



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ ECHAHID HAMMA LAKHDAR
EL OUED

FACULTÉ DES SCIENCES ET DE TECHNOLOGIE

Mémoire de fin d'étude

MASTER ACADEMIQUE

Domaine: Sciences et Technologie

Filière: Génie des Procédés

Spécialité: Génie chimique

Présenté par: BERRA Djamila

Thème

*Etude de l'effet du milieu d'extraction sur la
composition des feuilles de Matricaria Pubescens*

Devant le jury composé de :

Président:	Mr. TAMMA Nouredine	MAA	Université d'El- Oued
Examineur:	Mr. REBIAI Abelkerim	MAA	Université d'El- Oued
Rapporteur:	Mr. LAOUINI.Salaheddine	MCA	Université d'El- Oued

Remerciements

*Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir
donnée la force
et la patience. Aux joyaux de ma vie "mes parents" qui sont la source
de ma réussite, je souhaite qu'ils trouvent à travers ce mémoire le
faible témoignage de leurs efforts et sacrifices.*

*J'exprime ma profonde gratitude à Dr **LAOUINI Salah Eddine**, qui
ma fait l'honneur d'avoir veillé et dirigé ce travail. Ses conseils
pertinents m'ont permis de mener à terme ce travail.*

Je tien à remercier : professeurs membre de jury .

*J'adresse mes plus sincères remerciements au Mr **REBLAI Abdelkerim**
pour, leur aide qu'elles n'hésitèrent jamais à me proposer dans les
moments difficiles. Je la remercie pour sa bienveillance et ces conseils.
Je remercie tous ceux et celles qui m'ont marqué par leur soutien et
encouragements : tous les collègues laboratoire ,je leur exprime mon
respect et ma profonde sympathie.*

*Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont à toute
personne qui a participé de près ou de loin dans la réalisation de mon
travail.*

Résumé

L'objectif de notre travail est la contribution de l'effet du pH du milieu d'extraction sur la composition phytochimique et leur activité anti-oxydante de l'espèce *Matricaria pubescens* utilisée en médecine traditionnelle.

A cet effet, nous avons utilisé les différentes méthodes (spectrophotométrie UV-visible , spectrophotométrie infrarouge FT-IR , chromatographie liquide à haute performance HPLC) qui permettant de donner des informations sur chaque milieu d'extraction pour comparer entre eux .

Le screening photochimique a mis en évidence la présence de quantités considérables de flavonoïdes, de flavanols. L'analyse qualitative par chromatographie liquide à haute performance a révélé la présence de l'acide gallique, l'acide ascorbique, l'acide chlorogénique ,acide caféique, vanilline et la rutine dans les majorités des extraits .

En outre, les résultats ont montré que les extraits des milieux acides faibles présentent une propriété antioxydante très élevée et révèlent leurs richesses en contenu polyphénols par apport les autres extraits .

Mots clés : *Matricaria pubescens* ,pH , polyphénols , activité antioxydante.

الملخص :

يُكمن هدف هذا البحث في دراسة تأثير درجة حموضة وسط الاستخلاص على التركيبة الكيميائية وفعاليتها المضادة للأوكسدة لبنتة *Matricaria pubescens* المستعملة في الطب الشعبي.

انجاز هذا البحث تطلب استعمال طرق و تقنيات مختلفة (مطيافية الأشعة فوق البنفسجية UV-Vis ، مطيافية الأشعة تحت الحمراء FT-IR ، كروماتوغرافيا عالية الأداء HPLC) مما سمح لنا بإعطاء معلومات عن كل وسط استخلاص بهدف المقارنة فيما بينهم .

قد كشف التحليل الكيميائي عن وجود كميات معتبرة من البوليفينول ، الفلافونويدات ، الفلافانول . التحليل النوعي بواسطة كروماتوغرافيا عالية الأداء كشفت عن وجود حمض الغاليك ، حمض الاسكوربيك ، حمض الكلوروجينيك ، و حمض الكافيك ، الفانيلين والروتين في معظم المستخلصات المختبرة . وبالإضافة إلى ذلك ، أظهرت لنا النتائج بأن المستخلصات في الأوساط الحمضية الضعيفة ذات فعالية مضادة للأوكسدة عالية زيادة عن غناها بالبوليفينول مقارنة بالعينات الأخرى.

الكلمات المفتاحية : *Matricaria pubescens* ، البوليفينول ، درجة الحموضة ، الفعالية المضادة للأوكسدة.

Liste des Tableaux

<i>Chapitre I : Généralités botaniques</i>	
Tableau (I.1) : les différents espèces des Astéracées dans le Sud d'Algérie et leur usage thérapeutique	4
Tableau (I.2) : La classification Systématique.....	5
Tableau (I.3) : La classification Systématique de genre Matricaria	5
Tableau (I.4) : La classification Systématique de la plante.....	7
<i>Chapitre II : Les polyphénols et l'activité antioxydante</i>	
Tableau (II.1) : Principaux acides hydroxycinnamiques.....	13
Tableau (II.2): Principaux acides hydroxybenzoïques	13
Tableau (II.3) : Principaux types de coumarines	14
Tableau (II.4) : Activités biologiques des composés phénoliques.....	22
Tableau (II.5): Quelques exemples d'utilisation réglementée des antioxydants de synthèse	24
<i>Chapitre IV: Résultats et discussion</i>	
Tableau (IV .1): Les rendements des extraits bruts	45
Tableau (IV.2) : Teneurs des polyphénols totaux des extraits.....	48
Tableau (IV.3) : Teneurs des flavanoides totaux des extraits.....	50
Tableau (IV.4) : Teneurs des flavanols des extraits	52
Tableau (IV.5) : Le temps de rétention, coefficient de corrélation et l'équation des courbes d'étalonnage des étalons.....	60
Tableau (IV.6) : Concentration des polyphénols des extraits de feuilles du Matricaria pubescens.....	66
Tableau (IV.7) : La capacité antioxydant totale des extraits de feuilles du Matricaria pubescens.....	67
Tableau (IV.8) : Valeurs des IC ₅₀ du DPPH pour les extraits.....	68

Liste des Figures

<i>Chapitre I : Généralités botaniques</i>	
Figure (I.1) : Photo de la plante <i>Matricaria pubescens</i>	7
<i>Chapitre II : Les polyphénols et l'activité antioxydante</i>	
Figure (II.1): Squelette de base des flavonoïdes	14
Figure (II.2): Structure chimique des flavanones	15
Figure (II.3): Structures chimiques de flavonols.....	16
Figure (II.4): Structures chimiques de certains flavan-3-ols.....	16
Figure (II.5): Structures chimiques de flavone.....	17
Figure (II.6): Structures chimiques des isoflavones.....	17
Figure (II.7): Structures chimiques des anthocyanes	18
Figure (II. 8) : Structures de l'hydroxytyrosol (a) et du tyrosol (b).....	18
Figure (II.9) : Structure générale d'un tannin hydrolysable.....	20
Figure (II.10) : Structure chimique des unités monomériques constitutives des tanins condensés.....	21
<i>Chapitre III : Matériels et Méthodes</i>	
Figure (III.1) : La plante de <i>Matricaria Pubescens</i> à séché.....	33
Figure (III.2) :Extraction par ultrason.....	33
Figure (III.3) : Protocole de préparation des extraits.....	35
Figure (III.4) : La spectrophotométrie UV-visible.....	36
Figure (III.5) : La spectrophotométrie IR.....	37
Figure (III.6) : Chromatographie en phase liquide à haute performance.....	40
Figure (III.7) : Réduction du radical libre DPPH	42
<i>Chapitre IV: Résultats et discussion</i>	
Figure (IV.1) : Courbes d'étalonnages de l'acide gallique pour dosage des polyphénols totaux à différents pH	47
Figure (IV.2) : Courbes d'étalonnages de quercetine pour dosage des flavanoides à différents pH.....	49
Figure (IV.3) : Courbes d'étalonnages de Rutine pour dosage des flavanols à différents pH.....	51
Figure (IV.4) : Comparaison des composés phénoliques des différents extraits.....	52

Figure (IV.5) : le spectre de FT-IR d'extrait de pH=3.....	53
Figure (IV.6) : le spectre de FT-IR d'extrait de pH=4.....	54
Figure (IV.7) : le spectre de FT-IR d'extrait de pH=5.....	54
Figure (IV.8) : le spectre de FT-IR d'extrait de pH=6.....	55
Figure (IV.9) : le spectre de FT-IR d'extrait de pH=7.....	55
Figure (IV.10) : Profil du chromatogramme du mélange des étalons.....	57
Figure (IV.11) : Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique.....	57
Figure (IV.12) : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.....	57
Figure (IV.13) : Courbe d'étalonnage d'acide chlorogénique.....	58
Figure (IV.14) : Courbe d'étalonnage d'acide caféique.....	59
Figure (IV.15) : Courbe d'étalonnage de vanilline.....	59
Figure (IV.16) : Courbe d'étalonnage de rutine.....	60
Figure (IV.17) : profil chromatographique HPLC d'extrait de pH= 7.....	61
Figure (IV.18) : profil chromatographique HPLC d'extrait de pH= 6.....	62
Figure (IV.19) : profil chromatographique HPLC d'extrait de pH=5.....	63
Figure (IV.20) : profil chromatographique HPLC d'extrait de pH=4.....	64
Figure (IV.21) : profil chromatographique HPLC d'extrait de pH=3.....	65
Figure (IV.22) : Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique	67
Figure (IV.23) :comparaison entre ARP de différents extrais.....	69
Figure (IV.24) : Effet d'extraits de pH=7 sur le radical DPPH.....	69
Figure (IV.25) : Effet d'extraits de pH=6 sur le radical DPPH.....	70
Figure (IV.26) : Effet d'extraits de pH=5 sur le radical DPPH.....	70
Figure (IV.27) : Effet d'extraits de pH=4 sur le radical DPPH.....	71
Figure (IV.28) : Effet d'extraits de pH=3 sur le radical DPPH.....	71

Liste des abréviations

Abréviation	Désignation
AAE	Acide ascorbique équivalente
BHA	Tertiobutyl hydroxyanisole
BHT	Tertiobutyl hydrox toluène
CAT	Capacité anioxydante totale
DPPH	1,1- diphenyl-2-pierylhydrazyl
FT-IR	Spectrophotométrie de l'infrarouge
GAE	Acide gallique équivalente
HPLC	Chromatographie liquide de haute performance
MS	Masse sèche
pH	Degré d'acidité
QE	Quercitine équivalente
RE	Rutine équivalente
UV- visible	Spectrophotométrie ultra violet

Sommaire

Introduction.....	1
Références bibliographiques.....	3
Chapitre I : Généralités botaniques	
I.1. Famille des Astéracées.....	4
I.1.1 Généralités.....	4
I.1.2Systématique.....	5
I.2Le genre Matricaria.....	5
I,2.1-Systématique.....	5
I.2. 2. Répartition géographique et caractéristiques botaniques.....	5
I.3-Présentation de la plante étudiée.....	6
I,3.1Caractéristiques botaniques.....	6
I.3.2 La croissance et la florison.....	6
I.3.3 Répartition géographique.....	6
I.3.4 Systématique.....	7
I.3.5 Composition chimique de Matricaria pubescens (Desf.).....	7
a)- Les coumarines.....	8
b)- Les flavonoïdes	8
c)- Les amides	8
d)- Les terpènes	8
e)-Sesquiterpènes lactones	8
I.3.6 Domaines d'utilisation du Matricaria pubescens (Desf.).....	9
✓ Alimentation.....	9
✓ Médicinal.....	9
Références bibliographiques.....	10
Chapitre II : Les polyphénols et l'activité antioxydante	
II.1 Les composés phénoliques.....	12
II.1.1Généralités.....	12
II.1.2.Localisation.....	12
II.1.3. Principales classes des composés phénoliques.....	12
II.1.3.1. Polyphénols simples.....	12
II.1.3.1.1. Acides phénoliques.....	12
II.1.3.1.2. Les flavonoïdes.....	14
II.1.3.1.3. Alcools phénoliques.....	18

II.1.3.2. Polyphénols complexes (tannins).....	19
II .1.3.2.1. Les tannins hydrolysables.....	19
II.1.3.2.2. Les tannins condensés.....	19
II.1.4. Le rôle des composés phénoliques.....	21
II.1.4.1.Rôle physiologique.....	21
II.1.4.2. Rôle technologique.....	21
II.1.4.3. Rôle biologique.....	22
II.2 Activité antioxydante.....	22
II.2.1. Définition d'un radical libre.....	22
II.2.2. Antioxydants.....	23
II.2.2.1. Définition.....	23
II.2.2.2. Les sources des antioxydants.....	24
II.2.2.2.1 Les antioxydants synthétisés.....	24
II.2.2.2.2. Les antioxydants naturels.....	24
Références bibliographiques.....	26

Chapitre III: Matériels et Méthodes

III.1. Matériels.....	31
III.1.1.Matériels de laboratoire.....	31
III.1.2. Matériel végétal.....	32
III.1.2.1 Préparation des échantillons.....	32
III.2.Méthodes.....	33
III.2.1.Extraction.....	33
III .2.1.1.Préparation des solvants.....	34
III.2.1.2.Préparation des extraits	34
III.2.2.Techniques d'identification.....	36
III.2.2.1.La spectrophotométrie UV-visible	36
III.2.2.2.La spectrophotométrie IR.....	37
III.2.3.Dosage des composées phénoliques.....	37
III.2.3.1Analyse qualitative.....	37
✓ Dosage des polyphénols totaux (PPT).....	37
✓ Dosage des flavonoïdes totaux (FVT).....	38
✓ Dosage des Flavanols.....	39
III.2.3.2.Analyse quantitative.....	41
III.2.3.2.1.Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	41
III.2.4.Evaluation de l'activité antioxydante.....	41
III.2.4.1. Activité antioxydante totale (CAT).....	41

III.4.2.2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil).....	41
Références bibliographiques.....	43

Chapitre IV: Résultats et discussion

IV.1 Rendement d'extraction des composés phénoliques.....	45
IV.2 Etude phytochimique.....	46
IV.2.1 Dosage des composés phénoliques par la méthode colorimétrique.....	46
IV.2.1.1 Dosage de polyphénols totaux.....	46
IV.2.1.2 Dosage de flavonoïdes totaux.....	48
IV.2.1.3 Dosage de flavanols.....	50
IV.2.2 Comparaison des composés phénoliques des différents extraits	52
IV. 3 Analyses structurales.....	53
IV.3.1 Analyse par la spectrophotométrie FT-IR.....	53
IV.4 Technique d'analyse chromatographique HPLC.....	56
IV.4.1 Chromatogrammes des étalons.....	56
IV.4.2 Les courbes d'étalonnages des polyphénols standards.....	57
IV.4.3 Chromatogrammes HPLC des extraits.....	61
IV.5 Evaluation de l'activité antioxydante.....	66
IV.5.1 Méthode de la Capacité antioxydante totale (CAT).....	66
IV.5.2 Test anti-radicalaire (Test DPPH).....	68
Références bibliographiques.....	72
Conclusion.....	73
Annexe	

Introduction

Introduction

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies.[4]

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments .[6]

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures in vivo et in vitro de tissus végétaux. Ceci est notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique [2] .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 .[3]

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives. Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes [1]

En Algérie, l'industrie pharmaceutique, mais également des médecins et des chimistes cherchent à mieux connaître le patrimoine des espèces spontanées utilisées en médecine traditionnelle. Leurs modes d'utilisation, leurs indications dans diverses pathologies ainsi les principes actifs sont étudiés depuis une vingtaine d'années . [05]

C'est dans ce contexte, que notre travail va s'inscrire vu l'implication de notre laboratoire, dans cet axe de recherche consacré principalement à la phytochimie et à l'évaluation biologique des plantes sahariennes reconnues médicinales de façon traditionnelle. Pour cela, on propose notre contribution sur la plante *Matricaria pubescens* qui est très utilisée par la population saharienne.

L'objectif de notre étude est d'estimer la teneur de cette espèce végétale en ces composés actifs essentiels, les polyphénols obtenus dans les feuilles de la plante et d'en évaluer leur pouvoir biologique sur les différent pH du milieu d'extraction .

Notre travail se répartit donc comme suit :

- Etude botanique de la plante « *Matricaria pubescens* » (classification, description, et utilisation,).
- Etude chimique impliquant la définition, la structure, la classification, et l'activité biologique des polyphénols.
- Extraction des polyphénols contenus dans la matière végétale .
- Analyse des extraits par les méthodes colorimétriques et chromatographie liquide de haute performance (HPLC).
- Evaluation de l'activité antioxydante de notre extraits par deux méthodes, le capacité antioxydante totale et le piégeage du radical libre DPPH.

Références bibliographiques

- [1] Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J. C. and Pinkas M, **(1996)** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arznei. Forschung.*; 46: 1086-1089.
- [2] Bahorun, T. **(1997)** Substances Naturelles actives: La flore mauricienne une source d'approvisionnement potentielle. Université de Maurice. AMAS, Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius , p 83
- [3] Boizot, N ; Charpentier, J.P. **(2006)**. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour d'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, *INRA*, 79-82.
- [4] Lhuillier, A. **(2007)** Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae). Thèse de doctorat. Toulouse
- [5] Maizak, K ; Brac, De La Perriere et Hammiche, V. **(1993)**. Pharmacopée traditionnelle: Sahara septentrional. Actes du 2e colloque européen d'ethnopharmacologie, Heidelberg, p 169-181.
- [6] Maurice N, **(1997)** L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIe siècle. Ed. Lavoisier, Paris, p. 12-14.

Chapitre I

Généralités botanique

I.1. Famille des Astéracées

I.1.1. Généralités:

Nombreuses familles botaniques sont incluses dans ces plantes aromatiques. On signale la famille des Astéracées, cette famille des comprend plus de 13 tribus, 1000 genres et 23000 espèces [16]. En Algérie, il en existe 109 genres et 408 espèces et en France 111 genres et 638 espèces [8]. Les Astéracées sont économiquement importante, vu que plusieurs de ses plantes sont cultivées pour leur valeur alimentaire (le tournesol, le topinambour, la laitue, la chicorée, la camomille, etc.) ou comme plantes décoratives (les dahlias, les asters, les rudbeckies, les gaillardes, etc).

Plusieurs espèces sont utilisées en pharmacie, En effet, il a été rapporté que les fleurs et les feuilles de certaines plantes de cette famille, tels que l'Arnica (*Arnica montana L.*), la Chamomille (*matricaria chamomilla L* et *Anthemis nobilis L*) possèdent des propriétés antibactériennes, antifongiques, antiviraux et anti-inflammatoires. De ce fait, de nombreuses espèces de cette famille sont utilisées en médecine traditionnelle [6].

Le tableau (I.1) montre les différents espèces des Astéracées dans le Sud d'Algérie et leur usage thérapeutique.

Tableau (I.1) : les différents espèces des Astéracées dans le Sud d'Algérie et leur usage thérapeutique .[11]

Nom scientifique	Indication	Partie utilisée	Mode d'utilisation
<i>Anvillea radiata Coss.</i> <i>Dur.</i>	Refroidissement pulmonaire, indigestion	Feuilles, tiges	Infusion, macération
<i>Artemisia herba alba Asso</i>	Troubles digestif et respiratoire, rhumatisme, obésité, refroidissement, aromate	Feuilles rameaux, fleurs	Infusion, macération, tisane
<i>Artemisia campestris L.</i>	Emménagogue, vermifuge, vulnéraire, règles douloureuses, cicatrisant, maux d'estomac	Feuilles et les sommités	Infusion, décoction, macération, cataplasme
<i>Cotula cinerea Del.</i>	Colique, diarrhée, toux, refroidissement bronchopulmonaire	Feuilles et rameaux	Infusion, décoction, macération, inhalation
<i>Matricaria pubescens Def.</i>	Dysménorrhée, toux, affections oculaires, maux de rein	Feuilles et racines	Macération, décoction, infusion

I.1.2. Systématique [9]

Tableau (I.2) : La classification Systématique .

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta (Plantes vasculaires)
Embranchement	Phanerogamae (Phanérogames)
Sous-embranchement	Magnoliophytina (Angiospermes)
Classe	Magnoliopsida (Dicotyledones)
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Asterales
Famille	Astéracée (Compositae)

I.2. Le genre *Matricaria*

Matricaria est un genre de plantes à fleurs de la famille Astéracées. Certaines de ces espèces ont le nom commun de "matricaire", mais ce nom se réfère également à des plantes dans des autres genre.[6]

I.2.1. Systématique [6]:

Tableau (I.3) : La classification Systématique de genre *Matricaria* .

Règne	Plantae
Ordre	Asterales
Famille	Astéracées
Sous-famille	Asteroideae
Tribu	Anthemideae
Sous-tribu	Matricariinae
Genre	<i>Matricaria</i>

I.2. 2. Répartition géographique et caractéristiques botaniques [6]

La plupart des matricaires sont très fréquents dans les régions tempérées d'Europe, d'Asie, et en Amérique, ainsi que dans le nord et le sud de l'Afrique, et certaines sont naturalisées en Australie.

Les matricaires sont des plantes annuelles de 50 centimètres à 1,5 m de hauteur, à tige dressée (rameuse). Les feuilles, alternes, sessiles, épaisses, charnues, sont très divisées, en

lanières. Les fleurs, jaunes au centre, blanches à la circonférence, très odorantes, sont groupées en capitules solitaires au sommet des rameaux. Le fruit est très petit, blanc jaunâtre, légèrement arqué.

I.3.Présentation de la plante étudiée

Matricaria pubescens est une plante spontanée, elle pousse en abondance dans les régions sahariennes , elle est très utilisée en médecine et préparations traditionnelles.[10]

I.3.1.Caractéristiques botaniques:

Matricaria pubescens est une espèce endémique, appartenant à la famille des Astéracées , très connue en Afrique du Nord . C'est une plante herbacée à tiges nombreuses couchées puis redressées et sous forme de touffes. Les feuilles découpées et velues sont d'un vert sombre. Involucres à bractées et ayant une marge membraneuse large, les fleurs toutes en tubes, de coloration jaune, sont groupées en capitules dont le diamètre est de 6 à 7 m. [12]

I.3.2. La croissance et la florison :

La croissance de *Matricaria pubescens* commence en fin d'hiver , et après une courte périodes de croissance et de développement apparaitre les fleurs jaunes . La plante se dessèche et meurt quand approche de l 'été. [15]

I.3.3.Répartition géographique:

Matricaria pubescens est largement distribué dans tout le Sahara, il s'agit d'une espèce endémique nord-africaine: Sahara Occidental, Maroc, Tunisie, Algérie et Libye . [14]



Figure (I-1) : Photo de la plante *Matricaria pubescens* .[2]/[13]

I.3.4. Systématique

Nom vernaculaire: La dénomination se diffère d'une région à l'autre: L'espèce *Matricaria pubescens* (Desf.) est appelée Guertoufa et Ouazouza à El Goléa et Ouargla [7], Ainasnis à Tassili [2] et à Béchar Ouazouza et Guertoufa Khadra.

La classification botanique de cette plante est décrite par le tableau (I.4)

Tableau (I.4) : La classification Systématique de la plante .[12]/[13]

Embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Gamopétales
Ordre	Astérales
Famille	Astéracées
Genre	<i>Matricaria</i>
Espèce	<i>Pubescens</i> (Desf.)
Nom français	Camomille

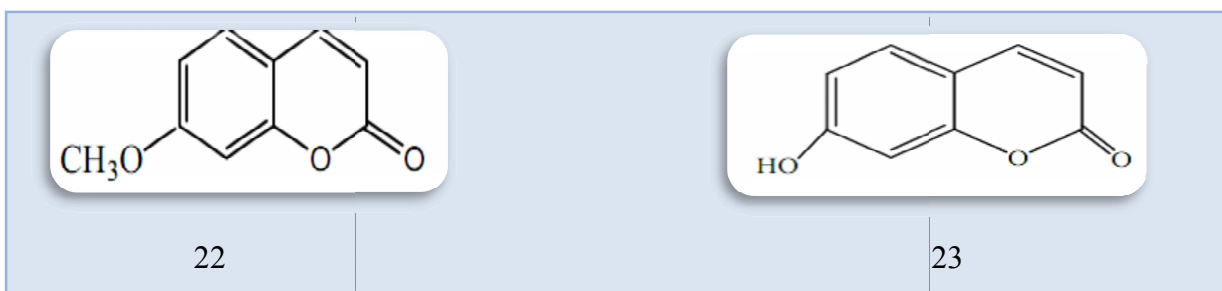
I.3.5.Composition chimique de *Matricaria pubescens* (Desf.)

