



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et Recherche Scientifique

جامعة الشهيد حمزة لخضر الوادي

Université Echahid Hamma Lakhdar – El-OUED

كلية علوم الطبيعة والحياة

Faculté des Sciences de la Nature et de la vie

قسم البيولوجيا الخلوية والجزيئية



MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie appliquée

THEME

**Etude phytochimique (GC/MS) et biologique
d'un extrait d'une plante médicinale de la flore
algérienne (Sahara)**

Présenté par :

M^{lle} AROUA Ikram

M^{lle} KHELIFI Mouna

M^{lle} RABBANI Imane

M^{lle} TEDJANIA Siham

06 Juin 2023

Devant le jury composé de :

Président: BOUALI Noureddine

MCB

Université d'El-Oued

Promotrice: HAOUAT Ammar

MCB

Université d'El-Oued

Examineur: KHELEF Yahia

MCB

Université d'El-Oued

Année universitaire 2022/2023

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



Remerciements

*T*out d'abord, nous remercions dieu tout puissant qui nous a donné la force et la chance
d'achever ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer ma plus vive reconnaissance à mon encadreur

Mr HAOUAT Ammar

*Pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigoureuse scientifique, sa
disponibilité, ses précieux conseils, la confiance qu'elle nous a accordé et pour son suivi
régulier à l'élaboration de ce travail.*

*Un grand merci va à **Mr BENSOUISSI Chawki** et son équipe de laboratoire de
biochimie de **CRBT** pour toute l'aide qu'elle nous a apporté au cours de notre pratique.*

*Toute personne qui a participé de près ou de loin directement ou indirectement, à la
réalisation de ce travail.*

Dédicace

A mon père **Youcef** et ma mère **Teber**.

A mon cher mari **Ahmed Yacine DRIHEM**.

A mes chères sœurs **Ikram, Fatima el-Zahra**.

A mes très chers frères **Amdjad, Baha Eddine, Mohammed Ali et Kossai**.

A toute la famille **TEDJANIA et DRIHEM**

A toutes les mains qui m'ont été tendues.



SIHAM

Dédicace

A mon cher père **Ahmed** et ma chère mère **Djamila**
A ma grand-mère **khaïra**.

A mes chères sœurs **Meriem, Soumaya, Maroua**.
A la belle-sœur **Roumaïssa**.

A mes très chers frères **Hamza, Nour Eddine, Hatem** et **Walid**.

A toute la famille **AROUA**.

A toutes les mains qui m'ont été tendues.



IKRAM

Dédicace

A mon père **Mohammed** et ma mère **Aïcha**

A mes chères sœurs **Naïma, Oum Essaad, Israa** et **El-Batoul**.

A mes très chers frères **Amara, Ahmed amine**.

A mes neveux **Raéd, Siwar**.

A toute la famille **RABBANI** et **LATRI**.

A toutes les mains qui m'ont été tendues.



IMANE

Dédicace

A mon père **Elhachmi** et ma mère **Nadia**.

A mes chères sœurs **Djouhaïna**, **Ikhlas**, **Aroua** et **Assil**.

A mon très cher frère **Taha**, son fils **Sanad** et son épouse **Achwak**.

A toute la famille **KHELIFI** et **GADI**.

A toutes les mains qui m'ont été tendues.



MOUNA

Résumé

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la découverte d'antioxydants naturels d'origine végétale, on a réalisé une étude de la composition chimique de notre plante (phytochimique) par la GC-MS et une évaluation des propriétés antioxydants de plante *Calligonum comosum* (L'Arta).

L'analyse GC-MS nous a permis d'identifier 37 composés de l'extrait d'éther de pétrole de *Calligonum comosum*, dans lequel 14 composés étaient majoritaires : Pinitol, Néophytadyne, Phytol, Acide Kolavenique, Androstane-3-one, Parkéol, Cycloarténol, Farnésol, Acétate Kolavénol, Vitamine-A, Stigmast-5-ène, 3. beta, Acide Cinnamique, Acide Palmitique, Turanose.

L'étude de l'activité biologique de la plante a été réalisé par 4 méthodes (DPPH, ABTS, β -carotène, phénanthroline). Les résultats obtenus ont donné une bonne efficacité antioxydants de l'extrait, pour DPPH ($IC_{50}=48,62\pm 1,61\mu\text{g/ml}$), pour ABTS ($IC_{50}=14,97\pm 1,23\mu\text{g/ml}$) et pour β -carotène ($IC_{50}= 18,33\pm 1,23\mu\text{g/ml}$) et finalement, phénanthroline ($A_{0,5} =14,72\pm 1,17 \mu\text{g/ml}$). Le dosage quantitatif des flavonoïdes et des polyphénols confirme la richesse de l'extrait en polyphénols et flavonoïdes.

Mots clés: *Calligonum comosum*, polyphénol, flavonoïde, activité antioxydant, DPPH, ABTS, β -carotène, phénanthroline.

Abstract

In the context of the discovery of new antioxidants from natural sources, we are interested in this work to study of the chemical composition by GC_MS technique and the evaluation of the antioxidant properties of the plant *Calligonum comosum* (L'Arta).

GC_MS analysis allowed us to identify 37 compounds in the extract of *Calligonum comosum*, in which 14 compounds were in the majority, namely: pinitol, Neophytadyne, Phytol, Kolavenic acid, Androstan-3-one, Parkeol, Cycloartenol, Farnesol, Kolavenol acetate, Vitamin-A, Stigmast-5-ene, 3. beta, Cinnamic acid, Palmitic Acid, Turanose.

The study of the biological activity of the plant by 04 methods (DPPH, ABTS, β -carotene, phenanthroline). The obtained results of evaluation of activity antioxidants gave a good antioxidant effectiveness of the extract, for DPPH ($IC_{50} = 48,62 \pm 1,61 \mu\text{g} / \text{ml}$), for ABTS ($IC_{50} = 14,97 \pm 1,23 \mu\text{g} / \text{ml}$) and for β -carotene ($IC_{50} = 18,33 \pm 1,23 \mu\text{g}/\text{ml}$) and finally for phenanthroline ($A_{0.5} = 14,72 \pm 1,17 \mu\text{g}/\text{ml}$) ($IC_{50} = \mu\text{g} / \text{ml}$) The quantitative determination of flavonoids and polyphenols testifies the richness of the extract in polyphenols and the flavonoids.

Key Words: *Calligonum comosum*, polyphenols, flavonoid, antioxidant activity, DPPH, ABTS, β -carotene, phenanthroline.

الملخص:

عملنا هو جزء من اكتشاف مضادات الأكسدة الطبيعية من أصل نباتي، أجرينا دراسة التركيب الكيميائي لنباتنا بواسطة GC-MS وتقييم الخصائص المضادة للأكسدة لنبات (أرطى) *Calligonum comosum*

سمح لنا تحليل GC-MS بتحديد 37 مركبًا من مستخلص الإيثر البترولي من *Calligonum comosum*، حيث اخترنا 14 مركبًا رئيسيًا وهم: Pinitol ، Néophytadyne ، Phytol ، Acid Kolavenic ، Acétate de colaphénol، Vitamine A، Farnesol ، Cycloarténol ، Parkéol ، Androstane-3-one Stigmast-5-ène، 3.β، Acide Cinnamique، Acide Palmitique، Turanose.

أجريت دراسة النشاط البيولوجي للنبات بأربع طرق (DPPH ، ABTS ، phénanthroline ، β-carotène). النتائج التي تم الحصول عليها أعطت فعالية جيدة كمضاد للأكسدة للمستخلص ، $IC_{50} = 48.62 \pm 1.23$ (DPPH) $1.61 \mu\text{g} / \text{ml}$ ، $IC_{50} = 14.97 \pm 1.23 \mu\text{g} / \text{ml}$ ABTS و $IC_{50} = 18.33 \mu\text{g} / \text{ml}$ β-carotène وأخيرًا $A_{0.5} = 14.72 \pm 1.17 \mu\text{g} / \text{ml}$ phénanthroline. تؤكد الجرعة الكمية من مركبات الفلافونويد والبولىفينول ثراء المستخلص في البولىفينول والفلافونويد.

الكلمات المفتاحية: *Calligonum comosum*، بولىفينول، فلافونويد، نشاط مضاد للأكسدة، DPPH ، ABTS ، β-carotène ، phénanthroline.

Liste des abréviations

- **A_{0,5}** : Concentration indiquant 0,50 d'absorbance.
- **ABTS** : Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6 sulfonique).
- **ACh** : Acétylcholine.
- **AlCl₃** : Chlorure d'aluminium.
- **BHA** : Butyl Hydroxy Anisole.
- **BHT** : Butyl Hydroxy Toluène.
- **IC₅₀** : Concentration inhibitrice à 50%.
- **CPG** : Chromatographie en phase gazeuse.
- **DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.
- **ECD** : Détecteur à capture d'électrons.
- **FID** : Détecteur à ionisation de flamme.
- **GC/MS** : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
- **NPD** : Détecteur spécifique de l'azote et du phosphore.
- **TFC** : Total Flavonoïde Content.
- **TR** : Temps de rétention.

