de l'échantillon vont être entraînés et amenés à se détacher les uns des autres en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire [69]. Quand ces composants seront séparés, ils seront détectés en sortie de colonne par un détecteur, le spectromètre de masse. Les composants seront introduites directement dans le spectrophotomètre qui est relié au chromatographe.

Une source ionise les composants à l'intérieur de l'appareil et vaporise les différentes molécules. La source la plus utilisée est l'ionisation électronique (EI) [70]. Pour ce type d'ionisation, la source est un réseau électrique à deux entrées et sorties permettant le transfert d'énergie. Les molécules sont dans ce cas bombardées par des électrons libres produites par un

filament (cathode ou anode). L'interaction des électrons et des molécules neutres produit des ions moléculaires qui sont chargés positivement. Les molécules qui ne sont pas ionisées sont éloignées de la source par le vide poussé. Les ions moléculaires produits dans la source seront accélérés et focalisés [71].

La séparation des ions qui s'effectue dans l'analyseur de masse à quadripôle. Grâce à un champ magnétique, les ions vont osciller le long de l'axe des  $z$  du filtre quadripolaire pour que seulement les ions de rapport masse sur charge ( $m/z$ ) choisis puissent traverser le filtre quadripolaire et se rendre jusqu'au détecteur.

Pour la détection des ions, ils seront récoltés sur un multiplicateur d'électrons. Le détecteur convertit les ions en signal électrique, et amplifie le signal obtenu pour permettre le traitement informatique, c'est-à-dire l'obtention de spectre [72].

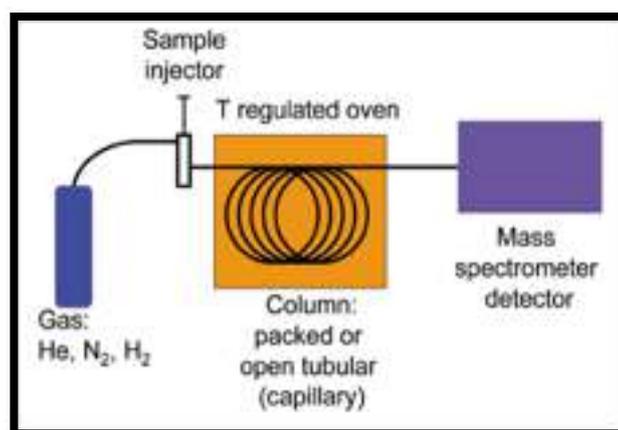


Figure 14 : Schéma de la CPG/SM

# **Chapitre III:**

## **Résultats et discussion**

## 1. Rendement

Les résultats obtenus pour le calcul du rendement sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 4** : Rendement de l'extrait à l'hexane des racines de la *Rhaponticum acaule*

Espèce	Poids des racines (g)	Poids de l'extrait (g)	Rendement (%)
<i>Rhaponticum acaule</i>	300	1.87	0.62

À partir des travaux antérieurs réalisés auparavant, les rendements des différents extraits de la plante ont été regroupé dans le **Tableau 2**.

Notre travail était sur l'extrait à l'hexane des racines de la *Rhaponticum acaule*, nous avons obtenus un rendement avec une valeur de 0.62 %, notre rendement est faible par rapport à la quantité de racines utilisé.

## 2. Résultats des tests phytochimiques

Les tests phytochimiques réalisés nous ont permis de mettre en évidence la présence de quelques métabolites secondaires présent dans la plante étudiée par des réactions qualitatives de caractérisation (précipitation ou coloration par des réactifs spécifiques).

Les résultats sont résumés dans le **Tableau 5**:

**Tableau 5 :** Résultats des tests phytochimiques de l'extrait à l'hexane de la *Rhaponticum acaule*

Groupes chimiques		Résultats
Terpénoïdes		+++
Alcaloïdes	Réactif de Wagner	+++
	Réactif de Mayer	-
Tannins		-
Flavonoïdes		-
Quinoléines		-
Saponines		-
Réaction fortement positive : +++ , Réaction moyennement positive : ++ , Réaction faiblement positive : +, Réaction négative : -		

Les résultats du screening phytochimique réalisés sur l'extrait à l'hexane des racines de la *Rhaponticum acaule* montrent une très forte présence en terpénoïdes et en alcaloïdes avec le réactif de Wagner.

En contrepartie, on remarque une absence totale des tannins, de flavonoïdes, de quinoléines et de saponines dans cet extrait.

