



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

Université ABOUBEKR BELKAÏDE TLEMCEN



MEMOIRE

Présenté à :

FACULTE DES SCIENCES –DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

MASTER EN CHIMIE

Spécialité : Chimie des Produits Naturels

Par

OUAHAB Amani
BELAHCENE Farah

Sur le thème

Etude de l'effet Hémolytique de certains extraits naturels

Soutenu publiquement le 31 mai 2023 à Tlemcen devant le jury composé de :

Mme MELIANI Nawel	MCB	Université Tlemcen	Encadrante
Mr BENDAHOU Mourad	Professeur	Université Tlemcen	Président de jury
Mr BENS Aid Okkacha	Professeur	Université Tlemcen	Examineur

Remerciements

Tout d'abord louage à Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la volonté, la force et la patience d'accomplir ce modeste travail qui a été réalisé au sein du laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives LASNABIO de la faculté des sciences, Université de Tlemcen.

La première personne que nous tenons à remercier est notre encadrante Mme. « MELIANI Nawel » maitre de conférences au département de chimie de l'Université ABOUBEKR BELKAÏDE TLEMCEM, pour la disponibilité, l'orientation, la confiance, la patience, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer et sans elle ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Mr. « BENDAHOU Mourad », de nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury. Ma gratitude va également à Mr « BENSAID Okkacha », pour avoir aimablement accepté d'examiner notre travail et de participer à ce jury.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous les professeurs et enseignants du département de chimie qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.

Nous tenons aussi à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail, notamment le personnel du laboratoire LASNABIO plus particulièrement Mme. « MEHIAOUI Kheira ».

Dédicace

À mes plus grands soutiens et sources d'inspiration, je dédie ce travail avec tout mon amour et ma reconnaissance infinis.

À ma mère qui a toujours été mon port d'attachement et ma boussole, merci pour ton amour inconditionnel, ton dévouement et ton soutien inébranlable. Tu as été la lumière qui a éclairé mon chemin dans les moments sombres et tu as toujours cru en moi, même lorsque je doutais.

À mon père qui m'a appris l'importance du travail acharné, de la persévérance et de l'honnêteté, je suis reconnaissante pour tes conseils avisés et ton soutien sans faille. Tu m'as inspiré à viser plus haut et à poursuivre mes rêves. Je te suis infiniment reconnaissante pour ton soutien indéfectible, ta confiance en moi et ton amour.

À mon frère Adel ainsi qu'à mes sœurs adorées Amel et Amira qui sont aussi mes meilleures amies, merci pour votre soutien constant, votre humour contagieux et votre présence réconfortante. Vous êtes ma source de joie et de bonheur, et je suis fière de vous avoir dans ma vie.

À ma belle-sœur Tema qui est devenue une amie et une confidente, merci pour ta gentillesse, ton soutien et ton amour.

À mes nièces et neveux Malek, Lilia, Lina, Selma et Adem qui ont rempli ma vie de tant de bonheur et de joie.

À mes très chères amies Rofaïda, Imene, Lilia, Nessrine, Amel, Kenza et ma cousine Widad qui ont été mes piliers dans les moments difficiles et mes partenaires de fête dans les moments de joie, merci pour votre amitié sincère, votre soutien sans faille et votre amour inconditionnel.

Enfin, à mon binôme Farah qui est devenue une amie chère et une collaboratrice talentueuse, merci pour notre collaboration fructueuse et notre amitié. Tu as été une source d'inspiration et de motivation pour moi tout au long de ce parcours.

Au-delà des noms cités, il existe un cercle précieux de personnes qui ont joué un rôle significatif dans mon parcours. Je vous exprime ma reconnaissance pour votre présence et votre soutien qui ont marqué positivement ma vie.

Amani

Dédicace

Chère Maman, même si tu n'es plus parmi nous physiquement, ton amour et ton souvenir restent gravés dans mon cœur pour toujours. Tu as été une mère incroyable, toujours là pour moi, me guidant et m'inspirant. Je suis reconnaissante pour chaque moment précieux que nous avons partagé, et je sais que tu veilles sur moi de là-haut.

Papa, tu as été un pilier dans ma vie et je te suis reconnaissante pour tout ce que tu as fait pour moi. Ta présence et ton soutien inconditionnel m'ont donné la force de persévérer dans les moments difficiles. Je te chéris profondément et je suis reconnaissante de t'avoir comme père.

À mes grands-parents votre amour et vos sages conseils ont façonné la personne que je suis aujourd'hui. Votre héritage d'amour, de gentillesse et de sagesse restera à jamais dans nos cœurs.

Ma tante Rafika, tu as toujours été là pour moi, comme une deuxième maman. Ton amour, ta douceur et ton soutien inconditionnel ont été des cadeaux précieux dans ma vie. Je suis reconnaissante de t'avoir comme tante, et je te remercie d'avoir toujours été là pour moi.

À ma sœur Fatima Zohra et mes frères Issam, Wassim et Ihab, vous êtes ma famille, mes meilleurs amis. Nos liens sont indestructibles et notre amour est inconditionnel. Nous avons traversé tant d'épreuves ensemble et nous sommes toujours restés unis.

À mes cousins Salah, Youssef, Abdelillah, Sanad, ainsi que mes tantes et mon oncle, vous êtes plus qu'une famille pour moi, vous êtes des amis proches et une partie importante de ma vie.

À mes amies, vous êtes des étoiles dans ma vie, apportant de la joie, du soutien et des moments inoubliables. Votre présence précieuse illumine mon existence et je suis reconnaissante de vous avoir à mes côtés.

Enfin, à ma binôme Amani, tu es bien plus qu'une amie, tu es ma confidente et ma complice. Nos aventures ensemble sont inoubliables et notre amitié est un cadeau précieux.

Farah

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Mécanisme de réduction du DPPH	06
Figure 02 : Hémolyse des globules rouges	08
Figure 03 : Description de la plante <i>R.alaternus</i> .	09
Figure 04 : Carte géographique de la répartition mondiale de <i>R. alaternus</i> au bassin méditerranéen	11
Figure 05 : La partie aérienne de <i>R. alaternus</i>	13
Figure 06 : Montage à reflux	14
Figure 07 : Protocole de préparation des extraits	16
Figure 08 : Montage d'hydrodistillation (type Clevenger)	17
Figure 09 : Réduction du radical DPPH	19
Figure 10 : Réduction du fer FRAP	20
Figure 11 : Spectrophotomètre U.V visible	21
Figure 12 : Protocole de l'activité hémolytique	23
Figure 13 : Les rendements des différents extraits de la plante	24
Figure 14 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'extrait brut aqueux de <i>R alaternus</i> sous reflux	27
Figure 15 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'extrait brut éthanolique et aqueux de <i>R. alaternus</i> sous reflux	28
Figure 16 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'extrait brut éthanolique de <i>R. alaternus</i> sous reflux	28
Figure 17 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'huile essentielle de <i>R. alaternus</i>	29
Figure 18 : Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'acide ascorbique	29
Figure 19 : Pouvoir réducteur des différents extrais par la méthode FRAP	31
Figure 20 : Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique par la méthode FRAP	31
Figure 21 : L'évolution de taux d'hémolyse (par absorbance) dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne <i>Rhamnus alaternus</i> L. durant 60 minutes	32
Figure 22 : L'évolution de taux d'hémolyse (par absorbance) dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extrait aqueux de la partie aérienne de <i>Rhamnus alaternus</i> L. durant 60 minutes	33

Figure 23 : L'évolution de taux d'hémolyse (par absorbance) dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations de l'huile essentielle de la partie aérienne de <i>Rhamnus alaternus</i> L. durant 60 minutes	33
Figure 24 : L'évolution de taux d'hémolyse (par absorbance) dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extrait éthanolique de la partie aérienne de <i>Rhamnus alaternus</i> L. durant 60 minutes	34
Figure 25 : L'évolution de taux d'hémolyse (par absorbance) dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations de l'acide gallique durant 60 minutes	34

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 : Les activités biologiques de quelques composés phénoliques	04
Tableau 02 : Quelques structures d'alcaloïdes et leurs usages thérapeutiques	05
Tableau 03 : Toxicités de quelques organes de végétaux	07
Tableau 04 : Les noms vernaculaires de <i>R. alaternus</i>	09
Tableau 05 : Composés bioactifs extraits de différentes parties de <i>R. alaternus</i> selon leur procédé d'extraction et leurs activités pharmacologiques	12
Tableau 06 : Les activités antioxydantes des extraits bruts par la méthode DPPH	12
Tableau 07 : Rendement des différents extraits bruts de la plante	24
Tableau 08 : Tests phytochimiques des trois extraits de la partie aérienne de <i>R. alaternus</i>	25
Tableau 09 : Rendement de l'huile essentielle de <i>R. alaternus</i>	26
Tableau 10 : Les Valeurs des IC50 et le pouvoir anti radicalaire (PAR) des différents extraits, de l'huile essentielle de <i>R.alaternus</i> et de l'acide ascorbique	30
Tableau 11 : Evaluation de taux d'hémolyse (%) des différents extraits et de l'huile essentielle de la partie aérienne de <i>R. alaternus</i> , après 60 min d'incubation	35

TABLE DES MATIERES

Introduction générale	01
CHAPITRE I: Synthèse bibliographique	03
1. Phytothérapie	03
2. Principes actifs des plantes médicinales « Métabolisme secondaire»	03
2.1. Les composés phénoliques	03
2.2. Les terpénoïdes	04
2.3. Les alcaloïdes	05
3. Huiles essentielles	05
4. Les activités biologiques	06
4.1. Activité antioxydante	06
5. Toxicité	07
6. Hémolyse	08
7. Description de la plantes étudiée « <i>Rhamnus alaternus L.</i> ».	08
7.1. Nomenclature	09
7.2. Taxonomie	10
7.3. Distribution géographique	10
7.4. Propriétés médicinales	11
7.5. Travaux antérieurs	11
CHAPITRE II : Partie expérimentale	13
1. Matériel et méthode	13
1.1. Origine géographique et période de récolte de la plante	13
1.2. Identification botanique	13
1.3. Préparation des échantillons	13
1.4. Méthodes d'extraction	13
1.4.1. Préparation des extraits sous reflux	13
1.4.2. Calcul des rendements en extraits bruts secs	14
1.5. Screening phytochimique	14
1.6. Extraction de l'huile essentielle	17
1.6.1. Calcul du rendement de l'huile essnetielle	17
1.7. Evaluation de l'activité antioxydante	18

1.7.1. Piégeage du radical libre	18
1.7.2. Réduction du fer	19
1.8. Activité hémolytique	21
CHAPITRE II : Résultats et discussion	24
Introduction	24
1. Rendement des extraits bruts	24
2. Test phytochimique	25
3. Rendement de l'huile essentielle	26
4. Etude du pouvoir anti-radicalaire	27
4.1. Piégeage du radical libre	27
4.2. Réduction du fer	30
4.3. Evaluation de l'effet hémolytique	32
Conclusion et perspectives	37
Références bibliographiques	39

LISTE DES ABREVIATIONS

Abs : Absorbance

DO : Densité optique

DPPH• : 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl

Fe²⁺ : Ions ferreux

FeCl₃ : Le chlorure ferrique

FRAP : Ferric Reducing-Antioxidant Power

HCl : Le chlorure d'hydrogène

HgCl₂ : Chlorure de mercure

HT : Hémolyse totale

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

I₂ : Diode

IC₅₀ : Concentration d'inhibition de 50%

K₂Fe (CN)₆ : Potassium ferricyanide

KI : Iodure de potassium

LASNABIO : Laboratoire de Substances Naturelles et Bioactives

NaCl : Chlorure de sodium

O₂ : Oxygène moléculaire

PI : Pourcentage d'inhibition

R : Rendement

R. alaternus : *Rhamnus alaternus* L.

RPM : Révolution par minute

T- : Témoin négatif

T+ : Témoin positif

TCA : temps de céphaline activée

UV : Ultraviolet

Liste des unités

% : Pourcentage

C° : Degré Celsius

G : Gramme

L : Litre

mg : Milligramme

mL : Millilitre

Min : Minute

Nm : Nanomètre

"La chimie, c'est la magie des éléments combinés : elle façonne notre monde et nous permet de rêver à des mondes encore inexplorés."

- Roald Hoffmann.

Introduction Générale

Pendant plusieurs siècles, les plantes ont été utilisées pour le soulagement des douleurs, la guérison des maux et des blessures, ainsi que pour certaines pathologies souvent mortelles. Nos ancêtres ont transmis leurs savoirs et expériences à plusieurs générations. Malgré le progrès de la pharmacologie, on a toujours eu recours à la médecine traditionnelle, et ce partout dans le monde et particulièrement en Algérie.

La chimie des végétaux remonte aux anciens temps. Son étude est toujours d'actualité, elle sert de base pour la découverte des variétés de molécules bioactives. La matière végétale contient un grand nombre de composés parmi lesquels nous citons les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes qui possèdent de nombreuses activités biologiques comme le pouvoir antioxydant utilisé dans l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique [1]. Cependant, malgré leurs effets thérapeutiques, les plantes médicinales doivent être utilisées avec prudence de par leur risque lié à la toxicité.

La richesse de la flore algérienne n'est plus à démontrer. Elle est représentée par des milliers de plantes médicinales et plus précisément au niveau de la wilaya de Tlemcen qui bénéficie d'une variété de climats favorisant l'apparition d'une flore riche et diversifiée qui mérite d'être explorée dans le domaine de la recherche des molécules thérapeutiques. Nos études ont ciblé une plante largement utilisée par nos grand-mères pour ses multiples bienfaits, notamment pour ses propriétés thérapeutiques contre l'hépatite, le diabète et les problèmes de goitre, ayant fait l'objet de nombreuses études à l'échelle internationale. C'est un organisme végétal spontané, facilement reconnaissable, poussant rapidement et dont la culture n'exige aucune compétence particulière. Il s'agit en effet du « *Rhamnus alaternus* L. ».

Actuellement, il existe peu de recherches qui se concentrent sur l'étude des extraits bruts et de l'huile essentielle de *Rhamnus alaternus*. Dans ce contexte, nous avons entrepris d'étudier quelques extraits issus de la partie aérienne de cette plante endémique en visant l'évaluation de leur activité antioxydante en utilisant les tests DPPH et FRAP.

Les plantes peuvent également avoir des effets toxiques, car toute substance biologiquement active peut produire des effets indésirables, voire nocifs, à fortes doses, à faibles doses ou pour une administration prolongée. La toxicité d'une substance pour l'organisme dépend de sa nature, de la dose et de la durée d'exposition. C'est la raison pour laquelle nous avons étudié aussi l'effet hémolytique in vitro de *Rhamnus alaternus* afin d'évaluer la cytotoxicité de cette plante médicinale algérienne vis-à-vis des globules rouges humains, Car, même si une plante possède des pouvoirs thérapeutiques puissants, son utilisation dans les préparations pharmacologiques sera impossible en présence de leur effet hémolytique.

Ces deux activités ont été réalisées dans le but de valoriser cette plante endémique.

