



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة عمار ثليجي بالأغواط

Université Amar Telidji Laghouat

كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم علوم المادة

Département des Sciences de la Matière



Mémoire de MASTER

Domaine : Sciences de la matière

Filière : Chimie

Option : Chimie organique appliquée

Par :

BENLHORMA Sarah

THEME

Caractérisation phytochimique et évaluation des propriétés antioxydantes d'une plante saharo-algérienne : *Hammada elegans*

Soutenu publiquement le devant le jury composé de :

M ^r . Mohamed YOUSFI	Professeur	Président
M ^{me} . Chahrazed HAMIA	MCB	Examinatrice
M ^{me} . Zineb HADBAOUI	MCB	Examinatrice
M ^r . Amar DJERIDANE	MCA	Rapporteur

Année Universitaire 2015/2016

Dédicaces

Premièrement, merci à mon Dieu qui m'a permis de faire cette modeste étude.
À celle qui m'a comblé d'amour et de tendresse, et qui pense souvent à moi, chère
Maman.
À la mémoire de mon Cher père.
À ceux qui ont veillé et qui ont sacrifié pour m'apprendre et m'agrandir.
À mes frères et mes sœurs que Dieu les protège.
À ma meilleure amie Nadjat.
À tous les professeurs de département des Sciences de la Matière l'université
de Laghouat.
À Khadidja, Fati, Sawsane et à tous mes amis et collègues d'études.
À tous ceux qui ont participé dans ce travail de prêt ou de soin.
Et à tous ceux qui me sont chers.
Je leur offre cette Modeste étude.

SARAH BENLHORMA

Remerciements

Je remercie en premier lieu le Dieu miséricordieux qui m'a donné La force d'achever ce travail.

C'est avec un grand respect et une gratitude que je transmets mes vifs remerciements à tous ceux qui m'ont aidé à avoir l'opportunité de réaliser ma mémoire dans de si bonnes conditions.

Je veux tout d'abord remercier particulièrement Mon directeur de Mémoire, Monsieur Amar DJERIDANE Maître de conférences A à l'université Amar Telidji de Laghouat, d'avoir accepté de m'encadrer et de m'avoir donné la chance de bénéficier de ses connaissances scientifiques et ses conseils, je lui adresse également mes remerciements distingués de m'avoir consacré son temps précieux, pour ses critiques constructives, son enthousiasme et ses qualités personnelles et professionnelles. Qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect.

Je remercie également Monsieur le professeur Mohamed YOUSFI, et tous les membres du laboratoire des sciences fondamentales à l'université Amar Telidji de Laghouat de m'avoir accueilli au sein de leurs laboratoires et pour leur précieuse aide.

Je voudrais remercier également Madame Sawsan LABIOTH, de m'avoir suivi et dirigé tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Je souhaite également remercier les membres du jury, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et pour le temps qu'ils ont consacré à l'examen de ce mémoire.

En fin, Un grand merci aussi pour mes enseignements, qui pendant les années du cursus universitaire.

Liste Des Notations

F	:	Fleurs
AR	:	Partie aérienne sans fleurs
µl	:	Microlitre
Abs_{éch}	:	Absorbance en présence d'antioxydant (Extrait ou standard)
Abs_t	:	Absorbance en absence d'antioxydant (contrôle négatif)
CCM	:	Chromatographie sur couche mince
EC₅₀	:	Concentration de l'extrait nécessaire pour inhiber 50% de radicaux libres
GAE	:	Equivalente en acide gallique
M	:	Molaire
nm	:	Nanomètre
UV-Vis	:	Ultra violet-Visible
R (%)	:	Rendement d'extraction
DPPH	:	Diphényl picryl-hydrate
TBHQ	:	Tertiobutylhydroquinone
EDTA	:	Acide EthyleneDiamineTetraAcétique
PAR	:	Pouvoir antiradicalaire
PR	:	Pouvoir réducteur
PC	:	Pouvoir chélateur

Liste Des Figures

Figure 1	: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	13
Figure 2	: Pouvoir antiradicalaire de la fraction diéthylétherique de la partie aérienne de <i>Hammada elegans</i> mesuré par le test de DPPH	24
Figure 3	: Pouvoir réducteur de l'extrait diéthylétherique des fleurs de <i>Hammada elegans</i> mesuré par le test du CUPRAC	28
Figure 4	: Corrélation entre le test du DPPH et le test du CUPRAC	29
Figure 5	: Pouvoir chélateur de l'extrait diéthylétherique de la partie aérienne de <i>Hammada elegans</i>	30
Figure 6	: Corrélation entre les valeurs d'EC ₅₀ mesuré par le test de chélation et leur rendement d'extraction	32
Figure 7	: Photos des plaques CCM avant pulvérisation par les réactifs de révélaion visualisée sous UV à 366 nm	38
Figure 8	: Photos des plaques CCM après pulvérisation par le réactif de Molish	39
Figure 9	: Photos des plaques CCM après pulvérisation par le réactif de Godin	40
Figure 10	: Photos des plaques CCM après pulvérisation par le réactif de Liebermann-Burchard	41
Figure 11	: Photos des plaques CCM après pulvérisation par l'acétate de plomb	42
Figure 12	: Photos des plaques CCM après pulvérisation par le Chlorure d'aluminium	43
Figure 13	: Photos des plaques CCM après pulvérisation par le réactif de Dragendorff	44
Figure 14	: Photos des plaques CCM après pulvérisation par le FeCl ₃	45

Liste Des Tableaux

Tableau 1	: La plante investiguée et son utilisation en médecine traditionnelle	3
Tableau 2	: Standards et réactifs utilisés dans ce travail	4
Tableau 3	: Aspect, couleurs et rendement d'extraction	12
Tableau 4	: Résultats du screening phytochimique	14
Tableau 5	: Rapports frontaux et couleurs des taches avant pulvérisation par les réactifs de révélation visualisée sous UV à 366	17
Tableau 6	: Rapports frontaux et couleurs des taches après pulvérisation par le chlorure d'aluminium.	17
Tableau 7	: Rapports frontaux et couleurs des taches après pulvérisation par le réactif de Godin	18
Tableau 8	: Rapports frontaux et couleurs des taches après pulvérisation par le réactif de Dragendorff	19
Tableau 9	: Rapports frontaux et couleurs des taches après pulvérisation par le réactif de Liebermann-Burchard	20
Tableau 10	: Rapports frontaux et couleurs des taches après pulvérisation par le FeCl_3	21
Tableau 11	: Rapports frontaux et couleurs des taches après pulvérisation par le réactif de Molish	21
Tableau 12	: Rapports frontaux et couleurs des taches après pulvérisation par l'acétate de plomb	22
Tableau 13	: Les valeurs des EC_{50} des différents tests pour chaque extrait	25

ملخص

اظهر التحليل الفيتو كيميائي للأزهار و الجزء الخارجي (بدون ازهار) لنبات *Hamada elegans* والذي اجري لأول مرة, وجود saponines, composés réducteurs, alcaloïdes, flavonoïdes, tanins catéchiques et galliques, stérols et triterpènes, hétérosides cardiotoniques et c-hétérosides اما بالنسبة ل anthracéniques combinés et les coumarines فهي تتواجد على مستوى الجزء الخارجي للنبات. اثبتت التحاليل الكيفية بواسطة التحليل الكروماتوغرافي ذو الطبقة الرفيعة (CCM) وجود هذه المركبات في جزئي *Hamada elegans*. كما بينت النتائج وجود الفينولات بمقادير متغيرة, حيث تركزت اكبر قيمة لهذه المركبات في المستخلص الميثانولي للأزهار بقيمة تقدر ب $2,661 \pm 0,028$ ميلليغرام مكافئ من حمض الغاليك / غرام من المادة الجافة.

تمت دراسة الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصات *Hamada elegans* بثلاث طرق *in vitro* وهي اختبار DPPH، اختبار ارجاع النحاس (CUPRAC) واختبار كمش الحديد الثنائي. بينت الطريقة الاولى فعالية مضادة للجذور جد مهمة لمستخلص اثيل الاثير للجزء الخارجي $EC_{50} = 0,46 \pm 0,05$ ميلليغرام / ميليلتر مقارنة بالمستخلصات الاخرى. اما عند مقارنة هذه الفعالية بمضادات الاكسدة المرجعية فتمتلك هذه المستخلصات نشاط اقل. تبين من خلال نتائج الطريقة الثانية ان مستخلص اثيل الاثير للأزهار يمتلك احسن فعالية إرجاعية $EC_{50} = 2,67 \pm 0,001$ ميلليغرام/ ميليلتر مقارنة بالمستخلصات الاخرى, بينما تكون هذه الفعالية اقل مقارنة بحمض الاسكوربيك و TBHQ. فيما يخص نشاط كمش الحديد, اظهرت النتائج ان مستخلصات اثيل الاثير و الاسيتون لكلا جزئي النبات تمتلك احسن فعالية كمشية مقارنة ب TBHQ. و اخيرا اظهرت نتائج الفعل المضاد للأكسدة لنبات *Hamada elegans* ان المستخلص الاسيتوني للجزء الخارجي يعتبر الاكثر نشاطا, و يمكن ربط هذا الفعل لغنى هذا المستخلص ب *alcaloïdes*, *tanins catéchique* و *flavonoides*.

في الاخير تعتبر النتائج المتحصل عليها مشجعة. كما تسمح نتائج تحليل هذه المستخلصات بطريقة التحليل الكروماتوغرافي ذو الطبقة الرفيعة (CCM) الى استكمال و تعميق هذا العمل من خلال دراسة فيتو كيميائية معمقة و ذلك من اجل ايجاد مركبات علاجية جديدة.

الكلمات المفتاحية : (العجرم) *Hammada elegans*, المسح الفيتو كيميائي, كروماتوغرافي ذو الطبقة الرفيعة (CCM), الفعل المضاد للأكسدة.

Résumé

Le screening phytochimique des fleurs et des parties aériennes (sans fleurs) de *Hammada elegans*, effectuée pour la première fois, a révélé la présence des saponines, des composés réducteurs, des alcaloïdes, des flavonoïdes, des tanins catéchiques et galliques, des stérols et triterpènes, des hétérosides cardiotoniques et des c-hétérosides. Quant aux anthracéniques combinés et les coumarines, ils sont présents seulement dans les parties aériennes. Les analyses qualitatives des extraits par CCM ont confirmé la présence de ces composés dans les deux parties de *Hammada elegans*. La teneur en phénols totaux est largement variable et dépendante aux solvants d'extraction. L'extrait méthanolique brut des fleurs a présenté la teneur la plus élevée ($2,661 \pm 0,028$ mg GAE/g)

L'activité antioxydante *in vitro* des extraits de *Hammada elegans* a été évaluée par le test de DPPH, le test de réduction de cuivre (CUPRAC) et le test de chélation du fer. La première méthode a montré une activité antiradicalaire très importante de la fraction diéthylétherique de la partie aérienne ($EC_{50} = 0,46 \pm 0,05$ mg/ml) par rapport aux autres extraits. Mais comparativement aux antioxydants de référence, tous les extraits testés ont des activités antiradicalaires faibles. Cependant, nous avons constaté dans la seconde méthode que l'extrait diéthylétherique des fleurs présente une capacité intéressante ($EC_{50} = 2,67 \pm 0,001$ mg/ml) par rapport aux autres extraits, mais faible à celles de l'acide ascorbique et le TBHQ. Les résultats du pouvoir de chélation des ions Fe^{2+} , nous ont permis de constater que les extraits diéthylétheriques et acétoniques des deux parties de la plante présentent des pouvoirs chélateurs supérieur à celui du contrôle positif (TBHQ). Toutefois, l'extrait acétonique de la partie aérienne de *Hammada elegans* s'est avéré le plus actif. Son effet antioxydant semble être lié à sa richesse en alcaloïdes, en flavonoïdes et en tanins catéchiques.

Néanmoins, les résultats obtenus sont encourageants, et l'analyse des différents extraits par CCM, nous conduira dans la perspective future, de compléter et d'approfondir ce travail par une étude phytochimique avancée afin d'identifier de nouveaux agents thérapeutiques.

Mots clés: *Hammada elegans*, Screening phytochimique, CCM, Activité antioxydante.

Abstract

The phytochemical screening of flowers and aerial parts (without flowers) of this plant, performed for the first time, revealed the presence of saponins, reducing compounds, alkaloids, flavonoids, catechic and gallic tannins, sterols and triterpenes, cardiac glycosides and C-glycosides. But, the combined anthracene and coumarins, they are present only in the air aerial parts. Qualitative analysis of extracts by TLC confirmed presence of these compounds in the two parts of *Hammada elegans*. The total phenolic content was widely *variable* and depending on extraction solvents. The crude methanolic extract of flowers presented the highest content (2.661 ± 0.028 mg GAE / g)

The *in vitro* antioxidant activity of *Hammada elegans* extracts was assessed by the DPPH assay, the CUPRAC assay and iron chelating assay. The first method showed an important antioxidant activity of the diethyletheric fraction of the aerial part ($EC_{50} = 0.46 \pm 0.05$ mg/ml) compared to other extracts. But comparatively to the standards, all the extracts have low radical scavenging activities. However, in the CUPRAC assay the diethyletheric extract from flowers part has an interesting ability ($EC_{50} = 2.67 \pm 0.001$ mg/ml) comparatively to the other extracts, but lower than those of ascorbic acid and TBHQ. The results of the *chelating effect* on ferrous *ions* of the extracts show clearly that diethyletheric and acetonic extracts of the two plant parts have chelating powers greater than that of the positive control. However, the acetonic extract of the aerial part of *Hammada elegans* proved to be the most active in the three assays. Its antioxidant effect seems to be related to the relative richness in active principles (alkaloids, flavonoids and catechic tannins).

Nevertheless, the results are encouraging, and TLC analysis of various extracts, lead us into the future prospects, to complete and deepen this work by a phytochemical study advanced to fractionate, isolate and identify individual molecules in order to find therapeutic active molecules.

Keywords: *Hammada elegans*, Phytochemical screening, CCM, Antioxidant activity

Sommaire

Liste des notations

Liste des figures

Liste des tableaux

I. Introduction	1
II. Matériels et méthodes	3
II.1. Matériels	3
II.1.1. Matériel végétal	3
II.1.2. Standard et réactifs	3
II.2. Méthodes	4
II.2.1. Préparation des extraits	4
II.2.2. Dosage des phénols totaux	5
II.2.3. Screening phytochimique des extraits	5
II.2.3.1. Les tanins	5
II.2.3.2. Les alcaloïdes	5
II.2.3.3. Les anthocyanes	6
II.2.3.4. Les flavonoïdes	6
II.2.3.5. Les saponines	6
II.2.3.6. Les dérivés anthracéniques libres	6
II.2.3.7. Les dérivés anthracéniques combinés	6
II.2.3.7.a.O-hétérosides	6
II.2.3.7.b.O-hétérosides à génines réduites	7
II.2.3.7.c.C-hétérosides	7
II.2.3.8. Les composés réducteurs	7

II.2.3.9. Les coumarines	7
II.2.3.10. Les stérols et triterpènes	8
II.2.3.11. Les hétérosides cardiotoniques	8
II.2.4. Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince (CCM)	8
II.2.5. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits	9
II.2.5.1. Effet scavenger du radical DPPH	9
II.2.5.2. Réduction du cuivre (CUPRAC)	10
II.2.5.3. Chélation du fer ferreux	10
III. Résultats et discussion	11
III.1. Quantification des composées phénoliques	11
III.2. Analyse phytochimique des extraits	14
III.3. Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince (CCM)	16
III.4. Evaluation de l'activité antioxydante	24
IV. Conclusion générale	33
V. Références Bibliographiques	35
VI. Annexes	38
VI.1. Photos des plaques CCM	38
VI.2. Figures du pouvoir antiradicalaire des extraits mesurés par le test du DPPH	46
VI.3. Figures du pouvoir chélateur du fer ferreux des extraits	54
VI.4. Figures du pouvoir réducteur des extraits mesurés par le test de CUPRAC	55

I. Introduction

Au cours des dernières décennies, les recherches scientifiques les plus modernes n'ont fait que confirmer le bien-fondé des vertus thérapeutiques de la plupart des plantes médicinales utilisées de façon empirique depuis des millénaires. La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme. 75 % des médicaments ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins une plante ou une molécule active d'origine végétale. La recherche des principes actifs extraits des plantes est d'une importance capitale car elle a permis la mise au point de médicaments essentiels **(Djeridane A., 2008)**.

Les plantes contiennent des métabolites secondaires et primaires qui peuvent être définis comme des molécules essentielles à la vie des plantes. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits. Les plus représentés sont les polyphénols, les huiles essentielles, les lipides et les alcaloïdes **(Boizot N. et Charpentier J., 2006)**.

L'évaluation de la valeur thérapeutique de ces métabolites fait l'objet de nombreuses recherches et amène à l'identification des principaux éléments actifs de la plante, les propriétés pharmacologiques et thérapeutiques. Ainsi, l'industrie pharmaceutique s'appuie largement sur la diversité et les propriétés biologiques des métabolites secondaires végétaux pour le développement de nouveaux médicaments **(Salem J., 2009)**. Ils ont été utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicaux **(Baharun T., 1997)**.

Cependant, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme antioxydants, demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquentes ou non connues dans la médecine et les traditions médicinales folklorique. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs. En effet, les métabolites secondaires font et restent l'objet de nombreuses recherches *in vivo* comme *in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels les composés phénoliques, les saponosides et les huiles essentielles **(Salem J., 2009)**.

La recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs *via* le screening de sources naturelles a résulté dans la découverte d'un grand nombre de médicaments utiles qui commencent à jouer un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines. Cette recherche doit être entreprise au sein de la biodiversité végétale en se servant de données ethnopharmacologiques. Cette approche permet de sélectionner des plantes potentiellement actives et d'augmenter significativement le nombre de découvertes de nouveaux actifs d'où la nécessité et l'importance de ce travail de recherche **(Bahorun., 1997)**.

L'Algérie est considérée parmi les pays connus pour leur diversité taxonomique vu sa position biogéographique privilégiée et son étendu entre la Méditerranée et l'Afrique sub-saharienne. La flore algérienne est potentiellement riche, beaucoup d'espèces endémiques peuvent y être. Cependant, seules quelques dizaines de ces espèces sont effectivement exploitables. Néanmoins, l'exploitation de ce patrimoine souffre d'un manque de connaissances précises aussi bien sur les potentialités en phytomasse de la matière végétale que sur la nature chimique de ses extraits.