Cette étude nous a montré que l'extrait à l'hexane des racines de la plante était pauvre en métabolites secondaires, mais les composés qu'elle possède contiennent beaucoup de propriétés biologique et pharmacologique, tels que :

Les alcaloïdes ont divers propriétés biologiques [73]. À faible dose, ce sont des anesthésiques locaux, antibiotique, analgésique, antiparasitaire, antipaludique et anti-tumoraux [74]. Ils ont également des effets sur le système nerveux central [75].

Les terpénoïdes ont aussi des activités biologiques et pharmacologiques variées: anti-inflammatoire, antiviral, analgésiques, antibactériennes et antifongiques [76].

### 3. Evaluation de l'activité antioxydante

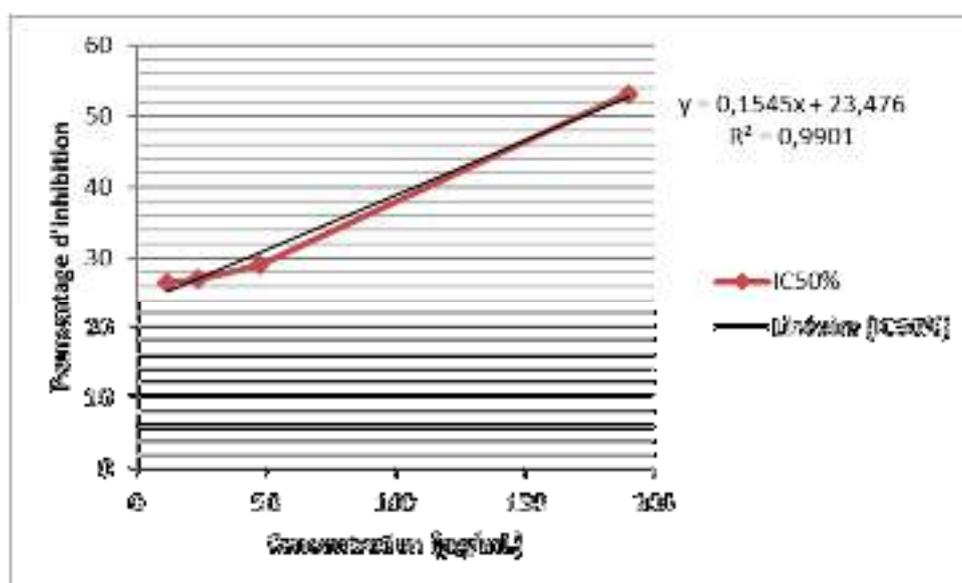
#### a. Par la méthode DPPH

Des travaux antérieurs ont été réalisés sur différentes parties de la *Rhaponticum acaule* sur l'activité antioxydante exprimés en DPPH pour différents extraits. Les résultats ont montré que tous les extraits ont été impliqués dans le transfert de protons et que la plus grande capacité à piéger la DPPH a été observée dans l'extrait phénolique des racines avec une valeur de 0,31 mg/mL, suivi de l'extrait de tanins du capitule avec 0,35 mg/mL. Pour l'extrait au dichlorométhane la valeur été de 0,12 mg/mL [77], et la IC<sub>50</sub> de l'extrait méthanolique été de 0,21 mg/mL [78] .

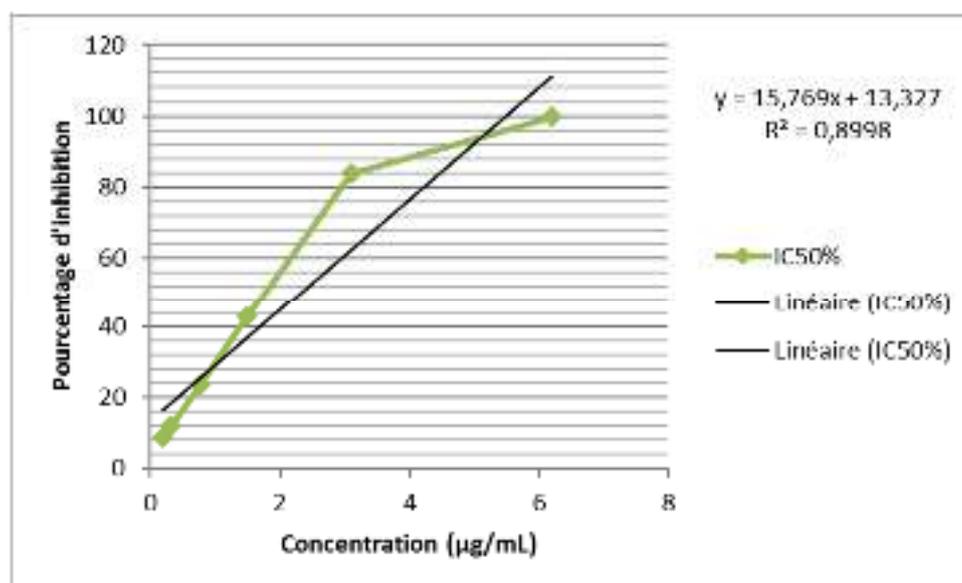
Les résultats de l'activité par la méthode du DPPH sont regroupés dans le tableau et la figure ci-dessous :