Introduction Générale

Nous avons adopté le plan suivant pour la présentation de notre travail :

- Dans le premier chapitre, nous exposerons la recherche bibliographique que nous considérons essentielle pour la compréhension de notre travail. Nous débuterons par l'étude des métabolites secondaires. Ensuite, nous consacrerons une section à l'activité antioxydante, tandis que la dernière partie sera dédiée à la description du phénomène d'hémolyse, puis nous nous pencherons sur une présentation de la plante *R. alaternus*.
- Dans le deuxième chapitre, Matériels et méthodes, nous détaillerons les outils et les procédures employés pour bien mener les expérimentations.
- Dans le troisième chapitre, nous présenterons les résultats de notre étude expérimentale et entamerons leurs discussions. Nous conclurons ce chapitre par une exposition de perspectives de recherche qui pourraient être entreprises pour poursuivre et approfondir notre travail.

1. Phytothérapie

Le terme "phytothérapie" vient de deux racines grecques : "phyto" qui signifie "plante" et "thérapie" qui signifie "traitement". La phytothérapie est une forme de médecine qui utilise des plantes, appelées plantes médicinales, qui sont définies comme des "drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicinales". Une drogue végétale peut être une plante entière ou une partie de celle-ci, utilisée sous forme desséchée ou fraîche, ou sous forme d'extraits aqueux (tisanes, infusions, décoctions, macérations) ou d'extrait éthanoliques ou hydroalcooliques [2].

2. Principes actifs des plantes médicinales « Métabolisme secondaire »

La plupart des espèces végétales présentes dans le monde ont des propriétés thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui ont un effet direct sur le corps humain. Ces plantes sont utilisées à la fois en médecine conventionnelle et en phytothérapie. Les principes actifs des plantes médicinales sont les composés naturels présents dans la plante qui lui confèrent ses propriétés thérapeutiques. Bien qu'ils ne représentent qu'une infime partie du poids total de la plante, ils en sont l'élément clé. Les principes actifs se trouvent dans toutes les parties de la plante, mais sont inégalement répartis. Cependant, les principes actifs d'une même plante n'ont pas les mêmes propriétés [3]. Les plantes contiennent des métabolites primaires qui sont principalement impliqués dans le développement et la croissance de la plante, ainsi que des métabolites secondaires considérés comme des substances indirectement essentielles à la vie de la plante.

Cela comprend la protection contre les ravageurs et les pathogènes, la compétition plante-plante, la symbiose plante-microbe au niveau des nodules racinaires et l'attraction des pollinisateurs grâce à la couleur, l'odeur et le goût.

Les alcaloïdes, les terpénoïdes et les substances phénoliques sont les trois classes principales de métabolites secondaires retrouvés dans les plantes [4].

2.1. Les composés phénoliques

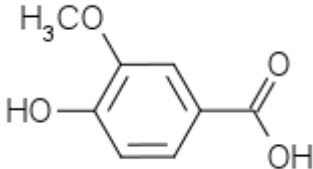
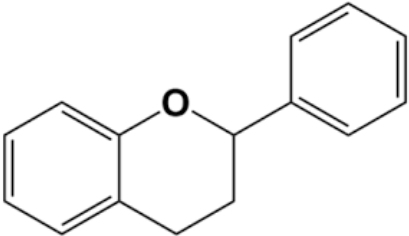
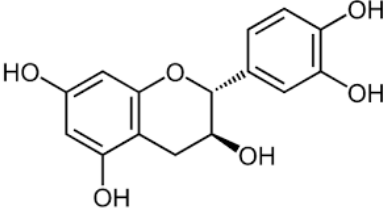
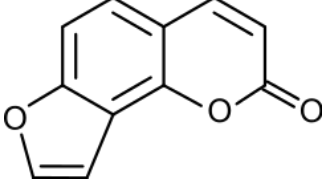
Les polyphénols ou composés phénoliques constitue une grande classe de produits chimiques qu'on retrouve dans les plantes au niveau des tissus superficielles. Ils sont des composés phytochimiques polyhydroxylés et comprennent au moins un noyau aromatique à 6 carbones. Ils sont subdivisés en sous classes principales : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les lignines, les tanins, etc. Comme ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes, elles ont un rôle principal dans la vie de celles-ci, dans la défense contre les facteurs pathogènes, principalement les moisissures et les bactéries phytopathogènes. Elles protègent également contre les UV, puisque tous les composés phénoliques absorbent les rayonnements solaires [1].

Ainsi, quelques composés phénoliques sont la source de plusieurs activités biologiques comme

CHAPITRE I : synthèse bibliographique

indiqué dans le tableau ci-dessous.

Tableau 01 : Les activités biologiques de quelques composés phénoliques [7].

Composés phénoliques	Structure	Activité biologique
Acides phénoliques		Antibactériens Antifongiques Antioxydants
Flavonoïdes		Inflammatoires Hypotenseurs Diurétiques Antioxydants
Tanins galliques		Antioxydants
Coumarines		Anticancérigènes

2.2. Les terpénoïdes

Les terpénoïdes constituent un vaste groupe de métabolites secondaires, ce sont des hydrocarbures naturels de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Le terme terpénoïde est attribué à tous les composés possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones dit isoprène. Ces composés sont majoritairement d'origine végétale. Elles forment les huiles essentielles, les parfums et les goûts des plantes, pigments (carotène), hormones (acide abscissique), stérols (cholestérol). On distingue : les monoterpènes en C 10, les sesquiterpènes en C15, les diterpènes en C 20, les triterpènes en C30 et tétraterpènes en C 40 [6].

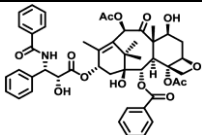
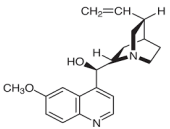
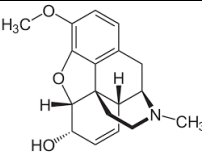
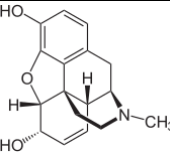
CHAPITRE I : synthèse bibliographique

2.3. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques azotées d'origine végétale à caractère alcalin et à structure complexe, sont retrouvés dans plusieurs familles des plantes. La plupart des alcaloïdes sont solubles dans l'eau et dans l'alcool. Ils ont un goût amer et certains sont fortement toxiques. Ils ont aussi une action directe sur l'organisme [5].

Le tableau ci-dessous présente quelques structures d'alcaloïdes ainsi que leurs usages thérapeutiques :

Tableau 02 : Quelques structures d'alcaloïdes et leurs usages thérapeutiques [8].

Alcaloïde	Structure	Activité biologique
Taxol		Antitumoraux
Quinine		Antipaludiques
Codéine		Antitussifs
Morphine		Antalgiques

3. les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des extraits volatils et parfumés qui sont extraits de certaines plantes par distillation à la vapeur, pressage ou incision des plantes qui les contiennent. Elles sont des composés naturels complexes de métabolites volatils secondaires, qui sont séparés par distillation aqueuse ou par injection mécanique [33]. Elles sont obtenues à partir des feuilles, des graines, des bourgeons, des fleurs, des brindilles, d'écorces, des bois, des racines, des tiges ou des fruits [34]. La composition des huiles essentielles est très complexe, elles peuvent renfermer jusqu'à plusieurs centaines de molécules chimiques différentes. Les plus fréquemment rencontrés sont les alcools (phénols et sesquiterpénols), les cétones, les aldéhydes terpéniques, les esters, les éthers, les terpènes et les oxydes [35].

4. Les activités biologiques

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétique et en pharmaceutique. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires, les polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapie comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti-radicalaires [8].

4.1. Activité antioxydante

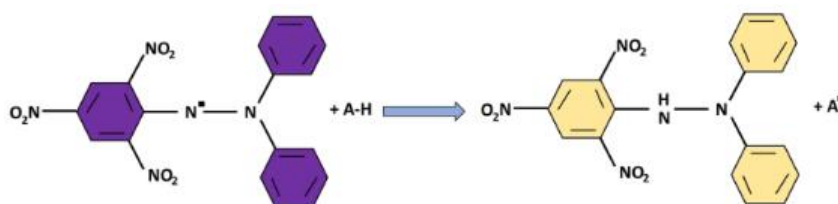
De nos jours, il existe un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres qui sont des espèces chimiques possédant un ou plusieurs électrons célibataires sur leurs couches périphériques, rendant ainsi ces espèces particulièrement instables [10]. Ce n'est pas seulement dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme ou l'ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement, tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires, ainsi que la dégénérescence du système immunitaire [9].

Parmi les principales sources d'antioxydants, nous citons les antioxydants naturels, présents dans toutes les parties des plantes supérieures. Ce sont des composés phénoliques (flavonoïdes, coumarines, caroténoïdes, dérivés d'acide phénolique, tanins, anthocyanines)

Il existe plusieurs méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* tel que :

- La méthode de piégeage du peroxyde d'hydrogène
- Le test de blanchiment du β -carotène
- La capacité antioxydante totale par la méthode de phosphomolybdate
- La méthode de FRAP (pouvoir réducteur)
- Le test de piégeage du radical libre DPPH•

Le test au 2,2-diphényl-2-picryl-hydrasyle (DPPH) permet de mesurer le pouvoir réducteur par le calcul de la CI_{50} des substances antioxydantes contenues dans un extrait. Le DPPH est un radical libre de couleur mauve qui vire au jaune quand il est réduit par un donneur de proton H^+ [11].



Où AH est un composé réducteur

Figure 01 : Mécanisme de réduction du DPPH.

5. Toxicité

Une plante toxique est une espèce végétale qui contient dans certaines de ses parties, parfois toutes, des substances toxiques, principalement pour l'homme ou les animaux. Les substances toxiques contenues dans les plantes sont généralement des composés organiques, plus rarement minéraux. Pour qu'une drogue possédant des effets pharmacologiques puisse éventuellement être utilisée comme médicament, il est d'abord nécessaire que l'activité apparaisse à des doses pour lesquelles la toxicité est négligeable. Les essais de toxicité accompagnent donc les essais d'activités biologiques au cours de la sélection de nouvelles molécules car dans certains cas, l'absorption d'une substance a pour effet de perturber le métabolisme des êtres vivants, provoquant ainsi des troubles physiologiques pouvant aller jusqu'à la mort des individus qui y sont exposés [12].

Il existe deux principaux types de toxicité, à savoir, **la toxicité aiguë** qui se produit par une exposition de courte durée (moins de 24h) à une dose forte, généralement unique. Ainsi qu'une **toxicité chronique** due à l'exposition prolongée et répétée à de nombreux produits chimiques qui produisent des effets tardifs à cause de l'accumulation de produit dans les tissus ou à cause d'autres mécanismes [12].

Une plante est rarement toxique dans sa totalité. Ainsi, un organe d'un végétal peut être toxique tandis qu'un autre peut être comestible. Les intoxications sont donc également dépendantes de l'organe végétal en cause, de l'état physiologique de la victime et de la quantité ingérée [13].

Tableau 03 : Toxicités de quelques organes de végétaux. [13].

Organe toxique	Plantes
Fruits (notamment baies)	Laurier-cerise, Belladone, Morelle noire, Pommier d'amour
Racines et tiges	Confusion avec une plante comestible : Gentiane et Véatré, Carotte sauvage et Ciguë
Feuilles et tiges	Lierre, Arum
Fleurs	Confusions thérapeutiques, comme entre l'Acacia et le Cytise, le Genêt à balai et le Genêt d'Espagne
Graines	Sarrasin contaminée par des graines de Datura ou de ricin

Le test de toxicité est réalisé en injectant l'extrait de la plante aux souris tout en observant la mortalité et le changement du comportement général des souris.

6. Hémolysé

Par (lyse), on entend rupture des globules rouges (érythrocytes) et diffusion de leur contenu (cytoplasme) dans le liquide environnant (par exemple, le plasma sanguin). L'hémolyse peut se produire *in vivo* ou *in vitro* (à l'intérieur ou à l'extérieur du corps). Une des causes de l'hémolyse est l'action des hémolysines, des substances toxiques produites par certaines bactéries ou champignons pathogènes. Une autre cause est l'exercice physique intense. Les hémolysines endommagent la membrane cytoplasmique des globules rouges, provoquant ainsi la lyse et finalement la mort des cellules [14].

Le test d'hémolyse fait l'objet d'une évaluation. Parce que, même si une plante possède un pouvoir antioxydant puissant, son utilisation en médecine traditionnelle et dans les préparations pharmacologiques sera impossible en présence de leur effet hémolytique, qui est un indicateur de cytotoxicité. Le pouvoir hémolytique des extraits des plantes est réalisé *in vitro* à partir de plusieurs concentrations sur une suspension d'érythrocytes du sang humain [15].

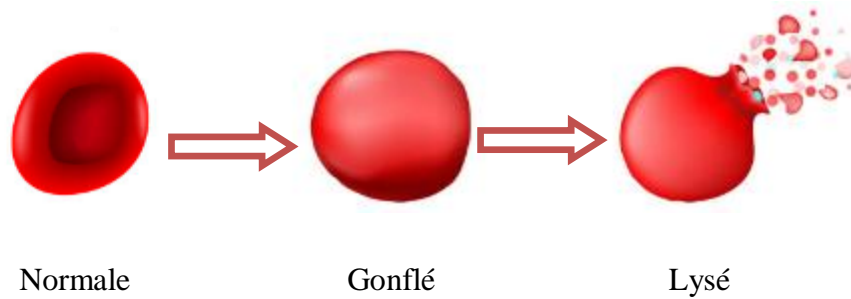


Figure 02 : Hémolysé des globules rouges [14].

7. Description de la plantes étudiée « *Rhamnus alaternus L.* »

Le nom du genre *Rhamnus* vient du grec « rhdos » qui signifie baguette, en référence à la flexibilité des rameaux, il est typiquement méditerranéen (Europe méridionale, Afrique du Nord et Asie occidentale) et caractéristique de la forêt de chêne vert [16].

Rhamnus alaternus L. est une espèce botanique qui appartient à la famille des Rhamnaceae, c'est une famille endémique d'arbres, arbustes et herbacées qui contient environ 50 genres et 900 espèces. Les plantes de cette famille sont connues comme espèces médicinales possédant diverses propriétés biologiques. *Rhamnus alaternus L.* est une plante vivace et arbuste.

