

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

BAHAR FATIMA et BENDJLIDJEL HAYET

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité : Pharmaco-toxicologie

THÈME

*Etude phytochimique et évaluation de l'activité
antioxydante d'une plante médicinale Ruta
montana collectée de la région de Mostaganem*

Soutenue le 12/09 /2019

DEVANT LE JURY

Présidente	Mme Douichene. S	MCB	Université de Mostaganem
Examinatrice	Mme Ammari. N	MCB	Université de Mostaganem
Encadrant	Mme Missoun.F	MCA	Université de Mostaganem

2018-2019

Remerciements

Nous remercions tout d'abord le bon Dieu le tout puissant, qui nous a donné le courage d'arriver à ce niveau d'instruction.

Nous tenons à remercier notre promoteur Madame Missoun F, pour nous avoir guidés et conseillés tout au long de notre travail. Nous lui sommes très reconnaissantes.

Nous exprimons également nos remerciements au madame Douichene pour avoir accepté de présider le Jury de soutenance et Mme Ammari N pour avoir accepté d'examiner notre mémoire de fin d'étude, et pour leurs conseils.

Tous les enseignant(e)s qui nous ont assuré une bonne formation sont également remercié(e)s.

Un grand merci aux ingénieurs du laboratoire de biochimie, pour leurs soutiens précieux durant notre stage de laboratoire, notamment Monsieur Sayem

Sans oublier nos parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience.

Enfin, nous n'oublions pas nos ami(e)s pour leur amabilité et d'avoir toujours été à notre entière disposition

Hayet.B et Fatima.B

Dédicaces

*Louange à ALLAH, le miséricordieux, qui m'a inspiré et
comblé de bien faits*

Je lui rend grâce

*Je dédie modeste travail a ma mère pour son affection son
soutien ses efforts et sacrifices quelle a entreprit*

A fin de voir réussi a la mémoire de mon regrette père

Que j'aurai tant espère me voir réussi un jour.

Mes frères : nacer et mes sœurs Rachida, yasmine .

*Pour leurs conseils et leurs encouragements ma copine
Fatima*

A toute la promotion pharmaco - toxicologie 2019

*A toute les personnes que j'aime et m'aime ; et tous ce qui
mon aidé le prés de loin*

Hayet.B

Dédicaces

*Louange à ALLAH, le miséricordieux, qui m'a inspiré et
comblé de bien faits*

Je lui rend grâce

*Je dédie modeste travail à ma mère pour son affection son
soutien ses efforts et sacrifices quelle a entreprit*

Afin de voir réussi a la mémoire de mon père

Que j'aurai tant espère me voir réussi un jour .

*Mes frères : Arbi, Abdallah, et mes sœurs Hanane, Laila,
Kaltoum, Zohra,Djamaia....*

*Pour leurs conseils et leurs encouragements ma copine
Hayet*

A toute la promotion pharmaco - toxicologie 2019

*A toute les personnes que j'aime et m'aime ;Ahlam et tous
ce qui mon aidé le prés de loin*

Fatima.B

Résumé

Ruta montana est une plante aromatique médicinale encore utilisée dans la médecine traditionnelle de nombreux pays comme laxatif, anti-inflammatoire, analgésique, antispasmodique, abortif, antiépileptique, emménagogue et pour le traitement de pathologies cutanées. Le screening phytochimique a mis en évidence la présence des flavonoïdes, Tanins, Les hétérosides, stérols, coumarines et protéines et l'absence des anthocyanes et quinones. Les résultats montrent la richesse de la partie aérienne de la plante en polyphénols (250 mg EAG/g MS) et flavonoïdes (52 mg EC/g MS) et une très faible quantité en tanins (0.8 mg EQ/g de MS). La capacité antioxydante 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. Selon les résultats enregistrés, les extraits aqueux et méthanolique sont dotés d'un pouvoir antioxydant modéré, leur IC50 respectivement est de 0.945 et 0.961 mg/ml comparé au standard utilisé dans notre étude celle d'acide ascorbique dont la valeur est de l'ordre de 0,16 mg/ml.

Mots-clés : *Ruta montana*, extrait aqueux, phytochimique, activité antioxydante, polyphénols totaux.

Abstract

Ruta montana is an aromatic medicinal plant still used in traditional medicine in many countries as laxative, anti-inflammatory, analgesic, antispasmodic, abortive, antiepileptic, emmenagogue and for the treatment of cutaneous pathologies. Phytochemical screening revealed the presence of flavonoids, tannins, glycosides, sterols, coumarins and proteins and the absence of anthocyanins and quinones. The results show the richness of the aerial part of the plant in polyphenols (250 mg EAG / g MS) and flavonoids (52 mg EC / g MS) and a very small amount in tannins (0.8 mg EQ / g of MS).

Antioxidant capacity was determined from IC₅₀. Its extract concentration needed to reduce 50% of the DPPH radical. The IC₅₀ and the antioxidant activity of the extract tested are inversely proportional. According to the results recorded, the aqueous and methanolic extracts have a moderate antioxidant capacity; their IC₅₀ respectively is 0.945 and 0.961 mg / ml compared to the standard used in our study that of ascorbic acid whose value is of the order 0.16 mg / ml.

KEYS WORDS: *Ruta montana*, aqueous extract, phytochemical, antioxidant activity, total polyphenols.

ملخص

السذاب الجبلي هو عبارة عن نبات طبي عطري لا يزال يستخدم في الطب التقليدي في العديد من البلدان كملين ومضاد للالتهابات ومسكن ومضاد للتشنج وإجهاض ومضاد للصرع وطرد من الطمث ولعلاج الأمراض الجلدية. كشف الفحص الكيميائي النباتي عن وجود مركبات الفلافونويد والعفص والجليكوسيدات والإستيرول والكومارين والبروتينات وغياب الأنتوسيانين والكينون. أظهرت النتائج ثراء الجزء الهوائي من النبات في مادة البوليفينول (250 مجم MS / g EAG) والفلافونيدات (52 مجم EC / جم MS) وكمية صغيرة للغاية من العفص (0.8 مجم مكافئ / غرام من MS).

تم تحديد قدرة مضادات الأكسدة من IC50. هذا هو تركيز استخراج اللازمة للحد من 50 ٪ من جذري DPPH. IC50 ونشاط مضادات الأكسدة في استخراج اختبار تتناسب عكسيا. وفقاً للنتائج المسجلة، تتمتع المستخلصات المائية والميثانولية بقدرة معتدلة مضادة للأكسدة، ويكون IC50 على التوالي هو 0.945 و0.961 ملغم / مل مقارنةً بالمعيار المستخدم في دراستنا وهو حمض الأسكوربيك الذي قيمته مرتبة 0.16 ملغ / مل.

الكلمات المفتاحية: روتا مونتانا "السذاب الجبلي"، المستخلص المائي، النشاط الكيميائي النباتي، مضادات الأكسدة، البوليفينول الكلي.

Table des matières

Liste des tableaux

Tableau 1 : La classification de <i>Ruta montana</i> ,	07
Tableau 2 : Les espèces réactives d'oxygène.	31
Tableau 03 : Résultats des tests phytochimiques de <i>Ruta montana</i>	57
Tableaux 04 : les résultats de dosage quantitatif du <i>Ruta montana</i>	60
Tableau 5 : le pouvoir antioxydant (exprimé par IC50 (en mg /ml)) des antioxydants de référence et des extraits testés.	64

Liste des figures

Figure 01 : Répartition géographique de la famille de Rutacées (Gaussen et al., 1982).	06
Figure 02 : La plante <i>Ruta montana</i> (Daoudi, 2017)	07
Figure 03 : Schéma représente les caractéristiques morphologiques du <i>Ruta montana</i> (Duke et al., 2008).	07
Figure 04 : Les parties aériennes de la plante <i>Ruta montana</i>	08
Figure 05 : Structure de quelques composés phénoliques (Lugasi et al., 2003)	13
Figure 06 : Structure de l'acide gallique (a) et structure de l'acide ellagique (b).	16
Figure 07 : Structure des tanins condensés (Gavot, 2009)	16
Figure 08 : Structure de base des flavonoïdes (Krishna et al., 2001).	17
Figure 09 : Structure des différentes classes des flavonoïdes (Martinez et al., 2005).	18
Figure 10 : Exemple de structure et espèce végétale associés aux alcaloïdes (Croteau et al., 2000)	20
Figure 11 : Structure chimique des Floridosides et des Hétérosides cyanogénétique.	24
Figure 12 : l'action des enzymes sur les hétérosides cyanogénétiques.	24
Figure 13 : Structures chimique d'Arbutoside et de Salicoside	24
Figure 14 : Structures chimique de Cardénolide et de Bufadénolide.	25
Figure 15 : Structure de noyau des saponosides	25
Figure 16 : Structure chimique des coumarines.	26
Figure 17 : Structure de phénylchromone.	26

Figure 18 : Structure de phényl-2-benzopyrylium.	26
Figure 19 : Structure des anthraquinones.	27
Figure 20 : Exemple sur l'action d'une enzyme (Myrosinase) sur le sinigroside.	27
Figure 21 : La balance d'équilibre entre les systèmes production et antioxydants (Favier, 2006).	30
Figure 22 : Mécanisme en chaine de la peroxydation lipidique et ses produits terminaux (Favier, 2003).	33
Figure 23 : Lésions de l'ADN, l'attaque radicalaire (Favier, 2003).	34
Figure 24 : Nature de quelques modifications des chaines laterales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).	35
Figure 25 : Action des antioxydants au cours du métabolisme des ERO (Pelletier et al., 2004).	37
Figure 26 : Une photo représente l'emplacement de la plante « <i>Ruta montana</i> » dans l'environnement	40
Figure 27 : <i>Ruta montana</i> sous forme séchée et broyée.	41
Figure 28 : Protocole de préparation de l'extrait aqueux (Belhattab et al., 2004)	42
Figure 29 : Méthode de l'évaporation de l'extrait méthanolique dans l'appareille de rutavapeur	43
Figure 30 : Schéma d'extraction de <i>Ruta montana</i> ; extrait méthanolique de la partie aérienne par macération (Belhattab et al., 2004)	44
Figure 31 : Réaction entre la vanilline et les tanins condensés (Schofield et al., 2001)	52
Figure 32 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH• (Michel, 2011)	53
Figure 33 : Préparation des solutions mère de différentes concentrations de l'acide ascorbique	53

Figure 34 : Le Lecteur à 517 nm + étalonnage de spectre avec le blanc (méthanol)	53
Figure 35 : Résultats de taux d'humidité de <i>Ruta montana</i> . Région de Mostaganem	55
Figure 36 : Les résultats observatoires des différentes concentrations de l'acide gallique.	59
Figure 37 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	59
Figure 38 : La coloration des composés phénoliques dans un notre extrait de <i>Ruta montana</i>	60
Figure 39 : Courbe d'étalonnage de Quercetine	61
Figure 40 : Courbe d'étalonnage de catéchine	62
Figure 42 : % d'inhibition du DPPH en fonction de différentes concentrations de l'acide ascorbique	63
Figure 43a : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait aqueuse	63
Figure 44b : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait méthanolique.	63

TABLE DES MATIERES

Résumé

Introduction 01

Parti I : Aperçus bibliographique

Chapitre I : Etude botanique

1. Présentation de la famille des rutacées	03
2. Aperçu sur la famille rutacée	03
3. Caractéristiques général	03
4. Description botanique	04
5. Intérêts des rutacées.	04
6. Nomenclature	04
6.1. Appellations en différents langues	05
7. Le Genre Ruta	05
7.1. Description botanique	05
7.1.1. Appareil végétative	05
7.1.2. Appareil reproducteur	05
7.2. Distributions géographique	05
8. Espèce <i>Ruta montana</i>	06
8.1. Description botanique	06
8.2. La position systématique	07
8.3. L'utilisation de la plante	09
8.3.1. Culinaire	09
8.3.2. Médicinale	09
8.3.3. Agricoles	10
8.3.4. Cosmétique	10
8.3.5. Ecologique et horticole	10
8.4. Mode d'emploi	10
8.5. La toxicité	11

8.6. Utilisation populaire en Algérie	11
--	-----------

Chapitre II :

Les métabolites secondaires

1. Définition et fonction des métabolites secondaires	12
2. Les composés phénoliques	12
2.1. Généralités	12
2.3. Propriétés des composés phénoliques	13
2.4. Propriétés physico-chimiques	14
2.5. Rôle biologique	14
2.5. Effets pharmacologiques	15
2.6. Composition	15
2.6.1. Acides phénoliques	15
2.6.2. Les tanins	15
2.6.3. Les flavonoïdes	16
2.6.3.1. Propriétés pharmacologiques des flavonoïdes	18
2.6.4. Les Alcaloïdes	19
2.6.4.1. Classification et distribution des alcaloïdes	20
2.6.4.2. Activités pharmacologiques	21
3. Les hétérosides	22
3.1. Définition	22
3.2. Répartition et localisation dans la plante	22
3.3. Structure et Classification des hétérosides	22
3.3.1. Propriétés physico-chimiques	23
3.3.2. Les différentes classes d'hétérosides	23
3.3.2.1. Les O-hétérosides	23
3.3.2.2. Les S-hétérosides ou Glucosinolates	27

3.3.2.3. Les C-hétérosides	27
3.3.3. Propriétés pharmacologiques et emplois des hétérosides.	27

Chapitre III : Activité antioxydants

1. Stress oxydant	29
1.1. Définition	29
1.2. Radicaux libres	30
1.2.1. Définition	30
1.2.2. Nature des radicaux libres	30
1.2.3. Génération des radicaux libres	30
1.2.4. Les espèces réactives de l'oxygène	31
1.2.5. Rôles physiologiques	32
1.2.6. Rôles pathologiques	32
1.3. Antioxydants	36
1.3.1. Définition des antioxydants	36
1.3.2. Actions des antioxydants	36
1.3.3. Classification des antioxydants	37
1.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante in vitro	38

Pari II ; Matériels et méthodes

1. Préparation du matériel végétal	40
1.1. Récolte et séchage	40
1.2. Broyage et tamisage	41
2. Test d'humidité	41
3. Préparation des extraits	42
3.1. Extrait aqueux	42
3.2. Extrait méthanoïque	43
4. Screening phytochimique	45

4.1. Préparation des extraits	45
4.2. Flavonoïdes	45
4.3. Stérols et triterpènes (La réaction de Liebermann Buchard)	46
4.4. Tanins	46
4.5. Saponosides	46
4.6. Coumarines	47
4.7. Anthocyanes	47
4.8. Proanthocyanidols	47
4.9. Quinones	47
4.10. Mucilage	47
4.11. Composés réducteurs	48
4.12. Stupéfiants	48
4.13. Protéines	48
4.14. Hétérosides cardiotonique	48
4.15. Dérivés anthracéniques	49
4.16. Alcaloïdes	50
5. Dosage des composés phénoliques et les flavonoïdes et les tanins	50
5.2.Détermination des composés phénoliques totaux (CPT)	50
5.3.Détermination des flavonoïdes totaux	51
5.4.Détermination des tanins totaux	51
6. Activité antioxydante	52
6.2.Activité scavenger de radical DPPH'	52
6.2.1. Test du piégeage des radicaux DPPH	52
6.3.Dosage de l'échantillon	53
7. Calcul des IC50 et de l'activité antiradicalaire (Scavenging activity)	54

Parti III : Résultats et discussion

1. Phytochimie de <i>Ruta montana</i>	55
1.1. Taux d'humidité (la teneur en eau) et matière sèche	55
1.2. Groupes chimiques caractérisés	55
2. L'analyse qualitative (les tests phytochimiques)	56
2.1. Analyse quantitative	58
2.2. Composés phénoliques totaux	58
2.3. Flavonoïdes	61
3. Teneur des tanins condensés dans l'extrait brut aqueux	62
4. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits de plantes	63
4.1. Calcul des IC50	64
Conclusion	67

Référence bibliographique

Annexe

Abréviation

aa : Acide aminé

Abs : absorbance

AcASC : acide ascorbique

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

APGIII : classification phylogénétique ; c'est la troisième version de classification botanique des Angiospermes.

ATP : Adénosine triphosphate

C° : degré Celsius

CHCl₃ : Chloroforme

Conc. : Concentration

CuSO₄ : Sulfate de cuivre

CRP : La protéine C réactive

CPT : composés phénolique totaux

DO : Densité optique

DPPH : 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl

EMOH : Extrait méthanolique

EH₂O : Extrait aqueuse

EROs : espèces réactives dérivées de l'oxygène

ERAs : espèces réactives dérivées de l'azote

FeCl₃ : trichloride de fer

FLVT : flavonoïdes totaux

Gly : glutamine

g: Gramme

H₂SO₄ : Acide sulfurique.

HCl : Acide chlorhydrique

IC50 : Concentration inhibitrice à 50%

KOH : Hydroxyde de potassium

MeOH : Méthanol

Meth: acide amine méthionine.

Mg: Magnésium.

ml: Millilitre

MS : matière sèche

Na₂CO₃: Bicarbonate sodium

Na₂CO₃: picrate de sodium

NaCl : Chloride sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

nm: Nanomètre

OR2 RP: Poxygène

OH : hydroxyle

R.M: *Ruta montana*

ROS : espèces réactives de l'oxygène

SA : Solution aqueuse.

SF : les solutions filles

SM : Solution méthanolique

TNc : tanins condensés

µl : Microlitre

µg : Microgramme

UV : Ultra-violet

Introduction

Introduction

Les plantes ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines grâce à leurs richesses en composants des valeurs thérapeutiques. Le pouvoir de guérison des plantes provient des effets de leurs métabolites secondaires. Ces métabolites interviennent dans la défense contre les parasites pathogènes. On distingue plusieurs groupes de métabolites notamment les phénols (simples phénols, acides phénoliques, flavonoïdes, tannins et coumarines) (**Khadhri, 2013**).

De nos jours de nombreuses études cliniques menées de façon scientifique ont permis de fournir des résultats fiables sur les effets de plusieurs dizaines de végétaux, certains dangers ont également été mis en évidence; si l'on connaissait depuis longtemps déjà les plantes les plus toxiques on s'est récemment rendu compte que d'autres faisaient preuve d'une nocivité plus subtile.

L'Algérie a un riche patrimoine végétal, elle recèle plusieurs sortes de végétaux connus et inconnus du monde sa richesse fait que nous avons décidé de parler d'une plante plutôt connue qu'on trouve dans nos sols «*Ruta montana* ».

Ruta montana est une plante aromatique, appartenant à la famille des rutacées, appelée communément par la population locale « Fidjel ». Elle est spontanée, largement répandue en Afrique du nord, particulièrement en Algérie. Cette plante est connue pour sa richesse en produits des métabolites secondaires et par les alcaloïdes (**Baba aïssa, 1999**)

Notre objectif est l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante d'une plante médicinale « *Ruta montana* » collectée de la région de mostaganem. Ce travail est scindé en trois grandes parties : La première on a donné une revue bibliographique de *Ruta montana* . Cette étude permet de connaître l'espèce et son localisation, nous décrivons les métabolites secondaires, leurs propriétés physico- chimiques et aussi leurs effets pharmacologiques. La deuxième partie, la plante utilisée et la méthodologie de travail.

Celles-ci comprennent :

- Les tests phytochimiques de la partie aérienne du *Ruta montana* (Analyses qualitatives et quantitatives des métabolites secondaires).
- L'évaluation de l'activité antioxydante en utilisant la technique suivante : la réduction du piégeage du radical libre DPPH.

Introduction

La troisième partie, nous interprétons et discutons les résultats obtenus. Une conclusion générale est donnée à la fin du présent travail en tirant les principaux résultats obtenus lesquels pourraient stimuler d'autres travaux de recherche dans le sens de servir et de valoriser le patrimoine national dans le domaine des plantes médicinales.

Parti I

APERÇU

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I

ETUDE BOTANIQUE

I. Etude botanique

1. Présentation de la famille des rutacées

Les Rutacées comprennent plus de 700 espèces en grande partie arborescentes appartenant aux pays chaud. C'est une famille par enchainement et n'offrant qu'un petit nombre de caractères constants.

Une Rutacées s'identifie cependant avec netteté par son appareil sécréteur constitué de poche sécrétrices_ d'un type particulier et qui ne sont rencontrées dans aucune autre famille dites schizolysigènes.

Ces poches, toujours très superficielles, sont d'origine épidermique ; c'est ce qui explique qu'il suffit d'écraser légèrement une partie molle d'une Rutacées pour qu'une forte odeur d'essence s'en dégage. Très abondantes sur les feuilles, elles apparaissent sous forme de points transparents.

Les fleurs possèdent un disque nectarifère intrastaminal, c'est-à-dire situé à l'intérieur des étamines sur le réceptacle (**Wiart C, 2006**).

2. Aperçu sur la famille rutacée

Les rutacées appartiennent à l'ordre des Sapindales qui comprend 13 familles et environ 5000 espèces, dont les plus importantes familles sont : les Anacardiacees, les Burséracées, les Maliacées, les Sapindacées, les Simaroubacées et les Rutacées (**Judd W.S., Cambeil C.S., Kellogg E.A. et Stevens P, (2002)**).

3. Caractéristiques général

Les rutacées s'identifient par leur appareil sécréteur représenté par des poches sécrétrices, d'origines épidermiques, elles sont surtout présentes dans les feuilles ou elles apparaissent sous formes de point transparent dans les organes d'origine foliaire (sépales, pétales paroi de l'ovaire et du fruit) et dans les tiges jeunes, encore d'une assise suberophélodermique. Les poches sécrétrices à essence, sont parfois remplacées ou accompagnées par des cellules sécrétrices à essence (**Crète, 1965**).

La famille est remarquable par la diversité de ses fruits qui peuvent être une baie à paroi coriace ou une capsule.

La plupart de ces espèces sont pollinisées par des insectes divers surtout les abeilles et les mouches qui sont attirés par les fleurs souvent spectaculaire produisant du parfum et du nectar.

La majorité sont allogames en raison de leurs fleurs unisexuées ou dans le cas de fleurs hermaphrodite parce que les stigmates et les anthères sont distants spatialement ou ont des période de maturité différentes (**Judd et al., 2002**).

4. Description botanique

a. Feuilles

simples ou composées, sans stipules, alternes ou opposées ; trifoliées ou unifoliées ; un de leurs caractères communs est la présence sur les feuilles de glandes oléifères qui apparaissent par transparence comme des points translucides (**Xiang Ke et al., 2004**).

b. Inflorescence

Généralement déterminée, rarement réduite à une fleur solitaire, terminale ou axillaire (**Judd et al., 2002**).

5. Intérêts des rutacées

Selon **Judd et al (2002)**, les rutacées ont une importance dans plusieurs domaines :

- Economiques : les résines caractéristiques des rutacées sont inflammables et en conséquence le bois de certaines espèces est utilisé comme carburant ou en torches.
- Alimentaires : fruits produisent essentiellement par les espèces du genre citrus (orange, citron, pamplemousse...) sont consommables
- Ornementales : la famille contient de nombreux arbres et plantes ornementales.
- Médicinales et cosmétiques : Citrus (genre des rutacées) est largement utiliser dans le domaine de la parfumerie.

6. Nomenclature

Ruta vient du grec 'rhyté' qui signifie sauvé, prévenir, ou de 'reo' qui signifie qui coule. Communément, les espèces du genre *Ruta* sont connues sous un seul nom "ruer", elles sont citées par **Ibn el-baytar** sous le terme de (Sadab, et (Fidjen, ùà) emprunté en Person (Pydjan), terme comparé au pèganon de Dioscorides. Fidjen est indiqué aussi par **Elghassani**, il correspond selon l'auteur à l'espèce sauvage connue à « Fès » quand au terme berbère (aouermi, ajj) il est mantionné par (**Bouklarich**) comme synonyme des autres appellations (**Baba-aissa, 1999**).

6.1. Appellations en différents langues

- En français : rue ;
- En allemand : raute ;
- En italien : ruta ;
- En anglais : rue (**Bonnier, 1999**).
- En espagnol : ruda (**Duke et al., 2008**)

7. Le Genre Ruta

7.1. Description botanique

7.1.1. Appareil végétative

- ✓ **La tige** est ramifiée, vert pâle ;
- ✓ **Les feuilles** sont pennatiséquées et cela d'autant plus que leur niveau d'insertion sur l'axe est plus bas.

