



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministre de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



UNIVERSITE ABBES LAGHAROUR - KHENCHELA-

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER ACADEMIQUE

FILIERE : Sciences Biologiques

OPTION : Biochimie Appliquée

Thème

**Contribution à l'étude phytochimique et l'activité
antioxydante des feuilles de *Ruta chalepensis* L. (Fidjel) de
la région de Khenchela**

Présenté par :

Belmekki Aicha

Jury de soutenance :

Présidente : **DOUAOUIYA Lilia**

MCB.Univ. Abbés Laghrour - Khenchela

Encadreur: **BOUHALIT Samira**

MAA.Univ.Abbés Laghrour - Khenchela

Examineur: **BOUSAA Abd-Elhalim**

MAA. Univ.Abbés Laghrour - Khenchela

Promotion : juin 2017

Dédicace :

Je dédie ce modeste mémoire

À la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager :
ma tendre mère qui a sacrifié ses beaux jours de jeunesse pour que ses enfants suivent le
bon chemin dans leur vie et leurs études.

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que
j'ai toujours pour toi mon cher père. Rien au monde ne vaut les efforts que tu as fournis
sans relâche pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices.

Que **DIEU** vous protège et vous accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur !

À ma deuxième source de tendresse, de patience et de générosité... Ma grande sœur
Khadidja.

À ma petite princesse Mouna Amira.

À mes chers frères El-hamza et Mohammed El-Madani qui n'ont cessé d'être pour moi des
exemples de persévérance et de courage.

À toute ma famille.

À ma meilleure amie et mon âme sœur Asma.

A mon amie d'enfance Chaïma.

A toutes les amies avec lesquelles j'ai vécu des beaux moments au cours de mon cursus à
l'université : Kaouthar, Selma, Nadhira, Sana et Sara.

Et à tous ceux qui se souviennent de :

♥ Aicha ♥

Remerciement :

Je remercie tout d'abord ALLAH le tout puissant de m' avoir donné la santé, la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire.

Avant d'aborder l'exposé de mes résultats, qu'il me soit permis de remercier toutes les personnes qui, à des degrés divers, ont contribué à l'élaboration de cette étude.

Je remercie très chaleureusement Madame BOUHALIT Samira, mon encadreur de mémoire. Merci pour votre encadrement efficace et votre disponibilité à tout moment. Merci pour votre compréhension et pour la confiance que vous m'avaient témoigné. Soyez assurées de ma profonde gratitude.

Je souhaite également remercier les membres du jury pour avoir accepté l'évaluation de ce travail et tout particulièrement Madame DOUAOUYA Lilya, Maître de conférences classe B qui m'a fait un grand honneur en acceptant de présider le jury.

Je remercie également Monsieur BOUSSAA Abd-Elhalim, Maitre-assistant classe A, pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Je remercie vivement monsieur ALLAGUI Okba qui s'est déplacé à maintes reprises pour me collecter la plante fraîche qui pousse dans des endroits difficilement accessibles.

Je tiens aussi à adresser mes remerciements à toute l'équipe du laboratoire pédagogique de l'université de Khenchela.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont à ma famille, particulièrement mes parents, qui m'ont marqué par leur soutien encourageant et je leur exprime mon respect et ma profonde sympathie.

Un grand Merci à tous...♥

Liste des abréviations :

Ac : Absorbance de contrôle négatif.

ArOH : phénol.

At : Absorbance de test effectué.

CAT : Catalase.

ClCH₃ : Chloroforme.

DPPH : 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl.

EBR : Extrait brut.

ER : Espèces Réactives.

ERO (ROS) : Espèce Réactive Oxygénée (Reactive Oxygen Species).

ERN : Espèce Réactive Azotée.

FAC : Fraction d'acétate d'éthyle.

FAQ : Fraction aqueuse.

FBU : Fraction butanolique.

FCH : Fraction chloroformique.

FCR : Folin-Ciocalteu.

FeCl₃ : Trichlorure de fer.

HCl : Alcool chlorhydrique.

4-HNE: 4-hydroxynonanal.

H₂O₂ : Peroxyde d'Hydrogène.

HOCl : Acide Hypochlorique.

H₂SO₄ : Acide sulfurique.

IC50 : Concentration Inhibitrice 50 %.

GR : Glutathion réductase.

GPX : Glutathion peroxydase.

GSH : Glutathion réduit.

GSSG : Glutathion Oxydé.

LDL : Low Density Lipoprotein ou lipoprotéines de basse densité.

MDA : Malondialdéhyde.

Me : Masse de l'extrait après l'évaporation du solvant.

MEP : 2-C-méthylérythritol-4-phosphate.

mg d'EAG / g : milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec.

Mv : Masse de la matière végétale.

NADH : Nicotinamide Adénine Di-nucléotide

NADPH : Nicotinamide Adénine Di-nucléotide Phosphate

NaOH : Soude caustique.

NH₄OH : Ammoniaque.

NO° : Monoxyde d'Azote.

NO² : Dioxyde d'Azote.

O₂^{••} : Anion superoxyde.

1O₂ : Oxygène singulet.

OH[•] : Radical Hydroxyle.

ONOO⁻ : Peroxynitrite.

8-OHDG : 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine.

Ps : poids de la matière sèche.

P450 : Protéine 450.

P53 : Protéine 53.

R. : Ruta.

R[•] : Radical alkyl.

Rf : Rapport frontal ou Facteur de rétention.

RO₂[•] : Radical peroxy.

ROO[•] : Alkyl Peroxyles.

ROOH : peroxyde lipidique.

ROH : Acide gras hydroxyle.

SH: Sulfhydryl.

SNC : Système Nerveux Central.

SNA : Système Nerveux Autonome.

SOD: Superoxyde dismutase.

TBARS : Acide thiobarbiturique.

UH : Acide urique.

Liste des figures :

Figure 1 : Photos montrant les différents aspects de la plante <i>Ruta chalepensis</i> ; Fleurs, tiges « écorce », feuilles et plante entière (A, B, C, D).....	03
Figure 2 : Répartition géographique de la famille de Rutacées.....	04
Figure 3 : Biosynthèse des métabolites secondaires.....	08
Figure 4 : L'origine biosynthétique du squelette flavonique.....	13
Figure 5 : différents origines des radicaux libres.....	19
Figure 6 : Mécanisme de la peroxydation lipidique.....	20
Figure 7 : Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les espèces oxygénées réactives.....	22
Figure 8 : Action des antioxydants au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène.....	23
Figure 9 : diagramme de fractionnement de l'extrait brut.....	31
Figure 10 : diagramme des tests phytochimiques.	34
Figure 11 : schéma résume les tests phytochimiques basés sur l'infusé.....	37
Figure 12 : schéma explicatif du procédé de dosage des polyphénols.....	40
Figure 13 : schéma explicatif du procédé de dosage des flavonoïdes.....	41
Figure 14 : Teneur en humidité des feuilles sèches de <i>Ruta Chalepensis</i>	43
Figure 15 : Rendements des extraits des feuilles de <i>Ruta Chalepensis</i> L.....	45
Figure 16 : Chromatogrammes résultant de l'analyse de différents extraits par CCM (dans le système solvant : Toluène/ acétate d'éthyle/ méthanol 5/3/1).....	55
Figure 17 : Teneur en polyphénols totaux de différentes fractions de la plante <i>Ruta chalepensis</i> (mg d'EAG / g d'E).....	56

Figure 18: Teneur en flavonoïdes totaux de différents extraits et fractions de la plante <i>Ruta Chalepensis</i> (mg d'EQ/gd'E).....	57
Figure 19 : Pourcentages de réduction du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les différents extraits des feuilles de <i>Ruta Chalepensis</i> L.....	59
Figure 20: Pourcentages de réduction du radical libre DPPH de l'Acide Ascorbique.....	60

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Les principales classes des composés phénoliques.....	10
Tableau 2 : Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques.....	18
Tableau 3 : Aspects, couleurs et rendements des extraits de feuilles de <i>Ruta Chalepensis</i>	44
Tableau 4 : Les groupes chimiques rencontrés dans les feuilles de <i>Ruta chalepensis L.</i>	46
Tableau 5 : Résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits du feuilles de dans le système TAM : Toluène/ acétate d'éthyle/ méthanol, 5 :3 :1 (V/V/V) Adsorbant : gel de silice.....	50
Tableau 6 : Les valeurs d'IC ₅₀ calculées pour chaque extrait des feuilles de <i>Ruta chalepensis L.</i>	60

Table des Matières

Remerciement

Dédicace

Résumés

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste es tableaux

Introduction.....	01
Chapitre 1 : <i>Ruta chalepensis</i> L.....	02
1. Généralités.....	02
2. Caractère botanique.....	02
3. Origine et répartition.....	04
4. Classification de la plante	04
5. Compositions et données phytochimiques	06
6. Toxicité et effets secondaires	06
7. Usage et intérêts pharmaceutiques	07
Chapitre 2 : Métabolites secondaires	08
1. Généralités	08
2. Biosynthèse des métabolites secondaires	08
3. Classification des métabolites secondaires	09
3.1. Les polyphénols	09
3.1.1. Intérêts thérapeutiques et activités des polyphénols	11
3.2. Les flavonoïdes.....	12
3.2.1. Activités biologiques et intérêts pharmacologiques des flavonoïdes	14
3.3. Les alcaloïdes.....	15
3.3.1. Intérêts et propriétés pharmacologiques des alcaloïdes.....	15
3.4. Stéroïdes et terpénoïdes.....	15
Chapitre 3 : Le stress oxydatif	17
1. Stress oxydatif	17
2. Les radicaux libres.....	17
2.1. Différents types de radicaux libres	17

2.2. Source des radicaux libres	18
3. Conséquence des espèces oxygénées réactives	19
3.1. Peroxydation des lipides	20
3.2. Oxydation des protéines	21
3.3. Altération des acides nucléiques et dommages d'ADN	21
4. Antioxydants et systèmes de défenses	22
4.1. Antioxydants enzymatiques	22
4.2. Antioxydants non enzymatiques	24
4.3. Les antioxydants de synthèse	26

Deuxième partie : Matériels et méthodes

1. Matériels	28
1.1. Le matériel végétal	28
1.2. Réactifs et instrumentations	28
2. Méthodes	29
2.1. Détermination de taux d'humidité	29
2.2. Procédés d'extraction	29
2.3. Screening phytochimique	32
2.4. Criblage phytochimique par chromatographie sur couche mince	38
2.5. Dosage des polyphénols totaux (PPT)	39
2.6. Détermination des flavonoïdes totaux (FVT)	40
2.7. Evaluation du potentiel antioxydant	41
3. Analyses statistiques.....	42

Troisième partie : Résultats et discussion

1. Détermination de la teneur en eau dans les feuilles de <i>Ruta chalepensis</i> L.....	43
-------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

2. Rendement d'extraction	44
3. Analyse des extraits	46
3.1. Analyse qualitative	46
3.1.1. Screening phytochimique	46
3.1.2. Criblage phytochimique par Chromatographie sur Couche Mince ...	48
3.2. Etude quantitative des extraits de <i>Ruta chalepensis</i> L	55
3.2.1. Dosage des polyphénols	55
3.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	57
4. Résultats de l'activité antioxydante par la méthode du radical DPPH ...	58
Conclusion et perspective	63
Références bibliographiques	64
Annexes	

INTRODUCTION

Toutes les civilisations ayant laissé une empreinte dans l'histoire, ont donné une grande importance à l'utilisation des plantes pour vaincre les maladies ainsi que leurs souffrances. On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. Les recherches médico-pharmaceutiques entreprises dans ce domaine (l'étude des propriétés des plantes médicinales) ne font que s'accroître en parallèle avec le progrès scientifique dans les domaines de l'exploration en raison des richesses que recèle le règne végétal pour le bien être de l'homme (Bortel, 2001).

Aujourd'hui, on estime que les principes actifs provenant des végétaux représentent environ 25% des médicaments prescrits. Soit un total de 120 composés d'origine naturelle provenant de 90 plantes différentes. En Afrique, près de 6377 espèces de plantes sont utilisées, dont plus de 400 sont des plantes médicinales qui contribuent à 90% dans les traitements médicaux. De plus ce type de soin est considéré souvent comme faisant partie de la médecine douce (Attou, 2011).

Selon certains auteurs, les composés d'origine naturelle présentent l'avantage d'une très grande diversité de structures chimiques et ils possèdent aussi un très large éventail d'activités biologiques (Bérubé -Gagnon, 2006).

Dans ce contexte, s'inscrit le présent travail de recherche dont le but principal est d'étudier les différents extraits des feuilles de *Ruta chalepensis* L. (Fidjel) largement utilisées dans la médecine traditionnelle comme laxatif, abortif, antiépileptique et emménagogue (Bendriss, 2003 ; Mergham, 2015). Reconnu également comme: fébrifuge, antivenimeux local, contre les nausées et les vomissements, dans les constipations, les douleurs gastriques, l'asthme et les névroses (Attou, 2011) afin de contribuer à une meilleure connaissance de cette plante médicinale de la région des Aurès et de découvrir certains constituants chimiques et l'étude de l'activité antioxydante de ses feuilles.

Les objectifs de ce travail sont fixés dans les quatre points suivants :

- L'analyse des différents extraits organiques et aqueux des feuilles de *Ruta chalepensis* L. en utilisant la CCM.
- Le dosage du contenu en polyphénols et en flavonoïdes des différents extraits.
- L'étude de l'activité antioxydante des différents extraits des feuilles de *Ruta chalepensis* L. en utilisant le test au DPPH.

A la lumière des résultats obtenus, différentes perspectives de recherche seront évoquées.

1. Généralités

Les Rutacées sont une famille, surtout tropicales, très importante qui produit des huiles essentielles et des fruits comestibles, et qui a été décrite en 1782 par Durande, puis par De Jussieu en 1789 (Zeghada, 2009 ; Alloun, 2013). Elle comprend 150-162 genres et 1500-2096 espèces avec trois principaux centres de diversité : Amérique tropicale, Afrique australe et Australie (Mergham, 2015). Les caractères morphologiques de cette famille sont assez variables, dont le plus marquant est la dissémination des glandes ou bien des lacunes sécrétrices d'origines épidermiques visibles sur les feuilles, elles sont dites Schizolysigènes et sont responsables de la libération des huiles essentielles (Alloun, 2013). Cette famille s'identifier aussi par l'inconvénient de dégager une odeur forte et très désagréable (Hazzit et al., 2015). Les résines caractéristiques des Rutacées sont inflammables d'où l'utilisation du bois comme carburant ou en torches. Elles sont des arbustes à feuilles bleu-vert cultivée en plein soleil ou à l'ombre partielle, de même au sec, dans un sol assez riche, de préférence très bien drainé, mais la rue accepte bien les terres argileuse et fortes (Attou, 2011 ; Saidani et al., 2011). La *Ruta Chalepensis L.* est surnommée « herbe de grâce », et réputée pour ces vertus anaphrodisiaques (Bendriss, 2003).

2. Caractère botanique

La rue d'Alep (*Ruta Chalepensis L.*) est une plante herbacée à tiges ligneuse à la base, pouvant atteindre 1 m et à feuilles alternes à très forte odeur fétide, simples et astipulées à couleur verte plus ou moins jaunâtre, découpées en segments ovales, larges et pennatiséquées, elles présentent 4 à 5 lobes oblongues, aigus, lancéolés ou aborales à pédicelles atteignant 5-10 mm. Elles sont finement glanduleuses et à inflorescence terminales. Ses fleurs sont hermaphrodites de 8-10 mm, de couleur jaune foncé s'épanouissent en coupe, portant 4 à 5 pétales ciliés, frangés de longs poils et fimbriées sur les marges. Elles portent aussi 4 sépales groupées en corymbes entre lesquels s'étalent 8 à 10 étamines présentant des fossettes nectarifères. Elle possède une capsule allongée de 6-7 × 5-6 mm de diamètre et des grappes fructifères étalées. Sa période de floraison s'étend du février jusqu'à juin. (Quezel, 1963 ; Bendriss, 2003 ; Zeghada, 2009 ; Attou, 2011).

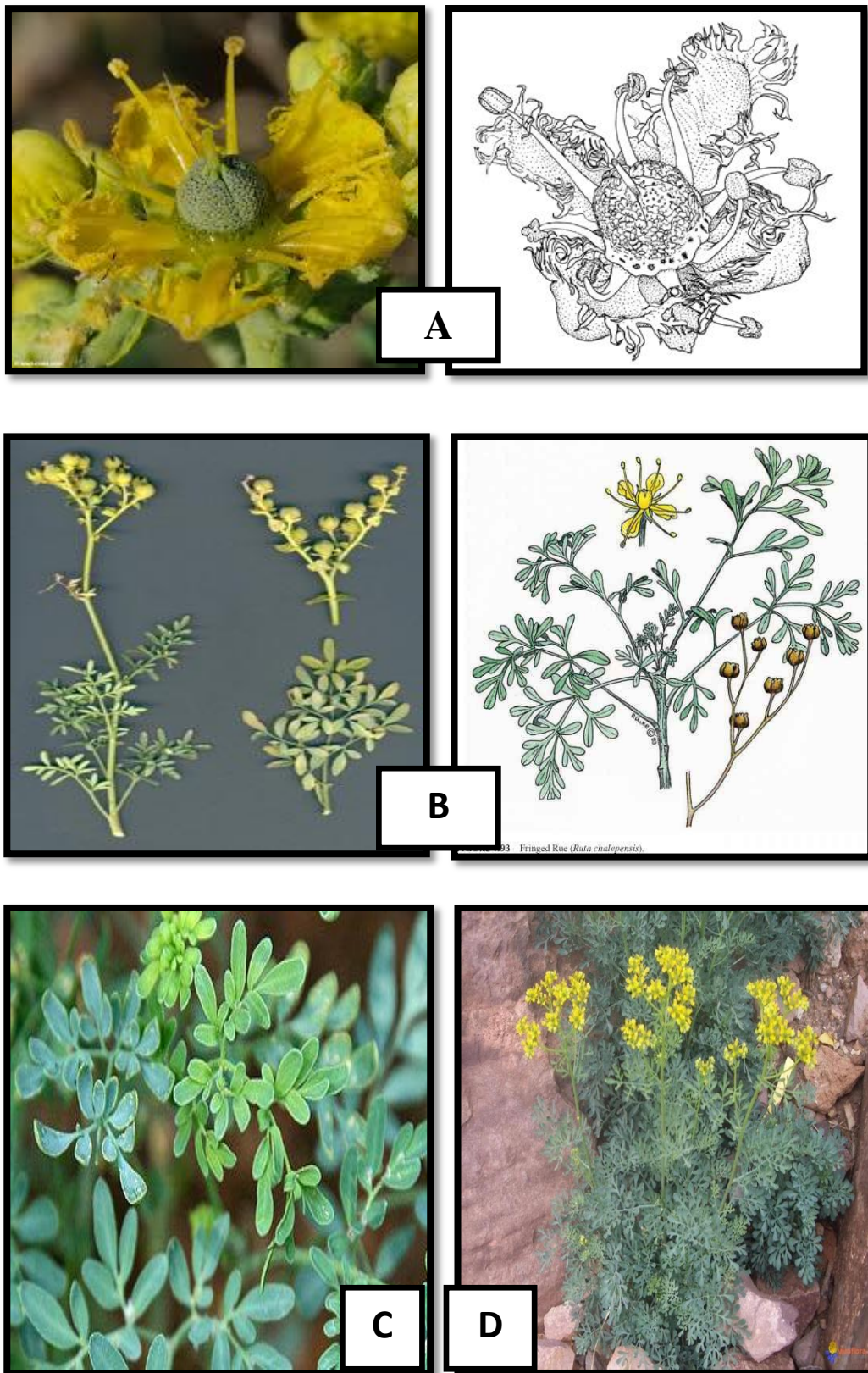


Figure 1 : Photos montrant les différents aspects de la plante *Ruta chalepensis* L. Fleurs, tiges « écorce », feuilles et plante entière (A, B, C, D). (Yannick, 2010 ; Abel, 2015).

3. Origine et répartition géographique

Ruta chalepensis L. est un petit arbuste indigène du pourtour méditerranéen et des îles canaries, il croit au nord-est de l'Afrique, Sud-est de l'Europe (Ukraine, Albanie, Bulgarie et ex-Yougoslavie) et dans le sud-ouest de l'Asie (Inde, Malaisie, Vietnam et à Java), de même qu'aux États-Unis, au Mexique, à Cuba et au Chili. Elle est également naturalisée dans l'Orient et la péninsule arabique. Elle pousse bien sur des sols sablonneux ou rocheux calcaires bien drainés et préfère le plein soleil. (Bendriss, 2003 ; Attou, 2011 ; Schmelzer et Gurib-Faki, 2013 ; Mohamed et al., 2015).

La rue d'Alep est relativement commune dans toute l'Algérie septentrionale, qui existe à l'état spontané dans les rocailles, pelouses, pentes rocheuses, coteaux et endroits secs du Tell. Elle est aussi cultivée dans les jardins. (Bendriss, 2003 ; Merghache et al., 2009 ; Attou, 2011).

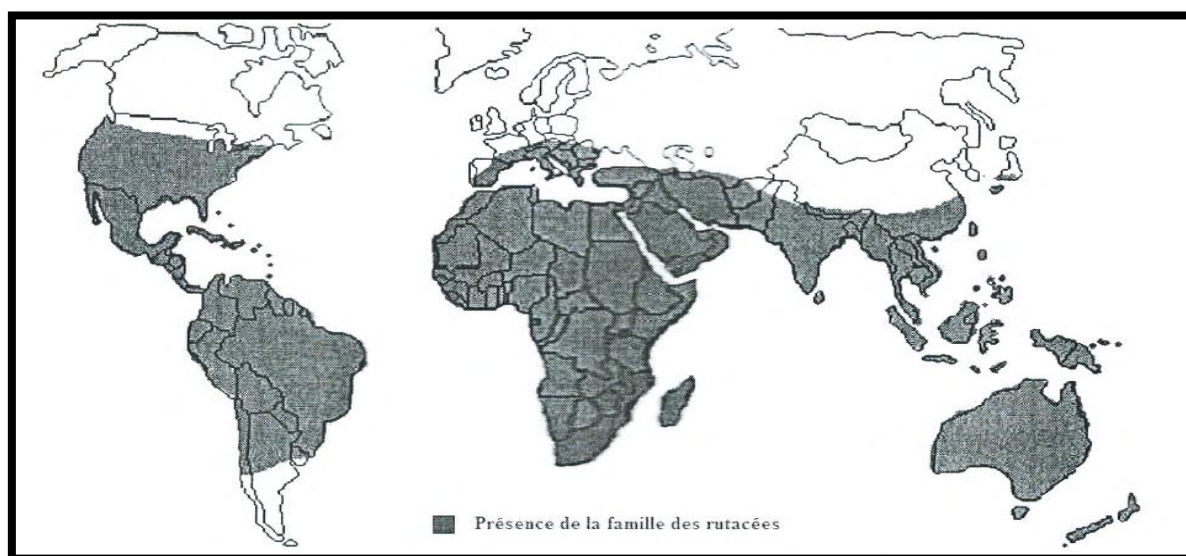


Figure 2 : Répartition géographique de la famille de Rutacées (Gausson et al., 1982).