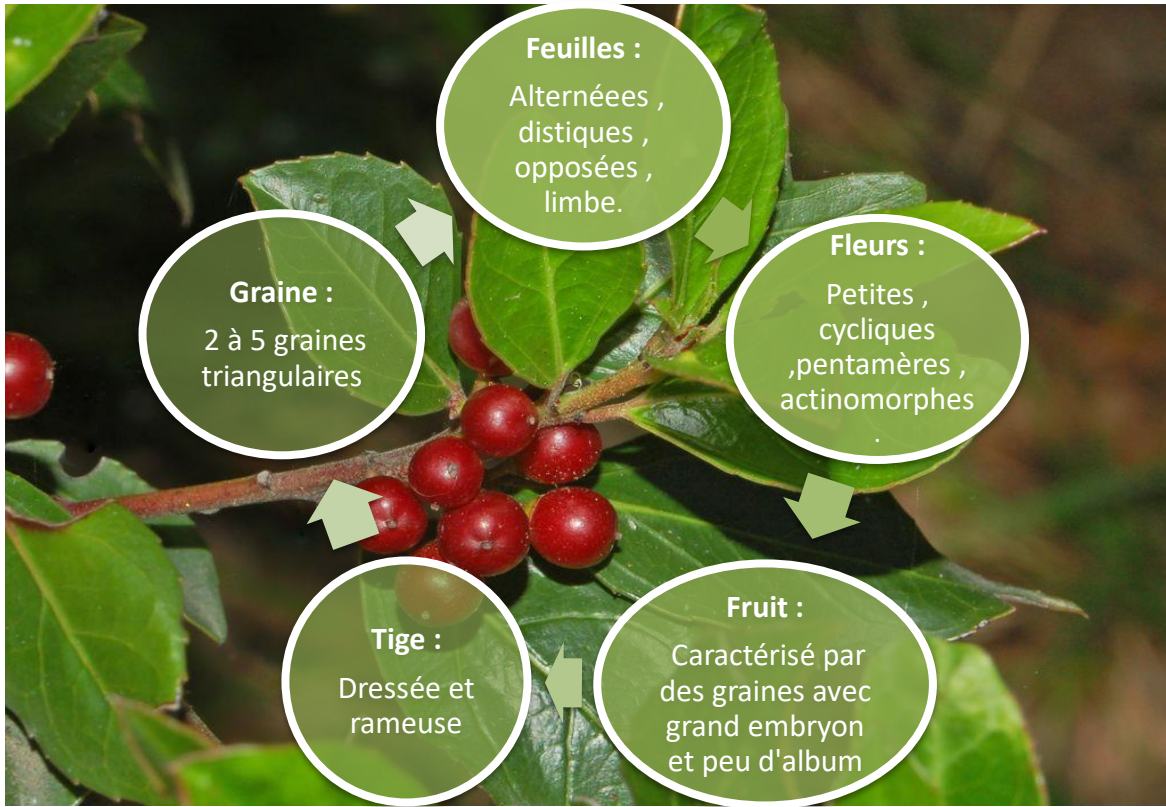


Figure 03 : Description de la plante *Rhamnus alaternus* L. [17].

7.1. Nomenclature

Les noms vernaculaires sont indiqués dans le tableau 4 :

Tableau 04 : Les noms vernaculaires de *R. alaternus* [18].

Nom Arabe	Oud el-khir.
Nom Kabyle	Mlisse
Nom français	Nerprun méditerranéen.
Nom Anglais	Mediterranean Buckthorn.

7.2. Taxonomie

La classification des plantes de la famille des *Rhamnaceae* est indiquée dans le schéma 01 :

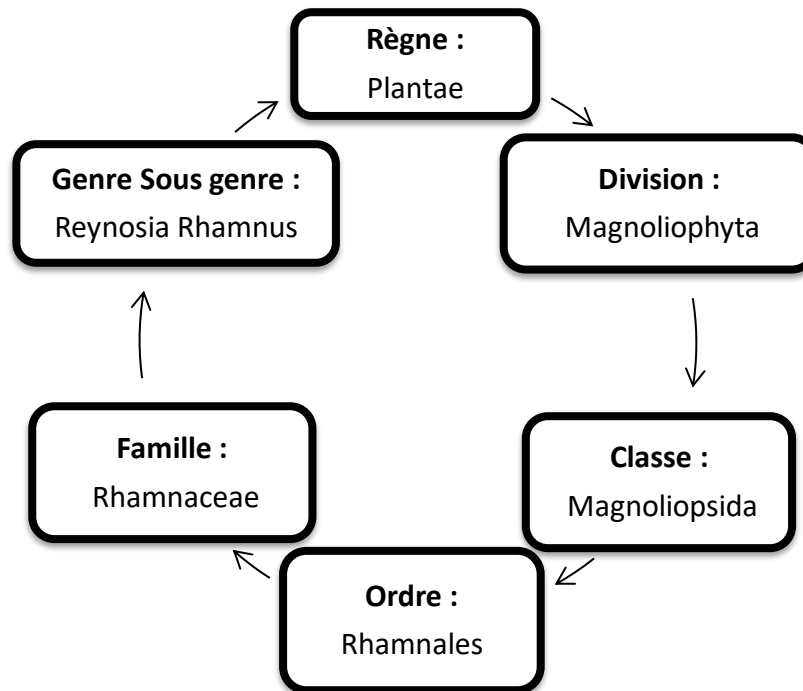


Schéma 01 : la classification botanique de *R. alaternus* [1].

7.3. Distribution géographique

La grande mauve a une aire de répartition eurasiatique. Elle est très répandue dans toute l'Afrique du Nord, dans les pays d'Asie Occidentale, d'Asie du Nord et du Sud-ouest, ainsi que dans certains pays d'Europe, répandue dans le bassin méditerranéen, *R. alaternus* est utilisé en médecine courante dans de nombreux pays, principalement la Tunisie, l'Algérie, le Maroc, l'Espagne, la France, l'Italie et la Croatie [19].

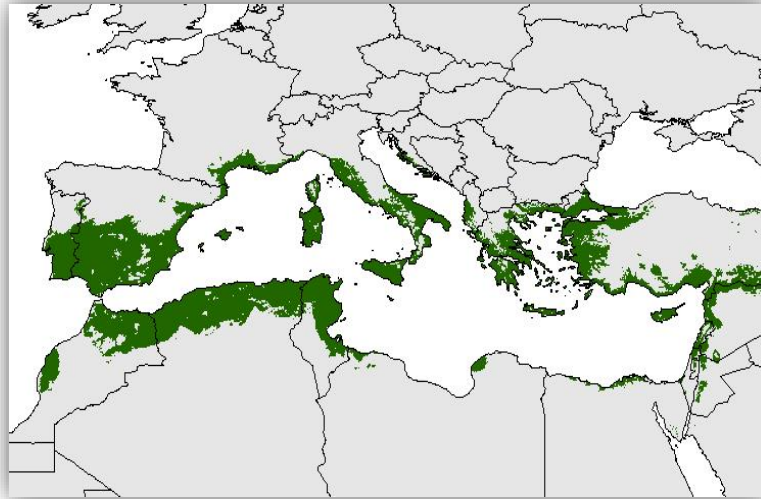


Figure 04 : Carte géographique de la répartition mondiale de *R. alaternus* au bassin méditerranéen.

7.4. Propriétés médicinales

En médecine traditionnelle *R. alaternus* a été employé en tant que digestif, diurétique, laxatif, hypotensif et pour le traitement des complications hépatiques et dermatologiques. Les baies de *R. alaternus* ont une action purgative, d'une saveur âpre, employés en médecine vétérinaire [20]. Cette plante est traditionnellement utilisée dans de nombreux pays du monde. En Algérie, le fruit est utilisé comme purgatif, les feuilles sont employées également pour gargarisme contre les maux de gorge. L'écorce permet de soulager la constipation. Sur le plan chimique les feuilles contiennent les flavonoïdes et des tanins, on lui reconnaît des propriétés antibactériennes et antioxydantes [1].

7.5. Travaux antérieurs

Un grand nombre de troubles, y compris les complications dermatologiques, le diabète, l'hépatite et les problèmes de goitre, peuvent être traités par les différentes parties de *R alaternus* (c'est-à-dire les racines, l'écorce, les baies et les feuilles). Plusieurs composés bioactifs ont été isolés de *R alaternus*, y compris les flavonoïdes, les anthocyanes et les anthraquinones et ont montré plusieurs effets antioxydant, antigénotoxique, antimutagène. Le tableau ci-dessous résume les informations mises à jour concernant sa toxicité, sa composition et ses effets pharmacologiques [21].

CHAPITRE I : synthèse bibliographique

Tableau 05 : Composés bioactifs extraits de différentes parties de *R. alaternus* selon le procédé d'extraction en cause et leurs activités pharmacologiques.

Partie de la plante	Méthode d'extraction	Solvant	Composés	Activité biologique	Référence
Feuilles	Macération	Méthanol	Rutine, antraquinones, acide gallique, acide p-coumarique, acide férulique, lutéoline	Activité antioxydante	[22]
Partie aérienne	Macération	Acétate d'éthyle	Flavonoïdes, tanins	Activité antigénotoxique	[23]
Feuilles, Ecorces de racine	Macération	Méthanol	Flavonoïdes, coumarines, anthraquinones, stérols	Activité Antioxydante Activité antimutagène	[24]

- Une récente étude a permis d'évaluer l'activité antioxydante par piégeage du radical DPPH° et d'estimer son effet hémolytique pour déterminer la cytotoxicité des extraits au méthanol de la partie aérienne (feuilles et écorces de racines) de *R. alaternus* qui a été cueillie au mois de novembre à Ouzidan, wilaya de Tlemcen (Algérie). Concernant les deux extraits de *R. alaternus*, à la même concentration, le pourcentage d'inhibition de DPPH est de 95 % de l'extrait de feuilles, tandis que l'extrait d'écorces est de 59,58 % [25].

Tableau 6 : Les activités antioxydantes des deux extraits bruts par la méthode DPPH [25].

Extraits méthanoliques	CI50 (µg /ml)
Feuilles de <i>R. alaternus</i>	10.5 ± 0.8
Écorce de <i>R. alaternus</i>	51.2 ± 1.2

Les deux extraits étudiés présentent un effet hémolytique inférieur à 3,5%, d'où une très faible hémolyse [25].

- D'autres résultats obtenus sur l'extrait éthanolique des feuilles de *R. alaternus* récoltées au niveau de la région de Bordj Menaiel, Wilaya de Boumerdes (Algérie) montrent une diversité moléculaire sur le plan des métabolites primaires et secondaires, indiquant une forte richesse en saponosides, mucilage, polyphénols, quinones, sucre réducteur et glucosides. On retrouve aussi un taux moyen de tanins totaux et galliques, des flavonoïdes et des coumarines avec une absence des tanins catéchiques, d'anthocyanes, des caroténoïdes, des irridoides, des protéines, des stérols, des polyterpènes, d'amidon et des lipides et l'étude a aussi détecté un fort pouvoir antioxydant [27].

1. Matériels et méthodes

1.1. Origine géographique et période de récolte de la plante

Cette étude a été réalisée sur la plante médicinale du genre *R. alaternus*, récoltée au mois de février 2023 dans la région de ZARIFFET, wilaya de Tlemcen.

1.2. Identification botanique

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

1.3. Préparation des échantillons

La partie aérienne de la plante a été séchée à l'air libre, à l'ombre et à température ambiante. Une fois séchée elle a été soumise aux extractions.



Figure 05 : La partie aérienne de *R. alaternus*

1.4. Méthode d'extraction

Les extraits utilisés au cours de notre étude sont préparés sous reflux et ce en utilisant deux solvants de polarité différente (l'eau et l'éthanol).

1.4.1. Préparations des extraits sous reflux

Dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant, une quantité de 50g de la partie aérienne de la plante *R. alaternus* a été mise en même temps que :

CHAPITRE II : Partie expérimentale

- 1)- 500 mL d'éthanol
- 2)- 500 mL d'eau distillée
- 3)- 250 mL d'éthanol + 250 mL d'eau distillée

Chaque mélange a été porté à reflux pendant une heure. Après refroidissement à température ambiante, chaque mélange obtenu a été filtré à l'aide d'un papier wattman N°03. Ensuite le filtrat est récupéré et versé dans une boîte à pétri et mis dans une étuve à 40°C pendant 48 h pour sécher. L'extrait sec est gratté et conservé dans un pilulier au réfrigérateur.



Figure 06 : Montage à reflux

1.4.2. Calcul des rendements en extraits bruts secs

Le rendement des trois extraits bruts exprimé en (%) de la plante a été déterminé par la formule suivante :

$$R (\%) = \frac{M1}{M0} \times 100$$

- R (%) : rendement exprimé en %.
- M1 : masse en gramme de l'extrait sec récupéré.
- M0 : masse en gramme du matériel végétal sec pour chaque extrait.

1.5. Screening phytochimique

Les trois extraits préparés ont fait l'objet de quelques tests phytochimiques afin de mettre en évidence la présence ou l'absence de certaines familles chimiques. Pour cela, nous avons réalisé sur nos extraits des tests basés sur des réactions de coloration ou de précipitation.

CHAPITRE II : Partie expérimentale

- **Les flavonoïdes**

À 5 ml de chaque extrait, on ajoute quelques gouttes d'HCl concentré et 0.5 mg de tournures de magnésium. L'apparition d'une couleur rouge – rose confirme la présence des flavonoïdes [29].

- **Les alcaloïdes**

Ajouter 5 ml d'HCl 1% à 1 ml de chaque extrait, chauffer le mélange au bain marie, puis on divise chaque extrait en deux volumes égaux. L'un est considéré comme témoin, l'autre traité par le réactif de Wagner. La formation d'un précipité brun révèle la présence des alcaloïdes.

Le réactif de Wagner est préparé comme suit :

Dans 75 ml d'eau distillée, dissoudre 2 g de KI et 1.27 g d'I₂. Le volume obtenu est ajusté à 100 ml avec l'eau distillée [28].

- **Tanins**

Mélanger 1 mL de chaque extrait avec 2 mL d'eau distillée et 2 à 3 gouttes de la solution de FeCl₃ diluée à 1%. Agiter et laisser reposer quelques minutes. Une couleur verdâtre confirme la présence des tanins catéchiques, et bleu – noirâtre indique l'existence des tanins galliques [29].

- **Saponosides**

La détection des saponosides est réalisée en ajoutant un peu d'eau distillée à 2 mL de chaque extrait, et en agitant fortement pendant 20 secondes et laisser reposer. La formation d'une mousse persistante révèle la présence des saponosides [28].