Dans cette optique d'évaluation scientifique du potentiel médicinal des plantes, nous avons choisi d'étudier une plante de la région de Laghouat de la famille des *Chenopodiaceae* : *Hammada elegans*. Le choix de cette plante a été dicté par un facteur important : l'étude de cette plante est encore rare et fragmentaire et elle n'a jamais été étudiée auparavant du point de vue phytochimique. Cette étude est une contribution à l'exploration phytochimique et biologique de la flore Algérienne qui reste peu exploitée. Elle vise à renforcer la connaissance phytochimique de cette plante afin de mettre en évidence des traceurs spécifiques en vue de l'utilisation ultérieure de leurs extraits dans l'industrie.

C'est dans cette optique que se situe notre travail de mémoire qui s'attèle à l'étude phytochimique de la plante *Hammada elegans* poussant à l'état spontané dans la région de Laghouat et à évaluer l'activité antioxydante de leurs extraits. Le programme de recherche s'articule autour de deux axes principaux. Le premier axe porte sur l'étude phytochimique des différents extraits issus des différentes parties de la plante. Tandis que, le second axe sera focalisé sur l'examen de l'activité antioxydante de ces extraits par la mesure *in vitro* de leur pouvoir chélateur de fer à l'aide de test au FRAP, leur capacité de moduler le système redox, en évaluant la réduction du cuivre : test CUPRAC et leur pouvoir du piégeage du radical libre DPPH.

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériels

II.1.1. Matériel végétal

La plante est récoltée dans la région de Sidi Makhlouf à 40 km du centre-ville de la wilaya de Laghouat au mois de Septembre 2015 (**Tableau 1**). La plante investiguée est séchée à l'abri de la lumière pendant 1 mois, et à température ambiante. Après, nous avons séparé les fleurs de la partie aérienne afin d'obtenir deux parties (Fleurs : F et partie aérienne : AR).

Tableau 1 : La plante investiguée et son utilisation en médecine traditionnelle

Description de la plante	Photo
Famille : Chenopodiaceae Nom latin : <i>Hammada elegans</i> Nom vernaculaire : El Ajrame Plante aux rameaux grêles et charnus, articulés, dressés, très nombreux. Les rameaux foncent et noircissent en séchant. Les rameaux âgés sont gris-brun et les rameaux nouveaux sont d'un vert légèrement blanchâtre. Feuilles opposées très petites en triangle des principales caractéristiques de <i>Hammada elegans</i> est sa très grande résistance à la sécheresse. Elle est connue dans plusieurs pays sahariens (Algérie, Arabie Saoudite et le Kuwait). Utilisation dans la médecine traditionnelle : Elle est utilisée par les habitants de la région pour soigner les maladies abdominales.	

II.1.2. Standard et réactifs

Tous les produits utilisés dans ce travail sont d'un grade analytique élevé (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Réactifs utilisés dans ce travail

Produit	Firme
CCM analytique ; Acide chlorhydrique (37%), Chloroforme, Chlorure de mercure	Fluka
Na ₂ CO ₃ ; Fer(II) sulfate7-hydrate (FeSO ₄ .7H ₂ O)	Pearce
Acide gallique ; Réactif de folin-ciocalteu	Sigma
L'éthanol ; le Cyclohexane ; l'Hexane, le Sulfate de sodium anhydre	Biochem
Méthanol	Carlo Erba
Di-ethylether ; HCl (acide chlorhydrique 37%)	Riedel de Haën
Acide formique 90%	BHD
Papier filtre qualitative Ø15cm	
Acétone, l'acide sulfurique, acétate d'éthyle, Ammoniac, Iode, Iodure de potassium, chlorure de fer, Magnésium pure, vanilline.	Sigma- Aldrich
Anhydride acétique, acide acétique, réactif de Fehling	Prolabo
Nitrate de bismuth	Laboratory reagent

II.2. Méthodes

II.2.1. Préparation des extraits

Dans notre travail nous avons choisi l'extraction à chaud « Soxhlet » qui est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant brut jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première.

Après avoir broyé finement chaque partie de la plante une masse d'environ 40g a été extraite par 7 systèmes de solvants de polarité croissante : Hexane (0,0) ; Di-Ethyle Ether (2,8) ; Chloroforme (4,1) ; Acétone (5,4) ; Méthanol (6,6). Eau (9,0) ; Eau acidifié par H₂SO₄ à 10 % (Les valeurs entre parenthèses indiquent les indices de polarité par rapport à l'eau).

Après chaque extraction, le solvant utilisé est évaporé sous vide à l'aide d'un Rotavapeur. Ensuite, le résidu récupéré est pesé puis solubilisé dans des volumes différents des solvants adéquats. Les extraits ainsi obtenus sont conservés à 4°C jusqu'à leur analyse.

II.2.2. Dosage des phénols totaux

Le dosage des phénols totaux a été effectué par une méthode adaptée de Singleton et Ross avec le réactif de folin-Ciocalteu (**Boizot N. et Charpentier J., 2006**). 100 µl de chaque extrait ont été introduits à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 500µl du réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué) plus 2 ml de carbonates de sodium Na_2CO_3 à 5% ont été ajoutées, puis les solutions ont été secouées immédiatement et sont maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 760 nm contre un blanc sur un spectrophotomètre UV/Visible (Shimadzu 1800). La teneur en composés phénoliques de chaque extrait a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage de l'acide gallique et exprimée en milligrammes par gramme de la matière sèche équivalent en acide gallique

II.2.3. Screening phytochimique des extraits

Nous avons déterminé la composition chimique de la plante par une étude basée sur des tests de solubilité, des réactions de coloration et de précipitation ainsi que par des examens en lumière ultraviolette.

II.2.3.1. Les tanins

2 mL d'une solution diluée des extraits de concentration 1 g/L a été placée dans un tube à essai. Ensuite, on ajoute quelques gouttes du chlorure ferrique (1%) à l'extrait diluée. En présence de tanins galliques on observe une coloration bleue noire alors qu'en présence de tanins catéchiques cette coloration est brune verdâtre (**Rizk A., 1982**).

II.2.3.2. Les alcaloïdes

Grace aux réactifs généraux de caractérisation des alcaloïdes nous en avons utilisé deux tests à savoir le réactif de Mayer et le réactif de Wagner car certains alcaloïdes peuvent être sensibles à certains tests et non détectables par d'autres (**Randerath K., 1971**). 1mL d'extrait dilué de concentration 1g/L a été introduit dans des tubes à essai, puis 5 gouttes du réactif de

Mayer ou de 2 gouttes du réactif de Wagner ont été ajoutées. Après l'agitation, on laisse les solutions séjourner pendant 24h. Après la centrifugation avec une vitesse de 2000 r/min pendant 5 min, s'il apparaît un précipité blanc jaunâtre avec le réactif de Mayer ou un précipité brun avec le réactif de Wagner, c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes (**Paris M., 1969**).

II.2.3.3. Les anthocyanes

2mL de solution d'HCl (2N) a été ajouté à 1mL d'extraits diluée de concentration 1g/L. Ensuite, on ajoute quelques gouttes d'ammoniac concentré. En présence des anthocyanes on observe une coloration rose ou rouge qui vire au bleu-violacé (**Debry M., 1971**).

II.2.3.4. Les flavonoïdes

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 1 mL de l'extrait diluée (1g/L) avec 1 mL d' AlCl_3 (2%). Après 15 min d'incubation à la température ambiante les flavonoïdes sont mis en évidence si une couleur jaune s'apparaît (**Debray M., 1971 ; Paris M., 1969**).

II.2.3.5. Les saponines

Pour mettre en évidence les saponines, nous avons introduit 2mL de la solution diluée (1g/l) de chacun d'extraits dans des tubes à essais. Chaque tube est agité pendant 15 secondes puis, laissé au repos pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante supérieure à 1cm indique la présence des saponines (**Trease E., 1987**).

II.2.3.6. Les dérivés anthracéniques libres

1ml de chacun d'extraits dilués de concentration de 1 g/L est ajouté à 1ml de NH_4OH 10 fois diluée. Après l'agitation pendant 15 secondes, la coloration plus ou moins rouge indique la présence d'anthracéniques libres (**Diallo A., 2005**).

II.2.3.7. Les dérivés anthracéniques combinés

II.2.3.7. a.O-hétérosides

On ajoute 2mL de chloroforme à 2mL de chaque extrait dilué de concentration (1g/L). Ensuite, on soutire la phase organique et on l'introduire dans un tube à essai puis on ajoute

1mL de NH_4OH 10 fois dilué. Après l'agitation, la présence d'anthraquinones est relevée par la coloration rouge plus ou moins intense (Diallo A., 2005).

II.2.3.7. b.O-hétérosides à génines réduites

3 à 4 gouttes de FeCl_3 à 10% a été ajouté à 1mL de chaque extrait dilué de concentration 1g/L ; puis, on chauffe pendant 5 min au bain marie à 100 C°. Après refroidissement, on ajoute 2ml de chloroforme. Ensuite, on ajoute 1mL de NH_4OH 10 fois dilué à la phase organique. En présence de produits d'oxydation des anthranols ou des anthrones, une coloration rouge intense apparaît. (Diallo A., 2005).

II.2.3.7. c. C-hétérosides

On reprend la phase aqueuse qui a été conservé au cours de la caractérisation des O-hétérosides par 1mL d'eau distillée et on ajoute 1ml de FeCl_3 à 10%. Ensuite, on introduit les tubes à essai dans un bain marie bouillant pendant 30 min, puis on laisse à refroidir et on ajoute ensuite 1mL de chloroforme. Après, on ajoute 1mL de NH_4OH 10 fois dilué. Une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence de génines de C-hétérosides (Diallo A., 2005).

II.2.3.8. Les composés réducteurs

A 1 mL de la solution à analyser de concentration 1g/L, on ajoute 20 gouttes de réactifs de Fehling puis on chauffe dans un bain marie à 100 C° pendant 1h. L'obtention d'un précipité rouge brique indique la présence de composés réducteurs (Trease E., 1987).

II.2.3.9. Les coumarines

1 ml de chaque extrait de concentration 1g/L est placé dans un tube à essai. Le tube est recouvert avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et porté à l'ébullition dans un bain marie pendant quelques minutes. Ensuite, 0,5 ml de NH_4OH 10% dilué a été ajouté et deux taches ont été mises sur un papier filtre qui sont examinées sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines (Rizk A., 1982).

II.2.3.10. Les stérols et triterpènes

On mélange 1mL de chaque extrait dilué de concentration 1g/L avec 0,5 mL de l'anhydride acétique, puis on ajoute acide sulfurique. En cas de réaction positive il se forme un anneau rouge-brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides (Trease E., 1987).

II.2.3.11. Les hétérosides cardiotoniques

Nous avons extrait au chloroforme la solution préparée et partagé la phase organique entre un tube à essai, évaporé à sec et repris les résidus avec l'isopropanol. Nous avons introduit ensuite avec le réactif de Baljet (acide picrique à 1%). Enfin nous avons introduit 5 gouttes de KOH à 5% dans l'éthanol. La présence de cardénolides se traduit par une coloration orange.

II.2.4. Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince (CCM)

Après l'extraction, une CCM analytique a été réalisée pour avoir une idée sur les différents composés existants dans les 14 extraits bruts. La séparation a été effectuée en utilisant une plaque CCM de dimension 10x10cm en gel de silice avec trois systèmes de solvant différents selon l'extrait séparé.

Système 1 : (Diéthyléther / Ether de pétrole / Acide acétique) (6 / 4 / 0,1) (v : v : v) ; pour les extraits de l'hexane, de diéthyléther et de chloroforme,

Système 2 : (Diéthyléther / Ether de pétrole / Acide acétique) (7 / 3 / 0,1) (v : v : v) ; pour l'extrait acétonique.

Système 3 : (Acétonitrile / Cyclohexane / Ethanol) (2 / 2 / 6) (v : v : v) ; pour l'extrait méthanolique.

Système 4 : (Acétone / Méthanol / Eau / Acide acétique) (3 / 4 / 3 / 0,1) (v : v : v : v) ; pour les extraits aqueux.

Après migration, la plaque est séchée à l'air libre et révélée par une lampe UV à une longueur d'onde $\lambda = 366$, avant et après révélation par les réactifs appropriés. Les réactifs utilisés pour le présent travail sont ; le NH_3 , l' AlCl_3 et le réactif de Godin (révélateurs des flavonoïdes), le réactif de Dragendorff (révélateur des alcaloïdes), le réactif de Liebermann-Burchard (révélateur des stérols et terpènes), le FeCl_3 (révélateur des tanins), le réactif de molish (révélateur des sucres réducteurs) et l'acétate de plomb (révélateur des coumarines).

II.2.5. Evaluation de l'activité antioxydant des extraits

L'activité antioxydante est définie comme étant la capacité d'un système à piéger des radicaux libres ou à réguler le système redox, défendant ainsi l'organisme contre la dégradation oxydative. Des nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des composés purs ou des extraits. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Dans notre étude nous avons utilisé trois différents tests chimiques *in vitro* à savoir : le test de DPPH, le test de chélation du fer ferreux et le test de réduction du cuivre.

Les mesures de densités optiques en présence de chaque solution d'extrait à différentes dilutions nous ont permis d'exprimer le pouvoir antioxydant par le paramètre EC_{50} qui représente la concentration de l'antioxydant nécessaire pour :

- Balayer 50% de radicaux libre totaux (test de DPPH),
- Chélater 50% des ions du fer ferreux initialement introduits (test de chélation),
- Réduire 50% des ions cuivrique totaux (test du CUPRAC).

Les valeurs des EC_{50} sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes représentant la variation des pourcentages d'activité antioxydante en fonction de différentes concentrations des fractions testées. Nous avons également, testé la vitamine C et le TBHQ (Tertiobutyl-hydroxyquinone) comme antioxydants de référence.

II.2.5.1. Effet scavenger du radical DPPH

Pour étudier l'activité antiradicalaire des différents extraits, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH (2,2 DiPhényle-1-Picryl-Hydrazyle) comme un radical libre relativement stable (**Mansouri A., 2005**). Dans ce test les antioxydants réduisent le radical DPPH[•] ayant une couleur violette en un composé jaune, le 2,2-diphénylpicryl-1-hydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (**Sanchez-Moreno C., 2002**). Brièvement, 1 ml des solutions d'extraits ou standards (vitamine C, TBHQ) sont ajoutés à 1 ml de DPPH (60 μ M), puis le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif est mesurée à 517 nm. Le pouvoir antiradicalaire (PAR) est estimé selon l'équation ci-dessous :

$$\text{PAR \%} = [(\text{Abs}_t - \text{Abs}_{\text{éch}}) / \text{Abs}_t] \times 100$$

Où ;

Abs_t : absorbance en absence d'antioxydant (contrôle négatif).

$\text{Abs}_{\text{éch}}$: absorbance en présence d'antioxydant (Extrait ou standard).

II.2.5.2. Réduction de cuivre (CUPRAC)

L'évaluation de la capacité réductrice de nos échantillons a été effectuée à l'aide du test de CUPRAC. La méthode CUPRAC (Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) est basée sur le suivie de la diminution de l'absorbance accrue du complexe Néocuproïne (Nc)-ions cuivrique [$\text{Nc}_2\text{-Cu}^{2+}$]. En effet, en présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre-néocuproïne est réduit et cette réaction est quantifié spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 456 nm (Apak R., 2004).

Dans un tube à essai, 1 ml de tampon acétate d'ammonium (1 M, pH 7) est mélangé avec 100 μl de l'extrait à tester, 500 μl de Néocuproïne (7,2 mM) et 500 μl de CuCl_2 (0,01 M). Le mélange est incubé pendant 30 min à 37°C. Le complexe réduit [$\text{Cu}^{2+}\text{-Nc}$] est quantifié spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 456 nm. L'effet antioxydant des différents composés testés a été exprimé en pouvoir réducteur (PR %) estimé selon l'équation ci-dessous :

$$\text{PR \%} = [(\text{Abs}_t - \text{Abs}_{\text{éch}}) / \text{Abs}_t] \times 100$$

Où ;

Abs_t : absorbance en absence d'antioxydant (contrôle négatif).

$\text{Abs}_{\text{éch}}$: absorbance en présence d'antioxydant (Extrait ou standard).

II.2.5.3. Chélation du fer ferreux

Le test de chélation des ions Fe^{2+} quant à lui, met en avant la capacité d'une molécule à fixer les ions Fe^{2+} . Les ions Fe^{2+} jouent un rôle important lors de la production des radicaux libres notamment lors de la réaction de Fenton, qui survient à chaque fois qu'une molécule d' H_2O_2 est en contact d'ions Fe^{2+} et qui est à l'origine de la production des radicaux hydroxyl ($\text{OH}^\cdot$), un des radicaux les plus réactifs. Le fer joue aussi un rôle dans la phase de propagation de la lipoperoxydation ainsi que dans la formation du radical O^{2-} (Huang D., 2005).

La capacité chélatrice est déterminée selon la méthode de **Le et ses collaborateurs (2007)** qui est basée sur l'inhibition de la formation du complexe Fe^{2+} -TPTZ après le traitement des échantillons avec les ions Fe^{2+} . 500 μL des solutions d'extraits ou du chélateur standard (EDTA) à différentes concentrations sont additionnées à 100 μL de FeSO_4 (2 mM) et 2 mL de méthanol. Après 5 min d'incubation, 100 μL de TPTZ (5 mM) sont ajoutés, et le mélange est agité et laissé réagir pendant 10 min pour permettre la complexation du fer résiduel. L'absorbance du complexe Fe^{2+} -TPTZ est mesurée à 595 nm. L'activité chélatrice est exprimée en pouvoir chélateur (PC) en utilisant l'équation ci-dessous :

$$\text{PC (\%)} = [(\text{Abs}_t - \text{Abs}_{\text{éch}}) / \text{Abs}_t] \times 100$$

Où ;

Abs_t : absorbance en absence d'antioxydant (contrôle négatif).

$\text{Abs}_{\text{éch}}$: absorbance en présence d'antioxydant (Extrait ou standard).

III. Résultats et discussion

III.1. Quantification des composés phénoliques

Les extraits ainsi obtenus présentent un aspect visqueux de couleurs différentes avec des rendements qui varient entre 0,67 et 21, 60 %. (**Tableau 3**). Il est constatable que la plus importante quantité du résidu sec a été trouvée dans l'extrait de l'eau acidifié comparativement aux autres extraits.

Le dosage des phénols totaux a été effectuée par la méthode de Singleton et Ross avec le réactif de Folin-Ciocalteu. C'est l'une des méthodes adoptées dans la plupart des travaux concernant les antioxydants naturels. Elle est considérée comme étant la meilleure méthode spectrophotométrique pour la quantification des polyphénols totaux.