4. Classification de la plante

Il existe plusieurs espèces du genre *Ruta*, on note :

- *Ruta graveolens* : rue officinale, rue domestique, rue des jardins, herbe de grâce.
- *Ruta chalepensis* : rue d'Alep.

- *Ruta bracteosa* : rue d'hiver.
- *Ruta montana* : rue des montagnes, bonne rue et Fidjlet el djebel.
- *Ruta Latifolia* : nom non trouvé. (Benziane Maatallah, 2007 ; Attou, 2011)

Les trois espèces les plus diffuses : *Ruta montana*. L, *Ruta chalpensis*. L et *Ruta graveolens*. L peuvent être confondues morphologiquement car elles sont très proches en forme, composition et en propriétés pharmacologiques. Elles ont probablement été interchangeablement utilisées pendant l'antiquité (Attou, 2011 ; Mergham, 2015).

Le genre *Ruta* L. est représenté en Algérie par 4 espèces : *R. montana* (clus). L, *R. chalpensis* L., *R. angustifolia* (pers) P. cout et *R. Latifolia* (Salib) Lindb. Elles diffèrent entre elles par l'allure des feuilles, de la grappe fructifère, des bractées et des sépales (Alloun, 2013).

- **La systématique**

Règne : Plantae

Sous règne : Tracheobionta

Super division : Spermatophyta (Plantes à graines)

Division : Magnoliophyta (Plantes à fleurs)

Sous division : Angiospermae

Classe : Magnoliopsida (Dicotylédons)

Sous classe : Rosidae (Dialypétales)

Super ordre : Rutanae

Ordre : sapindales (Rutales)

Famille : Rutaceae

Genre : *Ruta*. L

Espèce : *Chalepensis*.(Bonnier, 1999).

- **Noms vernaculaires**

Le nom générique des Rutacées est ancien. Dans la médecine traditionnelle grecque et latine la rue possède plusieurs significations ; libre de maladie, sauver et prévenir, ou bien qui coule faisant certainement références à ces vertus emménagogues. (Bendriess, 2003 ; Benziane Maatallah, 2007 ; Alloun, 2013). Compte à Chalepensis, elle signifie « d'Alep » (ville de Syrie), indique le lieu d'origine des spécimens ayant servi à identifier et classer cette espèce en premier lieu ou simplement l'abondance de celle-ci, dans la région. (Bendriess, 2003). Selon les auteurs arabes, la rue est citée par Ibn El-Baytar sous les termes de *Sadzab* et *Fidjen* emprunté au persan Paydjan. Quant au terme berbère « Aouermi », il est mentionné par Bouklarich comme synonyme des autres appellations « *Issel*, *Issin* » (Benziane Maatallah, 2007 ; Attou, 2011). Elle est répertoriée sous différentes appellations :

En Arabe : فيجلة الجبل, الفيجل, سذاب, روط, روة, فدجل

En français : rue d'Alep, rue.

En anglais : Aleppo rue, Syrian rue, Fringed rue.

D'autres langues : raute « allemand » ; ruta « italien » ; ruda « espagnol » (Pedro, 2005).

5. Composition et données phytochimiques

Les espèces de *Ruta* présentent une source de diverses classes des produits naturels. *Ruta chalepensis L.* est riche en substance pharmacologique et même à des teneurs très élevés telle que : flavonoïdes (flavones et rutine de 1 à 5%), alcaloïdes de 0.4 à 1.4% (acridone, quinolone, furoquinolone et des furoquinolines quaternaires), coumarines (chalepensisine, chalepine, rutarine 0.9%), furanocoumarines de 0.4 à 1.7% (bergaptène), phénols, tanins, huiles volatiles et saponines avec des activités biologiques telles que : antifongique, antioxydante, phytotoxique, abortive, dépresseur, antidote et anti-inflammatoire (Zeghada, 2009 ; Hammiche et Azzouz 2013 ; Schmelzer et Gurib-Faki, 2013 ; Mergham, 2015 ; Ouerghemmi et al, 2016).

6. Toxicité et effets secondaires

La rue est une plante à manier avec précaution car son huile essentielle est toxique ; elle exerce localement une action irritante. (Bendriess, 2003 ; Attou, 2011) Cependant, l'utilisation incontrôlée de cette plante peut produire plusieurs effets toxiques comme :

gastro-entérite intense, hypothermie avec vertiges, tremblements, convulsions et coma (Bendriss, 2003 ; Mergham, 2015). Son essence est stupéfiante, elle contient principalement des composés cétoniques, c'est elle qui cause une légère phase d'excitation puis rapidement une ivresse lourde avec obtusion sensitivo-sensorielle, tristesse et somnolence (Attou, 2011). A très fortes doses ; plus de 2 g de la poussière sèche par jour ; c'est un véritable élément toxique ; sur la peau, elle peut provoquer des éruptions cutanées prurigineuses et inflammations avec formation des cloques (Adouane, 2016). Son principe toxique est la méthylnonycétone car l'extrait aqueux de la rue a une activité hypotensive par un effet directe sur le système cardiovasculaire (Attou, 2011).

7. Usage et intérêts pharmacologiques

Réputée pour ses propriétés toniques, antispasmodiques et antiseptiques et pour ses nombreux effets qui incluent des actions sédatives, hypnotiques, analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires, *Ruta chalepensis L.* est utilisée dans la médecine traditionnelle comme laxatif, abortif, antiépileptique et emménagogue (Bendriss, 2003 ; Salima et al., 2009 ; Mergham, 2015). Elle traite différentes maladies : épilepsie, hystérie, vers intestinaux, intoxication, maux de tête et des oreilles, problèmes de vision et pour soigner les phlébites et les varices (Zeghada, 2009 ; Attou, 2011). En usage externe, elle est employée comme antirhumatismale et surtout comme antiseptique sur les plaies, les ulcérations et les affections gingivales (Bendriss, 2003). En Algérie la rue est utilisée à des fins diverses : fébrifuge, antivenimeux local, contre les nausées et les vomissements, dans les constipations, les douleurs gastriques, l'asthme et les névroses (Attou, 2011). Ces vertus ne concernent pas seulement la médecine, *Ruta chalepensis L.* sert à aromatiser des boissons alcoolisées, fromages blancs et des beurres aux herbes et entre aussi dans la fabrication du « vinaigre de rue » ou l'« huile de rue » par infusion. Plus récemment, les propriétés antimicrobiennes et antifongiques des composés de la rue sont exploitées comme des pesticides naturels, des herbicides et des antimicrobiens car sa présence éloigne les vipères et repousse certains insectes, elle est appliquée contre la gale et les parasites de la tête (Bendriss, 2003 ; Attou, 2011 ; Mergham, 2015).

1. Généralités

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides (Krief, 2003). Elles constituent un groupe de molécules qui interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement ainsi que la régulation des symbioses et d'autres interactions plantes-animaux, la protection de l'attaque des organismes pathogènes et des prédateurs, comme agents allélopathiques, pour l'attraction des pollinisateurs ou de la dissémination des fruits. Comme ces composés ont des effets toxiques, leur incorporation dans l'alimentation humaine peut être utile pour la prévention contre plusieurs maladies (cancer, maladies circulatoires, les infections viral...), car la différence entre toxicité et effet bénéfique est généralement soit dose ou structure-dépendant (Attou, 2011).

2. Biosynthèse des métabolites secondaires

De nombreuses familles de métabolites secondaires ont fait l'objet de recherches actives lors des 30 dernières années et certains processus de synthèse sont aujourd'hui bien décrits, comme dans le cas des flavonoïdes, des dérivés d'acides, des coumarines et furocoumarines, des terpènes et stérols, ou de certains alcaloïdes. Les métabolites secondaires résultent généralement de trois voies de biosynthèse : la voie de shikimate, la voie de mevalonate et du pyruvate (Attou, 2011).

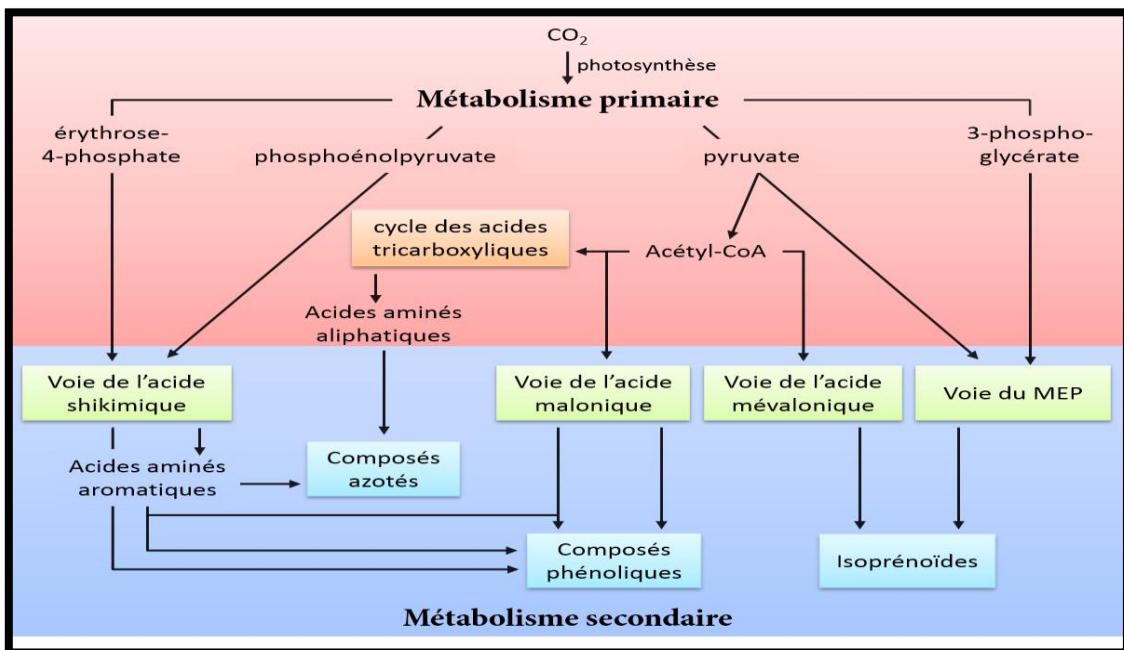


Figure 3 : Biosynthèse des métabolites secondaires (Guihur, 2017).

3. Classification des métabolites secondaires

3.1. Les Polyphénols

Dénommés aussi composés phénoliques, sont des molécules largement répandues dans le règne végétal étant trouvés dans les fruits et les légumes, allant des racines jusqu'aux fruits avec une répartition qualitative et quantitative varie entre les différents tissus (Saffidine, 2015 ; Sid Larbi, 2016). Ils sont synthétisés lors du métabolisme secondaire pour se défendre contre l'ensemble des agressions et stress biotiques ou abiotiques en donnant des arômes, amertume, couleur et parfums aux plantes qui servent principalement à repousser les herbivores ou à l'attraction des pollinisateurs (Akroum, 2011 ; Boubekri, 2014). Ces molécules jouent aussi un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...) (Boubekri, 2014). L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique, portant un groupement hydroxyle libre ou engagé dans une fonction ester, éther ou hétéroside (Sid Larbi, 2016).

Les polyphénols peuvent se regrouper en deux grands groupes : **Les non flavonoïdes** et **les flavonoïdes**, en se basant sur la structure, le nombre d'unités constitutives et les éléments structuraux qui lient ces noyaux (Boubekri, 2014 ; Sid Larbi, 2016).

- **Les non flavonoïdes**

a- Les acides phénoliques : Ce sont les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques qui représentent deux classes très importantes dont la structure de base est de type C6-C1, C6-C3 respectivement (Boubekri, 2014).

b- Les coumarines : Sont des composés hétérocycliques oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. Ils dérivent des acides t-cinnamique et p-coumarique pour la majorité d'entre eux. Ils ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration mais aussi l'espèce (Boubekri, 2014).

c- Les stilbènes : (C6-C2-C6) : Ses dérivés hydroxylés sont des composés formés de 2 noyaux aromatiques liés par un groupe éthylénique (Ghniimi, 2015).

d- Les lignanes et les lignines : Parlant des lignanes il s'agit des dimères ramifiés de phénylpropènes formés par dimérisation de trois types d'alcools : p-coumarine,

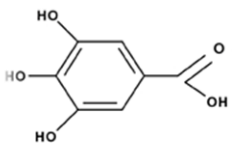
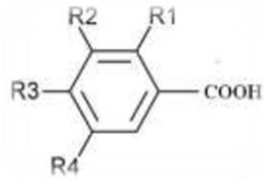
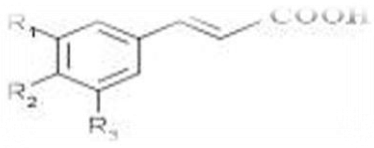
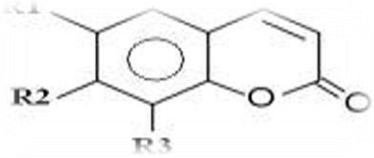
coniférique et sinapique. La polymérisation de ces trois alcools conduit à la formation de la lignine. La composition de la lignine diffère d'une espèce à l'autre (Ghnimi, 2015).

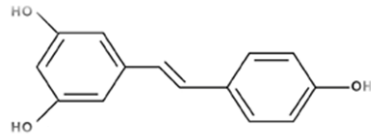
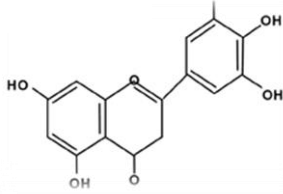
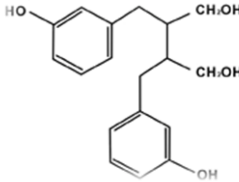
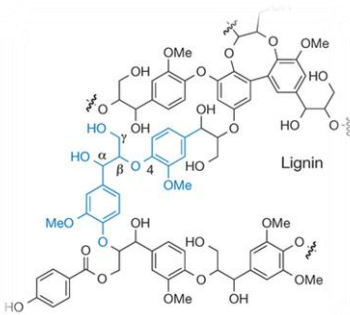
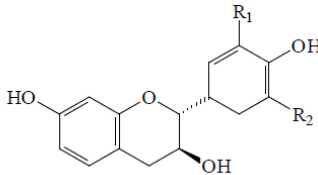
e- Les tannins : sont des macromolécules qui se divisent selon leur structure en deux groupes principaux les tannins hydrolysables ; esters d'acide gallique qui se lient aux molécules de glucose et les tannins condensés ; composés phénoliques hétérogènes (Akroum, 2011).

- **Les flavonoïdes**

Ils constituent la plus vaste et la plus abondante classe de composés phénoliques. Ces composés ont une structure de base formée de 2 noyaux benzéniques A et B reliés par un noyau C qui est un hétérocycle pyranique (Ghnimi, 2015).

Tableau 1 : Les principales classes des composés phénoliques (Boubekri, 2014).

Squelette carboné	Classe	Structure de base
C6	Phénols simple	 <p>Gallic Acid</p>
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques	
	Coumarines	

C6-C2-C6	stilbènes	
C6-C3-C6	Flavonoïdes	
(C6-C3)2	Lignanes	
(C6-C3)n	Lignines	
(C15)n	Tanins	 <p> $R_1 = R_2 = H$: Afzéléchol $R_1 = OH$; $R_2 = H$: Catéchol $R_1 = R_2 = OH$: Gallocatéchol </p>

3.1.1. Intérêts thérapeutiques et activités des polyphénols

Les extraits phénoliques ont toujours été utilisés en industrie alimentaire et cosmétique, et comme agents antimicrobiens en médecine populaire. Ils ont d'ailleurs montré ces dernières années un intérêt biologique important ayant de multiples activités (Side Larbi, 2016). La principale caractéristique des polyphénols est qu'ils sont des agents antioxydants très puissants. En effet, ils sont capables de piéger les radicaux libres et d'activer les autres

antioxydants présents dans le corps, ils sont connus aussi par leur protection contre le stress photo-oxydant cutané induit par les rayons solaires (Akroum, 2011 ; Ghnimi, 2015).

En 2009, Vafeiadou et ses collaborateurs ont pu déterminer l'effet anti-inflammatoire des flavonoïdes. Dans une étude antérieure, les lignanes présentaient cet effet, alors que les flavonoïdes ont montré une activité analgésique. En présence de bactéries, les composés phénoliques sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis de ces organismes. Le mécanisme de toxicité est peut être lié à l'inhibition des enzymes, l'inactivation des adhésines ou le blocage des protéines de transport et de la paroi cellulaire. En plus de l'effet antibactérien, ces composés montrent un effet antiparasitaire. Les substances polyphénoliques sont aussi capables d'activer les mécanismes naturels de la défense anticancéreuse (Sid Larbi, 2016). En effet, les enzymes de phase I et II sont synthétisées sous l'action des substances polyphénoliques trouvées dans les légumes, pour convertir leurs substrats en espèces hydrolysables facilement excrétées hors de la cellule (Akroum, 2011). Selon Win et ses collaborateurs en 2008, les coumarines sont également actives contre le cancer. Les polyphénols sont dotés d'autres effets thérapeutiques à savoir les activités antiulcéreuse, antivirale, ostéogène et anti-allergénique (Akroum, 2011 ; Side Larbi, 2016).

3.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent le principal groupe de polyphénols, avec plus de 9000 composés différents présents dans une grande variété d'aliments (fruits et légumes, céréales, thé ...) et distribués quantitativement et qualitativement selon le stade de développement du végétal dans différentes parties ; selon le type de l'espèce ; racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, fruits, graines, bois...etc (Akroum, 2011 ; Saffidine, 2015 ; Sid Larbi, 2016). Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs et dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes (Sid Larbi, 2016).

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune ; dont le chalcone est le précurseur de toutes les classes de flavonoïdes ; Ils possèdent donc tous une même structure de base à quinze atomes de carbone, constitué de deux cycles aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane selon le système C6-C3-C6 (Sid Larbi, 2016). L'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation de trois molécules de malonyl-CoA avec un ester du coenzyme A et d'un acide hydroxycinnamique, en règle générale le 4-coumaroyl-CoA, pour obtenir la 4, 2, 4', 6-tetrahydrochalcone (réaction catalysée par la chalcone synthase). Dans les conditions physiologiques normales, cette chalcone tend à s'isomériser en flavanone sous l'action de la chalcone isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du

cycle conduisant à la seule (2S)-flavanone. Cette chalcone peut également se cycliser en aurone. Elle est le précurseur de toutes les classes de flavonoïde (Attou, 2011).

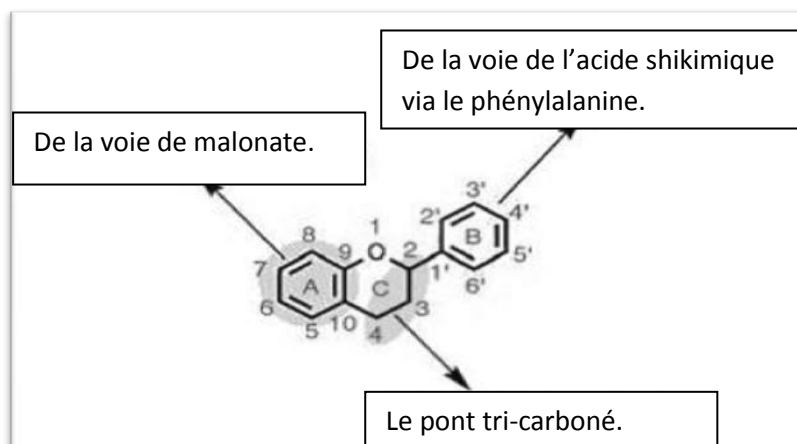


Figure 4 : L'origine biosynthétique du squelette flavonique (Attou, 2011).

Selon leurs structures moléculaires, ils peuvent être subdivisés en six groupes : flavonols, flavones, flavanones, isoflavones, anthocyanidines et chalcones qui peuvent être définis et différenciés comme suit :

- **Flavones et flavonols** : Le cycle A de ces deux types de molécules est substitué par deux hydroxyles phénoliques libre ou estérifiés en C5 et en C7. Les flavonols se distinguent des flavones par un OH en C3 (Akroum, 2011).
- **Flavanones** : Se caractérisent par l'absence de la double liaison entre le C2 et le C3 et par la présence des centres d'asymétrie (Akroum, 2011).
- **Isoflavones** : Sont caractérisées par la présence d'un cycle B fixé à C3 plutôt que C2. Ils ont une distribution très limitée dans le règne végétal (Boubekri, 2014).
- **Anthocyanes** : Sont des pigments hydrosolubles accumulés dans les vacuoles cellulaires, responsables des couleurs rouges, violettes et bleues dans les fruits, les légumes, les fleurs et les graines, mais aussi jouent un rôle important dans l'attraction des insectes et la dispersion des graines (Boubekri, 2014).
- **Chalcones** : Ils ont un noyau pyranique central ouvert et sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tri-carbonée, cétonique et insaturée (Akroum, 2011).

3.2.1. Activités biologiques et intérêts pharmacologiques des flavonoïdes

La plupart des flavonoïdes sont de puissants antioxydants offrant toute une batterie de fonctions biochimiques particulièrement intéressantes pour la santé. Ils ont la capacité de piéger les radicaux libres, générés par les organismes en réponse aux agressions de l'environnement et qui favorisent le vieillissement cellulaire. Ces composés renforcent les défenses naturelles en protégeant les constituants tissulaires. Ils jouent un rôle important dans la fonction immunitaire, l'expression génique, la circulation sanguine dans les capillaires et le cerveau, la fonction hépatique, l'activité enzymatique, l'agrégation des plaquettes et le métabolisme du collagène, des phospholipides, du cholestérol et de l'histamine (Messai, 2011).