- **Hétérosides**

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

CHAPITRE II : Partie expérimentale

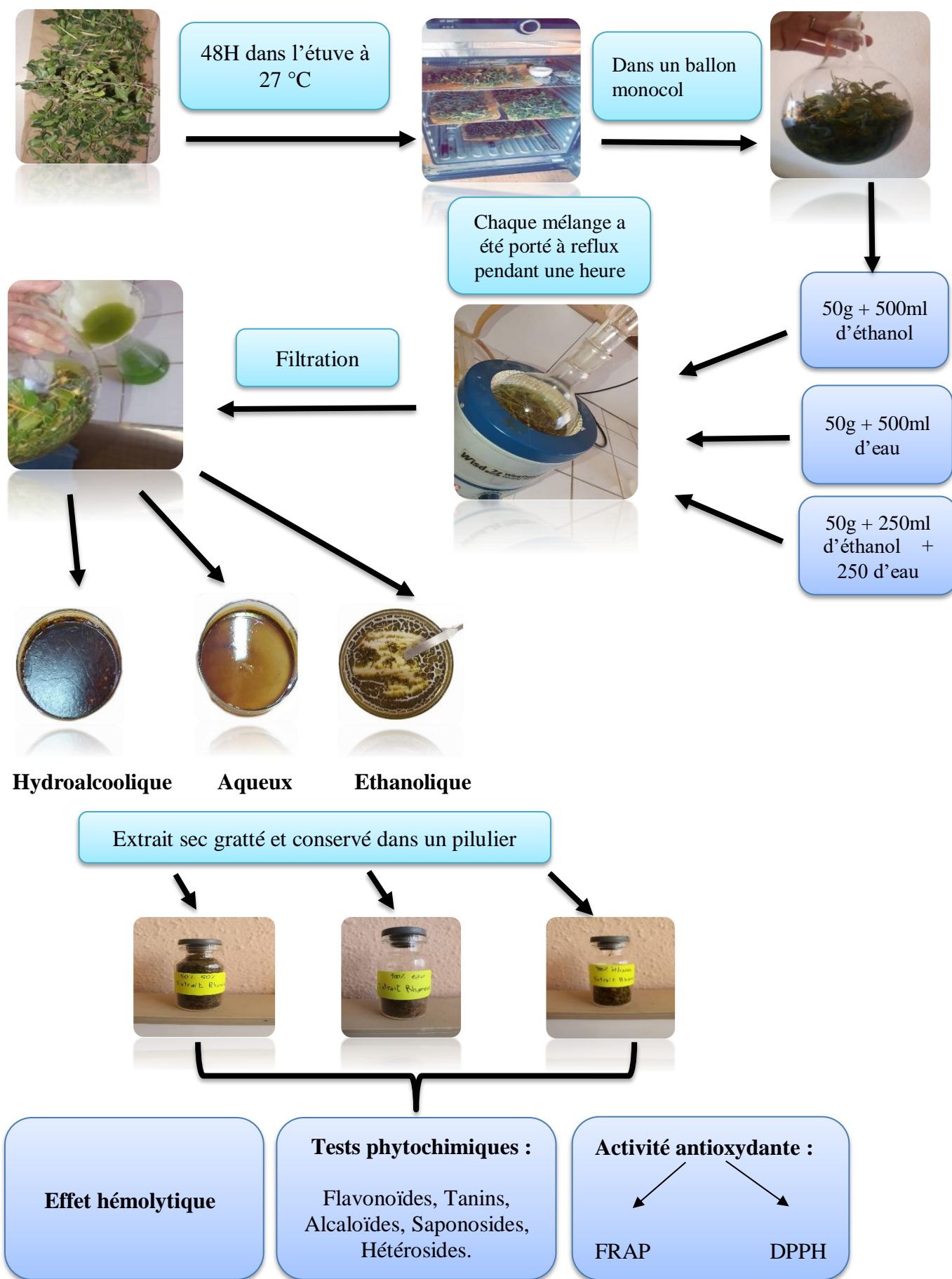


Figure 07 : Protocole de la préparations des extraits

1.6. Extraction de l'huile essentielle

Le procédé d'hydrodistillation de l'huile essentielle de *R. alaternus* implique l'immersion de 300g de matière végétale séchée et découpée en petits morceaux dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition pendant une durée de 4 à 5 heures. Les vapeurs hétérogènes sont condensées par un réfrigérant, ce qui entraîne la séparation de l'eau et de l'huile par différence de densité. L'huile essentielle obtenue est stockée à une température de -4°C jusqu'à son utilisation. Cette méthode est réalisée à l'aide d'un appareil de type Clevenger.



Figure 08 : Montage d'hydrodistillation (type Clevenger)

1.6.1. Calcul du rendement de l'huile essentielle

Le rendement de l'huile essentielle est calculé par la formule :

$$R (\%) = \frac{M1}{M0} \times 100$$

- M1 : masse de l'huile essentielle obtenue
- M0 : masse de la matière végétale utilisée

1.7. Evaluation de l'activité antioxydante

1.7.1. Piégeage du radical DPPH

- **Principe :**

DPPH est un radical libre et stable, il présente un maximum d'absorbance dans l'intervalle 515 - 520 nm, caractérisé par une couleur violette intense. Il possède un électron non apparié sur l'un des atomes d'azote qui permet de mesurer un pouvoir anti radicalaire. Cette méthode repose sur la réduction du radical DPPH (couleur violette) en DPPH-H (forme non radicalaire) de couleur jaune. Le virage vers cette coloration est proportionnel à la capacité des antioxydants qui se traduit par une diminution de l'absorbance à 517 nm [31].

- **Protocole :**

Préparation de la solution de DPPH : 0,006g de DPPH ont été dissout dans 100 mL d'éthanol 96%, le mélange a été placé sous agitation pour avoir une solution parfaitement soluble. Nous le mettons dans un flacon opaque et on recouvre avec du papier aluminium pour le conserver dans le frigo afin d'empêcher toute dégradation [31].

- **Mode opératoire :**

Une solution éthanolique de DPPH est mélangée avec différentes concentrations des extraits aqueux et éthanolique de *R. alaternus*. Dans des tubes à hémolyses 1 mL de chaque dilution des extraits sont ajoutés à 1 mL de la solution éthanolique de DPPH puis laissé incubé durant 30 min à l'abri de la lumière à température ambiante. Lire l'absorbance à 517 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible. Le contrôle négatif est composé de 1 mL d'éthanol et 1 mL de la solution de DPPH. L'acide ascorbique (contrôle positif) et l'huile essentielle sont préparés dans les mêmes conditions opératoires [31].

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

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

- Abs C : absorbance de control
- Abs P : absorbance de produit IC50 ou concentration inhibitrice de 50 %

Les IC50 sont calculés graphiquement par la courbe des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés.

CHAPITRE II : Partie expérimentale

L'activité anti radicalaire de nos différents extraits est déterminée à partir de l'IC50 définie comme étant la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH. Elle est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante.

Plus l'IC50 est petite plus l'activité antioxydante d'un extrait est grande.

- Le calcul du pouvoir anti radicalaire ARP :

$$\text{ARP} = \frac{1}{\text{IC50}}$$

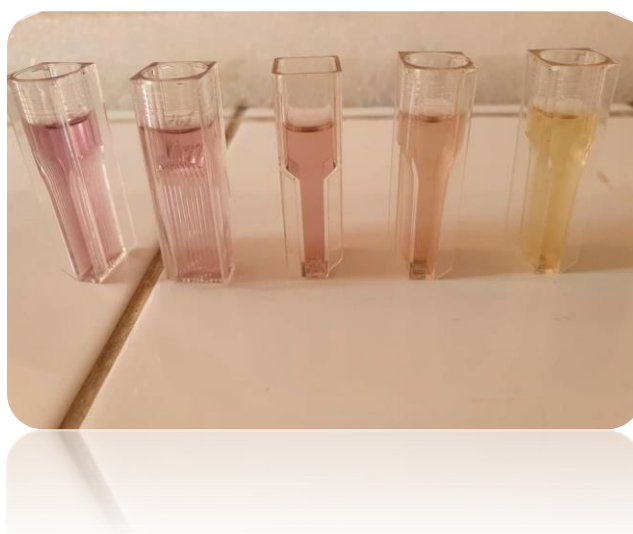


Figure 09 : Réduction du radical DPPH

1.7.2. Méthode de la réduction du fer FRAP

- **Principe :**

La méthode du pouvoir réducteur de fer est basée sur le changement de coloration lors de la réduction du fer de forme ions ferriques (Fe^{3+}) en ions ferreux (Fe^{2+}) en présence d'un antioxydant. La forme réduite donne une couleur bleu-vert du fer ferreux (Fe^{2+}). L'intensité de cette coloration est mesurée à 700 nm [30].

- **Protocole :**

Préparation des solutions :

La solution de trichloracétique TCA (10%) : 5g de TCA a été mis dans une fiole jaugée de 100 mL et complété par l'eau distillée jusqu'au trait de jauge

La solution de chlorure ferrique FeCl_3 (0,1%) : 0,1g de FeCl_3 a été solubilisé dans l'eau distillée dans une fiole jaugée de 100 mL.

CHAPITRE II : Partie expérimentale

La solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ (1%) : 1g de $K_3Fe(CN)_6$ a été dissout dans 100 mL d'eau distillée.

Solution tampon : on mélange 28,39g de NaH_2PO_4 solubilisé dans 1L d'eau distillée avec 23,99g de Na_2HPO_4 solubilisé également dans 1L d'eau distillée dont le pH=6,6.

- **Mode opératoire :**

Dans les tubes hémolytiques, 1mL de chaque dilution des extraits de la plante est ajouté, suivi de l'incorporation de 0.5 mL de tampon phosphate (0,2M, PH= 6,6) et 0,5mL d'une solution du ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$ à 1%). Le mélange ainsi formé est incubé à 50°C pendant 20min. Ensuite, l'arrêt de la réaction est effectué en ajoutant 0.5mL d'une solution de TCA (10%) à chaque tube. Pour séparer les composants, le mélange est centrifugé à 3000 tpm pendant 10 minutes, suivi d'une période de repos de 10min.

Par la suite, un volume de 1mL de surnageant est prélevé dans chaque tube. Ce prélèvement est ensuite mélangé avec 1mL d'eau distillée et 0,2mL d'une solution de $FeCl_3$ (0,1%). L'absorbance à 700 nm est mesurée pour chaque échantillon. Le blanc est préparé en remplaçant l'extrait par le solvant (éthanol) [30].

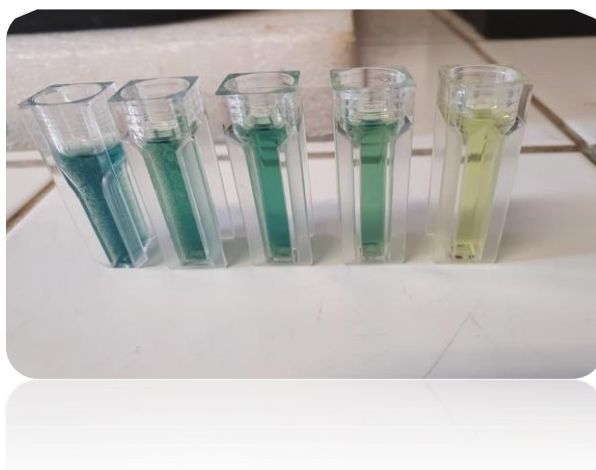


Figure 10 : Réduction du fer FRAP

- **Expression des résultats**

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

- **Spectroscopie d'absorption UV visible**

La spectroscopie UV-Visible permet d'accéder qualitativement à des renseignements quant à la nature des liaisons présentes au sein de l'échantillon. Elle permet également de donner une idée sur les différentes bandes de transition des fonctions chimiques dans la molécule tel que les transitions $\pi-\pi^*$, $n-\pi^*$ et aussi les transitions d-d caractérisant la formation

CHAPITRE II : Partie expérimentale

des complexes de coordination selon le modèle du champ cristallin.

- **Principe de la mesure, caractéristique principale :**

La technique de spectrophotométrie est basée sur la propriété de la matière plus particulièrement de certaines molécules. Elle permet de réaliser des dosages grâce à la loi de Beer-Lambert ($A = \epsilon l C$), qui montre une relation de proportionnalité entre l'absorbance et la concentration, aussi bien qu'une étude structurale des complexes par l'étude des spectres d'absorption. Cette méthode est basée sur l'utilisation d'un spectrophotomètre qui détermine l'absorption d'une solution pour une longueur d'onde donnée ou pour une plage de longueurs d'ondes judicieusement choisie [8].



Figure 11 : Spectrophotomètre U.V visible

1.8. Activité hémolytique

- **Principe :**

Le principe de cette méthode repose sur la mesure de l'absorbance à 540nm de l'hémoglobine contenue dans le surnageant, obtenue après centrifugation du milieu dans lequel les globules rouges ont été incubés [32].

- **Protocole**

Le test de l'effet hémolytique est réalisé *in vitro* sur une suspension érythrocytaire du sang humain, conservée dans un tampon phosphate saline (PBS) à pH=7,4

Nous avons préparé la solution tampon saline (PBS) à pH =7,4 ± 0,02 en mélangeant les composés suivants dans 2L d'eau distillée avec les masses qui correspondent. NaCl (16 g), KCl (0,4 g), Na₂HPO₄ (2,84 g), KH₂PO₄ (0,48 g).

- **Préparation de la suspension érythrocytaire**

Le sang est prélevé dans un tube hépariné à partir d'un donneur sain. Ensuite, il est centrifugé à 3000 rpm durant 10 min. Le plasma (surnageant) est éliminé. Le culot (la suspension érythrocytaire, GRh) est lavé trois (3) fois par le PBS pour être resuspendu à nouveau par 1 mL de PBS.

- **Préparation des solutions des extraits**

Les différentes concentrations sont préparées dans le PBS et sont : 25mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,125 mg/mL, 1,5625 mg/mL.

- **Mode opératoire :**

- Mettre dans des tubes à hémolyse 0,4ml de la suspension GRh (10 %) avec 1,6 ml de l'extrait à différentes concentrations.
- Incuber les tubes à 37°C pendant 30 min.
- Centrifuger les tubes à 3000 rpm pendant 10 min.
- La lecture est réalisée à une longueur d'onde de 540nm, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible contre un blanc contenant de PBS.

En parallèle, un tube contrôle négatif est réalisé en remplaçant l'extrait avec de l'eau physiologique.

Dans les mêmes conditions, un tube contrôle positif correspondant à 100% d'hémolyse est préparé, remplaçant l'extrait par l'eau distillée [32].