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait de plante a été alors calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Figure 1**) et exprimée en milligrammes équivalent en acide gallique (GAE) par gramme de la matière sèche. Ces valeurs représentent la moyenne de trois répétitions $\pm$ écart type. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Aspect, couleur et rendement d'extraction

Echantillon	Aspect	Couleur	Rendement d'extraction (%)	Teneur en phénols totaux (mg/g)
FH	Visqueux	Jaune clair	04,87	0,381 $\pm$ 0,026
FD	Visqueux	Vert olive	01,10	0,639 $\pm$ 0,022
FC	Visqueux	Vert olive	02,22	0,485 $\pm$ 0,005
FA	Visqueux	Jaune	00,75	0,387 $\pm$ 0,0009
FM	Visqueux	Vert foncé	07,20	2,661 $\pm$ 0,028
FE	Visqueux	Marron	11,45	2,437 $\pm$ 0,013
FEA	Visqueux	Vert olive foncé	11,96	1,677 $\pm$ 0,045
ARH	Visqueux	Jaune	02,42	0,273 $\pm$ 0,007
ARD	Visqueux	Vert olive	00,67	0,411 $\pm$ 0,020
ARC	Visqueux	Vert olive	02,65	0,435 $\pm$ 0,005
ARA	Visqueux	Vert olive	00,97	0,559 $\pm$ 0,023
ARM	Visqueux	Marron	7,37	2,341 $\pm$ 0,023
ARE	Visqueux	Vert foncé	9,62	1,812 $\pm$ 0,019
AREA	Visqueux	Vert olive foncé	21,60	2,308 $\pm$ 0,012

F : fleurs ; AR : partie aériennes sans fleurs ; H : hexane ; D : dithylether ; C : chloroforme ; A : acétone ; M : méthanol ; E : eau ; EA : eau acidifiée.

D'après la synthèse de l'ensemble de résultats obtenus lors de la quantification des phénols totaux, on constate que ces taux sont variables et qui s'étalent entre 0,27 et 2,66 mg GAE/g de la matière sèche.

Les taux des composés phénoliques les plus élevés ont été détectés dans les extraits méthanoliques. Tandis que, les teneurs les plus faibles sont remarquées pour les extraits hexaniques pour les deux parties de la plante. En outre, nous avons enregistré que les extraits acétoniques des fleurs et les extraits diéthylétherique de la partie aérienne qui ont donné des rendements les plus faible en résidu sec comparativement à l'extrait aqueux ont offert aussi es

teneurs importantes en phénols totaux. Ce résultat pourra être expliqué par le fait que la polarité des extraits influe sur le type de composés extraits.

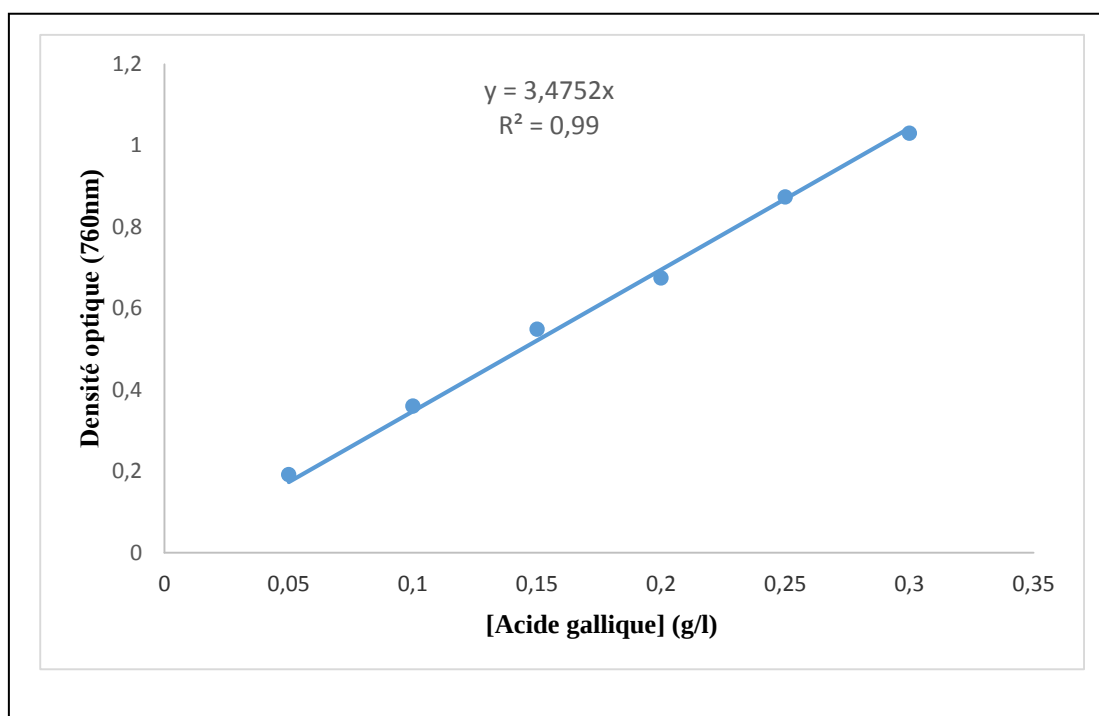


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Aussi, nous avons constaté que les fleurs renferment des proportions presque plus élevées en polyphénols comparativement à la partie aérienne. Ces résultats montrent principalement que les composés phénoliques ne sont pas extractibles par les solvants apolaires ce qui revient probablement à la solubilité relative des polyphénols. En fait, la solubilité des polyphénols est conditionnée par le type de solvant utilisé. Ainsi, pour une haute récupération de polyphénols, le méthanol est le solvant approprié (Mohammedi Z., et Atik F., 2011 ; Wissam Z., 2010 ; Aboshora W., 2014). D'ailleurs, la répartition inégale des polyphénols dans les différents organes d'une plante a été rapportée par plusieurs auteurs (Rao V., 2012 ; Gianmaria F., 2011 ; Pace G., 2014).

L'inconvénient majeur de ce test est que le réactif du Folin-Ciocalteu n'est pas spécifique aux composés phénoliques, mais il réagit avec tous autres composés qui contiennent un groupement OH comme les sucres, les protéines et les pigments par ce qu'une telle extraction ne donne pas que les composés phénoliques. De-ce-fait, les valeurs obtenues en phénols totaux ne représentent pas les teneurs réelles de ces substances dans les différents extraits de la plante investiguée.

III.2. Analyse phytochimique des extraits

Le criblage phytochimique a été réalisé sur les extraits obtenus par épuisement successif avec différents solvants à polarité croissante. Ainsi, nous avons obtenu 14 extraits. Ce screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de certains métabolites secondaires et primaires au niveau des tissus végétaux de notre plante. Les principaux groupes chimiques identifiés selon les méthodes classiques de caractérisation et d'identification sont consignés dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Résultats du screening phytochimique

Extraits	FH	FD	FC	FA	FM	FE	FEA	ARH	ARD	ARC	ARA	ARM	ARE	AREA
Saponines	-	-	-	-	-	+++	++	-	-	-	-	-	+	++
Alcaloïdes	Wagner	++++	+++	++	+	-	+	-	++	+++	+	+	+	-
	Mayer	+++	++	++	+++	-	-	-	+	++++	++	+++	-	+
	Dragendorff	+++	+++	+	-	-	-	-	++	++	+	+	+	-
Flavonoïdes	-	+	-	-	+++	++	-	-	++++	-	++	+++	+	-
Anthocyanes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leucoanthocyanes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Composés reducteurs	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	++	-	-	+	+++
Tanins	Cathéchique	-	++	-	-	-	+++	-	++	++	-	+	-	++
	Gallique	-	-	+	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
Anthracéniques libres	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anthracéniques combinés	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Coumarines	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Sterols et triterpènes	-	+	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
Hétérosides cordiotoniques	-	+	-	-	++	-	-	-	+	-	+	++	-	+++
O-hétérosides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O-hétérosides à génines réduites	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-hétérosides	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+++	+++	++	++	+	+	+

(++++): Très fortement présent ; (+++): Fortement présent ; (++) : Moyennement présent ; (+) : Faiblement présent ; (-) : test negative.

La mise en évidence des différentes classes des métabolites constituant de *Hammada elegans*, nous permet d'avoir une bonne idée sur ses activités pharmacologiques. Pour cela nous avons réalisé les tests phytochimiques sur les deux parties de la plante étudiée avec différents solvants d'extraction.

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 très fortement positive par (++++)), une réaction franchement positive est représentée par (+++), une réaction moyennement positive est représentée par (++), une réaction faiblement positive est représentée par (+) et l'absence de la substance est représentée par (-). Les réactions de caractérisation ont permis de mettre en évidence plusieurs groupes chimiques. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 4**.

On constate d'un test à l'autre que les C-Hétérosides sont les groupes chimiques les plus fréquents. On les retrouve dans les différentes parties de la plante et on note l'absence des anthocyanes, les leuco-anthocyanes, les anthracéniques libres et combinés, les O-Hétérosides et les O-Hétérosides à génie réduits, dans tous les échantillons.

Le screening phytochimique de la partie aérienne et des fleurs de *Hammada elegans* a montré la présence des alcaloïdes avec les trois tests de Wagner, de Dragendorff et de Mayer dans tous les extraits à l'exception de l'extrait méthanolique des fleurs et de l'extrait aqueux acidifié de la partie aérienne

Quant aux saponines, ils sont présents chez les fleurs et chez la partie aérienne de *Hammada elegans* dans les extraits aqueux. En outre, les autres extraits des deux parties de la plante sont dépourvus des saponines.

Les coumarines sont absentes dans presque tous les extraits de la plante étudiée. Ils se présentent en quantités faibles dans les extraits diéthylétherique et chloroformique de la partie aérienne de *Hammada elegans*.

Le test des tanins a montré la présence d'une coloration brune verdâtre, ce qui signifie que la partie aérienne et les fleurs de cette plante contiennent les tanins catéchiques. Les tanins catéchiques sont présents avec des quantités plus importantes dans les tiges et feuilles par rapport aux fleurs. Leur présence est confirmée par la réaction de Stiasny. Ils sont présents surtout dans les fractions diéthylétheriques et aqueux.

Les flavonoïdes existent dans les deux parties de la plante. Ils sont en quantités plus importantes dans les feuilles et tiges par rapport aux fleurs et cela pour les extraits diétheriques et méthanolique. La réaction de cyanidine confirme l'absence de flavonones, flavonols et flavonoïdes libres dans les deux parties de la plante.

Les stérols et les triterpènes sont présent seulement dans les extraits diétheriques des deux parties de la plante. Ils sont cependant en quantité importante dans les feuilles et tiges que dans les fleurs.

La présence des composés réducteurs particulièrement dans les extraits aqueux des deux parties de la plante en quantité importante a été vérifiée par la liqueur de Fehling donnant un précipité rouge brique. Tandis que, les Hétérosides cardiotoniques sont présents en faible quantités dans les fleurs comparativement aux tiges et feuilles.

Cette étude phytochimique qualitative montre que tous les groupes chimiques identifiés au niveau de tous les extraits de la plante étudiée, leur confèrent des propriétés pharmacologiques remarquables, ce qui pourrait justifier ses multiples indications thérapeutiques et pour lesquelles elle est utilisée en tradithérapie. Toutefois, peu d'étude a été réalisées sur le plan phytochimique de la plante de *Hammada elegans* (Nait Mbarek A., 1996). Cependant, l'absence de certains principes actifs dans les extraits des différentes parties de plante investiguées comme les leucoanthocyanes, les anthocyanes, les O-hétérosides et O-hétérosides à génines réduites ne justifie pas que cette plante est pauvre en ces composés mais, les méthodes d'extraction et les systèmes de solvants utilisés dans notre travail ne sont pas satisfaisantes pour l'extraction des métabolites désirés.

III.3. Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince (CCM)

Pour révéler les taches de substances sur la plaque, on utilise soit la détection UV, soit des révélateurs chimiques caractéristiques de certains groupes. On dispose un dépôt de 5 à 20 µl du filtrat sur la plaque (Voire annexe). Après migration et séchage, la plaque est examinée sous UV, dans le cas où l'observation en UV ne paraît pas suffisante, on peut compléter ces résultats par la pulvérisation sur le chromatogramme d'un révélateur chimique caractéristique. Les résultats obtenus sont mentionnés dans les **Tableaux 5-12**.

Tableau 5 : Rapports frontaux et couleurs des taches avant pulvérisation par les réctifs de révélation visualisée sous UV à 366 nm

FH		FD		FC		FA		FM		FE	
RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur
0,42	Vert	0,31	Rouge	0,36	Orange	0,4	Vert	0,31	Vert	0,83	Vert claire
0,6	Orange	0,4	Marron	0,5	Blanc	0,45	Blanc	0,95	Orange		
0,77	Rouge	0,52	Bleu	0,77	Marron	0,52	Marron				
0,95	Orange	0,61	Vert	0,95	Orange	0,77	Orange				
0,97	Vert	0,65	Blanc	0,98	Marron	0,95	Vert				
		0,95	Orange								
		0,98	Marron								
ARH		ARD		ARC		ARA		ARM		ARE	
RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur
0,43	Vert	0,32	Rouge	0,36	Orange	0,43	Vert	0,34	Vert	0,83	Vert claire
0,61	Orange	0,41	Marron	0,52	Blanc	0,46	Blanc	0,97	Orange		
0,79	Rouge	0,54	Bleu	0,79	Marron	0,54	Marron				
0,97	Orange	0,61	Vert	0,95	Orange	0,78	Orange				
0,98	Vert	0,67	Blanc	1	Marron	0,97	Vert				
		0,95	Orange								
		1	Marron								

Les CCM présente des taches de couleur orange, jaune, bleu, verte, rose, pourpre qui peuvent correspondre à plusieurs classes de métabolites secondaires : jaune, vert (coumarines) ; orange (xanthonnes) ; jaune quelconque ; bleu, pourpre (coumarines, flavones méthylées) (**Christelle Chantal N., 2009**).

Tableau 6 : Rapports frontaux et couleurs des taches après pulvérisation par le chlorure d'aluminium.

FH		FD		FC		FA		FM		FE	
RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur
0,67	Orange	0,01	Orange clair	0,06	Orange	0,75	Orange	0,06	Vert	0,46	Vert claire
0,82	Orange clair	0,18	Bleu	0,12	Bleu	0,97	Orange	0,12	Vert		

		0,62	Orange	0,43	Orange			0,93	Orange		
		0,77	Vert	0,67	Vert						
ARH		ARD		ARC		ARA		ARM		ARE	
RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur
0,67	Orange	0,01	Orange clair	0,06	Orange	0,75	Orange	0,07	Verte	0,46	Vert claire
0,82	Orange clair	0,18	Bleu	0,12	Bleu	0,97	Orange	0,12	Verte		
		0,62	Orange	0,43	Orange			0,95	Orange		
		0,77	Verte	0,67	Verte						

Pour préciser leur nature, les réactifs spécifiques aux coumarines ((CH₃CO₂)₂Pb) et aux flavonoïdes (Réactif de Godin, AlCl₃, NH₃) ont été utilisés. AlCl₃ révèle les flavonoïdes en jaune dans le visible ou sous UV à ondes longues, les couleurs des taches changent du bleu au brun ou fluorescent en jaune-vert (**Christelle Chantal N., 2009**). Aussi ont-ils été mis en évidence sous UV par l'apparition de colorations jaune, orange après révélation avec le réactif de Godin (**Ghasemzadeh A., 2010**). En application de toutes ces données bibliographiques à l'ensemble des résultats que nous avons obtenus, nous déduisons que tous les spots révélés correspondent aux flavonoïdes. Ce qui confirme la richesse des extraits en cette famille de métabolites secondaires (**Tableaux 6 et 7**).

Tableau 7 : Rapports frontaux et couleurs des taches après pulvérisation par le réactif de Godin

FH		FD		FC		FA		FM		FE	
RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur
0,27	Bleu	0,25	Vert	0,18	Bleu	0,75	Vert bleuté	0,06	Jaune vert	0,97	Jaune
0,9	Violet	0,27	Bleu	0,43	Vert	0,87	Bleu	0,96	Violet	0,96	Violet
0,93	Vert olive	0,31	Blanc	0,62	Violet	0,96	Violet				
0,96	Bleu	0,52	Vert	0,67	Vert olive						
0,98	Bleu foncé	0,75	Vert clair	0,87	Bleu						
		0,87	Violet	0,93	Violet						

ARH		ARD		ARC		ARA		ARM		ARE	
RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur
0,25	Bleu	0,08	Noir	0,22	Bleu	0,72	Vert olive	0,06	Jaune vert	0,98	Jaune
0,83	Violet	0,33	Blanc clair	0,37	Vert	0,87	Bleu	0,97	Violet	0,93	Violet
0,82	Vert	0,68	Vert clair	0,62	Violet	0,95	Violet				
0,62	Violet	0,83	Violet	0,66	Vert olive						
0,9	Vert olive	0,9	Vert olive	0,93	Bleu						
0,95	Bleu foncé	0,27	Vert	0,95	Violet						

Le réactif de Dragendorff a montré sur les CCM des deux parties de la plante des taches colorées en orange. Le **Tableau 8** confirme ainsi la présence d'alcaloïdes dans tous les extraits des fleurs. Tandis que dans la partie aérienne, tous les extraits (sauf l'extrait chloroformique) ont présenté une seule tache orange dans leurs chromatogrammes ce qui indique la présence des alcaloïdes en quantités faibles. Cependant, ces résultats sont en accord avec ceux obtenu par le screening phytochimique (**Tableau 4**).

Tableau 8 : Rapports frontaux et couleurs des taches après pulvérisation par le réactif de Dragendorff

FH		FD		FC		FA		FM		FE	
RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur
1	Orange	0,06	Orange	0,31	Orange	0,12	Orange	0,07	Vert		Orange
		0,96	Orange	1	Blanc	0,55	Orange	0,16	Orange		Noir
						0,62	Rouge	0,92	Orange		
							Blanc	0,31	Blanc		
ARH		ARD		ARC		ARA		ARM		ARE	
RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur
0,67	Orange	0,05	Orange	0,31	Blanc	0,43	Rouge	0,07	Vert		Orange
	Rouge					0,53	Rouge	0,93	Orange		
						0,1	Orange	0,28	Blanc		

Les CCM des différentes fractions de *Hammada elegans* révélés avec les réactifs de Liebermann-Burchard et de Godin puis visualisés sous UV à 366 nm (**Tableaux 7 et 9**), certifient la présence de terpénoïdes et de stéroïdes par les fluorescences de diverses couleurs (vert, mauve et jaune vert). Les spots orange sous UV à 366 nm se révèlent être des triterpènes de type lupane (**Sanjay R., 2013**). Ceux mis en évidence bleu sous UV à 254 nm et rouge à 366 nm sont des triterpènes de typeoléanane et ursane (**Sanjay R., 2013**).