En inhibant l'oxydation des LDL, les flavonoïdes limitent l'incrustation de ces derniers dans les parois des artères qui contribue à l'épaississement des parois et à réduire le flux de sang qui parvient au niveau des tissus. Ils sont actifs contre de nombreux cancers (colon, estomac, foie, sein, prostate, poumon, peau, vessie, etc.) à tous les stades de la cancérogenèse (Messai, 2011). Quant au flavone, ils possèdent une action de dilatation de coronaires. Ainsi, il a été prouvé que les anthocyanines ont une activité anticancéreuse, réduisant la fatigue oculaire, contrôlent le diabète, améliorent la circulation sanguine etc... (Benkiki, 2006).

Les flavonoïdes sont essentiellement des médicaments de l'insuffisance veineuse. Ce sont des toniques veineux et des protecteurs capillaires (Benkiki, 2006). Ils possèdent des propriétés antimicrobiennes. Ils agiraient à plusieurs niveaux : le cycle B jouerait un rôle important dans l'inhibition de la synthèse d'ADN et d'ARN des microorganismes. Certaines catéchines, la naringénine et la quercétine possèdent un effet antibactérien en provoquant un changement de perméabilité membranaire. Les licochalcones interféreraient avec le métabolisme énergétique en inhibant la NADH cytochrome C réductase. Cependant l'action pharmacologique des flavonoïdes suggère qu'ils pourraient présenter un intérêt dans le traitement des allergies en régulant les mastocytes. Ces composés possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (Saffidine, 2015).

3.3. Les alcaloïdes

Ce sont des composés cycliques, éventuellement reproductibles par synthèse, azotées, de réactions alcalines plus ou moins prononcées et douées à faible dose de propriétés pharmacodynamiques marquées. Leurs propriétés sont généralement variées et dépendent de leurs composantes chimiques (Messai, 2011). Ils sont présents pour l'essentiel dans les plantes supérieures comme les Angiospermes ; aussi bien chez les Monocotylédones que chez les Dicotylédones, Le plus souvent localisés dans les tissus périphériques : assises externes des écorces de tiges et de racines, tégument des grains, ou on les découvre également dans certains cas dans la partie supérieure des plantes (feuilles et fruits). Ils sont rencontrés exceptionnellement chez les bactéries et sont assez rares chez les champignons. Certains animaux renferment des structures alcaloïdiques. Dans certains cas, ce sont des produits formés à partir des alcaloïdes contenus dans les végétaux inclus dans la ration alimentaires de l'animal (Badiaga, 2012).

3.3.1. Intérêts et propriétés pharmacologiques des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leurs activités pharmacologiques dans les domaines les plus variés : SNC, SNA (sympathique et parasympathique), cardio-vasculaire, anesthésie, tumeurs, maladies parasitaires,...etc. Ils agissent au niveau du système nerveux central qu'ils soient dépresseurs (morphine, scopolamine) ou stimulants (strychnine, caféine) ou au niveau du système nerveux autonome sympathomimétique (éphédrine) ou sympatholytique (yohimibine). Certains alcaloïdes de l'ergot de seigle, parasympathomimétiques (ésérine, pilocarpine...) anticholinergiques (atropine, hyoscyamine), ganglioplégiques (spartéine, nicotine). D'autres ont des propriétés anesthésiques locales (cocaïne), antifiorillantes (quinidine), antitumorales (vinblastine, ellipticine,...), antipaludiques (quinine), amoebicides (émétines) (Benkiki, 2006).

3.4. Stéroïdes et terpénoïdes

Les terpénoïdes sont des métabolites secondaires synthétisés par les plantes, organismes marins, les champignons et même les animaux, ils résultent de l'enchaînement de plusieurs unités isoprénique. Les terpènes cycliques et non cycliques ont deux voies de biosynthèse : celle de l'acide mévalonique et du desoxyxylulose phosphate. La très grande majorité des terpènes est spécifique du règne végétal, ils se répartissent dans tous les organes : fleurs,

feuilles, écorces et fruits ou graines (Attou, 2011 ; Messai, 2011). Les terpènes non cycliques sont en grande partie responsable de l'odeur suave des plantes et des fleurs et dont quelques-unes sont employées en parfumerie. Ces substances possèdent aussi des propriétés pharmacodynamiques très variées, en relation avec les différentes fonctions liées au squelette terpénique : Rubéfiante «Pinènes », anti-inflammatoire «Azulène », antiseptique « Géraniol, Linalol et Cinéol », vermifuge « Ascaridol » et stupéfiante «Thuyone » (Messai, 2011).

Les stéroïdes peuvent être considérés comme des triterpènes ; composés en C30 issus de la cyclisation de l'époxysqualène ou du squalène ; tétra-cycliques ayant perdu au moins trois méthyles. Ce sont des métabolites secondaires dont l'intérêt thérapeutique et l'emploi industriel est majeur. On peut en particulier noter l'intérêt des hétérosides cardiotoniques ou des sapogénines spirostaniques qui constituent les squelettes de base des contraceptifs, des anabolisants et des anti-inflammatoires (Krief, 2003).

Ce travail a été effectué au niveau des laboratoires pédagogiques d'université de Khenchela.

1. Matériels

1.1. Le matériel végétal

La plante *Ruta Chalepensis* L. est cueillie dans la région de Tizegrarine - Chechar (Khenchela) dans la période allant de Mars au mois d'Avril 2017. L'identification de la plante a été confirmée par **Dr. Zraib Az.** Maître de conférences du département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Abbes Laghrour, Khenchela.

Après séchage à l'ombre à une température ambiante pendant deux (2) semaines dans un lieu sec et propre, le broyage des feuilles en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique est réalisé. Cette « Poudre » est mise dans un récipient en verre pour la conservation afin d'être utilisée pour la préparation des extraits bruts pour effectuer une étude phytochimique.

1.2. Réactifs et instrumentations

En rapport avec le screening phytochimique, une étuve utilisée à 105°C pour sécher les échantillons devenus humides, un évaporateur rotatif pour récupérer les différents solvants et une chambre UV pour observer la fluorescence des taches, sont mises en œuvre. Ce matériel comporte également un bain-marie à 90°C, une ampoule à décompter et un spectrophotomètre. Une cuve en verre munie d'un couvercle étanche, Plaque de gel de silice sur un support en plastique de taille 20x20 cm, Micro-seringue sont préparés pour réaliser la chromatographie sur couche mince.

Le screening phytochimique nécessitant divers réactifs tels le réactif de Stiasny, les réactifs de Wagner, Mayer et de Fehling. La recherche des composés actifs de la plante est possible grâce à l'acétate de sodium, le chlorure ferrique (FeCl_3), l'anhydride acétique, l'acide sulfurique concentré (H_2SO_4), l'alcool chlorhydrique (HCl) dilué à 1%, La solution alcoolique de chlorure ferrique à 2 % ainsi que le chlorure d'aluminium et l'acide acétique sont utilisés.

2. Méthodes

2.1. Détermination de taux d'humidité

La méthode utilisée est la méthode de dessiccation par évaporation (Audigie et *al.*, 1978).

Placer 5g du matériel végétal dans une étuve à une température de 105 °C pendant 24h jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

Elle est déterminée par la Méthode gravimétrique qui consiste en la détermination de la perte de masse par dessiccation à l'étuve. Elle est définie comme étant le rapport de la différence entre le poids de la prise d'essai et le poids de la dessiccation grâce à l'équation suivante :

La teneur en eau (humidité%) = $\left(\frac{M1-M2}{M1}\right) * 100$. Dont :

M1 : poids de la prise d'essai (matériel végétal).

M2 : Poids après dessiccation.

2.2. Procédés d'extraction

- **Extrait aqueux** : La réalisation de deux (2) opérations suivantes sont choisies pour obtenir l'extrait aqueux :

1-Mettre 10 g de poudre des feuilles de la plante dans 100 ml d'eau distillée à une température élevée à 50°C et laisser pendant 30 minutes. Ensuite procéder à sa Filtration et enfin la conservation à 4°C.

2- Mélanger 10 g de poudre des feuilles de la plante dans 100 ml d'eau distillée pendant 3 heures sur une plaque chauffante à une température élevée à 250°C, puis effectuer la filtration et effectuer l'évaporation de l'eau dans une étuve sous une température de 45°C pendant 24 h.

- **Extrait méthanolique** : Pour obtenir l'Extrait méthanolique une macération de 50 g de poudre dans 500 ml de solution hydroalcoolique à 70% (méthanol 70, eau 30 ; v/v) pendant 24 h dans la température ambiante doit être réalisée. A trois (3) reprises successivement ; après filtration du macérât, le filtrat obtenu est concentré à l'aide de

l'évaporateur rotatif sous vide à une température de 40°C jusqu'à ce que l'extrait hydroalcoolique devient très concentré avec la récupération totale du méthanol, ensuite cet extrait est séché dans l'étuve à 45°C puis conservé à 4°C jusqu'à son utilisation (Brou Kouassi et al., 2010).

Les extraits éthérique et chloroformique sont obtenus par macération du poudre végétal pendant 24h. Les tests de détection des groupes composés sont portés sur ces quatre types d'extraits bruts (aqueux, méthanolique, éthérique et chloroformique).

- **Fractionnement par solvants à polarités croissante**

Ce fractionnement est effectué en suivant la méthode décrite par Bekkara et ses collaborateurs 1998, basé sur la non-miscibilité de l'extrait brut avec les trois solvants à polarité croissante utilisés : Le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le 1-butanol.

2g d'extrait brut sont initialement dilués dans 100 ml d'eau bouillante et puis filtrés. Le filtrat est mélangé avec 100 ml de chloroforme (V/V) et on effectue une décantation après 2h. Cette opération est effectuée à deux reprises. Le résultat de cette décantation se résume en deux phases supérieure organique moins dense et inférieure aqueuse.

La phase supérieure est mise en évaporation dans une étuve à une température égale à 45°C par contre la phase inférieure à laquelle est ajouté 100 ml d'acétate d'éthyle (V/V) est soumise à une nouvelle décantation. Il est de même pour ce mélange de prélever sa phase supérieure après deux heures dans un bécher et le mettre également dans l'étuve à 45°C, et l'extrait résultant est considéré comme étant la fraction de l'acétate d'éthyle (FAC). La phase aqueuse inférieure subie un autre fractionnement par 50 ml de n-butanol pour obtenir la fraction butanolique (FBU). Le raffinat qui en résulte représente la fraction aqueuse (FAQ) résiduelle.

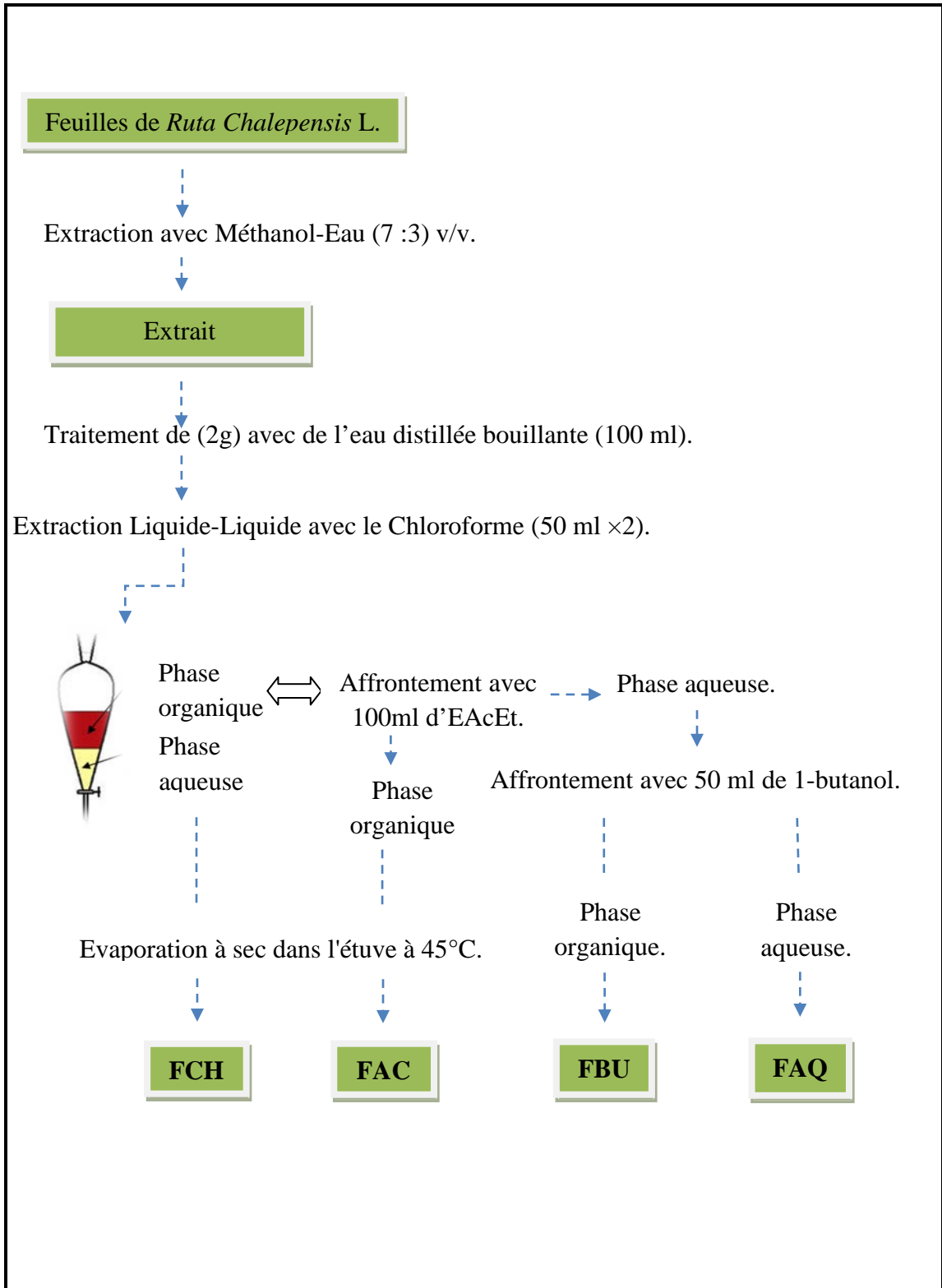


Figure 9 : diagramme de fractionnement de l'extrait brut (Bekkara et al., 1998)

- **Calcul des rendements d'extraction**

Le rendement des différents extraits obtenus est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenue et la masse du matériel végétal traité. Ce rendement est calculé par l'équation :

$$R(\%) = (Me / Mv) \times 100$$

R (%) : Rendement en %, **Me** : Masse de l'extrait après l'évaporation du solvant,

Mv : Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction. (Harborne, 1998).

2.3. Screening phytochimique

Le screening phytochimique regroupe l'ensemble des méthodes et techniques de préparation et d'analyse des substances organiques naturelles de la plante dont le but final est souvent d'isoler un ou plusieurs constituants responsables de l'activité particulière de la plante (Masumbuko, 1996).

- **Test des flavonoïdes**

Ajouter 15 ml d'HCl dilué à 1% à 1 g de poudre sèche puis laisser le mélange pendant 24h, ensuite filtrer ce mélange et rendre le filtrat basique en ajoutant l' NH_4OH . Si la coloration vire au jaune dans la partie supérieure du tube à essai cela signifie la présence des flavonoïdes (Attou, 2011).

- **Test des alcaloïdes**

Ce test est effectué pour révéler la présence ou l'absence des alcaloïdes avec la mise de 5 g de poudre végétale dans 25 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 10%. Après une macération de 24 h, le mélange est passé sur un papier filtre et le filtrat obtenu est réparti dans trois tubes à essai pour le soumettre à deux tests par des réactifs cités ci-après ; le troisième tube sert comme témoin :

- Le test de réactif de WAGNER : l'apparition d'une précipitation brune après l'ajout de quelques gouttes de ce réactif révèle la présence des alcaloïdes.
- Le test de réactif de MAYER : après l'ajout de quelques gouttes de ce dernier à 1 ml de macéré, si une décantation blanche-jaunâtre se développe, cela indique la présence des alcaloïdes (Kanoun, 2011).

- **Test des coumarines**

Deux tests pour déterminer la présence ou l'absence des coumarines :

- **Test 1 :** mélanger 5 ml d'extrait éthérique évaporé à sec avec 0.5 ml de NH_4OH à 25% la présence des coumarines est constatée s'il ya une fluorescence sous une lampe UV à 365 nm.
- **Test 2 :** Afin de confirmer la présence des coumarines, mouiller 1 g de poudre dans l'eau distillée dans un tube à essai puis le couvrir avec un papier imbibé d'une solution de NaOH. Laisser le tout dans un bain-marie pendant 3 minutes puis ajouter 0.5 ml de NH_4OH à 10%. Et enfin mettre deux taches sur un papier filtre et examiner sous la lumière ultraviolette la fluorescence des taches (Rizk, 1982).

- **Test des stérols et triterpènes**

Test effectué sur l'extrait éthérique, après filtration et évaporation du filtrat, l'ajout de 0.5 ml d'Anhydride acétique et de 0.5 ml de chloroforme avec un peu d'acide sulfurique laisse apparaître l'émergence d'une formation d'un anneau rouge-brunâtre en cas de réaction positive (Trease et Evans, 1987).

- **Test des quinones**

Après avoir mouillé 2 g de poudre dans une solution d'HCl à 10%, laisser le mélange dans 3 ml d'éther de pétrole pendant 3 minutes. Ensuite filtrer et traiter 1 ml de macérât avec 1 ml d'une solution aqueuse de soude caustique (NaOH) à 1%. La coloration rouge-rosâtre prouve la présence des quinones (Rizk, 1982).

- **Recherche des composés réducteurs (glucosides)**

Une précipitation rouge-brique s'effectue avec le test à la liqueur de FEHLING acidulée à HCl 1%. De même avec le test avec H_2SO_4 84%.

Pour procéder à la détection des composés réducteurs traiter 1 ml de l'extrait méthanolique avec 2 ml d'eau distillée et la liqueur de Fehling, puis chauffer. Le caractère réducteur des aldoses ou des cétones se révèle par la variation de la couleur de cette solution au rouge ou au rouge brique (Trease et Evans, 1987).

Screening phytochimique (Partie 01) :

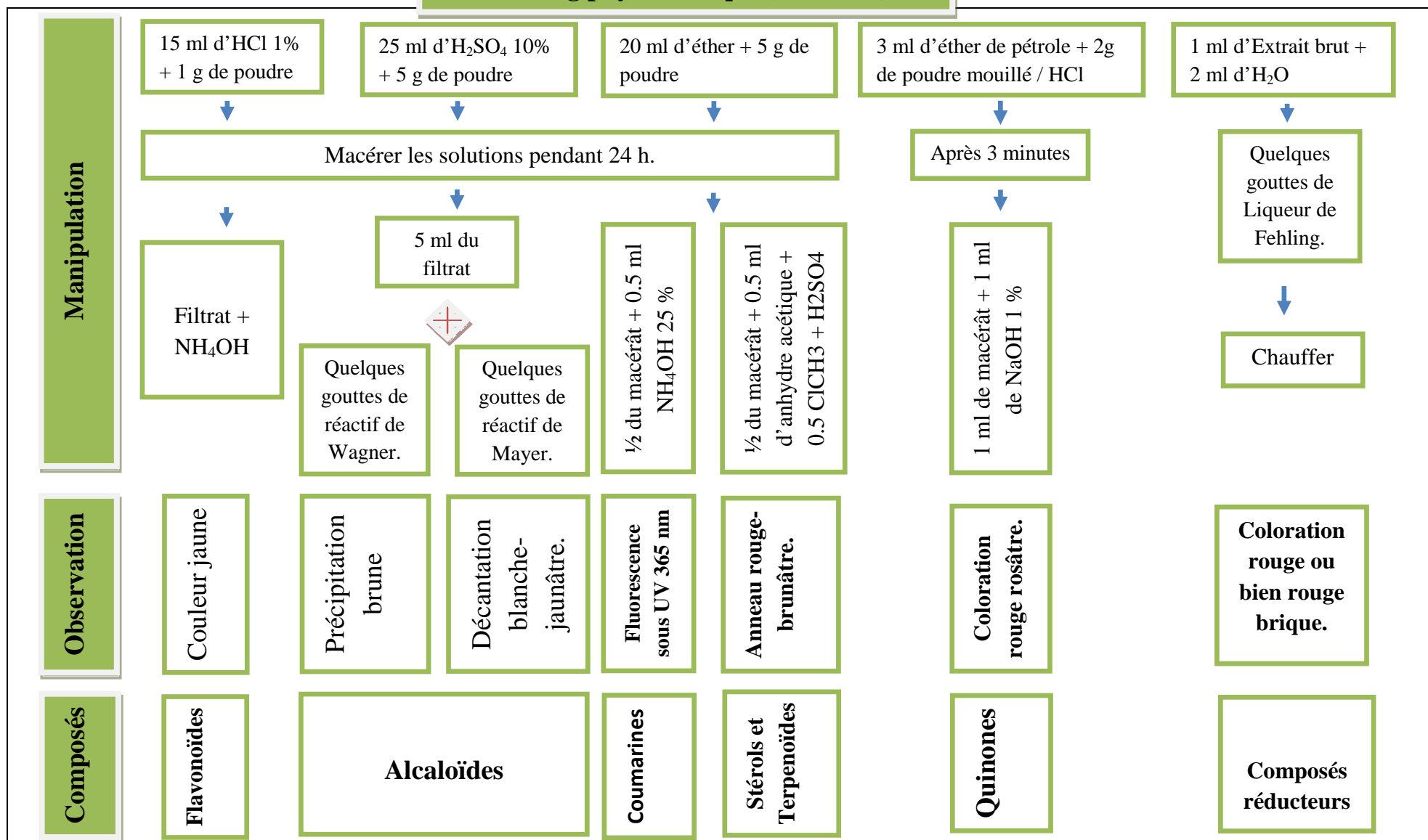


Figure 10 : diagramme des tests phytochimiques.

- **Test d'amidon**

Placez quelques gouttes de lugol ou eau iodée en contact avec 1 ml de l'extrait végétal. Si une coloration bleu foncé est développée, cela signifie qu'en est en présence d'amidon (Kanoun, 2011).