Un grand nombre du genre de *Matricaria* ont fait à ce jour, l'objet d'études chimiques et de très nombreux métabolites secondaires ont été isolés, à l'exception des alcaloïdes. Les recherches phytochimiques ont permis de mettre en évidence , dans le genre *Matricaria* , tous les composés caractéristique des Astéracées .Ces derniers, lors d' études chimiosystématiques,

ont montré une grande variété de métabolites secondaires et des procédés biosynthétiques différents. On a ainsi pu mettre en évidence au cours d'études chimiques sur les Astéracées, différents types de composés chimiques : coumarines, flavonoïdes, amides, terpènes, hétérosides, sesquiterpènes lactones. [4]

a)- Les coumarines [8]

Les composés coumariniques rencontrés chez le genre *Matricaria* sont le plus souvent des composés simples comme c'est le cas de l'Herniarine (22) et l'umbelliférone (23).



b)- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes, présents dans la plupart des plantes, sont des pigments polyphénoliques qui contribuent entre autres, à colorer les fleurs et les fruits en jaune ou en blanc. Ce sont des substances naturelles très répandues dans la famille des Astéracées [3] où beaucoup de travaux ont été réalisés chez le genre *Matricaria*. On trouve essentiellement des flavonoïdes glycosylés comme l'apigénine 7-glucoside et la lutéoline 7-glucoside [8].

c)- Les amides

Les parties aériennes et les racines de l'espèce *Matricaria pubescens* (Desf.) présentent un goût piquant et poivré dû à des métabolites secondaires comportant un radical isobutylamide. Ces amides peuvent être aromatiques « fagaramide » ou aliphatiques « sanshool » [1]

d)- Les terpènes

Constituant une vaste famille de composés naturels, ils sont classés chimiquement en fonction du nombre d'unités isopréniques $(C_5H_8)_n$ constituant leurs structures carbonées selon la règle élaborée initialement par Léopold Ruzicka. [8]

e)- Sesquiterpènes lactones

Ce sont des molécules en C_{15} souvent présentes sous formes de lactones qui peuvent conférer notamment aux Astéracées des propriétés allergisantes. Ces substances sont fragiles et, par

distillation, peuvent se transformer en carbures plus ou moins insaturés par dégradation de la lactone initiale. Elles peuvent être présentes dans les huiles essentielles. [8]

I.3.6.Domains d'utilisation du *Matricaria pubescens* (Desf.)

✓ Alimentation

Cette plante est utilisée pour donner une bonne saveur au thé [8] . Dans la région Sud-Ouest Algérienne elle est aussi utilisée pour la préparation des soupes et dans la conservation du beurre transformé traditionnellement (D'han).

✓ Médicinal

Matricaria pubescens (Desf.) est utilisée dans les affections oculaires, démangeaison, dysménorrhée, inflammations des plaies [7], rhumatismes, toux, otites et affections oculaires, calculs biliaires et affection gastro-intestinales. [8][11]

L'usage traditionnel de cette plante est varié d'une région à l'autre [7]:

- El-Goléa : rhumatismes, courbatures, déshydratation, dentition, dysménorrhée, affections oculaires, toux, allergies.
- Béchar : toux, allergies, affections oculaires ;
- Ouargla : toux, dysménorrhée, piqûres de scorpion et allergies ;

En usage externe, la matricaire est utilisée couramment dans le domaine dermatologique [8]

- Retenues de l'usage : vulnérable (cicatrisant, antiseptique, antiphlogistique) ;
- Mucodermotrope : anti-inflammatoire, épithéliogène, antiulcéreux, lénitif ;
- Anti-infectieux : antifongique, antibactérien.

Références bibliographiques

- [1] Benkiki.N,(2006),"Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Ruta montana* ,*Matricaria pubescens* et *Hypericum perforatum*".Thèse doctorat .Université el hadj lakhder Batna ,pages 8,112-125.
- [2] Djellouli Mohammed, Moussaoui Abdellah, Benmehdi Houcine., Ziane Laid, Belabbes Abdelghani , Badraoui Messaouda, Slimani Nawel, Hamidi Nourddine ,(2003)," Importance des Plantes Spontanees Medicinales dans La Pharmacopee Traditionnelle de La Région de Ouargla (Sahara Septentrional - Est Algerien)", Sciences et Technologie C – N°20, Décembre (2003), pp. 73-78.
- [3] Eberhard T, Robert A , Annelise L ,(2005), "Plantes aromatiques, épice aromates, condiments et huiles essentielles." Tec et Doc. Lavoisier. Paris France.
- [4] Guignard J L, Cossen L, Henry M,(1985). Abrégé de phytochimie, édition Masson, Paris .
- [5] Guignard J L, (1994). Abrégé botanique, 9 eme édition. Édition Masson, Paris.204
- [6] Mahdjar Salha, (2013), "Contribution à l'Etude de la composition chimique de la plante *Matricaria pubescens* et à l'évaluation de son activité antioxydante." Mémoire de Master Academique, Universite Kasdi Merbah Ouargla , p 1- 3.
- [7] Maiza K., Brac de La Perier R.A , Hammiche V, "Pharmacopée traditionnelle saharienne : Sahara septentrional. Médicaments et aliments : l'approche ethnopharmacologique." Actes du 2ème Colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la 11ème Conférence internationale d'Ethnomédecine, Heidelberg, 24-27 mars 1993, 169-171.
- [8] Makhoulfi Ahmed ," Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar(*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. " Thèse Doctorat, Universite Aboubaker Belkaid , p 13,14,15,16,17.
- [9] Mezache. N, (2010) ,"Détermination structurale et évaluation biologique de substances naturelles de quelques espèces de la famille astéracée: *Senecio giganteus* Desf.et *Chrysanthemum myconis* l", Thèse doctorat, Université mentouri-Constantine, 4, 5, 17,23-26.

[10] Naghmouche Salah , Amirat. M, Debbakh.O, et (2006), "Analyse qualitative de quelques produits chimiques contenus dans la plante (*Matricaria pubescens*)", Mémoire de DES, Université de Ouargla, p. 67.

[11] Ould el hadj M. D, Hadj-Mahammed M., Zabeirou H, Chehma.A , (2003)," Importance des plantes spontanees medicinales dans la pharmacopee traditionnelle de la region de Ouargla (Sahara Septentrional - Est Algérien)." Sciences et Technologie C – N°20, Décembre (2003), pp. 73-78.

[12] Ozenda P, 2004. Flore et végétation du Sahara. Troisième édition. CNRS édition.750005 Paris, 92,438,662.

[13] Zarrour Brahim, (2012),"Etude phytochimique de quelques extraits obtenus de le plante *Matricaria pubescens* (*Astéracéas*) et évaluation de leur activité antioxydante." Mémoire de Master Academique, Universite Kasdi Merbah Ouargla , p 01.

[14] www.catalogueoflife.org/annualchecklist/details/species/id/9508016/synonym/9569031

[15] حليس يوسف ، الموسوعة النباتية لمنطقة سوف، ص 192 .

Chapitre II

les polyphénols et l'activité antioxydante

II.1 Les composés phénoliques

II.1.1 Généralités :

Les composés phénoliques également dénommés les polyphénols, sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires [24], ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance ou la reproduction .[14]

Ils constituent un des groupes les plus nombreux et largement distribué des substances dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connues.[33]

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées . [43]

Les composés phénoliques participent activement aux interactions de la plante avec son environnement en jouant soit le rôle des signaux de reconnaissance entre les plantes, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel . [28]

II.1.2. Localisation

Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) [5]. Ils sont présents aussi dans diverses substances naturelles comme les fruits rouges, le raisinetc. [25] Parmi les composés phénolique, dont 8000 sont connus : les flavonoïdes, les quinones phénoliques, ligands, les xanthones, les coumarines et d'autres classes existent en nombre considérable. [5]

II.1.3. Principales classes des composés phénoliques :

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. On peut distinguer deux catégories : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes. [13, 36]

II.1.3.1. Polyphénols simples

II.1.3.1.1. Acides phénoliques

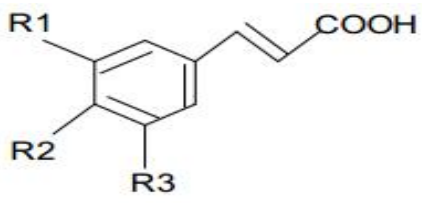
Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un

hydroxyle phénolique.[42]

➤ *Acides hydroxycinnamiques*

Dérivent de l'acide cinnamique et ont une structure générale de base de type (C₆-C₃). Existents souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent une réactivité chimique importante de ces molécules .[19]

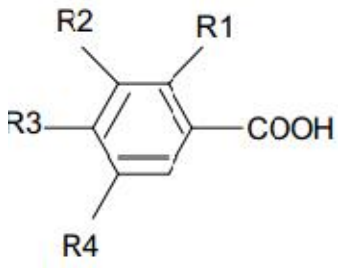
Tableau (II.1) : Principaux acides hydroxycinnamiques .[39]

Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	H	OH	Acid p-coumarine
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH ₃	OH	H	Acide férulique
	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide sinapique

➤ *Acides hydroxybenzoïques*

Sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure générale de base de type (C₆-C₁). Ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides. Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans le tableau suivant . [19]

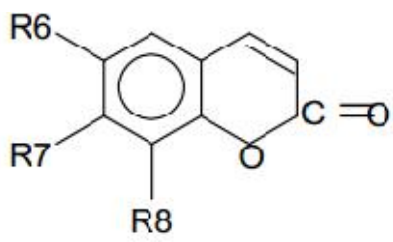
Tableau (II.2): Principaux acides hydroxybenzoïques .[39]

Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p-hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechine
	H	OCH ₃	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	H	Acide gallique
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

➤ **Coumarines**

Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale. Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique .[19]

Tableau (II.3) : Principaux types de coumarines .[28]

Structure	R6	R7	R8	Acides phénoliques
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH ₃	OH	H	Scopolétol
	OCH ₃	OH	OH	Fraxétol
	H	OH	OH	Daphnéol

II.1.3.1.2. Les flavonoïdes

Du latin *flavus*, jaune, sont des substances généralement colorées très répandues chez les végétaux : on les trouve dissoutes dans les vacuoles à l'état d'hétérosides ou comme constituant des plastides particuliers, les chromoplastes .[14]

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C₃ en formant ainsi l'hétérocycle (C).[44] Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C₆-C₃- C₆ [10] en formant une structure de type diphenyle propane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule [34, 29]

Les flavonoïdes sont présents dans une grande variété d'aliments (fruits et légumes, céréales, jus de fruits, thé et vin...).

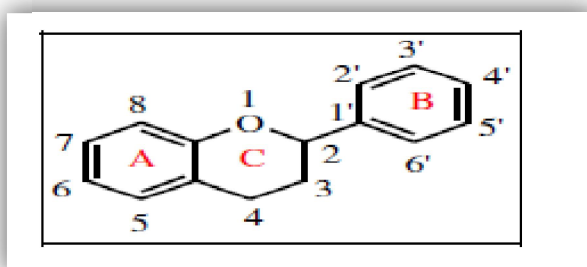


Figure (II.1): Squelette de base des flavonoïdes . [22]

Il existe plusieurs classes de flavonoïdes, dont les principales sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines. La structure de base de ces différents flavonoïdes peut subir de nombreuses substitutions, les groupements hydroxyles étant généralement en positions 4, 5 et 7. Ces substances existent généralement sous forme de glycosides .[1]

✓ *Flavanones*

Les flavanones sont caractérisées par l'absence de la double liaison entre C₂ et C₃ et par la présence d'un centre de chiralité en C₂ [42, 1]. Les agrumes constituent la principale source alimentaire de flavanones. Les principaux aglycones sont l'ériodictyol dans le citron, la naringénine dans le pamplemousse et l'hespéritine dans l'orange , un jus d'orange contient entre 200 et 600 mg d'hespéritine/L . [31]

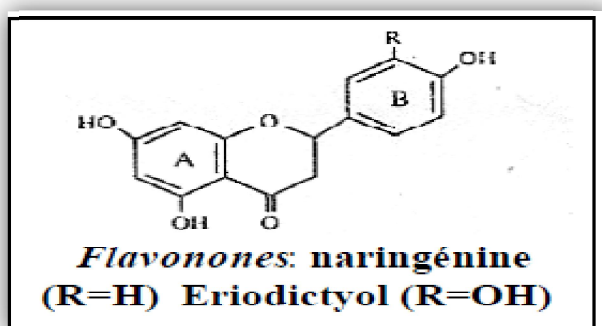


Figure (II.2): Structure chimique des flavanones . [3]

✓ *Flavanols*

Les flavanols se distinguent par la présence d'un groupement OH en position C₃ et d'une double-liaison en C₂-C₃ . Ils peuvent exister soit sous forme d'aglycones, soit sous forme d'hétérosides. Les trois principales structures sont la quercétine, le kaempférol et la rutine. Les sources les plus riches sont les oignons (350-1200mg/kg de matière fraîche) [41, 29], le poireau, le chou et les baies telles que le cassis (115 mg/kg de matière fraîche) [23]. Le thé contient aussi des flavanols à hauteur de 45 mg/L [21].

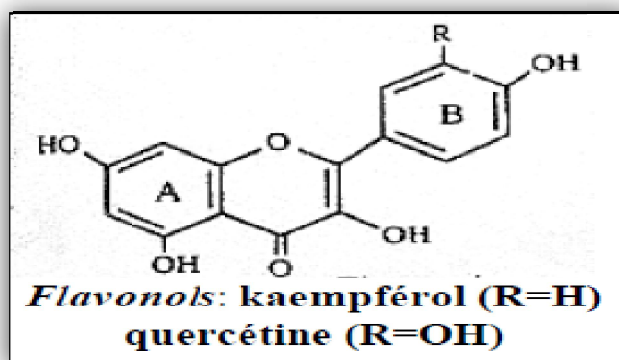


Figure (II.3): Structures chimiques de flavonols.[3]

✓ Flavan-3-ols

Les flavan-3-ols ou dérivés de catéchine sont la catégorie de flavonoïdes la plus complexe. De plus, les flavan-3-ols peuvent être estérifiés par l'acide gallique ou hydroxylés pour former les gallocatéchines (épicatechine gallate, épigallocatéchine, épigallocatéchine gallate) [1]. Les catéchines sont présentes dans le chocolat (jusqu'à 132,4 mg/kg de matière fraîche de chocolat noir), le thé (jusqu'à 120 mg du thé noir de Chine) et dans les fruits comme l'abricot [15, 9].

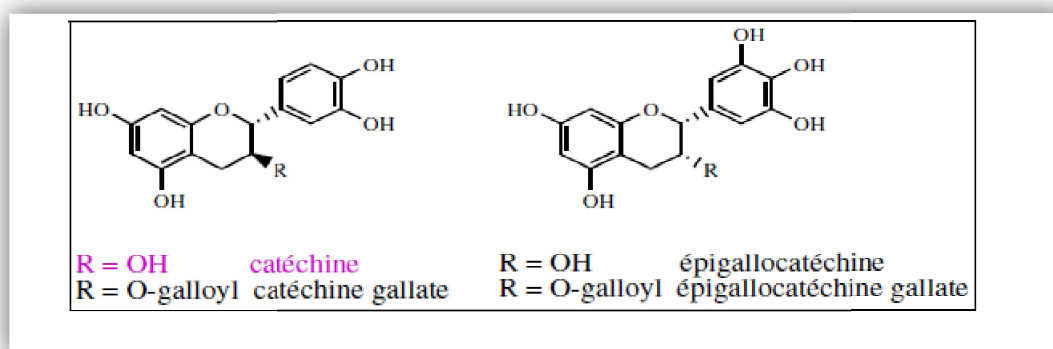


Figure (II.4): Structures chimiques de certains flavan-3-ols [1].

✓ Flavones

Dérivent des flavanones par une oxydation qui introduit une seconde double liaison dans l'hétérocycle. Dans plus de 90%, le cycle A est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C₅ et C₇. Par exemple: Glucoside d'apigénine chez le blé et la tricine chez le blé. [3]

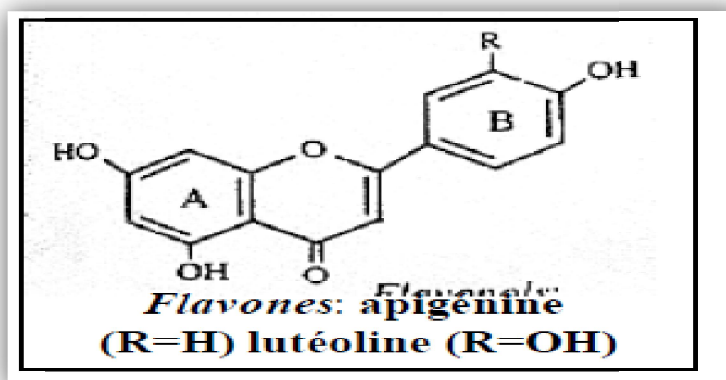


Figure (II.5): Structures chimiques de flavone.[3]

✓ *isoflavones:*

Dérivent aussi des flavanones mais outre une oxydation centrale, il y a transposition du cycle latéral du C₂ au C₄ de l'hétérocycle . [3]

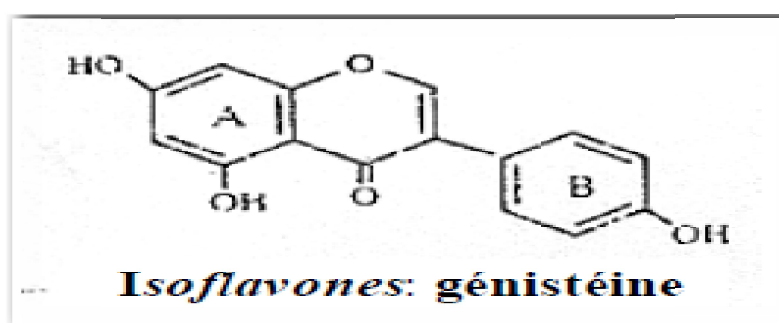


Figure (II.6): Structures chimiques des isoflavones.[3]

✓ *anthocyanes*

le terme « anthocyanes » a une valeur générale désignant, soit les formes naturelles glycosylées, soit les molécules non glycosylées . Chez les anthocyanes, en plus de la position 3 qui est toujours glycosylée, il y a aussi préférentiellement la position 5 est glycosylée. [28]

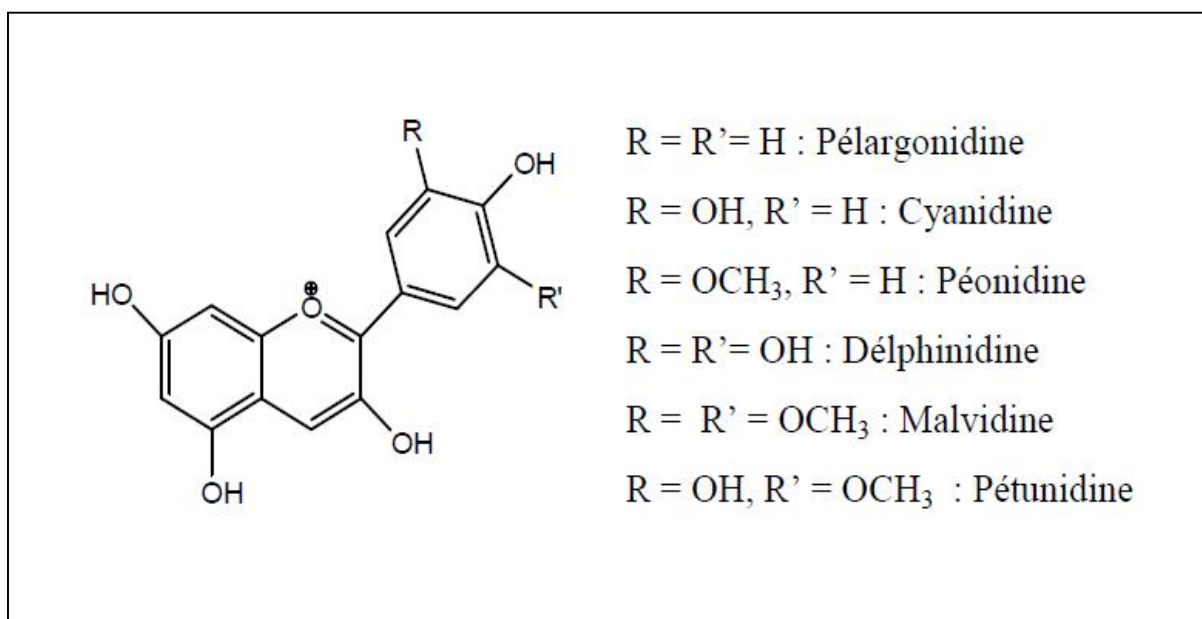


Figure (II.7): Structures chimiques des anthocyanes .[3]

II.1.3.1.3. Alcools phénoliques

Un alcool phénolique est un composé organique possédant au moins un alcool aliphatique et un hydroxyle phénolique. Le tyrosol (4-hydroxyphenylethanol) et hydroxytyrosol (3,4 dihydroxyphenylethanol) sont les principales molécules de cette classe. Ces composés sont très abondants dans l'olive (fruit et feuille), libres ou associés à l'acide élénolique [32, 12].

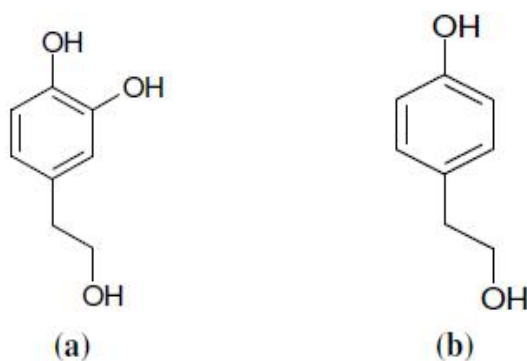


Figure (II. 8) : Structures de l'hydroxytyrosol (a) et du tyrosol (b) [26].

II.1.3.2. Polyphénols complexes (tannins)

Les tannins sont des composés phénoliques très abondants chez les angiospermes, les gymnospermes (tannins condensés) et les dicotylédones (tannins hydrolysables). Ces composés ont la capacité de se combiner et de précipiter les protéines. Ces combinaisons varient d'une protéine à une autre selon les degrés d'affinités .

Le terme tannin vient de la source de tanins utilisée pour le tannage des peaux d'animaux en cuir. Dans ce processus, les molécules de tanins se lient aux protéines par des liaisons résistantes aux attaques fongiques et bactériennes.

Selon la structure, on a deux types de tannins : les tannins hydrolysables et les tannins condensés, dits aussi : proanthocyanidines. [18]

II.1 .3.2.1. Les tannins hydrolysables

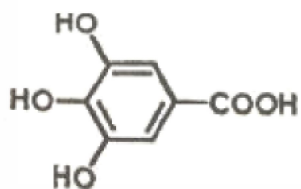
Sont formés par liaison de plusieurs acides galliques à un carbohydrate (généralement le glucose). On parle de gallotannins , aussi des unités galloyles peuvent être ajoutées par liaisons esters, généralement en position C₃ de l'acide gallique. Et les unités d'acide gallique voisines s'accouplent formant les esters d'acide hexahydroxydiphénique, dits : ellagitannins.

Ces deux groupes, les gallotannins et les ellagitannins sont appelés tannins hydrolysables. Comme leur nom l'indique, ces composés peuvent être dégradés en fragments simples (acides phénols et sucres).

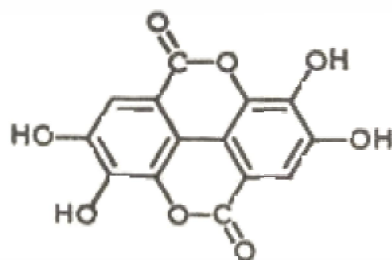
L'acide gallique provient de la β -oxydation des composés C₆-C₃, comme l'acide coumarique ou les acides oxygénés correspondants. Mais, l'acide shikimique est considéré comme le meilleur précurseur [40].