Tableau 9 : Rapports frontaux et couleurs des taches après pulvérisation par le réactif de Liebermann-Burchard

FH		FD		FC		FA		FM		FE	
RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur
0,31	Bleu	0,12	Vert	0,01	Marron	0,15	Vert	0,1	Bleu	0,55	Bleu
0,75	Marron	0,27	Bleu	0,31	Bleu	0,75	Vert clair	0,55	Vert clair	0,75	Jaune
1	Vert	0,62	Orange	0,37	Vert	1	Orange	0,62	Vert bleuté	0,87	Vert
		0,68	Jaune	0,62	Jaune			0,98	Vert		
		0,75	Orange	0,68	Noir						
ARH		ARD		ARC		ARA		ARM		ARE	
RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur
0,28	Bleu	0,12	Vert	0,31	Bleu	0,12	Vert	0,12	Bleu	0,5	Bleu
0,43	Jaune	0,27	Bleu	0,43	Vert	0,75	Vert clair	0,5	Vert clair	0,75	Jaune
0,56	Noir	0,65	Orange	0,72	Bleu noir	0,87	Bleu	0,68	Vert bleuté	0,93	Vert
0,75	Marron	0,71	Jaune			1	Orange	0,95	Vert		
1	Vert jaunâtre	0,77	Orange								

Suite à l'observation sous la lampe UV (366 nm) et révélation par le FeCl₃, la comparaison des Rfs des spots issus a donné naissance une idée sur les tanins qui présents dans les extraits de *Hammada elegans*. Ainsi, le spot verdâtre de l'extrait diétherique des fleurs avec (Rf = 0,31) confirme la présence cette famille (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Rapports frontaux et couleurs des taches après pulvérisation par le FeCl₃

FH		FD		FC		FA		FM		FE	
RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur
0,25	Brun	0,31	Verdâtre	0,43	Brun	0,81	Bleu noir	0,12	Noir		Bleu
		0,32	Bleu	1	Bleu	1	Vert	0,93	Orange		
ARH		ARD		ARC		ARA		ARM		ARE	
RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur
0,4	Bleu noir	0,35	Bleu	0,48	Brun		Bleu noir	0,12	Noir		Bleu noir
0,52	Vert			1	Bleu	0,43	Brun	0,92	Orange		
						0,81	Bleu noir	0,96	Vert		

Pour caractériser les sucres réducteurs dans les extraits de notre espèce, nous avons effectué un screening sur des plaques CCM en utilisant comme révélateurs le réactif de Molish. Les valeurs des rapports frontaux (Rf) des taches visualisées sur les chromatogrammes des extraits étudiés sont consignées dans le **Tableau 11**. Il est constatable que les propriétés physiques (Couleur et Rf) des taches dépendent non seulement de la partie étudiée de l'espèce mais aussi de la nature de l'extrait. L'apparition des taches brunes à noires sur les plaques CCM indique bien la présence de sucres dans ces extraits. Parmi tous les extraits étudiés, il s'est avéré que seuls les extraits aqueux des deux parties de *Hammada elegans* possèdent les sucres réducteurs.

Tableau 11 : Rapports frontaux et couleurs des taches après pulvérisation par le réactif de Molish

FH		FD		FC		FA		FM		FE	
RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur
0,57	Bleu	0,12	Bleu	0,07	Bleu	0,77	Vert bleuté	0,13	Vert	0,36	Bleu noir
0,67	Vert	0,93	Vert olive	1	Vert	0,88	Orange	0,75	Violet	0,48	Blanc
0,93	Marron	1	Vert fonce			1	Marron	0,96	Violet	0,98	Violet
ARH		ARD		ARC		ARA		ARM		ARE	
RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur
0,58	Bleu	0,11	Bleu	0,1	Bleu	0,68	Orange	0,12	Vert	0,48	Bleu noir
0,65	Vert	0,75	Violet	0,96	Vert	0,75	Vert bleute	0,75	Violet	0,96	Violet

0,95	Marron	0,81	Vert clair	0,87	Vert	0,95	Bleu noir	1,06	Bleu
		0,98	Vert foncé	1	Marron				

Les résultats de la détection et de la caractérisation des coumarines sont rapportés dans le **Tableau 12**. La majorité des coumarines fluorescentes sous UV/366 nm en bleu, violet, rose, vert, jaune, pourpre (Guy B., 2010). L'acétate de plomb révèle les coumarines dans le visible en jaune et sous UV/366 nm en vert.

Dans tous les cas, un constat général met en relief la présence des coumarines dans tous les extraits et ce, par l'apparition de spots verts avec des rapports frontaux différents. Cette présence relativement importante de coumarines dans pourrait faire d'elles des anticoagulants, antimicrobiens et des spasmodiques ; un ensemble de propriétés pharmacologiques par excellence qu'on reconnaît aux coumarines (Guy B., 2010).

Par ailleurs, le test de détection des coumarines met aussi en évidence les flavonoïdes et les quinones. Si ce test est positif en absence de flavonoïdes (test à la cyanidine négatif) et de quinones (test au réactif de Borntraeger négatif), alors la détection de coumarines est confirmée.

Tableau 12 : Rapports frontaux et couleurs des taches après pulvérisation par l'acétate de plomb

FH		FD		FC		FA		FM		FE	
RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur
0,31	Bleu violacé	0,06	Orange	0,1	Orange	0,01	Vert claire	0,18	Bleu	0,96	Jaune vert
0,37	Jaune	0,25	Bleu violacé	0,31	Bleu violacé	1	Orange	0,75	Jaune vert		
0,7	Rouge	0,43	Jaune	0,43	Jaune			0,96	Orange		
0,75	Vert	0,62	Rouge orangé	0,5	Vert						
1	Rouge orange	0,71	Jaune	0,62	Orange						
		0,75	Vert	0,75	Vert						
ARH		ARD		ARC		ARA		ARM		ARE	
RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur	RF	Couleur
0,37	Violet	0,15	Vert	0,05	Orange	0,82	Bleu	0,22	Bleu		Jaune vert

0,56	Jaune	0,18	Jaune	0,25	Bleu violacé	0,81	Vert	0,92	Jaune
0,75	Rouge	0,28	Bleu violacé	0,31	Orange	0,87	Rouge	0,93	Orange
0,81	Vert foncé	0,42	Rouge orangé	0,5	Vert	0,9	Orange		
0,93	Rouge	0,43	Jaune	0,62	Orange				
1	Bleu violacé	0,62	Rouge orangé	0,71	Jaune				
				0,72	Vert				

Tous ces métabolites secondaires bioactifs identifiés dans les différents extraits sont suspectés d'être à l'origine de leurs nombreuses propriétés pharmacologiques (Sanjay R., 2013). En effet, les flavonoïdes sont des antioxydants par excellence reconnus (Bougandoura N., 2013). Outre leur pouvoir antioxydant, ils sont des antiulcéreux, antispasmodiques, analgésiques, antisécréteurs et des antidiarrhéiques (Bougandoura N., 2013). Ils sont également doués de vertus aphrodisiaques (Hugues Alain N., 2011). Cet ensemble de propriétés pharmacologiques qu'on reconnaît également aux coumarines font des plantes qui en contiennent, des anticoagulants, antimicrobiens et des antispasmodiques (Hugues Alain N., 2011). Les tanins manifestent les propriétés de la vitamine P. Ils renforcent les vaisseaux sanguins et contribuent à l'accumulation de la vitamine C dans l'organisme (Chaouche T., 2014). Les polyphénols possèdent un effet de rétention potassique qui fait d'eux des diurétiques (Abedini A., 2013). Les dihydroxyanthracéniques selon certains auteurs, sont doués de propriétés laxative et purgative (Abedini A., 2013). Les alcaloïdes sont des phytocomposés qui présentent diverses activités pharmacologiques entre autres le renforcement de l'activité cardiaque, l'excitation du système nerveux central et des nerfs sympathiques, la stimulation de la circulation sanguine (Hugues Alain N., 2011).

III.4. Evaluation de l'activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant ne peut être mesuré qu'indirectement à partir de ses effets. La plupart des méthodes de mesure de l'activité antioxydante sont basées sur l'utilisation de systèmes générant des radicaux très variés. Ce sont principalement des méthodes dites "d'inhibition" dans lesquelles une espèce chimique capable de générer des radicaux libres est utilisée avec une substance capable de détecter ces espèces. L'échantillon dont on souhaite mesurer le pouvoir antioxydant est capable d'inhiber la génération des radicaux.

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant d'un échantillon. C'est pourquoi, on effectue différents tests de mesure de pouvoir antioxydant. Les antioxydants peuvent réduire les radicaux primaires par quatre mécanismes : par transfert d'électron, par transfert d'atome d'hydrogène, par chélation des métaux ou par inhibition des enzymes oxydatives.

De ce fait, l'activité antioxydante *in vitro* de nos extraits a été évaluée par trois méthodes différentes à savoir la technique de chélation de fer, la méthode de réduction de cuivre (CUPRAC) et le test de DPPH. Les résultats obtenus à partir de ces trois tests sont exprimés par le paramètre EC₅₀. Plus cette valeur est faible, plus le composé est antioxydant. Alors, l'approche la plus simple dans l'interprétation des données, est de tracer le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'antioxydant, développant une gamme de concentrations qui donne des taux d'inhibition compris entre 20 et 80 % (**Figures 2-4**). Le **Tableau 12** résume les différents résultats obtenus.

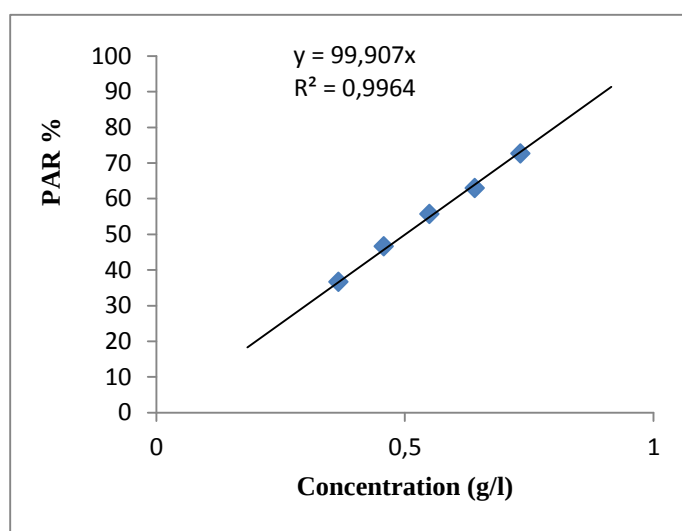


Figure 2 : Pouvoir antiradicalaire de la fraction diéthylétherique de la partie aérienne de *Hammada elegans* mesuré par le test de DPPH

Le paramètre EC₅₀ a été présenté récemment pour l'interprétation des résultats de l'activité antioxydante (autrement appelé la valeur IC₅₀). Ceci est défini comme la concentration de substrat qui cause la perte de 50% de l'activité. Ce paramètre a été présenté par Brand-Williams et ses collaborateurs (**Brand-Williams W., 1995 ; Bondet V., 1997**). Il a été employé plus tard par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats (**Jian T., 2007**). L'inconvénient de ce paramètre est que plus l'activité antioxydante est élevée, plus la valeur d'EC₅₀ est inférieure. Les valeurs des EC₅₀ obtenus à travers ce screening antioxydant représentent la moyenne de deux essais réalisés en parallèle $\pm$ l'écart-type.

Tableau 13 : Les valeurs des EC₅₀ des différents tests pour chaque extrait

Extraits	EC ₅₀ (g/l)		
	DPPH	Test de CUPRAC	Test de chélation de fer
FH	5,52 ±0,46	17,56±0,19	35,56±3,52
FD	0,84±0,91	2,67±0,001	13,26±1,69
FC	1,10±0,06	7,06±0,06	18,52±1,37
FA	2,254±0,25	4,15±0,02	8,39±1,56
FM	0,65±0,007	8,64±0,08	28,93±0,29
FE	0,88±0,001	12,54±0,21	48,83±2,22
FEA	8,40±0,29	36,74±0,26	57,20±0,32
ARH	10,52±0,72	21,92±1,70	24,19±4,63
ARD	0,46±0,05	4,40±0,01	9,38±0,37
ARC	0,96±0,03	10,99±0,17	36,74±0,13
ARA	0,54±0,009	2,69±0,07	8,10±2,51
ARM	0,70±0,004	6,17±0,10	35,14±0,35
ARE	1,07±0,05	14,25±0,08	34,46±1,76
AREA	4,73±0,21	38,52±1,35	43,90±1,39
Vamine C	0,002±1,65 ^E -05	0,34±0,0005	2,34±0,04
TBHQ	0,005±8,49 ^E -05	0,02±0,0006	20,95±0,16
EDTA			0,36±0,04

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence. A cet effet, nous avons utilisé l'acide ascorbique, et le TBHQ comme contrôles positifs dotés des activités antioxydantes très importantes. Ces antioxydants sont utilisés comme des agents conservateurs dans les industries agroalimentaires.

Dans le test du DPPH, ce radical est généralement l'un des substrats les plus utilisés pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse (**Bozin B., 2008**). A température ambiante, le radical

DPPH^{*} présente une intense coloration violette qui disparaît au contact d'une substance capable de saturer sa couche électronique. On peut donc détecter la diminution de l'intensité de la coloration par spectrophotométrie. Cette réduction rend compte du pouvoir piègeur des molécules testées.

Le **Tableau 13** représente les résultats d'activité antiradicalaire obtenus par le test de DPPH pour tous les extraits ainsi que les antioxydants de référence. Ces résultats montrent clairement que les antioxydants de référence (Vitamine C et TBHQ), ont exhibé des activités antiradicalaires supérieures à celle d'extraits avec des EC₅₀ de 0,002 mg/ml et 0,006 mg/ml respectivement

En revanche, l'extrait diéthylétherique de la partie aérienne de *Hammada elegans* a montré une meilleure activité antiradicalaire par rapport à tous les extraits (EC₅₀ = 0,46 ±0,05), bien que le contenu de ce dernier en composés polaires soit un peu inférieur aux autres. Cette bonne activité antiradicalaire de cet extrait peut être expliquée par la nature des composés peu polaires qui exercent des capacités donatrices de proton très remarquables.

Les résultats obtenus lors de la présente étude confirment l'existence d'une certaine corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antiradicalaire, en effet l'extrait hexanique de la partie aérienne de *Hammada elegans* a exposé une teneur faible en polyphénols totaux et a été également enregistré comme l'extrait qui possèdent la plus faible activité réductrice de DPPH, les mêmes résultats ont été mis en évidence dans un grand nombre des travaux similaires (Djeridane A., 2015; Khacheba I., 2014).

Par contre, l'extrait acétonique des fleurs a montré un pouvoir antiradicalaire 2 fois plus grand que celui de l'extrait hexanique de la même partie, malgré qu'ils renferment les mêmes teneurs en composés phénoliques. La seule explication de cette indépendance est que la composition des extraits en polyphénols sont différents. Ainsi, l'existence de certaines molécules individuelles responsables de cette activité peut influencer sur le pouvoir antiradicalaire. De plus, Egalement, nous avons enregistré une très bonne corrélation lineaire entre les valeurs d'EC₅₀ et le rapport (Teneurs en phénols totaux/redement d'extraction) pour les extraits hexaniques, diethylerique et acétoniques (R² = 0,99). Ce qui explique que la totalié des compoés extraits exercent des capacités antiradicalaires.

Selon la bibliographie les métabolites secondaires en particulier les polyphénols sont connus par leur effet antioxydant en neutralisant les radicaux libres. Or, d'après les résultats des tests phytochimiques on peut déduire que l'effet antiradicalaire important de l'extrait diéthylétherique de la partie aérienne de *Hammada elegans* est probablement lié à sa richesse en alcaloïdes, en flavonoides et en tanins. Ces composés sont dotés d'activité antioxydante en libérant un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle ou bien par leurs propriétés créatrices des ions métalliques.

Malgré leur pouvoir antioxydant inférieur à celui des antioxydants synthétiques, les extraits de *Hammada elegans* reste très avantageux par sa capacité de piéger les radicaux libres. Ce potentiel antioxydant confère à cette plante un grand intérêt dans la prévention contre les maladies cardiovasculaires, les cancers, le diabète, les maladies neurodégénératives, l'inflammation et le vieillissement.

L'activité réductrice des extraits de *Hammada elegans* a été évaluée en utilisant la méthode de CUPRAC. Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible. Il est universel peut être appliqué aussi bien chez les plantes que les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux (Apak R., 2007). La présence des réducteurs dans les extraits de la plante provoque la réduction de Cu^{2+} à la forme cuivreuse. Par conséquent, Cu^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant la diminution de la densité de la couleur verte dans le milieu réactionnel à 456 nm. En d'autre terme, le système CuCl_2 /néocuproïne confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semiquantitative » des concentrations des extraits, qui participent à la réaction rédox.). Les résultats de ce test sont résumés dans le **Tableau 13**.

Le pouvoir réducteur des extraits de la plante est dose dépendante (concentration dépendante). Ainsi, l'ensemble des extraits étudiés révèle des propriétés réductrices moyennement intéressantes ce qui se manifeste par de faibles valeurs de EC_{50} . Ainsi, nous remarquons que les valeurs obtenues varient entre $38,52 \pm 1,35$ $2,67 \pm 0,001$ mg/ml.

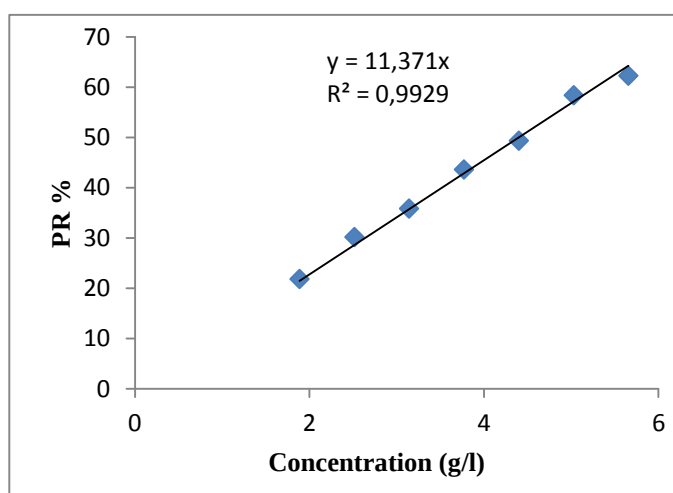


Figure 3 : Pouvoir réducteur de l'extrait diéthylétherique des fleurs de *Hammada elegans* mesuré par le test du CUPRAC

Parmi les quatorze fractions testées de *Hammada elegans*, l'extrait diéthylétherique des fleurs et l'extrait acétonique de la partie aérienne représentent les deux extraits les plus actifs avec des EC_{50} de l'ordre $2,67 \pm 0,001$ et $2,69 \pm 0,07$ mg/l. Par contre, l'activité antioxydante la plus faible a été affichée par l'extrait aqueux de la partie aérienne. Une activité intermédiaire a été obtenue pour les autres extraits avec des valeurs d' EC_{50} de 2 à 8 fois moins actifs que l'extrait diéthylétherique des fleurs.