**Tableau 6:** Résultats de l'activité antioxydante par la méthode du DPPH

<b>Concentration (µg/mL)</b>	190	47,5	23,75	11,875
<b>Absorbance</b>	0.288	0.436	0.448	0.451
<b>Activité antioxydante (%)</b>	53.17	29.11	27.15	26.67



**Figure 15:** Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de L'extrait à l'hexane



**Figure 16 :** Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de L'acide ascorbique

À partir de l'équation linéaire obtenue, nous pouvons déterminer la valeur de la  $IC_{50}$  en extraits et en antioxydants standard. Plus la valeur de  $IC_{50}$  est petite, plus l'extrait à l'hexane de la *Rhaponticum acaule* a une forte activité antioxydante.

Les valeurs des  $IC_{50}$  de l'extrait à l'hexane et de l'acide ascorbique qui permettent d'inhiber l'effet de 50% du DPPH sont rapportées dans le tableau suivant :

**Tableau 7:** Les valeurs des concentrations d'inhibitions  $IC_{50}$

	Extrait de <i>Rhaponticum acaule</i>	Acide ascorbique
$IC_{50}$ (µg/mL)	171.67	2.32

Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait à l'hexane des racines de la *Rhaponticum acaule* montrent une  $IC_{50} = 171.67 \mu\text{g/ml}$  qui est beaucoup plus élevée que la  $IC_{50}$  enregistré pour l'acide ascorbique qui est égale à  $2.32 \mu\text{g/ml}$ . L'activité de l'extrait est inférieure à celle de l'acide ascorbique, on peut donc dire que l'extrait à l'hexane de cette plante possède une faible activité.

En comparant les résultats obtenus avec ceux de la littérature, l'activité antioxydante des différents extraits et l'utilisation des différentes parties de la plante qui ont fait l'objet des études

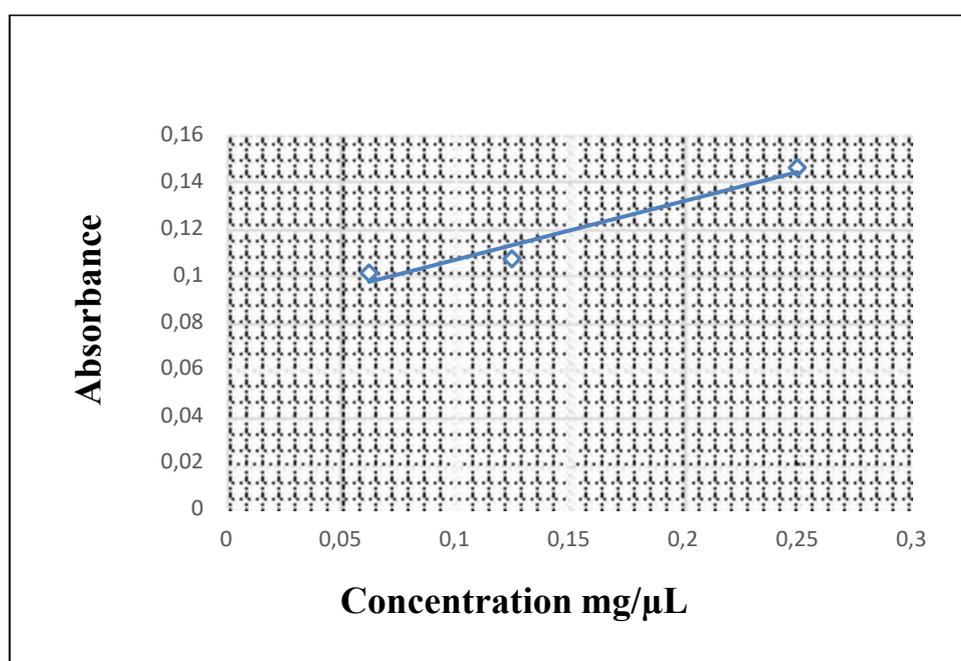
antérieures ont donné de bon résultat, mais même l'extrait à l'hexane de notre plante possède un pouvoir réducteur pour neutraliser les radicaux libres DPPH.