Liste des figures

Figure 01. Représentation photographies de l'espèce <i>Calligonum comosum</i>	5
Figure 02. Structure de base des flavonoïdes	6
Figure 03. Structure générale des tanins catéchiques.	8
Figure 04. structure de betuline que isolés de l'espèce <i>Calligonum comosum</i>	8
Figure 05. Stéroïdes qu'isolés de l'espèce <i>Calligonum comosum</i>	8
Figure 06. Structure de DPPH.	20
Figure 07. Structure de ABTS	21
Figure 08. Formation du complexe Fe^{+2} -phenanthroline.....	23
Figure 09. Chromatographie GC/MS de l'extrait <i>Calligonum comosum</i> L'her.	26

Liste des tableaux

Tableau 01. Position systématique de <i>Calligonum comosum</i> L'Her.	5
Tableau 02. Le classe de flavonoïde dans <i>Calligonum comosum</i>	7
Tableau 03. Les outils et solutions et appareils utilisés dans l'extraction de la plante.....	15
Tableau 05. le rendement d'extraction des extraits de <i>Calligonum comosum</i> L'her.	25
Tableau 04. Composition chimique de l'extrait de <i>C. comosum</i>	25
Tableau 06. Teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux.	27
Tableau 07. Inhibition du radical DPPH par les extraits biologiques.	28
Tableau 08. Inhibition du radical ABTS par les extraits biologiques.	28
Tableau 09. Activité antioxydant par β -carotène	29
Tableau 10. Activité antioxydant par phénanthroline	29

Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Résumé	
Liste des abréviations	I
Liste des figures.....	II
Liste des tableaux	III
Table des matières	IV
Introduction	2

Partie théorique

Chapitre I. Généralité de la plante *Calligonum comosum* L'her

I.1. Description botanique	5
I.2. Position systématique.....	5
I.3. Situation et climat de la région.....	5
I.4. Utilisations traditionnelles.....	6
I.5. Travaux antérieurs du genre <i>Calligonum comosum</i>	6
I.5.1. Les flavonoïdes.....	6
I.5.2. Tanins Cathéchiques.....	7
I.5.3. Triterpènes	8
I.5.4. Stérols	8
I.5.5. Saponosides	9
I.6. Activité biologique.....	9
I.6.1. Antioxydants.....	9
I.6.2. Activité alpha-amylase	9
I.6.3. Activité anti-inflammatoire	9
I.6.4. Activité alpha-glucosidase.....	9
I.6.5. Activité anticholinestérasés	10

Chapitre II. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM)

II.1. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/MS)	12
---	----

Partie expérimentale

Chapitre III. Matériels et méthodes

III. Matériels et méthodes.....	15
III.1. Récolte	15

III.2. Séchage et broyage	15
III.3. Extraction par Macération	15
III.3.1. Méthode	16
III.4. Analyse par GC/MS	16
III.5. Total bioactive content.....	16
III.5.1. Dosage de Flavonoïde, TFC (Total Flavonoïde Content)	16
a. Principe de la réaction.....	16
b. Instruments utilisés	17
c. Réactifs utilisés	17
d. Préparation des solutions	17
e. Préparation de l'extrait de plante	17
f. Procédure.....	17
III.5.2. Dosage des Flavonols (Flavonol content)	18
a. Principe de la réaction.....	18
b. Instruments utilisés	18
c. Réactifs utilisés	18
c.1. Préparation	18
c.2. Procédure	19
III.6. Activité antioxydant.....	19
III.6.1. Activité antiradicalaire au DPPH d'extrait	19
a. Réactive utilises	20
b. Mode opératoire.....	20
b.1. Préparation de la DPPH	20
b.2. Procédure	20
III.6.2. Activité antiradicalaire au ABTS d'extrait	20
a. Principe de la réaction.....	20
b. Instrument utilisé	20
c. Réactifs utilisés	21
d. Procédure	21
e. Procédure	22
III.6.3. Activité β -carotène et lycopène contents	22
a. Principe de la réaction.....	22
b. Instruments utilisés	22
c. Réactifs utilisés	22
d. Procédure	22
III.6.4. Activité antioxydant par phenanthroline	22

b. Réactifs utilisés.....	23
c. Préparation.....	23
d. Procédure.....	23

Chapitre IV. Résultat et discussion

IV. Résultat et discussion	25
IV.1. Etude phytochimique.....	25
IV.1.2. Rendement	25
IV.1.3. Caractérisation GC-MS de la composition de l'extrait de <i>Calligonum comosum</i> <i>L'her</i>	25
IV.2. Etude biologique.....	27
IV.2.1. Les activités antioxydantes	27
a. Activité antiradicalaire au DPPH.....	27
b. Activité antioxydante par le teste de piégeage ABTS	28
c. Activité antioxydant par β -carotène.....	28
d. Activité antioxydant par phénanthroline	29

Introduction

Depuis la nuit des temps, l'homme était en conflit avec plusieurs maladies, ce qui l'amène à utiliser plusieurs choses dans la médication, dont les plus importants sont les herbes. Cette utilisation a connu plusieurs évolutions. Les connaissances empiriques accumulées ont facilité aux différentes civilisations de prendre les plantes comme source essentielle de médicaments. Jusqu'au début du 20^{ème} siècle, presque tous les médicaments étaient d'origine végétale.

Pendant cette période, il y a eu une vague majeure d'intérêt ou de retour à ces médicaments, pour plusieurs raisons, dont la plus importante sont le coût et les effets secondaires des médicaments fabriqués, dans une courte période de temps, la moitié des médicaments acquis par la FDA (Food and Drug Administration) ont été examinés en raison de leurs effets secondaires.

L'Algérie contient plus de 3000 espèces de plantes, appartenant plusieurs familles botaniques, dont 15 % ENDEMIQUES. Il est considéré comme l'un des pays les plus variés, en raison de sa situation géographique, de son vaste territoire et de la diversité de son sol.

Pour connaître et confirmer la réalité de la plante *Calligonum comosum L'her* si c'est une plante médicale, nous avons mené cette recherche, qui focalise essentiellement sur trois axes principaux :

Tout d'abord, nous avons mené une étude théorique de la plante *Calligonum comosum L'her*, son emplacement, son type, ses caractéristiques les plus importantes.

Seconde : étude chimique de l'extrait d'éther de pétrole de la plante où nous avons utilisé GC/MS pour accéder aux molécules constituantes de la plante.

Enfin, nous avons effectué plusieurs tests biologiques de l'extrait de cette plante afin de déterminer son efficacité antioxydant.

Nous avons terminé nos recherches en analysant les résultats et en les comparant aux résultats de recherches antérieures sur la même plante.



Partie
Théorique





Chapitre I

Généralité de la plante

Calligonum comosum

L'her

I.1. Description botanique

L'Arta est un arbuste médicinaux à base de plantes appartenant à la famille des agrumes (KAROUCHE et HECHIFA, 2017), est un arbuste sans feuilles, grand, ligneux et vivace que l'on trouve dans toute l'Afrique du nord, le centre et l'est de l'Arabie (ALZHRANI,2021). La plante est largement utilisée à de fins économiques et dans la médecine traditionnelle (SOLIMAN *et al.*, 2023). Il a plusieurs noms, y compris : Alalabi, alramo ...etc. (KAROUCHE et HECHIFA, 2017).



Figure 01. Représentation photographiques de l'espèce *Calligonum comosum* L'Her.

I.2. Position systématique

Tableau 01. Position systématique de *Calligonum comosum* L'Her (QUZEL et SANTA, 1963).

Famille	<i>Polygonaceae</i>
Genre	<i>Calligonum</i>
Espèce	<i>Calligonum Comosum L'her</i>
Nom Vernaculaires	<i>Larta, Lartaya</i>

I.3. Situation et climat de la région

La ville d'El-Oued est située au sud-est de l'Algérie, La wilaya est limitée: au nord par la wilaya de Khenchla, au nord-est par la wilaya de Tébessa, au nord-ouest par la wilaya de Biskra, l'ouest par la wilaya de Djelfa, l'est par la Tunisie, au sud et sud-ouest et par Ouargla (ZINE, 2008).

Le climat de la région est de type saharien se caractérisant par des températures élevées en été, il fait en moyenne 34°, un faible taux des précipitations (moyenne annuelle jusqu'à 3.8mm), d'une évaporation intense et d'un rayonnement solaire excessif. Il est également exposé à des vents actifs toute l'année (**KARROUCHE et HECHIFA, 2017**). Les seules ressources hydriques disponibles dans cette région sont les nappes d'origine souterraines (**ZINE, 2008**).

I.4. Utilisations traditionnelles

Utilisé en médecine traditionnelle en raison de son importance médicale primordiale (**ABDALAH et al., 2014**), ses parties aériennes ont traditionnellement plusieurs applications ethno-médicinales dont la mastication pour soulager les maux de dents et soigner les ulcères gastriques et les douleurs abdominales. De plus sa décoction de racines a été utilisée pour soigner les plaies des gencives (**ALZHRANI, 2021**). Les feuilles sont utilisées contre les piqûres de scorpions. Ses racines sont utilisées vermifuge (**MAHBOUB, 2018**). C'est plante pastorale du désert consommé par les grands mammifères comme les chèvres...etc., il fournit de l'ombre pour les animaux désert, et stabilisation des dunes de sable. C'est aussi une source de bois de chauffage dans la région (**HELICE, 2007**).

I.5. Travaux antérieurs du genre *Calligonum comosum*

Une étude phytochimique a montré que les produits du métabolisme secondaire trouvée dans la plante de *Calligonum comosum l'her* sont: les flavonoïdes (sont des composés phénoliques très connus dans ce genre et jouent un rôle important dans le système de défense comme antioxydants (**BELAABED, 2018**)), les composés réducteur, les tanins cathéchique, les Anthocynes, les stérols et triterpènes, les saponosides (**MEKKI et ADJAL, 2015**).

I.5.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes appartiennent à la grande famille des polyphénols, molécules connues pour leur multiples activités biologiques, presque tous les tissus végétaux sont capables d'en synthétiser (**KERMICHE et al., 2022**). Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (**FREDDY, 2013**).