II.1.3.2.2. Les tannins condensés

Les tanins condensés, appelés aussi les proanthocyanidines sont des polymères formés d'unités répétitives monomériques qui varient par leur centre asymétrique et leur degré d'oxydation . Les formes naturelles monomériques des flavan-3-ols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétrique C₂ et C₃ et par le niveau d'hydroxylation du noyau B . On distingue ainsi les catéchines (dihydroxylées) des gallocatéchines (trihydroxylées).[4]



Acide gallique



Acide ellagique

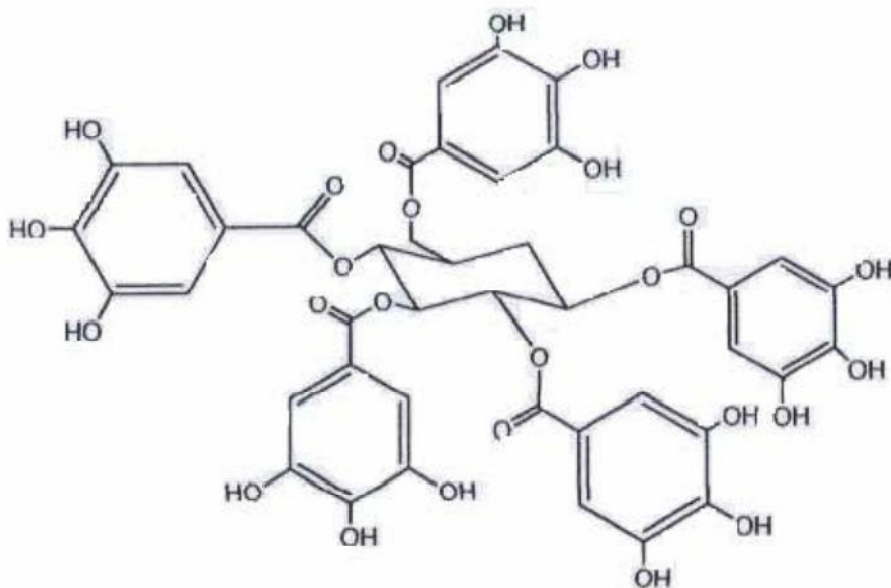
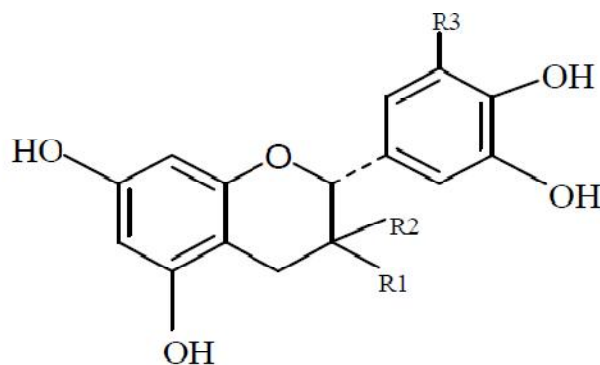


Figure (II.9) : Structure générale d'un tannin hydrolysable.[4]



Nom	R1	R2	R3
(+) - catechine	OH	H	H
(-) - épicatechine	H	OH	H
(+) - gallo catechine	OH	H	OH
(-) - épigallo catechine	H	OH	OH

Figure (II.10) : Structure chimique des unités monomériques constitutives des tanins condensés.[4]

II.1.4. Le rôle des composés phénoliques

II.1.4.1. Rôle physiologique

Des travaux plus anciens ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques: croissance cellulaires, différenciation, organogenèse, dormance des bourgeons, floraison et tubérisation .[2]

Les flavonoïdes sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. Ils sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques de feuilles, ils sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs des rayonnements UV .[16]

Ils sont impliqués dans la réaction de défense du palmier dattier contre le *bayoud*, maladie infectieuse due à un champignon telle que *Fusarium oxysporum* .[8]

II.1.4.2. Rôle technologique

Les polyphénols interviennent dans la qualité alimentaire des fruits. Les anthocyanes et certains flavonoïdes participent à la coloration des fruits murs, ils confèrent aux fruits et légumes leurs teintes rouge ou bleuté, ils sont aussi responsables des qualités sensorielles et alimentaires des aliments végétaux. L'astringence et l'amertume des nourritures et des boissons dépendent de leurs teneurs .[27]

II.1.4.3. Rôle biologique

Tableau (II.4) : Activités biologiques des composés phénoliques.[38]

Polyphénols	Activités
Acides Phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes Antifongiques Antioxydantes
Coumarines	Protectrices vasculaires et antioedémateuses
Flavonoïdes	Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydantes
Anthocyanes	Protectrices capillaroveineux
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène Antioxydantes Antitumorales Antifongiques Anti-inflammatoires
Tannins galliques et catéchiques	Antioxydantes

II.2. Activité antioxydante

La protection contre les effets délétères induits par les radicaux oxygénés s'effectue à l'aide de trois types d'agents différents : les protéines non enzymatiques, Les enzymes tels que les superoxyde-dismutases et les glutathion-peroxydases et enfin les antioxydants d'origine nutritionnelle tels que les caroténoïdes, les tocophérols (vitamine E), l'acide ascorbique (vitamine C) et les polyphénols qui sont des antioxydants essentiels pour l'homme. [20]

II.2.1. Définition d'un radical libre

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent

à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique . [7]

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux libres primaires, qui dérivent directement de l'oxygène. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires (radical peroxy $\text{ROO}\bullet$, radical alkoxy $\text{RO}\bullet$), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule . [35]

L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène" (**ROS**). Cette appellation n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical superoxyde $\text{O}_2\bullet$, radical hydroxyl $\text{OH}\bullet$, monoxyde d'azote $\text{NO}\bullet$, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante : l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , peroxynitrite ONOO^- .[11]

II.2.2. Antioxydants

L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydo-réduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Les antioxydants sont capables de stopper ou de retarder ces réactions en chaîne en se réduisant avec les radicaux libres et annihilant ainsi leur action. Ces propriétés se trouvent beaucoup dans les familles des thiols et des phénols.[20]

II.2.2.1. Définition

Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. Il est défini par HALLIWELL [17] comme « toute substance qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat ». C'est une molécule qui est capable de neutraliser les formes actives de l'oxygène et permet de maintenir au niveau de la cellule et de l'organisme des niveaux non cytotoxiques de radicaux libres.

II.2.2.2. Les sources des antioxydants

II.2.2.2.1. Les antioxydants synthétisés

Les antioxydants de synthèse sont introduits dans toutes les formulations contenant des corps gras insaturés et parfois aussi dans des phases aqueuses où se trouvent des extraits végétaux riches en oxydases. Leur concentration d'utilisation est généralement dix fois plus faible que celle des conservateurs et se situe entre 0,02 et 0,05 %. Ce sont :

- le butylhydroxytoluène (BHT)
- le butylhydroxyanisole (BHA)
- les gallates de propyle, octyle et de dodécyle

Le tableau (II.5) montre quelques limites d'utilisation des antioxydants de synthèse

Tableau (II.5): Quelques exemples d'utilisation réglementée des antioxydants de synthèse [37].

Nature de l'aliment	Antioxydant	Concentration maximale (ppm)
Saindoux, graisse de bœuf, de volaille et de mouton, huile de poisson.	Gallates et BHA seuls ou en mélange	200
	BHT	100
Compléments alimentaires	Gallates, BHT et BHA	400
Soupes et viandes déshydratées, lait en poudre	Gallate et BHA seuls ou en mélange	200

II.2.2.2.2. Les antioxydants naturels

Les antioxydants naturels sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures. Elles incluent le bêta carotène, l'albumine, les vitamines (E, C, P..), les composés phénoliques. [6]

II.2.2.2.2.1. Les vitamines :

❖ La Vitamine C : Acide ascorbique :

Est largement répandue dans les fruits comme : les légumes, les choux, le poivron, le persil, les agrumes et le kiwi. Elle joue un rôle important dans la régénération du vitamine E.

❖ **La vitamine E :**

Elle semble devoir fixer le radical hydroxyle avec formation d'une molécule d'ouverture de cycle. On la retrouve dans les huiles végétales (arachides, soja, chardon, tournesol, olive pressé à froid), les amandes, les graines, le lait, les oeufs, les légumes à feuilles vertes.

❖ **Le β carotène**

Il est présent dans les légumes vertes, la salade, les carottes, l'abricot, le melon, les épinards, la papaye. [30]

Références bibliographiques

- [1] Afanas'eva, I.B., Ostrakhovitch, E.A., Mikhal'chik, E.V., Ibragimova, G.A., Korkina, L.G. (2001), " Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *Biochemical Pharmacology*." 61(6): 677-684.
- [2] Albert L. (1998), " La santé par les fruits." Ed. Veechi, Paris. p 44-74.
- [3] Bellebcir Leila,(2008) ,"Etude des composés phénoliques en tant que marqueurs de biodiversité chez les céréales. " Thèse de magister Université Mentouri de Constantine , p17 , p 21.
- [4] Ben Abbes Farah , (2011)," Etude de quelques propriétés chimiques et biologiques d'extraits de dattes « Phoenix dactylifera L. " Thèse de magister Université Ferhat Abbas-Setif ,p 22 – 26.
- [5] Bessas .A, Benmoussa. L, Kerarma. M ,(2008)," Dosage biochimique des polyphénols dans les dattes et le miel récoltés dans le sud algérien . "Mémoire de fin d'étude .
- [6] Boubacar Souley Amadou, (2005)," Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Combretum glutinosum* Perr. Ex DC(Combretaceae)." Université de Bamako .
- [7] Dacosta Y,(2003) ,"Les phytonutriments bioactifs" : 669 références bibliographiques. Ed. Yves Dacosta, Paris, p. 317.
- [8] Daayf F, El Bellaj M ,El Hassni M ,Jaiti F and El Hadrami I,(2003) "Elicitation of soluble phenolics in date palm (*Phoenix dactylifera*) callus by *Fusarium oxysporum* f.sp. *albidinis* ." *Environ.Experiment.Botany* . 49 : 41-47.
- [9] De Souza, R.F., Sussuchi E.M., et al (2003)" Synthesis, electrochemical, spectral, and antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions." *Synthesis and reactivity in inorganic and metal-organic chemistry*. 33(7): 1125-1144.

- [10] Emerenciano V. P, Barbosa K. O, Scotti M. T et Ferrero M. J. P (2007)" Self organising maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae : a classification of tribes using flavonoid data." Journal of brazilian chemical society. 18 (5) : 891-899.
- [11] Favier A, (2003) "Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique." L'Actualité chimique; 108-117.
- [12] Fukuzawa K , Saitoh Y, Akai K , Kogure K , Ueno S , Tokumura A , Otagiri M ,Shibata ,(2005)" Antioxidant effect of bovine serum albumin on membrane lipid peroxidation induced by iron chelate and superoxide." Biochimica et BiophysicaActa (BBA)-Biomembranes. 1668(1): 145-155.
- [13] Gibbs C.R, (1976) "Characterization and application of ferrozine iron reagent as a ferrous iron indicator." Analytical Chemistry. 48(8): 1197-1201.
- [14] Guignard J , (2001) "Botanique systématique moléculaire", 2^{ème} édition Lavoisier, Paris. p.122
- [15] Guo M, Perez C, Wei Y, Rapoza E, Su G, Bou-Abdallah F, et Chasteen ND ,(2007) "Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects." Dalton Transactions. 43: 4951–4961.
- [16] Hadi M ,(2004)" La quercétine et ses dérivés: molécules à caractères pro-oxydants ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques." Mémoire doctorat, Université Louis Pasteur Strasbourg, p 155.
- [17] Halliwell. B, (1999) " How to characterize a biological antioxidant.Free RadicRes Commun," 9, 1-32.
- [18] Harborne J. B, (1997)" Recent advances in chemical ecology. "Nat Prod Rep; 14: 83-98.
- [19] Harrar Abd El Nacer , (2012) "Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L." Thèse de magister ,Universite Ferhat Abbas-Setif ,P 14.

[20] Kahina Bouhadjra,(2011) "Etude de l'effet des Antioxydants naturels et de Synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive Vierge. "Thèse de magister , Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou , p 42.

[21] Kang, J., Su, B., Lu, X. **(2005)** " Synthesis and characterization of coordination compounds of Cd (II), Co (II), Ni (II), Cu (II) and Zn (II) with rutin." Indian journal of chemistry. Sect. A: Inorganic, physical, theoretical et analytical. **44**(10), 2010-2014.

[22] Korkina L.G., Afanas'ev I.B. **(1997)** "Antioxidant and chelating properties of flavonoids." Adv. Pharmacol. **38**: 151–163.

[23] Kostyuk , V.A , Potapovich A.I , Kostyuk T.V, Cherian M.G, **(2007)** "Metal complexes of dietary flavonoids: evaluation of radical scavenger properties and protective activity against oxidative stress in vivo." *Cell. Mol. Biol.* **53**: 62–69.

[24] Lebham ,(2005) Mémoire du Laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM) - Université de Bretagne Occidentale (UBO).

[25] Laraoui.H, (2007) docteur de l'université Louis pasteur "Etude Phytchimique l'Extrait Chloroformique de BupleurumAtlanticum" , Universite El Hadj Lakhdar Batna.

[26] Lu Q.h , Ba C.d , Chen D.Y, **(2008)** "Investigating noncovalentinteractions of rutin - serum albumin by capillary electrophoresis - frontal analysis." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. **47**: 888-891.

[27] Lugasi A, Hovari J, Sagi, K V and Biro L, **(2003)** "The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases." Acta Biologica Szegedientis.1-4: 119-125.

[28] Macheix J J, Fleuriet A et Jay-Allemand C , **(2005)** "Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique." Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. p4-5.

[29] Malešev D et Kuntić V, (2007) "Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions." Journal of the serbian chemical society., **72** (10) : 921-939.

[30] Mogode Debeté Judith, (2005) "Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* Vahl (Caesalpiniaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad." Université de Bamako.

[31] Murota K , Mitsukuni Y, Ichikawa M , Tsushida T, Miyamoto S, et Terao J, (2004) "Quercetin-4'-glucoside is more potent than quercetin-3-glucoside in protection of rat intestinal mucosa homogenates against iron ion-induced lipid peroxidation." Journal of Agricultural and Food Chemistry. **52**(7): 1907-1912

[32] Moridani M.Y., Pourahmad J., Bui H., Siraki A., O'Brien P.J, (2003) "Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. "Free Radical Biology and Medicine. **34**(2): 243-253.

[33] Mohammedi Zohra , (2006) "Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes la région de Tlemcen." Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen.

[34] Narayana K. R, Reddy M. S, Chaluvadi M. R et Krishna D. R ,(2001) "Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential." Indian journal of pharmacology., **33** : 2-16.

[35] Novelli G. P, (1997) "Role of free radicals in septic shock. J." Physiol. Pharmacol , **48**: 517-527.

[36] Pascual-Reguera M.I, Ortega-Carmona I, Molina-Díaz A , (1997)" Spectrophotometric determination of iron with ferrozine by flow-injection analysis. "Talanta. **44**(10): 1793-1801

[37] Perrin J.L , (1992)" Les composés mineurs et les antioxygènes naturels de l'olive et de son huile. "Revue française des corps gras. N° 39. P 25-32.

[38] Saliha Daas Amiour , **(2009)**" Etude Quantitative des Composés Phenoliques des extraits de trois Variétés de dattes (*Phoenix Dactylifera L.*) et evaluation in vitro de leur activite Biologique." Thèse de magister, Université El-Hadj Lakhdar - Batna,p 41.

[39] Sarni-Manchado P. et Cheynier V, **(2006)** "Les polyphénols en agroalimentaire." Ed Lavoisier. p2- 10.

[40] Seigler DS, **(1998)** "Plant secondary metabolism." Ed. Kluwer Academic, Boston, p. 193-205.

[41] Simic A, Manojlović D, Segan D, et Todorović M, **(2007)**" Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics." *Molecules*. **12**(10): 2327-2340.

[42] Thompsen J. C, et Mottola H. A , **(1984)** "Kinetics of the complexation of iron (II) with ferrozine. " *Analytical Chemistry* . **56**(4): 755-757.

[43] Urquiaga I. N. E. S. and Leighton F. E. D. E, **(2000)** "Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress." *Biol. Res.* 33: 55-64.

[44] W –Erdman J, Balentine J. D, Arab L, Beecher G, Dwyer J. T, Folts J., Harnly, Hollman J. P, L –Keen C , Mazza G, Messina M, Scalbert A, Vita J, Williamson G et Burrowes J , **(2007)** "Flavonoids and heart health : Proceeding of the ILSI North America flavonoids" workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. *Journal of Nutrition.*, 137 (3 supp 1) : 718 s-737 s.

Chapitre III

Matériels et Méthodes

III. Matériels et méthodes

Notre travail a été réalisée au niveau de laboratoire de valorisation et technologie des ressources sahariennes (VTRS) d'université Echahide Hamma Lakhdar d'El Oued . Cette travail comprend l'étude de l'effet des milieux acide sur l'extraction des composés phénoliques .

Pour effectuer cette étude , plusieurs étapes ont été réalisé :

- ✓ Procéder d'extraction des composés phénoliques a partir des feuilles de notre plante .
- ✓ Dosage des composés phénoliques .
- ✓ Analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).
- ✓ L'utilisation de FT-IR pour confirmer la présence des composés phénoliques.
- ✓ Evaluation de l'activité antioxydant .

III.1. Matériels

III.1.1. Matériels de laboratoire :

✓ Appareillage et Produit chimiques:

Appareillage
• UV spectrophotomètre (UV-1800 SHIMADZU). • Spectrophotometer IR Affinity – 1(FTIR- 8400S SHIMADZU). • Un chromatographe liquide haute performance HPLC (SHIMADZU type HPLC-RP-C18). • Ultrason – H (J.P.SELECTA , s.a) . • Evaporateur rotatif (Rotavapor BUCHI Heating bath R-210). • pH mètre Consort (multi- paramétrer analyser C2030) . • Etuve (Mommert, Beschickung-Loadig Modell 100-800). • Balance analytique (Shanghai Sunrise Instrument précision 0.001g) .
Les logiciels utilisés
• Logiciel Microsoft office Excel 2007, pour le calcul des concentrations à partir des courbes d'étalonnage et pour la présentation des résultats. • Logiciel LC Solution, pour obtenu des chromatogrammes HPLC. • Logiciel Origin Pro 8 , pour trace les courbes d'étalonnages .

--

Produit chimique
• Acide gallique 99% ($C_7H_6O_5$) Production par (PROLABO) . • Rutine 97% ($C_{27}H_{30}O_{16}$) Production par (ALFA AESAR) . • Quercitane dihydraté 97%($C_{15}H_{10}O_7$) Production par (ALFA AESAR) . • DPPH 95% ($C_{18}H_{12} N_5O_6$) Production par (ALFA AESAR). • Trichlorure d'aluminium ($AlCl_3 .6H_2O$) Production par (BIOCHEM Chemopharma) • Carbonate de sodium(Na_2CO_3) Production par (BIOCHEM Chemopharma) . • Acétate de sodium (CH_3COONa) Production par (BIOCHEM Chemopharma) . • Sodium phosphate monobasic dehydrate $NaH_2PO_4 .2H_2O$ Production par (BIOCHEM Chemopharma) . • Ammonium molybdate tetrahydrate $H_{24}MO_7N_6O_{24} .4H_2O$ Production par (BIOCHEM Chemopharma) . • Hydroxyde de sodium ($NaOH$) Production par (BIOCHEM Chemopharma) . • Réactif Folin Ciocalteu ($3H_2O, P_2O_5, 13WO_3, 5MoO_3, 10H_2O$) Production par (PROLABO). • Ethanol 96% (CH_3-CH_2-OH) Production par (SIGMA- ALDRICH). • méthanol 99% (CH_3-OH) Production par (BIOCHEM Chemopharma). • Acide acétique 99% (CH_3-COOH) Production par (BIOCHEM Chemopharma). • Acide Sulfurique 98% (H_2SO_4) Production par (BIOCHEM Chemopharma).

III.1.2. Matériel végétal :

III.1.2.1 Préparation des échantillons

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué des feuilles de la plante *Matricaria Pubescens* (Desf.) récoltée au mois de février 2015 dans un village de Hassi Khalifa à région d'El Oued . Les échantillons des feuilles sont nettoyés puis mis à sécher à température ambiante et à l'abri de la lumière solaire. Afin de préserver au maximum l'intégrité de sa composition chimique.



Figure (III.1) : La plante de Matricaria Pubescens à séché

III.2.Méthodes

III.2.1.Extraction :

Pour l'isolation des matières naturelles ou composées de la matière première avec l'utilisation des solvants, si la matière que l'on veut séparer est liquide, on applique la méthode liquide-liquide; si la matière est solide, on applique l'extraction solide-liquide.[12]

Dans notre travail, on utilise l'extraction par ultrason. Cette technique est maintenant bien connue pour avoir des effets significatifs sur la cinétique de certaines réactions chimiques ou encore sur la réduction du temps des procédés d'extraction. En effet, la cavitation induite par les ultrasons de faibles fréquences dans les milieux liquides se traduit entre autres par des accélérations de cinétique et/ou des améliorations du rendement, notamment dans le cas de l'extraction solide-liquide. [14]

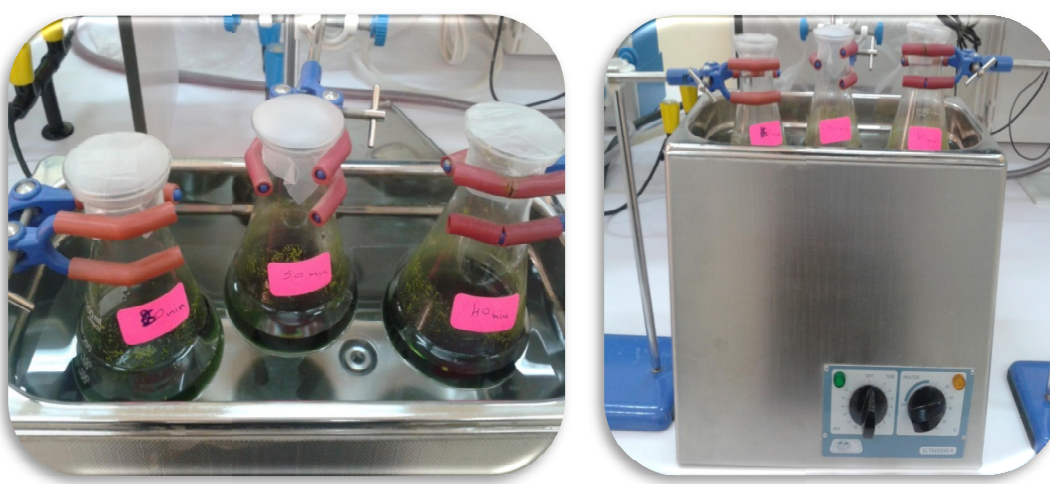


Figure (III.2) :Extraction par bain d' ultrason.

III .2.1.1.Préparation des solvants :

La détermination du pH des solvants a été effectuée à l'aide d'un pH mètre , a partir du pH=3 Jusqu'à pH= 7.

III.2.1.2.Préparation des extraits :

8g de poudre des feuilles sèche est placé dans un erlenmeyer avec 80 ml de solvant (différent pH) ,et est soumis à une extraction par ultrason à 40 °C pendant 30 minute Les macéras sont réunis puis ils sont filtrés sur un papier filtre. Les filtrats sont évaporés presque à sec au moyen d'un évaporateur rotatif muni d'une pompe à vide à une température 70°C pour éliminer le solvant. Le résidu sec obtenu ont été récupérés dans des flacons en verre hermétiquement fermé et conservé à -2°C pour protéger ses caractéristiques physicochimique .

Les résidus obtenus sont dosés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible afin de quantifier les teneurs en composés phénolique ensuite ils sont analysés par l' Infra rouge et Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et évaluer le pouvoir antioxydant des polyphénols contenus dans les différents échantillons.

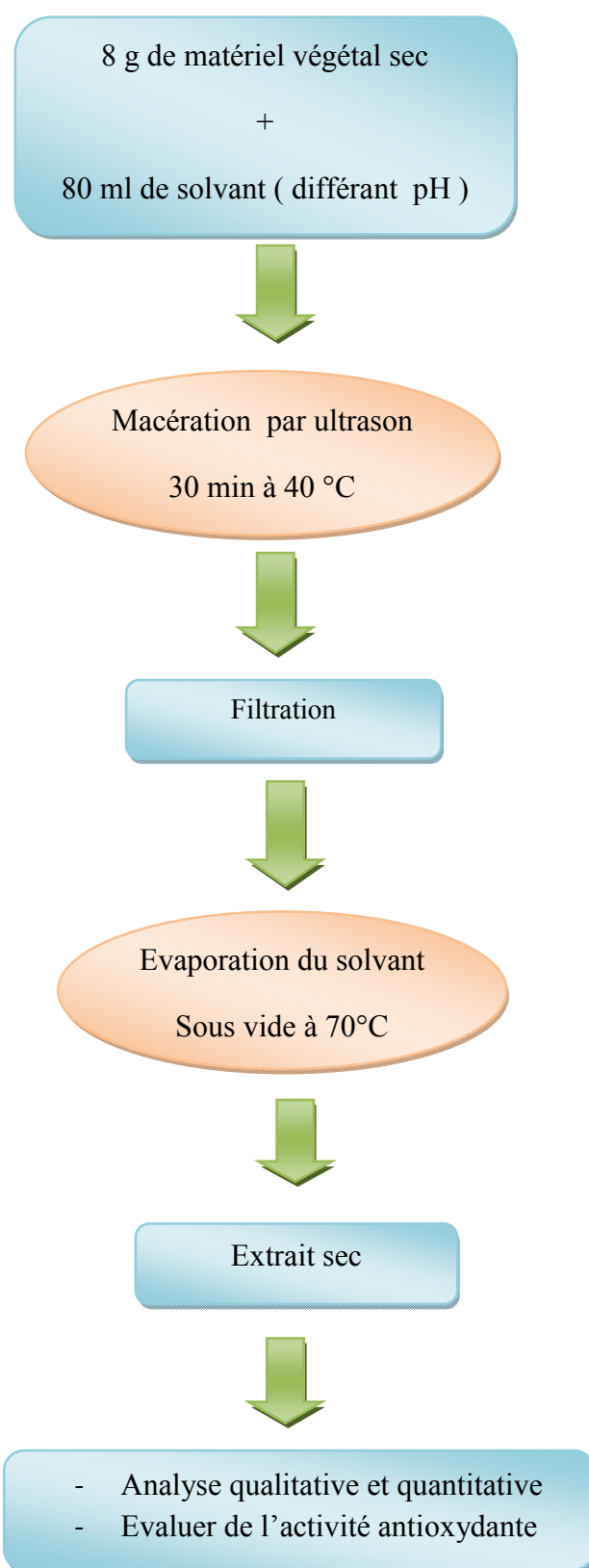


Figure (III.3) : Protocole de préparation des extraits

III.2.2. Techniques d'identification :

III.2.2.1. La spectrophotométrie UV-visible :

➤ **Définition :**

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une structure chimique donnée en solution, plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer– Lambert .