7.1.2. Appareil reproducteur

Les fleurs sont groupées au sommet de la tige en une cyme composée, dont seule, la fleur centrale, sans doute de par sa disposition privilégiée, est pentamère. Il y a donc 4 ou 5 sépales, 4 ou 5 pétales ; l'androcée, obdiplostémone, comprend deux cycles d'étamines, donc 10 étamines pour la fleur centrale et 8 étamines pour les fleurs périphériques : le gynécée comporte un seul cycle de 4 ou 5 carpelles fermés, pluriovulés reposant sur un disque nectarifère épais.

La formule florale de la rue est donc, en ne considérant que la fleur centrale :

$$5S+5P+ (5+5) E+5C$$

Cette formule ne met pas en évidence le caractère assez remarquable des carpelles, qui ne sont soudés entre eux que par leur style.

Les styles et stigmates se fanent après fécondation : les 5 carpelles devenus libres se transforment en 5 follicules (**Dupont et Guignard, 2007**).

7.2. Distributions géographique

La famille des Rutacées a une origine les régions tropicales et tempérées notamment Afrique du sud et Australie (**Gaussen et al., 1982**). (fig ;1)

En plus **Judd et al (2002)**, ont montré que les Rutacées sont presque cosmopolites mais surtout tropicales et subtropicales.

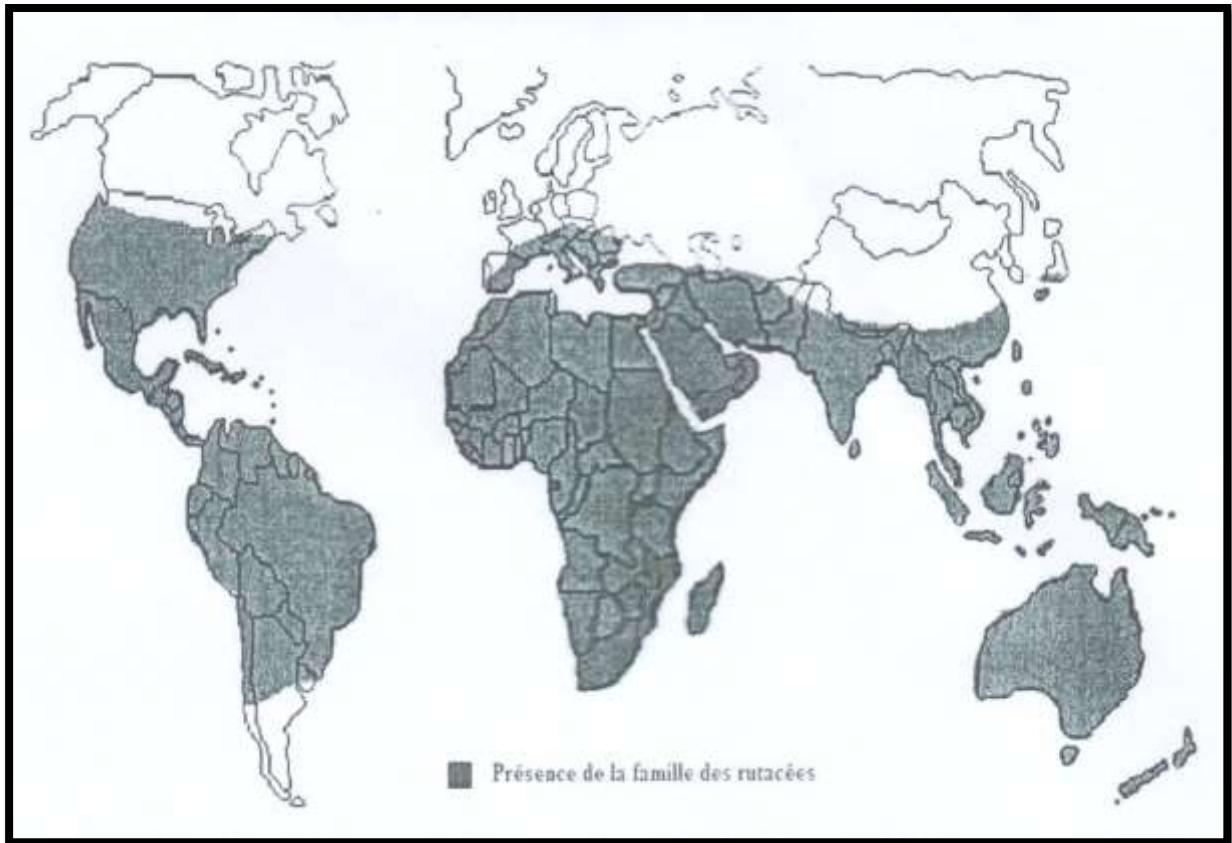


Figure 01 : Répartition géographique de la famille de Rutacées (Gausсен et al., 1982).

8. Espèce *Ruta montana*

8.1. Description botanique

La plante *Ruta montana* est une plante pérennante, vivace, glauque, à tiges dressées, à feuilles très divisées, alternes, couvertes de petites ponctuations qui sont des pochettes à essence. Les fleurs sont jaunes verdâtres, comportant 4 sepales, 4 pétales concaves et 8 étamines (Baba Aissa, 1999)

C'est la rue des montagnes (synonymes : *Ruta legitima* Jacq. ; *Ruta tenuifolia* Gouan) ou bonne rue (Bonnier, 1999), appelée vulgairement en Algérie : *fidjlet el-djbel* (فيجلة الجبل) ou *Fidjela* (فيجلة), a une odeur fétide très intense, se trouve sur les coteaux arides et dans les endroits secs et pierreux de la région méditerranéenne (Baba aissa, 1999).

8.2. La position systématique

Tableau 2 : La classification de *Ruta montana*
APGIII (2009)

Règne	plantea
Clade	Angiospermes
Clade	Dicotyledones Vraies
Clade	Rosidees
Clade	Malvidees
Ordre	Sapindales
Famille	Rutacées
Sous-Famille	Rutoideae
Genre	<i>Ruta</i>
Espèce	<i>Ruta montana</i>



Figure 02 : la plante *Ruta montana*
(Daoudi, 2017)

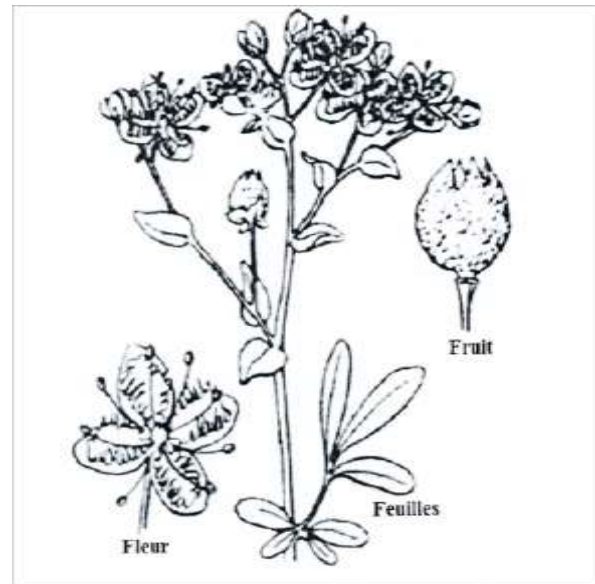


Figure 03 : schéma représente les caractéristiques morphologiques du *Ruta montana* (Duke et al., 2008).



La plante ;
Ruta montana

Les feuilles

Les fleurs

Les graines ou les
fruits

Figure 04 : les parties aériennes de la plante *Ruta montana*

- ❖ **Description** : plante glauque, à tige dressée, finement glanduleuse, à glande non saillante, brun-pale, 50 à 80 cm, feuilles en lobes oblongs-lancéolés, obtus, glanduleux, un peu inégaux.
- ❖ **Inflorescence** en corymbe, dotée à la base des rameaux, de bractées dépassant fortement leur largeur, carole à 4 pétales d'une jaune pale.
- ❖ **Fruits** aigus acuminés de 5 à 9 mm de diamètre, grappes fructifères étalées.
- ❖ **Odeur** ; très forte, nauséabonde, fétide.
- ❖ **Saveur** ; aromatique, amère, chaude, bore
- ❖ **Partie à utiliser** ; sommités fleuries.
- ❖ **Propriétés** ; emménagogue, antispasmodique, antiépileptique, vermifuge et sudorifique, elle exerce localement une action irritante, en usage interne ; elle peut provoquer des accédant de gastro-entérite, intense, avec vertiges, tremblements et convulsion. (Daoudi, 2017)

8.3. L'utilisation de la plante

8.3.1. Culinaire

Les feuilles fraîches ou séchées sont utilisées en petites quantités (très amères) dans les sauces, oeufs brouillés ou omelettes, fromages blancs et beures aux herbes.

Très prisée des Anglo-saxon, *Ruta montana* sert aussi à aromatiser des boissons alcoolisées, la bière mais aussi le vin blanc dont elle rehausse le bouquet.

Ainsi les feuilles fraîches peuvent être utilisées pour assaisonner les sauces et les plats de viande mais utiliser modérément à cause du goût amer et des risques de toxicité (**Eberhard et al., 2005**).

8.3.2. Médicinale

- **Peau** : l'effet de la rue sur la peau revêt deux aspects. D'une part, la rue, comme plusieurs rutacées et certaines ombellifères, contient des composés susceptibles de provoquer des dermatites sous l'action du soleil. D'autre part, il est reconnu depuis longtemps que le jus ou la sève des feuilles de la rue sert d'antidote contre les morsures de serpent, les piqures d'insectes et les allergies dues aux plantes. Elle servirait également à soigner les maladies de peau comme le psoriasis ainsi que les blessures (**Duval, 1992**).
- **Système nerveux** : la rue est antispasmodique. Les Arabes en mâchent les feuilles, ce qui est sensé calmer tout trouble d'origine nerveuse. Les feuilles fraîches écrasées en application externe soulagent la sciatique. Traditionnellement, la rue était utilisée dans les cas d'épilepsie. Les victimes de la maladie portaient des feuilles de rue au cou pour prévenir les crises (**Ait, 2006**).
- **Circulation sanguine** : une des propriétés reconnues de la rue est sa capacité pour abaisser la pression artérielle, ce qui en fait une plante utile pour le traitement des vaisseaux sanguins. La rue accroît également le flot sanguin du système gastrointestinal, protégé dans le cas de coliques ou troubles digestifs (**Ait, 2006**).
- **Sens** : les anciens reconnaissaient les vertus de la rue dans les cas de trouble de la vue. En homéopathie, le jus extrait des plantes fraîches est utilisée pour renforcer la vue, il conseille pour soigner les cataractes de dissoudre les fleurs de rue dans un plat d'eau peu profond exposé au soleil. On baigne les yeux plusieurs fois par jour avec le liquide jaune obtenu en pressant les fleurs ayant trempées dans l'eau. Le jus chauffé soulagera les maux d'oreilles (**Ait, 2006**).
- **Fertilité** : le pouvoir de la rue est redoutable en ce domaine, la plante agissant sur l'utérus. En petites doses, la rue est bonne pour le soulagement des dysménorrhées.

A plus forte dose, la rue est abortive et son utilisation a donc été envisagée comme 'pilule du lendemain'. Autrefois, la rue était utilisée comme anaphrodisiaque pour encourager à la chasteté (Ait, 2006).

- **Parasites** : la rue est un antihelminthique, un vermifuge et un anti-amibien (Ait, 2006).
- **Usage vétérinaire** : la rue a déjà été employée dans de nombreux remèdes vétérinaires surtout pour aider à la délivrance et contre la météorisation chez les bovins, caprins et ovins. D'autres usages, ceux-là empiriques, incluent le traitement des fièvres persistantes des bovins, les parasites intestinaux ; de la morve des chevaux ; des parasites externes et la prévention de la rage. En homéopathie animale, la rue entre dans la composition d'un remède antirhumatismal et d'une poudre calcique (Ait, 2006).

Les symptômes d'un empoisonnement à la rue chez les animaux sont : salivation, gastroentérite aiguë, excitation puis prostration, bradycardie et avortement (Ait, 2006).

8.3.3. Agricoles

La rue, par sa forte odeur et ses composés puissants, est utilisée pour le contrôle des ravageurs, notamment contre les insectes. La rue est toxique pour les mollusques, les poissons et les oiseaux. Elle serait aussi nématicide (Duval, 1992).

8.3.4. Cosmétique

L'huile essentielle de la rue est utilisée dans le domaine de la parfumerie (Baba Aissa, 1991).

8.3.5. Ecologique et horticole

Elle permet la fixation du sol donc le protéger contre l'érosion. On trouve cette plante dans la plupart des jardins pour son parfum, sa saveur, et sa décoration

8.4. Mode d'emploi

- **Infusion** : mélangé à du jus de citron, contre les coliques, les vers intestinaux et traitement des règles douloureuses, des affections respiratoires, des paralysies, de la goutte, de l'oligurie et des œdèmes. En tampons appliqués dans les cas de saignements de nez et en cataplasmes sur la tête dans les cas de migraine. On la donne à la mère juste après l'accouchement comme remède ocytocique (Ait, 2006).
- **Décocté** : en mélange avec d'autre plante comme remède abortif et en friction de tout le corps pour baisser la fièvre (Ait, 2006).
- **Fumigation** : mélangée à des graines de *Peganum harmala L.*, de câriandre et à du goudron de cèdre contre l'épilepsie, dans le traitement des affections du foie (Ait, 2006).
- **Oléate** : traitement de vitiligo. Contre les rhumatismes (Ait, 2006).

- **Macérât** : dans l'huile, des gouttes auriculaires : contre les bourdonnements d'oreille et dans les cas d'otite (**Ait, 2006**).
- **Poudre** : chez les enfants contre la fièvre (**Ait, 2006**).
- **Mélangé** : avec le miel pour soigner les gerçures des seins (**Ait, 2006**).

8.5. La toxicité

- La rue est une plante très puissante. Elle ne doit jamais être consommée par des femmes enceintes car elle est abortive. De grandes doses sont toxiques et provoquer la mort. L'huile essentielle est extrêmement irritante pour la peau et les muqueuses, elle est considéré toxique en doses plus grandes de 2 g de la poussière sèche par jour.
- La manutention de la plante peut causer des réactions allergiques (photodermatites) semblables à celles de l'herbe à puce chez certaines personnes (**Bruneton, 2005**).

8.6. Utilisation populaire en Algérie

La rue est très utilisée à des fins diverses : Fébrifuge, antivenimeux local, contre les nausées et les vomissements, dans les constipations, dans le paludisme, pour soigner les anémies (**Merad chiali, 1973**), le rhumatisme, contre les douleurs gastriques, les vers intestinaux (**Baba aissa, 1999**), dans les accouchements difficiles, les maux des yeux et des oreilles, dans l'asthme, les névroses (**Merad chiali, 1973**).

Chapitre II

LES MÉTABOLITES
SECONDAIRES

II. Les métabolismes secondaires

1. Définition et fonction des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont 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 défense contre les prédateurs et les pathogènes, comme agents allélopathiques ou pour attirer les agents chargés de la pollinisation ou de la dissémination des fruits (**Judd et al., 2002**).

En général, les termes, métabolites secondaires, xénobiotiques, facteurs antinutritionnels, sont utilisés pour déterminer ce groupe, il existe plus de 200.000 composés connus qui ont des effets antinutritionnels et toxiques chez les mammifères. 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 (**Makkar, Siddhuraju et Becker, 2007**).

2. Composés phénoliques

2.1. Généralités

Les polyphénols forment un des groupes le plus nombreux et largement distribué dans la règne végétal avec ce qui avoisine les 8000 structures phénoliques connus.

La teneur d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique (**Correta et al., 1993**).

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux et sont présents dans toutes les parties de la plante (**Lugasi et al., 2003**).

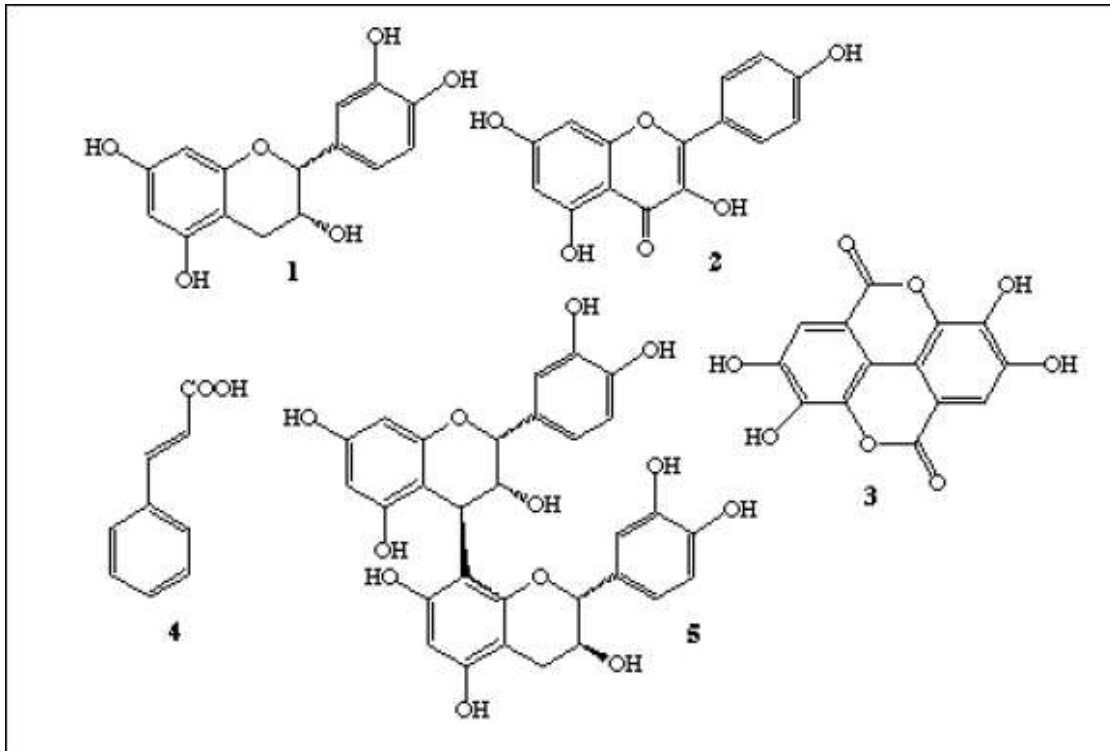


Figure 05 : Structure de quelques composés phénoliques (Lugasi et al.,2003)

2.3. Propriétés des composés phénoliques

D'anciens travaux de Nitsch G P et Nitsch C en 1961 et d'Alibert et ses collaborateurs en 1977 ont montré que les phénols seraient associés à de nouveaux processus physiologiques : croissance, différenciation, organogénèse, floraison et tubérisation.

Les flavonoïdes et d'autres polyphénols sont partiellement responsables des qualités sensorielles et alimentaires des végétaux. L'astringence et l'amertume des nourritures et des besoins dépendent de la teneur en polyphénols (Lugasi et al., 2003).

L'astringence est due au tanin catéchétiques qui précipitent les protéines salivaires, entraînant avec elles leur « cortège » des molécules d'eau qui lubrifieraient alors la muqueuse buccale.

Les tanins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non murs, les flavones sont responsables à l'amertume des citrus et peuvent donner naissance, par transformation chimique, à des hydrochalcones à saveur sucrée (Dubois et al., 1977).

Certaines hypothèses suggèrent que l'investissement métabolique pour la synthèse des tanins, nécessaires en quantité relativement importante pour exercer des effets toxiques significatifs, serait plus important que celui nécessaire aux systèmes de défense allélochimique basés sur la production de petites quantités de toxines très actives, comme les alcaloïdes (Lebreton, 1982).

Les flavonoïdes sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. Ils sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, et ils sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets des rayonnements UV. Les pigments responsables de la coloration des fleurs représentent des signaux visuels qui attirent des animaux pollinisateurs. La plupart de ces pigments sont des anthocyanes, des aurones et des chalcones. D'autres polyphénols incolores tels que les flavonols et flavanones interagissent avec les anthocyanes pour altérer par copigmentation la couleur des fleurs et des fruits (**Brouillard et al., 1977**).

Les cellules végétales répondent au stimulus environnemental en synthétisant les métabolites secondaires qui peuvent les protéger contre les agents de l'agression. Lorsque la plante soumise à des blessures mécaniques, des composés phénoliques et phénols simples sont synthétisés et l'activité peroxydasique caractéristique des tissus en voie de lignification est stimulée. Ces réactions aboutissent à la formation au niveau de la blessure d'un tissu cicatriciel résistant aux infections (**Fleurit et Macheix, 1997**).

2.4. Propriétés physico-chimiques

Les composés phénoliques sont généralement solubles dans les solvants organiques polaires. Les acides phénoliques sont solubilisés par le bicarbonate et les glycosides de ces composés sont solubles dans l'eau. Les dérivés d'acides cinnamiques tendent à former des isomères dans les solutions aqueuses. Tous les composés phénoliques sont instables, ils peuvent tous être oxydés, notamment dans les conditions alcalines (**Bruneton J, 1999**).

2.5. Rôle biologique

Les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques interviennent dans la qualité alimentaire, impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (**Bahorun T, 1997**). Ces substances sont essentielles pour la croissance, la pigmentation, la reproduction des plantes et la résistance aux pathogènes et les prédateurs (**Butler, 1982 ; Bhooshan Pandey et al., 2009**). Ces composés montrent des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux (**Babarali et al., 2007**), anti-allergènes, vasodilatateurs (**Falleh et al., 2008**) et antioxydants (**Gomez-caravaca et al., 2006**). Les plantes contiennent une grande variété de dérivés phénoliques.

Les composés phénoliques fonctionnent comme des antibiotiques, des pesticides naturels, des substances pour établir une symbiose avec des rhizobiums, attractifs pour les pollinisateurs, agents de protection contre la lumière ultraviolette (UV), matériaux isolants pour fabriquer des parois cellulaires imperméables au gaz et à l'eau et comme matériaux de structure pour donner une stabilité aux plantes (**Shahidi et al., 2006**).

2.5. Effets pharmacologiques

Les polyphénols ont de puissantes propriétés antioxydantes et des effets dans la prévention de diverses maladies associées au stress oxydant (**Manach et al., 2004**).

Les polyphénols ont d'autres activités biologiques, en plus des propriétés anti oxydantes, ils interviennent dans la prévention ou le traitement des maladies cardiovasculaires, neurodégénératives et du cancer. De plus, il a été constaté que les polyphénols modulaient l'activité d'une gamme d'enzymes (**Cole et al., 2005; Rasmussen et al., 2005**).

2.6. Composition

Les composés phénoliques sont constitués :

2.6.1. Acides phénoliques

Cette vaste famille regroupe des composés présentant des cycles aromatiques le plus souvent soluble dans l'eau et présent sous forme de glycoconjugués (**Gavot, 2009**).

Ils sont contenus dans un certain nombre de plantes surtout médicinales. Parmi les acides phénoliques on cite : acide chlorogénique, acide caféique, acide protocatéchique, acide vanillique et acide gallique (**Hale, 2003**) (*Fig ;6*)

2.6.2. Les tanins

Ceux sont des polyphénols polaires d'origine végétales (**Berthod et al., 1999**) ; existent dans presque chaque partie de la plante : écorce ,bois , feuilles ; fruits et racines .Leurs poids moléculaires s'étendent de 500 à 3000 da (**Cowan, 1999**). il est difficile de les séparer dans un extrait végétal parce que de nombreux isomères avec une base moléculaire très semblable coexistent (**Berthod et al., 1991**). Aujourd'hui, on distingue :

- Les tanins hydrolysables, esters d'un sucre, qui est très généralement le glucose, et de l'acide gallique ou de l'acide ellagique (*Fig ;6*).