**b. Par la méthode de FRAP**

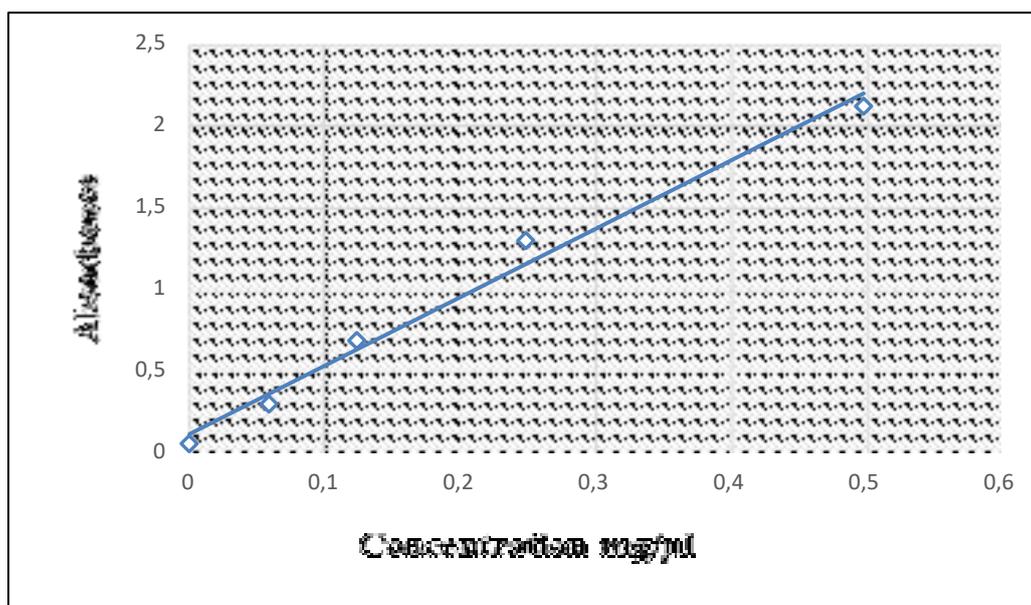
Les résultats obtenus par la méthode de FRAP sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 8** : Résultats de l'activité antioxydante par la méthode de FRAP

<b>Concentration (mg/μl)</b>	0.25	0.125	0.0625
<b>Absorbance</b>	0.146	0.107	0.101



**Figure 17** : Pouvoir réducteur de l'extrait à l'hexane de la *Rhaponticum acaule*



**Figure 18 :** Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique

L'activité antioxydante de l'extrait à l'hexane de la plante étudiée a été évaluée en utilisant la méthode de réduction du fer (FRAP). Cette dernière est un test simple, rapide et reproductible. Cette méthode est universelle et elle peut être appliquée sur les plantes et les différents extraits organiques et aqueux.

La méthode de FRAP est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique  $Fe^{3+}$  en fer ferreux  $Fe^{+2}$ . Quand l'absorbance augmente, cela nous indique que le pouvoir antioxydant de notre échantillon augmente.

Dans notre travail, l'acide ascorbique est utilisé comme antioxydant de référence.

Les résultats obtenus sont illustrés dans la **Figure 17** qui nous montre que la capacité du fer à se réduire augmente en fonction des concentrations utilisés.

On remarque donc que le pouvoir réducteur de l'extrait à l'hexane de la *Rhaponticum acaule* augmente avec l'augmentation de la concentration mais il reste inférieur au pouvoir réducteur de l'acide ascorbique.

#### **4. Chromatographie sur colonne**

0.75 g de notre extrait a été diluée et fractionner dans une colonne ouverte de gel de silice. En utilisant l'éther de pétrole comme éluant, des fractions ont été collectées dans de petits flacons. Une CCM a été réalisée pour toutes les fractions collectées.

À l'issue de ce fractionnement, les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 9**:

**Tableau 9** : Nombre de fractions collectées et leurs nombres de taches

<b>Fractions recueillies</b>	<b>Nombres de taches</b>
[1-5]	Rien
[6-10]	Une tache
[11-15]	Une tache
[16-20]	Une tache
[21-25]	Rien
[26-30]	Rien

La CCM nous a permis de séparer les différents constituants du mélange. Ensuite, nous avons recueilli les flacons qui contiennent le produit majoritaire et nous avons éliminé le solvant à l'aide de l'évaporateur rotatif. La masse du produit obtenue est égale à 0.06 g, donc le rendement du produit majoritaire est égal à 8%.

