

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLICUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
التعليم
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
ثلجي
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT
كلية
FACULTE DES SCIENCES

Département Des Sciences de la matière

Mémoire de MASTER

Domaine: Sciences de la matière

Filière: Chimie

Option: Chimie organique appliquée

Par :

CHERIF Fatima

Activité antioxydant d'une plante médicinale récoltée dans la région de Ghardaïa (*Ammodaucus leucotrichus*)

Soutenu publiquement devant le jury composé de:

<i>M^{me}.HAMIA Chahrazed</i>	<i>M.C.B</i>	<i>Présidente</i>
<i>Mr. BENALIA Mohamed</i>	<i>M.A.A</i>	<i>Examineur</i>
<i>Mr. HAMDI Ahmed</i>	<i>M.A.A</i>	<i>Examineur</i>
<i>Mr. KORIBA Bakhti</i>	<i>M.A.A</i>	<i>Encadreur</i>
<i>Mr. BOUCHOUKA Elmouloud</i>	<i>M.A.A</i>	<i>Co-encadreur</i>

Année Universitaire 2014/2015



Dédicace

Je dédie ce travail

Avec l'aide d'Allah, j'ai pu réaliser ce modeste travail que Je dédie:

A la mémoire de mon père

A ma chère mère

A mon beau père et belle mère

A mes sœurs et mes frères

A mes professeurs

A toute ma famille

A tous mes amis.

Remerciements

En premier lieu, je remercie notre DIEU, notre créateur pour nous avoir donné la force pour accomplir ce travail.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à tous mes professeurs qui ont contribué à notre formation.

Je désire exprimer ma profonde et vive reconnaissance à mon encadreur et co-encadreur : Mr. KORIBA Bakhti et Mr. BOUCHOUKA Elmouloud, Qui ont mis toute leur compétence à ma disposition, pour leurs directives et leurs Conseils judicieux et pour leur suivi régulier à l'élaboration de ce modeste travail.

Je remercie Mm. HAMIA Chahrazed d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance.

Je remercie les membres du jury : Mr. BENALIA Mohamed et Mr. HAMDI Ahmed d'avoir accepté de juger ce modeste travail. Merci beaucoup.

Je remercie également tous les membres de laboratoire qui m'ont beaucoup aidée à réaliser ce travail dans des bonnes conditions.

Sommaire

Remerciement	
Dédicace	
Liste de notations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
I. Introduction.....	01
II. Matériel et méthode	03
II.1. Matériel végéta	03
II.2. Réactifs et standards.....	04
II.3. Méthodes.....	04
II.3.1. Préparation des extraits.....	05
II.3.1.1. Extraction à froid (Macération)... ..	06
II.3.1.2. Extraction à chaud (extraction au Soxhlet.....	08
II.3.2. Calcul de rendement.....	09
II.3.3. Dosage des phénols totaux	10
II.3.4. Dosage des flavonoïdes	12
II.3.5. Evaluation du pouvoir antiradicalaire par le test au DPPH.....	13
II.3.6. Analyse des extraits par CCM analytique.....	14
II.3.7. Fractionnement de l'extrait butanolique par chromatographie sur colonne	15
III. Résultats et discussions.....	16
III.1. Détermination de rendement d'extraction	16
III.2. Teneur en phénols totaux et flavonoïdes et pouvoir antioxydant ..	17
III.3. Chromatographie sur couches minces (CCM)	23
III.4. Fractionnement de l'extrait butanolique par chromatographie sur colonne	26
IV. CONCLUSION	27
V. Références bibliographiques.....	28