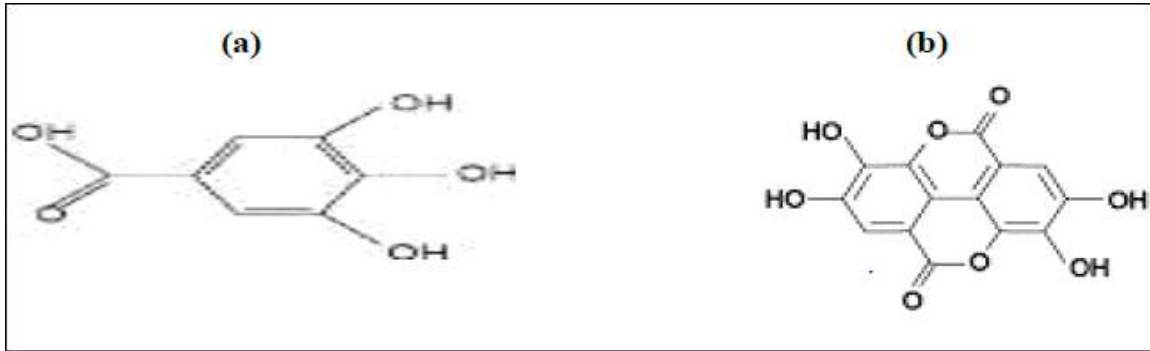


Figure 06 : Structure de l'acide gallique (a) et structure de l'acide ellagique (b)
(Berthod et al., 1991)

- Les tanins condensés ou proanthocyanidols, (*Fig ;7*) non hydrolysables résultant de la polymérisation d'unités flavan-3-ols. Ils forment dans les vacuoles des solutions pseudocolloïdales et peuvent aussi se fixer au niveau des lignines, renforçant encore l'imputrescibilité du bois de coeur. La disparition des tanins, lorsque les fruits ont atteint leur maturation, montre que comme d'autres composés phénoliques, ils peuvent être ré-utilisés par la plante (Gavot, 2009).

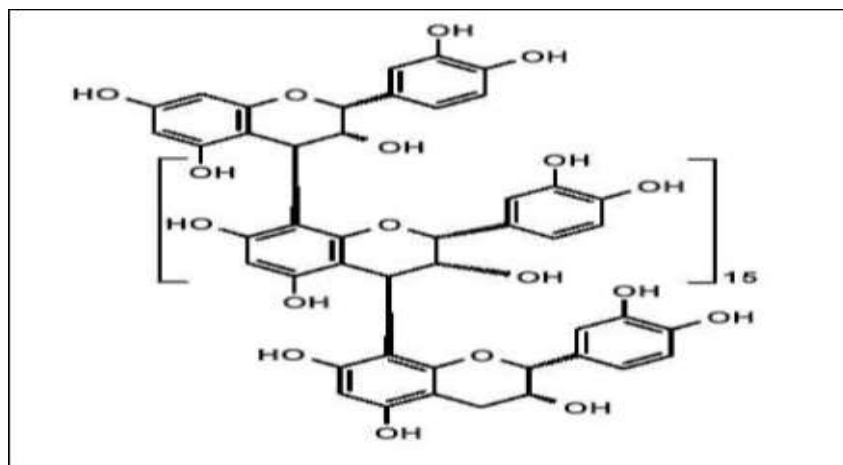


Figure 07 : Structure des tanins condensés (Gavot, 2009)

2.6.3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des dérivés phénylpropanoïdes solubles dans l'eau, souvent incolores ou jaunes (sauf exceptions dont les anthocyanes). Ces composés sont des dérivés de la naringénine-chalcone, elle-même issue de la condensation de trois résidus malonyl-CoA avec une molécule d'acide cinnamique. Il s'agit donc de dérivés phénylpropanoïdes. La structure de base comporte deux cycles aromatiques à 6 carbones joints par un hétérocycle à oxygène. Les

flavonoïdes constituent en eux même une famille de composés extrêmement vaste, jouant des rôles physiologiques importants. (Gavot, 2009) (Fig ;9).

Les principales catégories de flavonoïdes sont définies par :

- La présence ou l'absence d'une double liaison entre les carbones 2 et 3 du cycle C, qui déterminent la planéité de la molécule. Les flavones, flavonols et dérivés présentent une double liaison et sont des molécules planes, contrairement aux flavanes, flavanones et dérivés.
- La présence de fonctions cétones, alcools et méthoxy. (Gavot, 2009)

Les flavonoïdes ont tous une origine biosynthétique commune. Les flavonoïdes comprennent les flavonoïdes au sens strict (flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavan-3-ols, flavylum, chalcones, auronés) et les isoflavonoïdes (Cseke, Kirakosyan et al., 2006).

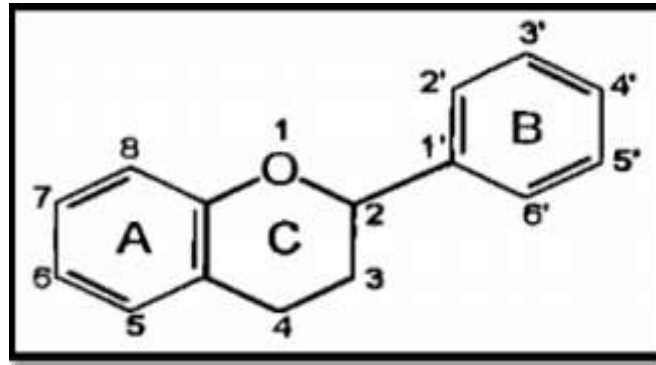


Figure 08 : Structure de base des flavonoïdes (Krishna et al ., 2001).

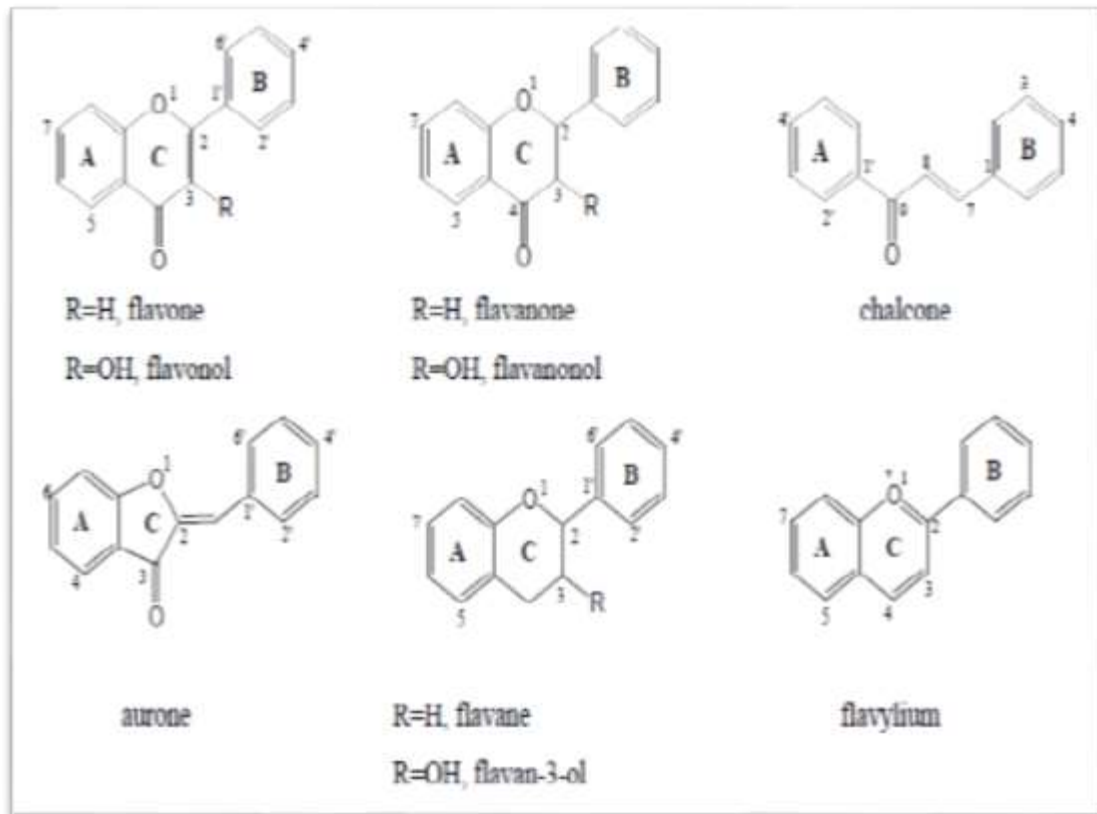


Figure 09 : Structure des différentes classes des flavonoïdes (Martinez et al., 2005).

2.6.3.1. Propriétés pharmacologiques des flavonoïdes

- L'activité la plus remarquable c'est qu'ils sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène (Van acker et al., 1996) ou par la chélation des ions métalliques impliqués dans la production des espèces oxygénées réactives. Autres études aussi ont montré que les flavonoïdes sont des bons inhibiteurs d'enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la xanthine oxydase, la cyclooxygénase et la lipooxygénase (Di carlo et al., 1999).
- L'effet antiallergique des flavonoïdes sur la production de l'histamine, par l'inhibition des enzymes (l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Calcium-dépendante) responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles.
- Des études ont montré que certains flavonoïdes comme : quercétine, myricétine, l'apigénine et la chrysin ont des effets anti-inflammatoires par l'action inhibitrice des enzymes responsables du métabolisme de l'acide arachidonique.

- D'autres flavonoïdes : rutine et kaempférol ont montré une action inhibitrice sur le PAF (Platelet Activating Factor), agent ulcérogène potentiel, et ainsi la réduction des dommages gastro-intestinaux.
- Effets anticancéreux par différents modes : l'inactivation du t-PA (tissue-type plasminogen activator) en lui greffant la laminine, une molécule de la matrice extracellulaire qui joue un rôle important durant la mort cellulaire. Le blocage de certaines phases du cycle cellulaire ou des sites récepteurs des hormones, la stabilisation du collagène, l'altération de l'expression des gènes.
- Les flavonoïdes préviennent le diabète en inhibant l'aldose réductase.
- La réduction du risque des maladies cardiovasculaires en entravant l'athérosclérose.
- On attribue aux flavonoïdes d'autres propriétés : veinotonique, anti tumorale, analgésique, antispasmodique, antibactérienne, hépato-protectrice, etc. (**Tringali, 2001**).

2.6.4. Les Alcaloïdes

Les alcaloïdes représentent un groupe de métabolites secondaires très diversifiés retrouvés chez les organismes vivants, ils ont un large rang de types structuraux, de voies de biosynthèse et d'activités pharmacologiques.

Les alcaloïdes sont des composés azotés, basiques qui s'extraient soit dans l'eau acide soit dans des solvants comme le chloroforme après alcalinisation. Ils précipitent généralement avec des réactifs iodométriques (réactif de Dragendorff) et sont très souvent biologiquement actifs. On retrouve en effet des molécules comme la quinine (anti-malaria), des drogues (cocaïne), des anticancéreux (la vincristine et le taxol), des molécules utilisées comme poisons (strychnine) et des stimulants (caféine). La plupart des alcaloïdes naturels sont d'origine végétale (**Gavot, 2009**). (*Fig ; 10*).

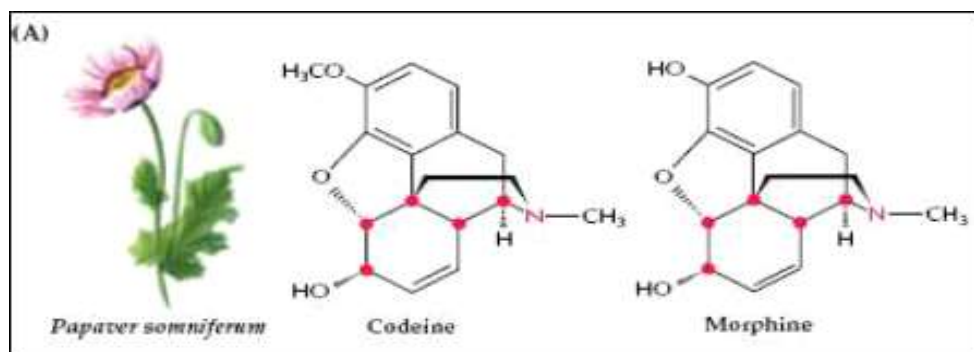


Figure 10 : Exemple de structure et espèce végétale associés aux alcaloïdes
(Croteau et al., 2000)

2.6.4.1. Classification et distribution des alcaloïdes

- Selon **Pelletier** en **1983**, les alcaloïdes sont des composés cycliques contenant un ou plusieurs atomes d'azote (**Roberts et Wink, 1998**), typiquement comme les amines primaires, secondaires, ou tertiaires et cela confère la basicité à l'alcaloïde, en facilitant leur isolement et purification comme sels solubles dans l'eau formés en présence des acides minéraux. Pourtant, le degré de basicité varie beaucoup, selon la structure de la molécule d'alcaloïde et la présence et l'endroit des autres groupes fonctionnels ;

- Cette définition inclue les alcaloïdes avec un azote incluse dans l'hétérocycle et aussi les alcaloïdes avec un nitrogène extra cyclique comme la colchicine, les alcaloïdes peuvent être de nature terpénique, stéroïdique ou aromatique ;

- L'activité biologique de beaucoup d'alcaloïdes dépend souvent de la fonction amine étant transformée en système quaternaire par ionisation aux pHs physiologiques (**Dewick, 2002**). Alors quatre groupes de composés azotés sont définis :

Amines secondaires ou tertiaires qui sont hydrophiles à pH<7.0 ou plus généralement lipophiles à pH>8.0, ce sont les alcaloïdes classiques.

Amines quaternaires, sont très polaires et chargés à n'importe quel pH, et sont isolés sous forme de sels, ex : berberine et sanguinarine.

Composés aminés neutres, incluent les amides-type alcaloïdes comme la colchicine, capsaïcine et la majorité des lactames comme la ricinine.

N-oxides, sont généralement très soluble dans l'eau, retrouvés dans plusieurs classes d'alcaloïdes, tel le groupe des pyrrolizidines.

- Depuis leur découverte et jusqu'à maintenant plus de 10.000 alcaloïdes ont été isolés ou détectés chez les plantes, les champignons et même les animaux, pour cela et à cause de la

grande diversité de ce groupe de métabolites, leur classification est basée sur plusieurs critères: l'origine biologique, la voie de biosynthèse, la structure et les propriétés spectroscopiques/spectrométriques (chromophores dans la spectroscopie UV) (**Hesse, 2002**).

- La classification la plus adaptée est basée sur l'origine biogénétique, par exemple, les indoles dérivent du tryptophane, sous le même groupe on peut trouver les indoles non terpéniques et terpéniques (irridoloïdes). Le groupe est après divisé en plusieurs sous-groupes dépendant ainsi sur le mode de cyclisation de la partie non glucidique de l'alcaloïde.

- Les alcaloïdes ne sont pas tous dérivés des acides aminés, et ainsi quatre groupes sont reconnus :

- ✓ Les alcaloïdes dérivés des acides aminés comme l'ornithine/arginine, lysine, histidine, phénylalanine/tyrosine, tryptophane, l'acide anthranilique ou nicotinique ;
- ✓ Alcaloïdes purines, comme la xanthine caféine ;
- ✓ Terpènes aminés, ex : diterpène aconitine ou triterpène solanine ;
- ✓ Alcaloïdes poly-cétoniques où l'azote est inclus dans le squelette poly-cétonique comme la coniine et la coccinelline.

- Avant quelques années, la majeure source des alcaloïdes était les plantes à fleurs, les angiospermes, où 20% des espèces y contiennent (**Walton et Brown, 1999**). Actuellement, plusieurs alcaloïdes proviennent des animaux, insectes, organismes marins, microorganismes et les plantes inférieures, ex : muscopyridine de cerf porte musk, bufotaline du crapaud (amphibien), les **Arthropodes** sont aussi une bonne source des alcaloïdes qui jouent un rôle de phéromone, ex : phéromone de trace, methyl-4-methylpyrrole-2-carboxylase, d'*Atta.sp* (espèce de fourmi), les **microorganismes** y contiennent aussi : les alcaloïdes d'*Aspergillus*, pyocyanine de *Pseudomonas aeruginosa*, chanoclavine-I de la moisissure de l'ergot (*Claviceps purpurea*) (**Roberts et Wink, 1998**).

2.6.4.2. Activités pharmacologiques

Les alcaloïdes exercent généralement leurs activités pharmacologiques sur les mammifères comme l'Homme. Jusqu'à aujourd'hui, plusieurs médicaments utilisés sont des alcaloïdes naturels, ils affectent chez l'être humain le système nerveux, particulièrement les transmetteurs chimiques tels l'acetylcholine, epinephrine, norepinephrine, acide γ -aminobutyrique (GABA), dopamine et la serotonine.

Les alcaloïdes jouent plusieurs activités pharmacologiques :

Analgésique (cocaine), anti-cholinergique (atropine, scopolamine, galanthamine), anti-malaria (quinine), anti-hypertensive (reserpine), antitussive (codeine), dépressant cardiaque, stimulant centrale (caféine), diurétique, anesthésiant local (cocaine), narcotique (morphine), anti-tumeur, sympathomimétique (éphedrine), ect... (**Bhat, Nagasampagi et Sivakumar, 2005**).

Plusieurs alcaloïdes servent de model pour la synthèse d'analogues avec des propriétés meilleures.

3. Les hétérosides

4.2. Définition

Les hétérosides sont des substances qui résultent de la condensation d'un ou plusieurs oses avec une partie non glucidique (génine ou aglycone) (**Sahraoui, 2015**)

4.3. Répartition et localisation dans la plante

Les hétérosides sont surtout abondants chez certaines familles riches en une catégorie d'hétérosides :

- ✓ Les **Scrofulariaceae** en hétérosides cardiotoniques
- ✓ Les **Rhamnaceae** en hétérosides anthracéniques...

Les hétérosides se localisent dans tous les organes : racine (gentiopecroside de la Gentiane), écorce (franguloside de la Bourdaine), feuilles (sennosides du Séné), fleurs (anthocyanosides), fruits (flavonosides des Citrus), graines (sinigrosides de la Moutarde). (**Sahraoui, 2015**)

4.4. Structure et Classification des hétérosides

La liaison entre le sucre et la génine s'établie avec la fonction réductrice de l'ose et un groupement fonctionnel de la génine, selon la nature de cette liaison on distingue :

→ **Les O-hétérosides** : la fonction réductrice de l'ose est liée avec un groupement hydroxyle (alcoolique ou phénolique) de la génine (liaison hémi-acétique)

→ **Les S-hétérosides** : La fonction réductrice de l'ose est liée à un groupement thiol de la génine ex : les sinigrosides

→ **Les N-hétérosides** : la fonction réductrice de l'ose est liée à un groupement aminé de la génine ex : les nucléosides

→ **Les C-hétérosides** : la liaison de l'ose avec la génine s'établie par une liaison Carbone – Carbone ex : barbaloine

Les oses peuvent être liés à la génine en des points différents, mais le plus souvent en un seul point sous forme de biosides, de triosides ou de tétraosides ...(**Sahraoui, 2015**)

4.4.1. Propriétés physico-chimiques

Les hétérosides sont généralement des solides bien cristallisés, parfois colorés, souvent de saveur amère. (**Sahraoui, 2015**)

→ Les hétérosides sont généralement solubles dans l'eau et les solutions hydroalcooliques, peu soluble dans les solvants organiques apolaire.

→ Les génines sont le plus souvent insolubles dans l'eau.

Hydrolyse : Les hétérosides sont des substances altérables, susceptible de s'hydrolyser plus ou moins facilement libérant ainsi les oses et les génines.

L'hydrolyse s'effectue soit par des enzymes ou bien par des acides.

Dans la plante fraîche, on retrouve les hétérosides primaires, riche en sucres n'ayant pas subit l'action des enzymes végétales. Par contre, dans la drogue sèche, les hétérosides primaires sont partiellement dégradés en hétérosides secondaires sous l'action des enzymes, perdant au moins un ose (le plus souvent le glucose terminal)

Selon la nature de la liaison hétérosidique on a :

- Les O-hétérosides sont facilement hydrolysables
- Les C-hétérosides s'hydrolysent difficilement (en présence d'un oxydant FeCl₃).

L'hydrolyse acide entraine fréquemment des altérations de la génine et même de la partie osidique (formation de dérivés du furfural) (**Sahraoui, 2015**)

4.4.2. Les Différentes classes d'hétérosides

La classification des hétérosides se fait suivant le mode de liaison de la génine et sa structure.

4.4.2.1. Les O-hétérosides

✓ Les hétérosides d'alcools simples

Ils sont rares, on les retrouve chez les algues Floridées ex : floridosides (galactoside du glycérol) et on rattache à ce groupe les hétérosides cyanogénétiques qui sont des hétérosides de nitriles-alcools (**Sahraoui, 2015**)

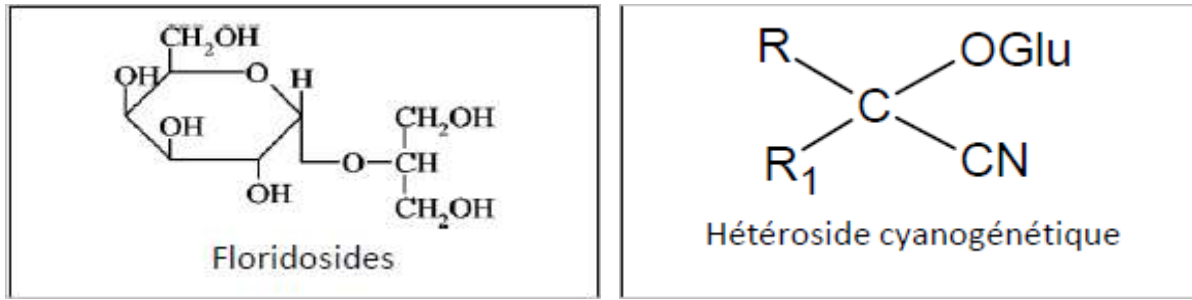


Figure 11 : Structure chimique des Floridosides et des Hétérosides cyanogénétique.

Chez les Rosacées, les hétérosides cyanogénétiques libèrent de l'acide cyanhydrique (très toxique) suite à l'action de différents enzymes. (Sahraoui, 2015)

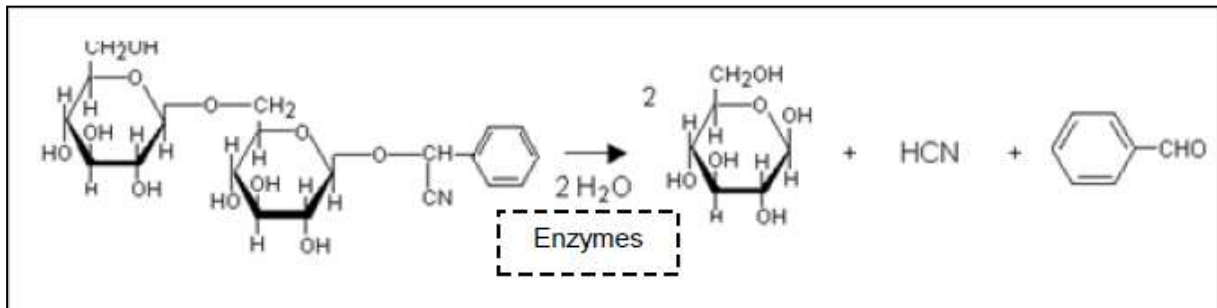


Figure 12 : l'action des enzymes sur les hétérosides cyanogénétiques.

❖ **Les hétérosides de phénols simples :** ex : l'arbutoside chez les Ericaceae et la salicoside chez la Saule. (Sahraoui, 2015)

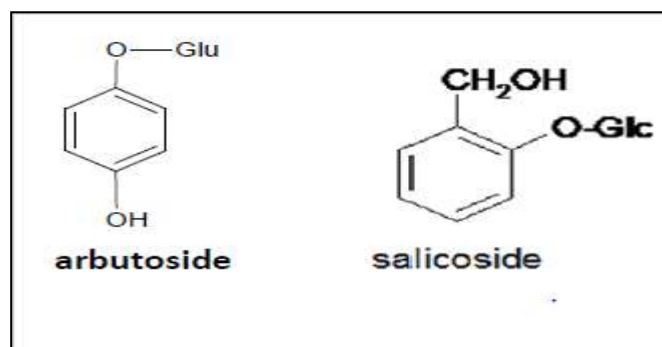


Figure 13 : Structures chimique d'Arbutoside et de Salicoside

❖ **Les hétérosides stéroïdiques :** c'est un groupe très important, il comprend :

Les hétérosides cardiotoniques : des hétérosides dont la génine dérive de la cardénolide ou de la bufadenolide. (Sahraoui, 2015)

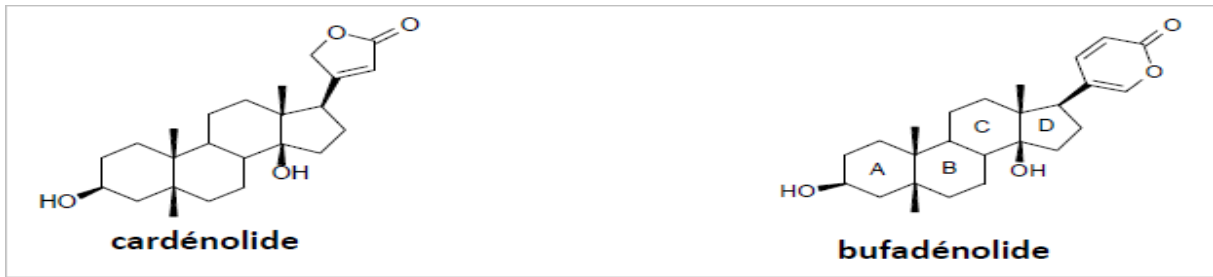


Figure 14 : structures chimique de Cardénolide et de Bufadénolide.