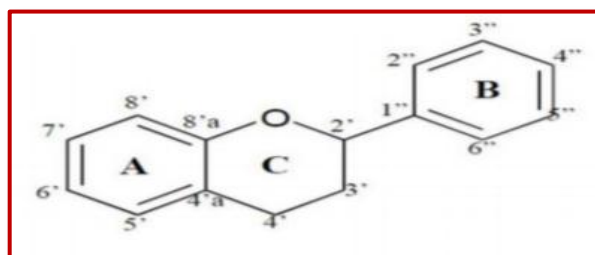
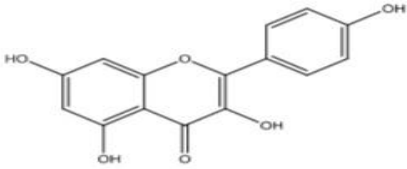
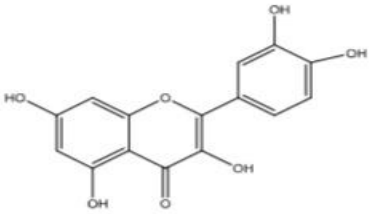
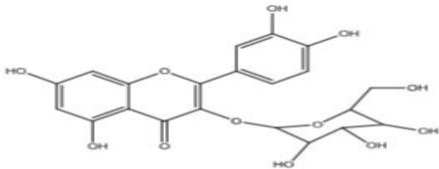
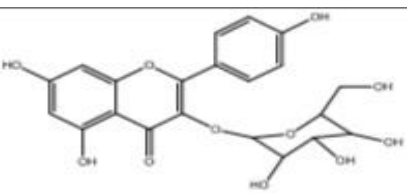
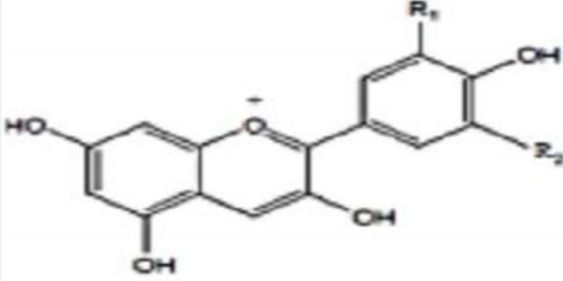


Figure 02. Structure de base des flavonoïdes (**COLLIN et CROUZET, 2011**).

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et par conséquent possèdent tous un même squelette de base. Basé sur le degré d'oxydation et de substitution de la position 3 du cycle C (BOUHALA et BOUHLAIS, 2014).

Tableau 02. La classe de flavonoïde dans *Calligonum comosum* (BELAABED, 2018).

Le classe	Structure et dénomination	Reference
Flavonols	<div style="text-align: center;">  <p>Kaempferol</p> </div> <hr/> <div style="text-align: center;">  <p>Quercetine</p> </div> <hr/> <div style="text-align: center;">  <p>Quercetine-3-O-β-D-glucoside (isoquercitrine)</p> </div> <hr/> <div style="text-align: center;">  <p>kaempferol-3-O-β-D-glucuronide</p> </div>	(BELAABED, 2018)
Les Anthocyanes	<div style="text-align: center;">  </div>	(MOUZAOUI <i>et al.</i> ,2021)

I.5.2. Tanins Cathéchiqes

Ce sont polyphénols constitués d'unité flavan-3-ols, également appelée "catéchine ou épicatechine" (NASSAR, 2017).

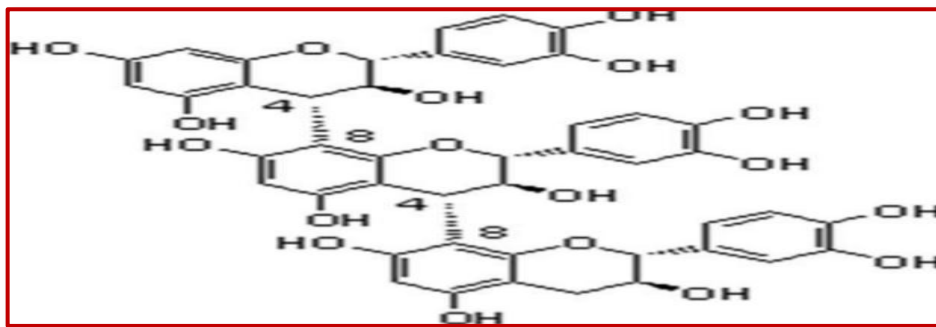


Figure 03. Structure générale des tanins catéchiques (DADDA *et al.*, 2022).

I.5.3. Triterpènes

C'est une classe des terpènes, c'est un composant hydro-carbonique résultant de la condensation d'unités isoprènes à 05 atomes de carbone. Les tri-terpènes contiennent 30 atomes de carbone (06 unités isoprènes) (KAROUCHE et HECHIFA, 2017).

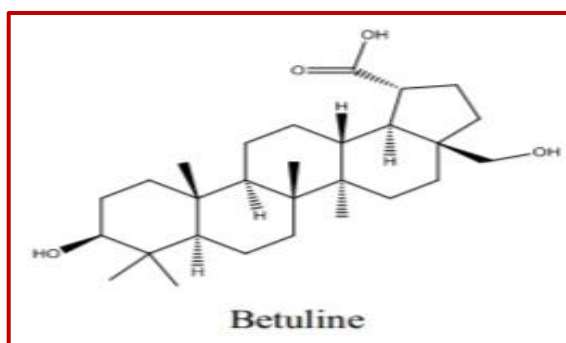


Figure 04. Structure de bétuline qu'isolés de l'espèce *Calligonum comosum* (BELAABED, 2018).

I.5.4. Stérols

Sont des métabolites d'origine terpénique distribués entièrement dans le règne végétal et animal.

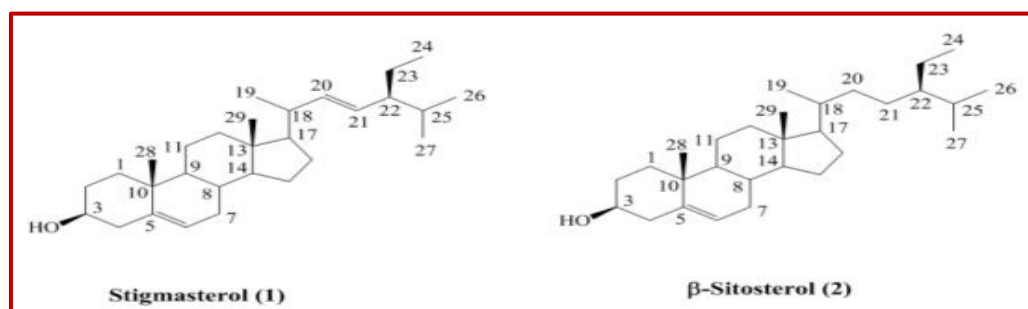


Figure 05. Stérols qu'isolés de l'espèce *Calligonum comosum* (CHATURVEDULA et PRAKASH, 2012).

I.5.5. Saponosides

Les saponines sont des terpènes glycosylés contenus dans les plantes qui doivent leur nom au fait qu'elles moussent lorsqu'on les mélange avec l'eau. Elles existent sous deux formes: les stéroïdes et les triterpénoïdes (**LITIEM et ZELACI, 2016**).

I.6. Activité biologique

I.6.1. Antioxydants

Les antioxydants sont de substance qui est capable de retarder, empêche et neutraliser les dommages causés par les radicaux libres dans les corps (**BOUKENI et TOUM, 2020**).

Les composés phénoliques ont un avantage antioxydants en raison de leur capacité à capturer les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène (**LARABA *et al.*, 2016**).

I.6.2. Activité alpha-amylase

C'est une glycosidase qui hydrolyse les liaisons osidiques α -1,4 des polysaccharides (amidon et glycogène) en libérant du glucose, du maltose et des malt- dextrines solubles de taille variable (**BOULHOUT et BOUKEBOUS, 2021**).

Plusieurs composés phénoliques sont doués d'une activité inhibitrice de l' α - amylase donc les composés phénoliques ont ainsi un potentiel thérapeutique pour le traitement de l'obésité et du diabète (**BOUDJEDOUR et BERTIL, 2016**).

I.6.3. Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est un processus de défense immunitaire du corps contre les agressions qui il provoque des lésions tissulaire (**OTMANI et SLIMANI, 2018**).

Les flavonoïdes possèdent des caractéristiques anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations (**BELILI et LAHMER, 2018**).

I.6.4. Activité alpha-glucosidase

Alpha glucosidase est une enzyme liée à une membrane qui facilite l'absorption du glucose par l'intestin grêle. L'inhibition de α -glucosidase dans l'intestin grêle retarde le taux de clivage hydrolytique des oligosaccharides. Le processus de digestion se propage à la partie inférieure de l'intestin grêle, ce qui retarde le taux global d'absorption du glucose dans le sang et diminue l'augmentation postprandiale de la glycémie (**KUMARI *et al.*, 2017**).

Les flavonoïdes et terpènes sont connus comme bons inhibiteurs l'alpha-glucosidase donc contrôlé l'hyperglycémie (**KIRANA et ANANDA, 2020**).

I.6.5. Activité anticholinestéras

Les Cholinestéras est une enzyme spécialisée et sa principale fonction physiologique est hydrolyse de l'acétylcholine (ACh), il existe deux types de cholinestéras: l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestéras (**JEBALI *et al.*, 2013**).

Alzheimer est une maladie neurodégénérative progressive développe dans le système nerveux central. Un des traitements de cette maladie est l'utilisation d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase, c'est à dire en inhibant sa dissociation au niveau de la fente synaptique (**BAADECHE et BENHACINE, 2020**), les polyphénols peuvent être considérés comme des neuro-protecteurs actifs possibles avec une application potentielle dans les anti-Alzheimer (**HASSAN KHAN *et al.*, 2009**).