Liste des figures

Figure 1: <i>Ammodaucus leucotrichus</i>	03
Figure 2 : Schéma illustrant la démarche expérimentale suivie dans cette étude.....	05
Figure 3: Schéma illustrant l'extraction par macération.....	07
Figure4 : Schéma illustrant l'extraction à chaud (L'appareil de Soxhlet)	09
Figure 5: Structure de l'acide gallique.....	10
Figure 6: Structure de la catéchine.....	12
Figure 7: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH [•] entre l'espèce radicalaire DPPH [•] et un antioxydant (AH).....	14
Figure 8: Histogramme représentant les rendements des deux procédés d'extraction.....	17
Figure 9: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.....	18
Figure 10: Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes.....	18
Figure11 : Pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration de la VC.....	20
Figure 12: Pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration de la BHA.....	21
Figure 13: Pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration de la VE.....	21
Figure 14: Pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration de la Trolox.....	22
Figure 15: Pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration de méthode macération.....	22
Figure 16 : Pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration de méthode Soxhlet.....	23
Figure 17 : Chromatogrammes analytiques des extraits de droite à gauche: Chloroforme, Acétate d'éthyle (Soxhlet) et Chloroforme, Acétate d'éthyle(Macération)	24
Figure 18: Chromatogrammes analytiques des extraits et standards de droite à gauche: n-butanol, Méthanol, Catéchine, Acide gallique, Quercitine, Rutine.....	25

Liste des tableaux

Tableau I: Fractionnement de l'extrait butanolique.....	15
Tableau II : Rendements obtenus des deux procédés d'extraction.....	16
Tableau III: Teneur en phénols totaux et flavonoïdes et valeurs d'EC ₅₀	19.

Liste des Notations

Abs	Absorbance
AcOEt	Acétate d'éthyle
BHA	Butylhydroxyanisole
BuOH	n-butanol
CCM	Chromatographie sur couche mince
CHCl ₃	Chloroforme
DPPH	2,2-diphenil-1-picrylhydrazyl
EAG	Équivalent acide gallique
ECAT	Équivalent catéchine
EC ₅₀	La concentration en extrait phénolique nécessaire pour l'inhibition de 50% des radicaux libres
PI %	Pourcentage d'inhibition
UV	Rayons ultraviolet

I. Introduction

L'homme a toujours été émerveillé par la beauté des plantes, leurs couleurs, la forme de leurs fleurs ou de leurs fruits. Il les considère comme des compagnes fidèles vers lesquelles il se retourne en raison des bienfaits qu'elles procurent et pour leur grande utilité, ce sont de vraies panacées et de véritables pharmacies naturelles (Bahorun, 1997).

Actuellement plus de 80 % de la population africaine ont recours aux drogues faites essentiellement de matières végétales qui poussent autour de leur ville. En plus, dans le monde, près de 25% des prescriptions sont à base de plantes et 60 à 70% des médicaments antibactériens et anticancéreux sont des substances d'origine naturelle (Hellal, 2011).

Plusieurs études épidémiologiques ont montré qu'il y a un rapport inverse entre la prise d'aliments riches en polyphénols (les fruits et les légumes) et le risque des maladies reliées à l'âge comme les maladies neurodégénératives (Hu, 2003; Bubonja-Sonje et *al.*, 2011). Cette relation est souvent attribuée aux puissantes activités antioxydantes des flavonoïdes et d'autres polyphénols associées à leurs propriétés redox permettant d'éliminer les effets d'espèces réactives de l'oxygène (Ketsawatsakul et *al.*, 2000) ainsi que de chélater les différents métaux de transition (Gulcin et *al.*, 2010).

En phytothérapie, même si certaines indications sont communes à plusieurs classes (les propriétés vasculo protectrices, sont par exemple aussi bien attribuées aux flavonoïdes qu'aux anthocyanes, tanins et autres coumarines), chaque classe chimique semble être utilisée pour des bénéfices spécifiques (Bahorun, 1997).

En effet, la famille des polyphénols devient le point de départ de toutes les recherches scientifiques en particulier la découverte des molécules naturelles à très forte activité antioxydante. Notant que les oxydants quel que soit leurs origines constituent un très grave problème non seulement au niveau de la santé publique mais aussi au niveau de l'industrie agro-alimentaire (Turkmen, 2007).