- **Expression des résultats**

Le pourcentage d'hémolyse a été calculé à partir de la formule suivante :

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = \frac{\text{DO extrait} - \text{DO contrôle négatif}}{\text{DO contrôle positif}} \times 100$$

CHAPITRE II : Partie expérimentale

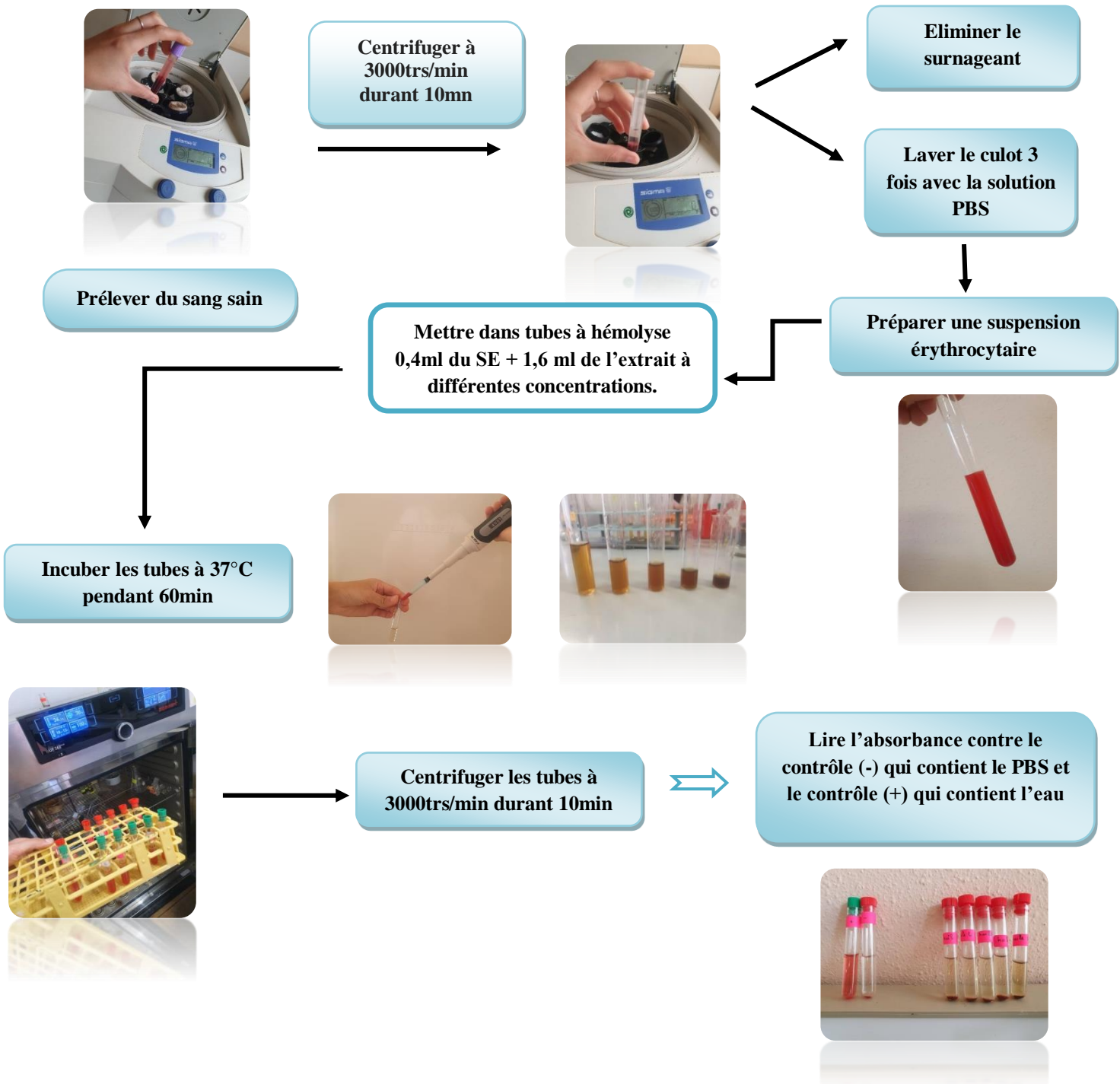


Figure 12 : Protocole de l'activité hémolytique

• Introduction

Notre étude a pour but d'évaluer l'activité antioxydante en utilisant les méthodes (DPPH et FRAP) et d'étudier les effets hémolytiques des différents extraits bruts et huile essentielle de la partie aérienne de notre plante.

1. Rendement des extraits bruts secs

Dans ce travail nous avons obtenu trois extraits de différents aspects à partir de 50g de la plante aérienne, ce qui nous a permis de déterminer les rendements des extraits bruts.

Tableau 07 : Rendement des différents extraits bruts de la plante

Parties de la plante	Extraits	Aspect	Couleur	Rendement %
Aérienne	Aqueux	Visqueux	Marron	14%
	Ethanolique	Visqueux	Vert	4%
	Hydroalcoolique	Visqueux	Marron	24%

Les résultats obtenus sont illustrés sur l'histogramme suivant :

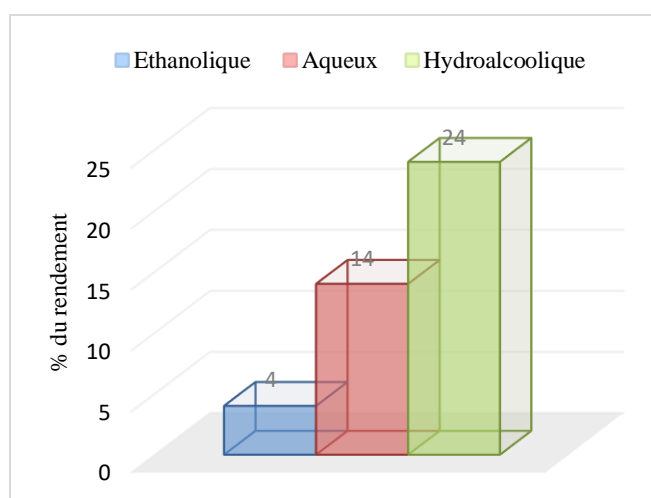


Figure 13 : Les rendements des différents extraits de la plante

D'après le tableau et l'histogramme, les résultats obtenus montrent que les rendements en extrait aqueux, éthanolique et hydroalcoolique de la partie aérienne de *R.alaternus* ont été de 24% ,14% et 4%, respectivement, on remarque que le rendement de l'extrait hydroalcoolique est supérieur aux autres.

Dans une étude menée sur la même espèce récoltée à Boumerdes (Algérie), un extrait éthanolique a été obtenu avec un rendement faible, mesuré à 4,4%. Ce rendement est

CHAPITRE III : Résultats et discussion

pratiquement identique à celui obtenu dans notre propre étude [27].

Selon une étude menée sur *R. alaternus* récoltée à Sidi Bel Abbés, une macération dans l'eau distillée a donné un rendement de 14,20% [39].

Dans une autre, le rendement d'extraction des feuilles de *R.alaternus* récoltées Sidi Bel Abbés, en utilisant un macérat aqueux, a été de 6,57% [40].

La différence de solubilité des composés chimiques dans le solvant d'extraction, la procédure de séchage, le temps de macération, le volume, la méthode d'extraction, la région et le temps de cueillette, ainsi que la nature du solvant, sont parmi les paramètres susceptibles d'influencer le taux d'extraction [36].

2. Tests phytochimiques

Le screening phytochimique a pour but la mise en évidence de la présence ou l'absence des différents métabolites secondaires dans nos extraits. La recherche de ses composés est basée sur des phénomènes de précipitation ou de colorations par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés. Les résultats des tests phytochimiques réalisés sur nos extraits bruts sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 08 : Tests phytochimiques des trois extraits de la partie aérienne de *Rhamnus alaternus*

Groupe chimique	Réactifs	Extrait aqueux	Extrait éthanolique	Extrait hydroalcoolique
Saponosides	Réaction de la Mousse	++	+	+
Flavonoïdes	Chlorure d'hydrogène concentré Tournure de Magnésium	+	-	+
Tannins	Le chlorure de fer (III)	+	+	+
Alcaloïdes	Réactif de Wagner	+	+	-
Hétérosides	Chloroforme Acide sulfurique concentré	-	+	+

(+) Présence (++) Forte présence (-) Absence

D'après les résultats, nous remarquons que l'extrait aqueux de la partie aérienne de *R.*

CHAPITRE III : Résultats et discussion

alaternus est riche en tanins, flavonoïdes, saponosides et alcaloïdes.

En ce qui concerne l'extrait éthanolique, l'analyse de ce dernier révèle la présence de saponosides, tanins, alcaloïdes et hétérosides en grandes quantités, alors que composés flavonoïdes sont absents dans cet extrait.

Pour l'extrait hydroalcoolique le test phytochimique indique sa richesse en saponosides, tanins, flavonoïdes et hétérosides sont présents en grande quantité. Les flavonoïdes sont totalement absents dans cet extrait.

Les résultats sont proches de ceux obtenus sur la poudre et l'infusé des feuilles de *R. alaternus* cueilli à Boumerdes (Algérie), ils indiquent une forte richesse en saponosides, mucilage, polyphénols, quinones, sucre réducteur et glucosides ainsi qu'un taux moyen de tanins totaux et galliques, des flavonoïdes et des coumarines [27].

Une autre étude a montré que l'extrait éthanolique des feuilles de *R. alaternus* récoltée à Bejaia (Algérie) est riche en composés phénoliques [43].

3. Rendement de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle à partir de la partie aérienne de *R. alaternus* réalisée par hydrodistillation en utilisant un montage de type Clevenger donne une huile essentielle de couleur jaune blanchâtre, donnant un faible rendement de 0.212 %

Tableau 09 : Rendement de l'huile essentielle de *R. alaternus*

Parties de la plante	Masse (g)	Aspect	Couleur	Rendement %
Aérienne	300	Fluide	Transparente jaunâtre	0,212

Cette étude fournit une évaluation du rendement en huile essentielle de *R. alaternus*. Elle est cependant limitée par l'absence de références scientifiques. Néanmoins, ces résultats peuvent être utilisés comme point de départ pour de futures recherches sur cette huile essentielle.

4. Etude du pouvoir anti-radicalaire

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

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

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

Lors de notre travail, la mesure de l'absorbance des extraits préparés à différentes concentrations nous permet de tracer des courbes et cela, après avoir effectué des calculs de pourcentages d'inhibition en utilisant la formule citée dans le protocole. Les courbes présentent la variation des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits obtenus. Les résultats sont résumés dans les figures ci-dessus :

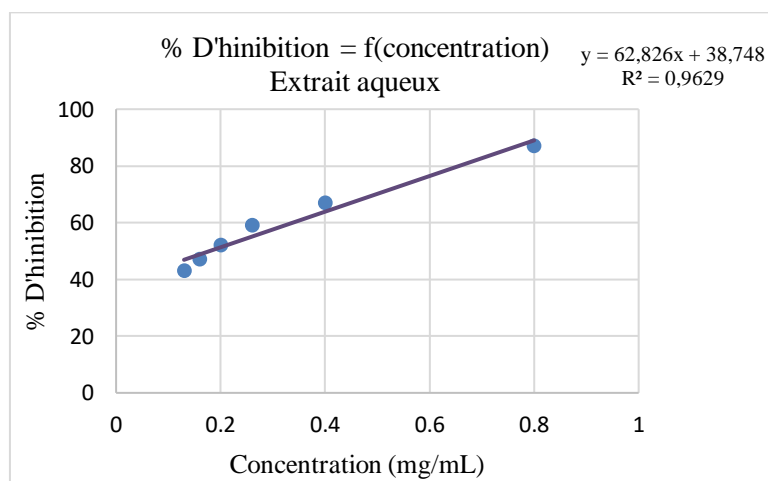


Figure 14 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'extrait brut aqueux de *R. alaternus* sous reflux

CHAPITRE III : Résultats et discussion

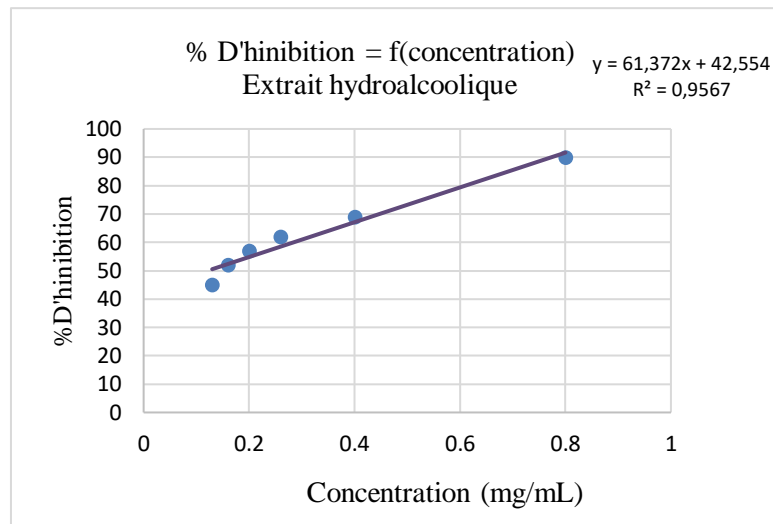


Figure 15 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'extrait brut éthanolique et aqueux de *R. alaternus* sous reflux

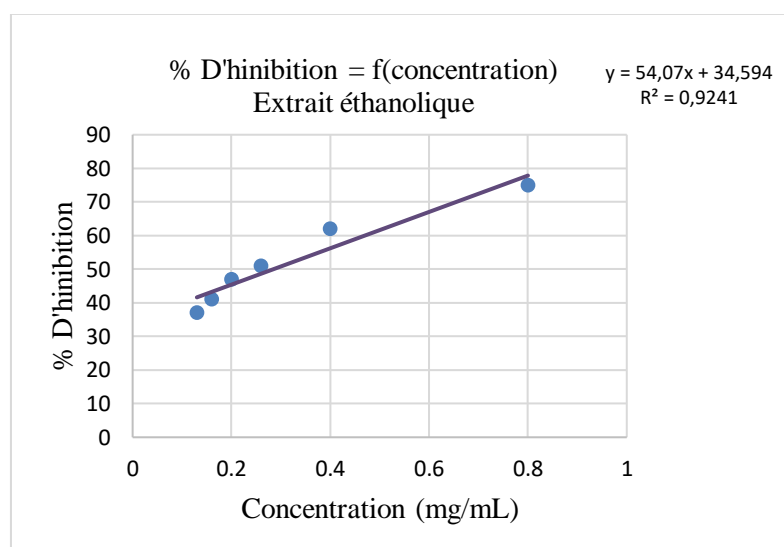


Figure 16 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'extrait brut éthanolique de *R. alaternus* sous reflux

CHAPITRE III : Résultats et discussion

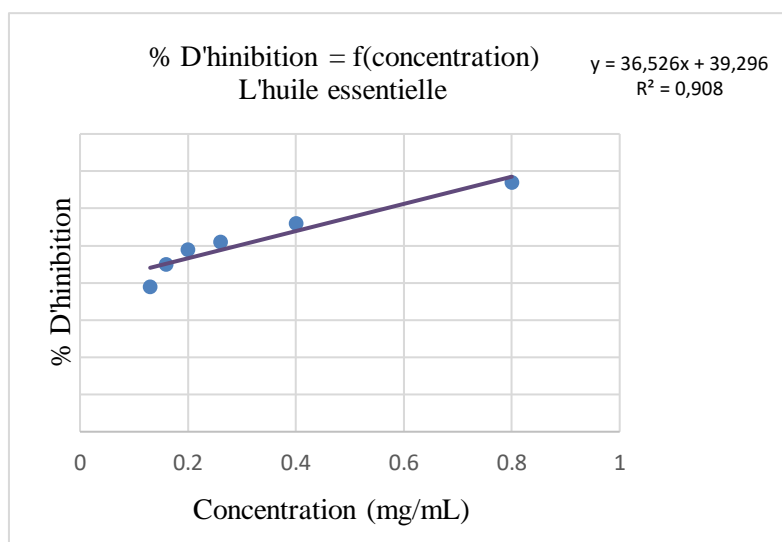


Figure 17 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'huile essentielle de *R. alaternus*

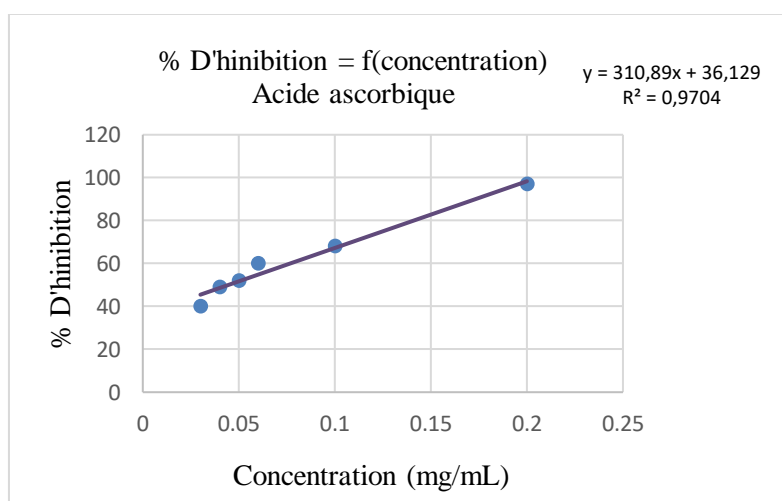


Figure 18 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'acide ascorbique.