Chapitre II

***Chromatographie en
phase gazeuse couplée à
la spectrométrie de masse
(GPC/SM)***

II.1. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/MS)

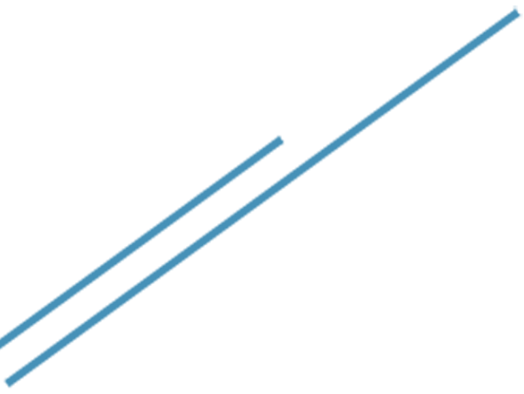
La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode séparative parmi les plus employées car elle allie rapidité et efficacité de séparation. Elle permet d'analyser qualitativement et quantitativement des mélanges complexes de gaz ou de composés qui peuvent être volatilisés sans être décomposé (**TEISSIER et MADET, 2004**). Le chromatographe en phase gazeuse est constitué de trois modules : un injecteur, une colonne capillaire dans un four et un détecteur (**BOUCHONNET et LIBONG,2004**).

Il permet l'introduction de l'échantillon à analyser dans la colonne à l'aide d'une vanne à boucles (micro seringue) (**BOUHANK, 2019**). L'injecteur est une zone chauffée où l'échantillon est introduit en solution, puis vaporisé et mélangé au gaz vecteur (phase mobile) (**BOUCHONNET et LIBONG,2004**).


Phase mobile c'est un gaz vecteur (hélium, azote, argon ou hydrogène) (**BELOUCIFA, 2014**). À l'entrée de la colonne le mélange à analyser est vaporisé, la phase stationnaire dans la colonne peut être solide ou liquide, la colonne est contrôlée thermiquement par un gaz inerte qui transporte le mélange (**SHIMADZU, 2020**). Les molécules du mélange se séparent et sortent de la colonne les unes après les autres, à la sortie de la colonne, les composés rencontrent le détecteur (**RAHMOUNI, 2021**).

Le détecteur qui ne réagit qu'au passage de ces espèces. Il est généralement couplé à un enregistreur numérique du signal qui permet son traitement par un système d'acquisition (**BOUHANK, 2019**). Il existe plusieurs modèles de détecteurs: FID, ECD, NPD mais le spectromètre de masse tend aujourd'hui à supplanter les autres car il est le seul à fournir des informations structurales sur les composés analysés et à permettre la quantification de composés non séparés par la chromatographie (**BOUCHONNET, 2009**).

Les données provenant du spectromètre de masse sont enregistrées par un logiciel puis convertit en valeurs de masses et d'intensités de pics puis en courant ionique total. Enfin les spectres de masse obtenus sont comparés avec ceux des produits de référence contenus dans les bibliothèques informatisées disponibles commerciales (**RAHMOUNI, 2021**).



Partie
expérimentale





Chapitre III

Matériels et méthodes

III. Matériels et méthodes

III.1. Récolte

Notre étude a été réalisée sur la plante *Calligonum comosum* L'her appelée L'Arta, que nous avons récolté durant le mois de Novembre 2022 au niveau de la commune d'El-Ogla wilaya d'El-Oued au sud-est l'Algérie.

III.2. Séchage et broyage

Nous mettons la plante sur le papier journal à l'ombre à l'abri du soleil et la laissons sécher pendant une période de 1 à 3 semaines jusqu'à ce que nous assurions qu'elle soit complètement sèche.

Après séchage de l'échantillon, il est broyé à l'aide du moulin traditionnel afin d'obtenir de la poudre douce.

III.3. Extraction par Macération

La macération est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui se fait à température ambiante. Pour préparer l'extrait, nous avons utilisé les outils et une solution et des appareils codifiés dans **le tableau 03**:

Tableau 03. Les outils et solutions et appareils utilisés dans l'extraction de la plante.

Les outils	Les solutions	Les appareils
Eprouvette graduée	Ether de pétrole	Rotavapeur Balance
Becher		
Erlen		
Spatule		
Papier filtre		
Papier aluminium		
Plat		
Cristalliseur		
Entonnoir		

Les rendements obtenus ont été exprimés en pourcentage, ils ont été calculés selon l'équation suivante :

$$\% \text{ rendement} = [\text{Poids d'extrait} / \text{Poids de poudre}] \times 100$$

III.3.1. Méthode

Nous pesons environ 90g d'échantillon broyés et le mettons dans erlen (grande taille) et le tremper dans éther de pétrole (pour éliminer tous les composés non phénoliques, comme les lipides et les caroténoïdes et les pigments chlorophylliens) nous couvrons la buse erlen (faire des petits trous dans la buse), et le laisser pendant 48h. Nous filtrons l'échantillon sur du papier filtre, puis nous répétons le processus 3 fois. Ensuite, nous utilisons rotavapeur pour sécher le solvant et obtenir l'extrait.

III.4. Analyse par GC/MS

L'extrait a été analysée sur un chromatographe en phase gazeuse Shimadzu QP2010 Ultra couplé au détecteur de masse (Agilent 5975) équipé d'un Auto-sampler AOC 20i-la séparation a été effectuée à l'aide d'une colonne capillaire DB-5 J&W colonne capillaire (30 m × 0.25 mm diamètre intérieur, 0.25 µm d'épaisseur du film). A un débit de 35 cm.s⁻¹, l'hélium a été utilisé comme gaz. L'identification des composés a été réalisée à partir de l'interprétation des schémas de fragmentation et de la comparaison des spectres de masse obtenus avec les données des bibliothèques Wiley229 LIB et NIST14 LIB et les données précédemment rapportées dans la littérature.

La quantification des composés identifiés a été obtenue à partir des zones des pics chromatographiques correspondants, en utilisant la méthode de l'étalon interne, dans laquelle l'eicosane a été utilisé comme étalon interne. Les étalons étaient les suivants : l'acide palmitique, cholestanol, le tétradécanol, le D- (+) -, eicosane, mannose et mannitol.

Comme l'analyse GC/MS nécessite des analyses thermostables et volatiles, l'extrait d'éther de Pétrole a d'abord été soumis à la procédure de silylation : 20 mg de l'extrait ont été dissous dans 250 µL de dichlorométhane. Ensuite, 200 µL d'étalon interne (IS), 250 µL de pyridine, BSTFA, et 50 µL de TMSCl ont été ajoutés. Après 30 min d'incubation à 70°C, le mélange a été injecté dans l'appareil GC-MS.

III.5. Total bioactive content

III.5.1. Dosage de Flavonoïde, TFC (Total Flavonoïde Content)

a. Principe de la réaction

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre Al⁺³ et les flavonoïdes. La méthode de (TOPÇU *et al.*, 2007) est utilisée avec quelques modifications pour une détermination sur microplaque 96 puits.

b. Instruments utilisés

Un lecteur microplaque (**Perkin Elmer, Enspire**) est utilisé pour la mesure de l'absorbance.

c. Réactifs utilisés

1. Méthanol.
2. Eau distillé.
3. 10% nitrate d'aluminium ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3, 9\text{H}_2\text{O}$).
4. 1 M Potassium acétate (CH_3COOK).
5. Quercétine (Flavonoïde).
6. Extrait de plante.

d. Préparation des solutions

Pour 1 M Potassium acétate (CH_3COOK) on dissolvé 9.80 grammes de (CH_3COOK) dans 100 ml d'eau distillé pour obtenir la solution S_1 .

Pour 10% nitrate d'aluminium ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3, 9\text{H}_2\text{O}$) on pèse 10g de ce produit dans 100ml d'eau distillée.

e. Préparation de l'extrait de plante

Une masse de 1 milligramme d'extrait est dissoute dans un volume de 1 *ml* de méthanol pour obtenir la solution (S_2).

f. Procédure**► Pour l'extrait**

50 μl (S_2) (extrait de plante) + 130 μl (Me OH) + 10 μl (S_1) (CH_3COOK) + 10 μl ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3, 9\text{H}_2\text{O}$) + attendre 40 min + lecture à 415 nm. Un blanc échantillon est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol (50 μl extrait + 150 μl méthanol).

► Pour l'étalon**• Préparation de la gamme d'étalon de la Quercétine**

On prend 1 mg de la Quercétine et on le dissolvé dans 5 ml de méthanol pour obtenir la solution 0,2 mg/ml S_m .

• Les dilutions sont préparées dans des eppendorfs comme la suite :

Quercétine (25) \longrightarrow 25 μl S_m + 175 μl Me OH.

Quercétine (50) → 50 µl Sm + 150 µl Me OH.

Quercétine (75) → 75 µl Sm + 125 µl Me OH.

Quercétine (100) → 100 µl Sm + 100 µl Me OH.

Quercétine (125) → 125 µl Sm + 75 µl Me OH.

Quercétine (150) → 150 µl Sm + 50 µl Me OH.

Quercétine (175) → 175 µl Sm + 25 µl Me OH.

Quercétine (200) → 200 µl Sm + 0 Me OH.

50 µl de chaque dilution sont transférés dans une microplaque 96 puits + 130 µl (MeOH) + 10 µl (S₁) (CH₃COOK) + 10 µl (Al (NO₃)₂, 9H₂O) + attendre 40 min + lecture à 415 nm.

III.5.2. Dosage des Flavonols (Flavonol content)

a. Principe de la réaction

La teneur en flavonols des extraits a été déterminée en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl₃).

b. Instruments utilisés

Un lecteur microplaque (**Perkin Elmer, Enspire**) est utilisé pour la mesure de l'absorbance.

c. Réactifs utilisés

1. Méthanol.
2. Eau distillé.
3. Trichlorure d'aluminium (AlCl₃).
4. Acétate de sodium.
5. Quercétine (Flavonol).
6. Extrait de plante.

c.1. Préparation

a- Trichlorure d'aluminium

200 milligrammes de AlCl₃ sont dissouts dans 10 ml d'eau distillé.

b-Acétate de sodium

500 milligrammes d'acétate de sodium sont dissouts dans 10 ml d'eau distillé.

c- la gamme d'étalon de la Quercétine

On prend 1 *mg* de la Quercétine et on le dissolvé dans 5 *ml* de méthanol pour obtenir la solution SM: 0,2*mg/ml*.