Dans le contexte de recherche des antioxydants naturels, nous nous sommes intéressés, d'une part, à évaluer les propriétés antioxydants d'une plante médicinale Saharienne : *Ammodaucus leucotrichus* .D'autre part, la quantification des composés phénoliques et des flavonoïdes a été envisagée en vue de rechercher une éventuelle corrélation entre ces derniers et l'activité antioxydante.

II. Matériel et Méthodes

II.1. Matériel végétale

La plantes a été récoltée au mois de Mai 2014, dans la région de Ghardaïa: "Metlili, Sebseb". L'identification du matériel végétal est faite par le Dr. CHEHMA A du département de Biologie à l'université de Ouargla. La plante a été séchée à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant une semaine. Après le séchage, le matériel végétal est finement broyé puis stocké dans des boites en plastique opaque jusqu'à son utilisation.

Présentation de la plante

C'est un arbrisseau blanchâtre très rameux, à poils laineux appliqués. Les épis sont grêles et lâches interrompus, larges de 12-15 mm. Le calice de 4-6 mm, forme un tube rétréci à son sommet. Feuilles petites en coin a la base et portant quelques dents au sommet. Les fleurs sont disposées au dessus de chaque paire de feuilles en couronne autour de la tige. Les fleurs rose pale en tube sont entourées par un calice vert qui s'agrandit au fur et a mesure de la fructification pour former comme une collerette (figure 1).



Figure 1: *Ammodaucus leucotrichus*.

Répartition géographique

Plante saharienne présente dans tout le Sahara.

Propriétés et usages thérapeutiques

Les fruits sont utilisés soit par la population locale sous forme de poudre ou dans une décoction pour traiter la douleur gastriques-intestinal, gastralgies et indigestion. C'est aussi fréquemment utilisé, sous forme de perfusion, pour diverses maladies infantiles de l'appareil digestif: nausées, la dysenterie, régurgitation, vomissements. Des extraits aqueux de *A. leucotrichus* se sont révélés inhiber la formation d'oxalate de calcium cristaux de monohydrate et aussi trouvés à inhiber puissamment les phases de calcium nucléation, croissance et d'agrégation cristallisation de l'oxalate.

II.2. Réactifs et standards

Tous les produits chimiques, les standards et les solvants (grade analytique) utilisés dans ce travail sont de la marque *Sigma-Aldrich*.

II.3. Méthodes

Dans l'optique d'évaluer de nouvelles molécules possédant une activité antioxydante qui trouvent leur application particulièrement dans le domaine agro-alimentaire et pharmaceutique, notre étude se propose d'étudier une plante médicinale saharienne *Ammodaucus leucotrichus* en suivant la démarche expérimentale suivante :

- *Extraction par différentes méthodes;
- *Détermination de la teneur en composée phénolique (phénols totaux, flavonoïdes);
- *Evaluation de l'activité antioxydante des différents extraits ;
- *Etude phytochimique bioguidée de l'extrait le plus actif.

Notre démarche expérimentale est résumée à travers le schéma suivant (figure 2):