- **Test des tanins**

Mettre 5 g de poudre sèche de la plante dans un Erlenmeyer puis ajouter 100 ml d'eau distillée et laisser infuser pendant 15 minutes (infusé à 5%). Après filtration prendre 5 ml d'infusé dans un tube à essai pour être testé avec le réactif de Stiasny et de chlorure ferrique à 1%, le développement d'une coloration bleu-verdâtre témoigne de la présence des tanins catéchiques, cependant la coloration bleu-noire signale la présence des tanins gallique.

Il convient de signaler que la réaction de Stiasny fait la différence entre les tanins gallique ou catéchiques.

Une autre méthode peut être effectuée en versant 5 ml de réactif de Stiasny sur 10 ml de cet infusé puis mettre le tout dans un bain-marie et laisser chauffer à 90°C pendant 15 minutes. L'apparence d'un précipité indique la présence de tanins catéchiques. Filtrer le mélange et saturer le filtrat d'acétate de sodium pulvérisé, puis ajouter quelques gouttes de chlorure ferrique à 1%, si une teinte bleu-noire est développée cela indique la présence de tanins galliques non précipité par le réactif de Stiasny (Trease et Evans, 1987).

- **Test des saponines**

Effectuer une forte agitation horizontale de 5 ml d'infusé à 5 % ou bien du mélange de 1 g de poudre végétale avec 10 ml d'eau distillée. Laisser attendre 15 minutes. Si une mousse d'au moins 1 cm persiste, elle confirme la présence de saponosides (Benkherara et *al.*, 2011).

- **Test des terpenoïdes**

La vision d'une coloration violette indique la présence des Terpenoïdes qui sont mises en évidence lorsqu'un ajout de 2 ml de chloroforme et 1 ml d'anhydride acétique ainsi qu'un (1) ml d'acide sulfurique concentré à 5 ml d'infusé (Daoudi et *al.*, 2016).

- **Test des anthocyanes**

Si l'ajout de 2 ml d'HCl (2N) avec quelques gouttes d'ammoniac à 2 ml d'infusé à 5 % donne une coloration qui se prononce par acidification et vire au bleu violacé en milieu basique, cela signifie la présence d'anthocyanes (Debray et *al.*, 1971).

- **Test des caroténoïdes**

Pour déterminer des caroténoïdes, Verser 3 ml d'infusé dans un tube à essai et ajouter des doses égales de 3 ml d'HCl et d'H₂SO₄ dans cet ordre. L'apparition d'une coloration vert bleu indique la présence des caroténoïdes (Attou, 2011).

- **Test des mucilages**

Pour connaître la présence des mucilages, mettre 5 ml d'éthanol à 1 ml d'infusé à 5 % puis surveiller une précipitation qui apparait après quelques minutes, dans ce cas le test est positif (Debray et *al.*, 1971).

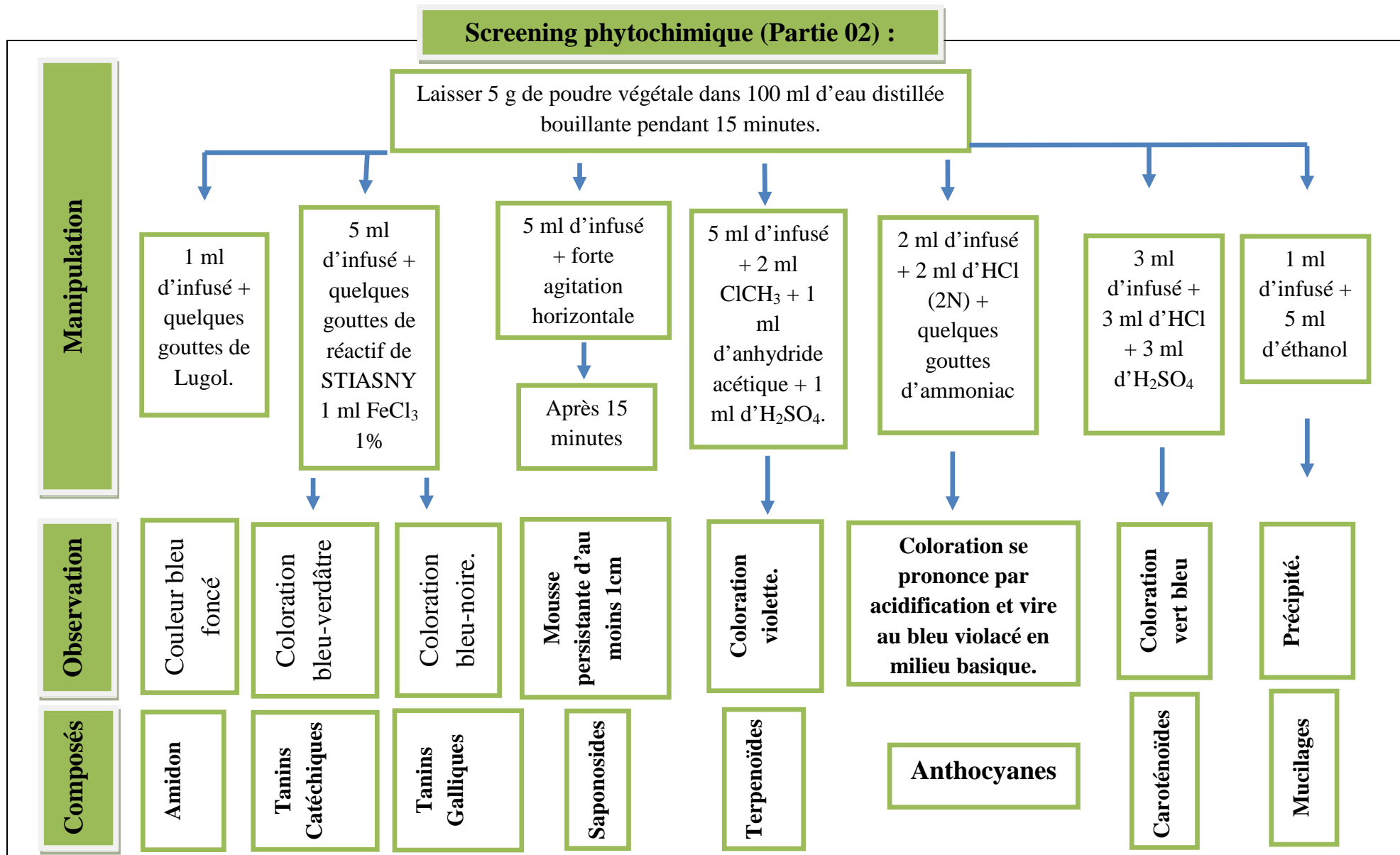


Figure 11 : schéma résume les tests phytochimiques basés sur l'infusé.

2.4. Criblage phytochimique par chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une méthode de séparation des composés qui permet d'analyser la complexité d'un mélange. Cette technique permet d'avoir une idée globale des métabolites présents dans un extrait ou une fraction, son utilisation à pour but l'identification des différents phytoconstitués des extraits bruts (EBR) et des fractions: acétate d'éthyle (FAC), butanolique (FBU) et aqueuse (FAQ) des plantes étudiées et pour visualiser la séparation de ces molécules. (Abedini, 2013).

Phase mobile constituée par un mélange de solvants organiques, six systèmes sont essayés :

Système 1 : n-Butanol / acide acétique / eau avec des volumes relativement (06 /1.5/ 2.5).

Système 2 : Acétate d'éthyle /acide formique/eau (6,5/1.5/2) (v/v/v).

Système 3 : Ether de pétrole / Acétate d'éthyle (8/2) (v/v).

Système 4 : Toluène / acétate d'éthyle/ méthanol (5/3/1) (v/v).

Système 5 : chloroforme / méthanol / eau (6.5/1.5/2) (v/v).

Système 6 : Acétone / Eau (1/1) (v/v).

- **Préparation de la plaque et dépôt de l'échantillon**

Sur une plaque chromatographique, tracer au crayon de papier, un trait à 1 cm environ du bord inférieur et parallèlement à ce dernier. Déposer sur le trait, à l'aide de tubes capillaires ou d'une micropipette (10 µl) d'une façon perpendiculaire et linéairement, à 0,5 cm d'intervalle, une microgoutte de différents extraits (extrait aqueux 1 et 2, extrait méthanolique, chloroformique, d'acétate d'éthyle et de l'extrait butanolique).

Ces échantillons à séparer sont solubilisés dans le méthanol (50 mg / ml), il est à noter qu'il faut effectuer deux à trois dépôts successifs du même analyte en même endroit pour concentrer l'analyte.

déposer chaque plaque verticalement ou légèrement inclinée dans la cuve préalablement saturée par les vapeurs du système solvant approprié, l'échantillon à étudier sera plus

ou moins entraîné vers le haut par la progression par capillarité de la phase mobile de la plaque (Sine, 2003).

- **La révélation**

Les plaques doivent être séchées à température ambiante et les différents spots dont on a marqué à l'aide d'un crayon sont observées sous lumière UV à 254 et 365 nm respectivement dans une chambre noire. Ces plaques sont ensuite révélées par pulvérisation avec Le Trichlorure de fer (FeCl₃) à 10 % dans un mélange MeOH-H₂O (1:1) ainsi que le trichlorure d'aluminium (AlCl₃) à 1% dans l'éthanol. Puis sont séchés à une température ambiante.

Après migration et révélation, chaque spot est caractérisé par sa fluorescence sous UV, sa coloration après la révélation et son facteur de rétention (Rf), ceci est calculé via l'équation :

$$Rf = d/D \text{ ou } h/H.$$

Dont : d (h) correspond à la distance parcourue par le constituant et D (H) à la distance parcourue par le solvant.

2.5. Dosage des polyphénols totaux (PPT)

Prélever 500 µL de réactif de Folin Ciocalteau (FCR) qui est dilué 10 fois dans de l'eau distillée que l'on mélange avec 100 µL de chaque extrait végétal dilué (2 mg / ml). Puis L'ajout après 5 minutes de 1.5 ml de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 2%.Après une incubation du mélange réactionnel pendant 1 heure à une température ambiante et dans l'obscurité, L'absorbance est mesurée à 765 nm. La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations (50 - 100 - 200 – 300 et 500 µg/ml), dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage sus-énumérées. Les résultats sont ainsi exprimés en milligramme d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg d'EAG/g) (Li et al., 2007). Toutes les mesures sont répétées 3 fois.

$$\text{Teneur en phénols totaux} = C \times V \times D/Ps.$$

C concentration des polyphénols en équivalent d'acide gallique déduit de la courbe

V : Volume de l'extrait D : facteur de dilution Ps : poids de la matière sèche.

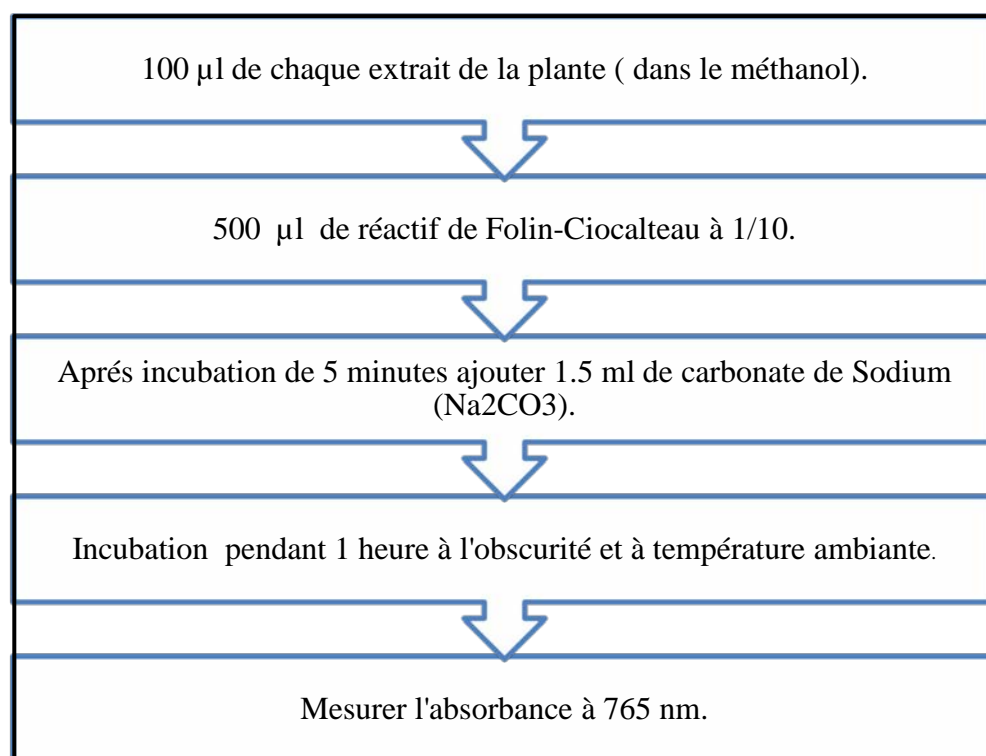


Figure 12 : schéma explicatif du procédé de dosage des polyphénols (Li et al., 2007).

2.6. Détermination des flavonoïdes totaux (FVT)

Procéder à la réalisation d'une courbe d'étalonnage en employant la quercétine. L' AlCl_3 à 2% dans le méthanol est utilisé pour la préparation des solutions de l'ordre de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

A un temps initial ($T = 0$ min) ajouter 1 ml d' AlCl_3 à 2% à 1 ml de chaque extrait et du standard (dissous dans le méthanol 2 mg / ml). Le mélange a été vigoureusement agité. Laisser incuber pendant 10 minutes puis mesurer au spectrophotomètre UVvisible à 430 nm l'absorbance de chaque mélange obtenu. L'expression des résultats obtenus est en mg équivalent de la quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS) (Boudiaf, 2006 ; Djeridane et al., 2006).

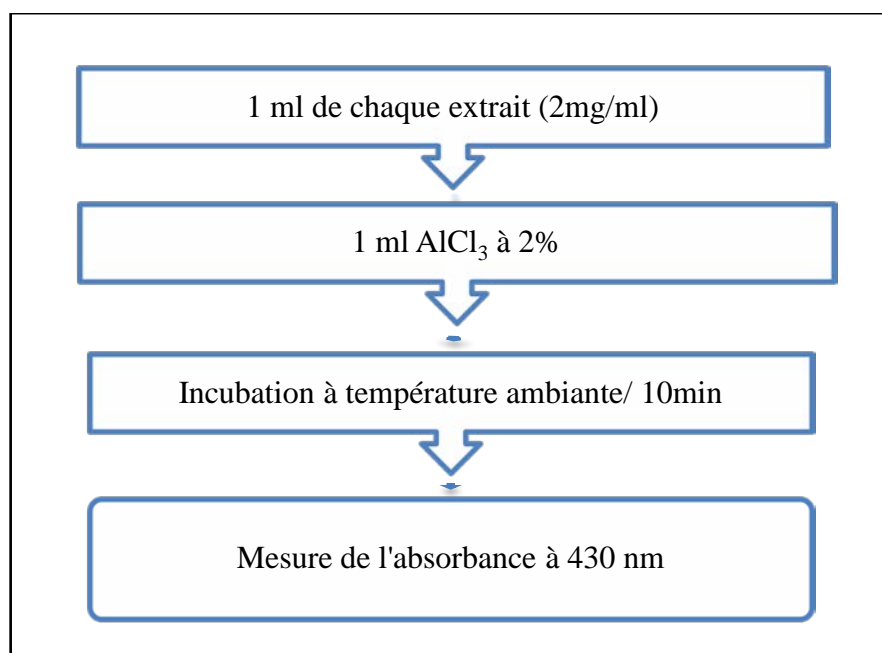


Figure 13 : schéma explicatif du procédé de dosage des flavonoïdes (Boudiaf, 2006 ; Djeridane et *al.*, 2006).

2.7. Evaluation du potentiel antioxydant

- **Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode au DPPH**

Pour évaluer l'activité Antioxydante des extraits, Procéder à la préparation du DPPH solubilisé dans le méthanol absolu $6.10^{-5}M$ d'une part et d'autre part la dilution des extraits aqueux dans le méthanol à 2 mg/ml, à différents concentrations croissantes (1 - 3 – 6 – 9 - 12 $\mu g/ml$). Ainsi que le prélèvement de 50 μl de différentes concentrations de chaque extrait en ajoutant 1.950 ml de la solution méthanolique du DPPH à (0.024 g/l) immédiatement préparée et agiter au vortex.

Pour le contrôle négatif, la solution méthanolique DPPH (1.950 ml) à (0.024 g/l) mélangé à 50 μl de méthanol et aussi le témoin positif « l'Acide Ascorbique ». Une incubation doit être réalisée pendant deux (2) heures à une température normale dans l'obscurité pour effectuer la lecture des absorbances à 515 nm au spectrophotomètre.

$$I \% = ((Ac-At)/Ac) \times 100$$

Ac : absorbance du contrôle négatif At : absorbance du test effectué

Les résultats sont exprimés par la moyenne de trois mesures \pm standard de déviation.

- **Calcul des concentrations inhibitrices IC50**

La concentration inhibitrice IC50 est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH, Elle est calculée graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

3. Analyses statistiques

Les tests sont répétés trois (3) fois et les valeurs sont représentées par la moyenne \pm l'écart type par Excel (2013).

1. Stress oxydatif

Le stress oxydatif (ou stress oxydant) correspond à l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des constituants de la cellule dû aux espèces réactives oxygénées (ERO) et aux espèces réactives azotées (ERN) oxydantes qui vont s'attaquer aux membranes cellulaires, aux protéines et à l'ADN. Un stress oxydant peut être induit lors de la surproduction d'espèce réactives et/ou par suite de l'inhibition des systèmes antioxydants qui peuvent être inactivés, soit directement, soit par défaut de synthèse. Il correspond à un déséquilibre entre molécule pro-oxydantes (ERO) et molécules de défenses antioxydantes (vitamines, enzymes) au niveau cellulaire. Le stress oxydant peut être de courte durée et, grâce aux systèmes antioxydants, limité, avec un retour rapide à un état redox physiologique. Un déséquilibre redox prolongé a des conséquences en pathologie et dans le vieillissement des tissus (Bouguerne, 2012 ; Benhamdi, 2014).

2. Les radicaux libres

Comprennent toute espèce moléculaire pouvant exister seule et contenant un ou plusieurs électrons non apparié sur sa couche externe, c'est à dire un électron célibataire qui confère à ces molécules une grande instabilité. Ils se caractérisent par une demi-vie très courte de l'ordre de la nanoseconde et une réactivité considérable (Dubois, 2015 ; Mergham, 2015). La diffusion limitée de ces radicaux lui permet de réagir avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant à proximité (protéines, lipides, ADN...) entraînant ainsi de multiples dommages et lésions cellulaires irréversibles (Garait, 2006). Les conséquences biologiques sont extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates (Favier, 2003).

2.1. Différents types de radicaux libres

Parmi toutes les espèces réactives oxygénées (ERO), on distingue un ensemble restreint de ces composés qui jouent un rôle particulier en physiologie (Toure, 2015), et ils peuvent être classés en deux catégories :

➤ Les radicaux libres primaires : ils dérivent directement de l'O₂ par une réaction de réduction, ou de l'azote et sont appelés Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) ou Espèces Réactives de l'Azote (ERN). Ils comprennent l'anion superoxyde O₂^{•-}, le radical hydroxyle OH[•], le monoxyde d'azote NO[•] mais aussi le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et le peroxydinitrite ONOO⁻, qui ne sont pas des radicaux libres à proprement parler, mais de puissants oxydants. (Magali, 2013 ; Techer, 2013).

➤ Les radicaux libres secondaires : ils sont formés par la réaction des radicaux libres primaires sur des composés biochimiques cellulaires ; tels que les acides nucléiques, les lipides membranaires ou les protéines. Ce sont par exemple les radicaux peroxydes ROO[•]. (Magali, 2013 ; Techer, 2013).

➤ Les espèces actives de l'oxygène : ce sont des molécules ne possédant pas d'électron non apparié mais elles sont dotées d'un fort pouvoir oxydant car elles peuvent donner naissance à des radicaux libres. (Magali, 2013).

Tableau 2 : Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques (Bartosz, 2003) :

Espèces radicalaires		Espèces non radicalaires	
Nom	Symbole	Nom	Symbole
Anion superoxyde	O ₂ ^{•-}	Peroxyde d'hydrogène	H ₂ O ₂
Radical hydroxyle	OH [•]	Acide hypochlorique	HOCl
Monoxyde d'azote	NO [•]	Oxygène singulier	1O ₂
		Peroxydinitrite	ONOO ⁻

2.2.Source des radicaux libres

L'origine principale des formes oxygénées actives réside dans la réduction d'O₂ par un électron. La chaîne respiratoire est une source permanente de ROS. Les plantes photosynthétiques sont les plus exposées au stress oxydatif, en raison de leurs conditions

oxygénées et l'abondance des photo-sensibilisants et des acides gras polyinsaturés (AGPI) dans la membrane plastidiale. En présence de la lumière, les chloroplastes et les peroxysomes sont la principale source de production des ROS, alors que dans l'obscurité les mitochondries semblent être les principales productrices (environ 1 à 3% de l'oxygène utilisés par la mitochondrie sont incomplètement réduits et produisent des ROS). Il existe d'autres sources importantes de production des ROS dans les plantes, telles que les réactions de désintoxication catalysées par le cytochrome P450 dans le cytoplasme et dans le réticulum endoplasmique et les réactions de réduction catalysées par l'oxalate et l'amine oxydases dans l'apoplaste des cellules végétales (Garait, 2006 ; Benhamdi, 2014).

Chez l'être humain la pollution, le tabagisme, l'alcoolisme, la prise des contraceptifs, l'exposition prolongée au soleil ou à des radiations, la pratique du sport de haut niveau et l'inflammation chronique sont des sources de production des ROS. Une alimentation pauvre en fruits et légumes où se trouve la majeure partie des antioxydants exogènes nécessaires (vitamines C et E, caroténoïdes, polyphénols) favorise une baisse de la capacité antioxydante (Bouguerne, 2012).