- ✓ *Les saponosides* : des hétérosides à génines stéroïdiques dérivant du spirostane ou à génine triterpénique dérivant de l' α ou β amyryne. (Sahraoui, 2015)

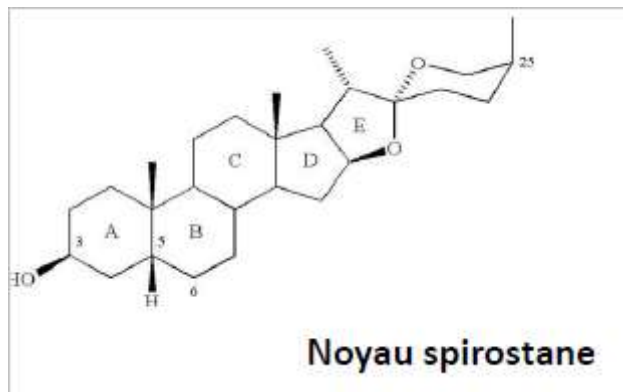


Figure 15 : structure de noyau des saponosides

- ✓ *Les gluco-alcaloides des Solanaceae (azastéroïdes)* : ce sont des saponosides à génines stéroïdiques azotées (Sahraoui, 2015)

❖ Les hétérosides à génine à noyau hétérocyclique

- ✓ *les hétérosides coumariniques* : sont des dérivés de la benzo- α -pyrone.

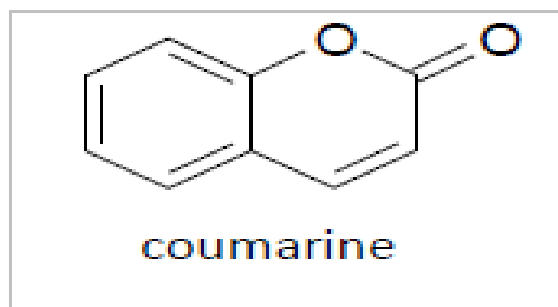


Figure 16 : structure chimique des coumarines.

- ✓ **Les hétérosides flavonoliques** : très répandus chez les plantes, les génines sont des dérivés de la phénylchromone.

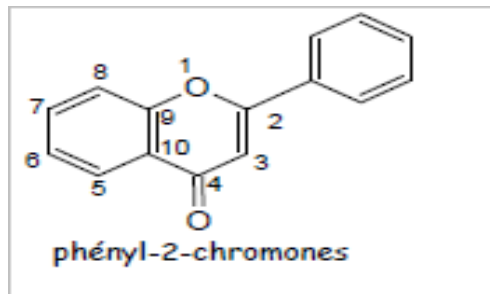


Figure 17 : Structure de phénylchromone.

- ❖ **Les hétérosides anthocyaniques** : composés à génine dérivant du phényl-2-benzopyrylium. (Sahraoui, 2015)

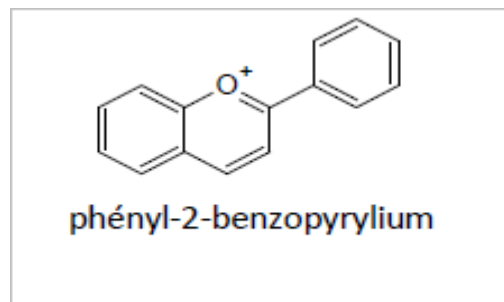


Figure 18 : structure de phényl-2-benzopyrylium.

- ✓ **Les anthracénosides** : des hétérosides dont la génine est un polyphénol à noyau anthracénique.

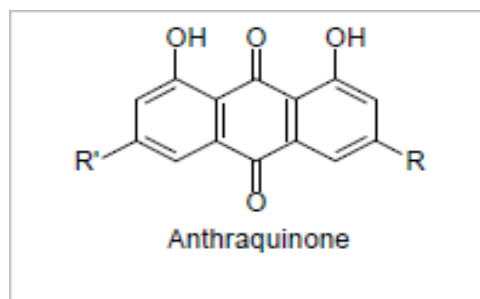


Figure 19 : Structure des anthraquinones.

❖ Les hétérosides divers

Il existe des hétérosides chromogéniques ou iridoïdes donnant par hydrolyse des génines triterpéniques instables qui s'oxyde à l'air (aucuboside de l'Acuba, loganoside du Vomiquier) Beaucoup d'antibiotiques sont des hétérosides dont la génine peut être une base azotée (streptidine) ou un macrolide, unis à plusieurs oses. (Sahraoui, 2015)

4.4.2.2. Les S-hétérosides ou Glucosinolates

Ils sont rencontrés principalement chez les Bracicacées.

Ses hétérosides sous l'action d'une enzyme (Myrosinase) libèrent des essences sulfurées volatiles : les **isothiocyanates** ou **sénévol** à propriétés rubéifiantes.

Ex : sinigroside de graine de Moutarde noir (Sahraoui, 2015). (fig ; 20)

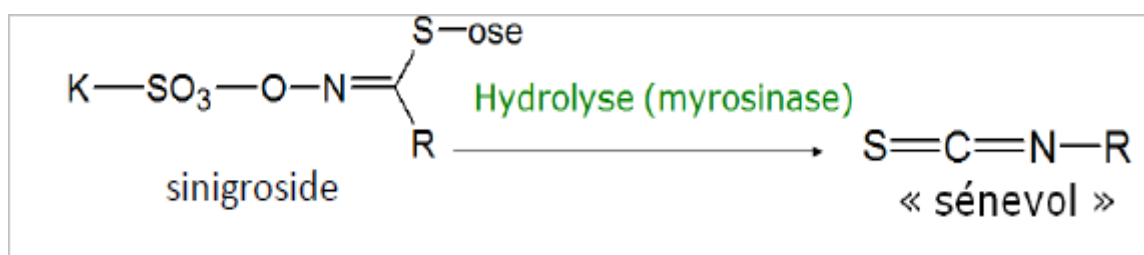


Figure 20 : Exemple sur l'action d'une enzyme (Myrosinase) sur le sinigroside.

4.4.2.3. Les C-hétérosides

Quelques C-hétérosides sont présent chez les hétérosides anthracéniques telle que l'aloïne de l'Aloès et chez les flavonosides telle que le scoparoside du Genêt à balai. (Sahraoui, 2015)

4.4.3. Propriétés pharmacologiques et emplois des hétérosides

Les hétérosides sont doués de propriétés pharmacologiques très importante et très divers exemple : cardiotoniques (hétérosides cardiotoniques), purgatifs (hétérosides anthracéniques), toniques veineux (hétérosides flavoniques), Diurétiques (arbutosides, saponosides, flavonoides), astringeants (tannosides), antimicrobiens (arbutoside, hétéroside des streptomycetes), des antirhumatismaux (salicosides) ...

Ils peuvent également être très toxiques telle que les hétérosides cardiotoniques et cyanogénétiques. L'activité est essentiellement due à la génine mais la partie osidique module cette activité et intervient dans l'absorption tissulaire, elle est le plus souvent nécessaire pour

l'action *in situ*. Le plus souvent c'est les hétérosides qui sont employés en thérapeutique pour leur action pharmacologique ou en industrie pour l'extraction des génines. (Sahraoui, 2015)

Chapitre III

ACTIVITÉ

ANTIOXYDANTE

III. Activité antioxydants

1. Stress oxydant

1.1. Définition

Le stress oxydant désigne une situation métabolique durant laquelle il y a formation d'une quantité excessive de radicaux libres. Les réactions en chaîne provoquées par ces molécules affaiblissent tout l'organisme. Cela ne fait que renforcer l'action du stress oxydant et les radicaux libres (Rösen, 2004) (*fig ; 21*).

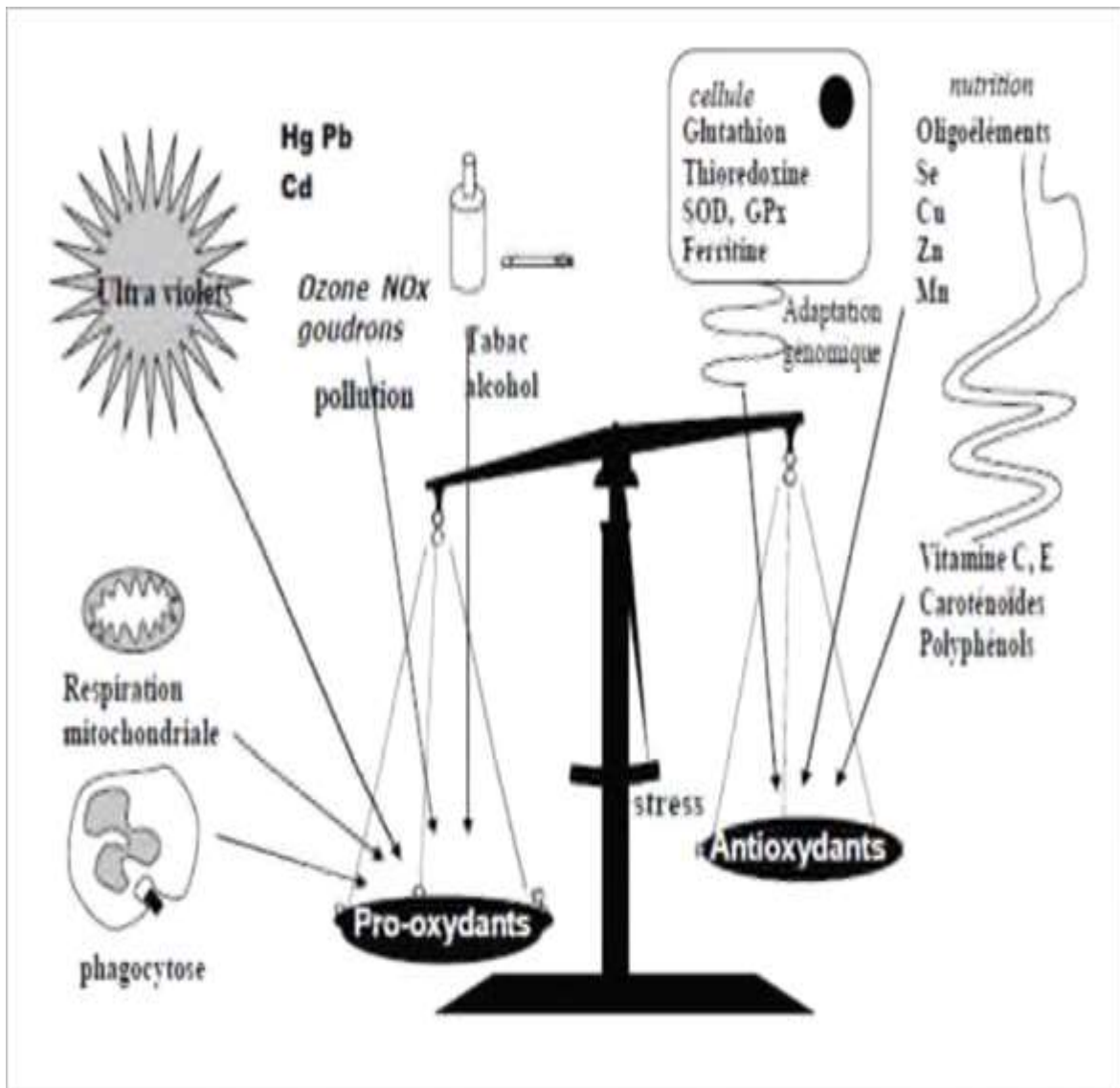


Figure 21 : La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants (Favier, 2006).

1.2. Radicaux libres

1.2.1. Définition

Un radical libre est défini comme une molécule ou un fragment moléculaire possédant un électron (ou plusieurs) non apparié qui se trouve le plus souvent sur l'orbitale externe de la molécule. Il est instable et a tendance à chercher à se stabiliser en s'appariant avec un électron appartenant à une autre molécule voisine provoquant ainsi sa déstabilisation et entraînant une réaction en chaîne qui aboutit à des destructions au niveau cellulaire (**Halliwell et Gutteridge, 1989 ; Borg et Reeber, 2008**).

1.2.2. Nature des radicaux libres

Les espèces réactives d'oxygène (ERO) et les espèces réactives d'azote (ERA) comportent :

- Des espèces radicalaire ; comme le radical super oxyde ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyle (OH^{\bullet}), Peroxyde (RO_2^{\bullet}), hydro peroxydyle (HO_2^{\bullet}), alkoxyde (RO^{\bullet}), peroxyde (ROO^{\bullet}), oxyde nitrique (NO^{\bullet}), dioxyde de nitrogène (NO_2^{\bullet}) et le peroxyde d'hydrogène (LOO^{\bullet}) ;
- Des espèces non radicalaires ; appeler aussi oxydants comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypochlorique ($HOCl$), l'ozone (O_3), l'oxygène singlet ($-1O_2$), peroxyde nitrate ($ONOO^-$), l'acide nitrique (HNO_2), trioxyde di nitrogène (N_2O_3), peroxyde lipidique ($LOOH$) (**Pham-Huy et al., 2008**).

1.2.3. Génération des radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être formes à partir de substances endogène et exogène.

Différentes sources de radicaux libres sont citées comme suit ;

- Les neutrophiles et les macrophages durant l'inflammation ;
- Les rayons UV, les rayons X, les radiations gamma et les micro-ondes ;
- Durant les réactions de transport d'électrons dans les mitochondries ;
- Le cytochrome oxydase mitochondriale, la xanthine oxydase, et par la peroxydation lipidique ;
- Le métabolisme de l'acide arachidonique, plaquettes etc.
- L'interaction avec les produits chimiques, les échappements d'automobiles et la Fume de cigarette ;
- La bruler de la matière organique pendant la cuisson, les feux de forêt et les activités volcaniques ;

- Les effluents industriels, les produits chimiques en excès, la consommation des produits alcooliques et certains médicaments, certains pesticides et herbicides, certains ions métalliques, toxines fongiques et xénobiotiques (**Bagchi et Puri, 1998 ; Nagendrappa, 2005 ; Valko, 2006**)

1.2.4. Les espèces réactives de l'oxygène

✓ Définition

L'oxygène est un élément indispensable à l'organisme aérobie et contribue en grande partie à la synthèse de l'énergie stockée sous forme d'ATP par le processus de la phosphorylation oxydative qui se réalise au niveau des mitochondries (**Gutteridge, 1995**).

En biologie les radicaux libres sont formés le plus souvent à partir de l'oxygène d'où leur appellations : les espèces réactives de l'oxygène (EROs) qui désignent à la fois des espèces radicalaires de l'oxygène et des espèces non radicalaires (**Boeck et Larcier, 2006**).

Tableau 2 : Les espèces réactives d'oxygène.

ERO	Symbole chimique	Propriétés
L'anion Superoxyde	$O_2^{\cdot -}$	Radical formé par la réduction monoélectronique de l'oxygène, peu réactif mais toxique (Lee et al., 2004).
Le radical hydroxyle	OH^{\cdot}	L'espèce radicalaire la plus réactive de l'oxygène, à une demi-vie extrêmement courte d'environ 10^{-9} s, capable de réagir très rapidement avec la plupart des biomolécules (ADN, protéines et lipides), (Bartosz, 2003).
L'oxygène singulet	1O_2	La forme excitée de l'oxygène moléculaire, est souvent assimilé à un radical libre en raison de sa forte réactivité (Hadi, 2004).
Le peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	C'est une molécule non radicalaire, stable, présente une toxicité importante (Binove, 2001).

1.2.5. Rôles physiologiques

- ***La Phagocytose et la défense immunitaire***

Les radicaux libres jouent un rôle essentiel dans le bon déroulement de la réaction immunitaire. La phagocytose par les macrophages ou les polynucléaires s'accompagne d'une production intense d'ERO. Au sein du phagosome, l'activation de la NADPH oxydase et l'action de superoxydedismutase (SOD) et la monoxyde d'azote synthétase (NOS) aboutissent à un mélange de O₂, H₂O₂, OH en plus du HOCl, ce mélange réactionnel détruit par oxydation l'ensemble des composants bactériens (Favier, 2003 ; Delattre et al., 2005).

- ***La communication cellulaire***

Les ERO peuvent agir en tant que molécules signales et ainsi intervenir dans la communication intracellulaire et intercellulaire. Cela leur confère un rôle important dans les phénomènes de croissance et de mort cellulaire (Delattre et al., 2005).

Quelques mécanismes de communication cellulaire faisant intervenir les radicaux libres sont résumés comme suit :

- La régulation de l'expression des gènes ;
- Les radicaux libres extracellulaires peuvent interagir avec certains récepteurs membranaires et les activer, ils sont ensuite à l'origine d'un signal cellulaire ;
- Les radicaux libres peuvent intervenir en tant que second messenger intracellulaire (Delattre et al., 2005).

1.2.6. Rôles pathologiques

- ***Cibles biologiques des radicaux libres***

- **Les lipides**

Les lipides membranaires sont très susceptible d'être attaqués par les radicaux libres, quand les lipides s'interagissent avec ses composés ils peuvent subir des chaînes de réactions de peroxydation lipidique conduisant aux effets direct ou indirect (Devasagayam et al., 2003) (fig ; 22).

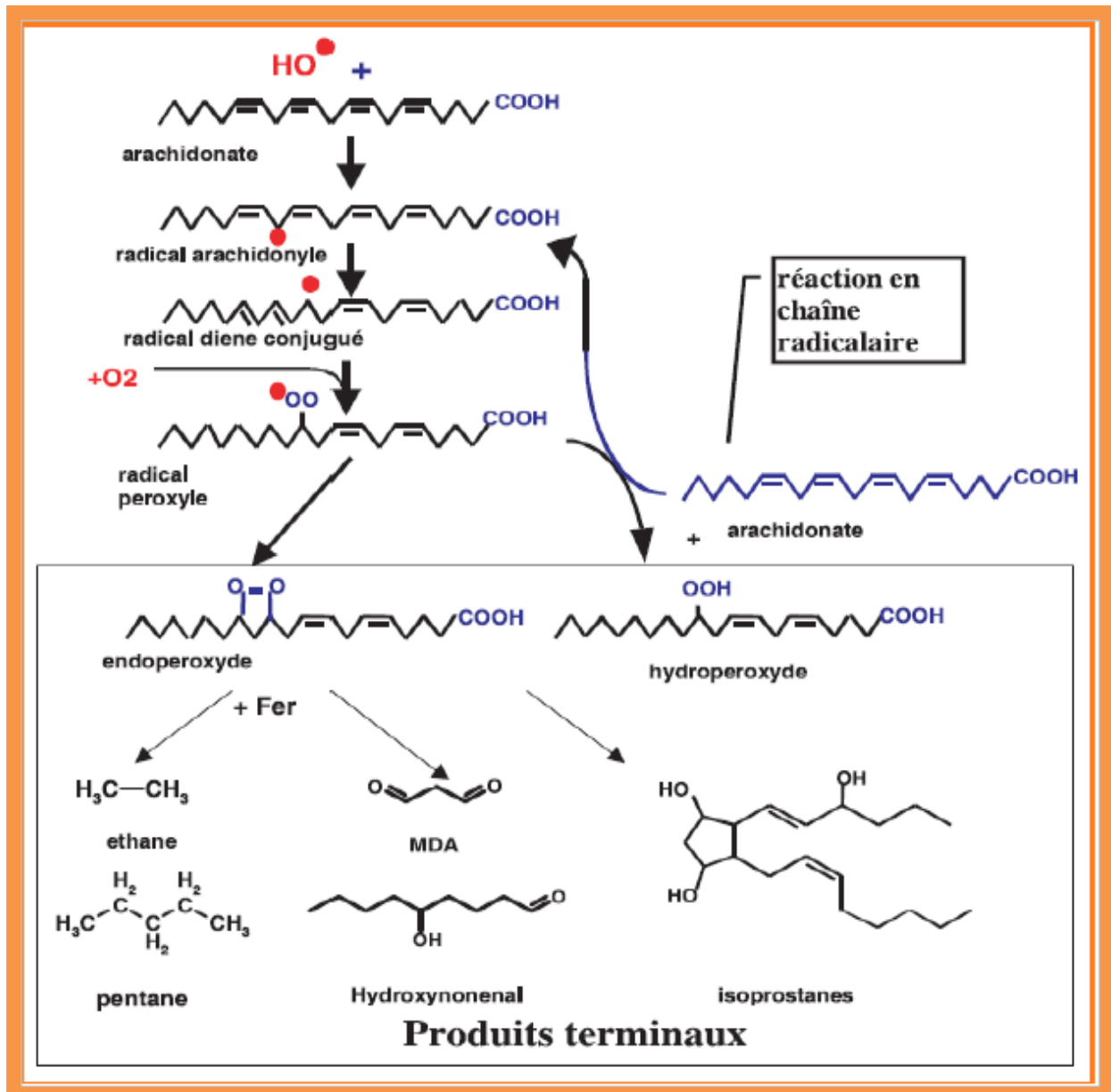


Figure 22 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation lipidique et ses produits terminaux (Favier, 2003).

➤ L'ADN

L'ADN oxydé est le résultat d'interaction de l'ADN avec les ERO. Les radicaux libres comme OH^\bullet s'interagissent avec l'ADN en se liant aux bases azotées ou aux dérivés d'hydrogène du sucre. La double liaison C4-C5 des pyrimidines est particulièrement susceptible d'être attaquée par OH^\bullet générant ainsi une gamme de produits avec des pyrimidines oxydées (Halliwell et Aruoma, 1993) (*fig* ; 23).

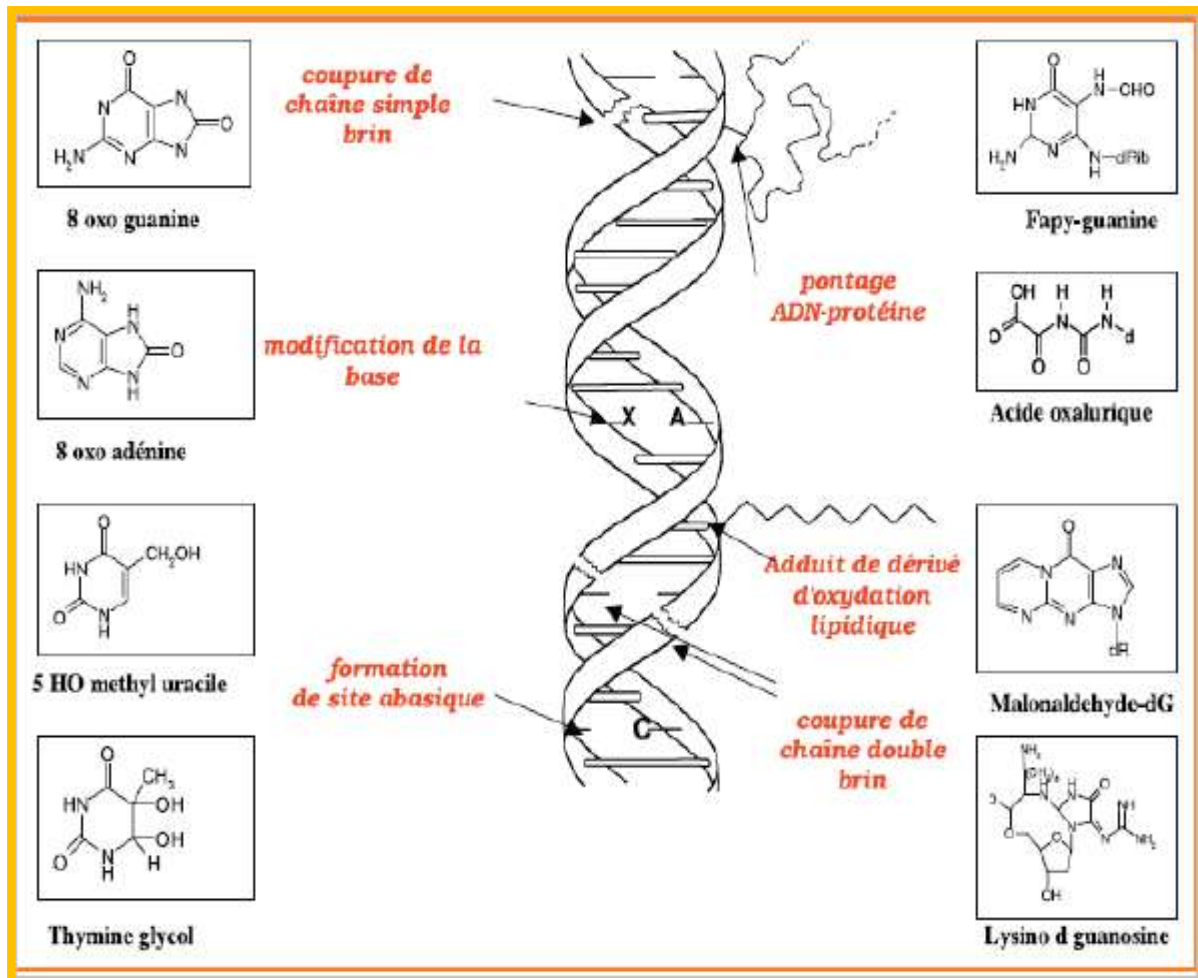


Figure 23 : Lésions de l'ADN, l'attaque radicalaire (Favier, 2003).