En comparaison avec les antioxydants de référence, tous les extraits testés s'avèrent moins actifs. La vitamine C est 7 fois plus actifs que l'extrait diéthylétherique des fleurs et l'extrait acétonique de la partie aérienne. Tandis que, le TBHQ est 133 fois plus actif que l'extrait diéthylétherique des fleurs et l'extrait acétonique de la partie aérienne. En effet, selon le criblage phytochimique des extraits, le bon effet réducteur de ces deux extraits est probablement attribué à leur richesse en alcaloïdes, en flavonoides et en tanins catéchiques.

D'autre coté, les résultats obtenus dans le présent travail indiquent l'existence d'une corrélation linéaire remarquable et significative entre les pouvoirs réducteurs des extraits et leurs taux d'extraction ($R^2 = 0,71$). De plus, une bonne corrélation linéaire a été repéré entre les pouvoirs antioxydants mesurés par les deux tests (DPPH et CUPRAC) ($R^2 = 0,77$) (**Figure 4**). Ce résultat suggère que les extraits qui ont fourni un pouvoir antiradicalaire important exposent un statut réducteur aussi fort. C'est-à-dire, les extraits ayant la capacité de piéger le radical DPPH $\cdot$, pourra être attribué à leur faible potentiel redox qui les rend thermodynamiquement capable de réduire les radicaux libres ($R\cdot$) par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyle.

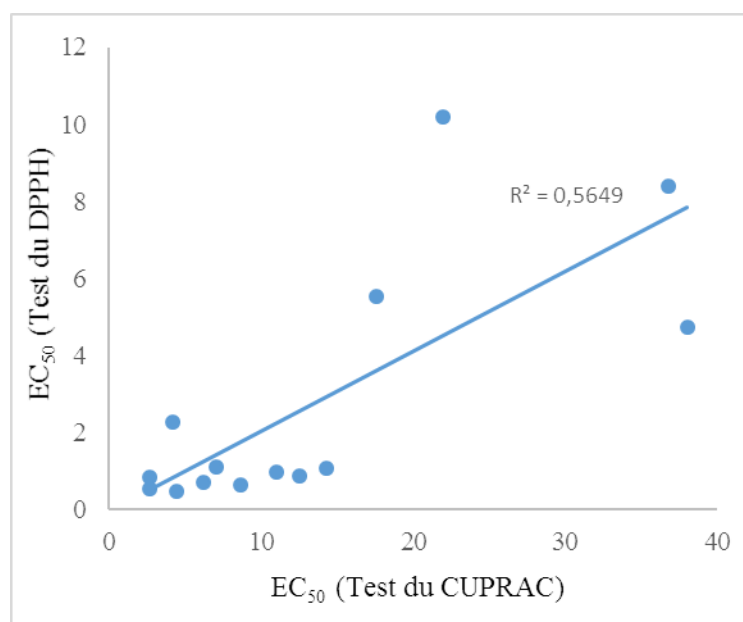


Figure 4 : Corrélation entre le test du DPPH et le test du CUPRAC

De plus, le pouvoir réducteur des extraits des fleurs est relativement supérieur par rapport à celui des extraits de la partie aérienne. Ainsi, le pouvoir réducteur de *Hammada elegans* est probablement dû à la présence de certains métabolites secondaires comme les alcaloïdes et les flavonoides portants des groupements hydroxyles servir comme donneur d'électron. Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (**Bougandoura N., 2013**).

Selon la littérature, les composés phénoliques s'avèrent comme de bons réducteurs des ions métalliques (**Boxin H., 2002**). Cependant, dans la présente étude des corrélations faibles et non significatives ($R^2 < 0,03$) ont été mise en évidence entre le pouvoir réducteur des extraits et leurs teneurs en composés phénoliques. Des résultats similaires ont été rapportés dans d'autres travaux récents (**Apak R., 2007 ; Bougandoura N., 2013**). Ces constatations pourraient indiquer que les composés phénoliques ne sont pas les principaux réducteurs présents dans les extraits qui sont en fait un mélange de composés qui peuvent contribuer également à la séquestration des métaux de transition (**Collette E., 2003**).

Le pouvoir chélateur du fer est évalué par l'utilisation du complexe le plus stable, le 2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine (TPTZ) qui forme avec le fer libre présent dans un milieu réactionnel un complexe $TPTZ-Fe^{2+}$ et également par l'absorbance qui renseigne sur la qualité du fer non

chélaté ainsi que sur la capacité des extraits à piéger cet élément afin de nous permettre d'atteindre la concentration inhibitrice EC_{50} d'où l'extrait provoque 50% de chélation de fer. En effet, les valeurs d' EC_{50} faibles correspondant à une activité antioxydante forte pour les extraits testés de *Hammada elegans*. À partir des profils de réduction obtenue pour nos extraits (**Figure 5**), il semble que la variation du pouvoir réducteur versus la concentration des extraits donne des tracés de linéarité très importants. Pour mieux caractériser l'efficacité des extraits, leurs activités réductrices a été exprimées en terme d' EC_{50} . Les résultats obtenus de ce test sont présentés dans le **Tableau 13**.

Les agents chélateurs agissent en formant des liaisons avec l'ion métallique réduisant son potentiel redox. En effet, la chélation des ions ferreux est importante dans la mesure où ces derniers participent à la formation des radicaux hydroxyles, très néfastes, lors de la réaction de Fenton (**Chaouche T., 2014**).

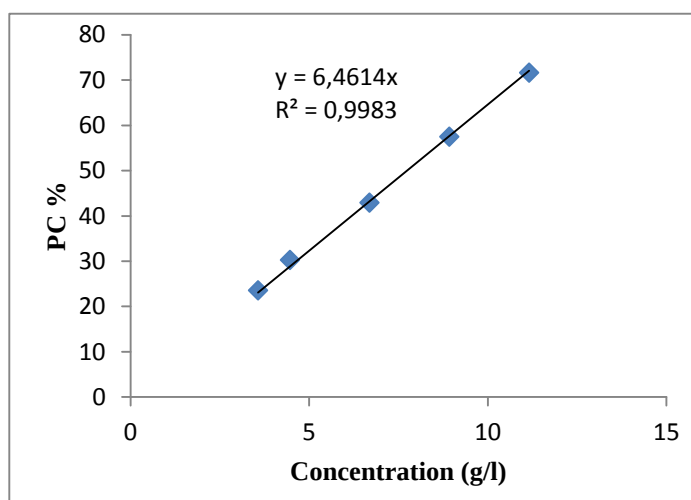


Figure 5 : Pouvoir chélateur de l'extrait diéthylétherique de la partie aérienne de *Hammada elegans*

D'après les résultats mentionnés dans le **Tableaux 13**, les valeurs des EC_{50} pourcentage de réduction excèdent 50%. Cela reflète simplement la nature des extraits contenant un ou plusieurs agents réducteurs ayant des affinités différentes pour l'ion Fe^{2+} . Cependant, les extraits acétoniques des deux parties de *Hammada elegans* possèdent les pouvoirs chélateurs des ions ferreux les plus élevés et présentent des EC_{50} de l'ordre de 8 mg/ml.

Outre, le pouvoir de chélation des ions Fe^{2+} exercé par l'EDTA est égal à $0,36 \pm 0,04$, il paraît être 7 fois plus important, que celui de la vitamine C et 59 fois plus important, que celui du TBHQ. Quant aux extraits testés, nous pouvons déduire que les extraits diéthyléniques et

acétoniques des deux parties de la plante présentent des pouvoirs chélateurs supérieur à celui du contrôle positif (TBHQ : $20,95 \pm 0,16$ g/l). Mais comparativement à la vitamine C seul l'extrait acétonique de la partie aérienne montre son efficacité la plus importante par rapport aux autres échantillons. Ainsi, cet extrait présente un grand paradoxe, d'une part il possède la valeur d' EC_{50} la plus faible en comparaison avec les autres extraits (**Tableau 13**) donc c'est l'extrait le plus actif. De l'autre part et comparativement aux tests du DPPH et du CUPRAC c'est l'extrait qui a montré une propriété antiradicalaire et réductrices presque la plus importante.

En se basant sur les résultats du criblage phytochimique, mise à part son effet antiradicalaire très important, l'extrait aqueux des fleurs représente un effet chélateur très bas. Son effet semble être lié à sa richesse en saponines. Cependant, cet extrait qui est riche en polyphénols et plus particulièrement exhibe un pouvoir chélateur très faible. Alors, les extraits donnant ainsi un potentiel antioxydant remarquable, est donc partiellement attribuée à la présence d'autres substances plus actives que celles présentes dans les autres extraits.

À l'exception de l'extrait aqueux acidifié de la partie aérienne de *Hammada elegans*, tous les extraits testés dans cette étude présentent une corrélation linéaire significative entre leurs effets chélateurs du fer ferreux et leurs rendements d'extraction ($R^2 = 0,80$) (**Figure 6**). Par contre, l'activité chélatrice des extraits n'est pas liée directement à la présence des composés phénoliques d'autant plus que la régression linéaire établit entre les composés phénoliques et les capacités chélatrices correspondantes donne des corrélations faibles ($R^2 = 0,40$).

Également, une bonne corrélation linéaire a été repérée entre les pouvoirs antioxydants mesurés par les deux tests (CUPRAC et Chélation) des extraits de chaque partie ($R^2 > 0,70$). Ce résultat suggère que les extraits qui ont fourni un pouvoir réducteur important exposent un statut chélateur aussi remarquable. Cependant, aucune corrélation significatives ($R^2 < 0,15$) n'a été mise en évidence entre le pouvoir chélateur et antiradicalaire des extraits de *Hammada elegans*.

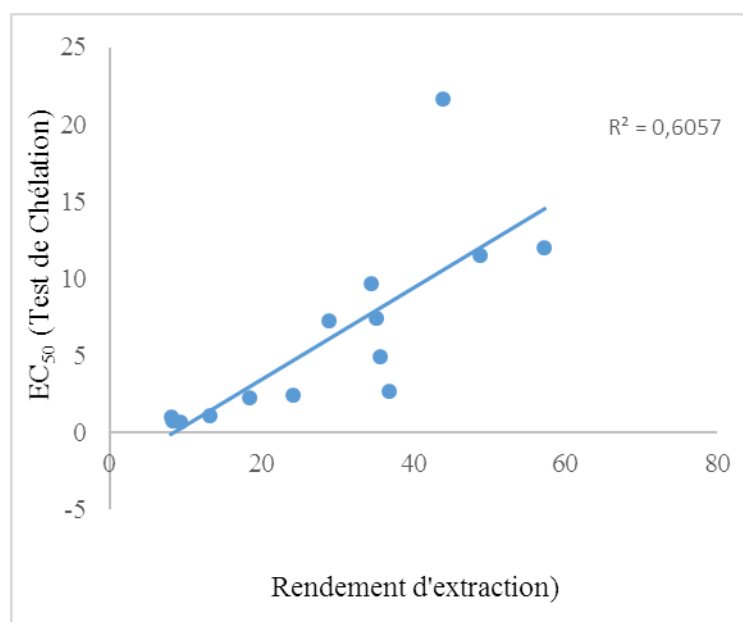


Figure 6 : Corrélation entre les valeurs d'EC₅₀ mesuré par le test de chélation et leur rendement d'extraction

D'après ce screening d'activité antioxydante, il apparaît que l'extrait acétonique de la partie aérienne s'est avéré le plus actif. Son effet antioxydant semble être lié à sa richesse en alcaloïdes, en flavonoïdes et en tanins catéchiques. Néanmoins, Plusieurs études ont montré que ces familles de substances naturelles sont responsables de leurs pouvoirs antioxydants (Ghasemzadeh A., 2010 ; Tiong S., 2013).

Globalement, les résultats obtenus sont encourageants et mériterait d'être confirmé par d'autres tests *in vitro* et *in vivo*. Mais, pour faire la distinction entre les extraits doués d'un effet scavenger du radical DPPH proprement dit de ceux ayant un effet réducteur de l'ion Cu⁺² ou chélateur du fer ferreux, nous devons faire d'autres techniques complémentaires. Et ce n'est qu'après l'analyse des valeurs d'EC₅₀ qui seront obtenues par ces techniques complémentaires, qu'on peut affirmer l'effet antioxydant de ces extraits.

En outre, ces résultats montrent que nos extraits fournissent des activités antioxydantes assez importantes qui peuvent être liées à la présence de certaines molécules bioactives. Alors, la future recherche sera consacrée pour déterminer la teneur de différents phénols et de leur partie relative dans le potentiel antioxydant. Ainsi, le pouvoir antioxydant des extraits pourra être encore soutenue par la teneur en composés phénoliques et de leurs types de molécules individuellement actives.

IV. Conclusion générale

Ce travail s'inscrit dans le cadre des travaux de recherches du laboratoire des sciences fondamentales de l'Université de Laghouat dont l'objectif principal est la découverte de nouvelles molécules à partir d'espèces végétales, en particulier dans le domaine des antioxydants.

De ce fait, la présente étude consiste à réaliser un criblage phytochimique et l'étude de l'activité antioxydante de quatorze extraits issus d'une plante Saharo-Algérienne ; *Hammada elegans* qui n'a pas été étudié sur le plan chimique. Lors de l'analyse du matériel végétal par CCM et par réactions colorées, les métabolites secondaires qui y sont contenus notamment les flavonoïdes, coumarines, stérols et terpènes, tanins, saponines, alcaloïdes, composés réducteurs, dérivés anthracéniques, hétérosides cardiotoniques et les c-hétérosides ont été identifiés. Les flavonoïdes et les tanins (substances naturelles antioxydantes à intérêt considérable en pharmacologie) mis en évidence par les tests phytochimiques pourraient présager que les espèces étudiées sont doués d'activité antioxydante.

Les extractions par Soxhlet des différents composés des deux parties (Fleurs et Tiges-feuilles) de notre plante par succession de sept systèmes de solvants de polarité croissante, nous a permis de déterminer le rendement d'extraction de chaque extrait. Le rendement le plus remarquable est celui des extraits aqueux acidifiés de la partie aérienne (21,60%).

La teneur des phénols totaux, est variable entre les différentes parties de *Hammada elegans*. La teneur la plus élevée des polyphénols est constatée dans l'extrait méthanolique des fleurs ($2,661 \pm 0,028$ mg GAE/g) suivi par l'extrait aqueux de la même partie avec une teneur de $2,437 \pm 0,013$ mg GAE/g. Tandis que, la teneur la plus faible a été enregistrée pour l'extrait aqueux acidifié des fleurs avec une teneur de $0,273 \pm 0,007$ mg GAE/g. On peut conclure que les tiges et les feuilles étaient relativement riches en polyphénols par rapport aux fleurs qui représentent une teneur moyennement faible. Ces résultats importants reflètent les rendements élevés et le contenu variable de chaque partie de la plante en polyphénols.

Concernant l'activité antioxydante, nous avons étudié le pouvoir antioxydant de tous les extraits des deux différentes parties de la plante par la capacité de piégeage de radical DPPH[•], la réduction de cuivre et la chélation de fer, afin de localiser la fraction qui représente l'activité la plus élevée.

Pour le piégeage du radical libre DPPH[•] et en comparant les EC₅₀ des différents extraits testés des deux parties de *Hammada elegans* par rapport à celles de l'acide ascorbique et le TBHQ, nous avons remarqué une activité antiradicalaire très importante de la fraction diéthylétherique de la partie aérienne (EC₅₀ = 0,46±0,05mg/ml) qui est supérieure à la capacité du piégeage du radical DPPH[•] de tous les autres extraits. Mais comparativement aux antioxydants de référence qui représentent une activité antioxydante presque similaire et intéressante, tous les extraits testés ont des activités antiradicalaires faibles. Ainsi, l'étude du pouvoir antioxydant par la méthode de DPPH a confirmé les propriétés importantes que possèdent certains extraits de *Hammada elegans* à piéger les radicaux libres.

Cependant, nous avons constaté pour l'activité réductrice par la méthode de CUPRAC, que tous les extraits de la plante étudiée ont la capacité de réduire le cuivre qui augmente en fonction de la concentration. Comme nous avons remarqué que l'extrait diéthylétherique des fleurs présente une capacité intéressante (EC₅₀ = 2,67±0,001) pour réduire l'ion cuivrique par rapport aux autres extraits, mais cette capacité est faible à celles de l'acide ascorbique et le TBHQ.

D'après les résultats du pouvoir de chélation des ions Fe²⁺, tous les extraits de *Hammada elegans* exposent leurs pouvoirs chélateurs du fer ferreux avec des EC₅₀ étalées être 8,10±2,51 et 57,20±0,32 mg/ml. D'autre part, nous avons constaté que les extraits diéthylétheriques et acétoniques des deux parties de la plante présentent des pouvoirs chélateurs supérieure à celui du contrôle positif (TBHQ : 20,95±0,16 g/l). Mais comparativement à la vitamine C seul l'extrait acétonique de la partie aérienne montre son efficacité la plus importante par rapport aux autres échantillons.

Selon les résultats obtenus dans cette étude, nous pouvons dire que les extraits de *Hammada elegans* ont une bonne activité antioxydante en particulier l'extrait acétonique de la partie aérienne qui s'est avéré le plus actif. Son effet antioxydant semble être lié à sa richesse en alcaloïdes, en flavonoïdes et en tanins catéchiques. Néanmoins, Plusieurs études ont montré que ces familles de substances naturelles sont responsables de leurs pouvoirs antioxydants Cette analyse trouve une importante application dans l'industrie pharmaceutique comme elle peut trouver aussi une application dans l'industrie alimentaire.

L'analyse des différents extraits par la méthode de chromatographie sur couche mince, nous conduira dans la perspective future de notre étude, de compléter et d'approfondir ce travail

par une étude phytochimique avancée. Dans un premier temps de faire un fractionnement de ces extraits et d'identifier les molécules responsables du pouvoir antioxydant en utilisant des techniques d'identification plus performantes. Dans un deuxième temps, il serait intéressant d'évaluer l'activité antioxydante par d'autres méthodes et de faire des tests *in vivo* afin de déterminer de nouveaux agents thérapeutiques.

V. Références bibliographiques

Abedini A. Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes. Thèse de doctorat, Université Lille Nord de France, 2013, p 84-86.

Aboshora W., Lianfu Z., Dahir M., Qingran M., Qingrui S., Jing L., Qaid N., Al-Haj M., and Farga Ammar A. Effect of Extraction Method and Solvent Power on Polyphenol and Flavonoid Levels in *Hyphaene Thebaica* L Mart (Arecaceae) (Doum) Fruit and its Antioxidant and Antibacterial Activities. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2014, 13 (12), p 2057-2063.

Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Esin Çelik S., Bektaşoğlu B., Işıl Berker K., and Özyurt D. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, 2007, 12, p 1496-1547.

Apak R., Güçlü K., Özyürek M., et Karademir S. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52 (26), p7970-7981.

Bahorun T. Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food and agricultural research council*, 1997, 2, 83-93.

Boizot N., Charpentier J. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cah. Tech. INRA*, 2006, 1, p79-82.

Bondet V., Brand-Williams W., and Berset C. Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH• free radical method. *Lebensmittel -Wissenschaft und Technologie*, 1997, 30 (6), P 609– 615.

Bougandoura N., Bendimerad N. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta* (L.) Briq. « Nature & Technologie ». *B-Sciences Agronomiques et Biologiques*, 2013, p 14 – 19.

Boxin Ou, Dejian H., Maureen H., Judith A., and Elizabeth K. Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2002, 50, P 3122-3128.

Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Goran R., and Igić I. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae), *Food Chemistry*, 111: 2008, p 925-929.

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., and Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel - Wissenschaft Technologie*, 1995, 28 (1), p 25-30.

Chaouche T. Contribution à l'étude des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales. Thèse de doctorat, université Abou-Bakr-Belkaid Tlemcen, 2014, p 39-56.

Christelle Chantal N., Yves-Alain B., Janat Akhanovna M., Anoubilé B., Bi Stéphane G. Sur la Composition en Métabolites Secondaires et L'activité Anti Oxydante D'extraits Bruts de *Gmelina Arborea* Roxb. (Verbanaceae) de Côte d'Ivoire, Afrique del'Ouest : Analyse par Chromatographie en Couche Mince. European Journal of Scientific Research, 2009, 36, p 161-171.

Collete E. Etude phytochimique et pharmacologie de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse de doctorat, Université de Bamako (Mali), 2003, p 29-30.

Debray M., Jacquemin H., Razafindrambo R. Travaux et documents de l'Orstom, Paris 1971, 8, p 150.

Diallo A. Biologiques de *Syzygium guineense* WILLD. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako, 2005, p 40-42.

Djeridane A., Hamdi A., Bensania W., Cheifa K., Lakhdari I., Yousfi M. The *in vitro* evaluation of antioxidative activity, α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory of natural phenolic extracts. Diabetes & Metabolic Syndrome : Clinical Research & Reviews, 2015, 9, p 324–331.

Djeridane A. Evaluation du pouvoir antioxydant et de l'inhibition d'enzymes (la Carboxylestérase et l'Acylase) par des extraits phénoliques de dix-neuf plantes médicinales locales, L'école normale supérieure de Kouba –Alger, 2008, p 1-150.

Ghasemzadeh A., Hawa Z. E., Jaafar and Rahmat A. Antioxidant Activities, Total Phenolics and Flavonoids Content in Two Varieties of Malaysia Young Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). Molecules, 2010, 15, p 4324-4333.

Gianmaria F., Amato I., Ingenito A., Zarrelli A. Gabriele Pinto and Antonino Pollio. Plant Polyphenols and Their Anti-Cariogenic Properties. A Review Molecules, 2011, 16, p 1486-1507.

Guy B., Janat Akhanovna M., Odette D., Jonathan G., Yves-Alain B. On the Qualitative Phytochemical Composition of Crude Hydromethanolic extracts of the Leaves of 6 Varieties of *Manihot Esculenta* Crantz of Côte d'Ivoire. European Journal of Scientific Research, 2010, 45, p 200-211.

Huang D, Ou B and Prior R L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2005, 53, p 1841-1856.

Hugues Alain N., Evelyne D., Janat Akhanovna M., Yves-Alain B. CCM D'extraits Selectifs de 10 Plantes Utilisées Dans le Traitement Traditionnel de L'hypertension Artérielle en Côte d'Ivoire. European Journal of Scientific Research, 2011, 66, p 575 585.

Jian T., Qinxue H., Jing Y., Rurun L., Xiuyi L., Chengping L., Chaoyin C., Ling., Robin S., and Kunlong B. *In vitro* anti-HIV and -HSV activity and safety of sodium rutin sulfate as a microbicide candidate. Antiviral Research, 2007, 75 (3), p 227-233.

Khacheba I., Djeridane A., Kameli A., and Yousfi M. The Inhibitory Effect of Some Algerian Plants Phenolics Extracts on the α - glucosidase and α - amylase Activities and their Antioxidant Activities. Current Enzyme Inhibition, 2014, 10, p 59-68.

Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E., Kefalas P. Phenolic profile and antioxidant activity of

the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). Food Chemistry, 2005, 89, p 411-420.

Mohammedi Z., Atik F. Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) Karst. International Journal of Pharma and Bio-Sciences, 2011, 1 (2), p 209.

Nait MBark A., Guillaume D., Kol O., Charrouf Z. Triterpenoid saponins from *Herniaria fontanesii*, Plant chemistry, 1996, 43(5), p 1075.

Pace G., Lima P., Vianello F., Renata C., Campos C., Galhardo M. Polyphenols in Fruits and Vegetables and Its Effect on Human Health. Food and Nutrition Sciences, 2014, 5, p 1065-1082

Paris M., Bouket A., Paris R. les flavonoïdes du *Fagara laurentii* de Wild Isolement d'un flavonoïde identifié à l'hespéridoside. Plantes Médicinales et Phytothérapie, 1969, 6, p 123 – 131.

Randerath K. Alcaloïdes, amines et autres composés basiques dans la chromatographie sur couches minces. European Journal of Lipid Science and Technology, 1971, 2, p 87.

Rao V. Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health (Plant Polyphenols: Extraction, Structural Characterization, Hemisynthesis and Antioxidant Properties). InTech, 2012, 2.

Rizk A. Constituents of plants growing in Qatar. Fitoterapia, 1982, 52 (2), p 35-42.

Salem J., H. Extraction, Identification, Caractérisation des Activités Biologiques de flavonoides, L'institut National polytechnique de Lorraine, Thèse de doctorat, 2009, p 125-130

Sanchez-Moreno C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. International Journal of Food Science and Technology, 2002, 8, p 121-137.

Sanjay R., Biradar, Bhagyashri D. Rachetti. Extraction of some secondary metabolites & thin layer chromatography from different parts of *Centella asiatica* L. (URB). American Journal of Life Sciences, 2013, 1(6), p 243-247.

Tiong S., Yeng Looi C., Hazni H., Arya A., Paydar M., Fen Wong W., Cheah S., Mohd Rais M., and Awang K. Antidiabetic and Antioxidant Properties of Alkaloids from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Molecules, 2013, 18, p 9770-9784.

Trease E., Evans W. Pharmacognosie. Billiaire Tindall, 1987, 13, p 61-62.

Wissam Z., Ghada B., Wassim A., Warid K. Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2010, 3, p 675-682.

VI. Annexes

VI.1. Photos des plaques CCM

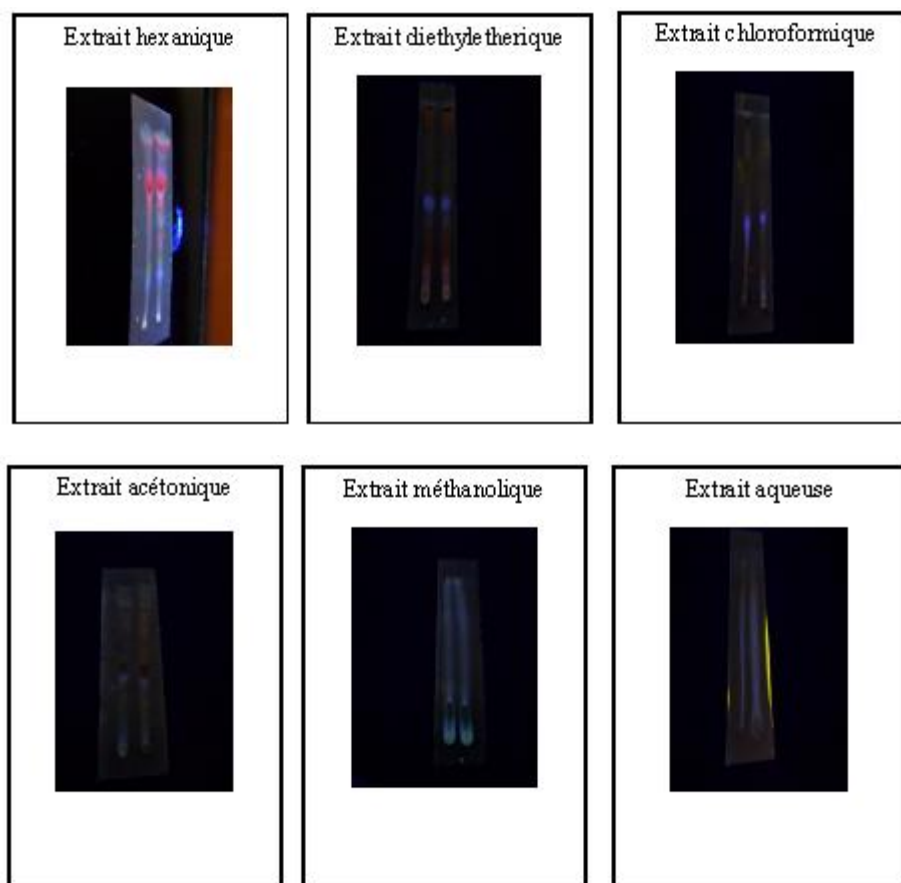


Figure 7: Photos des plaques CCM avant pulvérisation par les réctifs de révélation visualisée sous UV à 366 nm

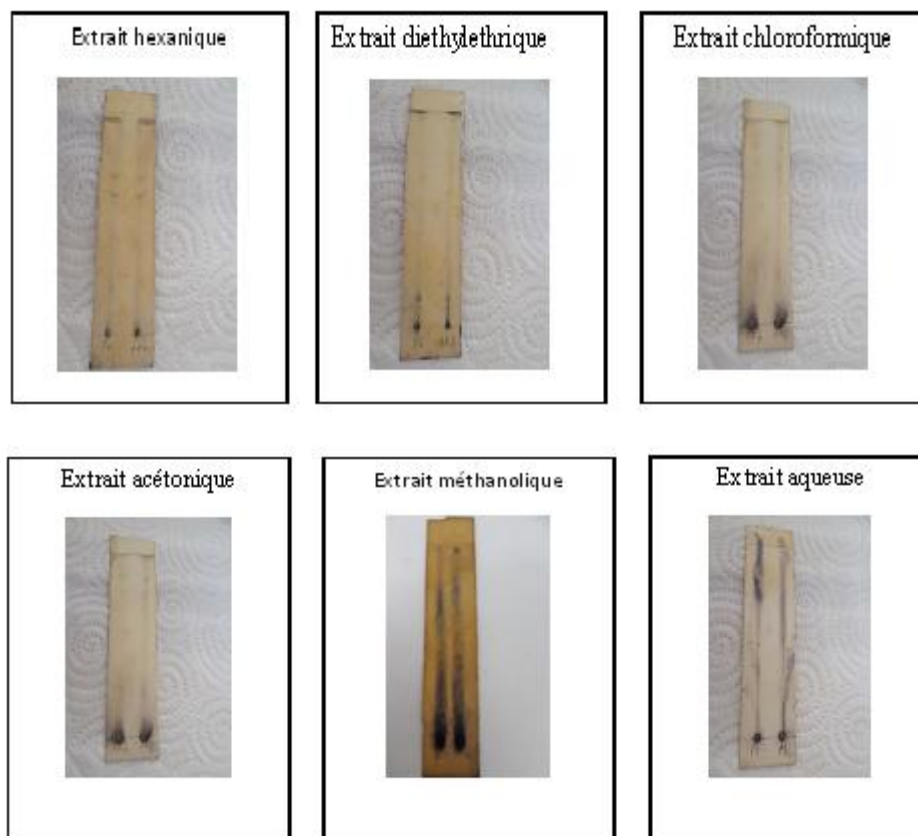


Figure 8: Photos des plaques CCM après pulvérisation par le réactif de Molish

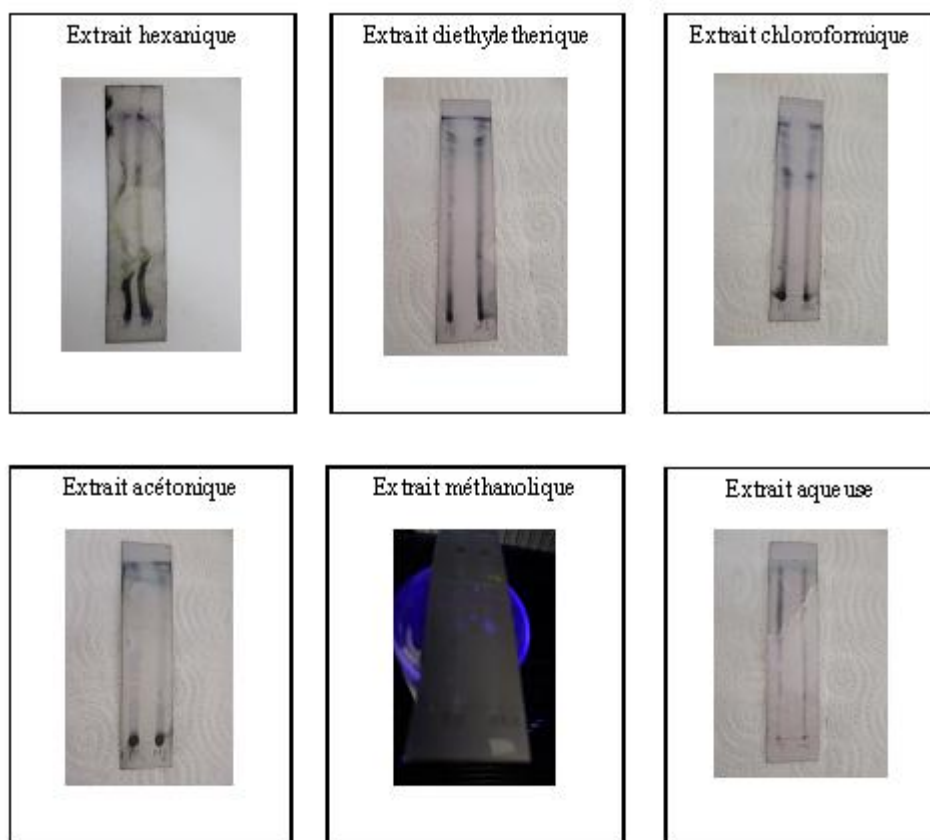


Figure 9: Photos des plaques CCM après pulvérisation par le réactif de Godin

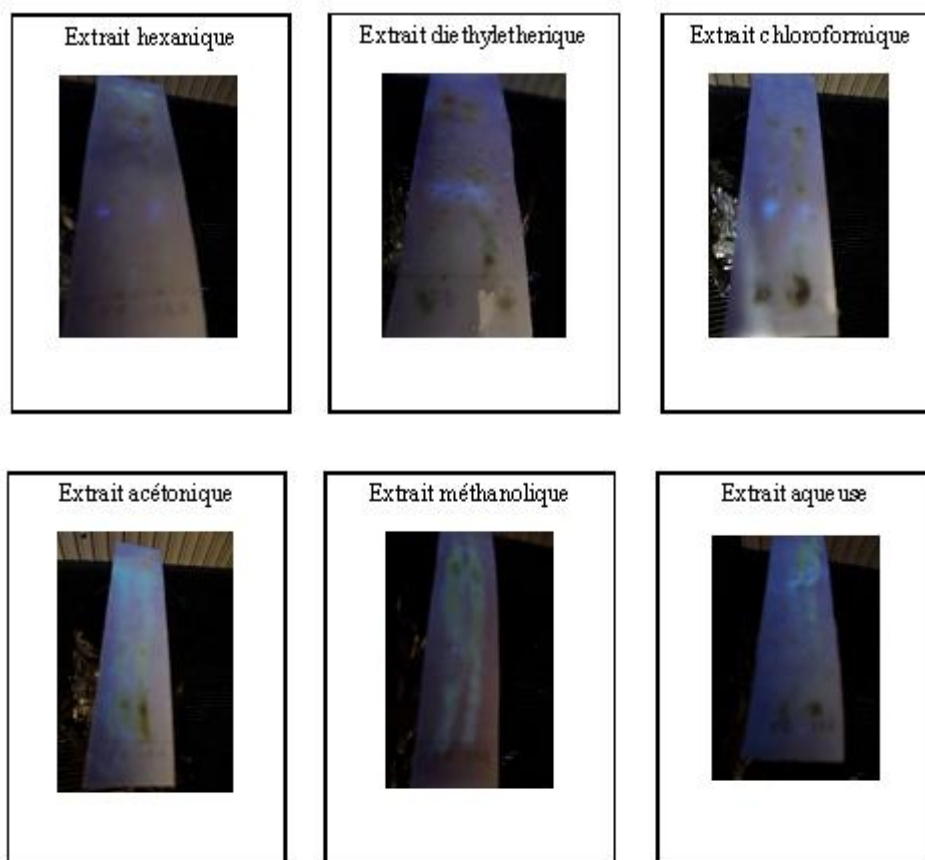


Figure 10: Photos des plaques CCM après pulvérisation par le réactif de Liebermann-Burchard