➤ **Principe :**

Le principe repose sur l'absorption de la lumière par les espèces chimiques, l'appareil comporte une source de lumière blanche, un système dispersif permettant de sélectionner la longueur d'onde de la radiation et un système détecteur permettant la mesure de l'intensité lumineuse de la radiation monochromatique traversant la solution. Le spectrophotomètre effectue une comparaison entre les intensités lumineuses incidentes et transmises et permet par l'intermédiaire d'un circuit électronique d'afficher l'absorbance $A = \epsilon \cdot l \cdot c$

Pour valider la loi de Beer-Lambert il faut travailler en lumière monochromatique, les solutions utilisées doivent être diluées, homogènes, et le soluté ne doit pas donner de réactions sous l'effet de la lumière incidente.[16]



Figure (III.4) : La spectrophotométrie UV-visible

III.2.2.2. La spectrophotométrie IR :

La spectrophotométrie infrarouge est une technique qui permet d'identifier la nature et les groupes fonctionnels des composés des liquides, des solides, des gaz, des poudres, des fibres, des films ou des surfaces. Elle s'intéresse à la caractérisation des groupements fonctionnels présents dans une molécule. L'analyse du faisceau infrarouge permet de détecter un certain nombre de bandes d'absorption qui correspondent aux modes de vibrations caractéristiques des divers groupements contenus dans les substances analysés. Le spectre infrarouge constitué par l'ensemble de ces bandes représente alors l'empreinte digitale de la molécule.[10]

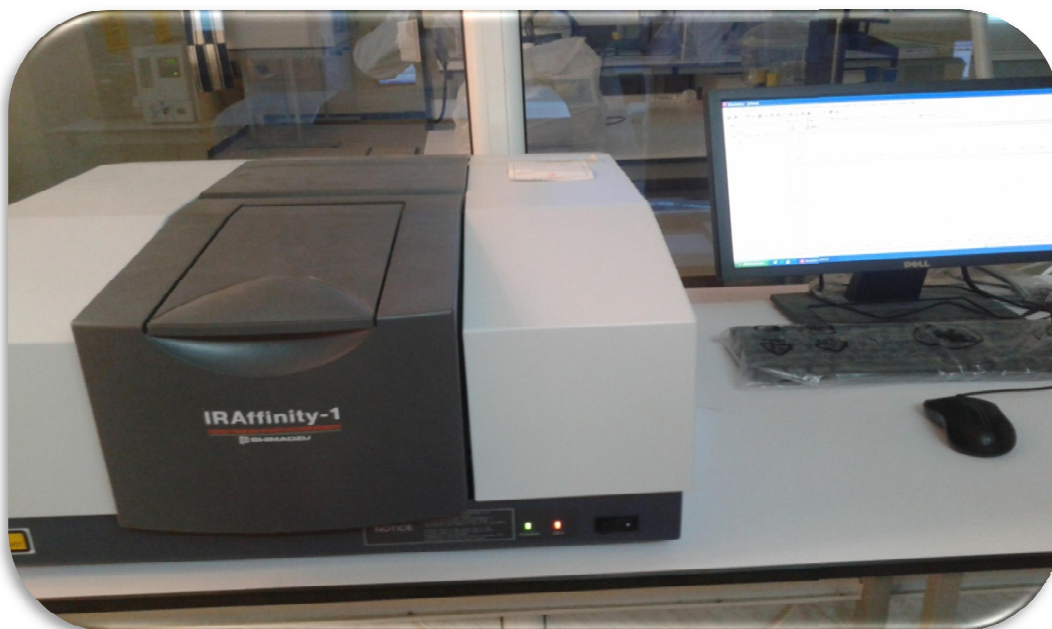


Figure (III.5) : La spectrophotométrie IR

III.2.3. Dosage des composées phénoliques :

III.2.3.1 Analyse qualitative :

a) Dosage des polyphénols totaux (PPT):

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits est réalisé par la méthode de Singleton et Ross en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.[15]

✓ Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolibdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), il est réduit par les phénols en un mélange

d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu donne un maximum d'absorption à 760 nm.[17]

✓ **Mode opératoire**

Mettre 0,2 ml de chaque extrait de dans des tubes à essais ; ajouter 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois dans l'eau distillée ; puis laisser agir 5 min avant d'ajouter 0,8ml de carbonate de sodium à 7.5%.

Après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible à 765 nm.

On effectue la même opération pour l'acide gallique à différentes concentrations.

Le blanc est représenté par le solvant utilisé additionné du Folin-Ciocalteu et de carbonate de sodium .

Toutes les mesures sont répétées 3 fois .

Les concentrations des polyphénols totaux contenus dans les extraits sont calculées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent en acide gallique/ g matière sèche .

b) Dosage des flavonoïdes totaux (FVT):

La méthode utilisée pour l'estimation des taux de flavonoïdes est celle décrite par Ordonez . [11]

✓ **Principe**

La coloration jaunâtre donnée dans cette méthode est due à la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes. [9]

✓ **Mode opératoire**

Mettre 1ml d'extrait dans un tube à essai ; Ajouter 1 ml de solution éthanolique de chlorure d'aluminium à 2 % ; laisser incuber 1h à température ambiante. Lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible à 420 nm.

On effectue la même opération pour la quercétine à différentes concentrations en introduisant 1ml de ces dernières dans une série de tubes et ajout de 1 ml d' $AlCl_3$ à 2%.

Le blanc est représenté par le solvant utilisée additonné à l' $AlCl_3$.

Les concentrations des flavonoïdes contenus dans les extraits de dattes sont calculées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine comme standard.

c) Dosage des Flavanols :

La méthode utilisée pour l'estimation de taux de flavanols est celle décrite par Kumaran et Karunakaran .[11]

✓ **Mode opératoire**

Mettre 2 ml d'extrait dans un tube à essai ; ajouter 2 ml de solution éthanoïque de chlorure d'aluminium à 2 % puis 3 ml d'acétate de sodium à 50g/l , laisser incuber 2,5 h à température ambiante. Lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible à 440 nm.

La concentration des flavanols contenus dans les extraits est calculée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la Rutine comme standard.

III.2.3.2.Analyse quantitative:

III.2.3.2.1.Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La technique de séparation la plus appréciée en analyse phytochimique est la chromatographie liquide à haute performance (pression), abrégée HPLC . [3]

✓ **Principe :**

La méthode de séparation qu'elle utilise fait appel aux mêmes éléments de base que ceux employés pour la chromatographie classique sur colonne, soit un ou plusieurs solvants et une colonne remplie avec une phase stationnaire, mais avec un appareillage plus sophistiqué. La grande différence par rapport à la chromatographie classique réside dans la durée d'élution. Cette vitesse est obtenue par l'application d'une pression élevée grâce à une pompe qui maintient constant le débit de l'éluent, elle se distingue également de la chromatographie classique par l'utilisation d'un détecteur dont le message est enregistré puis exploité par un détecteur relié au système .[3]

✓ **Mode opératoire :**

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe **HPLC-RP-C18**, équipé d'éléments suivants :

- **Colonne** (d'une longueur de 125 mm et d'un diamètre interne de 4,6 mm) contenant la phase stationnaire apolaire (phase inverse), cette dernière est constituée de silice modifié chimiquement par greffage de résidus (C-18), ces colonnes en phase inverse permettent la séparation des composés polaires, solubles dans l'eau ou dans les mélanges hydro-alcooliques

elle contient la phase stationnaire qui définit le type de chromatographie, soit en phase normale soit en phase inverse et l'éluant utilisé est constitué

- **Système de pompage, Pompe:** LC 20AL, LC20AL, pour déplacer la phase mobile à haute pression (plusieurs dizaines de bars) ;
- **Injecteur** : c'est une vanne d'injection qui porte une boucle d'échantillonnage portant Volume d'injection: 20 μ l ;
- **Détecteur** : un détecteur monochrome: UV SPD-20A;
- **Four:** CTO 20A ; [8]

Les conditions opératoires sont les suivantes:

- Débit: 1 ml/min ;
- Volume d'injection: 20 μ l ;
- Longueur d'onde: 300 nm ;
- Temps d'analyse : 50 min ;
- Concentration des échantillons : 10 mg /ml ;

Phase mobile est composée d'un mélange de deux compositions constante (H_2O acide acétique (0.2%) , acétonitrile).

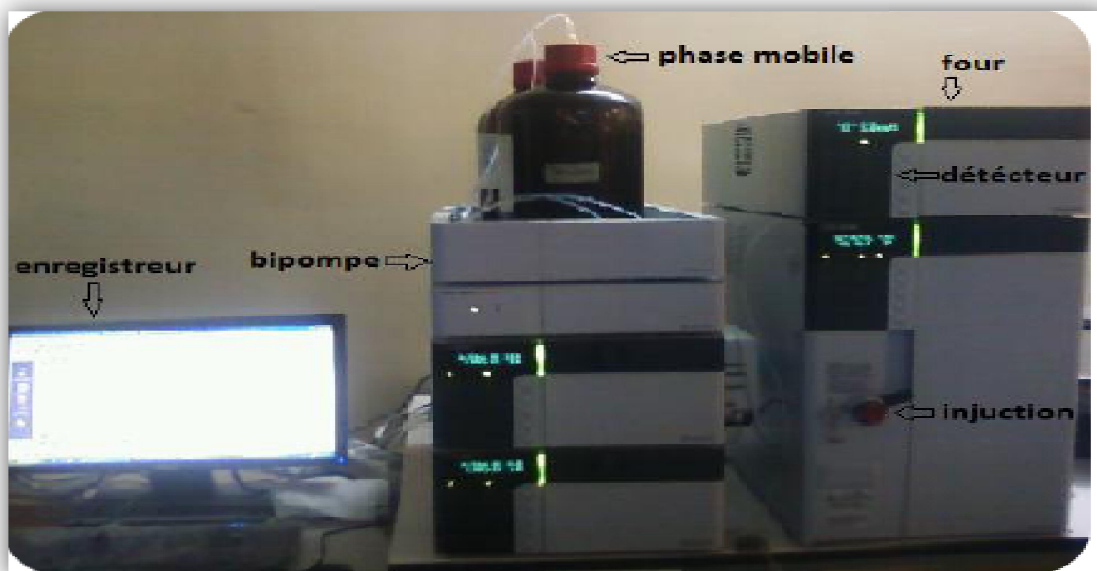


Figure (III.6) : Chromatographie en phase liquide à haute performance.[6]

III.2.4.Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydant des extraits du *Matricaria pubesens* traduit leur aptitude à piéger les radicaux libres de l'organisme . deux méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydant des extraits : ce sont capacité antioxydante totale (CAT), le piégeage du radical libre DPPH.

III.2.4.1. Activité antioxydante totale (CAT) :

La capacité antioxydante totale (CAT) des extraits est évaluée par la méthode de phosphomolybdène . Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdène Mo (V) MoO_2^+ en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) à pH acide.[2]

✓ Mode opératoire

Un volume de 0.1 ml de chaque extrait est mélangé avec 1 ml de solution du réactif (0.6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium). Les tubes sont vissés et incubés à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 1 ml de la solution du réactif et 0.1 ml du solvant utilise et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon. La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalents d'acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg EAA/ g MS). [1]

III.4.2.2.Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) :

Le DPPH[•](1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH[•] est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (Figure (III.7)). [7]

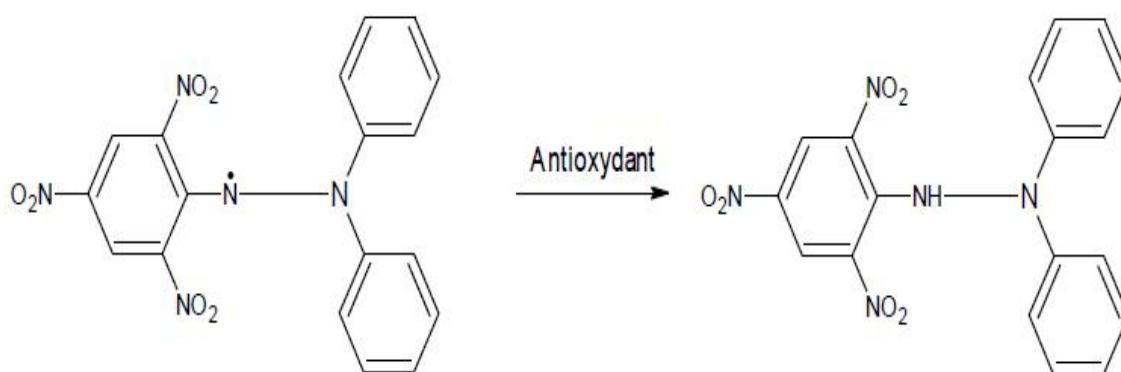


Figure (III.7) : Réduction du radical libre DPPH . [4]

✓ Mode opératoire

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par Brand-Williams, Cuvelier et Berset . [13]

Une solution méthanolique de 0,1 mM de DPPH est mélangée avec différentes concentrations des extraits, mettre 1ml de chaque dilution de ces extraits dans un tube à essai, ajouter 2ml de solution méthanolique de DPPH, puis laisser incuber 15 min à l'abri de la lumière à température ambiante. Lire l'absorbance à 515 nm contre un blanc qui contient de méthanol pur. Le contrôle est la solution DPPH avec le solvant .

L'évaluation de l'activité anti-oxydante en utilisant la méthode DPPH est exprimée en pourcentage selon la relation suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(Abs_{Control} - Abs_{Extrait})}{Abs_{Control}} \times 100$$

Avec :

Abs_{Control} : absorbance du control (ne contenant aucun antioxydant).

Abs_{Extrait} : absorbance des extraits.

Le pourcentage d'inhibition est exprimé ensuite par la valeur de la IC₅₀, sachant que l'IC₅₀ est la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH .[5]

Références bibliographiques

- [1] Amin Ardestani, Razieh Yazdanparast ,(2007) "Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on in vitro protein glycoxidation". Food and Chemical Toxicology 45 2402–2411.
- [2] Belyagoubi Née Benhammou Nabila,(2012)" Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien". Thèse Doctorat, Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen
- [3] Braithwaite A, Smith F. J, (1999) "Chromatographic Methods". 5^{ème} Ed Kluwer Academic Publishers. London. 548 p.
- [4] Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C, (1995) "Use of free radical method to evaluate antioxidant activity". Lebensm Wiss. Technol. **28** : 25-30.
- [5] Harrar Abd El Nacer , (2012) "Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L." Thèse de magister ,Universite Ferhat Abbas-Setif .
- [6] Hemmami Hadia , Guezei Nadia, (2013), "Évaluation de l'activité antioxydante d'extraits de *Capsicum annuum* L de la région d'el-oued". Mémoire de Master , Universite d'EL-Oued
- [7] Kanoun Khadidja, (2011), "Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine)" . Mémoire de magister , Universite Aboubekr Belkaid Tlemcen.
- [8] Kuntie V., Pejje N., Ivkovie B., Vugie Z., Ilie K., Miele S., Vukojevie V. (2007) "Isocratic R-P-HPLC method for rutin determination in solid oral dosage forms." Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. **43** : 718-721.
- [9] Lagnika . L, (2005), "Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises." Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur. Strasbourg, 249 p.

[10] Mahdjar Salha, (2013) "Contribution à l'Etude de la composition chimique de la plante *Matricaria pubescens* et à l'évaluation de son activité antioxydante." Mémoire de Master Academique, Université Kasdi Merbah Ouargla .

[11] Mbaebie .BO, Edeoga. HO, Afolayan. AJ,(2012) "Phytochemical analysis and antioxidants activities of aqueous stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq". Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 118-124.

[12] Petko Ivanov PENCHEV, (2010) "Etude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions " thèse en vue de l'obtention du doctorat de l'université de Toulouse.

[13] Selma Dziri, Imed Hassen, Saloua Fatnassi, Yassine Mrabet, Herve Casabianca, Belgacem Hanchi, Karim Hosni , (2012) "Phenolic constituents, antioxidant and antimicrobial activities of rosy garlic (*Allium roseum* var. *odoratissimum*)" . Journal of Functional Food.

[14] Veillet S, Tomao V, (2009), "Ultrasound Assisted Extraction of aromas and antioxidants in F. Chemat (Ed) Essential oil and aromas green extractions and applications." Handbook New Delhi Inde.

[15] Yogita Chavan, Rekha S. Singhal , (2013)" Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactives from arecanut (*Areca catechu* L.) and optimization study using response surface methodology." Innovative Food Science and Emerging Technologies 17 106-113.

[16] Zeghad .N (2009),"Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne", Mémoire magister, Université Constantine.

[17] بوقواده م. ، (2008) « دراسة فيتوكيميائية لليبيدات والفينولات في بعض أنواع نوى التمر المحلي » ، مذكرة ماجستير ، جامعة قاصدي مرباح ورقلة.

Chapitre IV

Résultats et discussion

IV. Résultats et discussion :

IV.1. Rendement d'extraction des composés phénoliques :

Les extractions des différents composés phénoliques les plus abondant dans notre plante nous a permis de calculer le rendement de chaque extrait notamment les extraits bruts aqueux (différents pH), selon la règle générale [4] :

$$R(\%) = \frac{\text{Masse de residu extrait}}{\text{Masse initial de végétale}} \times 100$$

Le rendement qui a été déterminé par rapport à 08g de matériel végétal sec et broyé est exprimé en pourcentage. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau (IV.1):

Tableau (IV .1): Les rendements des extraits bruts .

Solvant	Rendement (%)
pH = 3	33.175
pH = 4	24.595
pH = 5	27.645
pH = 6	20.763
pH = 7	8.412

Les résultats obtenus pour les extraits bruts, montrent que l'extrait brut à pH = 3 enregistre un fort rendement de l'ordre de 33.175 % suivi par l'extrait à pH = 5 à raison de 27 .645% ,et de l'extrait à pH = 4 (24 .595%) . D'autres rendements plus au moins considérables ont été observés dans l'extraits à pH = 6 (20 .763%) et l'extrait à pH = 7 représente de teneur assez faible (8 .412%).

IV.2.Etude phytochimique :

IV.2.1. Dosage des composés phénoliques par la méthode colorimétrique :

L'étude quantitative des extraits bruts, préparés à partir des feuilles de *Matricaria pubesens*, au moyen des dosages spectrophotométriques avaient pour objectif la détermination de la teneur des composés phénoliques . La raison principale pour le choix de ces substances liées avec des effets pharmacologiques des plantes . Les droites d'étalonnages ont été tracées pour cette objectif qui sont réalisées avec des solutions d'étalons à différentes concentrations.[7]

Les quantités des composés phénoliques ont été rapportées en milligramme d'équivalents de l'étalon utilisé par gramme d'extrait et déterminés par l'équation de type :

$$y = ax + b$$

Avec :

y : la valeur d'adsorbance .

x : la concentration d'étalon en mg/ml .

IV.2.1.1.Dosage de polyphénols totaux :

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrique adaptée de Singleton et Ross avec le réactif de Folin-Ciocalteu. La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations, la courbe montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations (Fig IV.1).

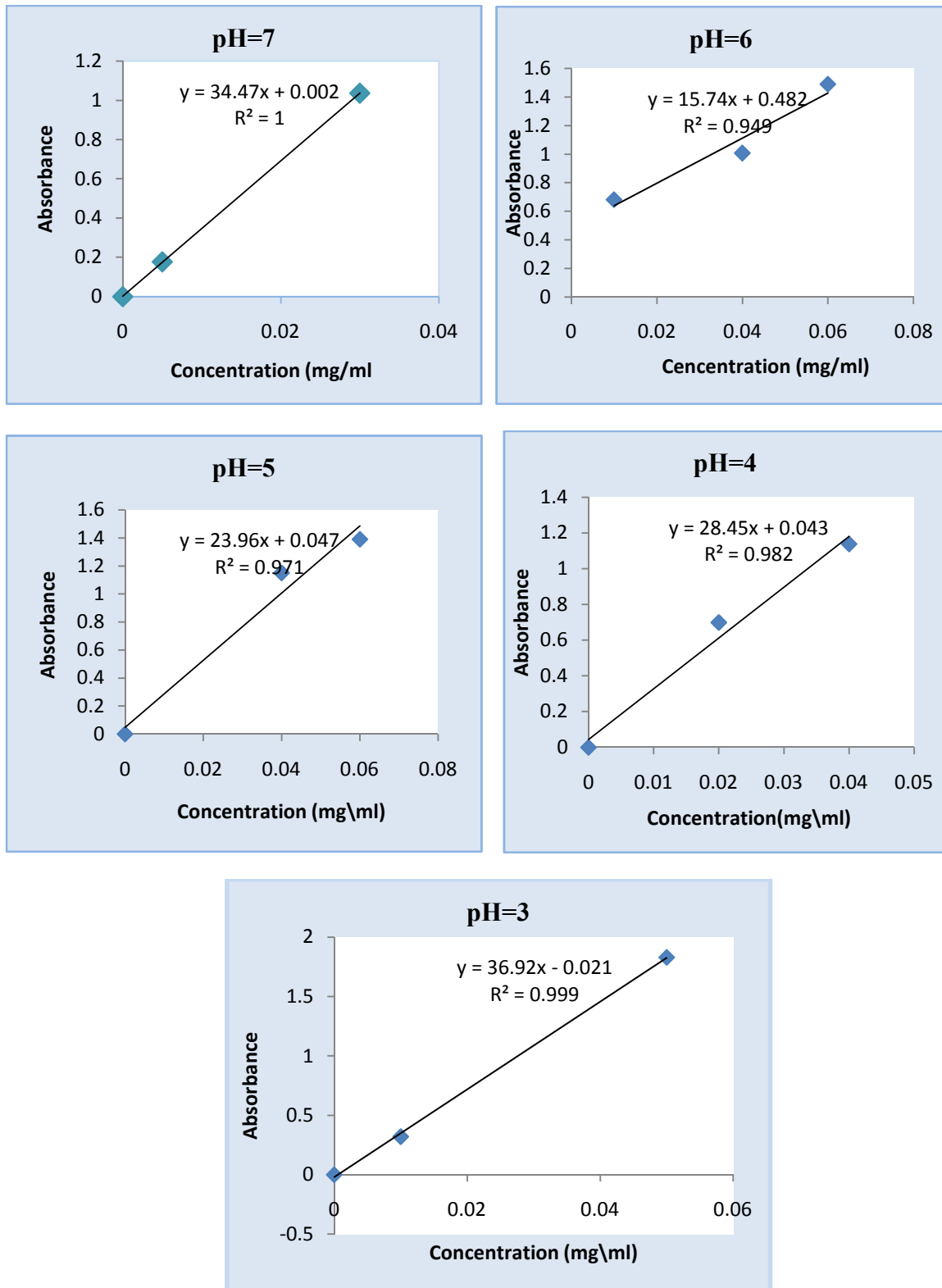


Figure (IV.1) : Courbes d'étalonnages de l'acide gallique pour dosage des polyphénols totaux à différents pH .

Le tableau (IV.2) résume les résultats obtenus des teneurs en polyphénols totaux des extraits bruts des plantes.

Tableau (IV.2) : Teneurs des polyphénols totaux des extraits.

Le solvant	Equation	Teneur en polyphenols totaux (mgGAE/g MS)
pH= 3	$Y = 36.92x - 0.021$	3.818 ± 0.077
pH= 4	$Y = 28.45x + 0.043$	5.507 ± 0.279
pH= 5	$Y = 23.96x + 0.047$	9.759 ± 1.267
pH= 6	$Y = 15.74x + 0.482$	6.702 ± 0.054
pH= 7	$Y = 34.47x + 0.002$	6.942 ± 0.364

D'après ces résultats, nous avons remarqué une variabilité des teneurs en phénols totaux. La teneur la plus élevée est enregistré dans l'extrait de pH =5, elle est de l'ordre de 9.759 ± 1.267 mg GAE/g MS suivi par les l'extrait de pH =7 avec une teneur 6.942 ± 0.364 mgGAE/gMS et l'extrait de pH =6 avec une teneur 6.702 ± 0.054 mgGAE/gMS, puis l'extrait de pH =4 avec une teneur de 5.507 ± 0.279 mgGAE/gMS, l'extrait de pH = 3 est représenté la teneur la plus faible environ 3.818 ± 0.077 mgGAE/gMS.