➤ Les protéines

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des ERO. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire d'un acide amine provoquera l'oxydation de certains résidus et des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes (Atkin *et al.*, 2005) (fig ; 24).

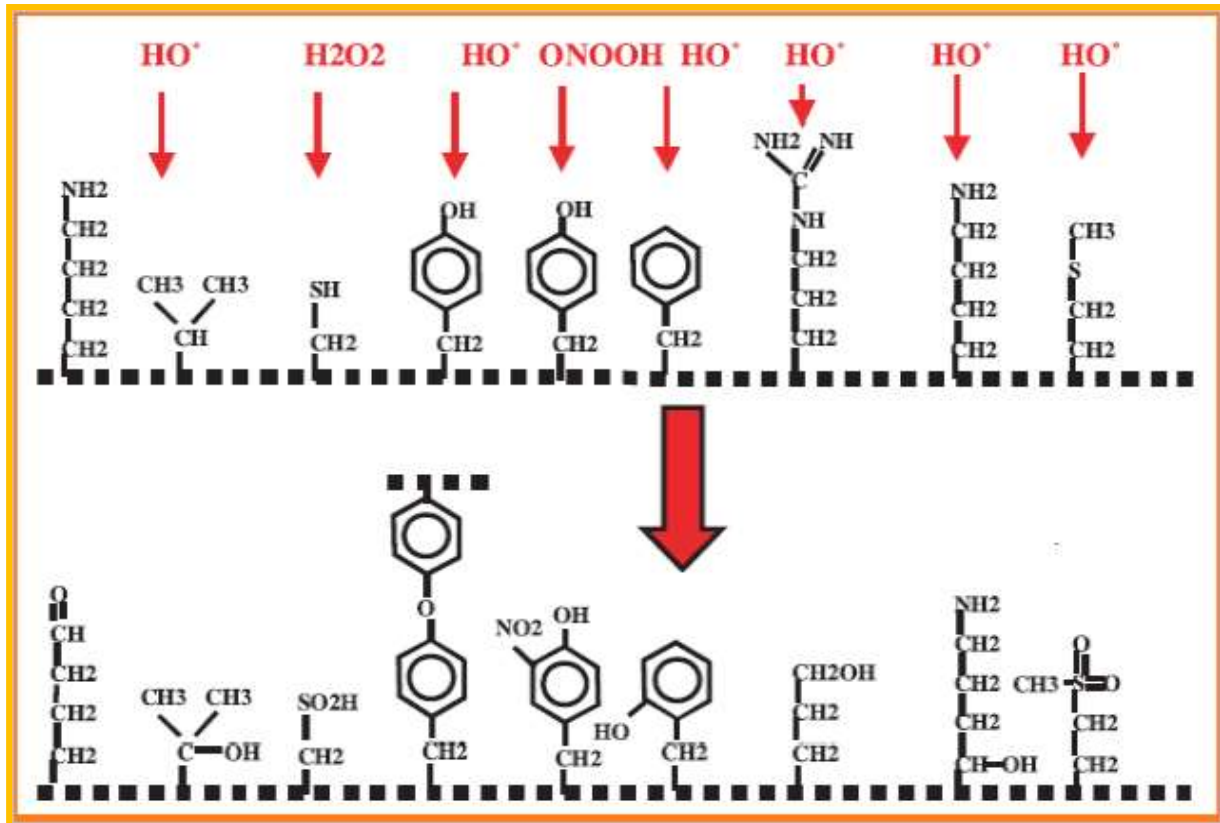


Figure 24 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).

➤ Les lipoprotéines

L'attaque radicalaire des lipoprotéines circulantes aboutit à la formation de LDL (low density lipoprotein) oxydées, qui seront captées par des récepteurs spécifiques des macrophages provoquant ainsi leur transformation petit à petit en cellules spumeuses (Saad *et al.*, 1983; Nakajima *et al.*, 2006).

➤ Les glucides

Les radicaux libres comme OH• se réagit avec les glucides par enlèvement d'un atome d'hydrogène au hasard à partir d'un atome de carbone, produisant un radical carbone centrale, cela va conduire à des cassures au niveau des chaînes de molécules très importantes (Halliwell et Aruoma ; 1993)

• *Les radicaux libres dans les maladies humaines*

Les réactions des ERO ont été impliquées dans la pathogenèse de nombreuses maladies humaines dont :

- Les troubles neurodégénératifs comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose en plaques et la dépression ;

- Les maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose, l'hypertension, la cardiopathie ischémique et l'hypertrophie cardiaque ;
- Les troubles pulmonaires comme les inflammations pulmonaires, et l'asthme ;
- Les maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde ;
- Les troubles rénaux à savoir la glomérulonéphrite, la néphrite, l'insuffisance rénale chronique, et l'urémie ;
- Les maladies gastro-intestinales comme l'ulcère peptique, la maladie inflammatoire de l'intestin et la colite ;
- Les cancers comme le cancer du poumon, la leucémie, Cancer du sein, de l'ovaire, du rectum,... etc. (Valko *et al.*, 2007; Pham-Huy *et al.*, 2008; Sen *et al.*, 2009).

1.3. Antioxydants

1.3.1. Définition des antioxydants

L'antioxydante est une substance est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation d'une autre substance (Boubekri, 2014)

1.3.2. Actions des antioxydants

Les défenses anti oxydantes sont extrêmement importantes et représentent l'élimination directe des radicaux libres, fournissant ainsi une protection maximale aux sites biologiques. Un bon antioxydant doit :

- Etre capable de piéger directement et spécifiquement les radicaux libres ;
- Chélate des ions de métaux de transition d'importance biologique capables de promouvoir la production des radicaux libres par la réaction de Fenton ;
- Interagir avec d'autres antioxydants et dans la mesure du possible les régénérer ;
- Capable de stimuler la synthèse des enzymes antioxydants et inhiber l'activité des enzymes pro-oxydantes ;
- Avoir un effet positif sur l'expression génique ;
- Etre rapidement absorbe ;
- Avoir une concentration qualifiée de physiologique. dans les tissus et les fluides biologiques ;
- Etre efficace en milieu aqueux et/ou dans le milieu membranaire (Valko *et al.*, 2006).

1.3.3. Classification des antioxydants

- *Les antioxydants enzymatiques*

Les plus efficaces sont le super oxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase. Super oxyde dismutase : La SOD est l'enzyme antioxydant qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde hautement réactif en O₂ et H₂O₂ (Mate et al., 1999).

- **Catalase**

La CAT est située dans un organite cellulaire appelé le peroxydosome, elle est responsable d'élimination de H₂O₂ présent en grandes quantités et favorise sa transformation en eau et l'oxygène moléculaire (Mate et al., 1999).

- **Glutathionne peroxydase**

La GPX est une enzyme sélénium (Se)-dépendante, elle est présente dans le cytoplasme, elle catalyse la réduction des hydroperoxydes (H₂O₂) et des peroxydes lipidiques en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène (Herbette, 2007). (fig ; 25).

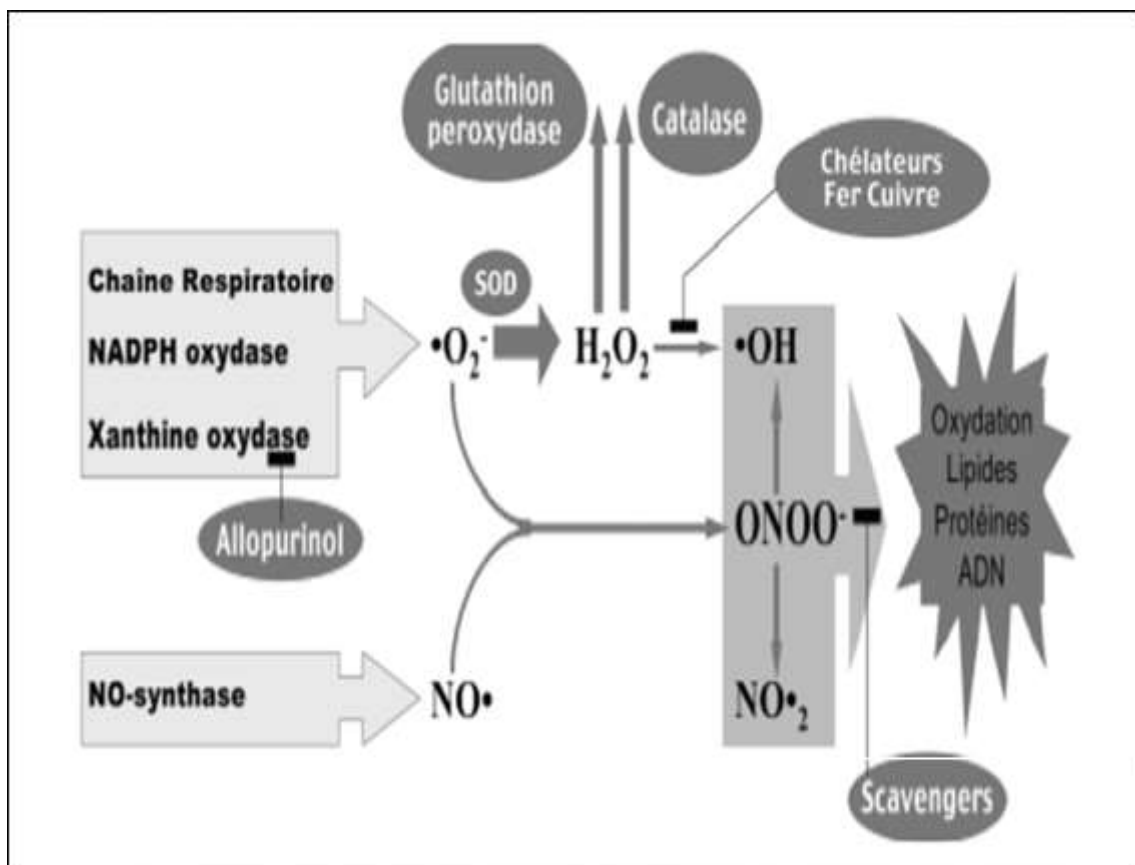


Figure 25 : Action des antioxydants au cours du métabolisme des ERO (Pelletier et al., 2004).

- **Les antioxydants non enzymatiques**

Ces antioxydants se divisent en deux principales catégories :

- *Les antioxydants endogènes*

Le glutathion : C'est le thiol le plus abondant dans les organismes et les systèmes vivants (Baudin et al., 2006).

L'acide urique : C'est un piègeur de l'O₂, des radicaux peroxy et hydroxyles (RO₂* et HO*), de l'ozone et de HClO (Delattre et al., 2005).

- *Les antioxydants exogènes*

La vitamine C : L'acide ascorbique est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présents dans les fluides intra- et extracellulaires (Vertuani et al., 2004).

La vitamine E : La α -tocopherol prévient la peroxydation des lipides membranaires in vivo en captant les radicaux peroxy, elle joue un rôle préventif dans le développement des cancers et dans le vieillissement (Evans, 2002).

Les caroténoïdes : Ils sont des pigments les plus répandus dans la nature. Une trentaine de caroténoïdes et de leurs métabolites a été identifiée dans le plasma et les tissus humains. Les caroténoïdes majoritaires sont : le β -Carotène, le lycopène, la lutéine, la β -cryptoxanthine, l' α -Carotène, et la zeaxanthin (Bouhadjra, 2011).

Les polyphénols : Ils sont des puissants antioxydants qui peuvent neutraliser les radicaux libres et chélate les métaux de transition comme Fe²⁺ (Tsao, 2010).

- *Les antioxydants synthétiques*

Les antioxydants synthétiques, vu leur efficacité et leur disponibilité, sont largement utilisés dans les aliments comme additifs dans le but de prévenir la rancidité.

Parmi les : le butylhydroxyanisole (BHA), le tertiarybutyl hydroquinone (TBHQ), le 2, 4,5 trihydroxy butyrophénone (THBP), le gallate de propyle (PG), le gallate d'octyle (OG) et le 4-hexylresorcinol (4HR) (Guo et al., 2006).

1.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante in vitro

Plusieurs méthodes sont disponibles pour mesurer l'activité antioxydant des aliments et les systèmes biologiques.

Elles peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes :

- soit par le transfert d'atome d'hydrogène ; employées pour évaluer la peroxydation et la quantification de cette propriété est exprimée par la mesure du pourcentage d'inhibition de l'oxydation (Sanchez-Moreno et Larrauri, 1998)

- soit par le transfert d'un simple électron, qui sont utilisées pour la mesure de la capacité du piégeage des radicaux libres (**Sanchez-Moreno, 2002**).

Partie II

Matériels et

méthodes

I. Objectif

L'objectif de notre travail est d'étudier la phytochimie et l'activité antioxydante de la partie aérienne de *Ruta montana* (fidjel) collectée de la région de Mostaganem .

L'étude phytochimique a été faite au niveau de laboratoire de biochimie N° 3 de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et l'étude de l'activité antioxydante a été réalisée au niveau du laboratoire de recherche de Pharmacognosie et Api-phytothérapie (LPAP). Université de Mostaganem.Algérie.

Notre étude expérimentale est composée de trois grandes parties ;

Partie I : préparation et extraction du matériel végétal de *Ruta montana* (la partie aérienne)

Partie II : l'étude phytochimique ; quantitative et qualitative.

Partie III : évaluation de l'activité antioxydante des extraits obtenus par la méthode :

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

1. Préparation du matériel végétal

1.1. Récolte et séchage

Cette étude a été réalisée, sur la partie aérienne de *Ruta montana* qui a été récoltée au période de floraison. La tige et les feuilles de *Ruta montana* ont été cueillies en février 2019 dans la région d'Ain Tadless .Wilaya de Mostaganem, la plante a été identifier et classée.

Après la récolte, les parties aériennes de la plante ont été lavées pour débarrasser les débris et toute sorte de poussières, puis elles ont été séchées dans l'étuve pendant plus de 25 jours et pour obtenir un meilleur broyage à 40C°.



Figure 26 : une photo représente l'emplacement de la plante « *Ruta montana* » dans l'environnement.(février, 2019).

1.2. Broyage et tamisage

Les parties séchées de la plante étudiée ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à obtention d'une poudre très fine (*fig ; 27*). La poudre obtenue a été conservée dans des flacons et stockée à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à l'utilisation.



Figure 27 : *Ruta montana* sous forme séchée et broyée.

2. Test d'humidité

- La teneur en humidité de la plante a été déterminée selon la méthode utilisée par **Amarti et al., (2010)**. Elle consiste en la détermination de la perte de masse par dessiccation à l'étuve à 40 °C.
- Nous avons sélectionné une quantité importante de 21 g de la plante fraîche (avant le séchage) spécialement pour calculer le taux d'humidité dans les mêmes conditions de séchage de la plante (la même température et période).
- Le taux d'humidité est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'humidité \%} = (M_f - M_s / M_f) \cdot 100$$

M_f : poids de la matière fraîche exprimé en grammes.

M_s : poids de la matière sèche exprimé en grammes.

3. Préparation des extraits

3.1. Extrait aqueux

L'extrait aqueux de *Ruta montana* a été obtenu par décoction de 20 g de broyat de la partie aérienne de la plante (tiges et feuilles) dans 500 ml d'eau distillée pendant 10 min sous agitation magnétique.

La solution est laissée reposer sur la plaque chauffante pendant 15 min, le mélange est d'abord filtré sur une gaze et ensuite sur papier Whatman (n°3).

Des aliquotes du filtrat sont placées dans une étuve à 40°C pendant 24 h pour sécher. L'extrait sec est conservé au réfrigérateur à -20°C (Belhattab *et al.*, 2004, Ben ammar *et al.*, 2007)

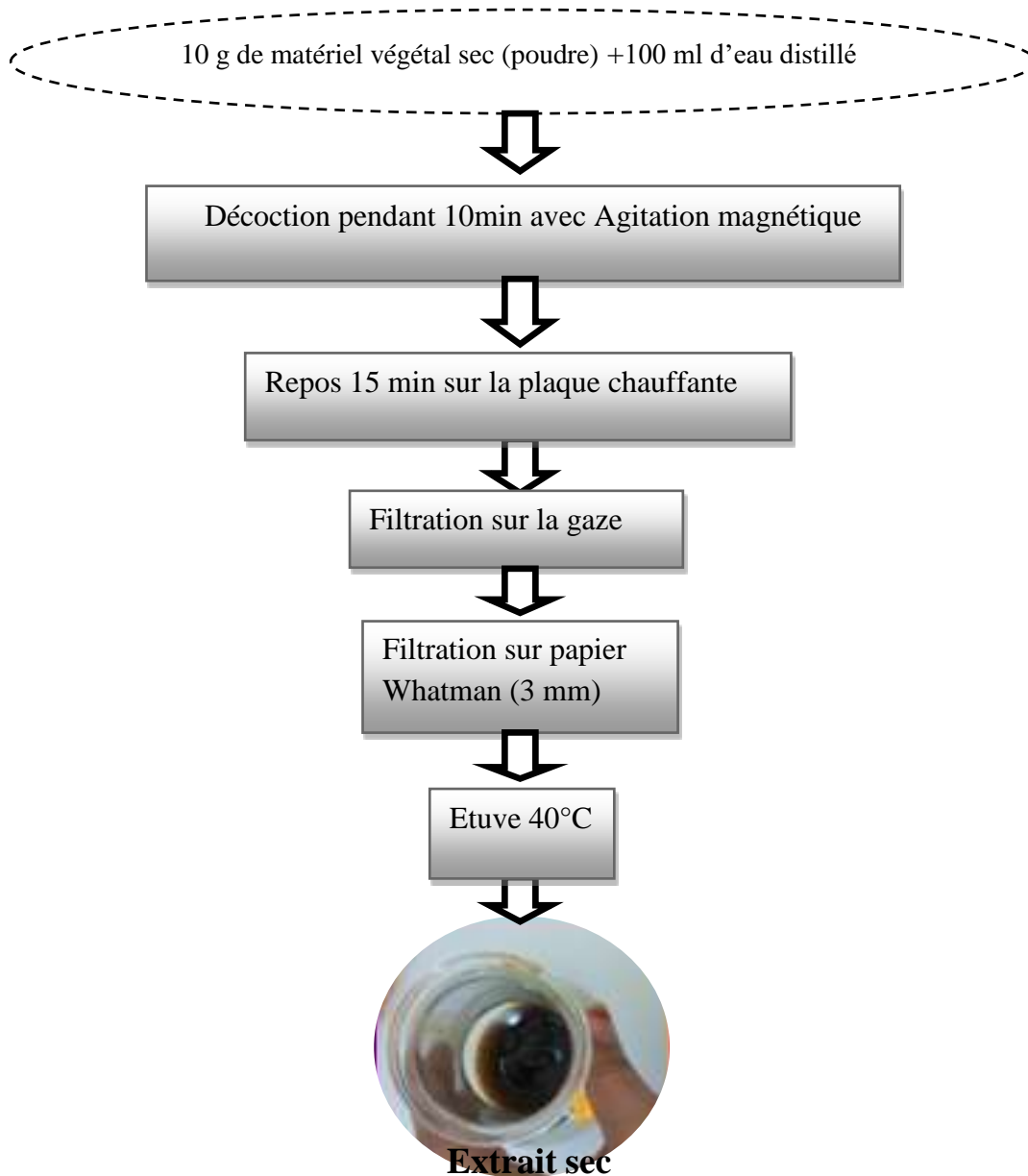


Figure 28 : protocole de préparation de l'extrait aqueux (Belhattab *et al.*, 2004)

3.2. Extrait méthanoïque

L'extrait méthanoïque de la partie aérienne de *Ruta montana* a été préparé à partir de 50 g de broyat des tiges et des feuilles, qui ont été mis à macérer dans 200 ml de méthanol à la température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 24 h, avec un maximum d'agitation. Ensuite le mélange est filtré sur la gaze et une deuxième fois sur papier Whatman (n°3). L'opération est répétée une seconde fois sur le mac. Les filtrats obtenus évaporés à sec à l'aide d'un rota vapeur (*Fig.29*) à une température de 40°C. l'extrait sec est conservé au réfrigérateur (*Belhattab et al., 2004 ,Ben ammar et al., 2008*).



Figure 29 : Méthode de l'évaporation de l'extrait méthanolique dans l'appareille de rutavapeur

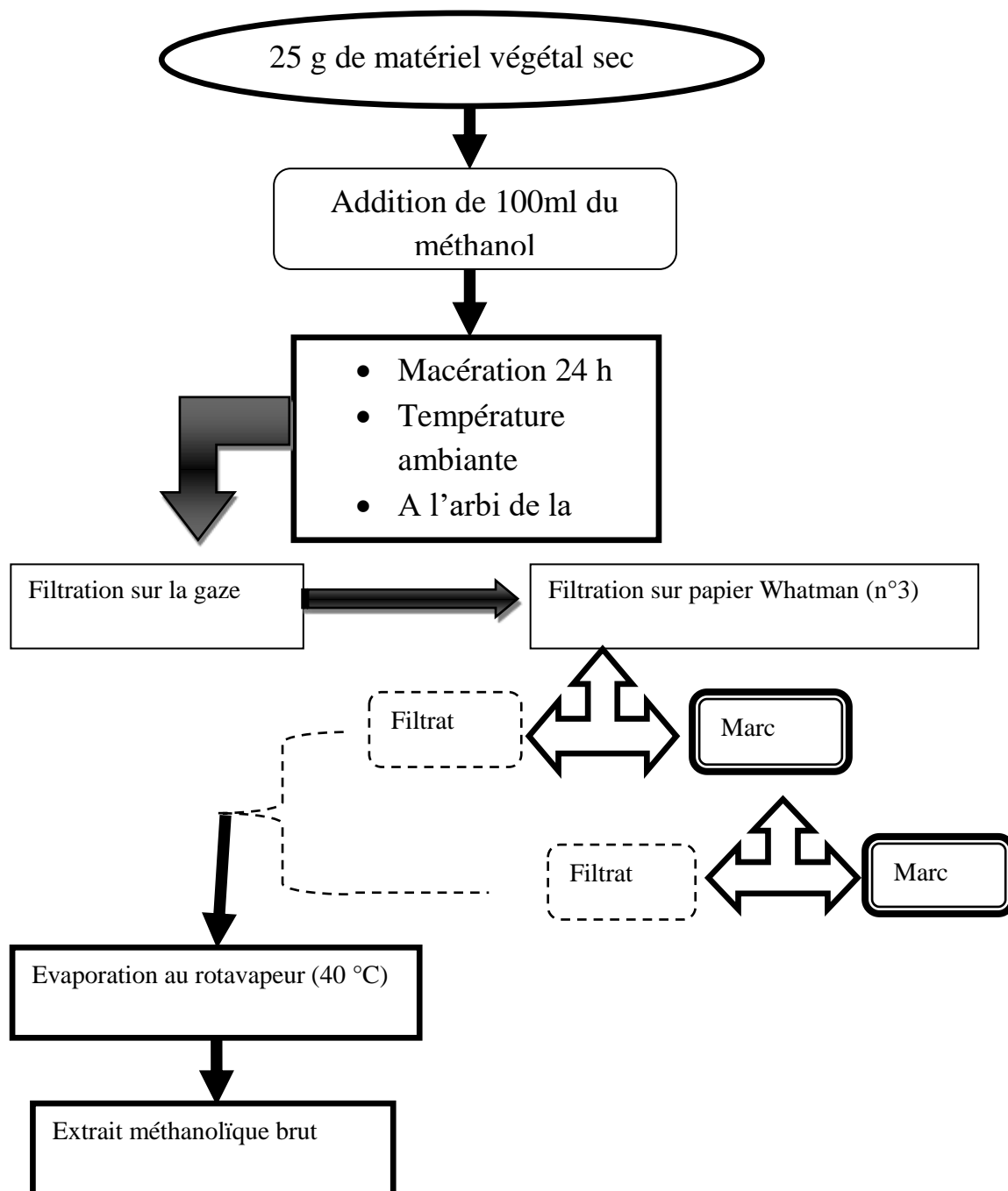


Figure 30 : Schéma d'extraction de *Ruta montana* ; extrait méthanolique de la partie aérienne par macération (Belhattab et al., 2004)

5. Screening phytochimique

5.1. Préparation des extraits

a) Préparation de l'infusé de 5% et de 10%

✓ L'infusé de 5% ;

Dans un ballon contenant 5 g de poudre végétale on verse 100 ml d'eau distillé bouilli. Après 5 min en faire la filtration avec papier wattman. Ce filtrat est conservé dans un flacon opaque à l'abri de la lumière dans le réfrigérateur.