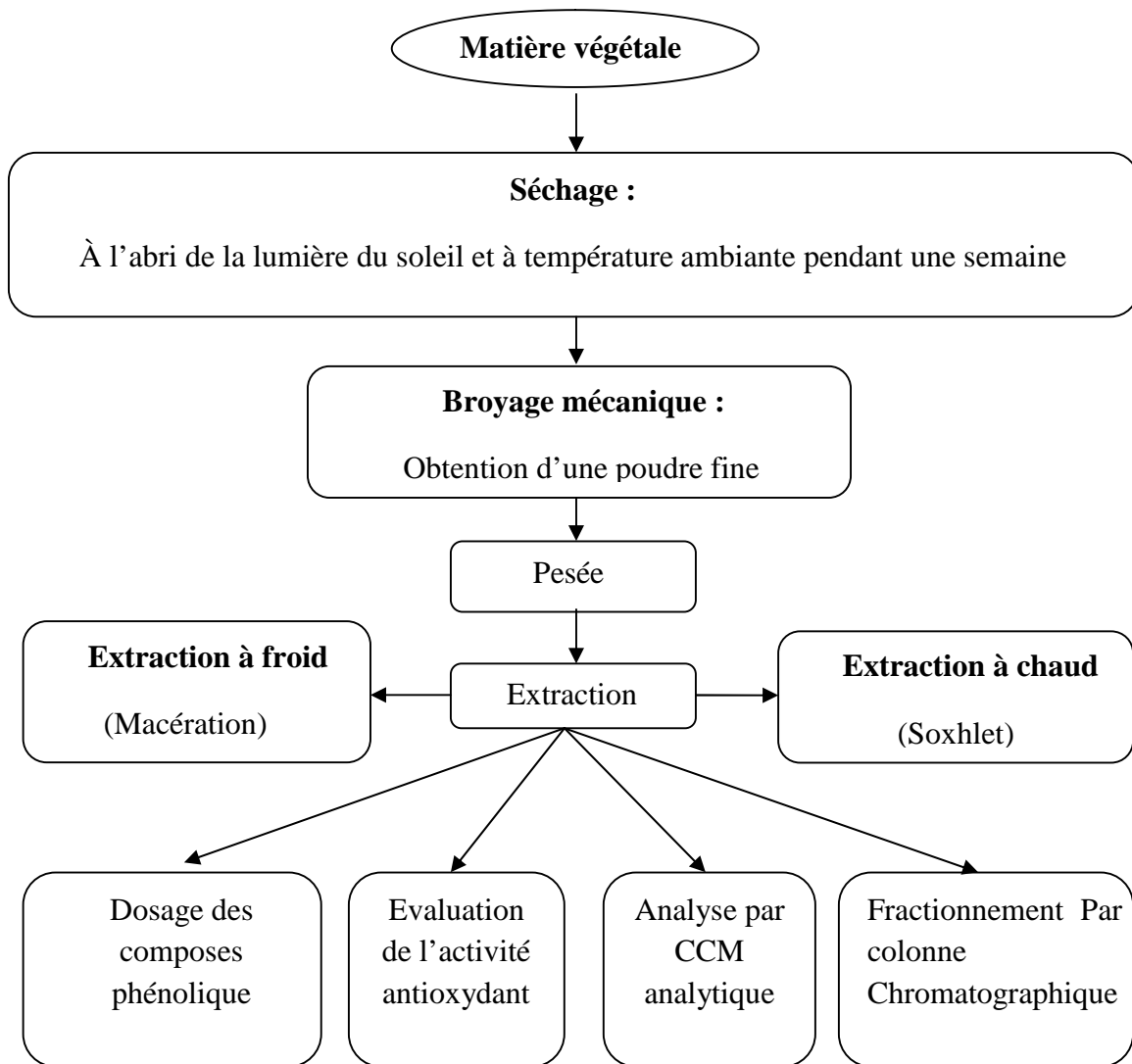


Figure 2 : Schéma illustrant la démarche expérimentale suivie dans cette étude.

II.3.1. Préparation des extraits

Dans cette partie de travail présentée ici et dans le but de trouver l'extrait de la plante qui possède la meilleure capacité antioxydante, deux méthodes d'extraction différentes ont été envisagées, à savoir la macération et l'extraction au soxhlet.

Délipidation

Avant d'entamer l'extraction proprement dite, nous avons procédé à une délipidation du matériel végétal par macération dans un solvant apolaire. Cette étape préliminaire a pour but d'éliminer les lipides et les pigments.