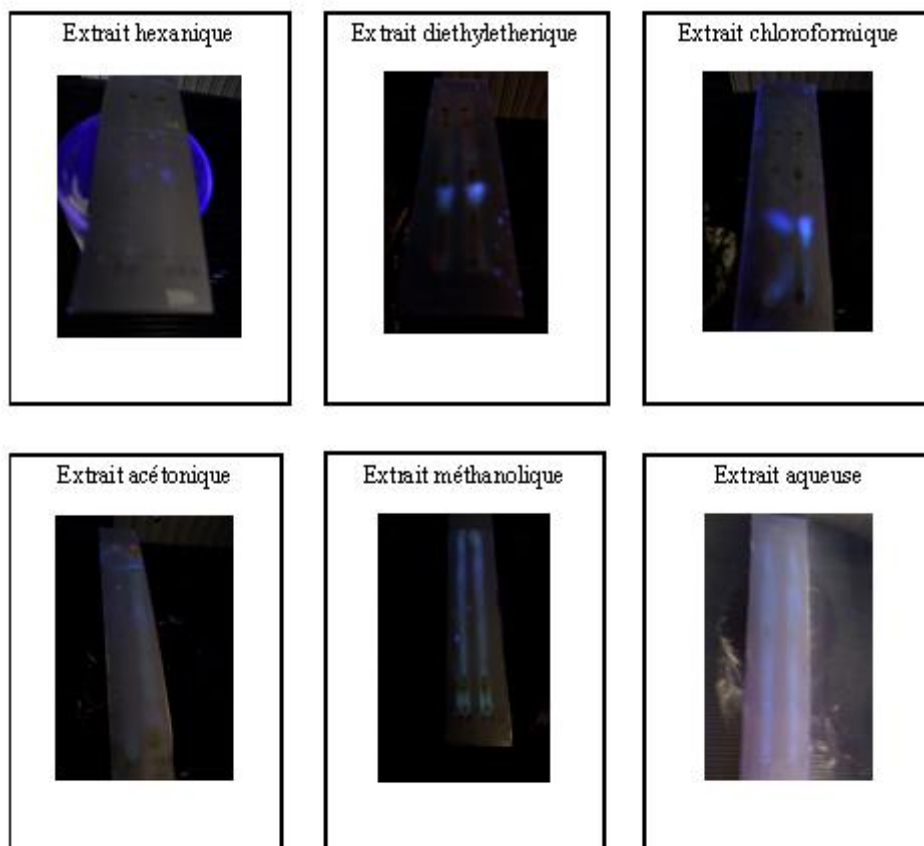


Figure 11: Photos des plaques CCM après pulvérisation par l'acétate de plomb

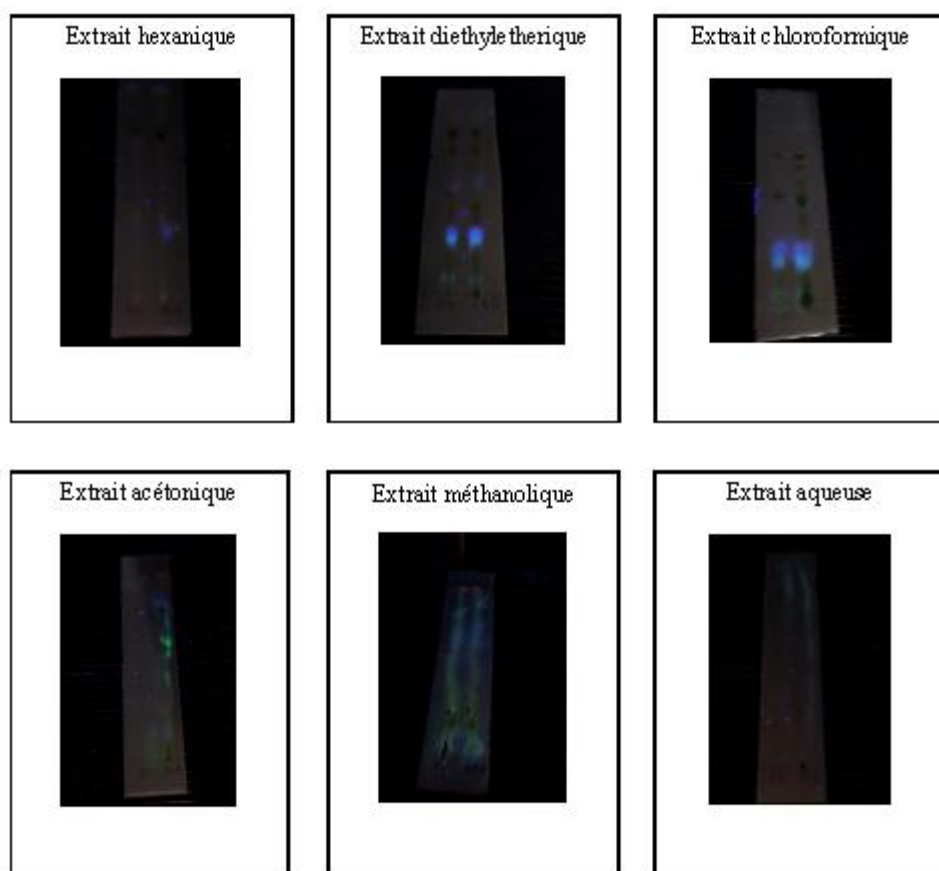


Figure 12: Photos des plaques CCM après pulvérisation par le chlorure d'aluminium.

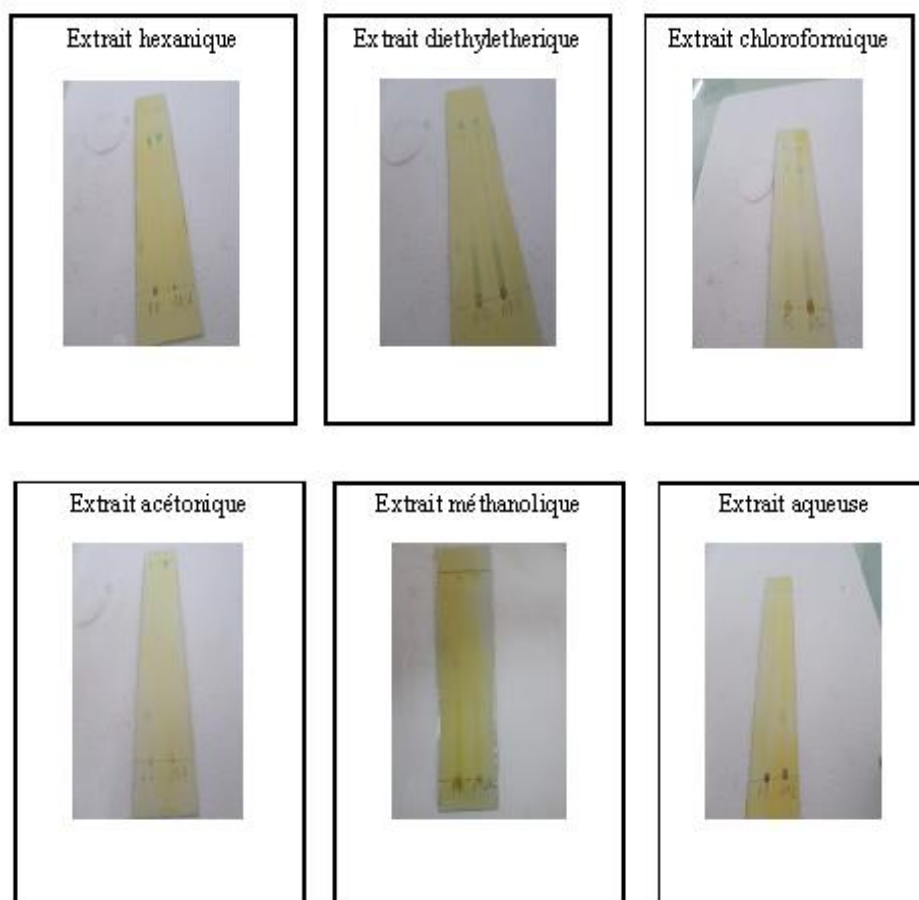


Figure 13: Photos des plaques CCM après pulvérisation par le réactif de Dragendorff

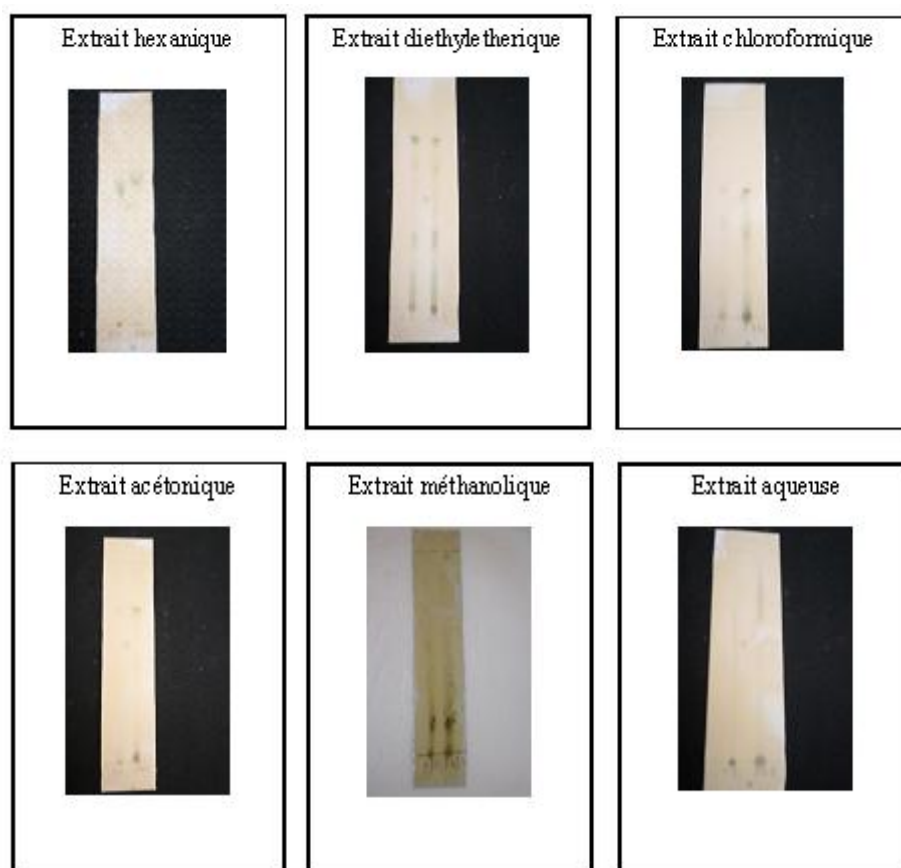
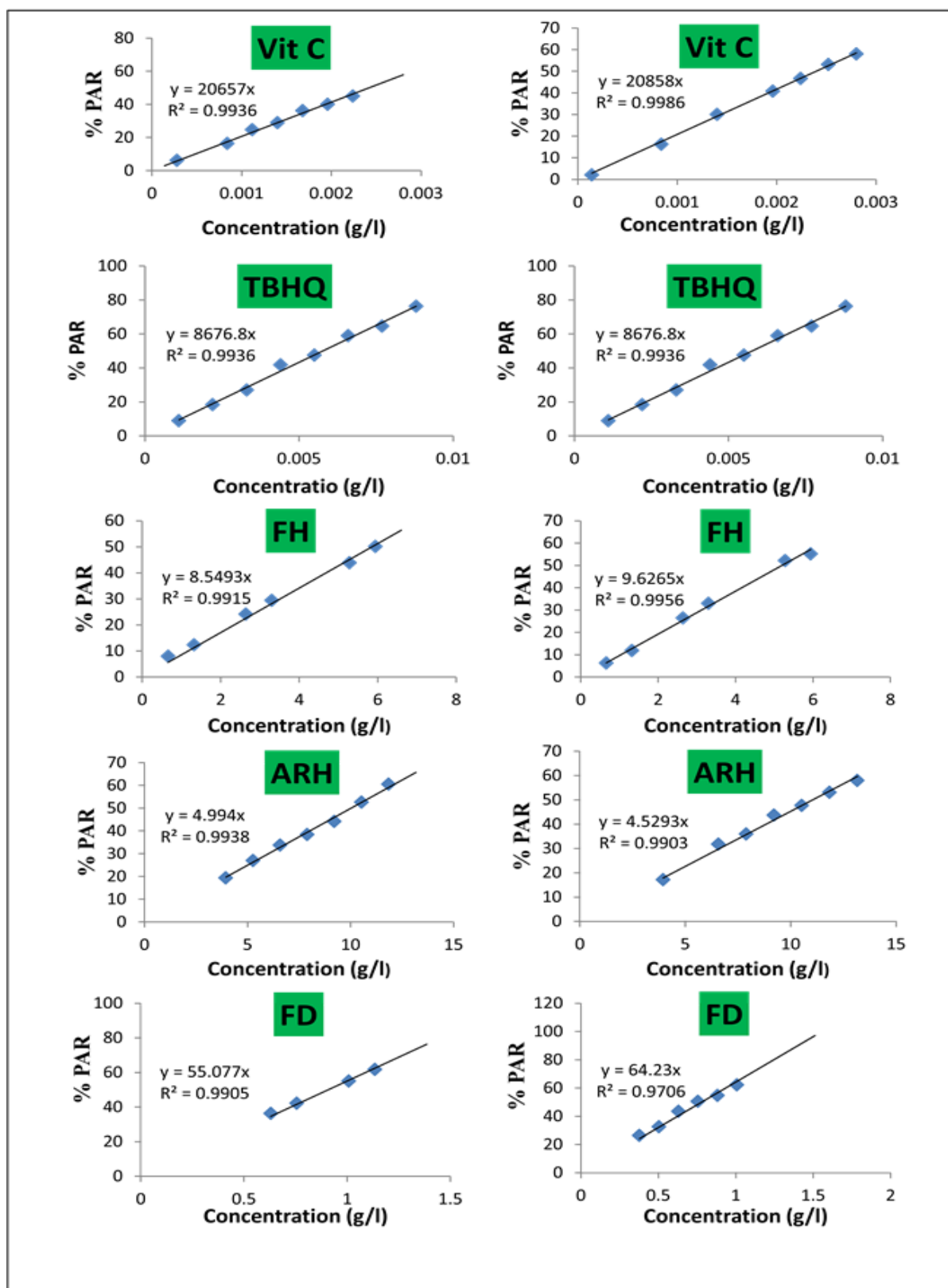
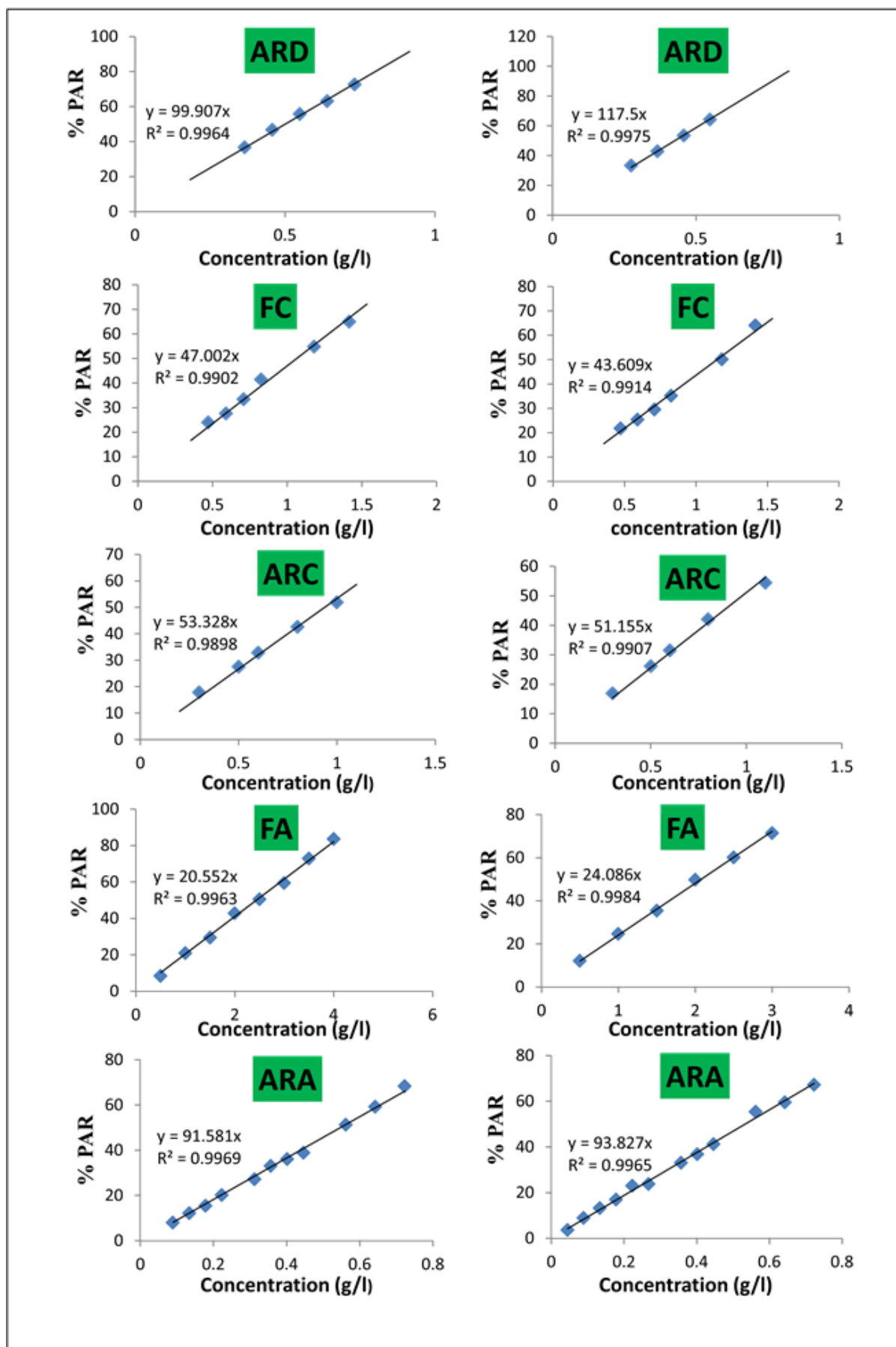
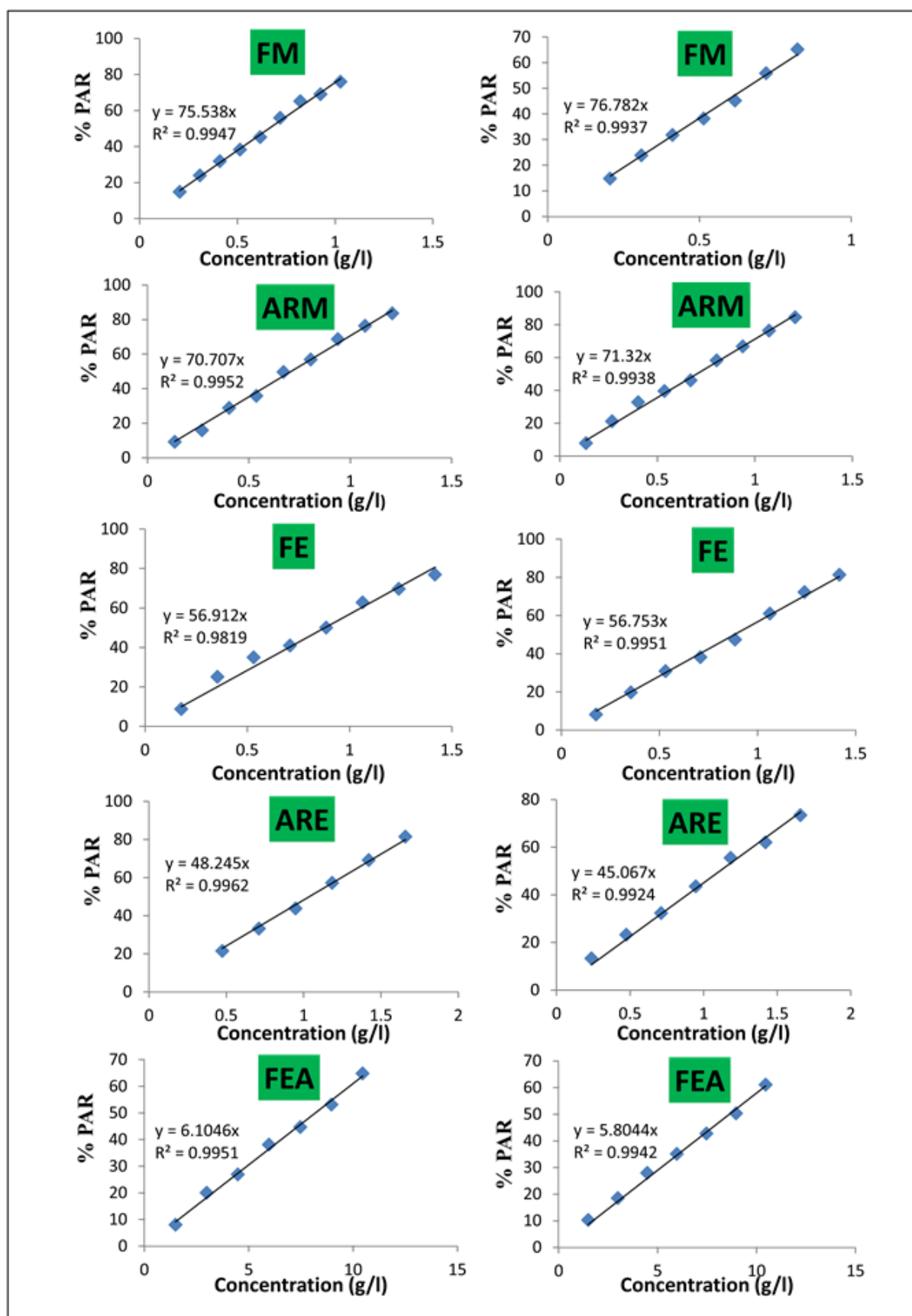