✓ L'infusé de 10% ;

Dans un ballon contenant 5g de poudre végétale on verse 50 ml d'eau distillé bouilli. Après 5 min en faire la filtration avec papier wattman. Ce filtrat est conservé dans un flacon opaque à l'abri de la lumière dans le réfrigérateur

b) Préparation de la décoction de 1% et de 10%

La méthode d'extraction employée est la décoction à :

✓ **Décocté de 10%** : 100 g de drogue végétale broyée ont été trempés dans un litre d'eau distillée.

✓ **Décocté de 1 %** : 10 g de drogue végétale broyée ont été trempés dans un 0.1 litre d'eau distillée.

Le mélange, recouvert de papier aluminium a été agité mécaniquement puis porté dans un bain marie à 90°C pendant 1 heure. Après refroidissement, un filtrat a été récupéré dans un flacon opaque hermétiquement fermé à l'aide d'un filtre de papier de Wattman.

5.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes ont été mis en évidence par la réaction à la cyanidine. A l'infusé à 5% (5ml), ont été ajoutés un acide (5ml de H₂SO₄ à 10%) puis une base (5ml de NH₄OH). Si la coloration s'accroît par acidification, puis vire au bleu-violacée en milieu basique, cela confirme la présence d'anthocyanes.

5.3. Stérols et triterpènes (La réaction de Liebermann Buchard)

Introduire 10 ml de la solution à analyser dans un bécher, ajouter 5 ml d'anhydride acétique puis 5 ml de chloroforme. A l'aide d'une pipette ajouter 1 ml de H₂SO₄ concentré sur la paroi du bécher sans agiter. Laisser reposer 30 minutes. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et une coloration violette de la couche surnageant révèlent la présence de stérols et triterpènes.

5.4. Tanins

La présence des tanins a été mise en évidence par la réaction au chlorure de fer (III) dans l'infusion à 5% par l'addition de quelques gouttes de chlorure ferrique (FeCl₃) 1%. La réaction au FeCl₃ provoque l'apparition de précipité ou de coloration verdâtre ou bleu-noirâtre.

- *Mise en évidence des tanins galliques par la réaction de Stiasny*

Trente millilitres d'infusé ont été ajoutés à 15ml de réactif de Stiasny (10ml de formol 40% et 5ml d' HCl concentré), le mélange a été maintenu au bain-marie à 90° C pendant 15min environ. Après filtration, le filtrat a été saturé par 5g d'acétate de sodium pulvérisée. Ensuite, 1ml goutte à goutte d'une solution de FeCl₃ 1% a été ajouté. La présence des tanins galliques a été montrée par l'obtention d'un précipité (**Harborne, 2005**)

5.5. Saponosides

Les saponines ont été mises en évidence par le test de mousse dans les décoctés à 1%. 100ml de ce décocté ont été répartis dans 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10 successivement 1, 2,...10ml. Le volume de chaque tube a été ajusté à 10 ml avec de l'eau distillée puis agité pendant 15 secondes dans le sens de la longueur. Après un repos de 15 minutes, la hauteur de la mousse a été mesurée. Un indice supérieur à 100 a été considéré comme une réaction positive témoignant d'une richesse de la plante en saponosides (**Harborne, 2005**). Le tube dans lequel la hauteur de la mousse est de l'ordre d'un cm permet de calculer l'indice de mousse.

$$\text{Indice de mousse (Idm)} = 10 / n \times 10^{-2}$$

Où : **n** : numéro du tube dans lequel la hauteur de la mousse est égale à 1cm.

5.6. Coumarines

La recherche des coumarines a été basée sur la propriété que possèdent la plupart d'entre elles, de présenter une fluorescence nette aux rayons ultraviolets. Cinq millilitres (5ml) d'extrait étheré obtenu après une macération de 24 heures ont été évaporés à l'air libre, puis repris avec 2ml d'eau chaude. La solution a été partagée entre 2 tubes à essai. La présence de coumarines s'est manifestée après ajout dans l'un des tubes de 0,5ml de NH_4OH à 25% et observation de la fluorescence sous UV à 366nm. Une fluorescence intense dans le tube où il a été ajouté de l'ammoniaque indique la présence de coumarines, l'autre tube sert de témoin (**Raman, 2006**).

5.7. Anthocyanes

À deux millilitres d'infusé (5%) ont été additionnés à 2ml d'acide chlorhydrique 2N. La présence d'anthocyanes a été montrée par l'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu-violacée par addition d'ammoniac (**Senhaji et al., 2005**).

5.8. Proanthocyanidols

Deux millilitres d'infusé ont été additionnés à 2ml d'acide chlorhydrique concentré. Ensuite, le mélange a été maintenu au bain-marie bouillant pendant cinq minutes. Une réaction positive s'est manifestée par l'apparition d'une coloration rouge (**Senhaji et al., 2005**).

5.9. Quinones

Les quinones ont été mises en évidence par la réaction de entre l'extrait et le NaOH de 1%. En introduire dans une tube à essais 2ml de l'extrait avec des quelques gouttes de NaOH 1% a été ajoutée. La présence des quinones a été indiquée par la coloration de la solution qui est jaune vers le rouge ou le violet.

5.10. Mucilages

Après avoir introduit 1ml de décocté (10%) dans un tube à essai, 5ml d'éthanol absolu ont été ajouté, suivi d'une agitation. Le mélange a été reposé pendant une dizaine de minutes et la présence de mucilage dans la drogue a été indiquée par l'obtention de précipité floconneux (**Amadou, 2005**).

5.11. Composés réducteurs

Les sucres réducteurs ont été mis en évidence dans les décoctés par le réactif de Fehling . Après avoir introduit 5ml de décocté dans un bécher de 100ml, la solution a été évaporée à sec au bain-marie. Au résidu, a été ajouté 1ml de réactif de Fehling (0,5ml de réactif A et 0,5ml de réactif B, mélange extemporané). La présence de composés réducteurs a été révélée par l'obtention d'un précipité rouge-brique (**Mogode debete, 2005**).

5.12. Stupéfiants

0,5g de poudre ont été pesés et introduit dans un tube à essai. Ensuite, 5ml d'éther de pétrole ont été ajoutés. Le mélange a subi une agitation pendant 15min. Après décantation de la phase éthéro-pétrolique dans une capsule et évaporation à sec au bain-marie, 3 à 4 gouttes de KOH 5% ont été ajoutés dans l'alcool. La présence de tétrahydrocannabinols a été indiquée par une coloration violette (**Diallo, 2005**).

5.13. Protéines

Les protéines ont été mises en évidence par la méthode de Lowry. A 1ml d'extrait végétal, 5ml de solution A (98ml de Na_2CO_3 à 2% dans NaOH 0,1N, 1ml de sulfate de cuivre à 1% et 1ml de tartrate double de potassium sodium) ont été additionnés. Après avoir agité et laissé au repos pendant 10 minutes, 0,5ml de réactif de Folin ont été ajoutés. Ensuite, le mélange a été agité énergiquement puis laissé reposer pendant 30 minutes. La présence de protéines a été indiquée par l'apparition d'une coloration bleue (**Kone, 1998**).

5.14. Hétérosides cardiotonique

La solution à analyser a été obtenue par addition à 1g de poudre, 10ml d'alcool 60° et 5ml d'une solution d'acétate de plomb neutre à 10%. Cette solution a été portée au bain-marie bouillant pendant 10 minutes puis filtrée sur coton. Le filtrat a été agité avec 10ml de chloroforme (CHCl_3) sans former d'émulsion (mettre dans une ampoule à décanter). Après une décantation, la phase chloroformique a été soutirée (à l'aide d'une pipette) et partagée entre 3 tubes à essai. Evaporés au bain-marie à sec, les résidus ont été repris avec 0,4ml d'iso-propanol. Dans le tube 1, un millilitre de réactif de Baljet, dans le tube 2, un millilitre de réactif de Kedde et dans le tube 3, un millilitre de réactif de Raymond-Marthoud ont été introduits. Quatre gouttes de potasse (KOH 5%) dans l'éthanol ont été ajoutées à chaque tube et observé après

une dizaine de minutes. En présence de cardénolides, les colorations suivantes se développent : tube 1 : orangée, tube 2 : rouge violacé, tube 3 : violet fugace (**Diallo, 2005**).

Après 10 minutes, le rougissement du papier Picrosodé a été traduit par la présence d'hétéroside cyanogénique ; la couleur rouge est due à l'acide cyanhydrique (**Diallo, 2005**).

5.15. Dérivés anthracéniques

A) *Mise en évidence des anthraquinones libres par le test de Bornsträger*

A 1 gramme de poudre, 10ml de chloroforme ont été ajoutés. Le mélange a été chauffé pendant 3mn au bain-marie puis filtré à chaud et complété à 10ml. Ensuite, à 1ml de l'extrait chloroformique obtenu, 1ml de NH₄OH dilué a été additionné et agité. La présence d'anthraquinones libres a été indiquée par la coloration plus ou moins rouge.

B) *Mise en évidence des anthraquinones combinées*

B.1. Les O-hétérosides

A partir du résidu de la drogue épuisée par le chloroforme, un hydrolysate a été préparé auquel a été ajouté 10ml d'eau et 1ml d'HCl concentré. Dans un tube à essai, l'ensemble a été ensuite maintenu au bain-marie bouillant pendant 15min. 5ml de l'hydrolysate ont été agités avec 5ml de chloroforme. Après décantation, la phase organique a été soutirée et mise dans un tube à essai. Celle-ci a été agitée avec 1ml de NH₄OH dilué au demi. La présence d'anthraquinone a été révélée par la coloration rouge plus ou moins intense qui indique la présence de génines O-hétérosides. Si la réaction est négative ou faiblement positive, la recherche des O-hétérosides à génine réduite est nécessaire.

B.2. Les O- Hétérosides à génines réduites

Dans un tube à essai, 5ml d'hydrolysate et 3 à 4 gouttes de FeCl₃ (chlorure ferrique) à 10% ont été introduits. Le tout a été porté au bain-marie bouillant pendant 5 minutes puis refroidi sous courant d'eau. Après agitation de la solution avec 5ml de chloroforme, la phase chloroformique a été soutirée et introduite dans un tube à essai contenant 1ml de NH₄OH dilué au demi. Ensuite, le mélange a été agité. En présence de produit d'oxydation anthranol, anthrone, la coloration rouge sera plus intense que précédemment.

B.3. Les C-hétérosides

La phase aqueuse, qui a été conservée au cours de la caractérisation des O-hétérosides, a été reprise par 10ml d'eau distillée et 1ml de FeCl₃ 10%. Puis, le tube à essai a été maintenu dans un bain-marie bouillant (après ébullition) pendant 30 min. Après refroidissement sous courant d'eau, la solution a été agitée avec 5ml de chloroforme. La phase chloroformique soutirée a été secouée avec 1ml de NH₄OH dilué. L'existence des C-hétérosides est confirmée par la coloration plus ou moins rouge après agitation qui indique la présence de génines C-hétérosides (Diallo, 2005).

5.16. Alcaloïdes

Les alcaloïdes ont été mis en évidence grâce aux réactifs généraux de caractérisation des alcaloïdes. Le réactif de Dragendorff (réactif à l'iodobismuthate de potassium) et le réactif de Mayer (réactif à l'iodomercurate de potassium) ont été utilisés. Une Solution à analyser a été préparée avec 10g de poudre végétale séchée et 50ml de H₂SO₄ 10%. Après agitation, le mélange a été macéré pendant 24 heures à la température du laboratoire puis filtré sur papier filtre et rincé à l'eau distillée de manière à obtenir 50ml de filtrat. Ensuite, une caractérisation par précipitation a été effectuée. Dans trois tubes à essai, 1ml de filtrat a été introduit et 5 gouttes de réactif de Mayer dans le premier tube, 5 gouttes de réactif de Dragendorff dans le second et en se servant d'un troisième tube sans réactif comme témoin. Après 15 minutes, la présence des alcaloïdes a été indiquée par la formation d'un précipité : blanc-jaunâtre dans le premier tube, orange dans le deuxième tube et orange abondant dans le tube témoin (Harborne, 2005).

6. Dosage des composés phénoliques et les flavonoïdes et les tanins

6.1. Détermination des composés phénoliques totaux (CPT)

5.1.1 Mode opératoire

Brièvement, 1ml (0,1%) de l'extrait aqueux a été mélangé avec 1ml de Folin Ciocalteu (2M) dilué 10 fois. Après 5 minutes d'incubation, 800 µl de carbonate de sodium à concentration de 75g/l ont été additionnés. Un étalon a été réalisé avec des concentrations croissantes d'acide gallique (standard) allant de 0 à 200 µg/l. Après une heure d'incubation, à la température ambiante, l'absorbance a été lue à 765nm contre le blanc, à l'aide d'un spectrophotomètre de type JENWAY 6517.(Annexe 01)

Le dosage de l'échantillon (extrait sec) est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en replacent le standard avec l'extrait aqueux de 0.4% (Annexe 2)

- Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif. Elle entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleu e qui absorbe à 725 nm. (Clémentine et al., 2012.).
- La teneur en polyphénols totaux a été exprimée en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme du poids d'extrait (mg EAG / gE).

6.2. Détermination des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes totaux a été effectué selon la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) (Djeridane et al., 2006)

Un volume de 0,5ml d' $AlCl_3$ (2%) (Annexe 03) a été mélangé à un volume égal d'extrait. Les densités optiques ont été lues à 430nm après 10 minutes d'incubation à l'aide du spectrophotomètre, contre un courbe étalon préalablement tracée avec la quercétine comme substance de référence. Les expressions des résultats ont été obtenues à partir de l'équivalence du standard (quercétine 0.4%) par gramme de l'extrait sec (mg EQ/g).

- Pour plus des détails de la préparation de la courbe d'étalonnage des flavonoïdes voir l'Annexe 04.
- Le dosage de l'échantillon (extrait sec) est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en replacent le standard avec l'extrait aqueux de 0.4%.

6.3. Détermination des tanins totaux

- ✓ 500 μ l de l'échantillon à concentration de 1 mg/ml pour l'extrait
- ✓ 3 ml de vanilline 4%(dissous dans le méthanol), et 1,5 ml d'acide chlorhydrique(HCL) à37% sont ajoutés successivement.
- ✓ Agitation vigoureuse à l'aide d'un vortex.
- ✓ Le mélange obtenu est laissé réagir à l'obscurité pendant 15 min
- ✓ Trois essais ont été effectués pour chaque échantillon
- ✓ L'absorbance est mesurée à 500 nm contre un blanc (500 μ l éthanol +3 ml méthanol +1,5 HCL)

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la Catéchine (25-300 μ g/ml) comme standard. (3mg/10ml)

- Les détails de préparation de la courbe d'étalonnage des tanins condensé sont mentionnés dans l'Annexe 6.

✓ **Principe :**

Ce test est basé sur la condensation des composés polyphénoliques avec la vanilline en milieu acide. Il est spécifique des flavanes-3-ols (price et coll., 1978) (fig.31)

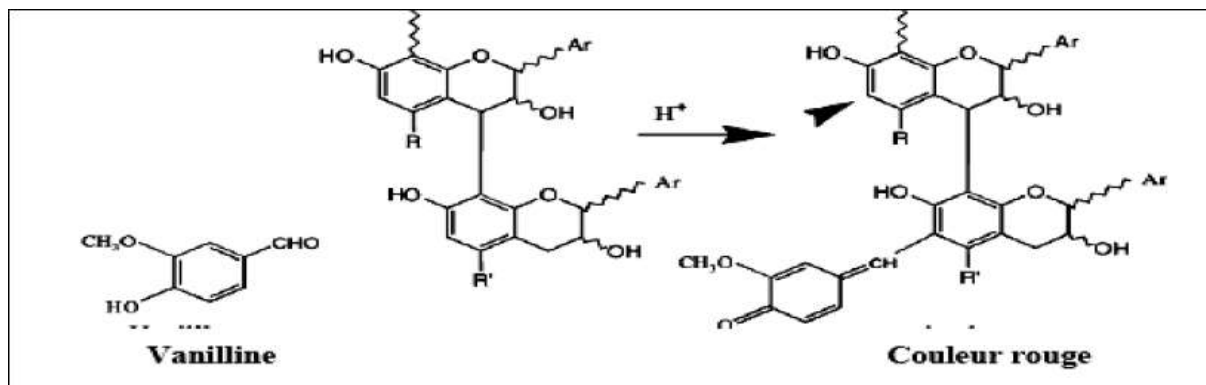


Figure 31 : Réaction entre la vanilline et les tanins condensés (Schofield et al., 2001)

7. Activité antioxydante

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydant peut être évaluée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la potentialité antioxydant de l'échantillon à tester (Sanchez-moreno, 2002). C'est pourquoi notre choix s'est porté sur l'utilisation d'un test chimique : test de piégeage des différents radicaux, le 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (**test de DPPH**).

7.1. Activité scavenger de radical DPPH'

7.1.1. Test du piégeage des radicaux DPPH

Le 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) est défini comme radical libre stable par vertu de la délocalisation de l'électron disponible qui provoque la couleur violette profonde, caractérisée par une absorption. Il réagit avec les groupements amines, les phénols, les acides, les composés hydro-aromatiques, etc... Cette propriété est largement recommandée et utilisée dans la pratique analytique. Quand la solution de DPPH est mélangée à une substance qui peut donner un atome d'hydrogène ou un électron, provoquera sa réduction (1,1-diphényl-2-(2,4,6-trinitrophenyl) hydrazine (DPPH₂) avec la perte de la couleur violette et apparition d'une

couleur jaune pâle résiduelle due à la présence de groupement picryl (Molyneux, 2004). La mise en évidence du pouvoir antioxydant, via le test DPPH, a été effectuée par la méthode décrite par Zakaria *et al.*, (2008), où 50µl de chacun des extraits méthanoliques ou aqueuse à différentes concentrations ont été mélangées avec 5ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,004%). Après une période d'incubation de 30 minutes à la température de laboratoire, l'absorbance a été lue à 517nm. Comme précédemment, l'inhibition du radical libre DPPH par l'acide ascorbique a été analysée. La capacité antioxydante des extraits a été exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH selon la formule suivante:

$$\% \text{Inhibition} = [(A \text{ blanc} - A \text{ échantillon}) / A \text{ blanc}] \times 100$$

Où : A blanc : Absorbance du blanc (absorbance de la solution en absence de molécules testées). A échantillon : Absorbance de la solution en présence de molécules testées.

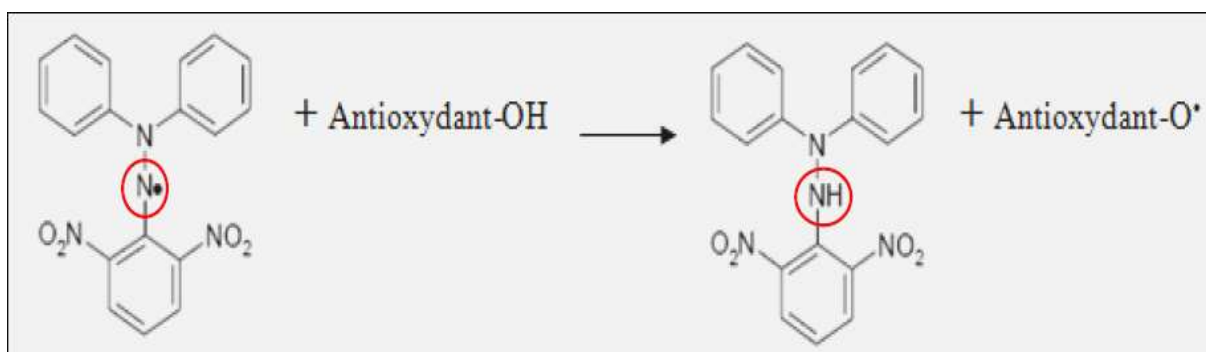


Figure 32 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH• (Michel, 2011)

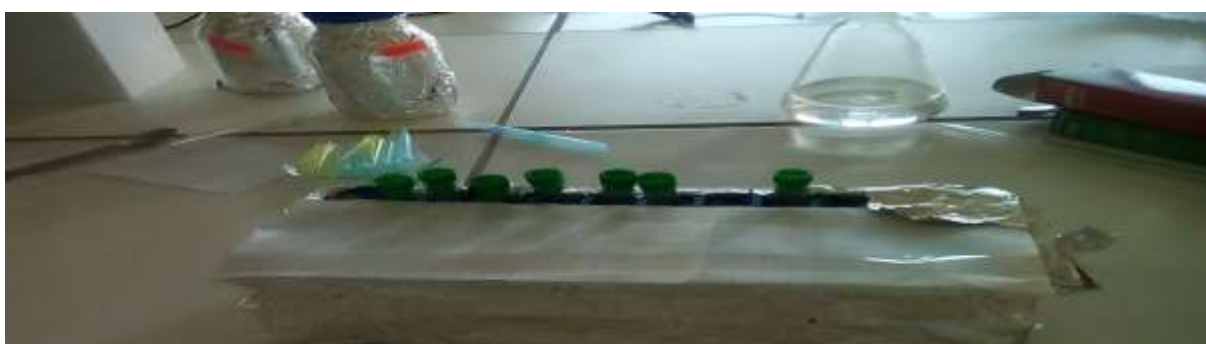


Figure 33 : préparation des solutions mère de différentes concentrations de l'acide ascorbique

7.2. Dosage de l'échantillon

L'activité antioxydante dans l'échantillon est déterminée par le même protocole et dans les mêmes conditions que l'acide ascorbique.

8. Calcul des IC50 et de l'activité antiradicalaire (Scavenging activity)

L'IC50 ou la concentration inhibitrice de 50 % est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH. Les IC50 sont calculées graphiquement par les régressions logarithmiques des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations de chacun des extraits testés (Scherer *et al.*, 2009).

parti III

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

I. Résultats et discussions

1. Phytochimie de *Ruta montana*

1.1. Taux d'humidité (la teneur en eau) et matière sèche

La teneur en matière sèche déterminée sur les différentes parties morphologiques aériennes prélevées est de 24% du produit brut. Le taux d'humidité de *Ruta montana* est de 69 % (fig ;35) . Comme la plupart des végétaux, notre plante est riche en eau.

La plante est dans un stade de début de floraison et ce qui explique la richesse en eau.