Concernant le recouvrement des polyphénols, le pH peut agir selon des mécanismes différents et de jouer un rôle significatif dans la performance d'extraction, dans notre étude les meilleures conditions pour l'extraction des polyphénols totaux étaient dans les milieux acides faibles et une diminution a été observée lorsque la valeur du pH du solvant est inférieure à 5.

Ces résultats peut être explique par l'augmentation de la stabilité de polyphénol, l'augmentation de la dissolution du composé phénolique, et l'augmentation de la désintégration des parois des cellules, la facilite de leur solubilité, et leur diffusion à partir de la matière végétale. [5]

IV.2.1.2.Dosage de flavonoïdes totaux :

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) et l'étalon été la quercétine. La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g de MS).

Les taux des flavonoïdes des extraits ont été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage de quercétine (Fig IV.2).

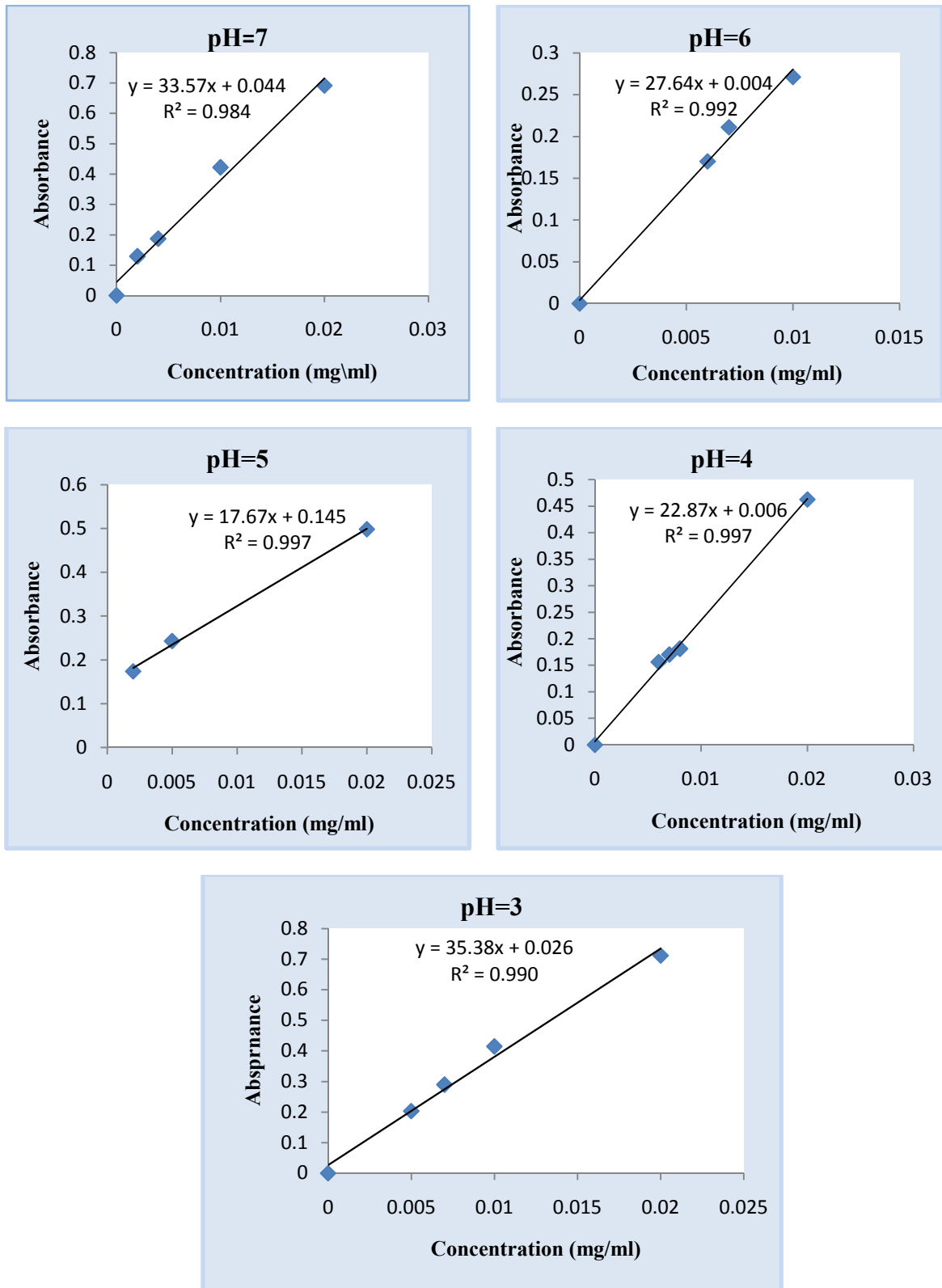


Figure (IV.2) : Courbes d'étalonnages de quercetine pour dosage des flavanoides à différents pH.

Les teneurs des différents extraits en flavonoïdes sont représentées dans le tableau (IV.3).

Tableau (IV.3) : Teneurs des flavanoides totaux des extraits.

Le solvant	Equation	Teneur en flavonoïdes totaux (mg EQ/gMS)
pH= 3	$Y = 35.38x + 0.021$	2.505 ± 0.016
pH= 4	$Y = 22.87x + 0.006$	2.164 ± 0.031
pH= 5	$Y = 17.67x + 0.145$	3.964 ± 0.012
pH= 6	$Y = 27.64x + 0.004$	6.365 ± 0.004
pH= 7	$Y = 33.57x + 0.044$	4.885 ± 0.012

Les résultats illustré dans le tableau (IV.3) montre que l'extrait à pH= 6 contient 6.365 ± 0.004 mg EQ/g suivi par l'extrait de pH= 7 avec 4.885 ± 0.012 mg EQ/g ,et l'extrait de pH=5 avec 3.964 ± 0.012 mg EQ/g. nous avons observé des teneurs rapprochées en flavonoïdes d'extrait de pH= 4 et l'extrait de pH= 3, ils représentent des valeurs de 2.164 ± 0.031 et 2.505 ± 0.016 mg EQ/g respectivement.

IV.2.1.3.Dosage de flavanols :

La Rutine a été utilisée comme étalon à différentes concentrations, la teneur en flavanols est exprimée en milligramme d'équivalent de Rutine par gramme d'extrait (mg ER/g d'extrait). Le taux des flavanols des extraits ont été obtenus à partir d'une courbe d'étalonnage de Rutine (Fig IV.3).

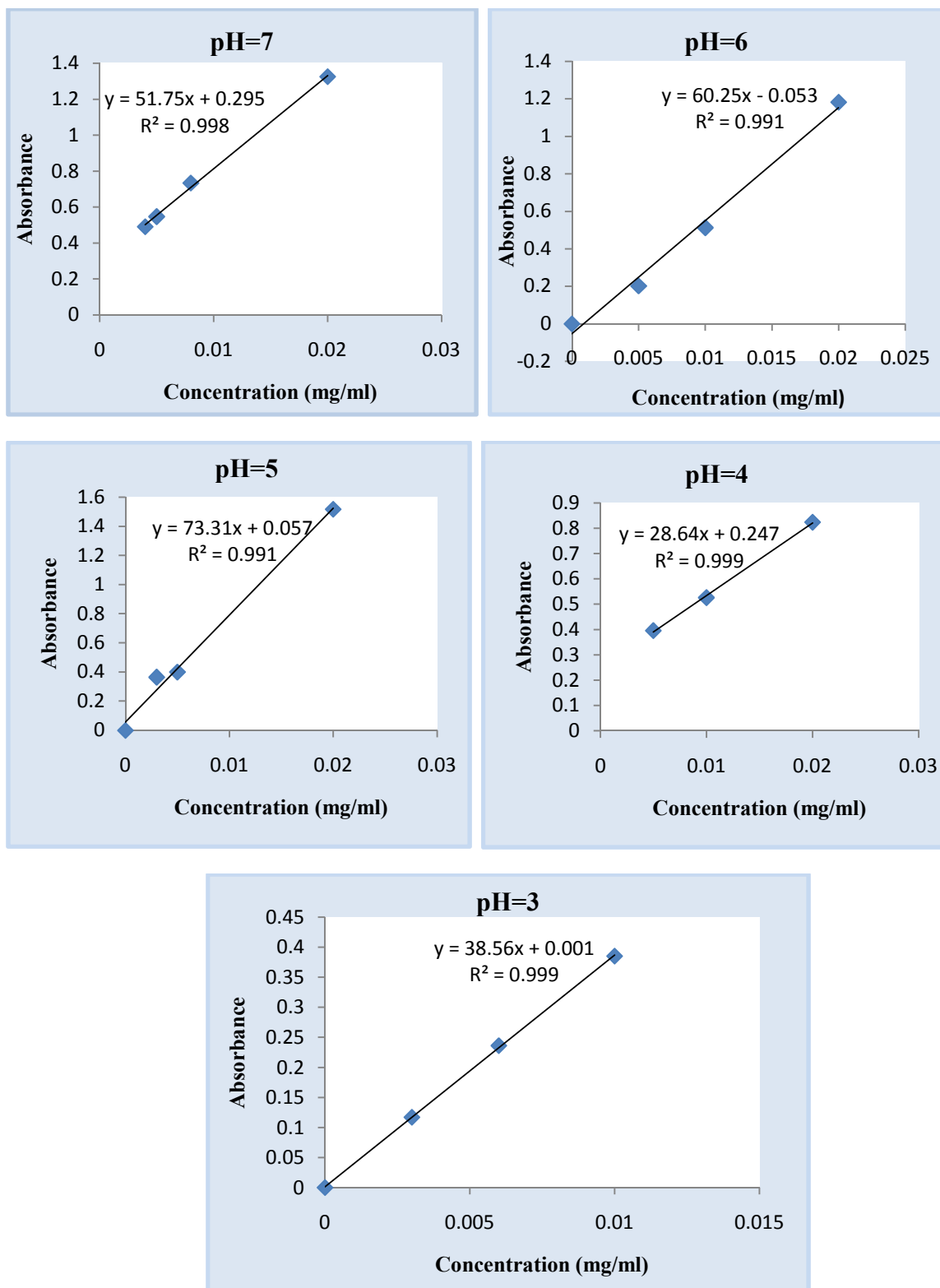


Figure (IV.3) : Courbes d'étalonnages de Rutine pour dosage des flavanols à différents pH.

Le tableau(IV.4) renferme les teneurs des flavonols des différents extraits .

Tableau (IV.4) : Teneurs des flavanols des extraits .

Le solvant	Equation	Teneur en flavonols (mg ER/gMs)
pH= 3	$Y = 38.56x + 0.001$	1.545 ± 0.002
pH= 4	$Y = 28.64x + 0.247$	0.701 ± 0.014
pH= 5	$Y = 73.31x + 0.057$	0.618 ± 0.0001
pH= 6	$Y = 60.25x - 0.053$	0.810 ± 0.006
pH= 7	$Y = 51.75x + 0.295$	0.647 ± 0.001

D'après les résultats on a observé des teneurs prochées en flavanols pour les extraits de pH=7, pH=6, pH=5 et pH=4, elles représentent une valeur de 0.647 ± 0.001 , 0.810 ± 0.006 , 0.618 ± 0.0001 et 0.701 ± 0.014 mg ER /g MS respectivement, tandis que l'extrait de pH= 3 représente la teneur la plus élevée avec 1.545 ± 0.002 mg ER /g MS .

IV.2.2.Comparaison des composés phénoliques des différents extraits :

La figure(IV.4) représente la comparaison des composition en composés phénoliques des différents extraits .

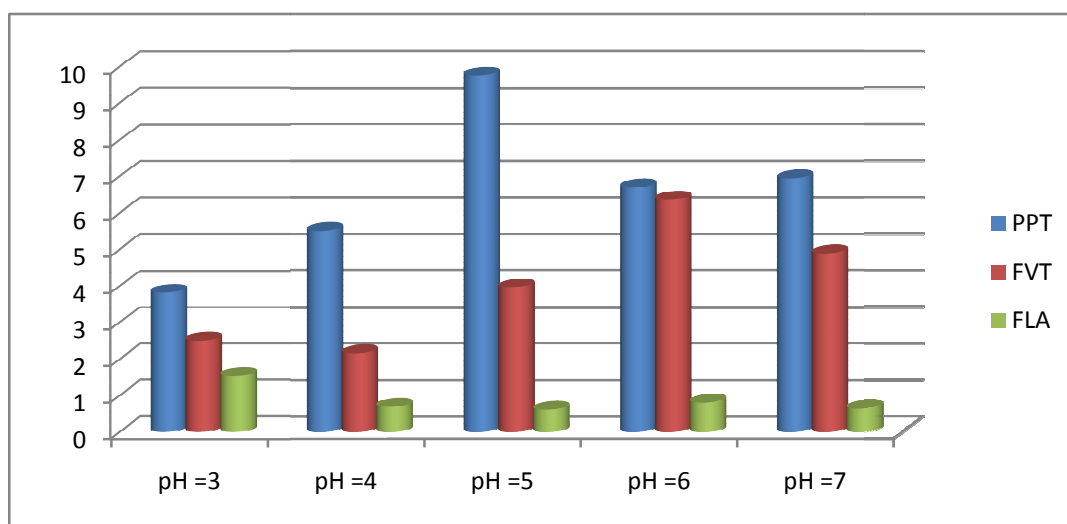


Figure (IV.4) : Comparaison des composés phénoliques des différents extraits.

PPT: polyphénols totaux ; FVT: flavonoïdes totaux ; FLA: Flavanols.

Les résultats des analyses quantitatives par spectrophotomètre UV-visible des extraits montrent que les rendements d'extraction des polyphénols totaux ,des flavanoides et des flavanols sont variable à chaque extraits. En comparant les teneurs des ces composition que les taux élevés enregistrés dans les milieux acides faibles , c'est pour simple raison de la bonne solubilités dans ces milieux .[2]

IV.3.Analyses structurales

IV.3.1. Analyse par la spectrophotométrie FT-IR

le spectre FTIR a été utilisé pour identifier les groupes fonctionnel des extraits et compose phénoliques sur la base de la valeur de crête dans la région du rayonnement infrarouge .Le spectre FTIR ($4000\text{-}500\text{cm}^{-1}$) de différent d'extrait ont été enregistrés et l'onde spécifique et les intensités ont été examinés . [6]

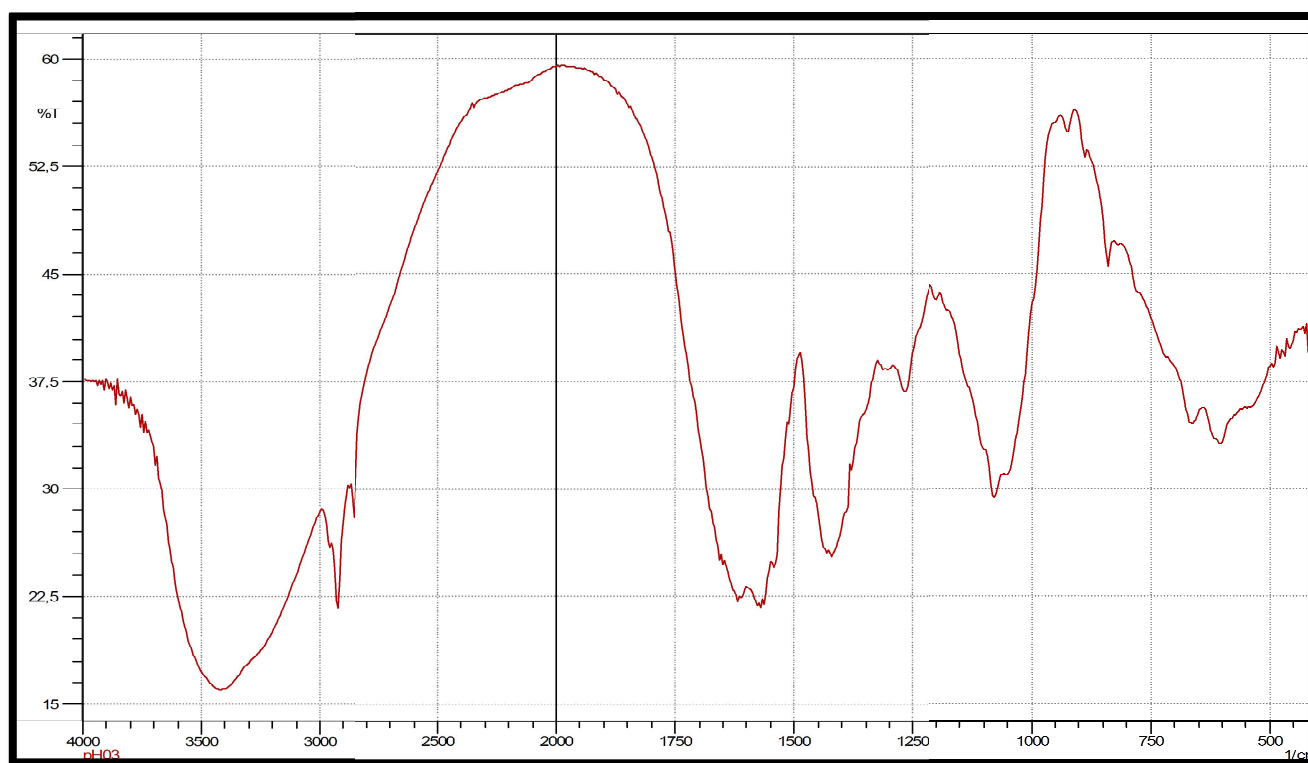


Figure (IV.5) : le spectre de FT-IR d'extrait de pH=3.

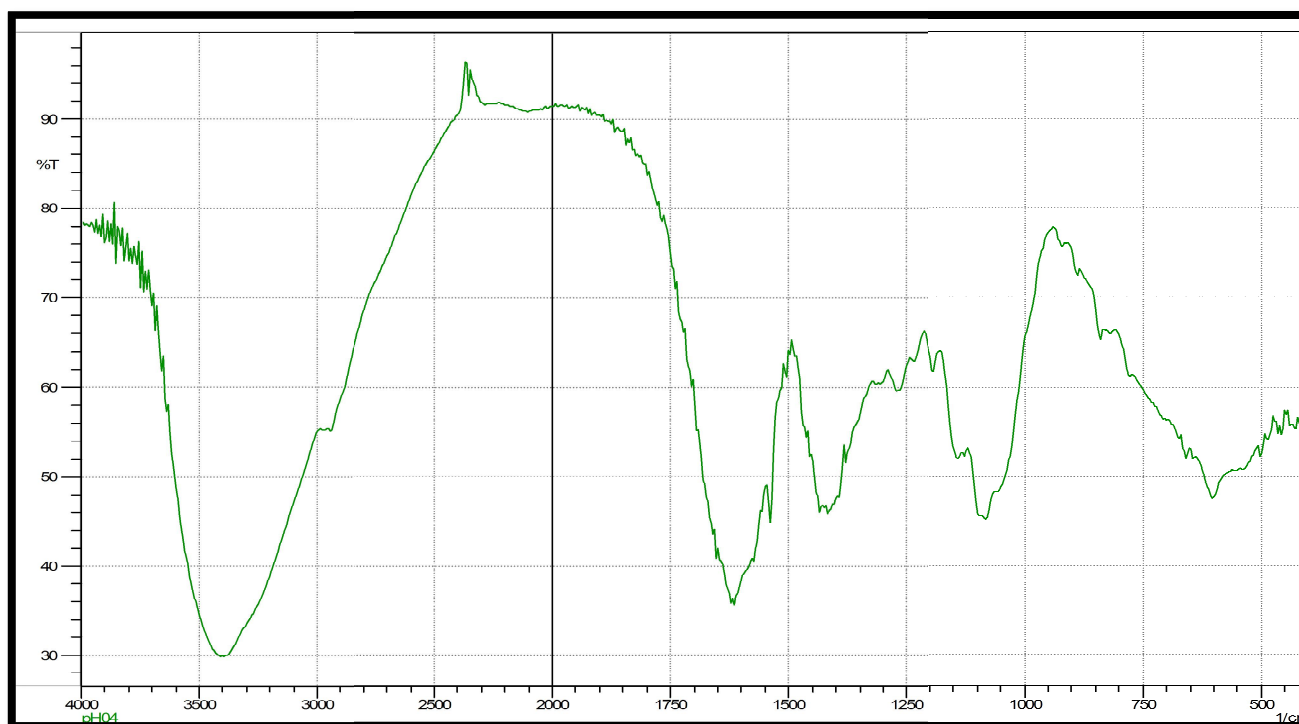


Figure (IV.6) : le spectre de FT-IR d'extrait de pH=4.

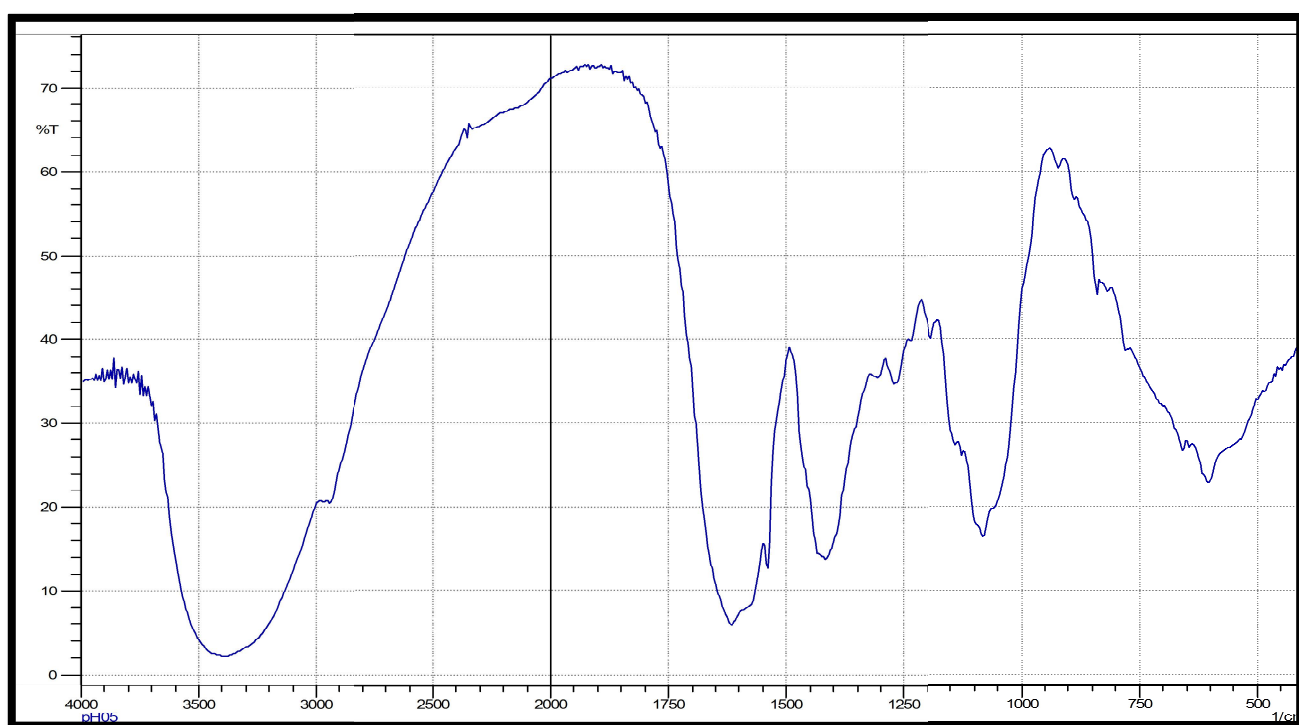


Figure (IV.7) : le spectre de FT-IR d'extrait de pH=5.