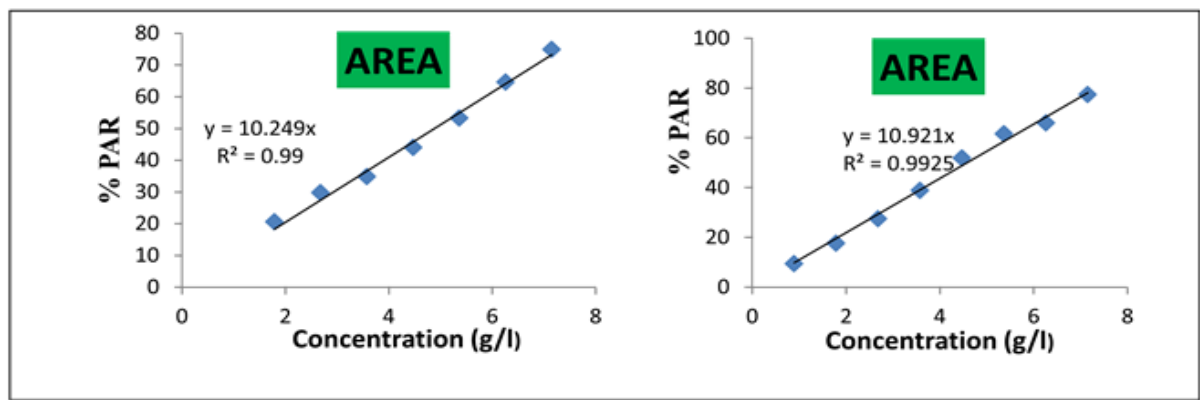
Figure 14: Photos des plaques CCM après pulvérisation par le FeCl_3

VI.2. Figures du pouvoir antiradicalaire des extraits mesurés par le test du DPPH

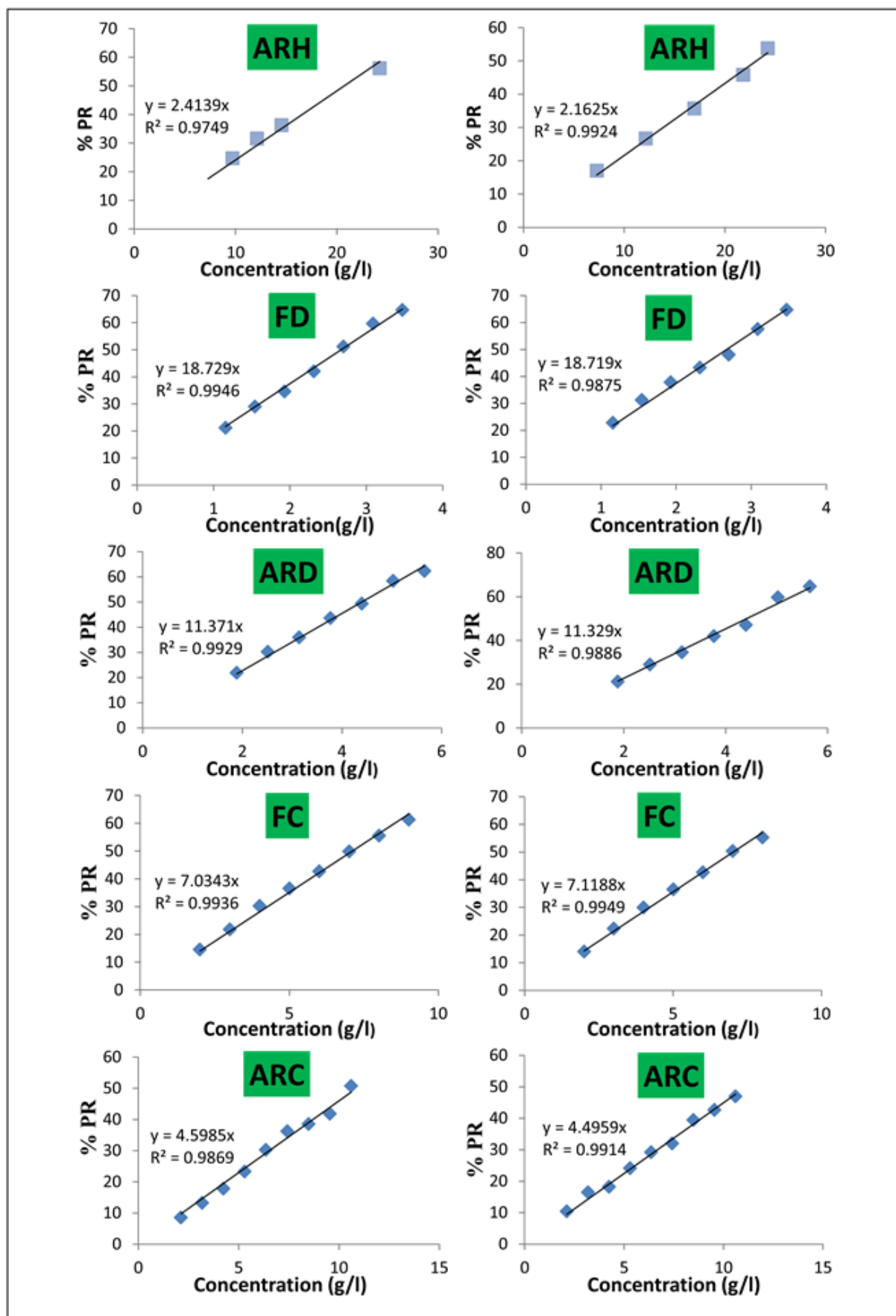


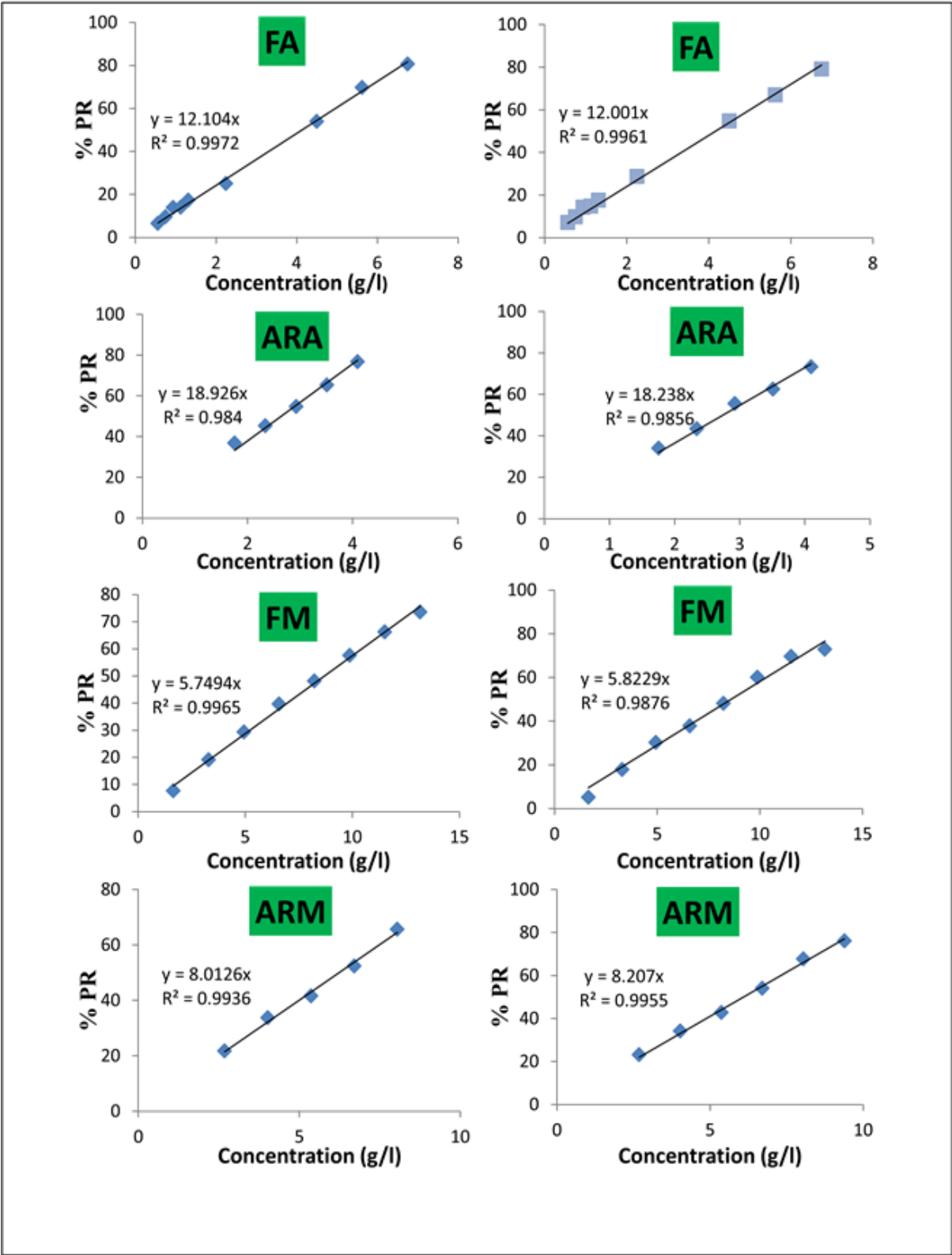


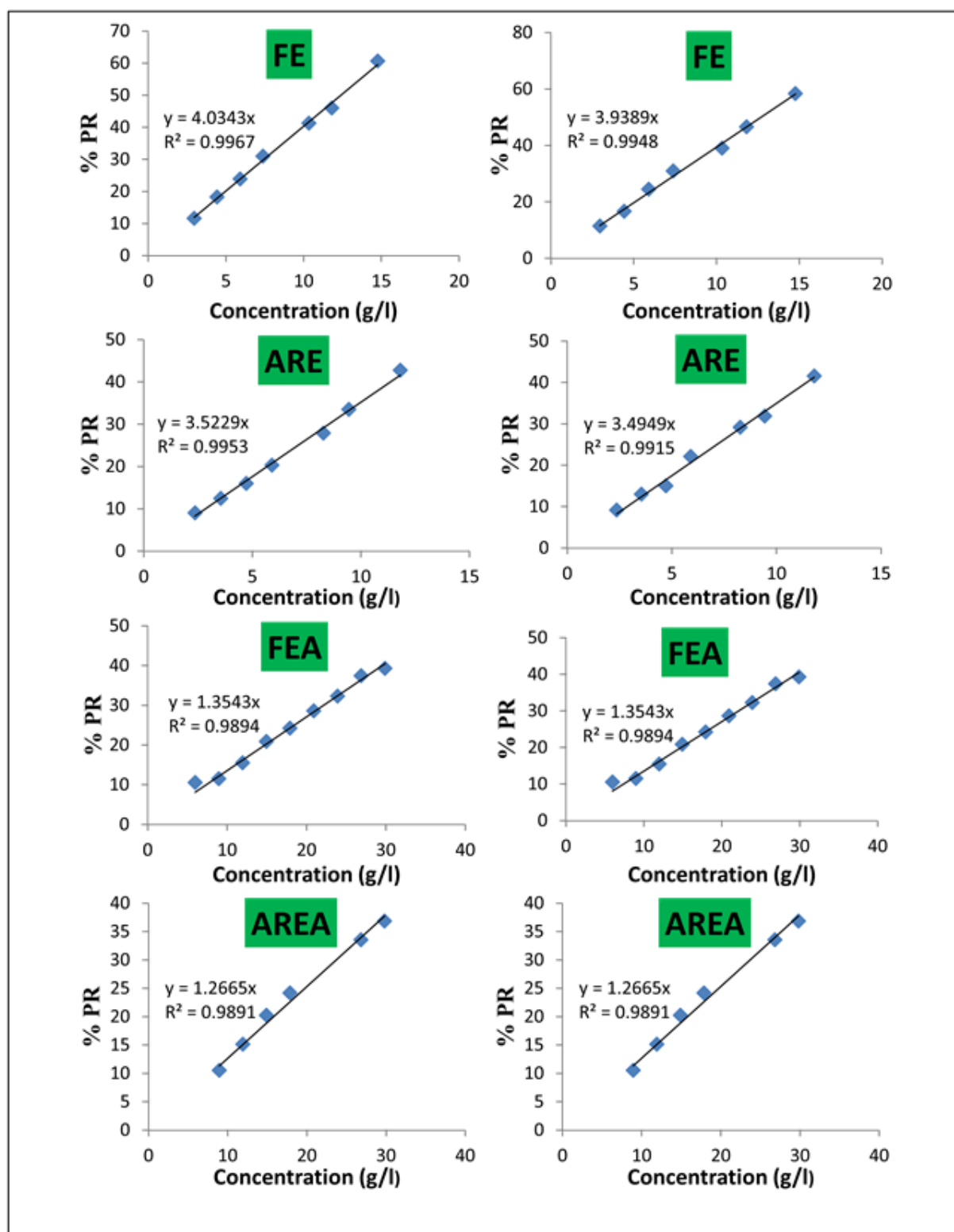


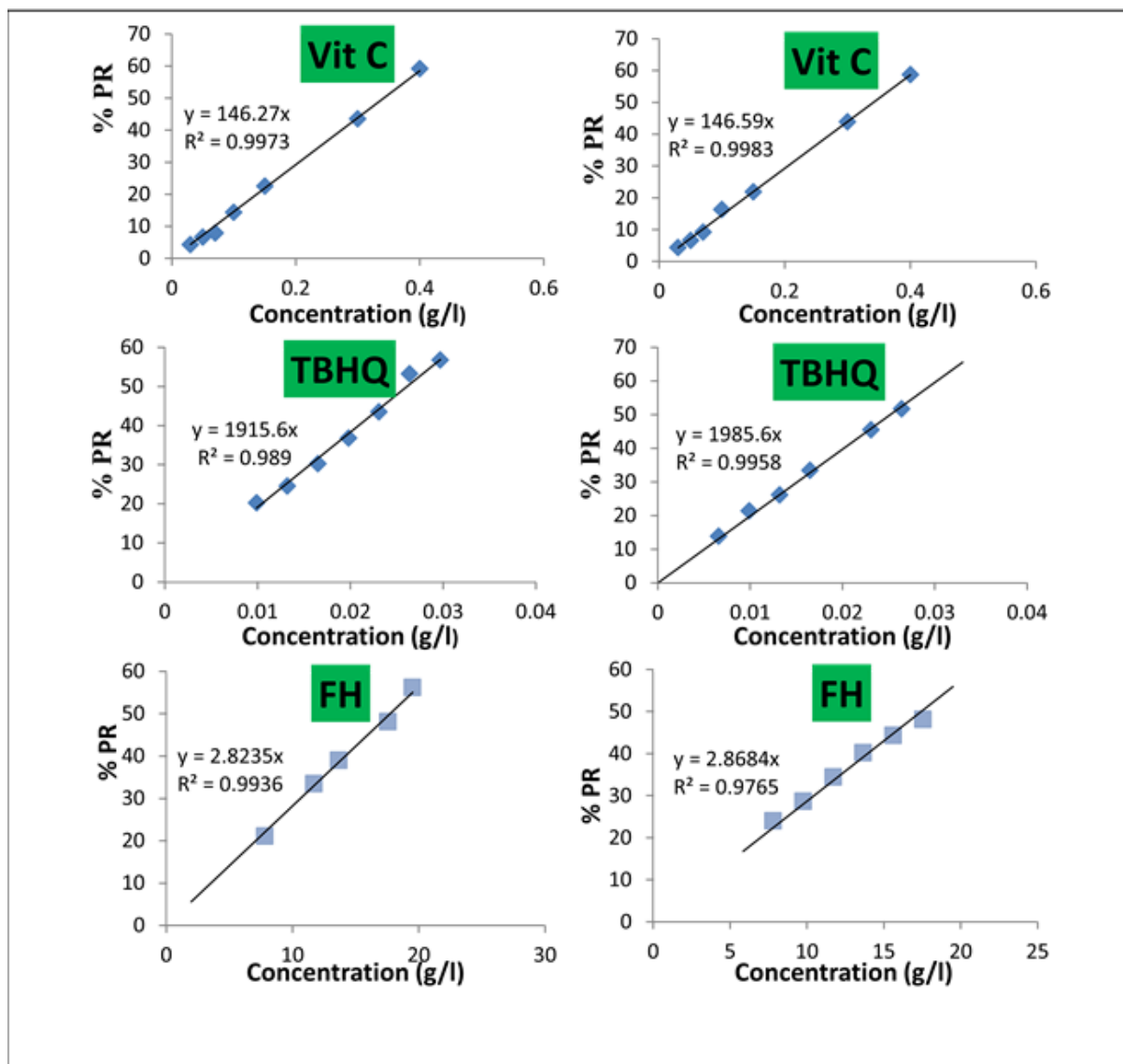


VI.3. Figures du pouvoir réducteur des extraits mesuré par le test du CUPRAC









VI.4. Figures du pouvoir chélateur du fer ferreux des extraits