Taux d'humidité de *Ruta montana* %= 69.047%

M_f : poids de la matière fraîche = 21 g.

M_s : poids de la matière sèche = 6.5 g.

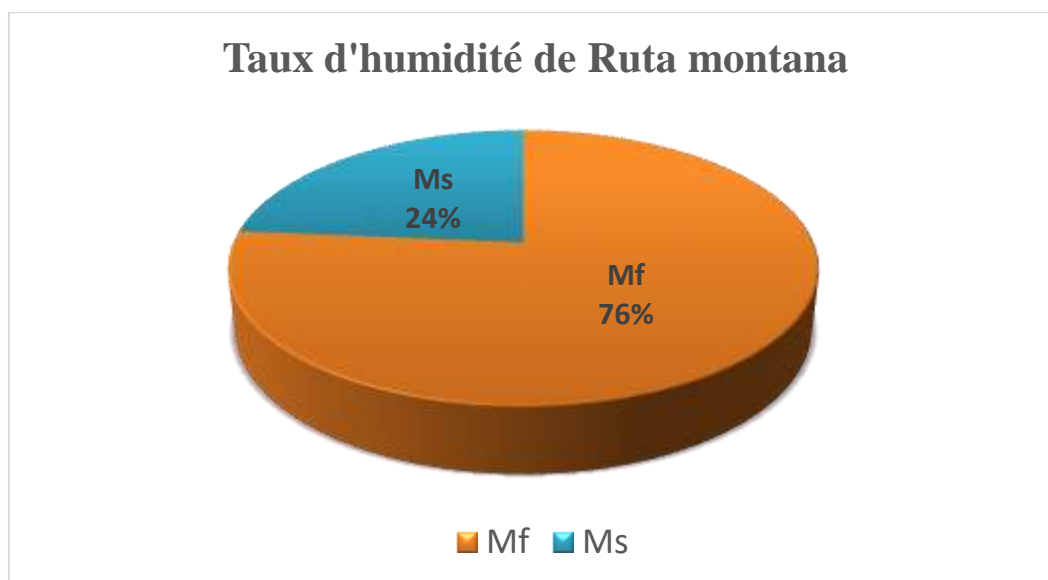


Figure 35 : résultats de taux d'humidité de *Ruta montana*. Région de Mostaganem

1.2. Groupes chimiques caractérisés

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 nous avons réalisé les tests phytochimiques sur la plante « *Ruta montana* » (partie aérienne), 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.

Ainsi :

- Une réaction franchement positive est représentée par : +++
- Une réaction moyennement positive est représentée par : ++
- Une réaction faiblement positive est représentée par : +
- L'absence de la substance est représenté par : -

Dans le **tableau n°3** : les Dérivés anthracéniques combinés sont symbolisés par :

- O : pour les O-hétérosides
- C : pour les C- hétérosides
- G : pour les O- hétérosides à génines réduites

2. L'analyse qualitative (les tests phytochimiques)

La plante étudiée est riche en métabolites secondaires, ayant présentée la plupart et la grande proportion des éléments chimiques. Pour la recherche des coumarines , alcaloïdes ,protéines ,les terpènes ,les hétérosides- c ,les réactions ont été franchement positive et pour la recherche des tanins catichique et gallique ,les composées réducteurs, pronthocianidols ,les réaction ont été faiblement positive et par ailleurs les tests de recherche des tanins complet ,les stupéfiant les hétérosides-o ,les hétérosides-G, les flavonoïdes ,les réactions ont été faiblement positive .par contre ,les tests de recherches des quinones et les anthocyanes étaient absents dans la plante. Sur l'ensemble des résultats obtenus, nous remarquons que la plante étudiée est très riche en métabolites secondaires. Les tests phytochimiques réalisés nous ont permis d'avoir une idée générale sur la composition chimique de la plante étudiée.

Tableau 03 : Résultats des tests phytochimiques de *Ruta montana*

Type de teste phytochimique	Les résultats
Flavonoïde	++
Tanins	
Tanins compte	++
Catéchique	+
Gallique	+
Les hétérosides	
G	++
C	+++
O	++
Les quinones	-
Stupéfiant	++
Les terpènes	+++
Les stérols	+++
Les composés réducteurs	+
Les alcaloïdes	+++
Les coumarines	+++
Les protéines	+++
	+++ (n ; 10) IM= 100
Les saponosides	
Les anthocyanes	-
Les pronthocyanidols	+

Il est à noter que les résultats des tanins galliques et catéchiques concordent avec les résultats de **Attou en 2010** dans la région d'Ain Témouchent .

Nos résultats sont de même ordre que les résultats de **Benkhadda en 2016** qui a trouvé l'absence des anthocyanes, et les quinones dans la plante de *Ruta montana*.

Les familles chimiques détectées dans notre étude viennent confirmer les travaux de **Hnatyszyn et al en 1974 ; Mohr et al en 1982 ; Ulubelen et Terem en 1988** et aussi **Mansour El-said et al en 1990** sur la même plante, de provenance d'Espagne, Égypte, Turquie et d'Arabie saoudite respectivement.

Des screenings phytochimiques ont mis en évidence la présence de coumarines: cholepénine, cholepine, rutamarin, bergapten, isopimpinellin et xanthotoxine (**Ulubelen et Terem, 1988**), augustifoline, scoparone et la 6,7,8-triméthoxy-coumarine (**Del castillo et al, 1984**), et d'alcaloïdes : kocusaginine, skimmianine , arborinine, γ -fagarine, graveoline, 3'-hydroxygraveoline (**Ulubelen et al , 1986**), taifine, isotaifine and 8-méthoxytaifine (**Mohr et al, 1982**) en plus du choloridone (**Ulubelen et Terem, 1988**).

3. Analyse quantitative

3.1. Composés phénoliques totaux

Les polyphénols sont des molécules bioactives très recherchées car ils sont réputés pour leurs excellentes propriétés biologiques (antioxydantes, antimicrobiennes, etc...). La détermination de la teneur en polyphénols totaux des différents extraits a été réalisée selon la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

Les résultats obtenus sont exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g).

La mesure de l'absorbance d'une solution d'acide gallique, pris comme standard, à différentes concentrations, nous a permis de tracer une courbe d'étalonnage.



Figure 36 : les résultats observatoires des différentes concentrations de l'acide gallique.

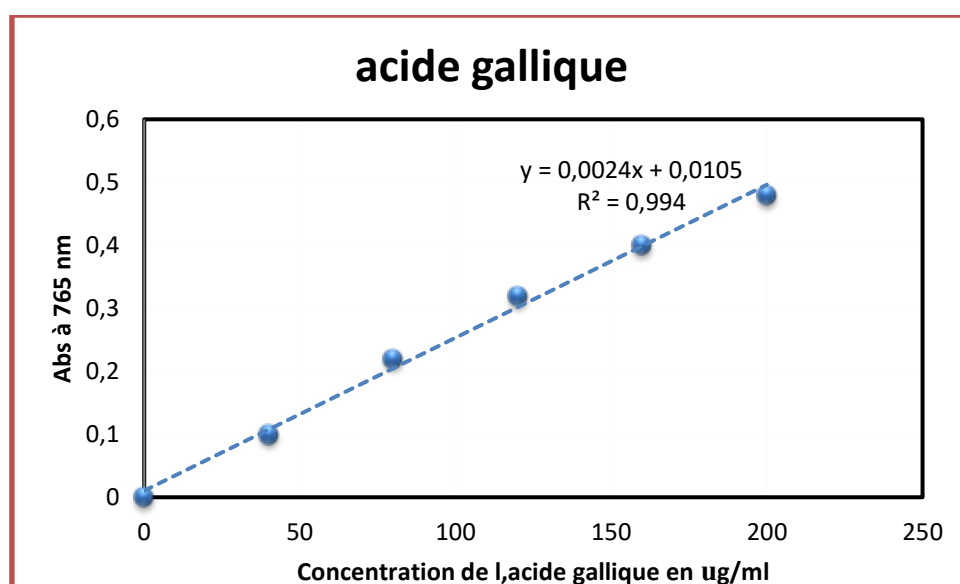


Figure 37 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Les quantités des phénols totaux dans l'extrait sec ont été rapportées en milligramme d'équivalents de l'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS). Les teneurs des polyphénols totaux a été déterminé selon l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage ; $Y = 0.0024x + 0.0105$ avec $R = 0.994$, (CPT de *Ruta muntana* = 250 mg EAG/g MS). La (fig ;38) exprime la coloration bleue qui confirme la présence des composés phénoliques dans notre extrait.

Tableaux 04 : les résultats de dosage quantitatif du *Ruta montana*


<i>Ruta montana</i>		Type d'analyse	CPT	FLVT	TN.C
			(mgEAG/gMS)	(mgEQ/gE)	(mgEC/gE)
		Les teneurs	250	52	0.8



Figure 38 : la coloration des composés phénoliques dans un notre extrait de *Ruta montana*

Les composés phénoliques constituent le groupe principal qui contribue à l'activité antioxydantes des végétaux, fruits, céréales et d'autres matériels à base de plantes (**Tachakittirungrod et al ; 2007**). Ces composés possèdent aussi diverses activités biologiques, telles que les activités anti-inflammatoire, antibactérienne, antivirale, antiallergique, antithrombotique et vasodilatatrice qui peuvent être reliées à leur activité antioxydante (**Gulcin et al ; 2010**).

- D'après les résultats, on peut constater que la plante étudiée « *Ruta muntana* » est riches en polyphénols. Ce résultat concorde avec les recherches de **Benkhadda en 2016** qui ont été menées sur la même plante, qui a trouvé une quantité importante des polyphénols dans les feuilles de *Ruta montana* (CPT *feuilles* = 156 mg EAG/g MS) .

3.2. Teneur des flavonoïdes

Les résultats enregistrés lors du dosage des flavonoïdes à partir de la partie aérienne de l'échantillon de *Ruta montana*. Sont représentés dans l'*Annexe 5*.

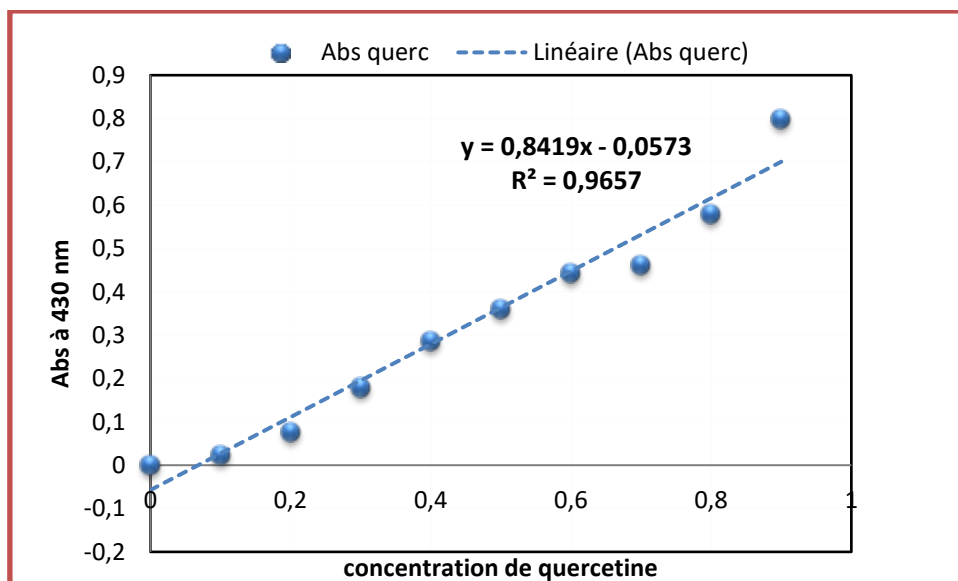


Figure 39 : Courbe d'étalonnage de Quercetine

La teneur en flavonoïdes de la plante est révélée plus importante de 52 mg EQ/g. Ces résultats confirment ceux qui sont rapportés par les tests phytochimiques dans le (tab ;2)

Notre résultat est proche et identique que le résultat de **Merghem en 2015** dans la région de Sétif ; qui a été trouvé de 50.86 mg QE/g

En effet, la composition chimique des extraits est affectée par le climat, les températures maximales et minimales, les périodes (estivale ou hivernale), la durée d'ensoleillement et le pic des radiations solaires, la pluviométrie, l'altitude, la nature du sol et son pH (**Boukhatem et al ; 2010**).

3.3. Teneur des tanins condensés dans l'extrait brut aqueux

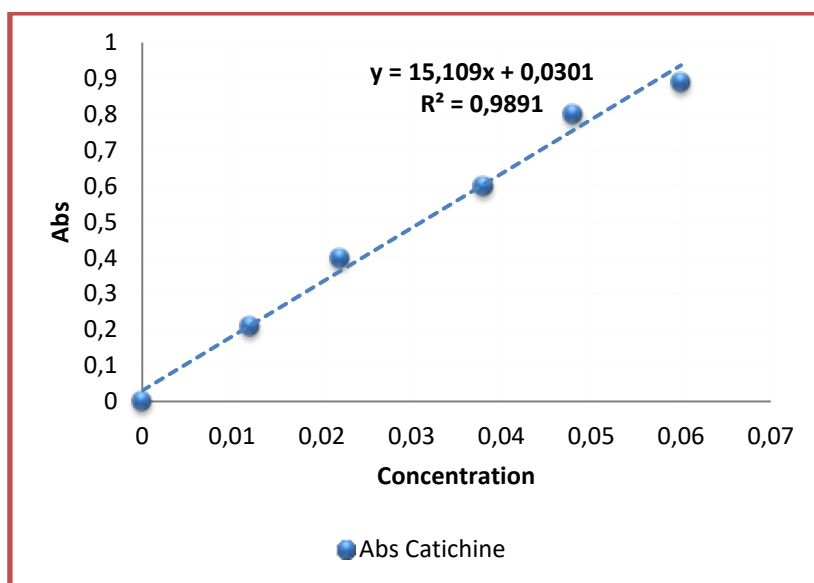


Figure 40 : Courbe d'étalonnage de catéchine

Les résultats montrent que la quantité des tanins dans notre extrait aqueux est très faible 0.8 mg EC/g de MS par rapport le résultat de **Merghem en 2015** dans la région de Sétif ; qui a trouvé une quantité de 3.36 mg EC/g. Et ensuite ces résultats sont concorde avec les résultats de **Benkhadda en 2016** sur la même espèce.

4. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits de plantes

Pour mieux comprendre L'activité de notre espèce végétale, nous nous sommes intéressés aux propriétés antioxydantes de leurs extraits méthanoliques et aqueux, il est fortement recommandé d'utiliser le teste DPPH pour l'évaluation de la capacité antioxydante de *Ruta montana*.

a) Test de piégeage du radical libre DPPH

L'activité antioxydante des extraits méthanoliques et aqueux de *Ruta montana* et de l'antioxydant standard (acide ascorbique) *vis-à-vis* du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 515nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances antiradicalaires (**Majhenic L, kerget M.S et al ; 2007**). Les résultats du pouvoir antioxydant

des extraits testés montrent que le pourcentage d'inhibition des extraits aqueux et méthanolique de *Ruta montana* est supérieur à 90% à des concentrations de l'ordre de 1,64 et 1.66 mg/ml respectivement pour les extraits aqueux et les extraits méthanoliques (Fig.30a, 30b).

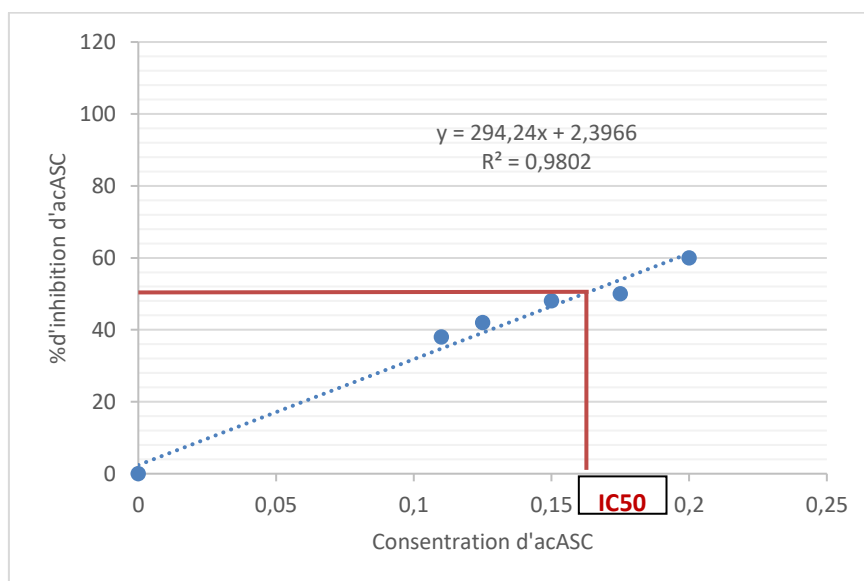


Figure 42 : % d'inhibition du DPPH en fonction de différentes Concentrations de l'acide ascorbique

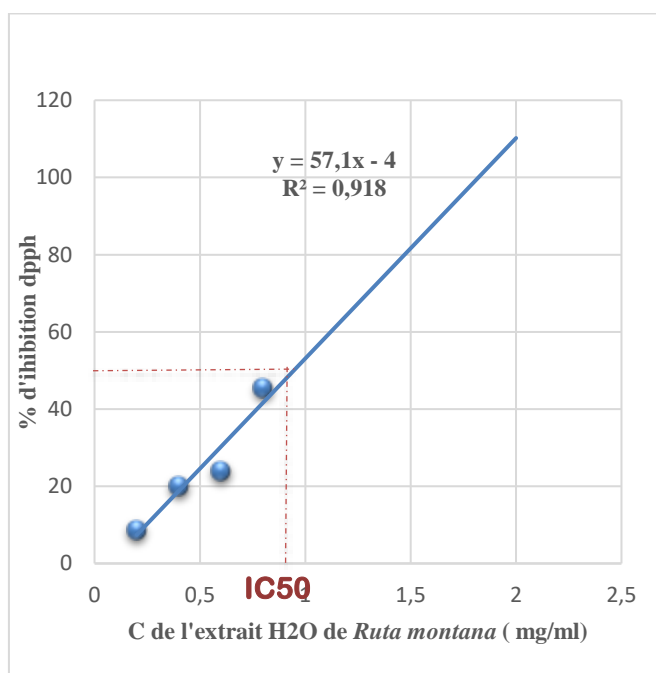


Figure 43a : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait aqueux

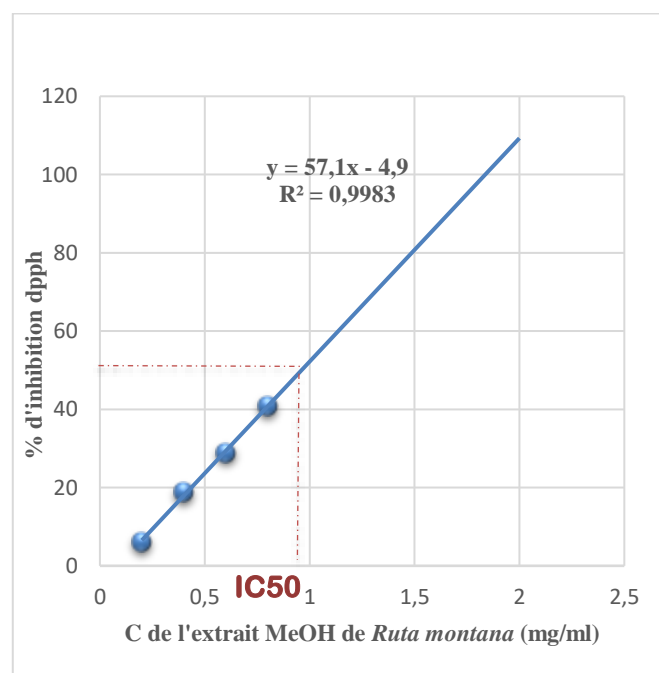


Figure 44b : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait méthanolique.

4.1. 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 (Prakash et al, 2007).

- Nous avons calculé les IC50 pour chaque extrait à partir de l'équation de la courbe tracée, les valeurs sont représentées dans *le tableau N° 5*

Tableau 5 : le pouvoir antioxydant (exprimé par IC50 (en mg /ml)) des antioxydants de référence et des extraits testés.

EXTRAIT /STANDARD	IC50 (EN MG /ML)
ACIDE ASCORBIQUE	0.16±0.01
EXTRAITS AQUEUX	0.945±0.15
EXTRAIT METHANOLIQUE	0.961±0.09

Selon les résultats enregistrés, les extraits aqueux et méthanolique sont dotés d'un pouvoir antioxydant modéré, leurs IC50 respectivement sont de 0.945 et 0.961 mg/ml, sont comparés au standard utilisé dans notre étude celle d'acide ascorbique dont la valeur est de l'ordre de 0,16 mg/ml. Il a été démontré que l'extrait aqueux (EA) et l'extrait méthanolique (EM) de *Ruta montana* possédant presque la même capacité antioxydante. Les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, tocophérol, flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène (Depooter et Schamp ; 1986) les polyphénols contenus dans les extraits de *R. montana* sont probablement responsables de l'activité antioxydante de ces extraits. Cela est en accord avec les travaux menés sur les extraits de *R. montana*. A travers la recherche bibliographique, de très grandes différences de points de vue sont notées à propos de cette corrélation. Certains travaux ont montré une bonne corrélation entre les IC50 et la teneur en polyphénols et en flavonoïdes,

Nous avons comparé ces résultats avec des autres recherches telles que le travail de Merghem en 2015 sur la même espèce de *Ruta montana* dans la région de wilaya de

Sétif qui a assuré le grand potentiel antioxydante élevé de l'extrait aqueux par rapport l'extrait méthanolique. Aussi avec le travail de **Benkhadda en 2016**, qui a été effectuée dans la wilaya de Constantine (la zone de sidi amour d'Elkharoub) sur la même espèce.

Alors que, à partir de l'ensemble des résultats obtenue ; nous avons trouvé des capacités antioxydantes modérés de la plante « *Ruta montana* ». L'efficacité de l'antioxydant (AH) augmente si la force de la liaison A-H est faible et le radical (A) résultant doit être le plus stable possible, ce qui est le cas pour les composé phénoliques et flavonoïdes, ce sont des meilleurs donateurs d'électron ou d'hydrogène (**Shahidi et Naczk ; 2004**), chélateurs des ions métalliques (**Pratt et Hudson, 1990 ; Ladaniya, 2008**).

Plusieurs études ont montrés que les groupements hydroxyles dans les composés phénoliques et flavonoïdes sont responsables de leurs pouvoirs antioxydants (**Heignen 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 (**Shahidi et Naczk, 2004**).

En général, les activités de nos extraits sont moyennes, ce qui est comparé par l'étude de **Djeridane et al., 2006** où il a trouvé que l'activité d'extrait phénolique de *Ruta sp* est moins importante par rapport aux autres plantes étudiées en même temps, malgré que le contenu en composés phénoliques est important, cela est due généralement à la synergie entre les différents composés antioxydants existants, ce qui rend l'activité non seulement concentration-dépendante.

Selon l'étude de **Ratheesh et al., 2010** sur une espèce proche, *Ruta graveolens* révèle aussi une activité antioxydante remarquable, en plus de l'activité anti-inflammatoire et prévention contre les maladies cardiaques chez des rats obèses.

Conclusion

La médecine traditionnelle est basée essentiellement sur l'utilisation des plantes médicinales qui occupent une place importante dans cette approche. Jusqu'à Aujourd'hui, les plantes médicinales sont utilisées dans la médecine. La médecine moderne a pour objectif de développer les médicaments, parfois ces médicaments sont de base des plantes médicinales. Dans le cadre de savoir l'intérêt pharmacologique de ces plantes médicinales et l'évaluation de leurs activités, nous avons choisi d'étudier une plante qui est *Ruta montana*.

Ruta montana est une plante à effet thérapeutique, des feuilles aux fleurs à tige, prometteuse pour l'activité antioxydante, qui lui confèrent toutes les propriétés pharmacologiques qui date de l'ère Hippocratique. A cette époque déjà elle était utilisée comme abortif, emménagogue et contre des maladies pulmonaires, soit par administration interne par tremper de la plante dans le vin, le miel ou ses dérivés, soit par voie externe. Ce qui est le plus utilisé actuellement, à cause de sa toxicité.