## *Conclusion*

---

Les plantes occupent de nos jours une place très importante dans la médecine traditionnelle car elles sont largement employées dans plusieurs domaines de santé. L'utilisation de ces plantes en phytothérapie a reçu un très grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante que la chimiothérapie.

Ces plantes sont toujours une source fiable de principes actifs car elles sont connues par leurs diverses propriétés thérapeutiques. De plus la recherche de l'activité antioxydante de ces plantes est devenue rapidement un champ actif de la pharmacologie.

Ce travail a été consacré aux tests phytochimiques, à l'évaluation de l'activité antioxydante, et à l'isolement du composé majoritaire de l'extrait à l'hexane des racines de la *Rhaponticum acaule*.

Les tests phytochimiques réalisés sur cette espèce nous ont permis de prouver qu'il existe des composés appartenant à la famille chimique des métabolites secondaires, les alcaloïdes et les terpénoïdes qui sont dotés de diverses propriétés pharmacologiques.

L'étude du pouvoir antioxydant de l'extrait de la *Rhaponticum acaule* par la méthode du DPPH et la méthode de réduction du fer a montré que cette plante possède un pouvoir réducteur pour neutraliser les radicaux libres DPPH, et possède aussi un pouvoir pour réduire le fer ferrique  $Fe^{3+}$  en fer ferreux  $Fe^{2+}$ , mais il reste inférieur à celui de l'acide ascorbique qui a été choisi comme référence.

L'isolement du produit majoritaire a été effectué par une chromatographie sur colonne. Cependant, l'identification de ce produit est en cours de réalisation car la *Rhaponticum acaule* est une plante qui est peu connue et peu de travaux ont été réalisés sur cette espèce.

De nombreuses perspectives pourraient être envisagées tels que :

- Evaluer l'activités antioxydante du produit majoritaire, et utiliser d'autres méthodes d'évaluation.
- Une valorisation biologique par l'étude de l'activité antidiabétique, anticancéreuse ou encore l'activité hémolytique de l'extrait hexanoïque de cette plante ainsi que du produit majoritaire.
- Etudier d'autres parties de cette espèce, avec d'autres extraits.

- (1) NACE International. Glossary of Corrosion Related Terms. **2007**. Wwww. Nace.Org .
- (2) Boussaada, O.; Ammar, S.; Saidana, D.; Chriaa, J.; Chraif, I.; Daami, M.; Helal, A. N.; Mighri, Z. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Volatile Components from Capitula and Aerial Parts of *Rhaponticum Acaule* DC Growing Wild in Tunisia. *Microbiological Reseach.* **2008**, *163* (1), 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.02.010>.
- (3) Lebrini. M. These de Doctorat, Lille (France). **2005**.
- (4) Zughdani, M.; Yusufoglu, H. S.; Ekiz, G.; Linden, A.; Çalış, İ. Ecdysteroids from the Underground Parts of *Rhaponticum Acaule* (L.) DC. *Phytochemistry.* **2020**, *180*, 112530. <https://doi.org/10.1016/j>.
- (5) Mosbah, H.; Chahdoura, H.; Kammoun, J.; Hlila, M. B.; Louati, H.; Hammami, S.; Flamini, G.; Achour, L.; Selmi, B. *Rhaponticum Acaule* (L) DC Essential Oil: Chemical Composition, in Vitro Antioxidant and Enzyme Inhibition Properties. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* **2018**, *18* (1), 79. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2145-5>.
- (6) Omar, A.; Mohammed, H. Plantes Médicinales et Aromatiques Deuxième Édition , Installations Connaissances d’Alexandrie. **1993**, 13-134.
- (7) Ahmad, F. A. Plantes Médicinales et Aromatiques Dans Le Monde Arabe, l’agriculture et La Fabrication de Plantes Medicinal dans le monde arabe. Institution arabe pour les études et publication. **1995**, 2-22.
- (8) Farnsworth, N.; Norman, R.; Akerele, O.; Bingel, A. S.; Soejarto, D. D.; Guo, Z. Places Des Plantes Médicinales Dans La Thérapeutique. *Bulletin of the World Health Organization.* **1986**, *64* (2), 159 - 175.
- (9) Decaux, I. Phytothérapie: Mode d’emploi. Ed: Le Bien Public. **2002**, 6-7.
- (10) Pinto, E.; Pina-Vaz, C.; Salgueiro, L.; Gonçalves, M. J.; Costa-de-Oliveira, S.; Cavaleiro, C.; Palmeira, A.; Rodrigues, A.; Martinez-de-Oliveira, J. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Thymus Pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and *Dermatophyte* Species. *Journal of Medical Microbiology.* **2006**, *55* (10), 1367–1373. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46443-0>.
- (11) Bone, K.; Mills, S. Principles and Practice of Phytotherapy: Modern Herbal Medicine. Elsevier Health Sciences. **2012**.
- (12) Williamson, E. Synergy and Other Interactions in Phytomedicines. *Phytomedicin.* **2001**, *8* (5), 401–409. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00060>.