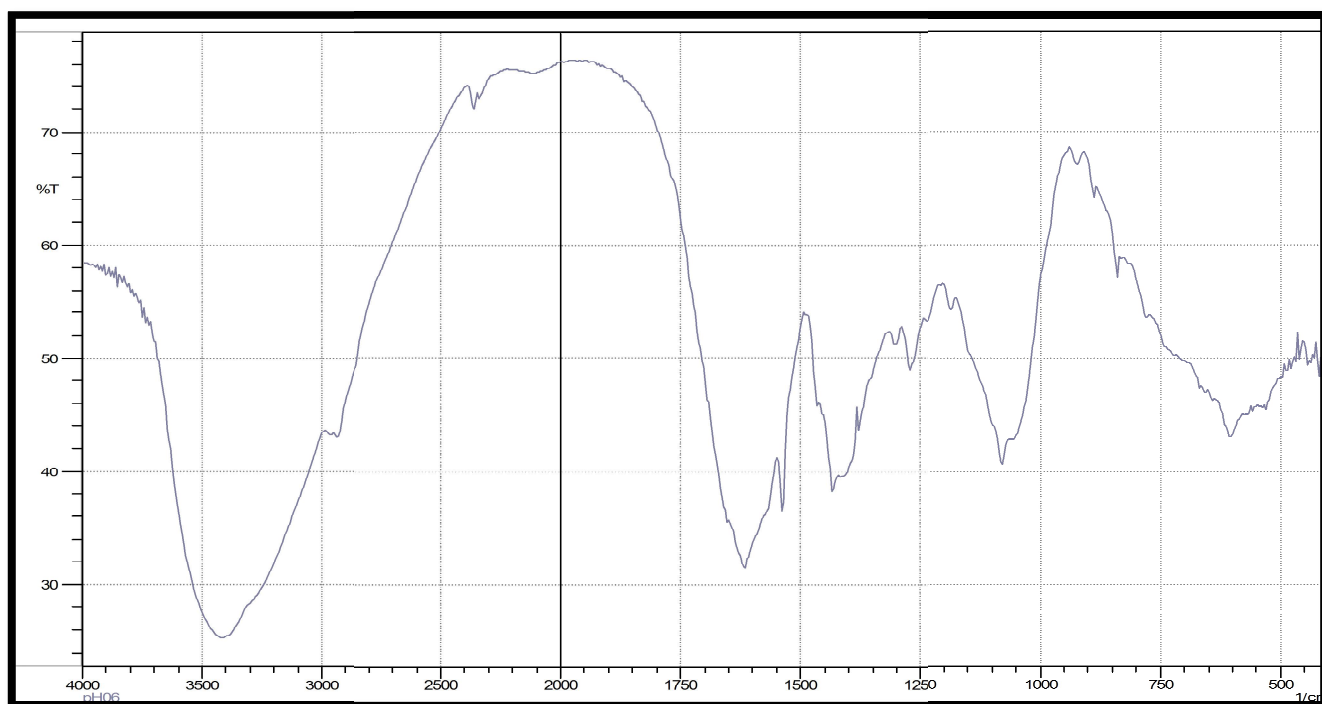


Figure (IV.8) : le spectre de FT-IR d'extract de pH=6.

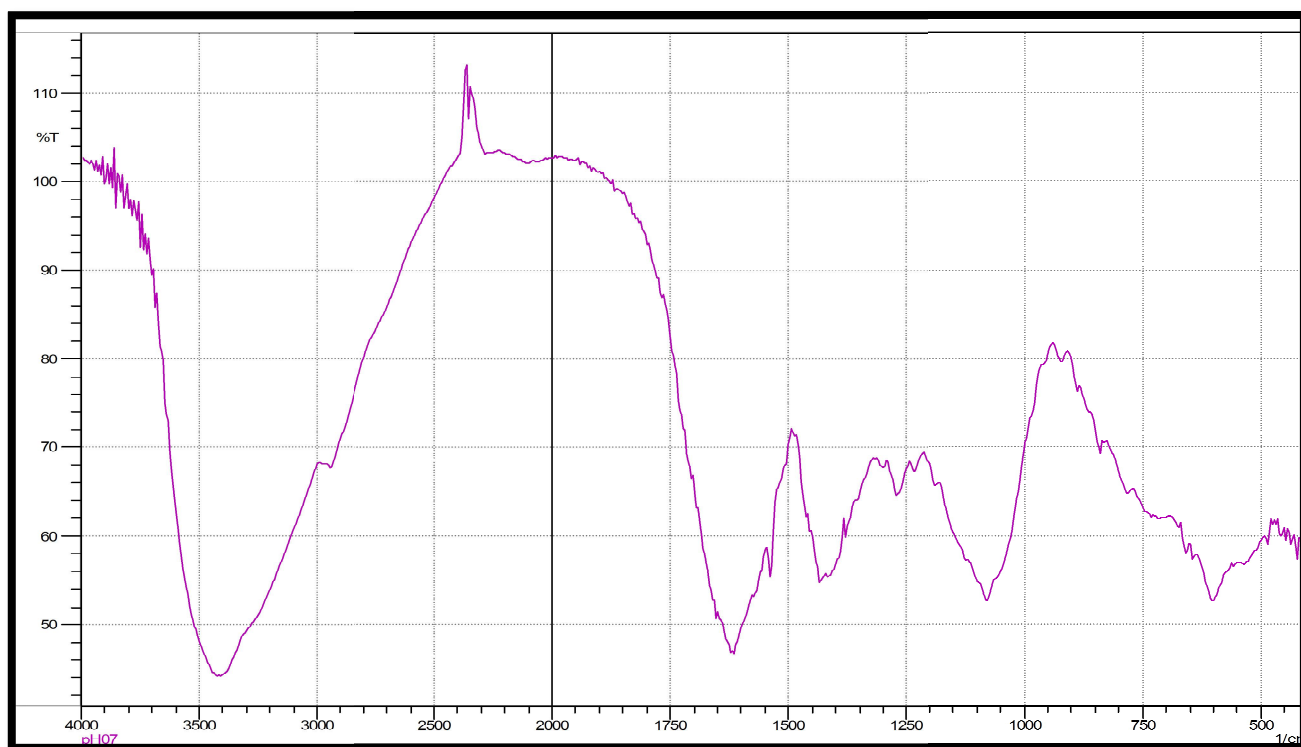


Figure (IV.9) : le spectre de FT-IR d'extract de pH=7.

Discussion des résultats de l'analyse par FT-IR :

- les groupements OH libres (de carboxyle ou phénol) sont responsables d'une bande d'absorption aux environs de $3400-3500\text{ cm}^{-1}$.

Cela nous laisse conclure que cette fonction est présente environ 3450cm^{-1} dans le différents spectre ,cette bande est intense et très large.

- une bande d'absorption due aux groupements CH_3 (aliphatiques et aromatiques) , se trouve entre 2800 et 2960 cm^{-1} . cette fonction apparait environ 2900 cm^{-1} dans le spectre du $\text{pH}=3$.
- une bande les doubles liaisons aromatiques ($\text{C}=\text{C}$) ont une absorption entre 1500 et 1640 cm^{-1} . Nous obtenons cette fonction aux environs de 1600 cm^{-1} dans les différents spectre .
- les groupements OH phénoliques ont une absorption importante aux environs de $1300-1400\text{ cm}^{-1}$, avec éventuellement une absorption secondaire à 1250cm^{-1} .
- une bande d'absorption due aux groupements C-O (Alcool secondaire) , se trouve entre 1000 et 1100 cm^{-1} .
- Une bande liaisons aromatiques (C-H) ont une absorption entre 900 et 600 cm^{-1} Nous obtenons cette fonction aux environs de 600 cm^{-1} dans les différents spectre.

IV.4.Technique d'analyse chromatographique HPLC :

Les différents extraits ont été analysés afin de comparer leurs profils chromatographiques et d'obtenir une information sur la composition de ces extraits en polyphénols et compares avec les différents standards.

IV.4.1.Chromatogrammes des étalons :

Six composés phénoliques standards (Acide ascorbique ,acide gallique, acide chlorogénique , acide caféique, rutine, ont été utilisés dans l'analyse HPLC comme étalons).

La quantité des ces composés a été rapportée en microgramme par un milligramme de la matière végétale équivalente en solution standard. Leurs chromatogrammes sont représentés dans la figure (IV.10)

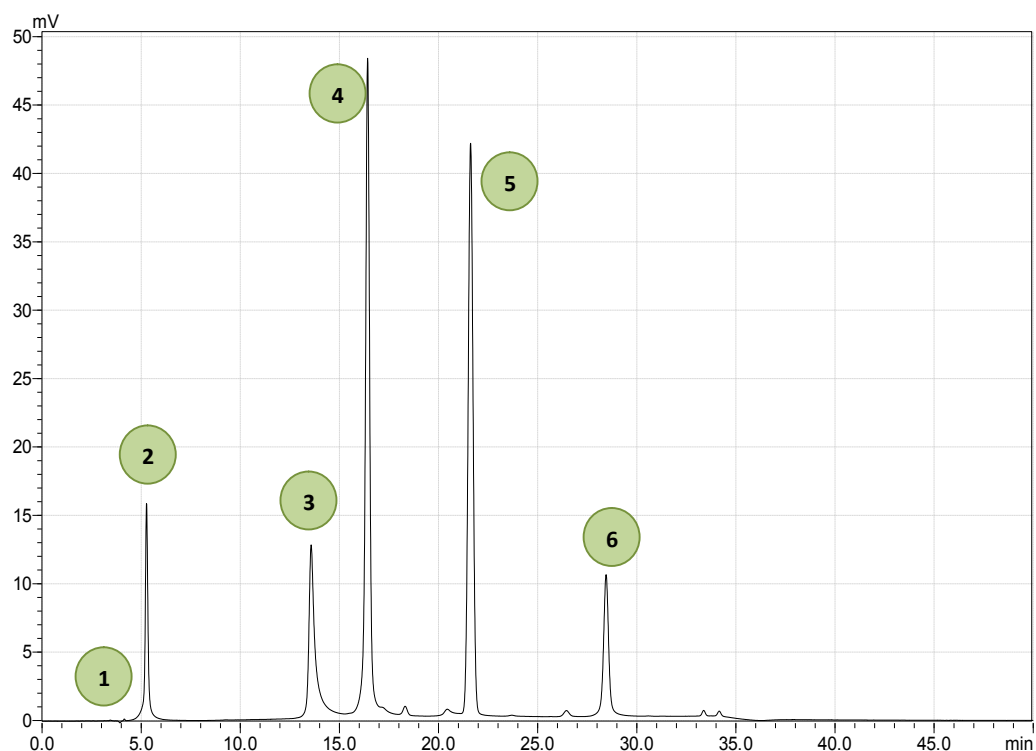


Figure (IV.10) : Profil du chromatogramme du mélange des étalons

1 : Acide Ascorbique ; 2 : Acide Gallique ; 3: Acide chlorogénique ; 4 : Acide caféique;
5 : vanilline ; 6 : Rutine.

IV.4.2. Les courbes d'étalonnages des polyphénols standards :

✓ *Acide ascorbique*

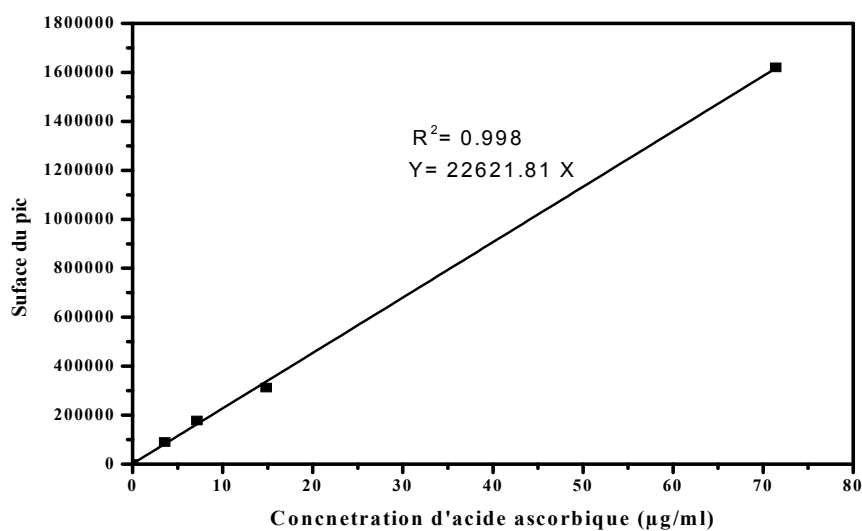


Figure (IV.11) : Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique

✓ *Acide gallique*

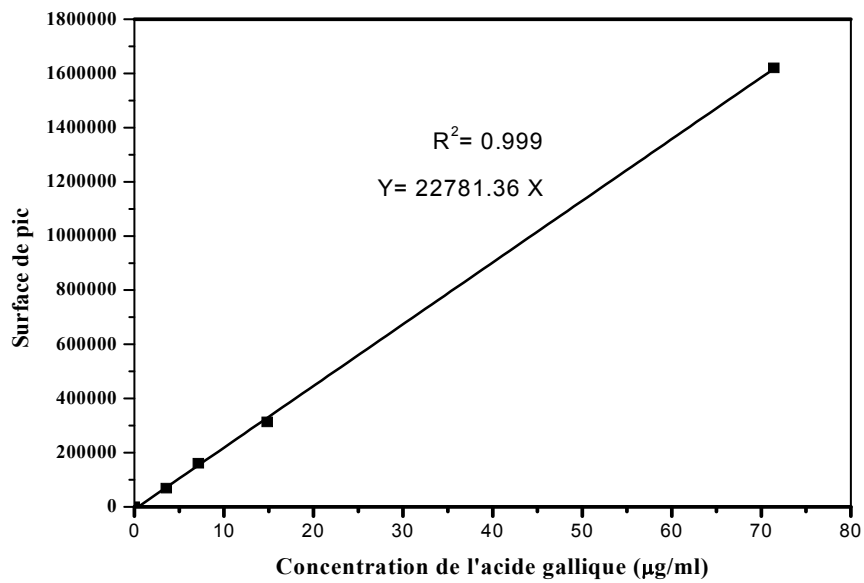


Figure (IV.12) : Courbe d'étalonnage d'acide gallique

✓ *Acide chlorogénique*

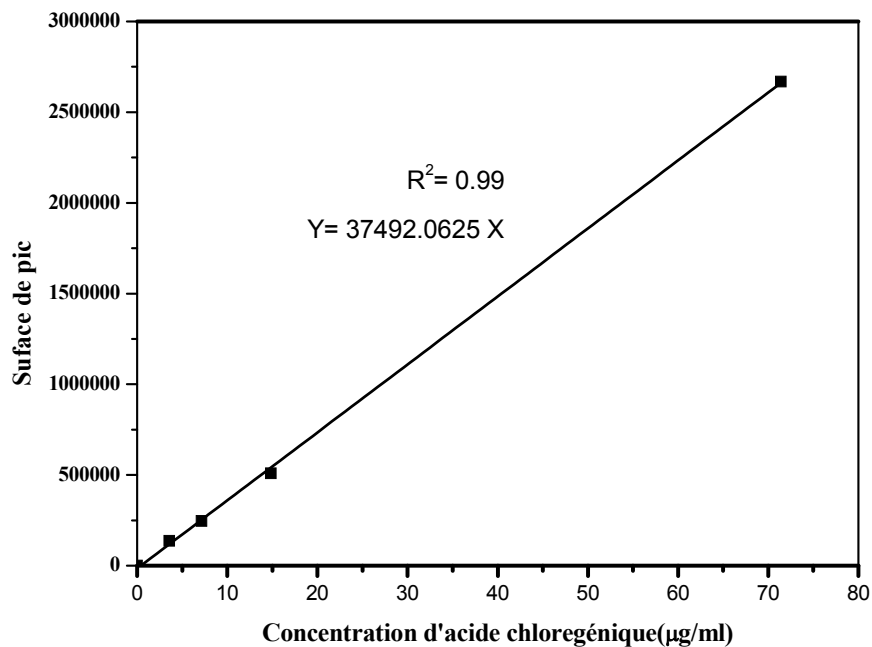


Figure (IV.13) : Courbe d'étalonnage d'acide chlorogénique

✓ *Acide cafeique*

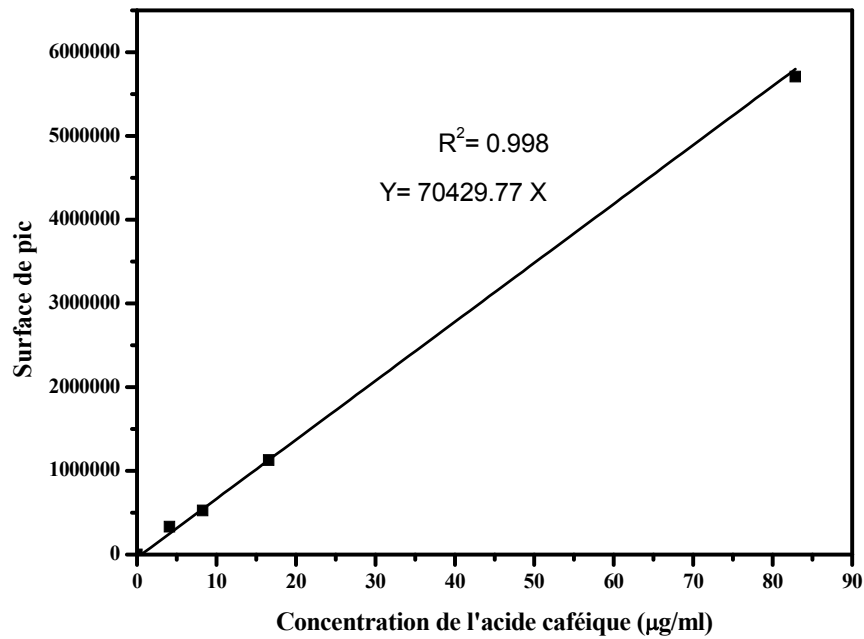


Figure (IV.14) : Courbe d'étalonnage d'acide caféique

✓ *vanilline*

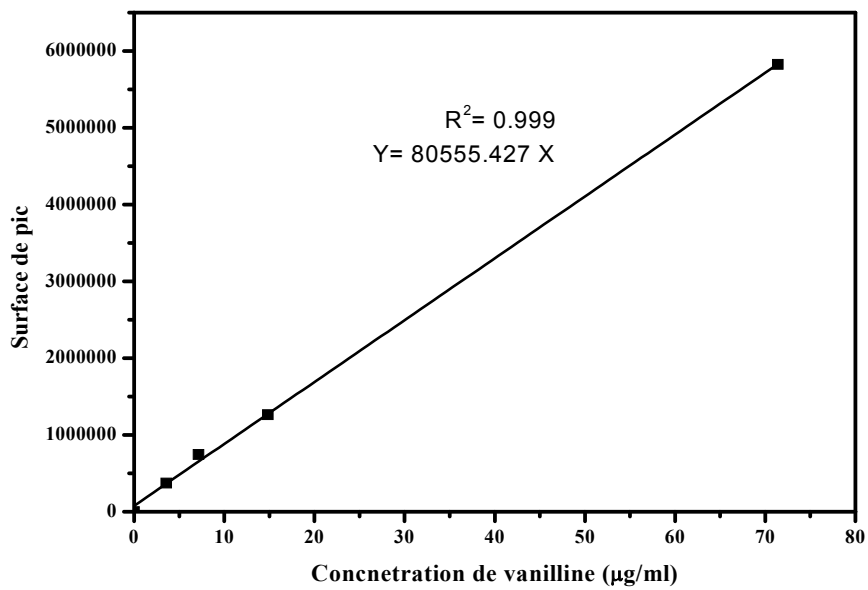
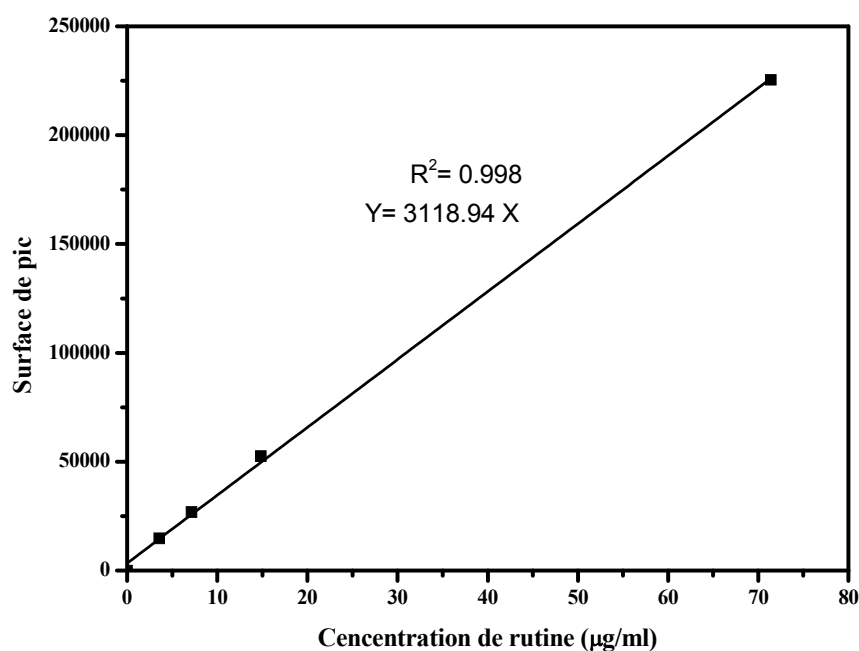


Figure (IV.15) : Courbe d'étalonnage de vanilline

✓ *Rutine**Figure (IV.16) : Courbe d'étalonnage de rutine*

Le temps de rétention des standards enregistré dans le tableau(IV.5)

Tableau (IV.5) : Le temps de rétention, coefficient de corrélation et l'équation des courbes d'étalonnage des étalons

composés	Temps de rétention (min)	Equation de courbe d'étalonnage	coefficient de corrélation
Acide ascorbique	4.35	$y = 22621.81x$	$R^2 = 0.998$
Acide gallique	5.61	$y = 22781.36x$	$R^2 = 0.998$
Acide chlorogénique	13.49	$y = 37492.06x$	$R^2 = 0.999$
Acide caféique	16.54	$y = 70429.77x$	$R^2 = 0.998$
Vanilline	21.46	$y = 80555.42x$	$R^2 = 0.999$
Rutine	28.49	$y = 3118.94x$	$R^2 = 0.998$

IV.4.3. Chromatogrammes HPLC des extraits

Les résultats de la séparation des différents extraits du feuillage de *Matricaria pubescens* par la chromatographie liquide à haute performance HPLC sont illustrés dans les spectres suivants:

✓ L'extrait de pH= 7

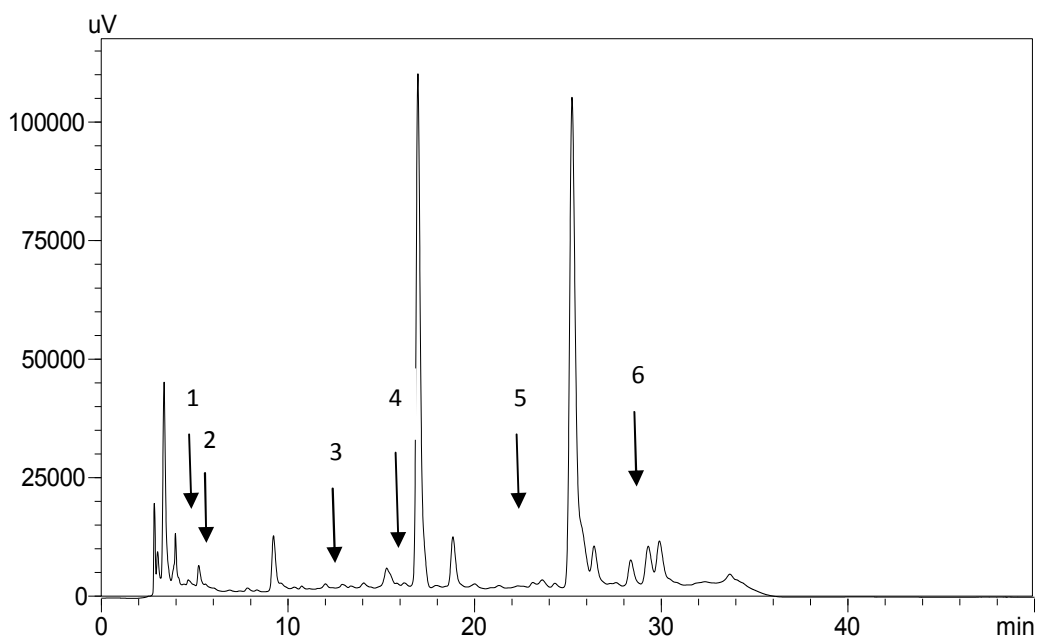


Figure (IV.17) : profil chromatographique HPLC d'extrait de pH= 7.

1: Acide ascorbique; 2: Acide gallique; 3: Acide chlorogénique; 4: Acide caféique;
5: vanilline; 6: Rutine

Le profil chromatographique d'extrait de pH=7 est représenté au niveau de figures (IV.17) tandis que le résultat des analyses quantitatives sont donnés dans le tableau (IV.6). L'analyse de ces résultats montre que dans l'extrait de pH=7, l'acide ascorbique (0.1677 µg/ mg Ms), l'acide gallique (0.3163 µg/ mg Ms), l'acide chlorogénique (0.1707 µg/ mg Ms), l'acide caféique (0.1182 µg/ mg Ms), vanilline (0.1118 µg/ mgMs) et la rutine (8.3369 µg/ mg Ms). On a remarqué que la rutine représente le composé majoritaire.