- Les dilutions sont préparées dans des Eppendorf comme la suite:

Quercétine (25) → 25 µl Sm + 175 µl Me OH.

Quercétine (50) → 50 µl Sm + 150 µl Me OH.

Quercétine (75) → 75 µl Sm + 125 µl Me OH.

Quercétine (100) → 100 µl Sm + 100 µl Me OH.

Quercétine (125) → 125 µl Sm + 75 µl Me OH.

Quercétine (150) → 150 µl Sm + 50 µl Me OH.

Quercétine (175) → 175 µl Sm + 25 µl Me OH.

Quercétine (200) → 200 µl Sm + 0 Me OH.

d- Préparation de l'extrait

Une masse de 1 *mg* d'extrait est dissoute dans un volume de 1 *ml* de l'eau distillée (ou Méthanol).

c .2. Procédure**a- Pour l'extrait**

50 µl d'extrait de plante + 50 µl de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) + 150 µl d'acétate de sodium + mettre le mélange à l'obscurité pendant deux heures et demi + lecture à 440 *nm*. Un blanc échantillon est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol (50 µl extrait + 200 µl méthanol).

b- Pour l'étalon

50 µl de chaque dilution sont transférés dans une microplaque 96 puits + 50 µl de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) + 150 µl d'acétate de sodium + mettre le mélange à l'obscurité pendant deux heures et demi + lecture à 440 *nm*.

III.6. Activité antioxydant**III.6.1. Activité anti-radicalaire au DPPH d'extrait**

L'activité anti-radicalaire libre est déterminée par spectrophotométrie par le dosage du DPPH (BLOIS, 1958), le α -tocophérol, BHT et le BHA sont utilisés comme standards antioxydants.

a. Réactive utilisées

1. Ethanol.
2. DPPH.
3. α -tocophérol.
4. BHA.
5. BHT.
6. Quercétine ou Catéchine.
7. Extrait de plante.

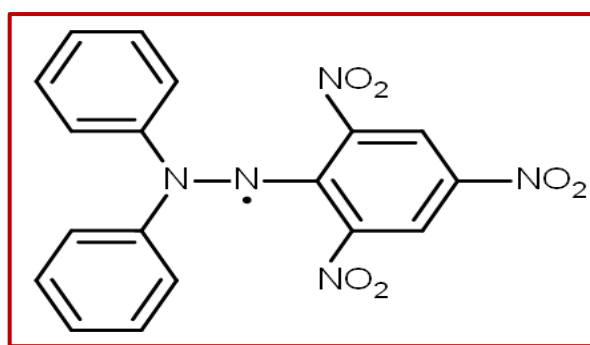


Figure 06. Structure de DPPH.

b. Mode opératoire**b.1. Préparation de la DPPH**

Dissoudre 6 mg de DPPH dans un volume de 100 ml de méthanol, le radical DPPH est dissous dans le méthanol et gardé à -20°C à l'abri de la lumière. L'absorbance est 0.5 nm (517 nm) dans le spectrophotomètre.

b.2. Procédure

160 μl (DPPH) + 40 μl (extrait) + lecture 517nm.

III.6.2. Activité anti- radicalaire au ABTS d'extrait

L'activité de piégeage des radicaux libres d'extrait biologique a été déterminée par le test de décoloration des cations radicaux $\text{ABTS}^{\bullet+}$ adapté à partir de la modification de la lumière.

a. Principe de la réaction

L'activité ABTS est déterminée par la méthode de (RE *et al.*, 1999).

b. Instrument utilisé

Un spectrophotomètre à cuve de volume 3 ml ou un lecteur à microplaque.

c. Réactifs utilisés

1. $K_2S_2O_8$.
2. ABTS.
3. Eau distillé.
4. Ethanol.
5. α -Tocophérol, BHA.

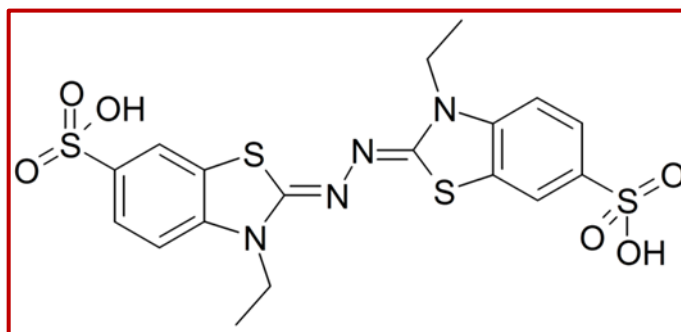


Figure 07. Structure d'ABTS.

d. Procédure

A partir de l'ABTS et du persulfate de potassium $K_2S_2O_8$: les deux produits en solution aqueuse sont mélangés et mis à l'abri de la lumière pendant 12- 16H, l'absorbance de la solution ainsi obtenue est ajustée par (Ethanol ou H_2O) à 0.700 ± 0.020 à 734 nm avant l'usage.

$(ABTS^+) \rightarrow 19,2 \text{ mg (7 mM) ABTS} + 5 \text{ ml } H_2O + 3,3 \text{ mg (2.45 mM) } (K_2S_2O_8) + 5 \text{ ml } H_2O + \text{ attendre 16 heures à l'abri de la lumière.}$

$M (ABTS) = 548,68 \text{ g/mol.}$

$M (K_2S_2O_8) = 270,32 \text{ g/mol.}$

La mesure de l'absorbance de l'ABTS avec le spectrophotomètre comme suit :

1 ml (ABTS) + 50 $\mu\text{l } H_2O$ ----- 1.41 nm.

1 ml (ABTS) + 75 $\mu\text{l } H_2O$ ----- 0.98 nm.

1 ml (ABTS) + 85 $\mu\text{l } H_2O$ ----- 0.87 nm.

1 ml (ABTS) + 90 $\mu\text{l } H_2O$ ----- 0.83 nm.

1 ml (ABTS) + 100 $\mu\text{l } H_2O$ ----- 0.73nm.

$A = 0.70 - 0.75 \text{ nm de l'ABTS}^+$

e. Procédure

160 μl (ABTS⁺) + 40 μl (extrait) + attendre 10 *min* + lecture à 734 *nm*.

- L'activité ABTS⁺ a été exprimée en pourcentage et calculée par l'équation suivante :

$$\text{ABTS}^+ \text{ scavenging effect (\%)} = (A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}} / A_{\text{Control}}) * 100$$

III.6.3. Activité β -carotène et lycopène contents

Le test de blanchissement au β -carotène est basé sur l'oxydation de l'acide linoléique, qui entraîne la formation de radicaux libres de nature hydro peroxyde agit pour attaquer les β -carotène, l'antioxydant agit pour modifier les radicaux libres dérivé de l'acide linoléique et protège ainsi contre l'oxydation et de blanchiment du β -carotène.

a. Principe de la réaction

β -carotène et lycopène contents est déterminé par la méthode de (BARROS *et al.*, 2008).

b. Instruments utilisés

Un spectrophotomètre à cuve de volume 3 ml ou spectrophotomètre de marque **DR2800 HACH LANGE** avec une cuve forme tube de volume 5 *ml*.

c. Réactifs utilisés

- 1- Eau distillé.
- 2- Acétone, Hexane.

d. Procédure

La méthode est basée sur le calcul de l'absorbance des extraits méthanoïque dissolvés dans un mélange d'acétone-hexane (6 :4, v/v), à 453 (A453), 505 (A505) et 663 (A663) *nm*. Le Total content de la β -carotène et lycopène est calculé par l'équation suivante:

- Lycopene (*mg/100 ml*) = $-0.0458 \times A663 + 0.372 \times A505 - 0.0806 \times A453$.

- β - Carotene (*mg/100 ml*) = $0.216 \times A663 - 0.304 \times A505 + 0.452 \times A453$.

III.6.4. Activité antioxydant par phenanthroline

C'est une activité simple base sur la formation d'un complexe sous le nom de férroïne = Fe²⁺-phenanthroline à partir du fer aqueux sous sa forme ferreuse réduite (Fe²⁺), il est de couleur rouge-orangée foncé. Son absorbance à 510 *nm*.

- L'activité de phenanthroline est déterminée par la méthode de (SZYDLOWSKA-CZENIAKA, 2008).

a. Instruments utilisés

Un lecteur de microplaque à 96 puits de volume 200 µl pour chaque puits.

b. Réactifs utilisés

- 1- Phenanthroline.
- 2- Ferric chloride FeCl₃.
- 3- Me OH, Eau distillée.
- 4- BHT.

c. Préparation

- **Phenanthroline (0.5%)**

0.05g de 1,10-Phenanthroline dans 10ml de Me OH.

- **Ferric chloride FeCl₃ (0.2%)**

0.02g de FeCl₃ dans 10ml de H₂O.

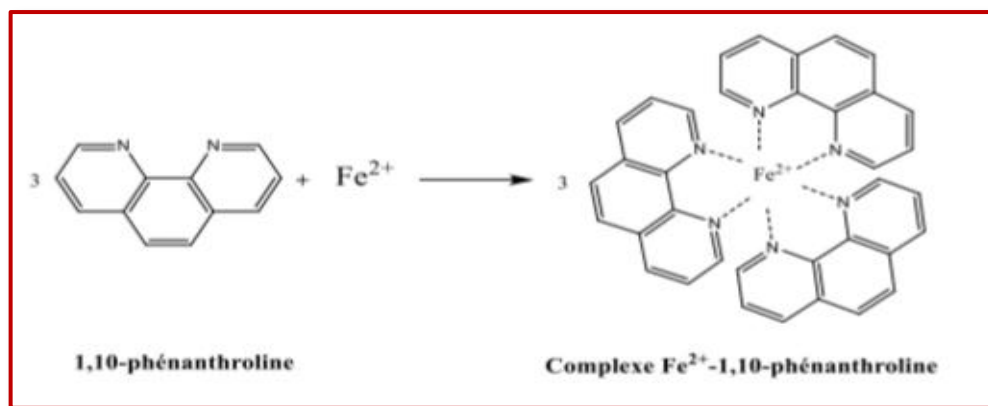


Figure 08. Formation du complexe Fe⁺²-phenanthroline (HAMMADI *et al.*, 2022).

d. Procédure

- 10 µl extrait + 50 µl FeCl₃ (0.2%) + 30 µl Phenanthroline (0.5%) + 110µl Me OH+ incubation à l'obscurité pendant 20 min à 30°C + lecture à 510 nm. Le BHT est utilisé comme standard.