A partir de ces graphes, nous remarquons que l'extrait hydroalcoolique présente une forte activité anti radicalaire vis-à-vis du DPPH avec un taux de 90 % à une dose de 0.4 mg /mL, par contre l'extrait aqueux présente un pourcentage d'inhibition de 87%, tandis que l'extrait éthanolique donne un pourcentage d'inhibition de 75%. Pour l'huile, il atteint 67% à une même concentration. Par contre, l'acide ascorbique peut atteindre un taux de 97% à une faible concentration (0.2mg/mL). Ces résultats montrent que le pourcentage d'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration.

CHAPITRE III : Résultats et discussion

Tableau 10 : Les valeurs des IC50 et le pouvoir anti radicalaire (ARP) des différents extraits, de l'huile essentielle de *R. alaternus* et de l'acide ascorbique

Extrait	IC 50(mg /mL)	ARP
Aqueux	0,179	5,714
Ethanolique	0,28	3,571
Hydroalcoolique	0,12	8,33
Huile essentielle	0,293	3,412
Acide ascorbique	0,04	25

D'après les résultats présentés dans le tableau, l'huile a montré la plus faible activité, avec une valeur d'IC50 de 0,293 mg/mL. Ensuite, l'extrait éthanolique a présenté une IC50 de 0,28 mg/ml, suivie de l'extrait aqueux avec une IC50 de 0,179 mg/mL et de l'extrait hydroalcoolique avec une IC50 de 0,12 mg/mL. Enfin, l'acide ascorbique a montré la plus forte activité antiradicalaire, avec la plus faible IC50 de 0,04 mg/mL.

Nos extraits ont montré une IC50 nettement supérieure à celle trouvée dans une étude menée sur la même espèce de plante en Tunisie. Dans cette étude, l'extraction a été réalisée à partir de méthanol, ce qui a donné une valeur d'IC50 de 7µg/ml pour les écorces des racines et les feuilles.

Le même groupe de chercheurs a également montré d'autres résultats pour l'écorce et les racines mixtes : une fois extraite avec du butanol saturé en eau, la IC50 était de 19 µg/ml. Cette valeur est presque la même comparée avec notre extrait aqueux. [19]

Par ailleurs, une autre étude sur la même espèce de plante récoltée à Bordj Bou Arreridj ; a démontré pour l'extrait aqueux une IC 50 = 0,082 mg/ml. Ce résultat est inférieur à celui trouvé avec notre extrait. [39]

Une autre étude A Sétif (Algérie), La partie aérienne de la plante (tiges et feuilles) a été soumise à une macération dans le méthanol, les concentrations inhibitrices à 50 % (CI50) sont estimées à 52 µg/mL (Extrait méthanolique des racines), 66 µg/mL (Extrait aqueux tiges et feuilles), 72 µg/mL (Extrait aqueux des racines) [20].

Par contre aucune étude n'a été faite sur l'huile essentielle de cette plante.

4.2. Le pouvoir réducteur du fer

L'activité antioxydante des extraits éthanolique, aqueux, hydroalcoolique et l'huile essentielle de *R. alaternus* a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP, cette dernière est un

CHAPITRE III : Résultats et discussion

test simple, reproductible et rapide. [41] C'est une méthode basée sur la capacité des antioxydants à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} .

Dans notre travail, nous avons évalué l'activité antioxydante de différents extraits (eau, éthanol) par la méthode FRAP.

Notre choix s'est porté sur l'acide ascorbique (un puissant antioxydant) comme contrôle.

Les valeurs obtenues permettent de tracer la courbe DO en fonction des différentes concentrations de l'extrait.

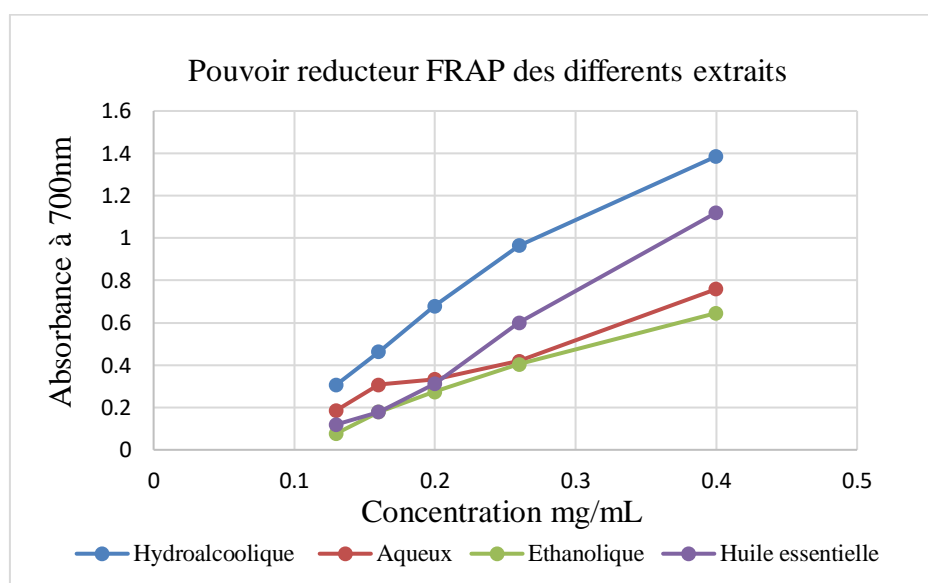


Figure 19 : Pouvoir réducteur des différents extraits par la méthode FRAP

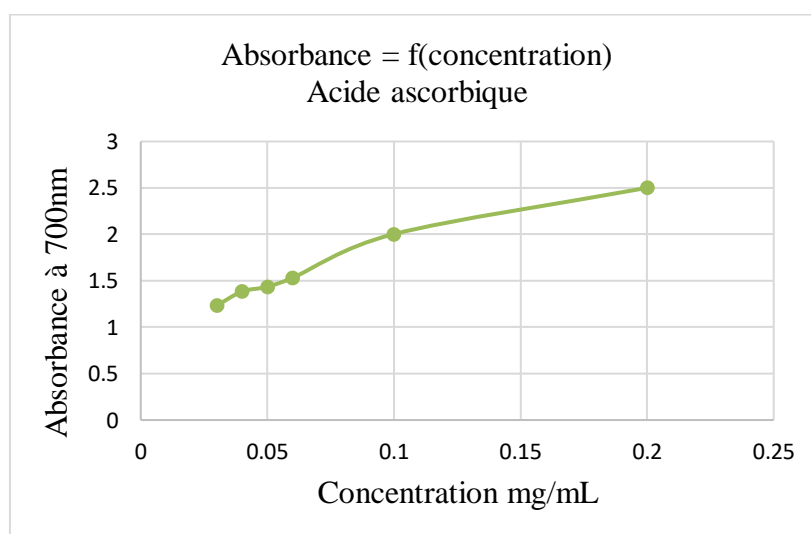


Figure 20 : Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique par la méthode FRAP

Les résultats obtenus à partir des courbes représentées dans la figure N° 19 présentent une réduction du Fe^{+3} en Fe^{+2} qui est proportionnelle avec l'augmentation de la concentration en extraits.

D'après le graphe de la figure N°19, nous remarquons que le pouvoir réducteur de l'extrait hydroalcoolique, l'huile, l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique augmente avec l'augmentation de la concentration dont l'extrait hydroalcoolique représente l'activité la plus importante par rapport aux autres extraits avec une DO de 1,4 ; 1,1 ; 0,7 ; 0,6 à une concentration de 0.4 mg/mL. Tandis, la capacité de réduction du fer est largement inférieure à celle de l'acide ascorbique.

Nous remarquons aussi que le pouvoir réducteur obtenu par l'acide ascorbique est très puissant avec une DO de 2.5 par rapport aux autres extraits.

4.3. Evaluation de l'effet hémolytique

Dans cette partie, la cytotoxicité est suivie par la fuite d'hémoglobine intracellulaire des globules rouges humains qui présente l'évolution de l'effet hémolytique, (par absorbance), durant 60 min, dans un milieu tampon PBS (pH 7.4) contenant une suspension érythrocytaire, incubée à 37°C, et en présence des différentes concentrations (1.5 mg/mL, 3.125mg/mL, 6.25mg/mL, 12.5 mg/mL, 25 mg/mL), des extraits (Aqueux, éthanolique, hydroalcoolique) et huile essentielle la partie aérienne de *R. alaternus*, comparée à un tube témoin négatif (tube contenant que de PBS et la suspension érythrocytaire), et un tube d'hémolyse totale provoquée par l'eau distillée.

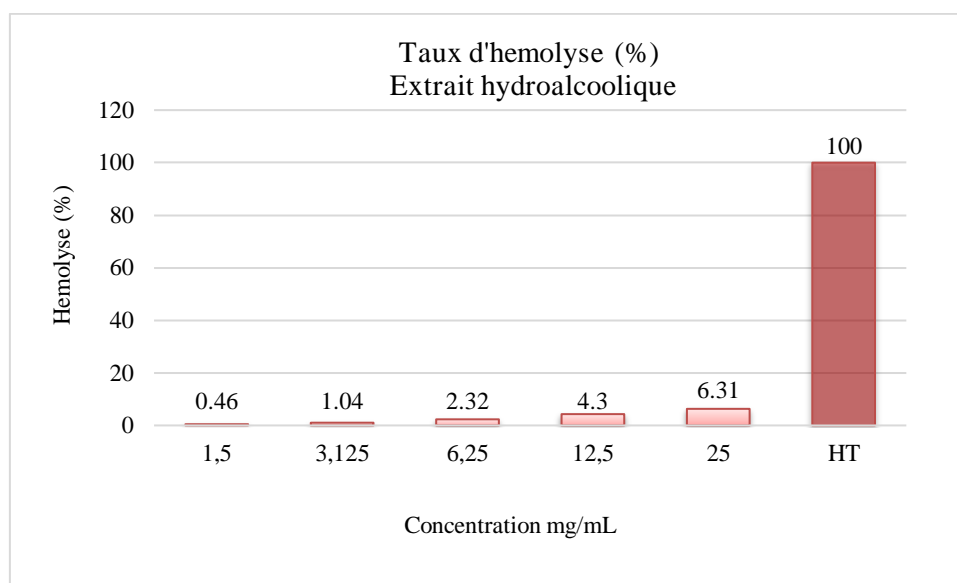


Figure 21 : L'évolution de taux d'hémolyse (par absorbance) dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne *R. alaternus* durant 60 minutes.

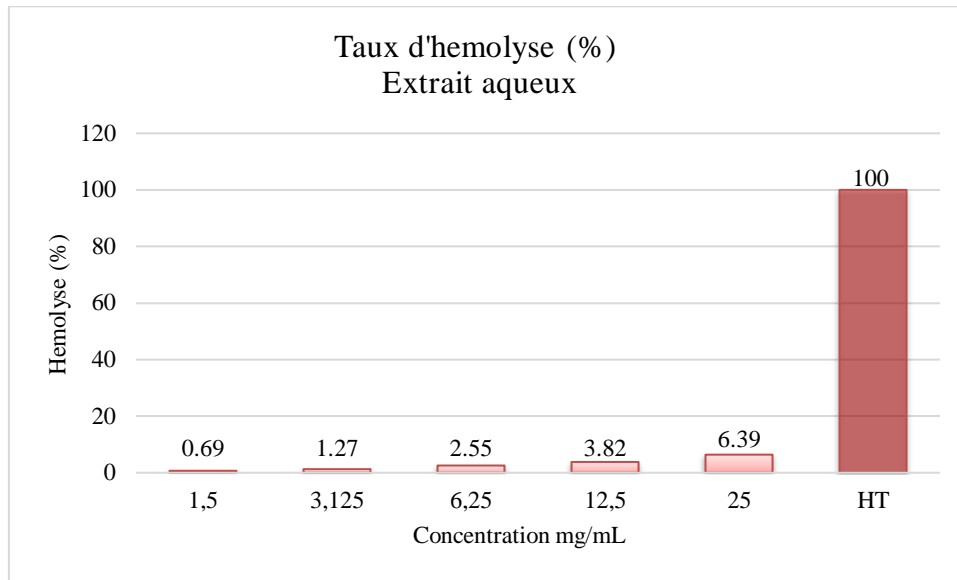


Figure 22 : L'évolution de taux d'hémolyse (par absorbance) dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extrait aqueux de la partie aérienne de *R. alaternus* durant 60 minutes.

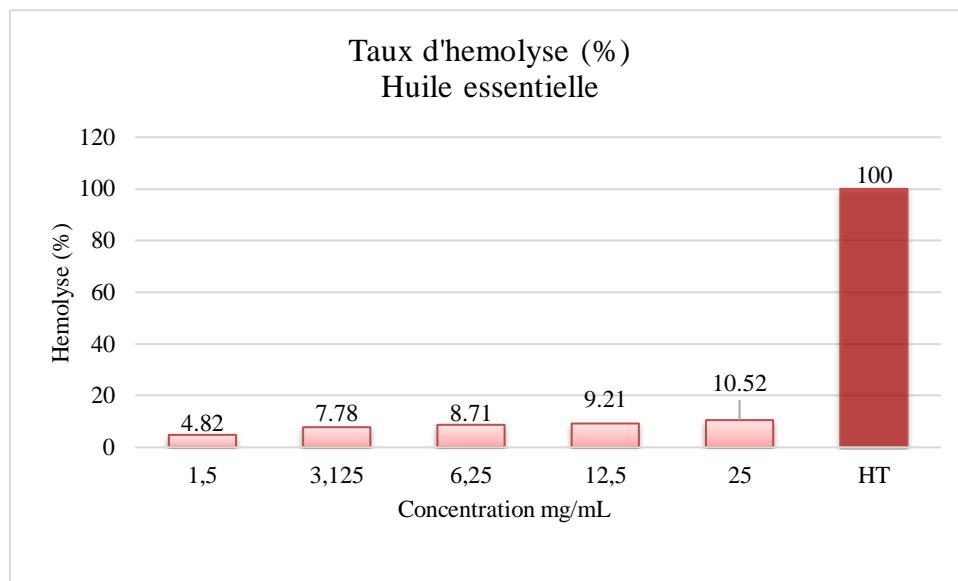


Figure 23 : L'évolution de taux d'hémolyse (par absorbance) dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations de l'huile essentielle de la partie aérienne de *R. alaternus* durant 60 minutes.