## *Références bibliographiques*

---

- (13) Verdrager, J. Ces Médicaments Qui Nous Viennent Des Plantes : Oules Plantes Médicinales Dans Les Traitements Modernes. Maloine. **1978**.
- (14) Anonyme. L'ABC Des Plantes : Guide Pratique de La Phytothérapie. Marseille. Romat-Édition. **1999**.
- (15) Iserin, P. Larousse Encyclopédie Des Plantes Médicinale : Identification, Préparation, Soins. Londres : Larousse. **2001**.
- (16) Wichtel, M.; Anton, R. Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Tec et Doc, **2003**.
- (17) Volak, J.; Stodola, J. Plantes Médicinales. Artia, Prague. **1983**.
- (18) Strang, C.; Caron, A.; Bar, C. Larousse Médical. Larousse. **2006**, 26.
- (19) Iserin, P.; Masson, M.; Restellini, J. P.; Ybert, E.; De Laage de Meux, A.; Moulard, F.; Zha, E.; De la Roque R.; De la Roque, O.; Vican, P.; Deelesalle –Féat, T.;Biaujeaud, M.; Ringuet, J.; Bloth, J. et Botrel, A. Larousse des plantes médicinales : Identification,préparation, soins. Larousse. **2001**, 10-12.
- (20) AFNOR. Huile essentielle. Échantillonnage et Méthodes d'analyses monographique relatives aux huiles essentielles (Tome 2). **2000**.
- (21) Chabrier, J.Y. Plantes Médicinales et Formes d'utilisation En Phytothérapie. Thèse de Pharmacie :Université Henri Poincare-Nancy 1. **2010**.
- (22) Mahmoudi, Y. La thérapeutique par les plantes. Palais du livre, Blida. **1992**, 128. Roux ,D. Les nouvelles plantes qui soignent. Alpen, Paris. **2005**, 21.
- (23) Marín, F. R.; Frutos, M. J.; Pérez-Alvarez, J. A.; Martinez-Sánchez, F.; Del Río, J. A. Flavonoids as Nutraceuticals: Structural Related Antioxidant Properties and Their Role on Ascorbic Acid Preservation. *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier, **2002**, 26, 741–778. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(02\)80018-7](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(02)80018-7).
- (24) Chaouche, T.M.; Haddouchi, F.; Atik-Bekkara, F. Identification of shikonin from the roots of *Echium Pycnanthum Pomel*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. **2012**, 5 (3): 13.
- (25) Hogan, D. Why Are Bacteria Refractory to Antimicrobials. *Current Opinion in Microbiology*. **2002**, 5 (5), 472–477. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00357-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00357-0).
- (26) Cuendet, M.; Hostettmann, K.; Potterat, O. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*. **1999**, 80, 1144-1152.

## *Références bibliographiques*

---

- (27) Vermeris, W.; Nicholson, R. Phenolic Compound Biochemistry. Springer Science & Business Media. **2007**.
- (28) Bruneton, J. Pharmacognosie : Phytochimie & Plantes Médicinales. 2<sup>e</sup>; 3<sup>e</sup> éd. Techniques et Documentation. **1993, 1999**.
- (29) Sarni-Manchado, P.; Cheynier, V. Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier. **2006**.
- (30) Macheix, J.-J.; Fleuriet, A.; Jay-Allemand, C. Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Lausanne, Presses Polytechniques et universitaires romandes. **2005**.
- (31) Lugasi, A. The Role of Antioxidant Phytonutrients in the Prevention of Diseases. *Acta Biologica Szegediensis*. **2003**, 47 (1–4), 119–125.
- (32) Jean, B. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4<sup>e</sup> éd.). Lavoisier. **2009**.
- (33) Guignard, J. Biochimie Végétale. Lavoisier, Paris. **1996**.
- (34) Richter, G. Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie. Presses polytechniques et universitaires romandes. **1993**.
- (35) Lin, C.-M.; Chen, C.-S.; Chen, C.-T.; Liang, Y.-C.; Lin, J.-K. Molecular Modeling of Flavonoids That Inhibits Xanthine Oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. **2002**, 294 (1), 167–172. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00442-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00442-4).
- (36) Bennick, A. INTERACTION OF PLANT POLYPHENOLS WITH SALIVARY PROTEINS. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. **2002**, 13 (2), 184–196. <https://doi.org/10.1177/154411130201300208>.
- (37) Gabor, M.; Cody, V.; Middleton, E. J.; Harborne, J. B.; Beretz, A.; Liss, A. R. *Plants Flavonoids in Biology and Medicine properties*. New York. **1988**, 1-15.
- (38) Singleton, V. L.; Rossi, J. R. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic – Phosphothungstic Acid Reagents. *American journal of Enology and Viticulture*. **1965**, 16, 144-58.
- (39) Crozier, A.; Clifford, M. N.; Ashihara, H. Plant Secondary Metabolite: Occurrence, Structure and role in the Human Diet. Blackwell Publishing. Oxford, UK. **2006**.
- (40) Atefeibu, E. S. I. Contribution à l'étude des tanins et de l'activité antibactérienne de *Acacia nilotica* var *adansonii*. Thèse de pharmacie. Université de Cheikh Anta Diop de Dakar, Sénégal. **2002**.
- (41) Paris, M.; Hurabielle, M. Abrégé de matière médicale «Pharmacognosie». Tome 1, Generalities, Morphologies. Masson, Paris. **1981**, 256-266.