Chapitre IV

Résultat et discussion

IV. Résultat et discussion

IV.1. Etude phytochimique

IV.1.2. Rendement

Tableau 05. Le rendement d'extraction des extraits de *Calligonum comosum* L'her.

Poids d'extrait	Poids de poudre	Rendement
0.224 g	90 g	0.24 %

IV.1.3. Caractérisation GC-MS de la composition de l'extrait de *Calligonum comosum* L'her.

L'analyse GC-MS (**fig.9**) a permis d'identifier et de quantifier deux grandes familles de composés lipophiles dans l'extrait de *Calligonum comosum*. Ce sont des terpènes et des stéroïdes et des acides carboxyliques et acides gras, comme indiqué dans le **tableau 4**. Les terpènes et les stéroïdes se sont révélés être les composants les plus abondants dans l'extrait lipophile de l'espèce étudiée.

Les terpènes et stéroïdes représentaient 78.5% du total des composés identifiés dans l'extrait de *C. comosum*.

L'acide carboxylique et acide gras représentaient 14.28% du total des composés identifiés dans l'extrait de *C. comosum*.

L'autres composés 0.14% du total des composés identifiés dans l'extrait de *C. comosum*.

La méthode du spectromètre de masse est un moyen sensible et sélectif d'identifier le composé organique polaire ayant des sites acides comme le phénolique, acide organique et flavonoïdes. Par conséquent, cette méthode a été utilisée pour identifier certains des composés polyphénoliques importants présents dans l'extrait de *C. comosum*.

Tableau 04. Composition chimique de l'extrait de *C. comosum*.

No	Rt (min)	composé*
<i>Terpènes et stéroïdes</i>		
1	32.57	Pinitol
2	33.78	Néophytadyne

3	42.72	Phytol
4	45.81	Acide kolavenique
5	49.10	Androstane-3-one
6	48.67	Parkéol
7	49.61	Cycloarténol
8	50.02	Farnésol
9	51.39	Acétate de kolavénol
10	54.71	Vitamine-A
11	66.71	Stigmast-5-ène, 3. Beta
<i>ACIDES CARBOXYLIQUES ET ACIDES GRAS</i>		
12	26.61	Acide cinnamique
13	38.12	Acide palmitique
<i>Autres composés</i>		
14	51.51	Turanose

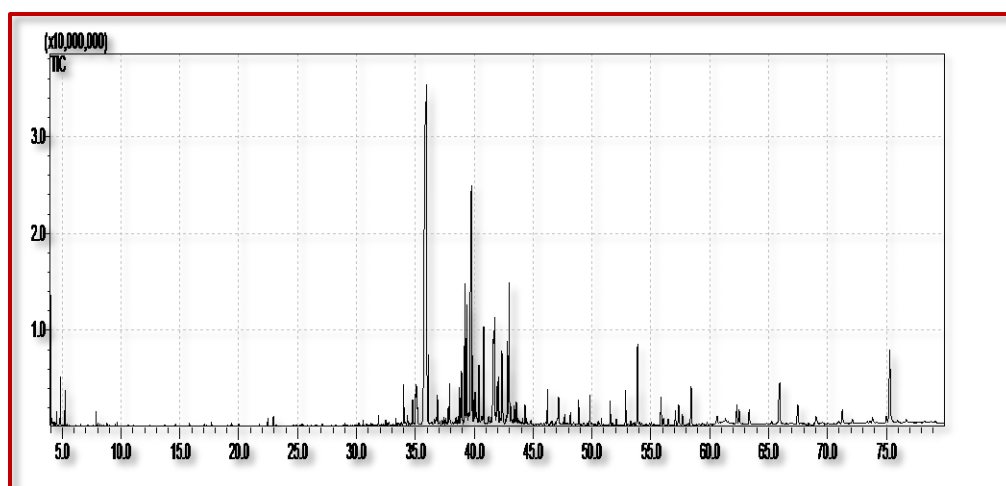


Figure 09. Chromatographie GC/MS de l'extrait *Calligonum comosum* L'her.

Tableau 06. Teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux.

Extract	Phénolique total ($\mu\text{g GAE/ mg}$ extrait)	Flavonoïdes ($\mu\text{g QE/ mg}$ extrait)
Extrait bio	71.69 \pm 1.09	89.90 \pm 1.04

Le Tableau 06 montre que l'extrait biologique est riche en flavonoïdes et en composés phénoliques, avec une quantité de flavonoïdes supérieure à celle des composés phénoliques.

Les résultats des flavonoïdes et des polyphénols pour notre étude semblent supérieurs à ceux obtenus par (CHOUIKH *et al.*,2020) (pour l'extrait de méthanol).

La variabilité de la teneur en flavonoïdes et des polyphénols est due à plusieurs facteurs : les conditions de séchage et d'extraction, la méthode, le temps, température et le solvant.

IV.2. Etude biologique

IV.2.1. Les activités antioxydants

Divers extraits botaniques sont des sources d'antioxydant et plusieurs tests ont été faits pour évaluer la capacité antioxydant de ces différents extraits. Dans notre expérience, on a utilisé 04 méthodes différentes pour évaluer l'activité antioxydant d'extrait de la plante *Calligonum comosum*. Les standards utilisés comme contrôle positifs sont: le BHT, BHA.

a. Activité anti-radicalaire au DPPH

Les résultats de l'activité anti-radicalaire au DPPH sont représentés par les pourcentages d'inhibition pour chaque concentration ainsi que les valeurs de la concentration d'inhibition de 50% (**Tableau 7**).

L'extrait biologique a présenté une meilleure activité anti-radicalaire ($IC_{50}= 48,62\pm 1,61 \mu\text{g/ml}$), en comparaison avec le standard BHA ($IC_{50}= 5,73\pm 0,41 \mu\text{g/ml}$) et BHT ($IC_{50}= 22,32\pm 1,19 \mu\text{g/ml}$). Cette activité est due à sa richesse en molécules polaires à savoir les flavonoïdes (cycloarténol, Phytol, pinitol, Acide cinnamique, Vitamine-A).

Tableau 07. Inhibition du radical DPPH par les extraits biologiques.

Extrait	Inhibition %							
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC ₅₀ µg/mL
Extrait bio	1,07±1,45	6,01±1,22	7,09±0,91	23,81±1,66	37,98±0,49	55,96±1,05	58,72±0,81	48,62±1,61
BHT	11,69±1,88	22,21±1,30	37,12±1,80	52,63±2,70	56,02±0,53	83,60±0,23	87,28±0,26	22.32±1.19
BHA	28,95±1,16	54,33±1,59	76,76±1,65	84,09±0,35	87,53±0,82	87,73±0,15	88,43±0,23	5.73±0.41

Selon (KHELEF *et al.*, 2019), l'extrait méthanoïque de *C. comosum* a une IC₅₀ d'environ 14.34µg /ml et cette valeur est relativement faible par rapport à nos résultats. Nous pouvons suggérer que le pouvoir antioxydant observé est dû à la différence de plusieurs facteurs dont: les conditions de séchage et d'extraction, méthode d'extraction, le récolte (méthode et temps), solvant et le nombre d'étapes d'extraction, outre la structure et la qualité des composés phénoliques présentes dans la solution.

b. Activité antioxydant par le teste de piégeage ABTS

La concentration de l'échantillon capable d'inhiber 50% de la réaction (CI50) a été déterminer (Tableau 08).

L'extrait biologique a présenté une meilleure activité anti-radicalaire de (IC₅₀=14,97±1,23 µg/ml), en comparaison avec le standard BHA (IC₅₀=1.81±0.10 µg/ml), BHT (IC₅₀= 1.29±0.30 µg/ml) et. Cette activité est due à sa richesse en molécules polaires à savoir les flavonoïdes et à d'autres polyphénols (phytol).

Tableau 08. Inhibition du radical ABTS par les extraits biologiques.

Extrait	Inhibition %							
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC ₅₀ µg/mL
Extrait bio	14,78±1,52	20,49±0,91	31,49±0,59	50,76±0,99	59,76±1,908	71,10±1,55	74,41±1,61	14,97±1,23
BHT	59.22±0.59	78.55±3.43	90.36±0.00	92.18±1.27	93.37±0.86	94.87±0.87	96.68±0.39	1.29±0.30
BHA	83.42±4.09	93.52±0.09	93.58±0.09	93.63±0.16	93.63±0.95	94.20±0.90	95.39±2.62	1.81±0.10

c. Activité antioxydant par β-carotène

L'extrait biologique a montré une meilleure activité de blanchissement du β-carotène (IC₅₀=18,33±1.23 µg/ml), par rapport au standard le BHA (IC₅₀=0.90±0. 02 µg/ml) et BHT (IC₅₀=1.05±0. 01 µg/ml) (Tableau 09).