II.3.1.1. Extraction à froid (Macération)

La macération consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui se fait à température ambiante et qui a l'avantage de préserver les substances thermosensibles. Cette extraction se déroule en deux étapes :

A. Préparation du filtrat hydrométhanolique

Une quantité de 80 g de la poudre de plante délipidée est macérée quatre fois dans 450 ml de Méthanol 70% pendant 24 heures sous agitation. Le filtrat hydrométhanolique obtenu est filtré sur papier filtre, puis concentré sous vide à l'aide d'un rota vapeur à 45°C, pour obtenir une solution aqueuse chargée en substances extractibles.

B. Fractionnement de la phase aqueuse

La solution aqueuse (phase aqueuse) ainsi obtenue est diluée avec de l'eau distillée puis subit une extraction liquide-liquide dans une ampoule à décanter avec une succession de solvants organiques par ordre de polarité croissante: chloroforme (CHCl_3), acétate d'éthyle (AcOEt) et n-Butanol. La solution aqueuse est extraite jusqu'à l'épuisement avec chaque solvant; chaque portion de solvant organique (phase organique) reste en contact avec la phase aqueuse sous agitation manuelle pendant quelques secondes, puis elles sont laissées reposer jusqu'à la séparation des deux phases. Après décantation, les portions de chaque phase organique sont réunies et évaporées à sec, sous pression réduite à 45°C. Les trois extraits issus du fractionnement sont pesés puis repris dans l'Ethanol 100 %.

Le protocole d'extraction est résumé dans le schéma ci-après (figure 3) :