CHAPITRE III : Résultats et discussion

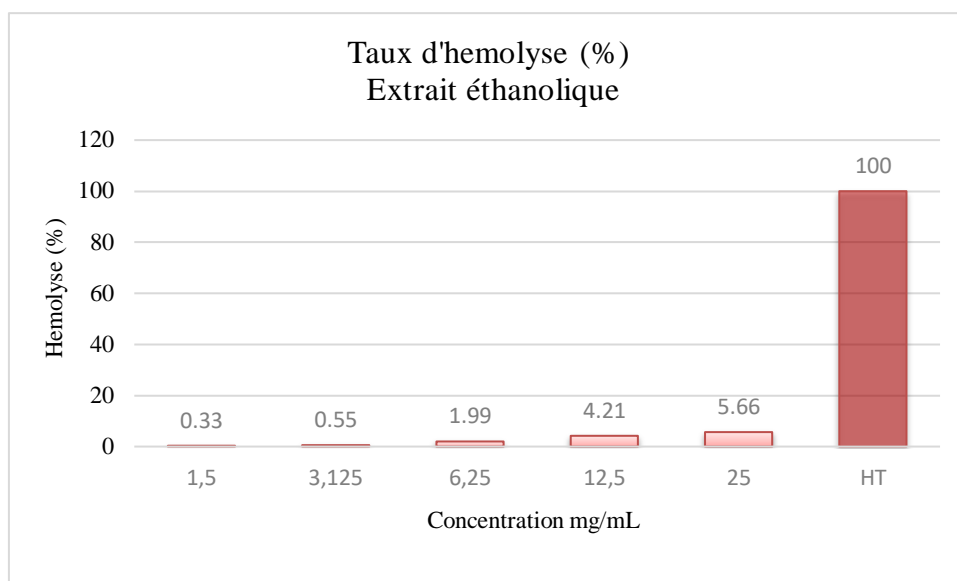


Figure 24 : L'évolution de taux d'hémolyse (par absorbance) dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extrait éthanolique de la partie aérienne de *R. alaternus* durant 60 minutes.

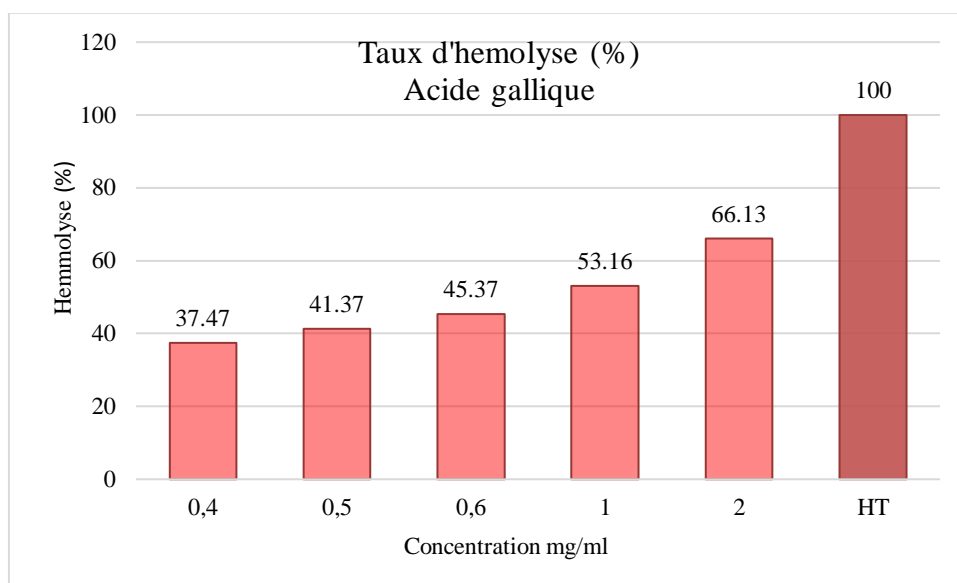


Figure 25 : L'évolution de taux d'hémolyse (par absorbance) dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations de l'acide gallique pendant 60 minutes.

CHAPITRE III : Résultats et discussion

Tableau 11 : Evaluation de taux d'hémolyse (%) des différents extraits et d'huile essentielle de la partie aérienne de *R. alaternus*, après 60 min d'incubation.

Taux d'hémolyse (%) des différents extraits après 60 min d'incubation				
Concentration (mg/mL)	Huile essentielle	Extrait aqueux	Extrait hydroalcoolique	Extrait Ethanolique
25	10,52 %	6,38 %	6,31 %	5,66 %
12,50	9,21 %	3,82 %	4,30 %	4,21 %
6,25	8,71 %	2,55 %	2,32 %	1,99 %
3,12	7,78 %	1,27 %	1,04 %	0,55 %
1,50	4,82 %	0,62 %	0,46 %	0,33 %

L'analyse biologique a été réalisée sur des érythrocytes (globules rouges) isolés du sang humain sain et incubés dans un milieu tampon PBS à un pH de 7,4. Les résultats ont montré que le pourcentage d'effet hémolytique des extraits de *R. alaternus* augmente en fonction de la concentration. L'huile essentielle a présenté l'effet hémolytique le plus important, avec un taux maximal de 10,52% à une concentration de 25 mg/mL.

En revanche, les extraits aqueux, hydroalcoolique et éthanolique ont montré un taux d'hémolyse moins important que l'huile essentielle, avec des taux maximums de 6,38%, 6,31% et 5,66% respectivement à une concentration de 25 mg/mL. Ces extraits sont donc considérés comme moins toxiques que l'huile essentielle. Les taux d'hémolyse ont diminué pour les autres concentrations, atteignant un minimum de 0,33% à une concentration de 1,50 mg/mL pour l'extrait éthanolique, qui est considéré comme le moins toxique.

Nous avons également testé le taux d'hémolyse de l'acide gallique qui a montré la plus forte toxicité à différentes concentrations ayant des pourcentages supérieurs à 30% à partir de 0,4 mg/mL, arrivant jusqu'à 60% à la concentration de 2 mg/mL.

Dans une récente étude menée sur la même espèce récoltée en novembre 2019 dans la région d'Ouzidane, Wilaya de Tlemcen (Algérie), les extraits ont été testés pour leur effet hémolytique sur les érythrocytes. Les résultats ont montré que tous les extraits n'ont pas provoqué d'hémolyse dans le temps initial de 0 minute, mais après 15 et 30 minutes de contact avec les érythrocytes, une légère augmentation des pourcentages a été observée dans l'extrait de feuilles de *R. alaternus*, à une concentration de 50 mg/mL. Cependant, aucun effet hémolytique n'a été enregistré dans l'extrait d'écorce de *R. alaternus*, même après 30 minutes. Après 60 minutes de contact avec les érythrocytes humains, une hémolyse maximale de 1,9 % a été obtenue dans les deux extraits de *R. alaternus*, suivie de l'extrait d'écorce à 1,08 %. À une concentration de 50 mg/ml, tous les extraits ont montré un effet hémolytique très faible. En conséquence, les résultats ont montré que les extraits étudiés ont un effet hémolytique inférieur à 3,5 % après 1 heure de contact avec les érythrocytes humains [37].

CHAPITRE III : Résultats et discussion

Ces composés chimiques pouvant conférer à la plante des propriétés toxiques à fortes doses. Il apparaît indispensable de procéder à la détermination de leur pouvoir hémolytique pour une adaptation rationnelle de la tradithérapie surtout pour les modes d'administration et les précautions à observer en cas de non-intégrité au niveau des muqueuses digestives (bouche, estomac, intestin, etc.) [38].

Conclusion et perspective

L'Algérie dispose d'un patrimoine végétal important en raison de sa biodiversité remarquable dans différentes zones telles que les régions côtières, les massifs montagneux, les hauts-plateaux, la steppe et les oasis sahariennes. Cette richesse floristique est constituée de milliers d'espèces de plantes qui possèdent diverses propriétés médicinales et autres. Les scientifiques mènent des recherches pour étudier les plantes médicinales pour en tirer des substances naturelles bioactives à des fins valorisantes.

L'étude menée sur les extraits de la partie aérienne de la plante *R. alaternus* et son huile essentielle, a révélé des résultats encourageants en termes d'activité antioxydante ainsi que l'absence de sa toxicité lors de l'analyse de leurs propriétés hémolytiques.

En se basant sur les résultats obtenus, il a été conclu que le rendement des extraits de la partie aérienne de la plante *R. alaternus*, récoltée dans la région de Tlemcen, varie de 4% à 24% en fonction de la quantité de matériel végétal sec utilisé. Les extraits incluent un extrait hydroalcoolique (24%), un extrait aqueux (14%) et un extrait éthanolique (4%). Cependant, le rendement de son huile essentielle est très faible, étant estimé à environ 2%.

L'analyse phytochimique a révélé que la partie aérienne de *R. alaternus* est abondante en tanins, flavonoïdes, saponosides, alcaloïdes et hétérosides.

En outre, l'étude a évalué l'activité antioxydante des extraits bruts (aqueux, éthanolique et hydroalcoolique) ainsi que de l'huile essentielle de *R. alaternus* en utilisant deux méthodes : la réduction du fer et le piégeage du radical libre DPPH.

Les résultats obtenus ont montré que tous les extraits de la plante possèdent une activité antioxydante. L'extrait hydroalcoolique a présenté la meilleure activité antioxydante avec une IC50 de 0,12 mg/mL et un pourcentage d'inhibition de 90% à une concentration de 0,4 mg/ml. En revanche, l'extrait éthanolique a montré la plus faible activité antioxydante avec une IC50 de 0,28 mg/mL. En ce qui concerne l'huile essentielle, elle a révélé une faible activité antioxydante avec une IC50 de 0,293 mg/mL, ceci étant plus élevé que l'acide ascorbique qui a présenté une IC50 de 0,04 mg/mL. En ce qui concerne les résultats de FRAP, tous les extraits ont montré une capacité de réduction du fer.

Les extraits de la plante *R. alaternus*, ainsi que son huile essentielle, ont été sélectionnés pour évaluer leur activité hémolytique sur les globules rouges humains durant 60min, dans le but d'étudier la cytotoxicité de cette plante. Les résultats ont montré que le pourcentage d'effet hémolytique augmente en fonction de la concentration. Le taux maximal (10,52 %) a été obtenu avec l'huile essentielle à une concentration de 25 mg/mL, tandis que l'extrait aqueux présente un taux d'hémolyse de 6,38 %, le plus élevé parmi tous les extraits testés. Les extraits éthanolique et hydroalcoolique présentent des taux d'hémolyse de 6,31 % et 5,66 %, respectivement et sont considérés comme moins toxiques que l'extrait aqueux.

En définitive, il est possible de conclure que notre plante renferme une quantité significative de métabolites secondaires qui lui en confèrent une valeur thérapeutique et médicinale importante. Toutefois, il est important de souligner que cette étude reste préliminaire et ne permet pas de déterminer de manière précise les mécanismes d'action de la plante. Par conséquent, il s'agit d'une première étape dans la recherche de substances biologiquement actives issues de sources naturelles.

Conclusion et perspective

Et comme perspectives, il est intéressant d'approfondir cette étude en :

- Isolant puis identifiant et caractérisant des molécules « principe actif » par les méthodes d'analyse (RMN, Spectrophotomètre de masse).
- Menant les expérimentations in vitro, sur un modèle animal.
- Elargissant le panel des activités biologiques in vitro et in vivo, et pourquoi pas réalisant d'autres tests biologiques : antidiabétique, anticancéreuse et anti-inflammatoire.

Références bibliographiques

- [1]. BENCHIHA W., Phyto-écologie et étude biochimique des composants phénoliques (traitement in vivo contre hépatite) de *Rhamnus alaternus* L. des monts de Tessala wilaya de Sidi Bel Abbes Thèse de doctorat. Université El Djillali Sidi Bel Abbes. Spécialité : Environnement ; p 7. **2016**.
- [2]. LIMONIER S., La phytothérapie de demain : les plantes médicinales au cœur de la pharmacie, département bio-ingénierie pharmaceutique, Aix, Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Marseille. **2018**.
- [3]. BEN GHANOU M, La phytothérapie entre la confiance et méfiance, Mémoire professionnel infirmier de la sante publique, institut de formation paramédical CHETTIA ; p : 9-19. **2009**.
- [4]. JUDD W.S., CAMPBELL C.S., KELLOGG E.A. et STEVENS P., Botanique Systématique : une perspective phylogénétique ; Ed 1 : DEBOECK ; p : 84-336. **2002**.
- [5]. WALTON N.J. et BROWN D.E.; Chemical from Plants: Perspectives on plant secondary products; Ed: WORLD SCIENTIFIC;p: 1-14. **1999**.
- [6]. KOUWELTON P., Applications des techniques de chromatographie et de spectroscopie dans l'identification des métabolites secondaires de trois plantes antidiabétiques et antihypertensives de la pharmacopée ivoirienne Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique Felix Houphoët Boigny. Spécialité : Chimie Organique et des Substances Naturelles ; p 18. **2018**.
- [7]. KERBOUCHE L., Composition chimique et activité biologique des huiles essentielles de quelques plantes des familles de labiacées et de cupressacées. Mémoire de Magister Ecole Nationale Supérieure Agronomique - El-Harrach – Alger. Spécialité : Sciences Alimentaires. **2010**.
- [8]. MEZOUAR D., Recherche d'activités biologiques de *Berberis vulgaris* Mémoire de Magister en Biologie. Université ABB –Tlemcen. Spécialité : Sciences biologiques. **2013**.
- [9]. GUINEBERT E., DURAND P., et al., Mesure de la résistance aux radicaux libres. *Sixièmes Journées de la Recherche Avicole* ; 554-558. **2005**.
- [10]. DURAND D., DAMON M. et al., "Le stress oxydant chez les animaux de rente : principes généraux." *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 48(5) : 218-224. **2013**.
- [11]. AMMAR R. B., BHOURI W., SGHAIER M. B., et al., Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus*L. (Rhamnaceae): A structure-activity relationship study. *Food Chem.* 116: 258-264. **2009**.
- [12]. BISMUTH C., BAUD F., CONSE F., et al., Toxicologie clinique. Flammarion Médecine Science, Paris, p. 956. **1987**.
- [13]. LOUFFAR I., MAHDJOUB S., Enquête ethnobotanique sur les plantes médicinales dans la wilaya de Boumerdes. Doctorat en Pharmacie. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. **2016**.