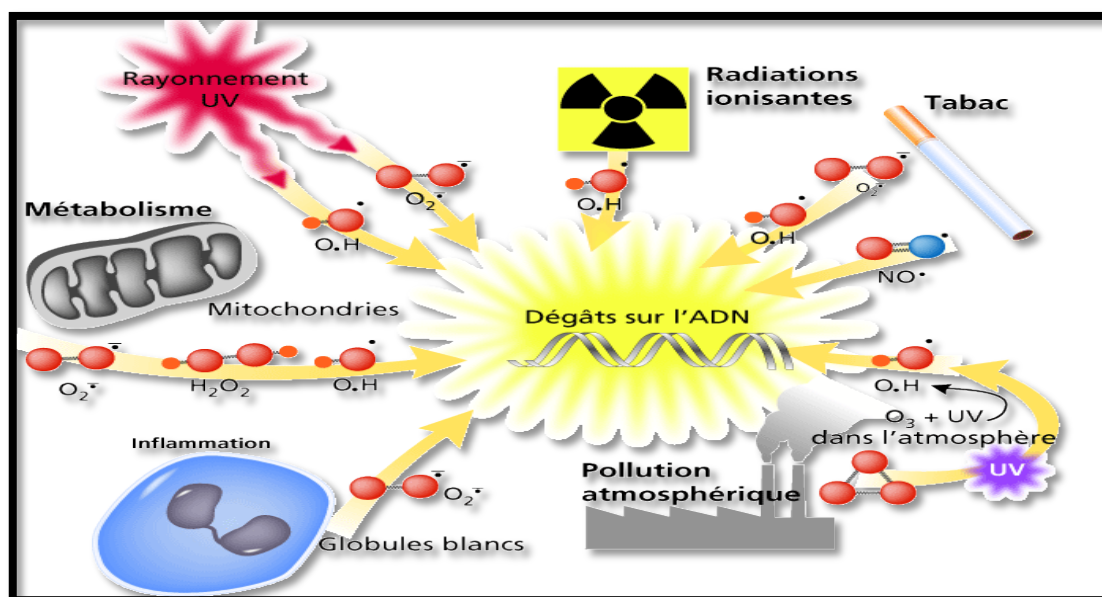


Figure 5: différents origines des radicaux libres (santejeunesse.net)

3. Conséquences des espèces oxygénées réactives

Ces radicaux sont responsables de l'altération de l'ADN, du vieillissement cellulaire, et de diverses pathologies allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives et le diabète (Attou, 2011). Ainsi, les

relations entre stress oxydant et cancer s'avèrent très étroites, les radicaux libres intervenant dans l'activation des pro-carcinogènes en carcinogènes, créant les lésions de l'ADN, amplifiant les signaux de prolifération et inhibant des gènes suppresseurs de tumeur comme la p53. Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles telles les maladies d'Alzheimer et les rhumatismes (Favier, 2003).

L'accumulation des EOR a pour conséquences l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines, les lipides et l'ADN (Alloun, 2013).

3.1. Peroxydation des lipides

L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. Les acides gras polyinsaturés (AGPI) présents dans les phospholipides membranaires sont particulièrement sensibles aux attaques par EOR en raison de leur degré élevé d'insaturation (Mergham, 2015). Le mécanisme de la peroxydation se met en jeu après l'attaque du groupement méthylène par un radical OH, un radical carboné R° est ainsi produit et est transformé, en présence d'O₂, en radical peroxy RO₂. Ensuite ce dernier enlève un hydrogène à un nouvel AGPI voisin qui à son tour produira un Radical R° puis un Radical RO₂. Une réaction en chaîne s'installe pourrait modifier de manière significative la structure des membranes et d'autres lipides, entraînant une fluidité, une perméabilité, un transport, une excitabilité et des processus métaboliques altérés (Alloun, 2013 ; Mergham, 2015). Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN, Parmi eux, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), les acides thiobarbituriques (TBARS) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE). (Garait, 2006).

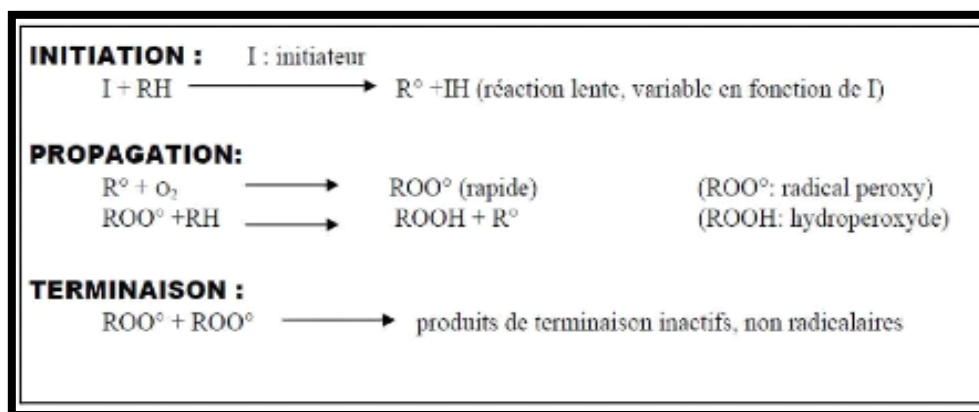


Figure 6: Mécanisme de la peroxydation lipidique (Karray, 2013).

3.2. Oxydation des protéines

Les protéines sont également des cibles pour les radicaux libres. Les dommages oxydatifs à une protéine spécifique, en particulier sur le site actif, peuvent induire une perte progressive d'une fonction biochimique particulière, et affecte l'antigénicité et les activités de protéines (Alloun, 2013 ; Mergham, 2015). Plusieurs types de modifications de protéines induites par les ROS ont été démontrés, y compris la perte de groupes sulfhydryl (SH), la formation de carbonyles, de réticulation disulfure, de sulfoxyde de méthionine, de ditrosine, de nitrotyrosine et de glyoxydation et d'adduits de peroxydation lipidique, entre autres. Des modifications des mécanismes de transduction du signal, des systèmes de transport ou des activités enzymatiques ont été démontrées. L'oxydation des protéines peut être au moins en partie responsable de l'athérosclérose, de nombreuses formes de cancer, d'une lésion par ischémie-reperfusion et peut également être associée au vieillissement (Mergham, 2015).

3.3. Altérations des acides nucléiques et dommages d'ADN

Les radicaux libres peuvent intervenir de différentes façons sur l'ADN. Ils peuvent modifier les bases, provoquer des coupures de chaîne (simple ou double brins), favoriser la formation d'adduits avec des dérivés d'oxydation lipidique ou des protéines (pontage ADN-protéine). Les bases puriques, pyrimidiques et le désoxyribose sont la cible privilégiée des EOR, ils sont alors transformés en produits de fragmentation et en bases oxydées. Les EOR ont une grande affinité de réaction avec certaines bases constitutives de l'ADN. La guanine est ainsi facilement transformée en 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OHdG) qui est normalement éliminée par des enzymes de réparation de l'ADN qui peuvent, elles aussi, être victimes de l'action des radicaux libres (Alloun, 2013). Ces altérations du matériel génétique, si elles ne sont réparées, peuvent engendrer la mutagenèse, la carcinogenèse ainsi que le vieillissement (Techer, 2013).

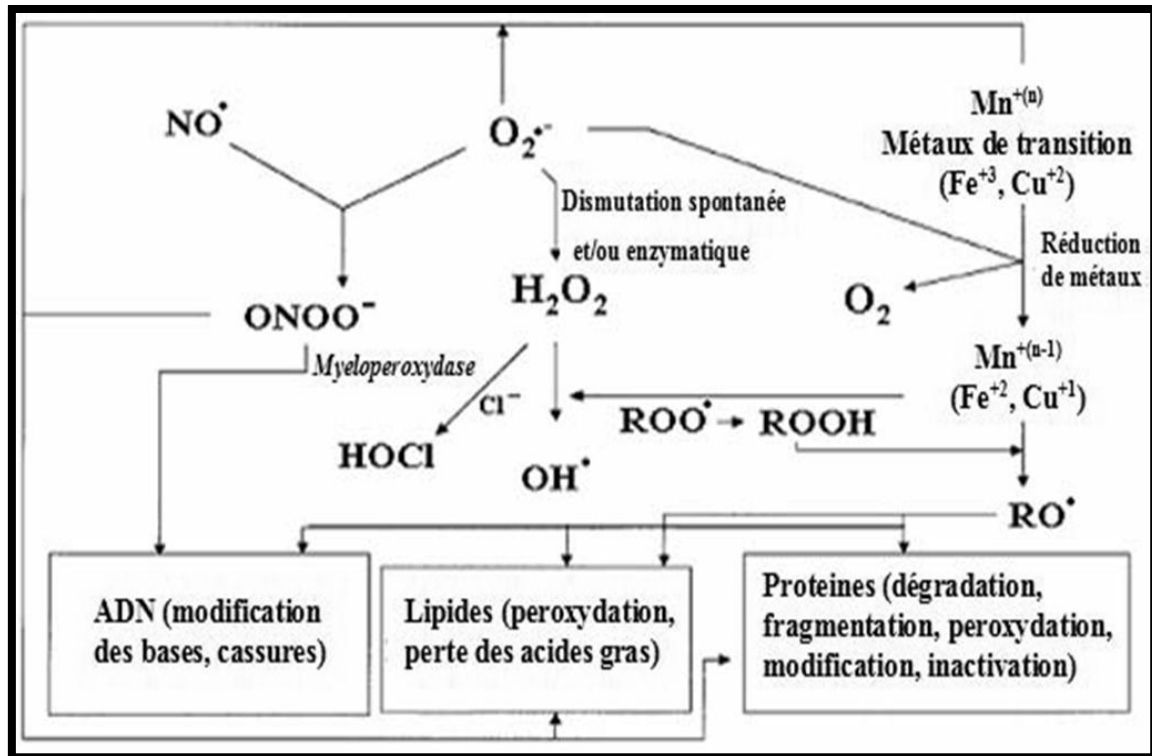


Figure 7: Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les espèces oxygénées réactives (Attou, 2011).

4. Antioxydants et systèmes de défense

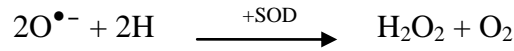
Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui ; présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable ; est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro- ou liposolubles. Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d'antioxydants dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires (Boubekri, 2014).

4.1. Antioxydants enzymatiques

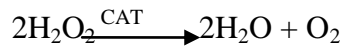
Pour faire face à ces attaques, les organismes ont développé des systèmes d'action antioxydante qui visent à éliminer les espèces réactives de l'oxygène et les catalyseurs de leur formation, induire la synthèse des antioxydants et à augmenter l'activité des systèmes de réparation et d'élimination des molécules endommagées (Boubekri, 2014).

Trois types d'enzymes antioxydantes sont mis en œuvre pour la destruction des espèces réactives de l'oxygène :

- Les superoxydes dismutases (SOD) qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène.



- La catalase (CAT) qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau permettant l'élimination de celui-ci.



- La glutathion peroxydase (GPX) qui décompose aussi le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en l'utilisant pour oxyder le glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG). Le glutathion réductase, une flavoenzyme, régénère GSH de GSSG, avec NADPH comme source de puissance réductrice. En outre, le peroxyde d'hydrogène, GPX réduit également les peroxydes lipidiques (ROOH) formés par l'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) à une molécule stable et non toxique d'acide gras hydroxyle (ROH) (Mergham, 2015).

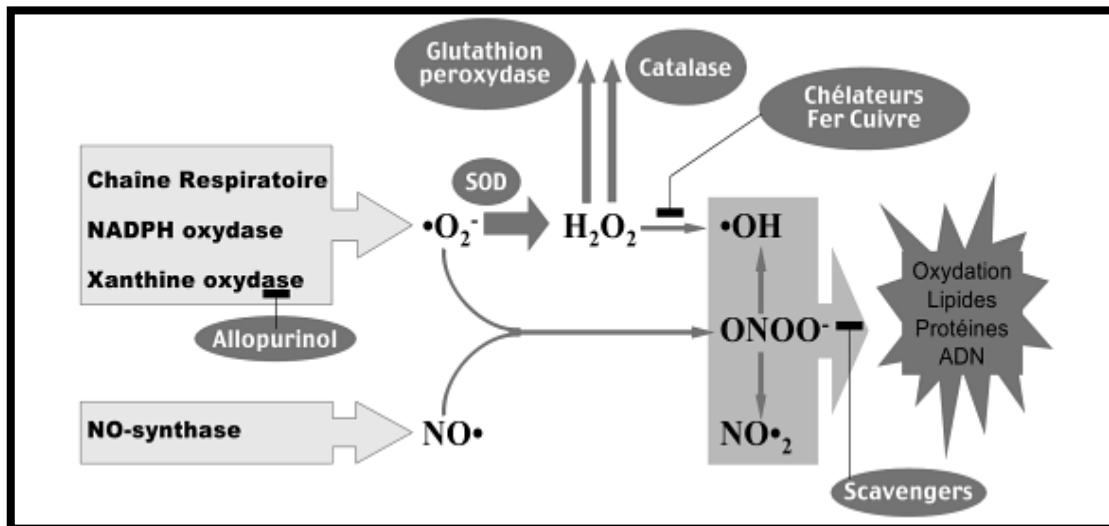
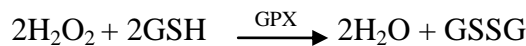


Figure 8: Action des antioxydants au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène (Boubekri, 2014).

4.2. Antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants non enzymatiques sont divisés en antioxydants métaboliques et antioxydants nutritifs. Les antioxydants métaboliques (endogènes) sont produits par le métabolisme du corps tels que le glutathion, l'acide lipéidique, la L-arginine, etc. Alors que les antioxydants nutritifs (exogènes) ne peuvent être produits dans le corps et doivent être fournis par des aliments ou des suppléments tels que la vitamine E, vitamine C, caroténoïdes, polyphénols et autres antioxydants (Mergham, 2015).

- **Glutathion**

C'est un antioxydant hydrosoluble important est synthétisé à partir de la glycine, du glutamate et de la cystéine. Les principaux rôles protecteurs du glutathion contre le stress oxydatif sont les suivants:

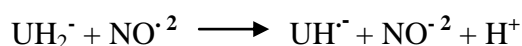
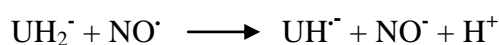
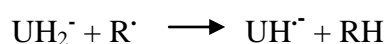
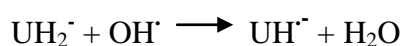
1- Incorporation comme cofacteur dans plusieurs enzymes antioxydantes contre le stress oxydatif.

2- Effet de nettoyage contre le radical hydroxyle et l'oxygène singulet directement, détoxifiant peroxyde d'hydrogène et peroxydes lipidiques par l'action catalytique du glutathion Peroxydase.

3- Régénération des antioxydants les plus importants, la vitamine C et la vitamine E (Mergham, 2015).

- **Acide Urique**

Il est établi que l'acide urique est un réducteur puissant des radicaux libres. En 1981, Ames et ces collaborateurs ont montré que l'acide urique réduit les radicaux peroxyde, hydroxyle, du monoxyde et du dioxyde d'azote. L'acide urique est également un neutralisant puissant de l'ozone, de l'oxygène singulet, de l'acide hypochloreux et du radical superoxyde (Sekli-Belaidi, 2011).



- **La vitamine E**

C'est un antioxydant important qui protège les cellules contre les dommages associés aux radicaux libres et par conséquent, prolonge la vie cellulaire tout en ralentissant le processus de vieillissement et la diminution de l'athérosclérose. Elle est rencontrée surtout dans les huiles végétales, les noix et les germes de divers grains (Alloun, 2013).

- **La vitamine C ou l'acide ascorbique**

C'est un micronutriment qui n'est pas synthétisé par l'organisme humain et doit être apporté dans les aliments. Cette vitamine hydrosoluble est capable de réagir directement avec les radicaux superoxydes, hydroxyles et l'oxygène singulet et peut jouer le rôle d'antioxydant (Alloun, 2013).

- **Les caroténoïdes**

Sont une classe de composés phytochimiques très importante, trouvés dans les légumes et fruits, également dans le lait, empêchent les dommages génétiques, protègent contre les dommages oxydants en augmentant le métabolisme de désintoxication, empêchent l'expression des oncogènes, augmentent l'activité de communication des jonctions GAP (Alloun, 2013).

- **Les tanins**

Toutes les plantes en contiennent à des degrés différents. Ce sont des composés polyphénoliques qui permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections. Ce sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides (Attou, 2011).

- **Les coumarines**

Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Les

conditions structurales requises pour l'activité antiperoxydante des coumarines sont similaires à celles signalées pour les flavonoïdes (Attou, 2011).

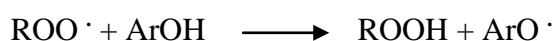
- **Les oligoéléments**

Les oligo-éléments ; Fer, Zinc, Cuivre, Sélénium et Manganèse ; sont des cofacteurs enzymatiques impliqués dans toutes les grandes voies métaboliques et notamment dans la protection contre les espèces radicalaires. Le rôle antioxydant paradoxal du fer s'exerce par l'intermédiaire de la catalase. Le zinc remplit de multiples rôles dans l'organisme : un effet antioxydant par sa participation au maintien de l'activité de la SOD cytoplasmique cuivre et zinc dépendante, un effet modulateur de l'apoptose et une activité de défense anti-infectieuse. Le cuivre agit en synergie avec le zinc dans la SOD cytosolique, et possède ainsi un effet antioxydant et par conséquent un effet anti-inflammatoire et anti-infectieux, notamment dans les tissus cutanéomuqueux. Le sélénium, connu pour son pouvoir anti-peroxydant, anti-inflammatoire et antiviellissement, la détoxification des métaux lourds (cadmium, mercure, plomb) qui s'accumulent dans les tissus au cours du vieillissement, agit par l'intermédiaire de la glutathion peroxydase (GSH-Px) dans la lutte contre les ER toxiques. Le manganèse exerce une action antioxydante spécifique à travers l'activité des SOD mitochondriales pour moduler la production des radicaux libres au cours de la phosphorylation oxydative dans la respiration (Sekli-Belaidi, 2011).

4.3. Les antioxydants de synthèse

- **Polyphénols et flavonoïdes**

Les antioxydants de synthèse habituellement utilisés sont les composés phénoliques qui sont toujours substitués par les alkyls qui ont prouvé une plus grande solubilité dans les graisses et les huiles (Alloun, 2013). Leurs structures leur confèrent une activité antioxydante aussi importante. Les groupes hydroxyle des polyphénols sont bien des donneurs d'atomes d'hydrogènes ; ils peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactifs de l'azote, enfin de réaction, le cycle de génération de nouveaux radicaux est interrompu (Boubekri, 2014).



Le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est également attribué à leur capacité à chélater les métaux ioniques de transition comme le fer et le cuivre impliqués dans la

production de radicaux libres. Cependant, les composés phénoliques peuvent agir comme des pro-oxydants. (Haleng, 2007 ; Boubekri, 2014).

Le présent travail se base sur l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante des feuilles de la plante *Ruta chalepensis* L.

1. Détermination de la teneur en eau

Les végétaux sont riches en eau, les plantes fraîches renferment 60 à 80 % d'eau. Pour assurer une bonne conservation, la teneur en eau doit être inférieure ou égale à 10 % (Diallo, 2005). Nous avons utilisé la méthode pondérale pour déterminer la teneur en eau dans la poudre des feuilles sèches de notre plante. C'est la détermination de la perte de masse par dessiccation à l'étuve.

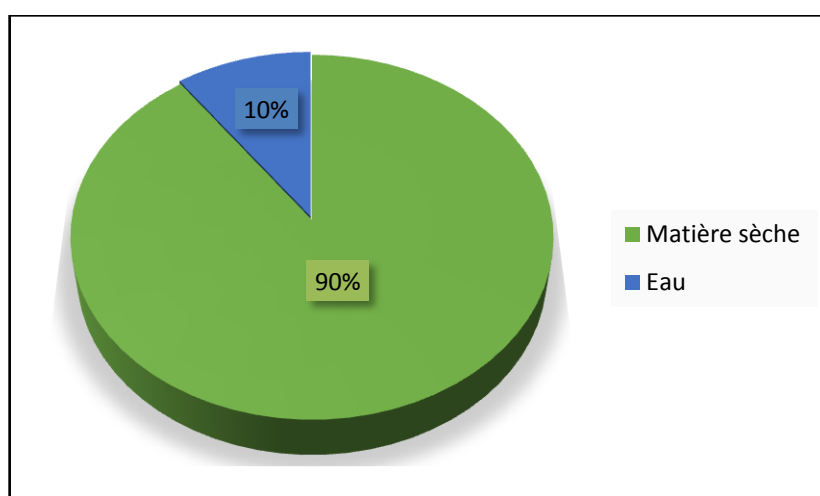


Figure 14 : Teneur en humidité des feuilles sèches de *Ruta Chalepensis* L.

Les résultats de cette analyse ont révélé un taux d'humidité égale à 10% ce qui confère à notre poudre une meilleure conservation à long terme.

Alors que l'étude faite par Daoudi et ses collaborateurs en 2016, révèle une teneur en eau égale à 66.34 %, pour *Ruta chalepensis* L. et de 60% pour *Ruta montana* L. cela peut être expliqué par le fait qu'ils ont utilisé des feuilles fraîches. L'altitude n'a aucune influence sur le rendement (Attou, 2011).

En 2012, Bouzidi et ses collaborateurs apportent un pourcentage d'humidité des feuilles de *R. chalepensis* de 19.01%, de la région de Djebel Tessala, qui est relativement élevé par rapport au notre Djebel des Aurès, mais généralement faible et peut être expliqué par la stratégie adaptative de l'espèce. C'est une plante xérophytes qui croit sous des climats semi-

arides réalisant leur économies hydriques grâce à leur surfaces évaporantes ; des feuilles réduites chez *Ruta Chalepensis* L. explique la teneur faible en eau de cette espèce.

D'une manière globale la teneur en eau des plantes est très variable selon l'aire de répartition, les espèces, les organes et les stades végétatifs (Soltner, 2001).

2. Rendement d'extraction

La préparation des extraits des feuilles de *Ruta chalepensis* L. a été effectuée selon la méthode proposée par Bekkara et ces collaborateurs en 1998. Cette extraction est réalisée par l'utilisation d'une série de solvants à polarité croissante (Méthanol, chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol) permettant ainsi la séparation des composés selon leur degré de solubilité dans les solvants d'extraction.

Pour l'extrait aqueux -1-, c'est le résultat d'une simple infusion à 10%, suivant la méthode de Drissa ces collaborateurs en 2004 ; pour l'extrait aqueux -2-, c'est une décoction à 10%.