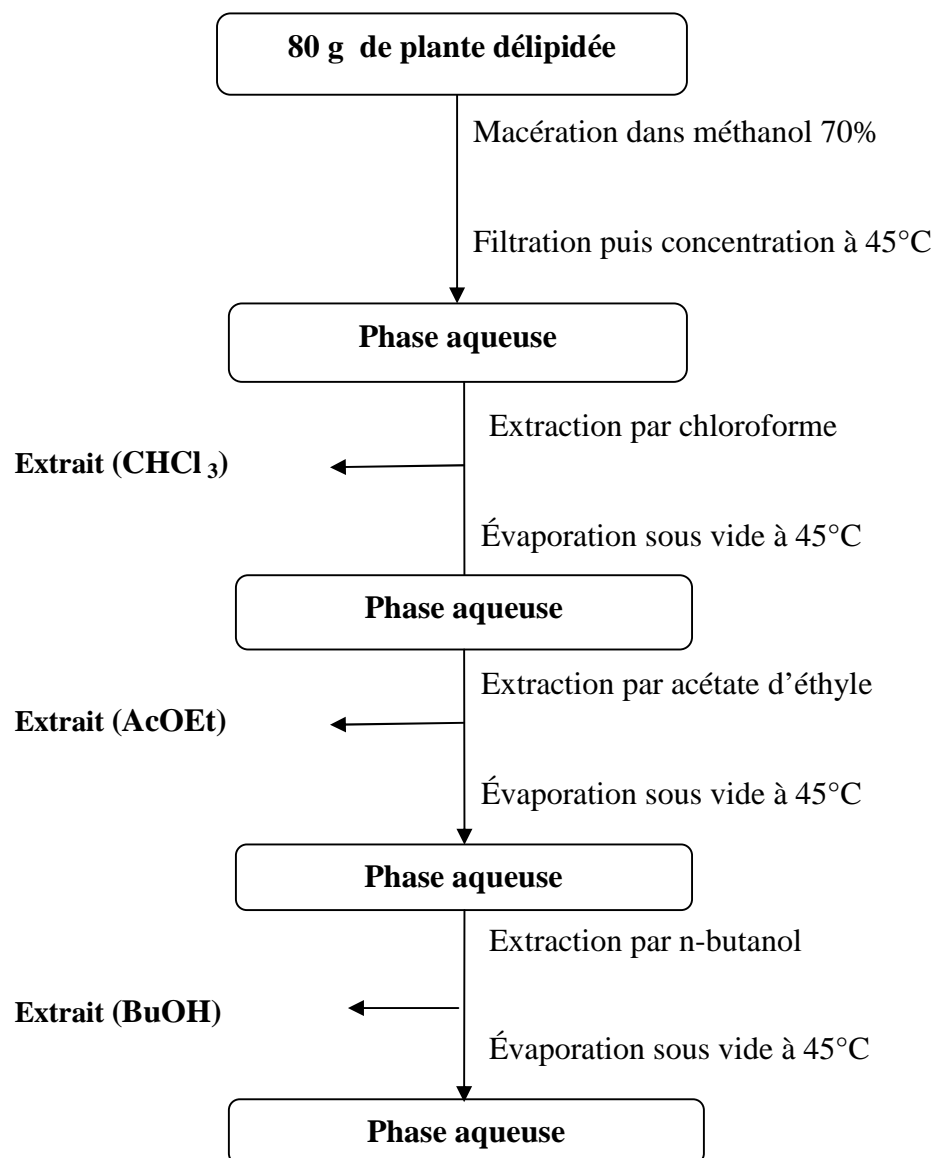


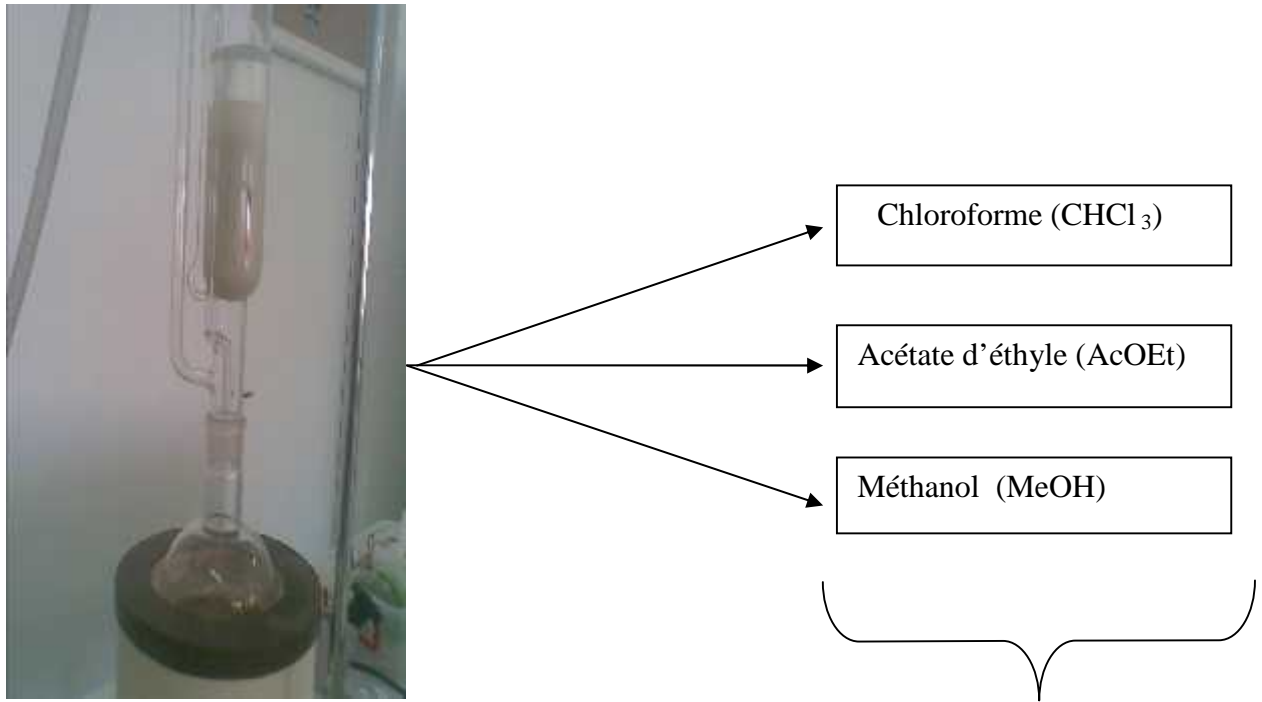
Figure 3 : Schéma illustrant l'extraction par macération.