## Références bibliographiques

---

- (42) Zohra, B. F.; Nassima, M. Etude Des Propriétés Antimicrobienne de *Marrubium Vulgare L.* et *Teucrium Polium*. Mémoire de Master. **2015**.
- (43) Harbornz, J. B.; Baxter, H.; Webster, F. X. Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plant. London, Washington, D.C., Taylor & Francis, **1994**.
- (44) Aniszewski, T. Alkaloids - Secrets of Life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role. Elsevier, **2007**.
- (45) Bruneton, J. Pharmacognosie, phytochimie, Plantes médicinales, 2<sup>e</sup> édition. Tec et Doc, Lavoisier, Paris. **1993**.
- (46) Lamarti, A.; Badoc, A.; Deffieux, G.; Carde, J. P. Biogénèse Des Monoterpènes I- Localisation et Sécrétion. Bull. **1994**, *133*, 69-78.
- (47) [Http://Www.Afd-Ld.Org/~adventices/Especies.Php, Id=59](http://Www.Afd-Ld.Org/~adventices/Especies.Php, Id=59) , [10/04/2017].
- (48) Benyelles, B.; Allali, H.; El Amine Dib, M.; Djabou, N.; Tabti, B.; Costa, J. Essential Oil from *Rhaponticum Acaule L.* Roots: Comparative Study Using HS-SPME/GC/GC-MS and Hydrodistillation Techniques. *Journal of Saudi Chemical Society*. **2014**, *18* (6), 972–976. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2011.12.001>.
- (49) Bendimerad-Moultas, F.; Beghdad, M. C.; El Haci, I. A.; Soualem, Z.; Belarbi, M.; Bekkara, F. A. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of *Rhaponticum Acaule (L.) DC.* *Natural Product Research*. **2020**, *34* (11), 1553–1557. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1516664>.
- (50) Ladoh, Y.; Dibong, S.; Nyegue, M.; Djembissi, T.; Lenta, N.; Mpondo, M.; Yinyang, J.; Wansi, J. Activité Antioxydante Des Extraits Méthanoliques de *Phragmanthera Capitata* (Loranthaceae) Récoltée Sur *Citrus Sinensis*. *Journal of Applied Biosciences*. **2015**, *84* (1), 7636. <https://doi.org/10.4314/jab.v84i1.9>.
- (51) Boudjouref, M. Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*artemisia campestris L.* Thèse de Magister. **2011**.
- (52) Nathalie, C. Effet Protecteur Du Safran Contre La Cardiotoxicité de La Doxorubicine Encondition Ischémique. Thèse De Doctorat.
- (53) Atti, I. Evaluation Des Activités Antioxydant et Antiradicalaire d'un Mélange d'épices « *Ras El Hanout* ». Mémoire De Master.
- (54) Durand, G.; Beaudeau, J.-L. Biochimie médicale: Marqueurs actuels et perspectives, 2<sup>e</sup> Edition, Lavoisier. **2011**.
- (55) Chaouche, T.M.; Haddouchi, F.; Atik-Bekara, F. et Al. Phyto-Chemical Study of Roots and Leaves of the Plant *Echium Pycnan*. *Der pharmacia*. **2011**, *3*(2), 1-4.