Tableau 09. Activité antioxydant par β -carotène

Extrait	Inhibition %							
	3.125 μ g	6.25 μ g	12.5 μ g	25 μ g	50 μ g	100 μ g	200 μ g	IC ₅₀ μ g/mL
Extrait bio	13,81 \pm 0,77	40,50 \pm 1,51	42,82 \pm 1,84	50,92 \pm 0,98	67,81 \pm 1,61	70,19 \pm 1,06	75,55 \pm 1,23	18,33 \pm 1.23
BHT	81.14 \pm 0.84	86.0.9 \pm 1.04	87.52 \pm 4.24	91.67 \pm 0.52	94.11 \pm 0.42	94.41 \pm 0.32	95.28 \pm 3.25	1.05 \pm 0.01
BHA	84.23 \pm 1.14	90.11 \pm 0.68	94.59 \pm 0.77	96.09 \pm 0.02	97.35 \pm 1.08	99.59 \pm 0.14	99.76 \pm	0.90 \pm 0.02

d. Activité antioxydant par phénanthroline

Les résultats du test phénanthroline montrent que le meilleur résultat d'absorbance est de l'extrait ($A_{0.5} = 14,72 \pm 1,17 \mu\text{g/ml}$) cet extrait est fort 15 fois par rapport le standard BHA ($A_{0.5} = 0,93 \pm 0,07 \mu\text{g/ml}$) et fort 6 fois par rapport le standard BHT ($A_{0.5} = 2,24 \pm 0,17 \mu\text{g/ml}$). Les résultats de ce test confirment les résultats précédents dans les trois tests.

Tableau 10. Activité antioxydant par phénanthroline

Extrait	Absorbances							
	3.125 μ g	6.25 μ g	12.5 μ g	25 μ g	50 μ g	100 μ g	200 μ g	A _{0,5} 15 f
Extrait bio	0,19 \pm 0,09	0,32 \pm 0,77	0,46 \pm 0,27	0,58 \pm 0,68	0,65 \pm 0,81	1,23 \pm 0,54	2,49 \pm 1,13	14,72 \pm 1,17
	0.78125	1.5625	3.125 μg	6.25 μg	12.5 μg	25 μg	50 μg	A_{0,5} μg/mL
BHA	0,49 \pm 0,01	0,59 \pm 0,01	0,73 \pm 0,02	0,93 \pm 0,01	1,25 \pm 0,04	2,10 \pm 0,05	4,89 \pm 0,06	0,93 \pm 0,07
BHT	0,47 \pm 0,01	0,47 \pm 0,01	0,53 \pm 0,03	1,23 \pm 0,02	1,84 \pm 0,01	3,48 \pm 0,03	4,84 \pm 0,01	2,24 \pm 0,17

Nous n'avons pas pu comparer d'autres testes (phénanthroline, β -carotène et ABTS) à cause de l'absence d'études à leur sujet.

- Les effets du piégeage des radicaux observés dans la présente étude indiquent la capacité de ces extraits à donner des électrons et des hydrogènes, qui contribuent à stabiliser les molécules radicales libres. Cette capacité est importante, car l'excès de radicaux libres est l'un des principaux facteurs qui entraînent et aggravent des conditions pathologiques telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et le diabète.

- Cette activité antioxydant potentielle s'explique par sa richesse en composés phénoliques, principalement en flavonoïdes, révélée par analyse GC/MS.



Conclusion

En accord avec le développement scientifique de ces dernières années et dans le but de valoriser les plantes désertiques poussant dans la région d'OUED SOUF, et parce qu'elles n'ont pas reçu beaucoup d'attention de la part des chercheurs dans de telles études, cette recherche a été faite la modeste étude scientifique phytochimique et l'activité biologique de certaine plante de la famille Polygonales se développe dans d'OUED SOUF.


Les plantes de *Colligonum comosum* L'Her ont été soumises à une méthode d'extraction des composés phénoliques, par macération.

Pour déterminer les constituants chimiques de notre plante, nous avons mis en œuvre la technique d'analyse GC-MS qui a révélé que cette plante est composée majoritairement de: terpènes et stéroïdes, acides carboxyliques et acides gras et autre composé, et certaines composés majoritaires présentes dans cette plante ont déjà prouvé un potentiel antioxydant, ce qui expliquerait en partie les bons résultats in vitro obtenus dans cette étude.

Le dosage des polyphénols totaux a révélé une teneur de $71.69 \pm 1.09 \mu\text{g GAE}/\text{mg}$ d'extrait, et la teneur en flavonoïdes par la méthode d' AlCl_3 nous mène à conclure que l'extrait d'éther de pétrole de cette plante contient $89.90 \pm 01.04 \mu\text{g QE}/\text{g}$ d'extrait.

Dans la partie biologique de notre travail, nous avons évalué l'activité antioxydant de l'extrait d'éther de pétrole par la méthode du DPPH, ABTS, β -carotène et phénanthroline à l'issue de cette étude, il en ressort que cet extrait possède un pouvoir antioxydant fort. Cette activité est liée en grande partie à la composition de l'extrait et sa richesse en composés phénoliques en particulier les flavonoïdes.

En fin, l'ensemble de ces résultats obtenus in-vitro ne constitue qu'une petite partie de la recherche des substances et sources naturelles biologiquement actives, nous envisageons comme perspective d'utiliser des méthodes modernes pour l'extraction des principes actifs, et de valoriser leur présence par des techniques précises comme la CPG /MS, la RMN et l'HPLC.



***Références
bibliographique***

Références

-A-

1. **ALZHRANI ALHUSAIN. J.**, (2021). Potent antioxidant and anticancer activities of the methanolic extract of *Calligonum comosum* (L'Her) fruit hairs against human hepatocarcinoma cells. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28 ,5283–528 p.

-B-

2. **BADDECHE Takoua Balkiss., BENHACINE Manel.**, (2020). Etude phytochimique et l'évaluation in vitro des activités antioxydants, anti cholinestérase, antidiabétique et anti-inflammatoire des extraits d'*Eriobotrya japonica*, Mémoire de Master en Sciences Biologiques, Université des Frères Mentouri, Constantine, 83 p.
3. **BARROS. L., CRUZr. T., BAPTISTA. P., ESTEVINHO. LM., FERREIRA. ICFR.**, (2008). Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food Chem Toxicol*, 46, 2742-2747 P.
4. **BELAABED Soumia.**, (2018). Etude chimique et biologique des espèces *Calligonum azel* et *Calligonum comosum* (*Polygonaceae*) et une espèce du genre *Thymus* (*Lamiaceae*), thèse du doctorat en Chimie pharmaceutique, université des Freres Mentouri, Constantine, 242 p.
5. **BELILI Ismahan., LAHMER Sihem.**, (2018). Etude photochimique et propriété antioxydant des composés phénoliques du *Citrus limon*, mémoire de master en sciences biologiques, université des Frères Mentouri, Constantine, 46 p.
6. **BELOUCIFA Moufida.**, (2014). Etude par GC-MS des huiles essentielles de : *Nigella Sativa*, *Pisacia Lentiscus*, et *Punica Granatum*, mémoire de magister en chimie, université de Jijel, 85 p.
7. **BLOIS. M.S.**, (1958). Antioxidants determinations by the use of a stable Free Radical. *Nature*, 4617 (181): 1119-1200 p.
8. **BOUCHONNET Stéphane.**, (2009). La spectrométrie de masse en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse. Tec &doc. 191 p.
9. **BOUCHONNET Stéphane., LIBONG Danielle.**, (2004). Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse, l'actualité chimique, n° 275, p 07.

10. **BOUDJEDOUR Nour El Houda., BERTIL Aicha.,** (2016). L'activité inhibitrice des composés phénoliques de *Dictyopteris polypodioides* sur l' α -amylase salivaire libre et immobilisée in vitro, mémoire de master en sciences biologiques, université des Frères Mentouri, Constantine, 52 p.
11. **BOUHALA Roukia., BOUHLAIS Meriem.,** (2014). Evaluation de quelques activités biologiques d'une plante endémique "*limonium sp*", mémoire de master en toxico et santé, université Mentouri, Constantine, 36 p.
12. **BOUHANK Antar.,** (2019), Etude de quelques modèles pour le calcul des densités énergétiques des sites d'adsorption en utilisant la chromatographie gazeuse inverse, doctorat en sciences , université Ferhat Abbas, Setif 1, 87p.
13. **BOUKENI Ghenima., TOUM Thanina.,** (2020). Activité antioxydant des composés phénoliques d'*Asphodelus microcarpus*, mémoire de master en sciences biologiques, université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, 40 p.
14. **BOULHOUT Roumeissa., BOUKEBOUS Hind Seloua.,** (2021). Etude des propriétés physico-chimiques de l' α -amylase levurienne, mémoire de master en science biologique, université des Frères Mentouri., Constantine, 57 p.

-C-

15. **CHOUIKH Atef., CHEMSA Ahmed Elkhalfa., AOUNALLAH Chahira., AOUNALLAH Imane., ALIA Fatma.** (2020) Phytochemical study nutritive value, antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolic extracts from desert plant *Calligonum Comosum l'her*, Algerian journal of biosciences, 01(02), 068_075p.
16. **COLLIN Sonia., CROUZET Jean.,** (2011). Polyphénols et procédés. Éditions tec & doc. 333 p.

-D-

17. **DADDA Maroua., GHRAB Nadjoua., HAMMOUYA Oumeima.,** (2022). Etude phytochimique de l'extrait des tanins à partir de *Pergularia tomentosa L.* issue de région d'El-Oued, mémoire de master académique en sciences biologiques, université Echahid Hamma Lakdhar, EL Oued,46 p.

-H-

18. **H.M.I. Abdallah., G.F. Asaad., M.S. Arbid., E.A. Abdel-Sattar.,** (2014) Anti-inflammatory, Antinociceptive, Antipyretic and Gastroprotective Effects of

Calligonum comosum in Rats and Mice, international Journal of Toxicological and Pharmacological Research, 6(2): 26-33p.

19. **HAMMADI Nassim., DJEBAILI Abderrahmane.,** (2022) Activité antioxydante et anti-inflammatoire et toxicité et cytotoxicité d'une espèce du genre *Asphodelus*, mémoire du diplôme de Master en science biologique, université Frères Mentouri, Constantine, 90 p.