II.3.1.2. Extraction à chaud (extraction au Soxhlet)

L'extraction au Soxhlet a été retenue comme technique d'extraction car elle favorise l'extraction relativement complète des métabolites présents dans la matrice végétale. Les extractions au Soxhlet ont été effectuées de façon séquentielle, en utilisant des solvants de polarité croissante (figure 4). Les solvants utilisés étaient le chloroforme (CHCl_3), l'acétate d'éthyle (AcOEt) et le méthanol (MeOH). Cette approche d'extraction permet de fractionner grossièrement les divers produits naturels de la matrice végétale.

Le corps de l'extracteur, contient une cartouche en cellulose remplie de 65 g de matière végétale délipidée en poudre, cette cartouche est fixée sur un réservoir (ballon) contenant 300 ml de solvant et est surmonté d'un réfrigérant. Le solvant est vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec le matériel végétal. La solution collectée dans le ballon s'enrichit de plus en plus en soluté à chaque cycle d'extraction et le matériel végétal est toujours en contact avec du solvant fraîchement distillé. L'extraction est terminée lorsque le solvant d'extraction devient de plus en plus clair c'est-à-dire sans une proportion significative de soluté. Après évaporation du solvant organique sous pression réduite à 45°C , le résidu sec de chaque solvant est pesé puis solubilisé dans l'éthanol à une concentration donnée.

Le protocole d'extraction au Soxhlet est résumé dans la figure 4:



Les trois extraits évaporés à sec.

Figure 4: Schéma illustrant l'extraction à chaud (L'appareil de Soxhlet)

II.3.2. Calcul de rendement

Le rendement en pourcentage (%), est défini comme étant le rapport entre la masse d'extrait et celle de la biomasse de la plante traitée. Il est calculé par la formule suivante :

$$\mathbf{Rdt = (PB / PA) \times 100}$$

Rdt : Rendement

PB : poids d'extrait brut.

PA : poids de la plante sèche en poudre.

II.3.3. Dosage des phénols totaux

Principe

Les phénols totaux ont été déterminés par spectrophotométrie en utilisant la méthode au réactif de Folin-Ciocalteu. Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué d'un mélange de deux acides : acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols pour former un complexe bleu stable d'oxydes de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum est au voisinage de 760 nm, est proportionnelle à la quantité des composés phénoliques présents dans les extraits végétaux.

La quantification des phénols totaux a été faite à l'aide d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = ax$), réalisée dans les mêmes conditions que celles de l'échantillon, en utilisant l'acide gallique comme standard (figure 5). Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalents de l'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g).

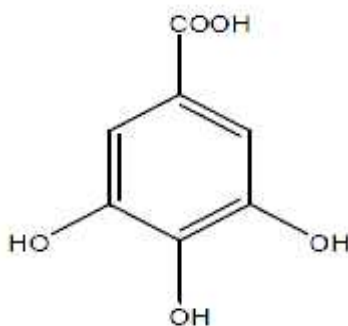


Figure 5: Structure de l'acide gallique.

Protocole expérimental

La méthode adoptée pour le dosage des phénols totaux est celle décrite par Kim et ses collaborateurs (Kim et *al.* 2003) avec une légère modification.

Une quantité de 100 µl de l'extrait convenablement dilué dans l'EtOH est mélangée avec 1ml du réactif de Folin–Ciocalteu (10 fois dilué) fraîchement préparé.

Après 5 minutes, une solution de Na₂CO₃ à 7 % (1 ml) est ajoutée tout en agitant. La solution est immédiatement diluée par 400 µl avec de l'eau distillée et le mélange est agité vigoureusement.