## Références bibliographiques

---

- (56) Mahmoudi, S.; Khali, M.; Mahmoudi, N. Etude de l'extraction Des Composés Phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technologie*. **2013**. 35-40.
- (57) Meratate, F. Etude Phytochimique et Pouvoir Biologique Des Métabolites Secondaires de La Plante *Zizyphora Hispanic*. Mémoire de Magister.
- (58) Bechlagham.K. Screening Phytochimique de La Rhapontique, Une Plante Commune Dans Toute l'Algérie Septentrionale. Mémoire de Magister.
- (59) Benzaoui, F.; Houari, A. Contribution à l'étude Des Activités Biologiques de *Broccchia Cinerea*.(Vis.) et *Matricaria pubescens* (Desf.). Mémoire de Master.
- (60) Pélagie, Y.; Togbé, A.; Yaya, K.; Pascal, A.; Vital, N.; Djèntonin, T. S.;Dieudon, W.;Eni-Coffi, A.; Dominique, S. Comparative study of phenolic compounds and radical-scavenging activity of the extracts of seeds of *Garcinia kola* (Guttiféreae) and *Cucumeropsis edulis* (cucurbitacéae) of Benin. *International Journal of Innovation and Scientific Research*. **2015**, 15, 217-227.
- (61) Molyneux, P.The Use of Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*. **2004**, 26, 211-219.
- (62) Arous, S. Etude phytochimique et évaluation de l'activité antiradicalaire des extraits de *Fredolia aretioides*. Mémoire de Master.
- (63) Oyaizu, M. Studies on Products of Browning Reaction. Antioxidative Activities of Products of Browning Reaction Prepared from Glucosamine. *The Japanese of Journal of Nutrition and Dietetics*. **1986**, 44 (6), 307-315. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>.
- (64) Hubert, J. Caractérisation Biochimique et Propriétés Biologiques Des Micronutriments Du Germe de Soja. Etude Des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines .PhD. **2006**.
- (65) Karagözler, A. A.; Erdağ, B.; Emek, Y. Ç.; Uygun, D. A. Antioxidant Activity and Proline Content of Leaf Extracts from *Dorystoechas Hastata*. *Food Chemistry*. **2008**, 111 (2), 400-407. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.089>.
- (66) Madi, A. Caractérisation et Comparaison Du Contenu Polyphénolique de Deux Plantes Médicinales (Thym et Sauge). Mémoire de Master. **2009**.
- (67) Bidlingmeyer, B. A. Pratical HPLC Methodology and Applications. Wiley. **1992**.

## Références bibliographiques

---

- (68) Arpino, P.; Prévôt, A.; Serpinet, J.; Tranchant, J.; Vergnol, A.; Witier, P.; Manuel pratique de Chromatographie En Phase Gazeuse. Masson. **1995**.
- (69) Harold M.; Miller, W. McNair, James, M. Basic Gas Chromatography. *Chemical Education Today*. **1998**, 75 (9), 1094. <https://doi.org/10.1021/ed075p1094>.
- (70) Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. Méthodes Spectroscopiques Pour La Chimie Organique. Paris. Masson. **1997**, 350.
- (71) McNair, H. M.; Miller, J. M.; Snow, N. H. Basic Gas Chromatography. Wiley. **2019**.
- (72) Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. Spectrometric Identification of Organic Compounds. Wiley. **2005**.
- (73) Okwu, D. E. NMAP. *Science and Biotechnology*. **2007**, 1(1), 90-96.
- (74) Chenni, M. Contribution à l'étude Chimique et Biologique de La Racine d'une Plantemédicinale: *Bryonia Dioica Jacq.* Mémoire de Magister. Université d'Oran Es-Senia, **2010**.
- (75) Bruneton, J. Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes Medicinales. Paris, Tec-Doc. **1999**.
- (76) Bisoli, E.; Garcez, W.; Hamerski, L.; Tieppo, C.; Garcez, F. Bioactive Pentacyclic Triterpenes from the Stems of *Combretum Laxum*. *Molecules*, **2008**, 13 (11), 2717–2728. <https://doi.org/10.3390/molecules13112717>.
- (77) Link, P.; Roth, K.; Sporer, F.; Wink, M. *Carlina Acaulis* Exhibits Antioxidant Activity and Counteracts A $\beta$  Toxicity in *Caenorhabditis Elegans*. *Molecules*, **2016**, 21 (7), 871. <https://doi.org/10.3390/molecules21070871>.
- (78) Dordevic, S.; Tadic, V.; Petrovic, S.; Kukic-Markovic, J.; Dobric, S.; Milenkovic, M.; Hadzifejzovic, N. Bioactivity Assays on *Carlina acaulis* and *c. Acanthifolia* root and herb extracts. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. **2012**, 7(3), 1213-1222.