Ces procédés d'extraction ont permis d'obtenir trois extraits bruts : l'extrait méthanolique (EBR) et les deux extraits aqueux (E.Aq1 et 2) ainsi que trois fractions : Chloroformique, d'acétate d'éthyle et butanolique. La couleur, l'aspect ainsi que le rendement de chaque extrait par rapport au poids des feuilles séchées pulvérisé sont représentés dans le tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3 : Aspects, couleurs et rendements des extraits de feuilles de *Ruta Chalepensis* L.

Extrait		Aspect	Couleur	Rendement (%)
Aqueux	01	Poudre	Marron claire	18
	02	Pâteux		20.4
Méthanolique		Pâte collante	Marron-Vert	15.32
Chloroformique		Pâte huileuse	Vert foncé	4.29
Acétate d'éthyle		Pâteux	Marron	3.064
Butanolique		Pâteux	Marron	1.36

Les rendements représentés dans le tableau ci-dessus sont illustrés sous forme d'un histogramme permettant de faire une comparaison entre les rendements des différents extraits:

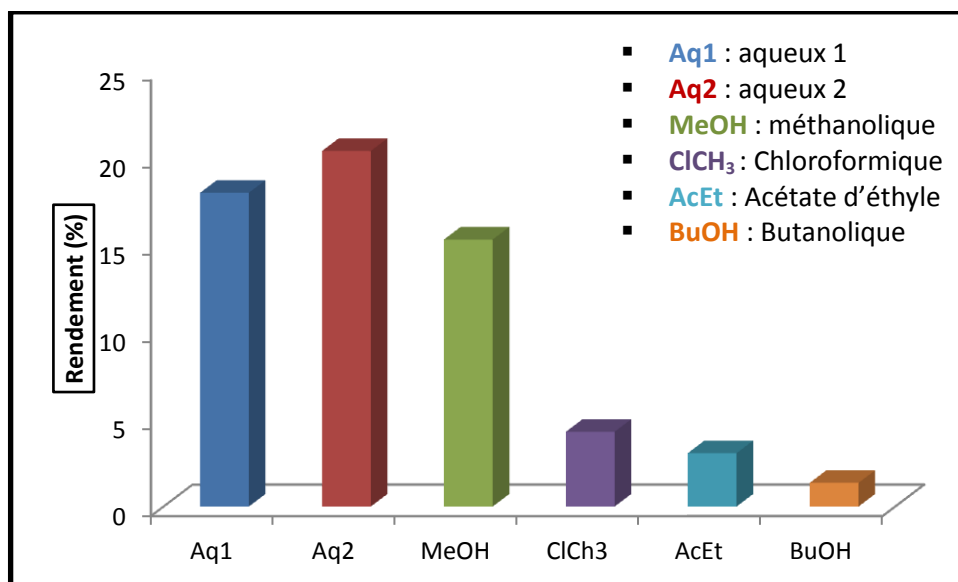


Figure 15: Rendements des extraits des feuilles de *Ruta Chalepensis L.*

L'historgramme représente les rendements d'extraction de différents extraits et fractions préparés qui sont respectivement : EAq1 (18 %), EAq2 (20.4%), EBR (15.32%), FCH (4.29%), FAC (3.064%) et en fin FBU (1.36%).

A partir de ces résultats nous constatons que les extraits aqueux et l'extrait méthanolique présentent les rendements les plus élevés par rapport à ceux des différentes fractions. Alors que l'extrait butanolique est celui qui présente le plus faible des rendements.

L'extrait brut a été confirmé par Attou (2011), avec un rendement égal à 15.88% dans la station d'Ain Témouchent. Selon une étude mener par El-Said et ces collaborateurs en 1990 sur la même espèce, le rendement en extrait brut de la partie aérienne entière est de 3.75%. Rendement nettement inférieure à celui obtenu dans notre étude. Cela est peut être dû à l'utilisation de soxhlet où la température élevée pendant plusieurs heures peut dégrader certains constituants sensibles (tels les polyphénols...) (Andersen et Markham, 2006), ce qui n'est pas le cas dans notre étude où l'extraction est réalisée à froid par simple macération. La méthode d'extraction menée à température ambiante permet d'extraire le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

Le rendement d'extraction dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. La méthode d'extraction affecte également tout le contenu total en phénols et flavonoïdes et l'activité antioxydante (Lee et *al.*, 2003).

3. Analyse des extraits

3.1. Analyse qualitative

3.1.1. Screening phytochimique

La mise en évidence des différentes classes des métabolites secondaires constituant une plante, nous permet d'avoir une bonne idée sur ses activités pharmacologiques. Pour cela les tests phytochimiques sur les feuilles de la plante *Ruta chalepensis* L. sont réalisés.

Ces tests sont en relation avec l'intensité du précipité et de turbidité ou la coloration est proportionnelle à la quantité de la substance recherchée. Les réactions de caractérisation ont permis de mettre en évidence plusieurs groupes chimiques. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 4: Les groupes chimiques rencontrés dans les feuilles de *Ruta chalepensis* L.

Constituants		Résultats	Observation	
Composés phénoliques	Flavonoïdes	+	Apparition d'une couleur Jaune	
	Tanins	Catéchiques	+	Obtention d'un précipité
		Galliques	-	Absence d'une teinte Bleu- noire
	Coumarines	+	Fluorescence	
	Anthocyanes	-	Absence de la couleur bleu violacée	
Composés azotés	Alcaloïdes	+++	Apparition d'un précipité brun remarquable	

Stéroïdes et terpenoïdes	Stérols et Triterpènes	-	Absence d'anneau rouge brunâtre
	Terpenoïdes	+	Apparition d'une couleur marron
	Saponines	-	Absence totale de la mousse après 15 minutes.
Mucilages		-	Absence d'un précipité
glucosides		-	Absence du couleur rouge brique
Amidon		++	Développement d'une coloration bleu foncée
Caroténoïdes		+	Anneau bleu-vert dans la partie supérieure
Quinones		-	Absence de la coloration rouge rosâtre

Réaction franchement positive : +++ . Réaction moyennement positive : ++

Réaction faiblement positive : + . Absence de la substance : -

A partir de ces résultats nous constatons que : les feuilles de la plante *Ruta chalepensis* L. sont très riches en composés Azotés (Alcaloïdes), elles renferment également l'amidon, ainsi que des flavonoïdes, tanins catéchiques confirmée par la réaction de Stiasny, de coumarines, de terpénoïdes et de caroténoïdes, ce qui confirme les travaux de Attou (2011), qui a été révéle la présence de flavonoïdes, et par la réaction de cyanidine confirme la présence de flavonones, flavanonols et flavonoïdes libres dans les feuilles. De flavones et flavonoïdes libres (génines flavoniques) dans les tiges et fleurs. Ces résultats sont confirmés par la CCM et le dosage colorimétrique par spectrophotomètre.

Des screening phytochimiques ont mis en évidence la présence de coumarines: chalepensisin, chalepin, rutamarin, bergapten, isopimpinellin et xanthotoxin (Ulubelen et Terem, 1988), augustifolin, scoparone et le 6,7,8-trimethoxy-coumarine (Del Castillo et al., 1984), et d'alcaloïdes : kokusaginine, skimmianine, arborinine, γ -fagarine, graveoline, 3'-hydroxygraveoline (Ulubelen et al., 1986), taifine, isotaifine and 8-methoxytaifine (Mohr et al., 1982) en plus du choloridone (Ulubelen et Terem, 1988).

Le test avec le réactif de Mayer révèle la présence des alcaloïdes, ce qui explique la toxicité de *Ruta chalepensis* L. rapportée par Collin (2012); aussi, la présence des alcaloïdes pourrait impliquer des activités biologiques intéressantes, notamment antiproliférative et antalgique (Somboro, 2010).

Alors que les tanins galliques, les anthocyanes, les stérols et triterpènes ainsi que les saponines, les mucilages, les quinones oses et holosides sont totalement absents ou rares. Ce qui s'oppose aux résultats trouvés par Daoudi (2016) concernant sa richesse en mucilages, oses et holosides, et ceux de Attou (2011) concernant la présence des stérols et saponines.

D'une façon générale, les familles chimiques détectées dans notre étude viennent confirmer les travaux de Hnatyszyn et ses collaborateurs en 1974; Mohr et ses collaborateurs en 1982; Ulubelen et Terem en 1988 et aussi Mansour El-said et ses collaborateurs en 1990 sur la même espèce (*Ruta chalepensis*) de provenance d'Espagne, Égypte, Turquie et d'Arabie saoudite respectivement.

3.1.2 Criblage phytochimique par chromatographie sur couche mince

Pour une caractérisation partielle des différents extraits de feuilles de *Ruta Chalepensis* L. une chromatographie sur couches minces (CCM) a été réalisée suivant la méthode de Diallo et ses collaborateurs en 2004. Le système solvant utilisé, parmi les six systèmes choisis, (Toluène - acétate d'éthyle - méthanol, 5 :3 :1 V/V/V) a permis d'obtenir une très bonne séparation chromatographique. La révélation est réalisée par le réactif $AlCl_3$ après l'observation sous lumière ultraviolette.

L'utilisation de différents solvants à polarités différentes a permis de séparer ces composés selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction. Les résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits sont reportés dans le tableau 5; Il s'agit des informations sur les facteurs de rétention des constituants chimiques et leur

coloration après révélation avec l' AlCl_3 ; et les chromatogrammes sont illustrés dans la figure 16.

Il est à noter que la valeur du R_f n'est pas une constante physique du corps, car elle est influencée par plusieurs facteurs ; tels que la nature du solvant utilisé (organique ou aqueux), la technique employée, la température ainsi que la disposition des différents substituants et leurs positions sur le squelette flavonoïque (Mansor-Djaalab, 2014).

Cette valeur varie aussi avec le type de support chromatographique (gel de silice, polyamide, cellulose), la nature du produit lui-même (aglycone ou glycosyle) (Berthillier, 1972 ; Merkhham, 1982). C'est pour cela que nous avons basé beaucoup plus dans la détection de différentes classes des flavonoïdes sur la coloration des spots.

Tableau 5 : Résultats de la chromatographie sur couche minces des extraits des feuilles de dans le système TAM : Toluène/ acétate d'éthyle/ méthanol, 5 :3 :1 (V/V/V). Adsorbant : gel de silice.

Système 4 : Toluène - acétate d'éthyle - méthanol (5, 3, 1) (v/v).									
spot s		Rf	Couleur	type de flavonoïdes possibles		spots	Rf	Couleur	Type de flavonoïdes possibles
extrait aqueux 1	1	0,11	Jaune	Flavonols glycoside, flavones glycoside	extrait méthanolique	1	0,23	Marron	Flavonoïdes, Flavonols glycoside, flavones glycoside
	2	0,23	Marron	Flavonoïdes, Flavonols glycoside, flavones glycoside		2	0,15	Violet	Flavones
	3	0,46	Violet	Flavones		3	0,25	Jaune-claire	Flavonols, flavonones, Aurones
	4	0,63	Bleu-violet	Anthocyanidine 3-glycoside, Flavones, Flavoneméthylée ou hydroxy flavonols		4	0,39	Bleu	Flavonones, Aurones
	5	0,78	Jaune-marron	Flavonols glycoside, flavones glycoside, Flavonoïdes		5	0,45	Jaune-claire	Flavonols, flavonones, Aurones

TROISIEME PARTIE : Résultats Et Discussion

Extrait aqueux 2	6	0,84	Jaune-claire	Flavonols, flavonones, Aurones		6	0,6	Marron	Flavonoïdes, Flavonols glycoside, flavones glycoside
	1	0,09	Bleu	Flavonones, Aurones		7	0,73	Bleu	Flavonones, Aurones
	2	0,23				8	0,75	Marron	Flavonoïdes
	3	0,45	Jaune-claire	Flavonols, flavonones, Aurones		9	0,81	Marron foncé	Flavones glycoside, flavonols glycoside
	4	0,61	Marron	Flavonoïdes, Flavonols glycoside, flavones glycoside	10	0,94	Jaune	Flavonols glycoside, flavones glycoside	
	5	0,76	Bleu	Flavonones, Aurones	Extrait chloroformique	1	0,13	Marron	Flavonoïdes, Flavonols glycoside, flavones glycoside
	6	0,83	Marron	Flavonoïdes, Flavonols glycoside, flavones glycoside		2	0,15		
	1	0,15	Violet	Flavones		3	0,2	Violet	Flavones
	2	0,19	Marron	Flavonoïdes, Flavonols glycoside, flavones glycoside		4	0,25	Bleu	Flavonones, Aurones
	3	0,3				5	0,26	Violet+cercle marron	Flavones, flavonoïdes
4	0,34	Bleu	Flavonones, Aurones	6		0,32	Bleu claire	Flavoneméthylée ou hydroxy flavonols,	

TROISIEME PARTIE : Résultats Et Discussion

Extrait d'acétate d'éthyle					Extrait Chloroformique				Isoflavones, flavonones
	5	0,39	Marron	Flavonoïdes, Flavonols glycoside, flavones glycoside		7	0,36	Orange	Flavoneméthylée ou hydroxy flavonols, flavonones, Aurones, Flavonoïdes xanthonique
	6	0,45	Vert	Flavones, Chalcones, Isoflavones, Anthocyanidine 3-glycoside		8	0,43		
	7	0,6	Violet	Flavones		9	0,55		
	8	0,79	Bleu	Flavonones, Aurones		10	0,57	Jaune	Flavonols glycoside, flavones glycoside
	9	0,94	Violet	Flavones		11	0,6	Jaune marron	Flavonols, Flavonoïdes
Extrait	1	0,17	Marron	Flavonols glycoside, flavones glycoside	12	0,65	Orangé claire	Flavoneméthylée ou hydroxy flavonols, flavonones, Aurones, Flavonoïdes xanthonique	

TROISIEME PARTIE : Résultats Et Discussion

Butanoli que	2	0,33	Marron foncé	Flavones glycoside, flavonols glycoside		13	0,71	Marron	Flavonoïdes, Flavonols glycoside, flavones glycoside
	3	0,47	Marron	Flavonols glycoside, flavones glycoside		14	0,76	Bleu	Flavonones, Aurones
	4	0,64	Marron- claire						
	5	0,8	Violet	Flavones		15	0,9	Marron	Flavonoïdes

Les extraits des feuilles de la plantes *Ruta chalepensis* L. ont montré après observation à l'UV (254 et 365 nm) et révélation par l' $AlCl_3$ une richesse en constituants chimiques. Avant la révélation la majorité des spots apparaissent sombre, mais après leurs expositions à l' $AlCl_3$ les spots sont apparus avec différentes couleurs à savoir : vert, jaune, orange, marron, bleu et violet. Tout ce nombre de spots élevé et de couleurs variés constitue une indication de la présence de plusieurs types de substances chimiques relevant de différentes classes des flavonoïdes.

Six spots ont été ségrégués des dépôts de chaque extrait aqueux par le système utilisé dont l'intervalle des rapports frontaux varie entre 0.09 et 0.84 rentrant dans les classes des flavonoïdes : flavonols, flavones, flavonones, aurones, flavoneméthylée ou hydroxy flavonols et anthocyanidine 3-glycoside.

S'agissant des extraits méthanolique, chloroformique et d'acétate d'éthyle nous avons remarqué le plus grand nombre de spots partagés entre dix spots qui incluent des R_f de 0.23 et 0.94 pour l'extrait méthanolique, quinze spots regroupant des R_f allant de 0.13 jusqu'à 0.9 concernant l'extrait chloroformique et neuf spots avec des R_f basculent entre 0.15 et 0.94 pour l'extrait d'acétate d'éthyle qui nous renvoient aux flavonoïde xanthonique, chalcones et isoflavones en plus des composés flavonique suscités. Alors que l'extrait butanolique ne renferme que les flavonols et les flavones-glycosides.

Ces résultats restent tout de même préliminaires. La CCM nous a permis de contrôler la qualité de nos différents extraits, même si elle n'est pas suffisante pour identifier un constituant précis, elle nous a permis d'obtenir des renseignements utiles sur les éléments constitutifs de nos extraits (fluorescence, coloration, facteur de rétention...).

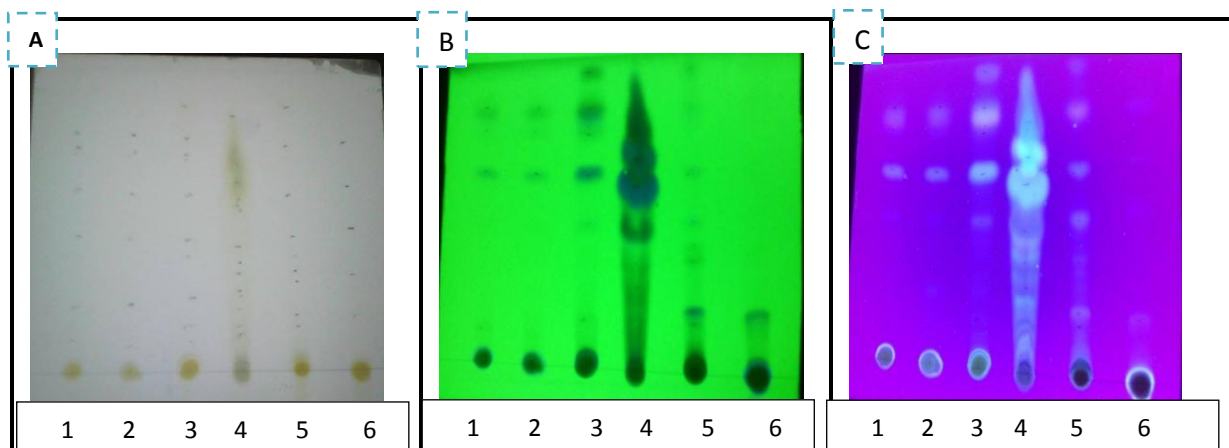


Figure 16 : Chromatogrammes résultant de l'analyse de différents extraits par CCM (dans le système solvant : Toluène/ acétate d'éthyle/ méthanol 5/3/1).

A : chromatogramme photographié après révélation avec l' AlCl_3 .

B : chromatogramme photographié sous lampe UV à 254 nm.

C : chromatogramme photographié sous lampe UV à 365 nm.

1 : EAq1. 2 : EAq2. 3 : EBR. 4 : FCH. 5 : FAC. 6 : FBU.

3.2 Etude quantitative des extraits de *Ruta chalepensis* L.

Les composés phénoliques (acides phénoliques, tanins et flavonoïdes) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes (Beta et *al.*,2005). Et comme la majorité des effets pharmacologiques des plantes est dû à ces substances, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes des six extraits (Aqueux 1 et 2, MeOH, ClCH_3 , EAC et BuOH) de *Ruta chalepensis* L. a été effectué pour en estimer les teneurs.

3.2.1. Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols totaux des extraits bruts de la plante *Ruta chalepensis* L. ont été effectué selon la méthode de Folin-ciocalteau. La concentration des polyphénols a été calculée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'Acide gallique (50-500 μg / ml) et est exprimée en milligrammes équivalents d'acide gallique par grammes du poids d'extrait (mg d'EAG / g d'E).

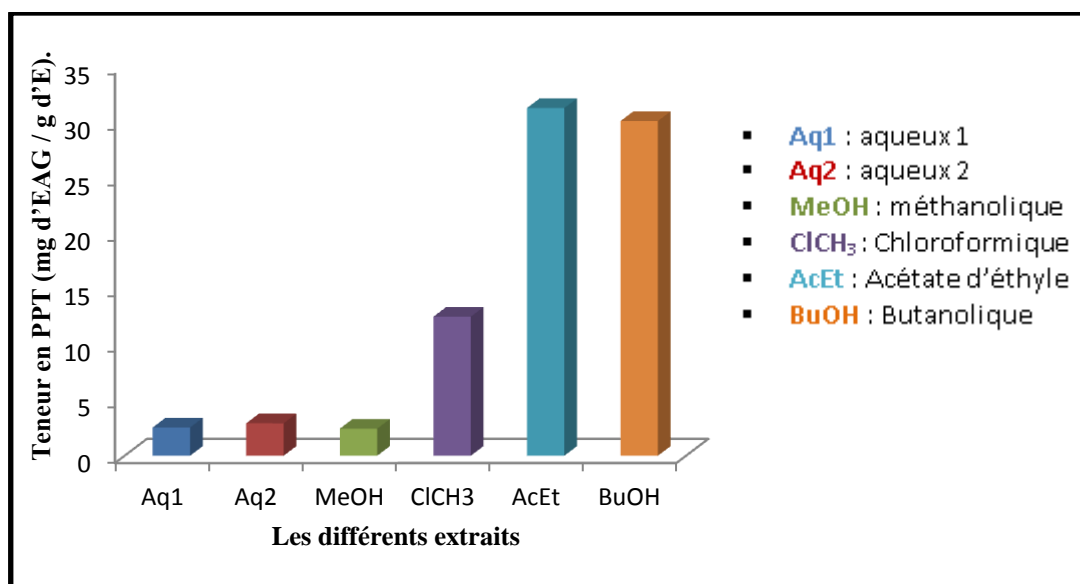


Figure 17: Teneur en polyphénols totaux de différentes fractions de la plante *Ruta chalepensis* L. (mg d'EAG / g d'E).

D'après les résultats présentés dans la figure ci-dessus, l'extrait d'acétate d'éthyle est le plus riche en polyphénols (31.275 ± 4.54 mg d'EAG / g d'E), suivi régressivement par l'extrait butanolique (30.105 ± 7.61 mg d'EAG / g d'E), chloroformique (12.505 ± 3.11 mg d'EAG / g d'E), aqueux 2 puis 1 (2.92 ± 0.46 et 2.54 ± 1.14 mg d'EAG / g d'E) et enfin par l'extrait méthanolique qui contient la teneur la plus basse (2.435 ± 0.39 mg d'EAG / g d'E).

Dans une étude faite sur les feuilles de *Ruta chalepensis* L. par Rached., (2009) qui a dosé les polyphénols totaux par la méthode de Folin Ciocalteu, le résultat obtenu est inférieur à 100 mg/g. Cependant nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Hazzit et ses collaborateurs en 2015 qui ont montré que les extraits de *Ruta graveolans* L. ainsi que *Ruta montana* L. renferme une teneur en polyphénols égale à 37 et 38.25 mg d'EAG/ g d'extrait sec respectivement.

La faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également de certains sucres et de protéines etc. (Vuorela, 2005 ; Gomez-Caravaca et al., 2006).