-J-

20. **JEBALI Jamel., BEN KHEDHER Sana., SABBAGH Marwa., KAMEL Naouel., BANNI Mohamed., BOUSSETA Hamadi.,** (2013). Cholinesterase activity as biomarker of neurotoxicity: utility in the assessment of aquatic environment contamination, Journal of Integrated Coastal Zone Management, 13(4):525-537 p.

-K-

21. **KERMICHE Oumaima., BOUBAKEUR Katrate Nada., ZOUBEIDI Amira.,** (2022). Contribution à l'étude phytochimique et l'activité biologique des racines de *Costus*, mémoire du diplôme master en biochimie appliquée, université Larbi Ben M'hidi, Oum El Bouaghi, 68 p.
22. **KHELEF Yahia., CHOUIKH Atef., REBIAI Abdelkrim., NEFFAR Souad., CHEFROUR Azzedine., ADJAL El Hadda., ALIA Fatma.,** (2019). Biochemical, quantitative and qualitative phenolic compounds, anti-free radical's activities of *Calligonum comosum* collected from different sites in the Algerian Desert, Biharean biologiste, 13 (2): 71-76p
23. **KIRANA P. MUGARANJA., ANANDA Kulal.,** (2020). Alpha glucosidase inhibition activity of phenolic fraction from *Simarouba glauca*: An in-vitro, in-silico and kinetic study, Heliyon 6 e04392, 1-15p.
24. **KUMARI Smita., KIRAGANDUR Manjunath., SITIKANTH Sarangi.,** (2017). Evaluation of α -glucosidase inhibitory potential of methanolic leaf extract of *Ocimum canum*, international journal of pharmacy and pharmaceutical sciences, vol10,issue1, 126-131 p.
25. **KUMARAN., R. Joel Karunakran.,** (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extract of five phyllanthus species from India, LWT 40: 344-355 P.

-L-

26. **LARABA Meriem., SERRAT Amina., OUASSAA Ghania.,** (2016). Etude in vitro de l'activité antioxydant des polyphénols isolés à partir d'une plante médicinale, mémoire du diplôme de master en sciences biologiques, université des Frères Mentouri, Constantine, 56 p.
27. **LITIEM Ouacila., ZELACI Imene.,** (2016). Contribution à l'étude phytochimique et biologique de la plante *Albizia lebbek (L) Benth (labakh)* cultivée dans une zone saharienne à la région d'El-Oued, master académique en sciences biologiques, université Echahid Hamma Lakhdar, El Oued, 77 p.

-M-

28. **MAHBOUB Nasma.,** (2018). Effet de différents modes de séchage de quelques plantes sahariennes à caractère médicinales sur leur contenu phénolique et leurs activités biologiques, thèse de doctorat ès sciences en biologie, université Kasdi Merbah, Ourgla, 105 p.
29. **MAHMUD TAREK. Hassan Khan., I. Orhan., F.S. şenol., M. Kartal., B. şener., M. Dvorská., K. Smejkal., T. Slapetová.,** (2009). Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies, chemico-biological interactions, 181, 383–389 p.
30. **MARCO, G.J.,** (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. J. Am. Oil Chem. Soc. 45, 594–598 p.
31. **MOUZAOUI Dihia., KHEMIS Rym.,** (2021). Etude comparative de l'activité antioxydant et antibactérienne de quelques marques de gingembre «*Zingiber officinale*», mémoire de master académique en sciences alimentaires option biochimie, université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, 44 p.

-N-

32. **NASSAR Meryem.,** (2017). Activités biologique des molécules bioactives extraites des quelques plantes médicinales, thèse doctorat on sciences, université des Frères Mentouri, Constantine, 106 p.

-O-

33. **OTMANI YAMINA., SLIMANI MELISSA.,** (2018). Activité antibactérienne et anti-inflammatoire des extraits des feuilles d'olivier (*Olea europea L.*) et du lentisque

(*Pistacia lentiscus L.*), mémoire de master en biotechnologie et valorisation des plantes, université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, 56 p.

34. **OYAIZU, M.** (1986). Studies on products of browning reactions: ant-oxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. Japanese Journal of Nutrition, 44, 307–315 p.

-P-

35. **PESSEL Freddy.,** (2013). Synthèse éco-compatible de flavonoïdes fonctionnalisés par le glucose comme antioxydants potentiels, thèse de doctorat, université Paris-Sud, 173 p.

-Q-

36. **QUEZEL P., SENTA, S.,** (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertique méridionales. Ed, tome II: Paris. 1170p.

-R-

37. **RAHMOUNI Malika.,** (2021). Etude de la composition chimique et des activités biologique des huiles essentielles et d'extraits bruts de *Ferula lutea (Poir)* Maire, doctorat en sciences, université Ferhat Abbas, Sétif, 150 p.

38. **Re. R., PELLEGRINI. N., PROTEGGENTE. A., PANNALA. A., YANG. M., RICE-EVANS. C.,** (1999).Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation de colorization assay. Free Radical Bio. Med. 26, 1231–1237P.

-S-

39. **SHIMADZU Genzo.,** (2020). Shimadzu fundamental guide to Gas chromatography Mass spectrometry (GCMS), 80p.

40. **SINGLETON. V.L., R. ORTHOFER., R.M. Lamuela-Raventos.,** (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. Met. Enzyme, 299, 152-178 p.

41. **SOLIMAN Gamal A., ALTHURWI Hassan N., SALKINI Mohammad Ayman A., ALHARTHY Khalid M., HAMAD Abubaker., ABDEL- KADER Maged S.,** (2023). Anti-ulcerative colitis effect of *Calligonum comosum L'Hér.* using rat model: Chemical, pharmacological and histopathological evidences. Saudi Pharmaceutical Journal, 1-9 p.

42. **SZYDLOWSKA-CZERNIAKA. A, Dianoczki C, Recseg K, Karlovits G, Szlyk E.** (2008); Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*; 76:899-905 p.

-T-

43. **TEISSIER Thomas., MADET Nicolas.,** (2004). Compte- rendu de TP chromatographie: Chromatographie en Phase Gazeuse CPG, université de Créteil-Paris XII, 11 p.
44. **TOPÇU. G., Ay A., BILICI. A., SARIKÜRKÜ. C., ÖZTÜRK. M., ULUBELEN. A.** (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry* 103: 816–822P.
45. **TURKOGLU. A., EMIN DURU. M., MERCANer N., KIVRAK. I., GEZER. K.,** (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull) Murrill. *Food Chemistry* 101: 267–273P.

-V-

46. **VENKATA Sai Prakash Chaturvedula., INDRA Prakash.,** (2012). Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*, *International Current Pharmaceutical Journal*, 1(9): 239-242 p.

-Z-

47. **ZINE Brahim.,** (2008). La remontée des eaux souterraines en surface : mécanisme et l'impact sur l'environnement (cas d'Oued Souf), mémoire de magister en hydraulique, université El Hadj Lakhdar, Batna, 116 p.

• المراجع العربية:

1. **الحادة عجال، مكي مسعودة،** (2015)، المساهمة في دراسة فيتوكيميائية والنشاطية البيولوجية لنبات صحراوي الأرتى *Calligonum comosum L'her* النامي في منطقة وادي سوف، مذكرة تخرج لنيل شهادة ماستر، جامعة الشهيد حمة لخضر، الوادي، 73ص.
2. **حليس يوسف،** (2007)، الموسوعة النباتية لمنطقة سوف، إنتاج الوليد للطباعة الوادي.
3. **حشيفة علي، كروش عبد الرزاق،** (2017)، مساهمة في دراسة بعض الخصائص (الفيزيولوجية والايكوفيزيولوجية) لنبات الأرتى *Calligonum comosum L'her* مذكرة تخرج لنيل شهادة الماستر، جامعة الشهيد حمة لخضر الوادي، 93ص.



Annexes



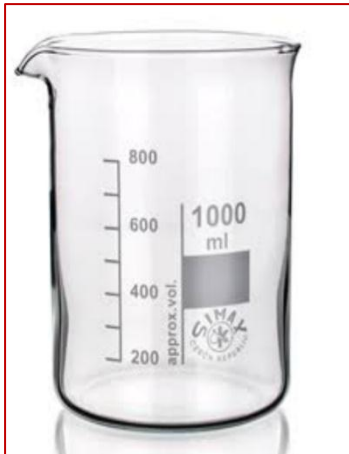
GC/MS



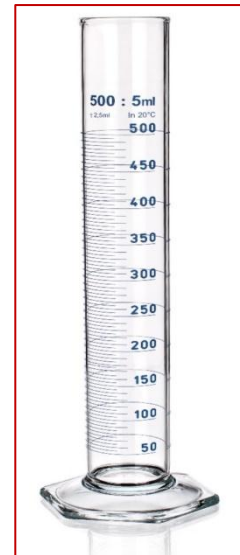
Rotavap



Spatule



Becher



Eprouvette graduée



Erlen



cristalliseur



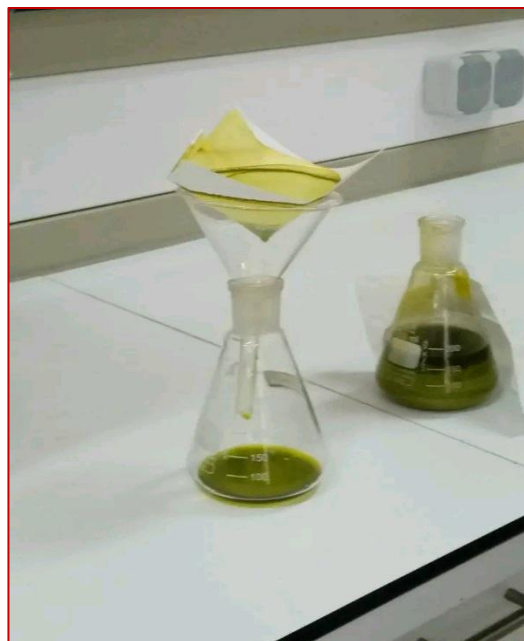
Entonnoir



Balance



ETUVE



Filtration d'extrait