Références bibliographiques

- [14]. MADIGAN T., BrockBiology of Microorganisms 13th Edition. p. 804. **2010**.
- [15]. HADDOUCHIF., CHAOUCHET.M., HALLA N., Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie DOI 016-1086-8. **2016**.
- [16]. RAMEAU D., MANSION G., DUME C., Flore forestière française, guide écologique illustré, région méditerranéenne ministère de l'agriculture et de la pêche. Revue de Géographie Alpine p2426. **2008**.
- [17]. TSAHAR E., FRIEDMAN J., IZHAKI I., Impact on fruit removal and seed predation of a secondary metabolite, emodin, in *Rhamnus alaternus* fruit pulp. OIKOS.99 :290-299. **2002**.
- [18]. BEN GHEZALA, H., CHAOUALI, N., et al., Toxic Effects of *Rhamnus alaternus*: Case Report Emergency Mediteranean. Sou's press. **2015**.
- [19]. BEN AMMAR R., KILANI S., et al., Antiproliferative, Antioxidant, and Antimutagenic Activities of Flavonoid-Enriched Extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L. Combination with the Composition. Drug. Chem. Toxicol 31, 61-80. **2008**.
- [20]. HARRAR A., Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. Mémoire de Magister. Université Ferhat Abbas de Bejaia. Spécialité : Sciences biologiques. **2018**.
- [21]. MOUSSI K. ; NAYAK B. ; PERKINS L.B. ; et al., HPLC-DAD profile of phenolic compounds and antioxidant activity of leaves extract of *Rhamnus alaternus* L. Ind. Crop. Prod. 74, 858–866. **2015**.
- [22]. BHOURI, W., BEN SGHAIER, M., KILANI, S., et al., Évaluation de l'activité antioxydante et antigénotoxique de deux flavonoïdes de *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): Kaempférol 3-O- β -isorhamninoside et rhamnocitrine 3-O- β -isorhamninoside. *Chimie alimentaire. Toxicol.* 49, 1167–1173. **2011**.
- [23]. BERROUKCHE, A., KAHLOULA, K., SLIMANI, M., et al., Hepatoprotective effects of the decoction and macerated leaves of *Rhamnus alaternus* L. On rats exposed to carbon tetrachloride. *J. Pharmacogn. Phyther.* 7, 253–262. **2015**.
- [24]. AMMAR B., BOUHLEL I., VALENTI K., et al., Transcriptional response of genes involved in cell defense system in human cells stressed by H₂O₂ and pre-treated with (Tunisian) *Rhamnus alaternus* extracts: Combination with polyphenolic compounds and classic in vitro assays. *Chem. Biol. Interact.* 168, 171–183. **2007**.
- [25]. AMMAR B., KILANI S., BOUHLEL I., et al., Antiproliferative, antioxidant, and antimutagenic activities of flavonoid-enriched extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L., Combination with the phytochemical composition. *Drug Chem. Toxicol.* 31, 61–80. **2008**.
- [26]. BOUSSAHEL S., DAHAMNA S., AMAR Y., et al., Profil flavonoïde, activité antioxydante et cytotoxique de différents extraits d'écorce algérienne de *Rhamnus alaternus* L. *Pharmac. Mag.*, 11, S102–S109. **2015**.

Références bibliographiques

- [27]. BOUCHENAK O., YAHIAOUI K., et al., Criblage phytochimique et évaluation du pouvoir antioxydant des feuilles de *myrtus communis* l. Et *rhamnus alaternus* l. *Revue Agrobiologia*, 10, 1749-1761. **2020**.
- [28]. AMANA K., Les anacardiaceae du togo : Etudes botaniques, Ecologiques et propriétés antifongiques. Thèse de Doctorat de l'Université de Reims Champagne Ardenne. p : 182. **2007**
- [29]. SOULAMA S., SANON H O., et al., Teneur en Tanins de 15 ligneux fourrgrers de bourkinafaso. *Afrique Science*.10(4) :180-190. **2014**.
- [30]. KARAGÖZLER A., ERDAG CS., et ÇALMAZ EMEK Y., Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*. *Food Chem.*, 111: 400–407. **2008**.
- [31]. BOLIGON A.A., MACHADO M.M., ATHAYDE M.L., Tecknical evaluation of antioxydant activity. *Medicinal chemistry* 4517-522.**2014**.
- [32]. LI G.X., LIU Z.Q., The protective effects of ginsenosides of human erythrocytes against hemin-induced hemolysis. *Food and chemical toxicology*, 46(3), pp.886-892. **2008**.
- [33]. KALEMBA D., & KUNICKA A., Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicianl Chemistry*, 10: 813-829. **2003**.
- [34]. BURT S., - Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food and Microbiology*. 94 : 223-253. **2004**.
- [35]. WILLEIN J. P., Les Huiles Essentielles : Médecine d'Avenir. Editions du Dauphin. **2006**.
- [36] HAYOUNI E.A., ABEDRABBA M., et al., The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biologicalactivities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperusphoenicea* L. fruit extracts. *Food chemistry*, 105(3), 1126-1134. **2007**.
- [37] CHAUCHE T. M., HADDOUCHI F., et al., I. Antioxidant and hemolyticactivity of *Ziziphus jujuba* Mill and *Rhamnus alaternus* L (Rhamnaceae) extractsfrom Algeria. *Activité antioxydante et hémolytique des extraits de Ziziphus jujuba* Mill et *Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae) d'Algérie. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. **2020**.
- [38] NACOULMA O., OUEDRAGO Y et al., Evaluation in vivo et in vitro de la Toxicité des extraits aqueux d'écorces de tige et de racine de *Mitragynainermis* (Willd). O. (Rubiaceae) ; *Faculté des sciences et technique, Université de Ouagadougou*. **2001**.
- [39] BOUSSAHEL S., DAHAMNA S., et al., Phytochemical study and antioxydant activities of leaves extracts from *Rhamnus alaternus* L. *Pharmacognosy Communications* 3: 46-47. **2013**.
- [40] BENCHIHA, W., MAHROUG, S., et al., Activité antihépatotoxique des extraits des Références bibliographiques 42 feuilles de *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae). *Phytothérapie*, 15(1), 10-15. **2017**.
- [41] SHARMA P., SHARMA J.D., Hémolyse in vitro d'érythrocytes humains par des extraits de plantes à activité antiplasmodiale. *Journal d'ethnopharmacologie*. 74, 239–243. **2001**.

Références bibliographiques

[42] KARAGÖZLER A., ERDAG CS. Et al., Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechastate*. Food Chem., 111: 400–407. **2008**.

[43] KHETTAL, B., ZAIDI, A., et al., Effet des extraits de feuilles de *Rhamnus Alarnus* à activités antioxydant et antilipasique sur la masse corporelle et le métabolisme des lipides des souris nourries avec un régime enrichie en carbohydrates. Nutrition clinique et metabolism, 28 : S 149-150. **2011**.

Annexe

Annexe N° 01 : Test DPPH

➤ **Tableau 1 : Extrait aqueux**

Concentration (mg/mL)	0,8	0,4	0,26	0,2	0,16	0,13
DO	0,110	0,280	0,348	0,410	0,453	0,489
% PI	87	67	59	52	47	43

➤ **Tableau 2 : Extrait hydroalcoolique**

Concentration (mg/mL)	0,8	0,4	0,26	0,2	0,16	0,13
DO	0,087	0,263	0,324	0,365	0,412	0,470
% PI	90	69	62	57	52	45

➤ **Tableau 3 : Extrait éthanolique**

Concentration (mg/mL)	0,8	0,4	0,26	0,2	0,16	0,13
DO	0,210	0,322	0,416	0,451	0,505	0,540
% PI	75	62	51	47	41	37

➤ **Tableau 4 : Huile essentielle**

Concentration (mg/mL)	0,8	0,4	0,26	0,2	0,16	0,13
DO	0,260	0,343	0,386	0,398	0,430	0,479
% PI	67	67	51	49	45	39

➤ **Tableau 5 : Acide ascorbique**

Concentration (mg/mL)	0,2	0,1	0,06	0,05	0,04	0,03
DO (Acide ascorbique)	0,02	0,250	0,315	0,376	0,398	0,469
% PI	97	68	60	52	49	40

Annexe

Annexe N° 02 : Test FRAP

➤ **Tableau 6 : Extrait aqueux**

Concentration (mg/mL)	0,4	0,26	0,2	0,16	0,13
DO	0,759	0,420	0,334	0,307	0,249

➤ **Tableau 7 : Extrait hydroalcoolique**

Concentration (mg/mL)	0,4	0,26	0,2	0,16	0,13
DO	1,386	0,966	0,679	0,463	0,308

➤ **Tableau 8 : Extrait éthanolique**

Concentration (mg/mL)	0,4	0,26	0,2	0,16	0,13
DO	0,646	0,404	0,275	0,180	0,087

➤ **Tableau 9 : Huile essentielle**

Concentration (mg/mL)	0,4	0,26	0,2	0,16	0,13
DO	1,12	0,601	0,313	0,18	0,12

➤ **Tableau 10 : Acide ascorbique**

Concentration (mg/mL)	0,2	0,1	0,06	0,05	0,04	0,03
DO	2,501	2,003	1,532	1,434	1,384	1,231

Annexe

Annexe N° 3 : Evaluation de l'effet hémolytique

➤ Tableau 11 : Extrait aqueux

Concentration (mg/mL)	25 mg	12,5 mg	6,25 mg	3,12 mg	1,56 mg	T+	T-
DO	0,071	0,049	0,038	0,027	0,022	0,862	0,016
% PI	6,38	3,82	2,55	1,27	0,69		

➤ Tableau 12 : Extrait éthanolique

Concentration (mg/mL)	25 mg	12,5 mg	6,25 mg	3,12 mg	1,56 mg	T+	T-
DO	0,069	0,056	0,036	0,023	0,021	0,901	0,018
% PI	5,660	4,21	1,99	0,55	0,33		

➤ Tableau 13 : Extrait hydroalcoolique

Concentration (mg/mL)	25 mg	12,5 mg	6,25 mg	3,12 mg	1,56 mg	T+	T-
DO	0,075	0,057	0,040	0,029	0,024	0,860	0,020
% PI	6,31	4,30	2,32	1,04	0,46		

➤ Tableau 14 : Huile essentielle

Concentration (mg/mL)	25 mg	12,5 mg	6,25 mg	3,12 mg	1,56 mg	T+	T-
DO	0,112	0,100	0,096	0,087	0,060	0,912	0,016
% PI	10,52	9,21	8,71	7,78	4,82		

➤ Tableau 15 : Acide gallique

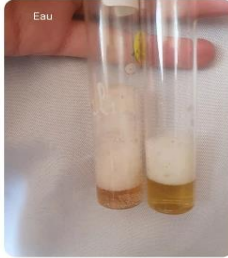
Concentration (mg/mL)	2 mg	1 mg	0,66 mg	0,50 mg	0,40 mg	T+	T-
DO	0,598	0,483	0,414	0,481	0,344	0,886	0,012
% PI	66,13	53,16	45,37	41,64	37,47		

Annexe 04 : Les tests phytochimiques

Extrait aqueux



Saponosides



Flavonoïdes



Tanins



Alcaloïdes

Extrait hydroalcoolique



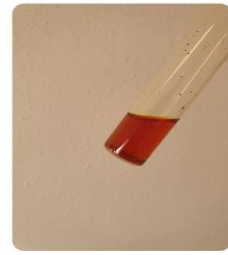
Saponosides



Flavonoïdes



Tanins



Hétérosides

Extrait éthanolique



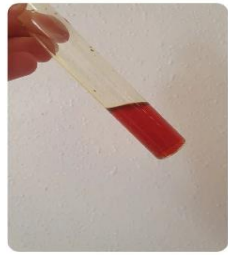
Saponosides



Tanins



Alcaloïdes



Hétérosides

Résumé

Notre travail a porté sur l'étude phytochimique et biologique de 3 extraits ainsi que de l'huile essentielle de la partie aérienne d'une plante médicinale algérienne, *Rhamnus alaternus*. L'étude phytochimique réalisée sur les 3 extraits en utilisant des solvants de différentes polarités (aqueux, éthanolique et hydroalcoolique) préparés sous reflux à chaud a permis de mettre en évidence la richesse de cette plante en métabolites secondaires, notamment les tannins, les flavonoïdes, les saponosides, les alcaloïdes et les hétérosides.

Partant de ces données, nous nous sommes intéressés à l'étude biologique. Dans un premier temps, nous avons étudié l'activité antioxydante de *Rhamnus alaternus*, par deux méthodes, à savoir (le piégeage du radical libre DPPH et la réduction de fer FRAP) qui ont montré que tous les extraits de la plante ainsi que son huile essentielle possèdent une activité antioxydante importante.

D'autre part, nous avons étudié la cytotoxicité de cette plante en évaluant l'activité hémolytique des extraits in vitro vis-à-vis des globules rouges humains. Les résultats montrent que cette plante possède un faible effet toxique sur les érythrocytes humains. L'effet hémolytique maximal est obtenu avec l'extrait aqueux (**6,38%**) et l'huile essentielle (**10,52%**)

Mots clé : *Rhamnus alaternus*, activité antioxydante, DPPH, FRAP, métabolites secondaires, effet hémolytique

Summary

Our work focused on the phytochemical and biological study of three extracts and essential oil from the aerial parts of an Algerian medicinal plant, *Rhamnus alaternus*. The phytochemical study, carried out on the three extracts using solvents of different polarities (aqueous, ethanolic, and hydroalcoholic) prepared under reflux, highlighted the richness of this plant in secondary metabolites, particularly tannins, flavonoids, saponins, alkaloids, and heterosides.

Based on these findings, we were interested in the biological study and evaluation of two biological activities of this plant. Firstly, we studied the antioxidant activity of *Rhamnus alaternus*, using two methods, namely the DPPH free radical scavenging assay and the FRAP iron-reducing capacity assay, which showed that all the plant extracts and its essential oil have antioxidant activity and iron-reducing capacity. Secondly, we studied the cytotoxicity of this plant by evaluating the hemolytic activity of the extracts in vitro against human red blood cells. The results showed that this plant has low toxic effects on human erythrocytes. The maximum hemolytic effect was obtained with the aqueous extract (6.38%) and the essential oil (10.52%).

Key word: *Rhamnus alaternus*, antioxidant activity, DPPH, FRAP, secondary metabolites, hemolytic activity

ملخص

ركز عملنا على الدراسة الكيميائية النباتية والبيولوجية لثلاثة مستخلصات وزيت أساسي للجزء الجوي من نبات طبي، الجزائري *Rhamnus alaternus*. إن الدراسة الكيميائية النباتية التي أجريت على المستخلصات الثلاثة باستخدام المذيبات ذات الأقطاب المختلفة (مائي، إيثانول و 50% ماء 50% إيثانول) محضرة تحت ارتجاع ساخن، جعلت من الممكن تسليط الضوء على ثراء هذا النبات في المستقبلات الثانوية، ولا سيما العفص، مركبات الفلافونويد والسابونوزيدات والقلويدات والجليكوسيدات.

بناءً على هذه البيانات، نحن مهتمون بالدراسة البيولوجية وتقييم نشاطين بيولوجيين لهذا النبات. في البداية درسنا النشاط المضاد للأكسدة في *Rhamnus alaternus* بطريقتين هما (محاصرة الجذور الحرة DPPH وتقليل الحديد FRAP والتي أظهرت أن جميع مستخلصات النبات بالإضافة إلى الزيت العطري لها نشاط مضاد للأكسدة والحديد. تقليل القدرة.

من ناحية أخرى، درسنا السمية الخلوية لهذا النبات أو قمنا بتقييم النشاط الانحلالي للمستخلصات في المختبر ضد خلايا الدم الحمراء البشرية. أظهرت النتائج أن هذا النبات له تأثير سام ضعيف على كريات الدم الحمراء البشرية. يتم الحصول على أقصى تأثير انحلالي باستخدام المستخلص المائي (6.38%) والزيت العطري (10.52%).

الكلمة الأساسية: *Rhamnus alaternus*، النشاط المضاد للأكسدة، DPPH، FRAP، المستقبلات الثانوية، النشاط الانحلالي