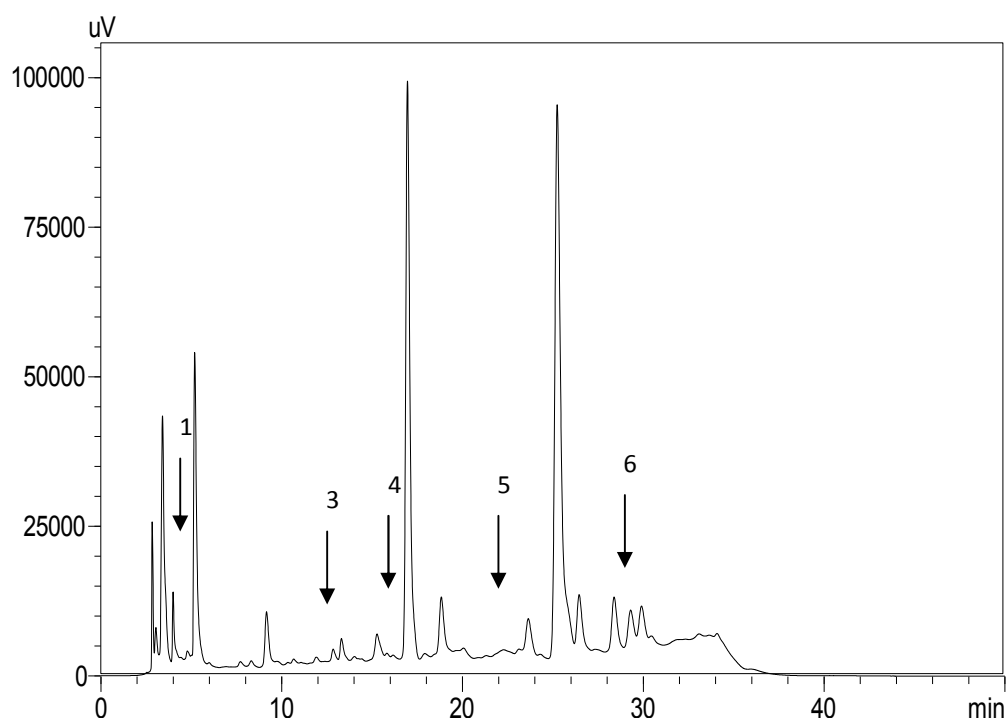
✓ *L'extrait de pH= 6*

Figure (IV.18) : profil chromatographique HPLC d'extrait de pH= 6.

1: Acide ascorbique; 2: Acide gallique (non détecté); 3: Acide chlorogénique;
4: Acide caféique; 5: vanilline; 6: Rutine

Le profil chromatographique d'extrait de pH= 6 représenté au niveau de figure (IV.18) .

Les résultats des analyses quantitatives des composés phénoliques identifiés sont représentés dans le tableau (IV.6) . L'analyse de ces résultats montre que dans l'extrait de pH= 6, l'acide ascorbique (0.1856 μ g/ mg Ms), l'acide chlorogénique (0.3977 μ g/ mg Ms), l'acide caféique (0.1319 μ g/ mg Ms), vanilline (0.1287 μ g/ mg Ms) et la rutine (14.4397 μ g/ mg Ms), on remarque que la rutine est le plus représentatif.

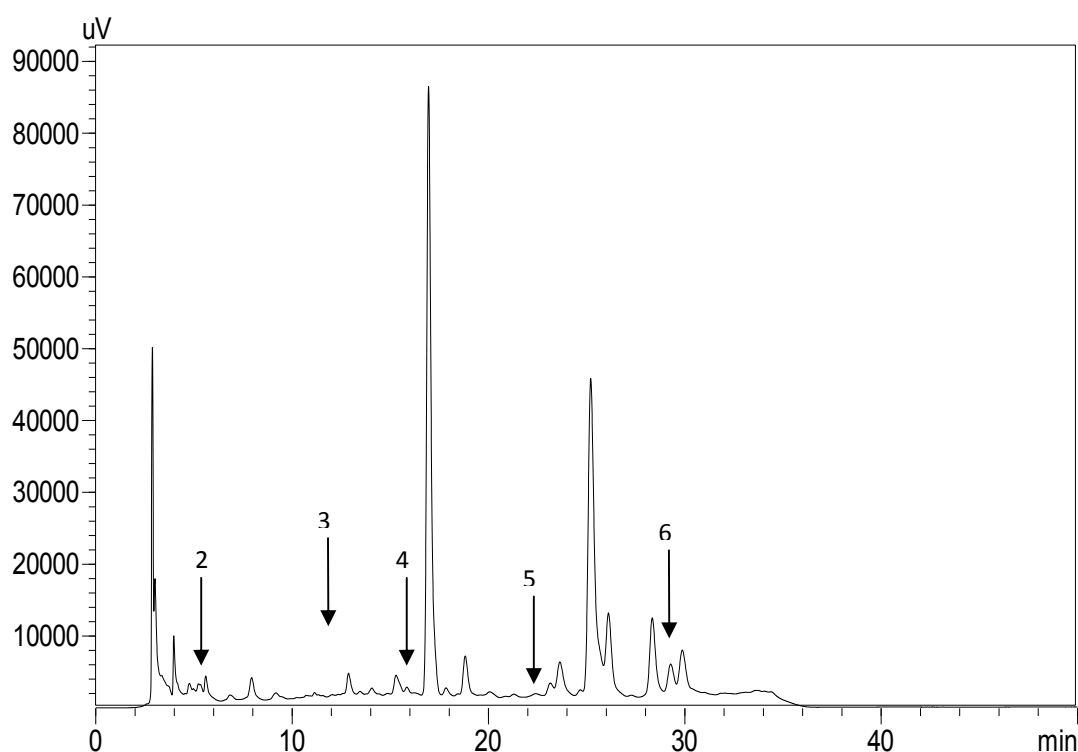
✓ *L'extrait de pH= 5*

Figure (IV.19) : profil chromatographique HPLC d'extrait de pH=5.

1: Acide ascorbique(non détecté) ; 2: Acide gallique; 3: Acide chlorogénique;
4: Acide caféique; 5: vanilline; 6: Rutine

Le profil chromatographique d'extrait de pH=5 représenté au niveau de figure(IV.19) .

Les résultats des analyses quantitatives des composés phénoliques identifiés sont représentés dans le tableau (IV.6) . L'analyse de ces résultats montre que dans l'extrait de pH=5, l'acide gallique (0.3750 μ g/ mg Ms), l'acide chlorogénique (0.0789 μ g/ mg Ms), l'acide caféique (0.0362 μ g/ mg Ms), vanilline (0.0111 μ g/ mg Ms) et la rutine (8.1787 μ g/ mg Ms), on remarque l'absence de l'acide ascorbique dans l'extrait et que la rutine est le plus représentatif.

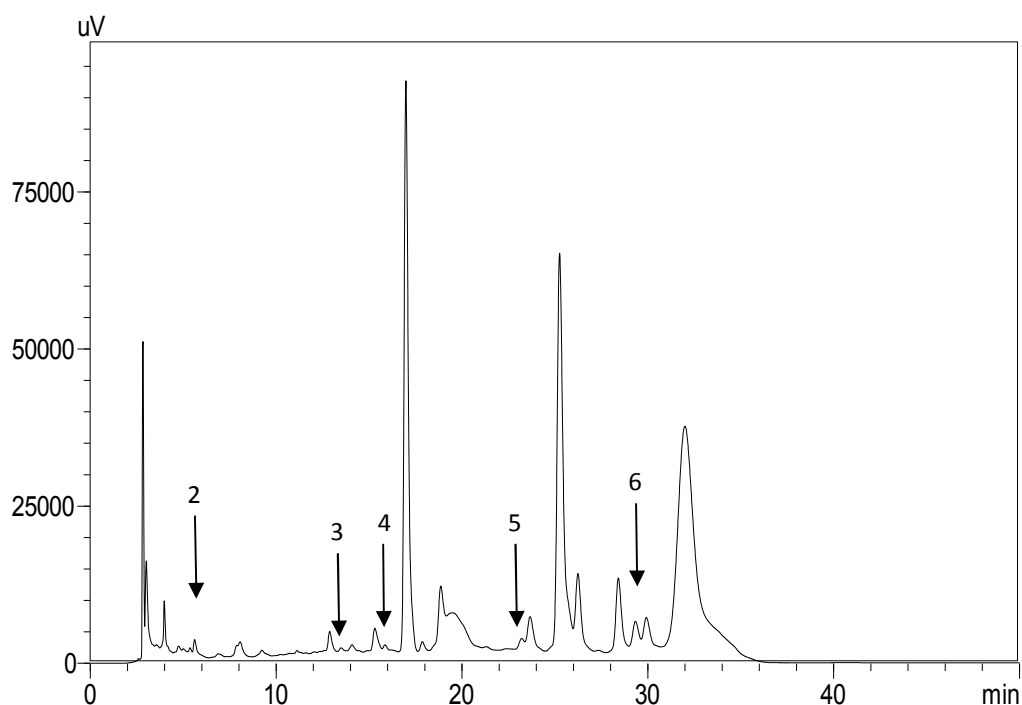
✓ *L'extrait de pH=4*

Figure (IV.20) : profil chromatographique HPLC d'extrait de pH=4.

1: Acide ascorbique(non détecté) ; 2: Acide gallique; 3: Acide chlorogénique;
4: Acide caféique; 5: vanilline; 6: Rutine

Le profil chromatographique d'extrait de pH=4 représenté au niveau de figure (IV.20) .

Les résultats des analyses quantitatives des composés phénoliques identifiés sont représentés dans le tableau (IV.6) . L'analyse de ces résultats montre que dans l'extrait de pH=4, l'acide gallique (0.2927 μ g/ mg Ms), l'acide chlorogénique (0.0763 μ g/ mg Ms), l'acide caféique (0.0202 μ g/ mg Ms), vanilline (0.0193 μ g/ mg Ms) et la rutine (8.8324 μ g/ mg Ms), on remarque dans l'extrait que la rutine est le plus représentatif.

✓ L'extrait de pH=3

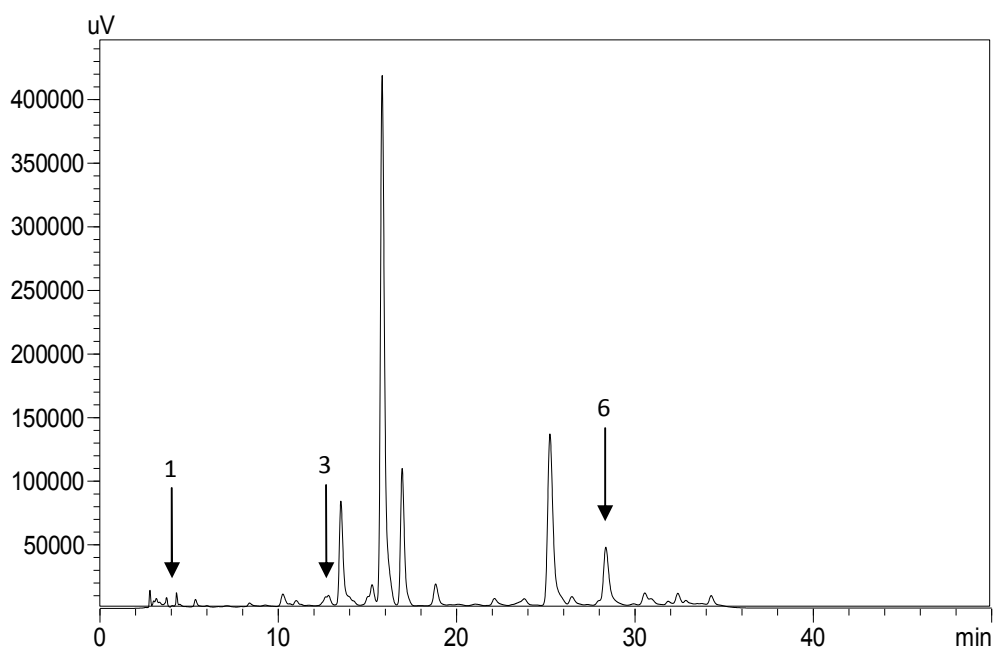


Figure (IV.21) : profil chromatographique HPLC d'extrait de pH=3.

1: Acide ascorbique ; 3: Acide chlorogénique ; 6: Rutine

Le profil chromatographique d'extrait à pH=3 représenté au niveau de figure (IV.21) .

Les résultats des analyses quantitatives des composés phénoliques identifiés sont représentés dans le tableau (IV.6) . L'analyse de ces résultats montre que dans l'extrait de pH=3, l'acide ascorbique (0.1935 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Ms), l'acide chlorogénique (4.1790 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Ms), et la rutine (46.5949 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Ms), on remarque l'absence de la plupart des composés phénoliques dans l'extrait et la rutine est le plus représentatif.

Les résultats de l'analyse HPLC des extraits du feuillage de *Matricaria pubescens* sont présentés dans le tableau (IV.6) .

D'après ces résultats et du point de vue quantitatif, l'extrait de pH=6 est meilleur que l'extrait de pH=7 , l'extrait de pH=5,et l'extrait de pH=4 dans les différents composés, tandis que l'acide chlorogénique, et la rutine représentent les composés majoritaires dans l'extrait de pH=3 .

Tableau (IV.6) : Concentration de polyphénols des extraits de feuilles du *Matricaria pubescens*.

Composés	Concentration (µg/mg)				
	Extrait à pH=7	Extrait à pH=6	Extrait à pH=5	Extrait à pH=4	Extrait à pH=3
Acide ascorbique	0.1677	0.1856	non détecté	non détecté	0.1935
Acide gallique	0.3163	non détecté	0.3750	0.2927	-
Acide chlorogénique	0.1701	0.3977	0.0789	0.0763	4.1790
Acide caféique	0.1182	0.1319	0.0362	0.0202	non détecté
Vanilline	0.1118	0.1287	0.0111	0.0193	non détecté
Rutine	8.3369	14.4397	8.1787	8.8324	46.5949

IV.5. Evaluation de l'activité antioxydante

Les extraits sont des mélanges de plusieurs composés, avec différents groupements fonctionnels, polarités et comportements chimiques. Cette complexité chimique des extraits pourrait mener à des résultats dispersés selon l'essai utilisé. Par conséquent, une approche avec des analyses multiples pour évaluer le potentiel antioxydant des extraits serait plus instructif et même nécessaire . [1]

Dans ce travail, deux méthodes sont utilisées : capacité antioxydante totale (CAT) et le piégeage du radical libre DPPH.

IV.5.1.Méthode de la Capacité antioxydante totale (CAT) :

L'acide ascorbique a été utilisée comme étalon à différentes concentrations, La teneur en capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme d'équivalent d' acide ascorbique par gramme d'extrait (mg ER/g d'extrait). Le taux de capacité antioxydante totale des extraits ont été obtenus à partir d'une courbe d'étalonnage d'acide ascorbique figure (IV.22).

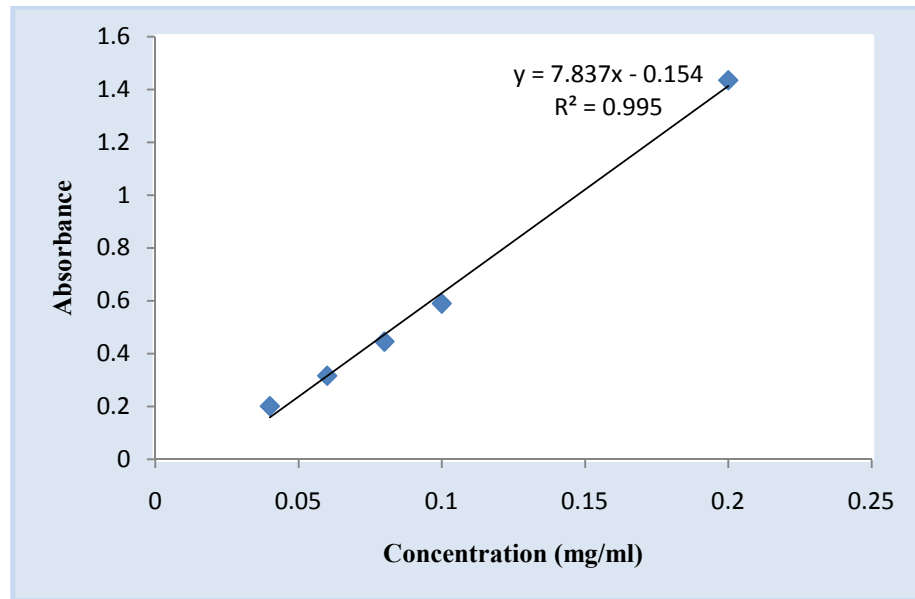


Figure (IV.22) : Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique .

Le tableau (IV.7) résume les résultats obtenus des teneurs en capacité antioxydante totale des extraits .

Tableau (IV.7) : La capacité antioxydant totale des extraits de feuilles du *Matricaria pubescens*

Extrait	La capacité antioxydant totale (mg/g)
pH= 3	25.647±0.074
pH= 4	18.140±0.073
pH= 5	34.768±0.290
pH= 6	66.840±0.241
pH= 7	26.050±0.034

Les résultats montre que tous les extraits présentent des activités antioxydantes différentes. L'extrait de pH= 6 possède la meilleure capacité antioxydante totale de l'ordre de 66.840±0.241mg /g ,suivi par l'extrait de pH= 5 avec 34.768±0.290 mg/g et par l'extrait de pH= 7 avec 26.050±0.034mg /g . Les deux extraits de pH=3 et de pH= 4 révèlent une activité réductrice de l'ordre de 25.647±0.074 mg/g et 18.140±0.073mg /g respectivement .

Grâce à ces résultats, nous concluons que l'activité antioxydante était dépendante du pH . L'activité antioxydante maximale observée à pH= 6 a diminué lorsque le pH a été réduite ou augmentée .

IV.5.2. Test anti-radicalaire (Test DPPH)

L'activité anti radicalaire est réalisée par la méthode du radical 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle (DPPH) qui est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron, la forme non radicalaire DPPH-H est formée. L'inhibition de la décoloration du radical DPPH est en fonction de la concentration des différents extraits utilisés. [3]

L'activité antioxydante des extraits est exprimée en IC_{50} , il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH. Un autre paramètre exprime la puissance anti-radicalaire a été calculée à partir du premier paramètre notée : "APR" (efficacité anti-radicalaire, égale à $1/IC_{50}$).

Tableau (IV.8) : Valeurs des IC_{50} du DPPH pour les extraits.

Extrait	Valeurs des IC_{50} (mg/ml)	APR
pH= 3	0.741	1.349
pH= 4	0.757	1.321
pH= 5	0.300	3.333
pH= 6	0.151	6.622
pH= 7	0.666	1.501

Le tableau ci-dessus montre que l'extrait de pH= 6 possède une activité antiradicalaire plus importante 0.151 mg/ml et APR de l'ordre de 6.622, suivi par l'extrait de pH= 5 avec 0.300 mg/ml et APR de l'ordre de 3.333 et l'extrait de pH= 7 avec 0.666 mg/ml et APR de l'ordre de 1.501. Les deux extraits pH= 4 et pH=3 ont des activités anti radicalaire similaires. les capacités de piégeage du radical sont classées dans l'ordre :

$$pH= 6 > pH= 5 > pH= 7 > pH=3 > pH= 4$$

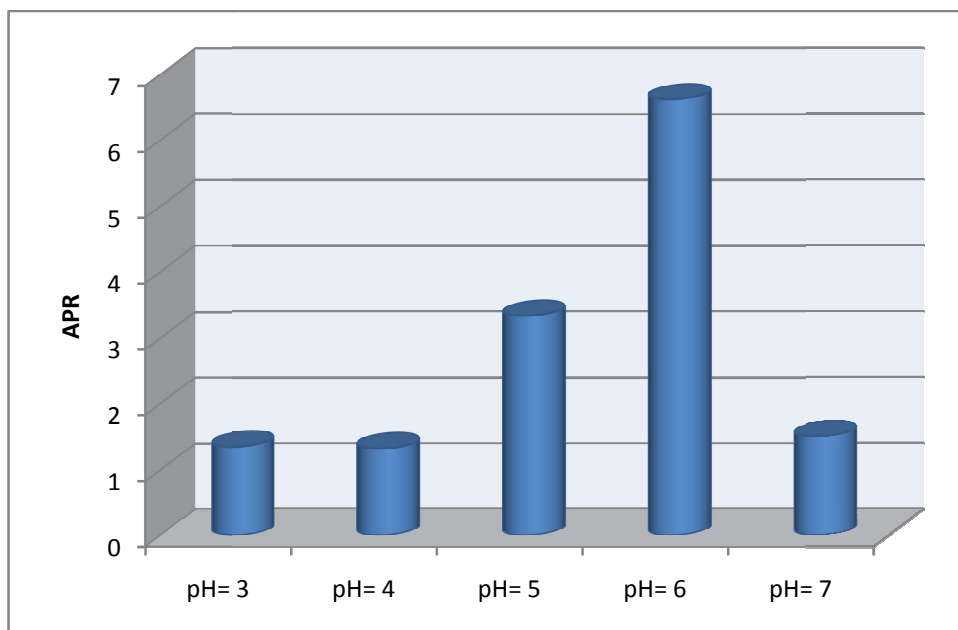


Figure (IV.23) :comparaison entre ARP de différents extrais.