Le screening phytochimique réalisé, a révélé la richesse de notre plante en métabolites secondaires, où nous avons constaté la présence des flavonoïdes, des tanins, des stérols, des terpènes, des coumarines, des alcaloïdes et saponosides.

Les résultats du dosage des composés phénoliques totaux, à partir des deux extraits obtenus, ont clairement montré que l'extrait méthanolique de *Ruta*, possède une teneur élevée en ces composés.

L'analyse quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes de l'extrait méthanolique de *Ruta montana*. Nous a permis de donner les teneurs des polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés par l'ordre suivante ; de 250 mg EAG/g MS, 52 mg EQ/g de MS, 0.8 mg EC/g de MS .

Le pouvoir antioxydant des extraits aqueux et méthanolique sont moyens à faibles en général par rapport l'IC50 de l'acide ascorbique. Ces résultats sont confirmés par la méthode de piégeage du radical libre DPPH.

L'ensemble des tests ont montré que le pouvoir antioxydant est proportionnel à l'augmentation de la concentration de l'extrait. Cette étude confirme scientifiquement l'usage traditionnel de cette plante et révèle son intérêt dans le cadre d'une exploitation industrielle pharmaceutique.

Nous pensons montrer à travers ce travail que les plantes constituent un réservoir très intéressant pour la recherche dans le futur.

La conclusion de cette étude nous permet de dégager un certains nombres de perspectives faisant suite à ce travail. Ainsi, nous envisageons :

-Isoler et identifier les composés phénoliques et flavonoïdiques dans les différents extraits.

-Evaluer la toxicité chronique et aigue des extraits et des huiles essentielles sur différentes lignées cellulaires *in vitro* et sur des modèles utilisant les animaux afin de déterminer les doses thérapeutiques et les doses létales car les remèdes traditionnels souffrent beaucoup du problème de dosages ;

Isoler et identifier des composés d'autres groupes chimiques,

Rechercher l'activité antivirale,

Rechercher l'activité antiinflammatoire,

Rechercher l'activité antidiabétique,

Rechercher l'activité antihypertensive,

Effectuer des tests de conservation de produits agroalimentaires,

Développer un système de culture à titre conservatif de certaines plantes.

Références

bibliographiques

Références bibliographiques

- **Amadou, D. (2005).** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* willd. (Myrtaceae). Thèse, Pharmacie, Université de Bamako (Mali). 99 pp.
- **Ait My (2006).** Plantes médicinales de Kabylie. Ed. Ibispress. Paris. 293pp.
- **Atkin MA., Gasper A & Ullegaddi R. (2005).** Oxidative susceptibility of unfractionated serum or plasma : response to antioxidants in vitro and to antioxidants supplementation. *Clinical Chemistry*, 51 :2138-2144.
- **Amarti, F., Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Arab, L., El Ajjouri, M. & Chaouch, A. (2010).** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Dest.) Benth. Du Maroc. *Biotechnol. Agron. Environ.*, 14(1) : 141 - 148.
- **Bruneton J. (2005).** Plantes toxiques dangereux pour l'homme et les animaux. 3^{ème} édition. Ed. TEC DOC Lavoisier. Paris 505p
- **Baba Aissa F. (1991).** Les plantes médicinales en Algérie, Ed. Addiwane, Alger, 184p .
- **Babar Ali M., Hahn E.J., Paek K.Y. (2007).** Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules*. 12: 607-621
- **Bahorun.T,1997.** Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne .une source d'approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research council Mauritias, p83-94
- **Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., Pinkas, M., Luycky, M., and Gazin, M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Drug Research*, 1-6.
- **Bagchi K & Puri S. Free radicals and antioxidants in health and disease. (1998).** *EasternMediterranean Health Journal*, 4 : 350-360
- **Boubekri C. (2014).** Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanummelongena* par des techniques électrochimiques. thèse de Doctorat en sciences. Université d'El-Oued .
- **Bouhadjra K. (2011).** Etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge. thèse pour l'obtention du diplôme de magister, Université Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou.
- **Baudin B. (2006).** Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *MT Cardio*. 2(1):43- 52.

Références bibliographiques

- **Baba Iassa F. (1999)**. Encyclopédie des Plantes Utiles : Flore d'Algérie et du Maghreb. Ed: LIBRAIRIE MODERNE – ROUIBA. P: 243 – 244.
- **Baba IASSA F. ; 1999** ; moderne –Rouïba ; p : 243 - 244.
- **Boukhatem M.N., Hamaidi M.S., Saidi F., Hakim Y.**, Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). Revue « Nature et Technologie », 2010, Vol.3 ; pp. 37-45
- **Bhat S.V., Nagasampigi B.A. et Sivakumar M.; 2005**; Chemistry of Natural Products; Ed 1: NAROSA, SPRINGER; p: 115-252
- **Bonnier G.; 1999**; La Grande Flore en Couleur; Ed : BELIN; Tome 3; p:205 – 206
- **Diallo, A. 2005**. Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd (MYRTACEAE). Thèse de Doctorat en Pharmacie. Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie- de Bamako, Mali.
- **Djeridan.A; Yousfi.M; Nedjmi.D; Boutassouna.D; Stoker.P; Vidal.N, 2006**. Antioxidant activity of some medical plants extracts containing phenolic compounds foods chemistry; 97; 654-660.
- **Del castillo J.B., Rodriguez I.f. et Secundino M.; 1984**; Angustifolin: a coumarin from *Ruta angustifolia*; Phytochemistry 23 (9); Ed: PERGAMON PRESS, Great Britain; p: 2095-2096.
- **Doerper S.; 2008** ; Modification de la synthèse des furo-Coumarines chez *Ruta graveolens* L. par une approche de génie métabolique ; Thèse de Nancy – Université, INRA ; p : 12 – 34
- **Duke A.J., Duke P.A.K. et Duce J.I. ; 2008** ; DUKE'S HANDBOOK of Medicinal Plants of the Bible, Ed: CRC PRESS; p: 394 – 397
- **Duval J. (1992)**. La culture de la rue. AGRO-BIO. 3: 6-45.
- **Dewick p.m.; 2002**; Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach; Ed 2: JOHN WILEY & SONS; p: 291- 398
- **Dupont f; Guignard J.L. (2007)**. Abrèges : botanique systématique moléculaire. 14e Ed : Elsevier Masson, France. P: 155; 188-189.
- **Devasagayam TPA., Bloor KK & Ramsarma T. (2003)**. Methods for estimating lipid peroxidation: Analysis of merits and demerits (minireview). Indian Journal Biochemistry and Biophysics, 40:300-308.
- **Delattre J., Beaudoux J L & Bonnefont R D. (2005)**. Radicaux libres et stress

Références bibliographiques

bxydant: aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier edition TEC & DOC éditions medicales internationales, Paris. P : 1, 87,108, 405.

- **El Gharras H. (2009)**. Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12): 2512-2518.
 - **Eberhard T. Robert A. et Annelise L. (2005)**. Plantes aromatiques: épices, aromates, condiment et leurs huiles essentielles. Ed. Tee & Doc, Paris, 521p
 - **Favier A. (2003)**. Inter& conceptual et experimental dans la comprehension des mecanismes des maladies et potentiel therapeutique. *L'actualité Chimique*, 108 - 115.
 - **Favier A. (2006)**. Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales de Biologie Clinique*, 64(6) : 390-396.
 - **Gülçin i. et al; 2010**; Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid, Arabian.
 - **Gausсен H. Ozenda P. Leroy J.F. (1982)**. Précis de botanique, végétaux supérieurs. TomeII. Ed. Masson, Paris. P: 600.
 - **Guo L., Xie M Y., Yan AP., Wan Y Q & Wu Y M. (2006)**. Simultaneous determination of five synthetic antioxidants in edible vegetable oil by GC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386(6): 1881-1887.
 - **Halliwell B. (1997)**. Antioxidants and human diseases: a general introduction. *NutritionJornal*, 55: 44-52.
 - **Halliwell B & Aruoma OI. (1993)**. DNA and Free Radicals. Boca Raton Press.
 - **Halliwell B & Gutteridge JMC. (1984)**. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals, and disease. *Biochemistry Jornal*, 219: 1-4.
 - **Halliwell B & Gutteridge J M C. (1989)**. Free radicals in biology and medicine. 2nd edition, Clarendon Press.
 - **Hagerman, A. E. (2002)**. "Hydrolyzable tannin structural chemistry." Tannin Handbook ([http://www. users. muohio. edu/hagermae/-tannin. pdf](http://www.users.muohio.edu/hagermae/-tannin.pdf)).
- Référence bibliographiques
- **Harborne, J.B. 2005**. Phytochemical methods. New Delhi: Springer Pvt. Ltd. India, p17. .Clémentine.B ; Mathieu.S ; Elena,V ; Ilonka,S, 2012. Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachishypogaea L.*), *Revue de Génie Industriel*.p 37.
 - **Herbette S., Roeckel-Drevet P & Drevet J R. (2007)**.Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *FEBS Journal*, 274 :2163-2180.

Références bibliographiques

- **Hesse m.; 2002**; Alkaloids: nature's curse of blessing ; Ed: WILEY-VCH; p: 1-12
- **Harborne J.B.; 1998**; Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis; Ed 3: CHAPMAN & HALL; p: 202-209
- **Heijnen C.G.M., Haenen G.R.M.M., Vekemans J.A.J.M. et Bast A.; 2001**; Peroxynitrite scavenging of flavonoids: structure activity relationship; Environ. Toxicol. Pharmacol 10; p: 199-206.
- **Hnatyszyn O., Arenas P., Moreno A.R., Rondina, R. et Coussio J.D.; 1974**; Plantas reguladoras de la fecundidad segun la medicina folklórica; Revista de la Sociedad Científica 14; p: 37.
- **Judd W.S., Cambeil C.S., Kellogg E.A. et Stevens P. (2002)**. Botanique systématique une perspective phylogénétique 1^{er} édition. Ed De Boeck, Paris. p: 540
- **Khadhri A., El mokni R Smiti S. (2013)**. Composés phénoliques et activités antioxydantes de deux extraits de chardon à glu: *Atractylis gummifera*. Revue Social Science National, 39 : 44-52.
- **Krishna D., Chaluvadi M., Raj N. and Sripal R.** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. Indian Journal of Pharmacology, 2001; 33: 2-16.
- **Ladaniya M.; 2008**; Citrus Fruit: biology, technology and evaluation; Ed 1: ACADEMICPRESS, ELSEVIER; p: 157-165
- **Lugasi, A ; Hovari, J ; Sagi, K.V ; et Biro, L.** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. Acta. Biologica Szegedensis 2003, 1-4: 119-125
- **Mansour el said S. et al; 1990**; Studies on *Ruta chalepensis*, an ancient medicinal herb still used in traditional medicine; Journal of Ethnopharmacology 28; Ed: ELSEVIER SCIENTIFIC; p: 305-3012.
- **Mohr N. et al; 1982**; Further Alkaloids from *Ruta chalepensis*; Phytochemistry 21 (7); PERGAMON PRESS, Great Britain; p: 1838-1839
- **Mates J M., Perez-Gomez C De Castro I N. (1999)**. Antioxidant enzymes and human diseases. Clinical Biochemistry. 32 : 595–603.
- **Molyneux, P. (2004)**. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarim J .Sci .Technol, 26, 211 – 219.
- **Makkar H.P.S., Siddhuraju P. et Becker K.; 2007**; Plant Secondary Metabolites, Methods in Molecular Biology 393; Ed: HUMANA PRESS; p: 67-111

Références bibliographiques

- **Pelletier E., Campbell P G C & Denizeau F. (2004).** Écotoxicologie moléculaire : Principes fondamentaux et perspectives de développement. Edition PUQ. P : 182.
- **Pham-Huy LA., He H & Pham-Huy C. (2008).** Free radicals, antioxidants in disease and health, International Journal of Biomedical Science, 4: 89-96.
- **Pelletier E., Campbell P G C Denizeau F. (2004).** Écotoxicologie moléculaire : Principes fondamentaux et perspectives de développement. Edition PUQ. P : 182
- **Prakash D., Upadhyay J., Brahma N. et Singh H.B.; 2007;** Singh antioxidant and free radical scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean; Food Chemistry 104; p: 783-790.
- **Pratt D.E. et Hudson B.J.F.; 1990;** Natural antioxidants not exploited commercially in Food Antioxidants; Ed: ELSEVIER APPLIED SCIENCE, London; p: 171–192
- **Ratheesh M., Shyni J.I., Sindhu J. et Helen A.; 2010;** Inhibitory effect of *Ruta graveolens* L. on oxidative damage, inflammation and aortic pathology in hypercholesteromic rats; Experimental and Toxicologic Pathology 7; p: 1-6
- **Roberts m. f. et Wink m.; 1998;** alkaloids: Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications; Ed: PLENUM PRESS; p: 1- 6.
- **Saad A., Virella G & Chassereau Ch. (2006).** OxLDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by MonoMac 6 cells and human macrophages. The Journal Of Lipid Research, 47: 1975-1983
- **Sen S., Chakraborty R., De B & Mazumder J. (2009)** Plants and phytochemicals for pepticulcer: an overview, Pharmacognosy Reviews, 3 : 270-279.
- **Sanchez-Moreno C & Larrauri J A. (1998).** Main methods used in lipid oxidation determination. Food Science and Technologie International, 4: 391-399.
- **Sanchez-moreno C. (2002).** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. International Journal of Food Science and Technology 8. P: 121-137.
- **Shahidi F. et Naczk M.; 2004;** Extraction and analysis of phenolics in food; Journal of Chromatography A 1054; Ed: ELSEVIER; p: 95-111.
- **Sahraoui M ; 2015 ;** Laboratoire de Pharmacognosie ; les hétérosides ; UN1901 ; P :3- 7.
- **Shahidi F. (1997).** Natural Antioxidants: chemistry, health effects and applications. Ed: AOCS MISSION STATEMENT. P: 174-197
- **Tsao R. (2010).** Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. Guelph FoodResearch Centre, Agriculture et Agri-Food Canada. Nutriment, 2: 1231-1246.

Références bibliographiques

- **Uri N.;** 1961; Mechanism of antioxidation; Ed: SCIENCE p: 133-169.
- **Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin MTD., Mazur M & Telser J. (2007).**
Freeradicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease,
TheInternational Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39 :44-84
- **Vertuani S., Angusti A & Manfredini S. (2004).** The Antioxidants and ProAntioxidants
Network: An Overview. Current Pharmaceutical. Design. 10:1677-1694
- **Wiert, C. (2006).** Medicinal Plants of the Asia – Pacific: Drugs for the future; Ed:
WORLD SCIENTIFIC, p: 401 - 416.
- **Xiang KIE. Y., Dianxiang Z., Hartley T.G. et Mabberley D.J. (2004).** Rutaceae.
Bot. Garden South China. Vol. 11: 51-9

| Annexes

Annexe 01 : préparation de courbe d'étalonnage d'acide gallique

Le réactif N°tube	1	2	3	4	5	6
Folin Ciocalteu	1	1	1	1	1	1
Acide gallique(μg)	0	40	80	120	160	200
V(eau D)ml	1	1	1	1	1	1
Na ₂ Co ₃ (7.5%)	800	800	800	800	800	800
<ul style="list-style-type: none"> • Incubation pendant 1 h à température ambiante et à l'abri de la lumière • Absorbance à 765 nm 						

Annexe 02 : préparation de solution aqueuse 0.4% ;

Pousser 0.4 g de l'extrait aqueuse + 100 ml d'eau distillé





Annexe 03 : préparation de solution d'AlCl₃ (2%) ; 2 g de AlCl₃ + 100 ml d'eau distillé**Annexe 04** : préparation de la courbe d'étalonnage des flavonoïdes

N° tube	1	2	3	4	5	6
S M , A	0	0.40	0.80	1.20	1.60	2
V (ED), B	2	1.60	1.20	0.80	0.40	0
Incubation 20 min						
Solution AB	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
V(AlCl ₃) ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
lecteur à 430 nm						

Annexe 06 : préparation de la courbe d'étalonnage des tanins condensé

N° Tube	1	2	3	4	5	6
V(SM) ml	0	0.012	0.022	0.038	0.048	0.06
V(ED) ml	0.06	0.048	0.038	0.022	0.012	0
Lecture à 517 nm						

Annexe 07 : les résultats des tests phytochimiques :

<i>Le teste</i>	<i>Les résultats sous forme des photos</i>
<i>Les tanins</i>	
<i>Les tanins galliques</i>	
<i>Les stérols</i>	
<i>Les pronthocyanidoles</i>	



Les terpènes



Les composés réducteurs



Les flavonoïdes



Les saponosides



Les protéines



*Les O. Hétérosides à
génies réduits*





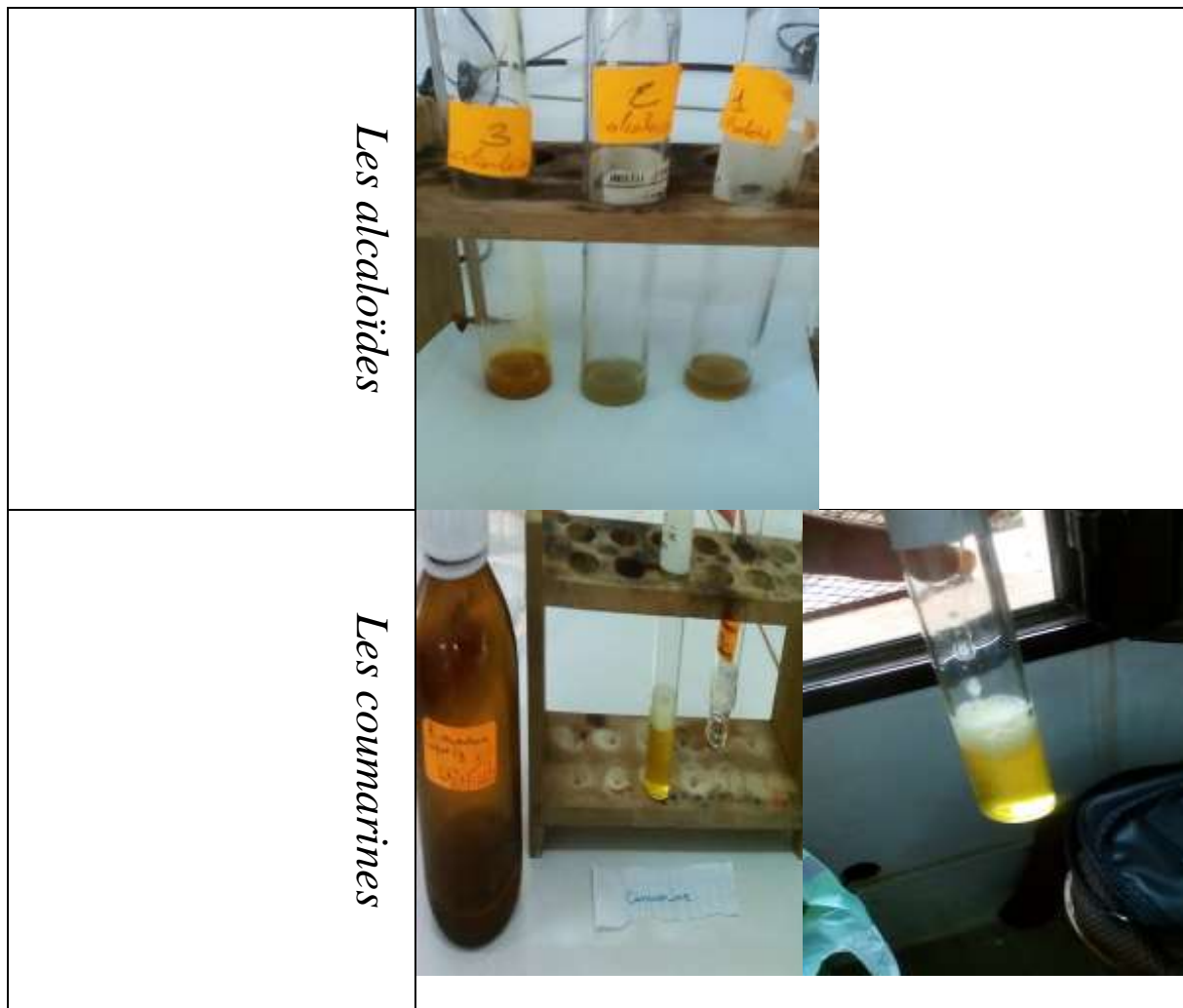
Les C. hétérosides



*Les dérivés
anthracéniques*



Mucilage



Annexe 08 : toutes les informations nécessaires pour préparation de courbe d'étalonnage d'acide ascorbique et % d'inhibition de DPPH

- *Préparation des solutions :*
 - S.Aq**= 100 ml ED + 1g d'extrait
 - S.Méth**=100 ml méth + 1 g d'extrait
 - Dpph**= 250 ml méth + 0.01 Dpph
 - Acide ascorbique**= 0.1g + 100 ml méth

- Préparation des solutions filles de 5 ml

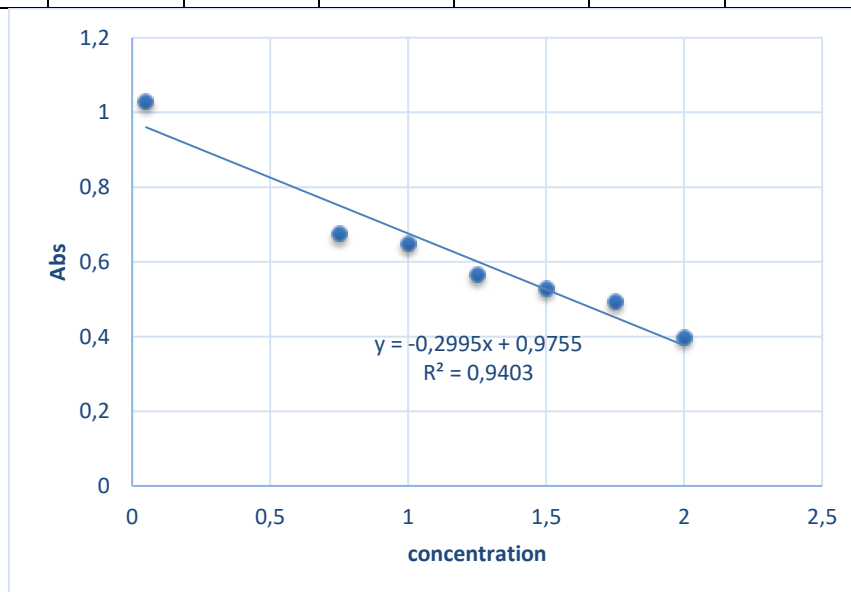
N° tube	S F	S M	Méthanol
1	0.050	0.5	4.5
2	0.075	0.75	4.25
3	0.100	1	4
4	0.125	1.25	3.75
5	0.150	1.5	3.5
6	0.175	1.75	3.25
7	0.200	2	3

1. DPPH

N° tube	S F (ul)	DPPH (ml)
1	50	50
2	50	50
3	50	50
4	50	50
5	50	50
6	50	50
Incubation pnd 30 min		
Lecteur à 517 nm		
Le blanc ; méthanol		

2. Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique

N°tube/ R	1	2	3	4	5	6	7
R1	0.742	0.699	0.651	0.596	0.543	0.511	0.431
R2	0.784	0.662	0.695	0.551	0.514	0.469	0.401
R3	1.575	0.665	0.602	0.552	0.535	0.500	0.367
MOYENNE DES ABSORBANCES							
Abs	1.03	0.675	0.649	0.566	0.530	0.493	0.399



Courbe d'étalonnage de d'acide ascorbique

1. Dosage de l'échantillon (extrait aqueuse, méthanolique)

1.1. Préparation des SF

SF	SM 0.01% (extrait ; aqueuse/méthanolique)	Eau / méthanol
0.2%	1 ml	4ml
0.4%	2ml	3ml
0.6%	3ml	2ml
0.8%	4ml	1ml
Solution de 5 ml		

1.2. Dosage SA (aqueuse)

N° tube	SA (ul)	DPPH (ml)	R1	R2	R3	RT	% inh
1	50	5	0.914	0.916	0.910	0.913	8.7
2	50	5	0.822	0.798	0.777	0.799	20.1
3	50	5	0.690	0.707	0.888	0.761	23.9
4	50	5	0.567	0.542	0.526	0.545	45.5