Le solvant d'extraction emporte des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique (Djeridane et al., 2006). Le dosage par ce réactif donne donc une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait. Il n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de

composés peuvent réagir avec le réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé (Tawahaet *al.*, 2007).

En effet, la teneur phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (conditions climatiques, les pratiques culturelles, la maturité à la récolte et les conditions de stockage) (Falleh *et al.*, 2008 ; Podsdek, 2007).

Il est important de souligner que l'utilisation de plante d'origine géographique et climatique distinctes ainsi que des méthodes d'extraction et de dosage différentes réduisent la fiabilité d'une comparaison entre les deux études.

3.2.2. Dosage des Flavonoïdes

L'étude quantitative des fractions issues de l'extrait méthanolique ainsi que les extraits aqueux et de même le méthanolique au moyen des dosages spectrophotométrique, selon la méthode de trichlorure d'aluminium avaient pour objectif la détermination de la teneur en flavonoïdes. La concentration des flavonoïdes dans les extraits a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage $Y = ax + b$ établie avec la quercétine à différentes concentrations (5-40 $\mu\text{g/ml}$ chacune a été préparée dans le méthanol), pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que les extraits, servira à la quantification des flavonoïdes. La teneur en flavonoïdes a été exprimé en milligrammes équivalents de quercétine par gramme du poids d'extrait (mg EQ/ g E).

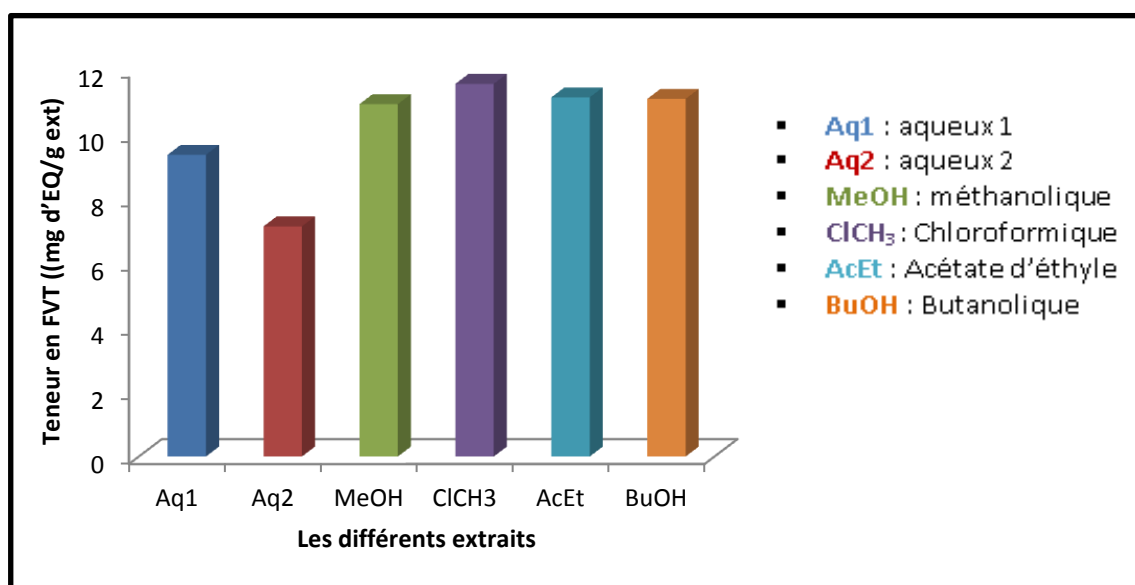


Figure 18 : Teneur en flavonoïdes totaux de différents extraits et fractions de la plante *Ruta Chalepensis*L. (mg d'EQ/g d'E).

Suivant la figure ci-dessus, les teneurs en flavonoïdes de différents extraits de la plante *Ruta chalepensis* L. sont : 9.37 (mg d'EQ/gd'E), 7.15 (mg d'EQ/gd'E), 10.94 (mg d'EQ/gd'E), 11.57 (mg d'EQ/gd'E), 11.15 (mg d'EQ/gd'E) et 11.11 (mg d'EQ/gd'E) respectivement avec les extraits aqueux 1 et 2, méthanolique, chloroformique, acétate d'éthyle et butanolique. L'extrait chloroformique représente la teneur la plus élevée, tandis que la teneur la plus basse est celle obtenue avec l'extrait aqueux 1.

Ces résultats sont approximatifs avec ceux de Rached, (2009) qui a démontré que les feuilles de *Ruta chalepensis* L. présentent une teneur en flavonoïdes égale ou inférieure à 25 %. Alors que les travaux de Hazzit et ses collaborateurs en 2015, confirment nos résultats car ils ont trouvé une teneur en flavonoïdes égale à 10 mg EQ/g d'extrait sec pour *Ruta montana* L. d'Alger.

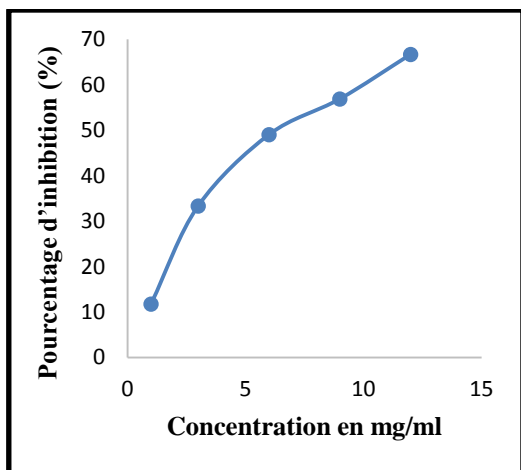
4. Résultats de l'activité antioxydante par la méthode du radical DPPH

Dans le test de DPPH, la cinétique de décoloration de ce radical a été suivie à 517 nm. Ce radical libre présente une coloration violet sombre, lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes, la forme réduite confère à la solution une coloration jaune pâle, le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration de la couleur de la forme libre en solution dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance anti-radicalaire.

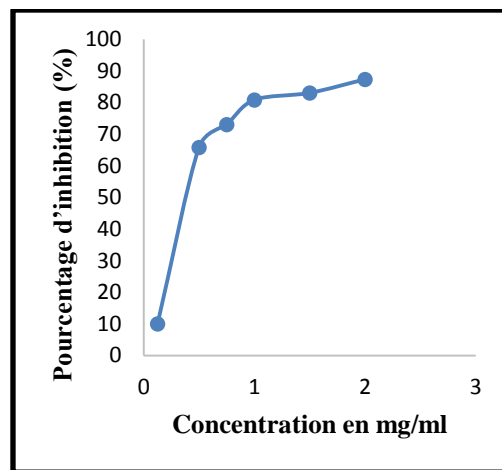
Le radical DPPH est souvent utilisé comme un indicateur pour tester la capacité de l'extrait à donner un atome d'hydrogène ou un électron et donc l'activité antioxydante (Oyaizu, 1986 et Soares et *al.*, 1997). Il a été trouvé que l'acide ascorbique, les tanins et les flavonoïdes provoquent la réduction et la décoloration du radical libre DPPH en lui donnant un hydrogène pour former le diphénylpicrylhydrazine (Blois, 1958 et Yokozawa et *al.*, 1998).

Les différentes densités optiques ont permis de tracer pour chaque extrait, une courbe d'allure exponentielle, ce qui signifie l'existence d'une relation proportionnelle entre le pourcentage de réduction du radical libre et la concentration de l'extrait dans le milieu réactionnel, à partir de ces courbes nous pouvons déterminer la valeur de la concentration inhibitrice (IC₅₀) de chaque extrait.

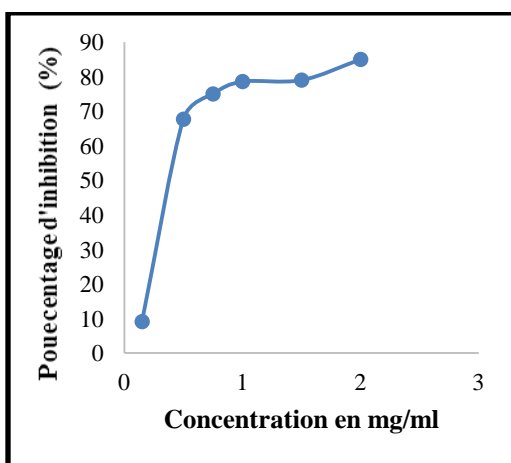
Pour des fins comparatives l'acide ascorbique est utilisé comme un antioxydant standard. Il a montré une activité anti-radicalaire très puissante avec IC₅₀ 0.002 (mg / ml).



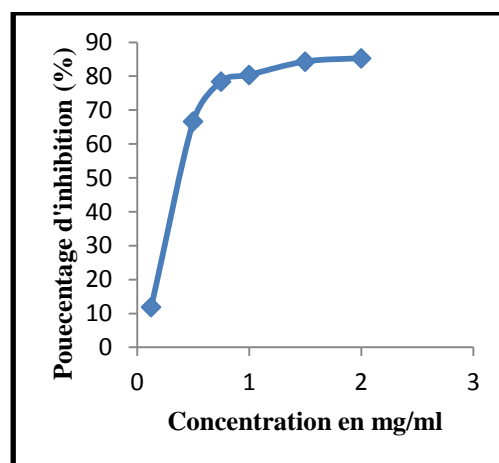
(A). Pourcentage d'inhibition d'EA -1-



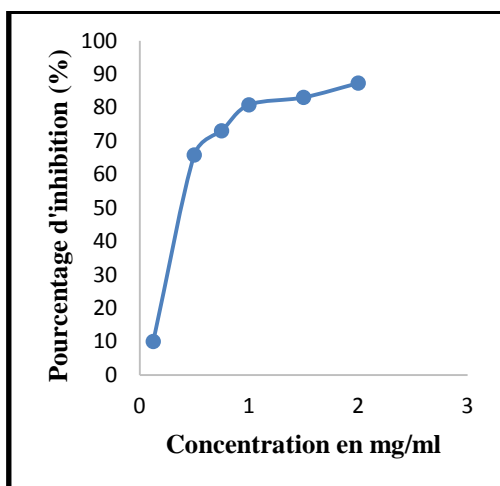
(B). Pourcentage d'inhibition d'EA -2-



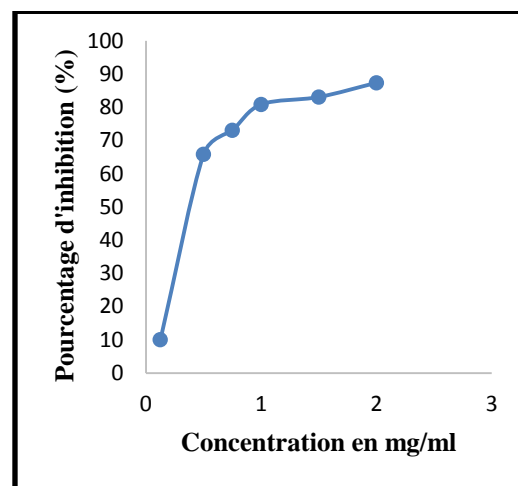
(C). Pourcentage d'inhibition d'EBR



(D). Pourcentage d'inhibition de la FCH



(E). Pourcentage d'inhibition de la FAC



(F). Pourcentage d'inhibition de la FBU

Figure 19 : Pourcentages de réduction du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les différents extraits des feuilles de *Ruta Chalepensis* L.

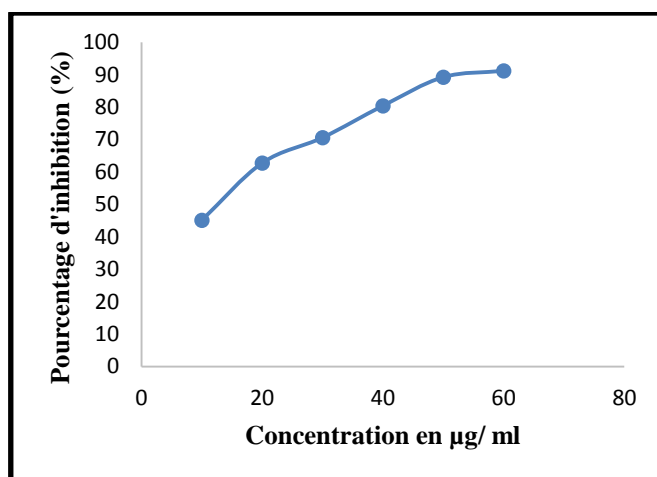


Figure 20: Pourcentages de réduction du radical libre DPPH de l'Acide Ascorbique.

Suivant ces résultats représentés dans les figures 19 et 20 ci-dessus nous remarquons que l'extrait méthanolique et les fractions chloroformique, acétate d'éthyle et butanolique ont montré un pouvoir croissant de piégeage du radical DPPH, ce pouvoir est plus important par rapport à l'extrait aqueux (2). Nous constatons aussi que l'extrait aqueux (1) présente un pourcentage d'inhibition significativement supérieur à celui de l'extrait aqueux (2).

➤ Calcul des IC50

La capacité antioxydante de nos différents extraits a été déterminée à partir des IC50. C'est la concentration en extrait nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH. L'IC50 et l'activité antioxydante de l'extrait testé sont inversement proportionnels (Attou, 2011).

Nous avons calculé les IC50 pour chaque extrait à partir de l'équation logarithmique de la courbe tracée, les valeurs sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 6 : Les valeurs d'IC₅₀ calculées pour chaque extrait des feuilles de *Ruta chalepensis* L.

Extraits	Aqueux 1	Aqueux 2	Méthanolique	Chloroformique	Acétate d'éthyle	Butanolique
IC50	7.73	8.47	0.59	0.51	0.55	0.55

D'après le tableau, nous remarquons en premier lieu que tous nos extraits ont des activités moins importantes que la substance de référence, l'acide ascorbique.

En second lieu, les extraits organiques sont généralement les plus actives par rapport aux extraits aqueux, parmi les six extraits du *Ruta chalepensis* L., l'extrait chloroformique représente l'extrait le plus actif avec une IC₅₀ de l'ordre de 0.51 µg/ml suivi par les deux extraits d'acétate d'éthyle et butanolique avec une IC₅₀ égale à 0.55 µg/ml suivi par l'extrait méthanolique (IC₅₀ = 0.59) puis par les deux extraits aqueux 1 et 2 avec des IC₅₀ de l'ordre de 7.73 et 8.47 µg/ml respectivement.

Nous pouvons classer nos extraits selon l'ordre décroissant d'activité antioxydante comme suit : Acide ascorbique > FCH > FAC et FBU > EMeOH > EAq 1 > EAq 2.

On peut conclure que l'extrait méthanolique et les fractions chloroformique, acétate d'éthyle et butanolique sont plus actifs que les extraits aqueux, cela est due sûrement à la complexité des fractions en substances polyphénoliques (flavonoïdes et tanins) et la synergie entre eux pour une meilleure activité antioxydante.

L'extrait chloroformique possède la plus forte teneur en molécules dosées (polyphénols, flavonoïdes et tanins), suivi par l'extrait butanolique, d'acétate d'éthyle et méthanolique. Une étude faite par Kang et ses collaborateurs en 2003 a suggéré que les molécules polaires présentes dans les extraits végétaux contribuent à l'augmentation de l'activité anti-radicalaire.

Plusieurs études ont montrés que les groupements hydroxyles dans les composés phénoliques et flavonoïdes sont responsables de leurs pouvoirs antioxydants (Heijnen et *al.*, 2001 ; Heim et *al.*, 2002), et aussi les sites d'hydroxylation des différents noyaux affectent la potentialité antioxydante (URI, 1961). Pour les flavonoïdes, les formes aglycones sont plus actives que les formes glycosylées (Naczki et Shahidi, 2004).

Ces résultats concordent avec celui de la teneur en flavonoïdes ainsi qu'avec celui de la CCM où l'extrait chloroformique présente le plus grand nombre de spots qui nous renvoient à différentes classes de flavonoïdes sous cités. Il faut noter aussi que le potentiel antioxydant des extraits dépend non seulement de la concentration des polyphénols mais aussi de leur structure ; c'est le concept de la « relation structure-activité » ; ce qui explique pourquoi l'activité anti-radicalaire des deux fractions d'acétate d'éthyle et butanolique semble inférieure à celle chloroformique pourtant leurs teneurs en polyphénols indique l'inverse.

Le potentiel anti radicalaire très faible de deux extraits aqueux est cohérent avec la teneur plus basse des polyphénols par rapport à celle des autres extraits restants.

Conclusion et perspectives

Ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour l'utilisation des antioxydants naturels. De nombreux chercheurs ont été intéressés par les composés biologiquement actifs isolés des extraits des plantes. Ce travail avait pour objectifs d'évaluer l'activité antioxydante des extraits (EAq, E MeOH, E AcEt et En- BuOH) du *Ruta chalepensis* L. relativement à leur teneur polyphénolique et flavonoïdes.

Le screening phytochimique réalisé, a révélé la richesse de notre plante en métabolites secondaires, où nous avons constaté la présence des flavonoïdes, des tanins catéchiqes, des terpenoïdes, des coumarines, des alcaloïdes, d'amidon et des caroténoïdes.

Les rendements des extraits réalisés sur les feuilles de la plante sont relativement importants. Pour les extraits aqueux, les rendements sont les plus élevés suivis par celui de l'extrait brut. Les différentes fractions effectuées ont des rendements généralement moyens.

Le dosage quantitatif des polyphénols totaux, par le réactif de Folin -Ciocalteu a révélé des concentrations importantes pour les extraits AcEt et BuOH. Cependant le dosage quantitatif des flavonoïdes par la méthode d' $AlCl_3$ a révélé que l'extrait $ClCH_3$ présente la teneur la plus élevée.

Le criblage préliminaire des extraits en CCM a permis de localiser le pouvoir piègeur du radical DPPH dans les quatre extraits (MeOH, $ClCH_3$, AcEt et BuOH) qui sont les plus riches en composés phénoliques. Effectivement, le test au DPPH révèle que l'extrait chloroformique est le plus actif comme piègeurs du radical DPPH. Suivi par les extraits Acétate d'éthyle et Butanolique par rapport à l'acide ascorbique.

En fin, Nous pensons montrer à travers ce travail que les plantes constituent un réservoir très intéressant pour la recherche dans le futur, l'ensemble de ces résultats obtenus in-vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances et source naturelle biologiquement active. Des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidence.

Références bibliographiques:

Abedini A., (2013). Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes (Doctoral dissertation. Université du Droit et de la Santé-Lille II).

Adouane S., (2016). Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région méridionale des Aurès, mémoire de magister en sciences agronomiques. Université Mohamed Khider Biskra, p 197.

Akroum S., (2011). Etude analytique et biologique des flavonoïdes naturels, thèse de doctorat en sciences. Université Mentouri Constantine, p 19-26.

Alloun K., (2013). Composition chimique et activités antioxydantes et antimicrobienne des huiles essentielles de l'aneth (*Anethum graveolens* L.), de la sauge (*Salvia officinalis* L) et de la rue des montagnes (*Ruta montana* L), thèse de magister en agronomie. Ecole Nationale supérieure agronomique El-Harrache- Alger, p 27- 39.

Attou A., (2011). Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent, mémoire de magister en biologie. Université Abou baker Belkaid, Telemcen, p 4-56.

Audigie C-L ,Figarella J , Zonszain F., (1978). Manipulation biochimique. Doin (Ed).Paris, 274p.

Bartosz G., (2003) Generation of reactive oxygen species in biological systems .*Commtoxicol .;* 9: 5-21.

Bekkara, F., Jay, M., Viricel, M.R. and Rome, S. (1998). Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudations. *Plant and Soil* 203 (1): 27–36.

Bendriss H., (2003). Valorisation des extraits de plantes aromatiques et médicinales de : « *Ruta chalepensis* et *Marrubium vulgare* », Mémoire de magister en génie des procédés. Université Hassiba BEN BOUALI-CHLEF, p 34-42.

Benhamdi A., (2014). Etude des enzymes de stress oxydatif chez *Hedysarum pallidum* Desf et *Lygeum Spartum L.* en réponse à la pollution du sol par l'antimoine, Thèse du doctorat 3ème cycle LMD en biochimie et biotechnologie. Université constantine 1, p 17- 32.

BENKHERARA S., BORDJIBA O., BOUTLELIS DJAHRA A., (2011). Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de la Sauge officinale sur quelques entérobactéries pathogènes. Université Badji Mokhtar, BP12, Annaba 23000, Revue Synthèse (23). 107p.

Benkiki N., (2006). Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Ruta montana*, *Matricaria pubescens* et *Hypericum perforatum*, Thèse de doctorat d'état en chimie. Université El-Hadj Lakhdhar Batna, p 12.

Benziane Maatallah M., (2007). Screening photochimique de la plante *Ruta montana*. Extracation de l'huile essentielle et de la rutine. Activité antioxydante de la plante, Mémoire de magister en chimie organique. Université d'Oran Es-senia, p 38,41.

Berthillier A., (1972). La chromatographie et ses applications, Dunod Paris.

Bérubé-Gagnon J.,(2006). Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*, Mémoire de l'université de Québec.

Bessas A., (2008). Dosage biochimique des composés phénoliques dans les dattes et le miel récoltés dans le sud algérien, Ingénieur d'état en biologie option contrôle de qualité et analyses. Université Djillali Liabes -Sidi Bel Abbès.

Beta T., Shin N, Jim E. D, and Harry D. S., (2005). Phenolic content and antioxydant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal chem.*82, p 390-393.

Blois, M. S., (1958). Antioxydant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.

Bonnier G. (1999). La Grande Flore en Couleur; Ed : BELIN; Tome 3; p:205 - 206.

Borges-Del-Castillo, J., Vazquez-Bueno, P., Secundino-Lucas, M., Martinez-Martir, A. I., & Joseph-Nathan, P., (1984). The N-2-phenylethylcinnamamide from *Spilanthes cymifolia*. *Phytochemistry*, 23(11), 2671-2672.

Bortel A., (2001). LAROUSSE Encyclopédie des plantes médicinales, identification, préparations, soins, Ed (2). 1996, 2001, Dorling kindersiey limited, Londres.

Boubekri C., (2014). Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de solanum melongena par des techniques électrostatiques, thèse de doctorat en sciences. Université Mohamed Khider. Biskra, p 24-38.

Boudiaf, K., (2006). Etude des effets anti-xanthine oxydoreductase et anti -radicalaires des extraits des graines de Nigellasativa. Mémoire de magister.Setif.

Bouguerne B., (2012). Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose), Thèse de doctorat. Université Toulouse III-Paul Sabatier, p 7-22.