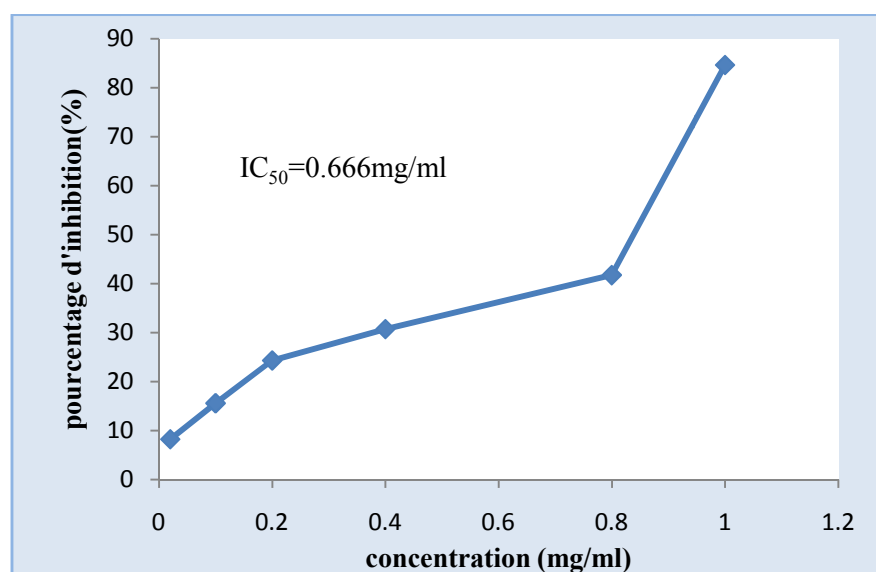


Figure (IV.24) : Effet d'extraits de pH=7 sur le radical DPPH

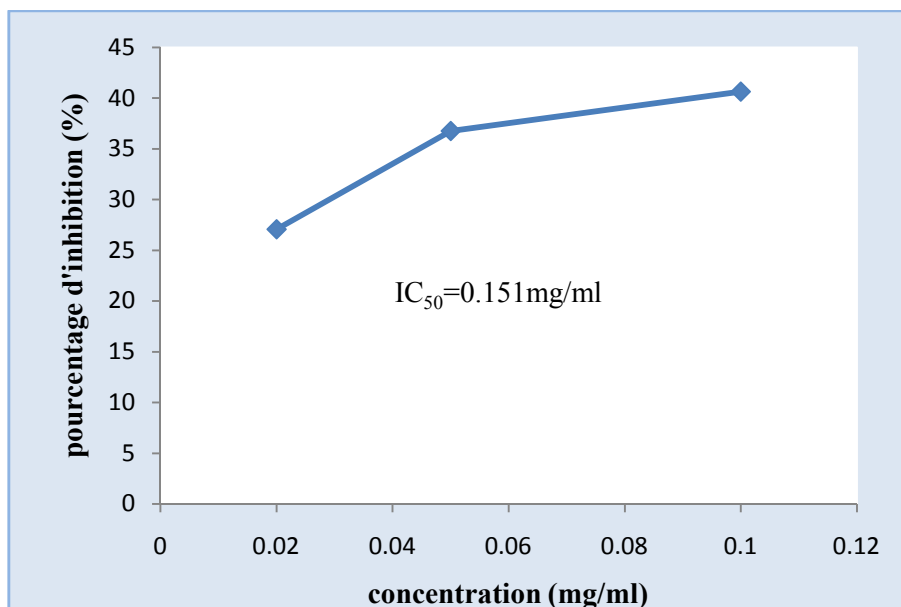


Figure (IV.25) : Effet d'extraits de $pH=6$ sur le radical DPPH

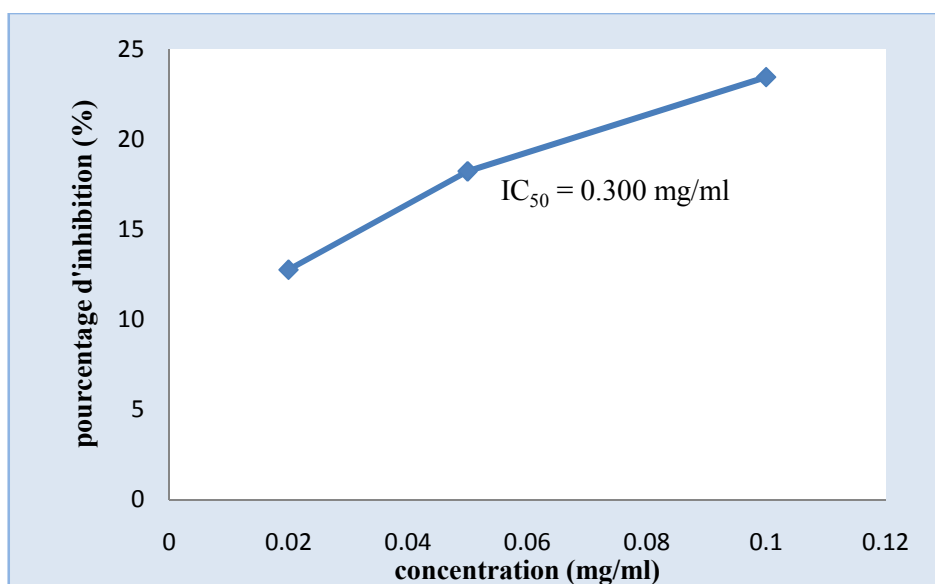


Figure (IV.26) : Effet d'extraits de $pH=5$ sur le radical DPPH

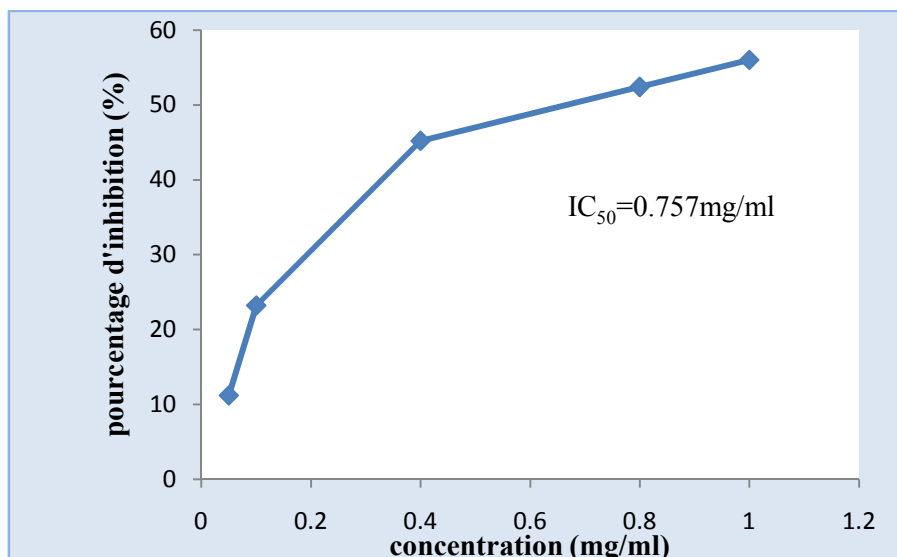


Figure (IV.27) : Effet d'extraits de pH=4 sur le radical DPPH

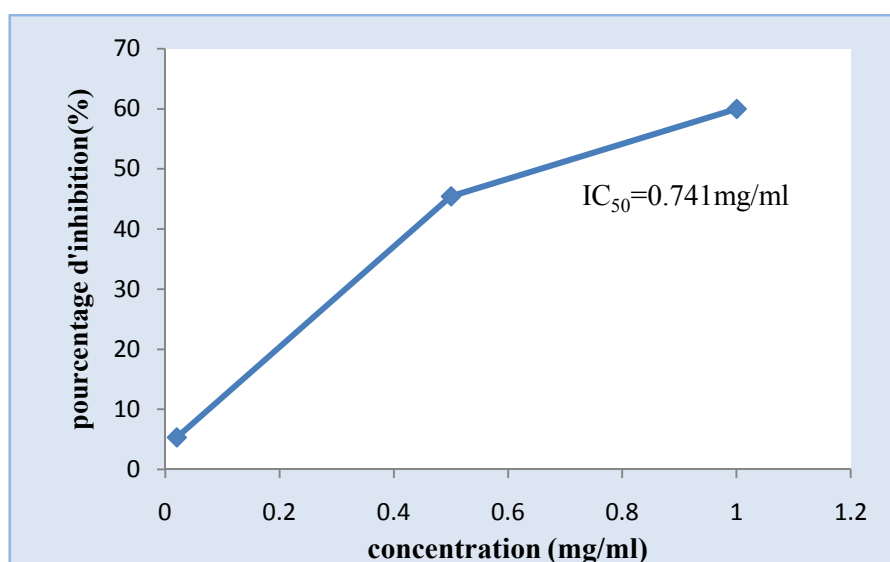


Figure (IV.28) : Effet d'extraits de pH=3 sur le radical DPPH

Références bibliographiques

- [1] Athamena Souad, (2009) "etude quantitative des flavonoides des graines de *cuminum cyminum* et les feuilles de *rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique" Thèse de magister ,Université El-Hadj Lakhdar-Batna.
- [2] Celia M. Librán, Luis Mayor, Esperanza M. Garcia-Castello, Daniel Vidal-Brotons, (2013) "Polyphenol extraction from grape wastes: Solvent and pH effect" . Agricultural Sciences Vol.4, No.9B, 56-62.
- [3] Harrar Abd El Nacer , (2012) "Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L." Thèse de magister ,Université Ferhat Abbas-Setif .
- [4] Kanoun Khadidja,(2011) " Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine)" . Mémoire de magister , Université Aboubekr Belkaid Tlemcen.
- [5] M.Angela, A.Meireles,(2009)" Extracting bioactive compounds for food products". Edited by Taylor and francis group, LLC, p 196.
- [6] R.Vijayalakshmi, R.Ravindhran,(2012)" Comparative fingerprint and extraction yield of *Diospyros ferrea* (willd.)Bakh. root with phenol compounds (gallic acid), as determined by uvvis and ft-ir spectroscopy ." Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine S1367-S1371
- [7] Yakhlef Ghania,(2011) "Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de *thymus vulgaris* l. et *laurus nobilis* L". Mémoire de magister , Université El-Hadj Lakhdar-Batna.

Conclusion

Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. La connaissance et l'usage des ces plantes constituent un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique est très accentuée dans ces dernières années grâce aux thérapeutiques qu'elles procurent.

Ce travail nous a permis en premier lieu de maîtriser les plus simples techniques analytiques en passant de l'extraction des polyphénols aux outils analytiques de base dans l'étude des composantes les plus intéressantes contenues dans une plante. Le choix de ce sujet est dicté par des travaux antérieurs effectués dans le cadre de la valorisation des plantes spontanées à caractère médicinal des régions arides et semi-arides. Parmi ces plantes, celle faisant l'objet de notre travail est *Matricaria pubescens* de la famille de Astéracée, issue de la région d'El-Oued .

En outre, ce travail nous a permis de quantifier les composés phénoliques en utilisant les techniques universelles appropriées après avoir effectué des analyses chromatographiques analytiques de ces composés (polyphénols, flavonoïdes,...etc.) contenus dans cette plante. Deux aspects principaux sont visés par ce travail, le premier était d'évaluer les teneurs par spectrophotométrie IR et UV-visible , et par chromatographie HPLC de certaines molécules bioactives telles que les polyphenols totaux, les flavonoïdes, et flavanols. Le second de nature biologique qui a été mis en évidence par test antioxydant .

Les feuilles de *Matricaria pubescens*, soumises à l'extraction par ultrason avec des solvants aqueux à différentes pH, sont caractérisée par les rendements obtenues.

Quantitativement, l'évaluation du contenu des polyphénols totaux en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu révèle la présence des quantités moyennement importantes en polyphénols dans les milieux acides faible . De même nous avons dosé les flavonoïdes par la méthode d' AlCl_3 qui nous mène à conclure que cette plante contient une quantité considérable de flavonoïdes .

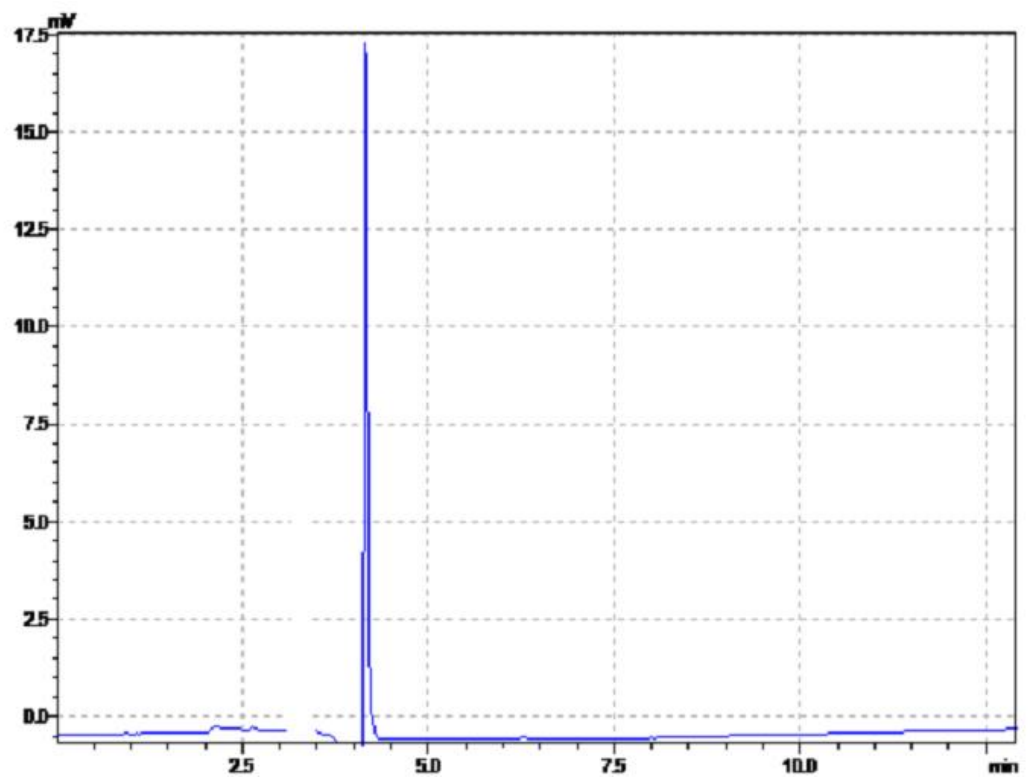
L'analyse quantitative par HPLC a montré la présence de plusieurs des composés phénoliques ,de l'acide ascorbique , l'acide gallique , l'acide chlorogenique, l'acide caféique, vanilline , et la rutine dans la plupart des échantillons.

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante , le test de capacité antioxydante totale et de DPPH a été utilisé, et les résultats ont montré que le meilleur résultat est obtenu pour l'extrait à pH=6 .

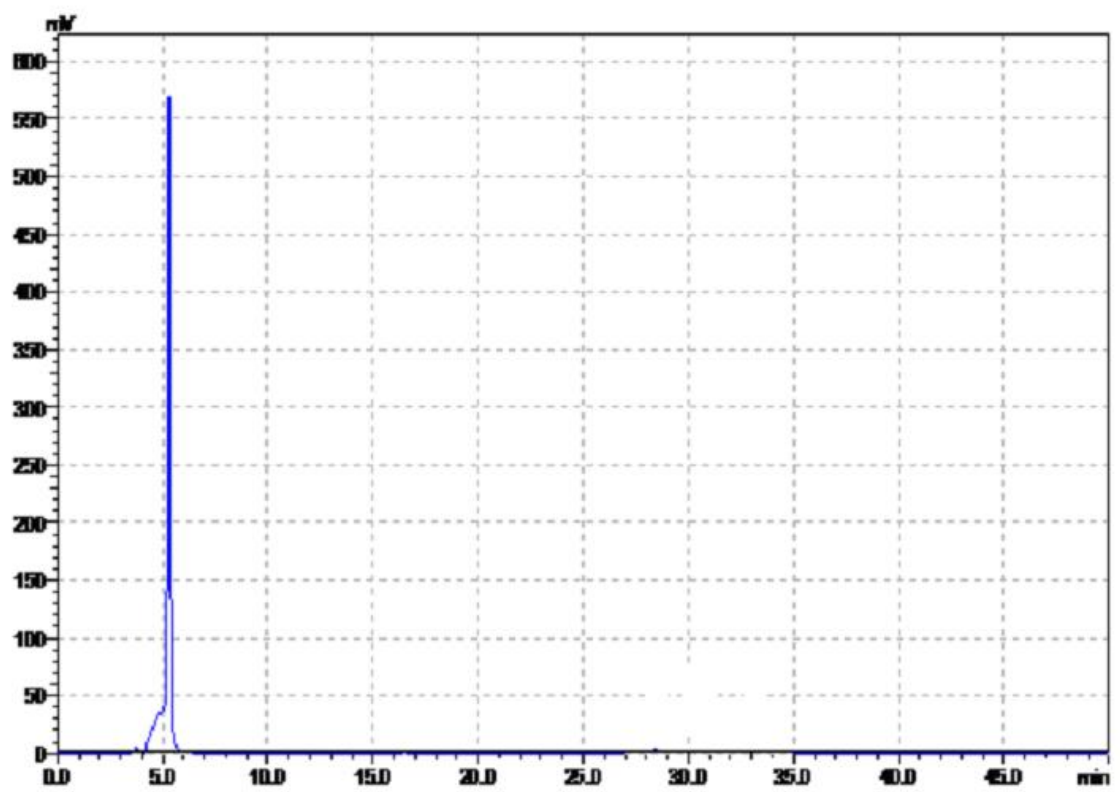
Notons enfin que ce travail va nous ouvrir des horizons de recherche ciblés dans le domaine des plantes utilisées en médecine traditionnelle dans les zones arides, notamment en terme de mise en évidence des principes actifs et l'évaluation de leurs activités biologiques.

ANNEXE

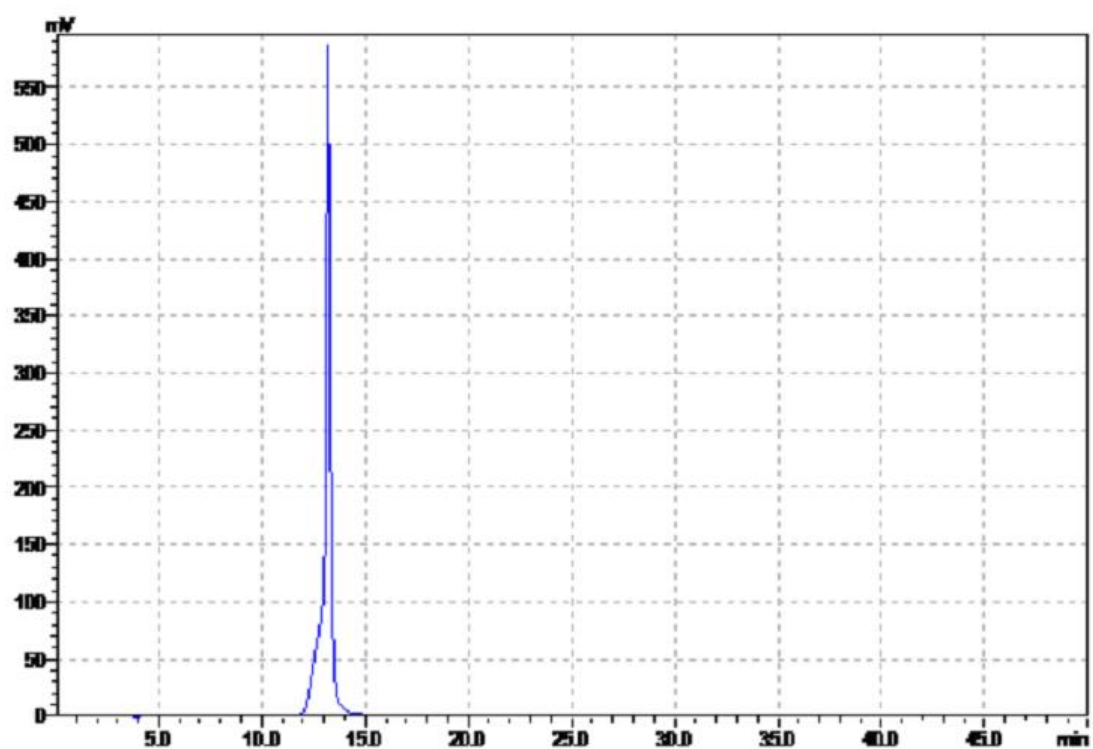




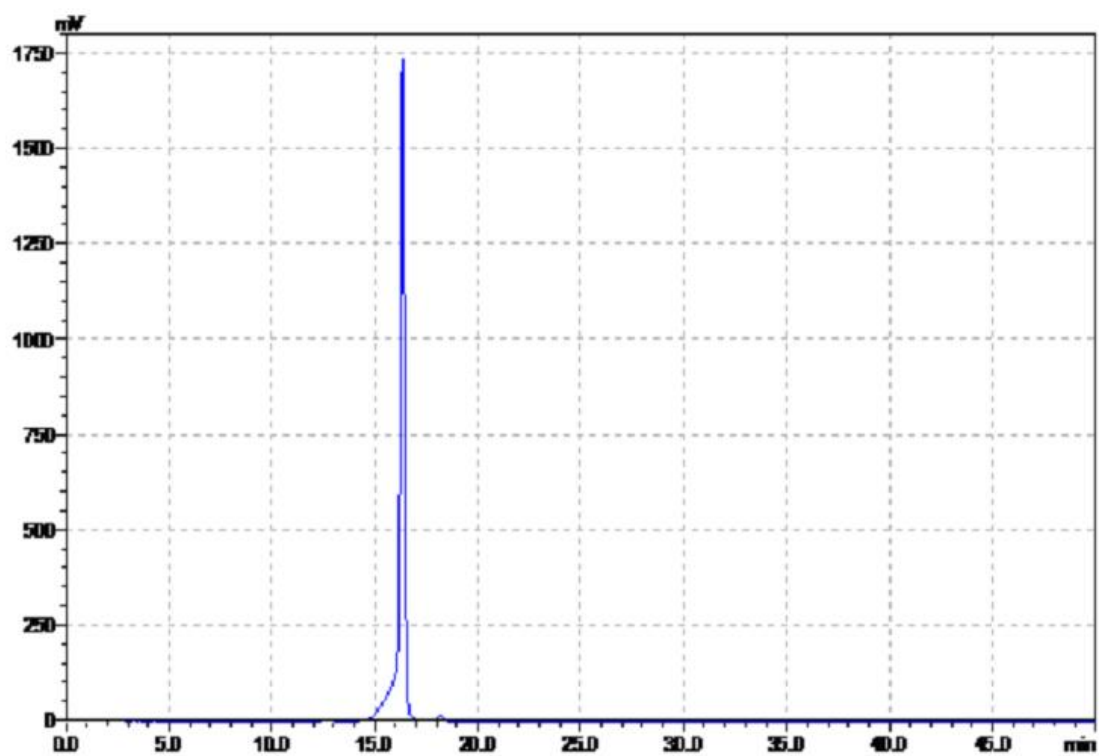
Chromatogramme d'acide ascorbique



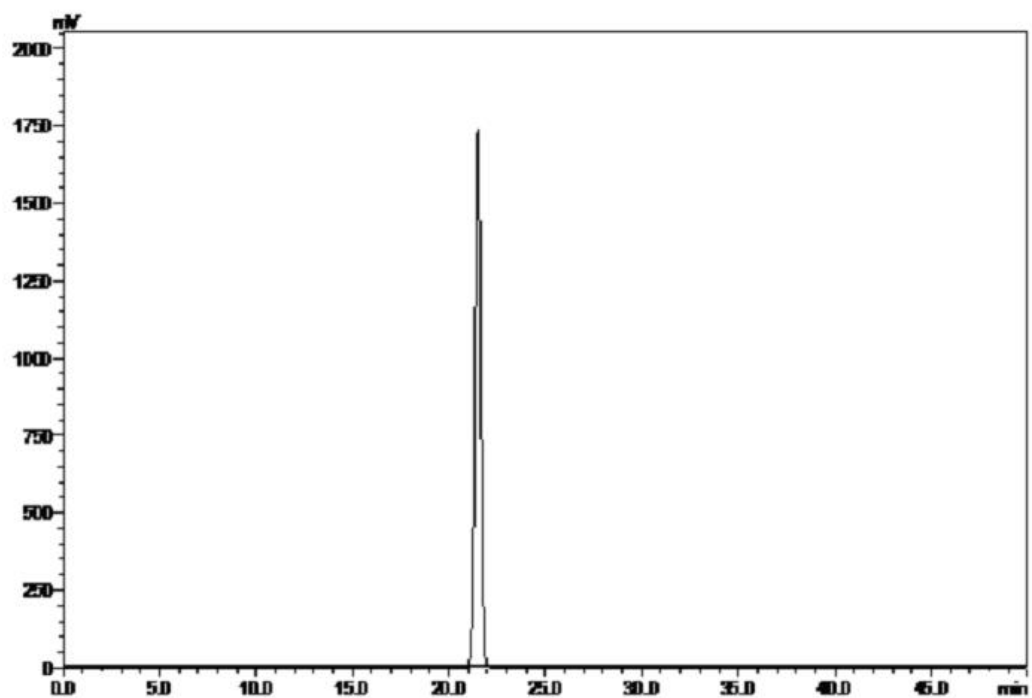
Chromatogramme d'acide gallique



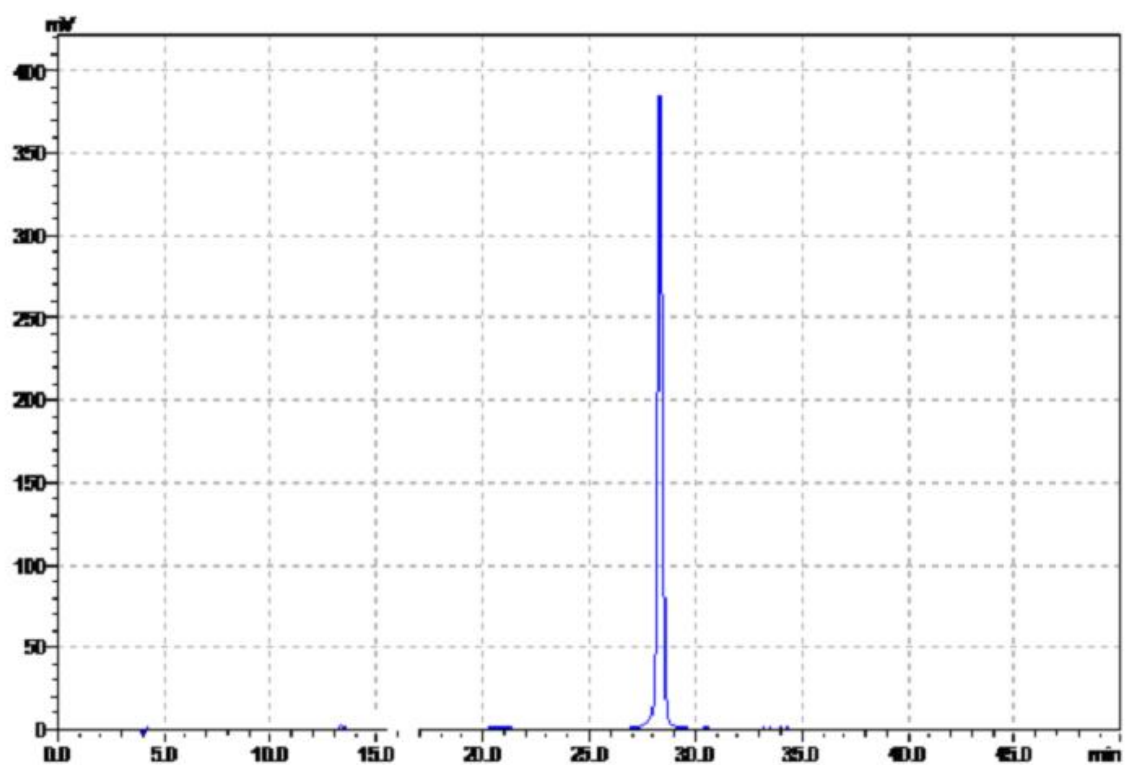
Chromatogramme d'acide chlorogénique



Chromatogramme d'acide caféique



Chromatogramme de vanilline



Chromatogramme de la rutine