Bouzidi et al., (2012). Antibacterial effect of the essential oils extracted from Ruta chalepensis L. and Ruta montana (L.) L. Jrn of life science 6.898-902, p 899.

Brou K.G., Mamyrbekova-Bekro J. A., Dogbo D.O., Gogbeu S.J., Bekro Y-A., (2010). Sur la composition phytochimique qualitative des extraits hydrométhanoliques des feuilles de 6 cultivars de Manihotesculenta de Côte d'Ivoire, European Journal of Scientific Research, , 45(2), 200-211.

Collin S., Crouzet J., (2012). Polyphénol et procédés.

Daoudi A., Hrouk H., Belaidi R., Slimani I., Ibijbijen J., Nassiri L., (2016). Valorisation de Ruta montana et Ruta chalepensis : Ethude ethnobotanique, screening phytochimique et pouvoir antibactérien. Valorization of Ruta montana and Ruta chalepensis: Ethnobotanical study, phytochemical screening and antibactérial activity. J Mater. Environ.Sci. 7(3), p 931,932.

Debray, M., Jacquemin, H., &Razafindrmbao, R. S., (1971). Contribution à l'inventaire des plantes médicinales de Madagascar. Travaux et Documents de l'ORSTOM, 8 : 1-150.

Djeridane, A., Yous, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., (2006) Antioxydant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 97: 654 -660.

Diallo, D., Sanogo, R., Yasambou, H., Traoré, A., Coulibaly, K. and Maiza, A., (2004). Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae) utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *C. R. Chimie*, 7: 1075- 1076.

Diallo A., (2005). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* WILLD. (Myrtaceae), Thèse de doctorat en pharmacie, Université de Bamako, Mali, p 44.

DUBOIS B., (2015). Implication du stress oxydant dans plusieurs affections du cheval athlète : revue bibliographique. Thèse de doctorat vétérinaire. Université de Lyon, p 16.

ÉTUDES RWANDAISES., (1977), Médecine traditionnelle et pharmacopée rwandaise, Butare, UNR, 19 pages.

Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C.,(2008). Phenolic composition of *Cynaracardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies*, 331: 372-379.

Favier A., (2003). Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, *L'actualité chimique*: 108-115.

Garait B., (2006). Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin, Thèse de doctorat en biologie cellulaire, Université Joseph Fourier-France-

Gaussen H. Ozenda P. Leroy J.F. (1982). Précis de botanique, végétaux supérieurs. Tome II. Ed. Masson, Paris. P: 600.

Gaussen, H., Leroy, F., (1982). Précis de botanique (Végétaux supérieurs), 2ème édition, 424- 426.

Ghnimi W., (2015). Etude phytochimique des extraits de deux Euphorbiacées : Ricinus communis et jatropha curcas. Evaluation de leur propriété antioxydante et de leur action inhibitrice sur l'activité de l'acétylcholinestérase, thèse de doctorat en cotutelle Université de l'Orraine (France) et Université de Carthage (Tunisie), p 50-57.

Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A., (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1220-1234. PMID:16621403.

Haleng J ., Pincemail ., Defraigne JO., Harlier CC ., Chapelle JP., (2007). Le stress oxydant. *J Med Liege*; 62: 628-638.

Hammiche V., Azzouz M., (2013). Les rues: ethnobotanique, phytopharmacologie et toxicité, *Ethnobotanique*. France, p 23-26.

Harborne, J. B., (1988). The flavonoïds: advances in research since 1980, Chapman and Hall, London.

Harborne, J. B. (2013). *The flavonoids: advances in research since 1980*. Springer.

Hazzit M., Benchabane A., Baaliouamer A., Alloun K., Kaci M., (2015). Composition chimique et activité antimicrobienne de l'extrait non volatil et des huiles essentielles de la rue des montagnes (*Ruta montana L.*), Institut National de la recherche agronomique d'Algérie, p 119.

Heaton, F. W., & Uri, N., (1961). The aerobic oxidation of unsaturated fatty acids and their esters: cobalt stearate-catalyzed oxidation of linoleic acid. *Journal of lipid research*, 2(2), 152-160.

Heijnen CG, Haenen GRMM, Vekemans JA. et al.,(2001). Peroxynitrite scavenging of flavonoids: Structure activity relationship. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* ;10:199–206.

Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R. and Bobilya, D. J., (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J NutrBiochem*, 13, 527-584.

Hnatyszyn, O., Arenas, P., Moreno, A.R., Rondina, R., Coussio, J.D., (1974). Plantas reguladoras de la fecundidad segun la medicina folklorica. Revista de la Sociedad Cientifica 14, 37.

J.R. Soares, T.C.P. Dins, A.P. Cunha, L.M. Almeida., (1997). Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis* Free Radical Research, 26, p. 469

Kacem M et al., (2015). Phytochemicals and biological activities of *Ruta Chalepensis* L. growing in Tunisia, Food Bioscience, p 4.

Kang, D. G., keun Yun, C., & Lee, H. S., (2003). Screening and comparison of antioxidant activity of solvent extracts of herbal medicines used in Korea. *Journal of Ethnopharmacology*, 87(2), 231-236.

Kanoun K., (2011). Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine), Mémoire de magister en biologie. Université ABOUBEKR BELKAID TLEMCEM, p53,54.

Karray H., (2013). Bioconversion enzymatique des composés phénoliques des effluents issus de l'extraction d'huile d'olive : une voie prometteuse de valorisation par la production de l'hydroxytyrosol naturel, Thèse de doctorat en biologie. Université de Sfax école nationale d'ingénieurs de Sfax, p 33.

Krief S., (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : Surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (*Pan troglodytes* Schweinfurth). En Ouaganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées, thèse de doctorat d'histoire naturelle, p 20.

Lee K. W., Kim Y. J., Lee H. J., and Lee C. Y., (2003). Cacao has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine, *J Agric Food chem*, 51 : 7292-7295.

Lee Y-S., Chang Z-Q., Oh B-C., Park S-C., Shin S-R., Kim N-W. (2007). Antioxidant activity anti-inflammatory activity. And whitening effects of extracts multiflora Thumb. *J Med Food*, 10:126-133.

Magali M., (2013). Origine et conséquences du stress oxydant, thèse de doctorat vétérinaire. Faculté de médecine de Créteil, p 19.

Mamadou B., (2011). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Naucelea Latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au mali, thèse de doctorat en chimie organique. Université de Bamako et de Balaise Pascal de Clermont-Ferrand, Mali, p 33-42.

Mansour-Djaalab H., (2014). Evaluation chimique et activité antidermatophyte de quelques plantes médicinales d'Algérie, Thèse de doctorat en science, Université de Constantine 1. Algérie, p 62,63.

Mansour S. Al-Said, M. Tariq, M.A. Al-Yahya, S. Rafatullah, O.T. Ginnawi And A.M. Ageel.,(1990). Studies on *Ruta chalepensis*, an ancient medicinal herb still used in traditional medicine; Journal of Ethnopharmacology 28; Ed: ELSEVIER SCIENTIFIC; p: 305-3012.

Markham, K. R., & Andersen, O. M., (2006). Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications. *London: CRC Taylor & Francis Group.*

Merghache, Hamza M Et Tabti B., (2009). Etude physicochimique de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. de Tlemcen, Algérie, *Afrique science* 5 (1) 67-81, p 68,69.

Mergham M., (2015). Evaluation of toxicity in mice and rats and antioxidant activities of *Ruta montana* L. extracts, mémoire de doctorat des sciences biologiques. Université Ferhat Abbas Sétif1, p 24 - 36.

Messai L., (2011). Etude phytochimique d'une plante médicinale de l'est algérien (*Artemisia herba ALBA*), thèse de doctorat des sciences en chimie organique, Université Mentouri Constantine, p 27-30.

Mohr, N., Budzikiewicz, H., El-Tawil, B. A. H., & El-Beih, F. K. A., (1982). Further furoquinolone alkaloids from *Ruta chalepensis*. *Phytochemistry*, 21(7), 1838-1839.

Nacz, M. and Shahidi, F.,(2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* 1054 (1-2): 95-111.

Ouerghemmi I, et al., (2016). Antioxidant and antimicrobial phenolic compounds from extracts of cultivated and wild-grown Tunisian *Ruta chalepensis*, *Journal of Food and Drug Analysis*, p 1, 2.

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307–315

Podsedek, A., (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: a review, *Swiss Society of Food Science and Technology*, 40, 1–11.

Quezel P., Santa S., (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome 2, Ed. CNRS, Paris, p 591,592.

Rached W., (2009). Evaluation du potentiel antioxydant de plantes médicinales et analyse phytochimique, Mémoire de magister en biochimie végétale appliquée, Université d'Oran Es-Sénia, p 130,131.

Rizk, A. M. (1982). Constituents of plants growing in Qatar.: 1. A chemical survey of sixty plants. *Fitoterapia*, 53(1-2), 35-44.

Saffidine K., (2015). Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *Carthamus caeruleus* L. et de *Plantago major* L., Thèse de doctorat en microbiologie, Université de erhat Abbes-Sétif, p 4-26.

Saidani Tounsi M, AidiWannes W, Ouerghemmi I, Msaadaa K, Smaoui A et Marzouka B., (2011). Variation in essential oil and fatty acid composition in different organs of cultivated and growing wild *Ruta chalepensis* L., *Industrial crops and products* 33(6), p 617-618.

Schmelzer, G.H et Gurib-Fakim, A. (Editeurs), (2013). Ressources végétales de l'Afrique tropicale 11(2). Plantes médicinales 2. [Traduction de : Plant Resources of tropical Africa 11 (2). Medicinal Plants 2.2013]. Fondation PROTA, Wageningen, Pays-Bas / CTA, Wageningen, Pays-Bas. 418 pp.

Sekli-Belaidi F., (2011). Fonctionnalisation de surfaces d'électrodes par un film de poly(3,4-éthylènedioxythiophène) PEDOT pour l'élaboration de microcapteur spécifique des

acides ascorbique et urique : application à l'étude des propriétés antioxydantes du sérum sanguin, Thèse de doctorat de l'université de Toulouse France, p 11-30.

Sid-Larbi K., (2016). Potentiel du contenu Polyphénolique et Huiles Essentielles de Quelques Plantes Médicinales à Activités Anti-cartilagineuse et Biologiques, Thèse de doctorat en Science, Technologie et Santé, Université de MUSTAPHA STAMBOULI DE MASCARA, Algérie, p 18-22.

Soares et al., 1997. R. Soares, T.C.P. Dins, A.P. Cunha, L.M. Almeida Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis* Free Radical Research, 26 (1997), p. 469

SOLTNER D., (2001). Les bases de la production végétale. Tome III la plante et son amélioration, 3e édition Paris, 189p.

Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M. and El-Elimat, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. Food Chemistry 104: 1372–1378.

Techer S., (2013). Criblage d'activités biologiques de plantes endémiques ou indigènes de La Réunion - Recherche de molécules antivirales ciblant le virus du chikungunya. Université de la Réunion, p 29-33.

TOURE DaoudaM., (2015). Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes Aromatiques médicinales de côte d'ivoire. Thèse de doctorat en biologie humaine tropicale. Université Félix Houphouët-Boigny 31.

Trease, G. E., & Evans, W. C. (1987). A text book of Pharmacognosy. ELSB/Bailliere Tindal.

Ulubelen, A., Terem, B., & Tuzlaci, E. (1988). Antraquinones and sesquiterpene lactones from *Asphodeline anatolica*. *Fitoterapia*, 2, 159.

Vuorela, S 2005. Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics (dissertation). EKT series 1343. University of Helsinki. Department of Applied Chemistry and Microbiology.

Yokozawa, T., Chen, C. P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G. I., & Nishioka, I. (1998). Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochemical pharmacology*, 56(2), 213-222.

Zeghad N., (2009). Etude de contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne, Mémoire de magister en biotechnologie végétale. Université Mentouri Constantine, p 26.

Zeghada F.Z., 2009. Activité allélopathiques et analyse phytochimique, mémoire de magister en biochimie appliquée, université d'Oran Es-Sénia, p 13,14.

- **Liste des sites :**

Anthony Guihur. Le nobel des lycéens [en ligne]. Disponible sur : <http://le-nobel-deslyceens.livehost.fr/pages/consultation_resume/RESUME_AFFICHAGE.php?r_id=35&u_id=90>. (consulté le 17-04-2017).

Santé, vitalité et jeunesse. Technologies et produits innovants [en ligne]. Disponible sur : <<http://santejeunesse.net/radicaux-libres-et-antioxydants/>>. (Consulté le 09-05-2017).

Steve Abel. Medicinal Plants [en ligne]. Disponible sur : <<https://www.doctorabel.us/medicinal-plants-2/fringed-rue-ruta-chalepensis-l-rutaceae.html>>. (Consulté le 17-04-2017).

Yannik. Visoflora [en ligne]. Disponible sur : <<https://www.visoflora.com/photos-nature/photo-ruta-chalepensis-juin-gorges-du-cia.html>>. (Consulté le 17-04-2017).

Résumé :

Ruta chalepensis L. est une plante aromatique, médicinale, appartenant à la famille des rutacées, appelée communément par la population locale « Fidjel ». Elle pousse spontanément, elle est largement répandue en Afrique du nord, particulièrement en Algérie.

Le screening phytochimique pour les feuilles de la plante recueillie de la région de Khenchela a mis en évidence la présence de coumarines, flavonoïdes, d'alcaloïdes, tanins catéchiques, caroténoïdes, amidon et de terpenoïdes.

L'étude qualitative par CCM des extraits de *Ruta chalepensis* L. a montré une diversité remarquable des composés flavoniques.

La détermination de la teneur en flavonoïdes et en polyphénols pour les différents extraits de *Ruta chalepensis* L. a révélé que l'extrait d'acétate d'éthyle est la fraction la plus riche en polyphénols, dont les valeurs sont classées par ordre décroissant comme suit : 31.275 ± 4.54 , 30.105 ± 7.61 , 12.505 ± 3.11 , 2.92 ± 0.46 , 2.54 ± 1.14 et 2.435 ± 0.39 mg d'EAG / g d'E pour les extraits AcEt, BuOH, ClCH_3 , Aq2, Aq1 et MeOH respectivement. Cependant l'extrait chloroformique représente la teneur la plus élevée en flavonoïdes (11.57 ± 0.18 mg d'EQ/ g d'E) ; en seconde position se classent les deux extraits AcEt et BuOH avec des teneur proches (11.15 ± 0.04 et 11.11 ± 0.45 mg d'EQ/ g d'E) en suite viennent les extraits MeOH, Aq1, Aq2 par ordre décroissant respectivement : 10.94 ± 0.04 , 9.37 ± 0.58 , 7.15 ± 0.43 mg d'EQ/ g d'E.

L'activité antioxydante in vitro des extraits bruts, aqueux et les fractions : chloroformique, d'acétate d'éthyle et butanolique a été étudiée avec la méthode de réduction de radical libre DPPH. Les IC50 des extraits bruts, aqueux et les fractions : chloroformique, d'acétate d'éthyle et butanoliquesont sont respectivement : 0.59, 7.73, 8.47, 0.51 et 0.55 mg/ml.

Mots clés : *Ruta chalepensis* L, polyphénols, flavonoïdes, DPPH, activité antioxydante.

Abstract:

Ruta chalepensis L. is an aromatic plant belonging to the family of Rutaceae, commonly called by locals “Fidjel”. It is spontaneous, largely spread in North Africa, especially Algeria.

The phytochemical screening of leaves of *Ruta chalepensis* collected from wilaya of Khenchela revealed the presence of coumarins, flavonoids, alkaloids, tannins, carotenoids, starch and terpenoids.

The qualitative study of extracts of *Ruta chalepensis* by TLC showed a remarkable diversity of flavonic compounds.

The determination of flavonoid and polyphenol contents for the various *Ruta chalepensis* L. extracts revealed that the ethyl acetate extract was the fraction richest in polyphenols, The values are ranked in descending order as follows: 31.275 ± 4.54 , 30.105 ± 7.61 , 12.505 ± 3.11 , 2.92 ± 0.46 , 2.54 ± 1.14 and 2.435 ± 0.39 mg EAG / g of E for the extracts AcEt, BuOH, ClCH₃, Aq2, Aq1 and MeOH. While the chloroform fraction represents the highest content of flavonoids (11.57 ± 0.18 mg d'EQ/ g d'E). In the second position, the two extracts AcEt and BuOH are classified with similar contents (11.15 ± 0.04 and 11.11 ± 0.45 mg EQ / g of E), then the extracts MeOH, Aq1 and Aq2 are listed in decreasing order respectively: 10.94 ± 0.04 , 9.37 ± 0.58 , 7.15 ± 0.43 mg EQ / g of E.

The in vitro antioxidant activity of the crude, aqueous extracts and the fractions: chloroform, ethyl acetate and butanol was investigated with the free radical reduction method DPPH. The IC 50s of the abovementioned extracts are respectively: 0.59, 7.73, 8.47, 0.51 and 0.55 mg / ml.

Key words : *Ruta chalepensis* L, polyphenols, flavonoids, antioxidant power, free radical scavenging DPPH.

ملخص:

يعتبر السذاب أو الشذاب من النباتات الطبية العطرية التي تنتمي إلى عائلة السذابيات حيث يطلق عليه السكان المحليون اسم الفيجل، تنتشر هذه العشبة بشكل كبير في شمال إفريقيا وفي الجزائر خاصة.

كشف الفحص الكيميائي النباتي وجود كل من: الفلافونويدات، الكومارينات، القلويدات، التانينات، الكاروتينات، النشاء التيربينويدات، وقد تم التأكد من التنوع الكبير للمركبات الفلافونويدية التي تحتويها هذه النبتة بواسطة الدراسة النوعية عن طريق كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة.

كما تم الكشف أيضا على المحتوى الكلي للفلافونويدات ومتعدد الفينول في أوراق نبتة السذاب حيث استنتجنا أن مستخلص خلات الإيثيل يحتوي على أكبر كمية من متعدد الفينول حيث تم ترتيب القيم المتحصل عليها تنازليا كما يلي: 4.54 ± 31.275 , 7.61 ± 30.105 , 3.11 ± 12.505 , 0.46 ± 2.92 , 1.14 ± 2.54 و 0.39 ± 2.435 مغ ما يعادل حمض الغالليك/ غ من المستخلص) بينما مستخلص الكلوروفورم يحتوي على أعلى قيمة من الفلافونويدات والتي تساوي (0.18 ± 11.57) مغ ما يعادل الكرسيتين/ غ من المستخلص) يأتي في المرتبة الثانية مستخلص خلات الإيثيل و البوتانول بقيم متقاربة (0.04 ± 11.15) و 0.45 ± 11.11 مغ ما يعادل الكرسيتين/ غ من المستخلص) يليه على التوالي مستخلصات الميثانول و الماء 1 و 2 بترتيب تنازلي كالاتي: 0.04 ± 10.94 , 0.58 ± 9.37 , 0.43 ± 7.15 مغ ما يعادل الكرسيتين/ غ من المستخلص).

تمت دراسة النشاط المضاد للأكسدة لجميع المستخلصات المائية (1 و 2)، الميثانول، الكلوروفورم، خلات الإيثيل والبوتانول في المختبر بطريقة تخفيض الجذر الحر HPPD. وقد تم فرز قيم التراكيز المثبطة بنسبة 50 بالمئة تنازليا كما يلي: المستخلص المائي-2- (8.47 مغ/مل)، المستخلص المائي-1- (7.73 مغ/مل)، مستخلص الميثانول (0.59 مغ/مل) يليه مستخلصي خلات الإيثيل والبوتانول بالتساوي (0.55 مغ/مل) ثم مستخلص الكلوروفورم بقيمة 0.51 مغ/مل.

الكلمات المفتاحية: السذاب، متعدد الفينول، الفلافونويدات، المجموعات الذرية الحرة، مضاد للأكسدة.

Année Universitaire : 2016/ 2017

Présenté par :BELMEKKI Aicha.

Contribution à l'étude phytochimique et l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Ruta chalepensis* L. (Fidjel) de la région de Khenchela

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de master en Biochimie Appliquée

Résumé

Ruta chalepensis L. est une plante aromatique, médicinale, appartenant à la famille des rutacées, appelée communément par la population locale « Fidjel ». Elle pousse spontanément, elle est largement répandue en Afrique du nord, particulièrement en Algérie.

Le screening phytochimique pour les feuilles de la plante recueillie de la région de Khenchela a mis en évidence la présence de coumarines, flavonoïdes, d'alcaloïdes, tanins catéchiqes, caroténoïdes, amidon et de terpenoïdes.

L'étude qualitative par CCM des extraits de *Ruta chalepensis*L. a montré une diversité remarquable des composés flavoniques.

La détermination de la teneur en flavonoïdes et en polyphénols pour les différents extraits de *Ruta chalepensis* L. a révélé que l'extrait d'acétate d'éthyle est la fraction la plus riche en polyphénols, dont les valeurs sont classées par ordre décroissant comme suit : 31.275±4.54, 30.105±7.61, 12.505±3.11, 2.92±0.46, 2.54±1.14 et 2.435±0.39 mg d'EAG / g d'E pour les extraits AcEt, BuOH, ClCH₃, Aq2, Aq1 et MeOH respectivement. Cependant l'extrait chloroformique représente la teneur la plus élevée en flavonoïdes (11.57±0.18 mg d'EQ/ g d'E) ; en seconde position se classent les deux extraits AcEt et BuOH avec des teneur proches (11.15±0.04 et 11.11±0.45 mg d'EQ/ g d'E) en suite viennent les extraits MeOH, Aq1, Aq2 par ordre décroissant respectivement : 10.94±0.04, 9.37±0.58, 7.15±0.43 mg d'EQ/ g d'E.

L'activité antioxydante in vitro des extraits bruts, aqueux et les fractions : chloroformique, d'acétate d'éthyle et butanolique a été étudiée avec la méthode de réduction de radical libre DPPH. Les IC₅₀ des extraits bruts, aqueux et les fractions : chloroformique, d'acétate d'éthyle et butanolique sont respectivement : 0.59, 7.73, 8.47, 0.51 et 0.55 mg/ml.

Mots clés : *Ruta chalepensis* L, polyphénols, flavonoïdes, DPPH, activité antioxydante.

Le travail à été réalisé aux laboratoirespédagogiques, Université de Khenchela.

Date De Soutenance : 28 /06/2017