Après une incubation de 90 min dans l'obscurité et à la température ambiante, l'absorbance est mesurée à 750 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (JENWAY 6300 visible Spectrophotometer), contre un blanc (le même mélange excepté l'extrait qui est remplacé par 100 µl d'EtOH). La teneur en phénols est exprimée en mg EAG/g extrait. Tous les essais sont reproduits trois fois.

La teneur en composés phénoliques des échantillons analysés est calculée par la formule suivante :

$$\mathbf{TCP = 100. C. V / m}$$

TCP: Teneur en composés phénoliques ;

C : Concentration de l'extrait ;

V : Volume de solvant utilisé pour l'extraction ;

m : Masse en grammes de la prise d'essai.

Courbe d'étalonnage

A partir d'une solution mère de l'acide gallique de 200 mg/l, une série de solutions filles est ainsi préparée, de concentrations allant de 20 à 200 mg/l. Ensuite, nous avons suivi le même protocole entrepris pour doser les échantillons.

II.3.4. Dosage des flavonoïdes

La méthode décrite par Kim et ses collaborateurs (Kim et *al.* 2003) est adoptée pour déterminer la teneur en flavonoïdes dans les différents extraits de la plante *Ammodaucus leucotrichus*. Un volume de 400 µl de chaque extrait convenablement dilué dans l'éthanol (étalon ou l'éthanol pour le témoin) est ajouté à 120 µl de NaNO₂ à 5%. Après 5 minutes, on ajoute 120 µl d'AlCl₃ à 10%. Ensuite, après 6 minutes, on ajoute 800 µl de NaOH (1M). La solution est bien homogénéisée et l'absorbance a été mesurée immédiatement à 510 nm.

La teneur en flavonoïdes dans les extraits est calculée à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la catéchine (0-120 mg/l).

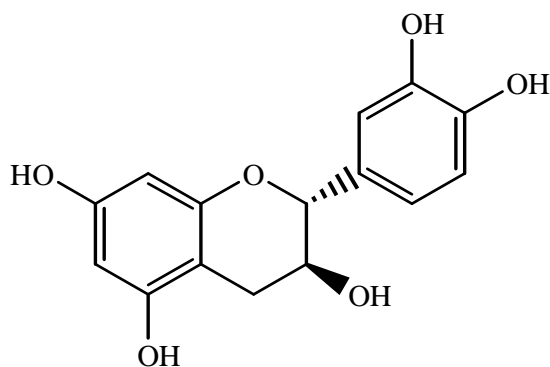


Figure 6: Structure de la catéchine.

II.3.5. Evaluation du pouvoir antiradicalaire par le test au DPPH

Principe

Des nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques purs ou des extraits. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel.

La molécule de 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre stable, dont la solution possède une coloration violette et une absorption caractéristique à 517 nm. Quand une solution de DPPH est mélangée avec une substance donneuse d'atomes d'hydrogène, antioxydante, il y'a formation de la forme réduite (figure 7). Ceci provoque la perte de la coloration violette en coloration jaune (Molyneux, 2004) caractérisée par une bande d'absorption dans le visible à 517 nm (Brand-Williams, 1995).

Protocole expérimental

L'effet piègeur ou le pouvoir antiradicalaire des extraits de la plante étudiée vis-à-vis du radical DPPH' est évalué selon la méthode décrite par Hansraj et ses collaborateurs (Hansraj et al. 2006) en y apportant quelques modifications. Un volume de 2 ml de la solution de DPPH' (0.2 mM) préparée dans l'éthanol 80% est mélangé avec 2 ml des solutions d'extraits ou des antioxydants de référence (Vitamine C, Vitamine E, Trolox, BHA) à différentes concentrations. Après 20 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est lue à 517 nm. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (PI%).

$$\text{PI\%} = [(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

Abs contrôle : absorbance du contrôle (solution de DPPH sans extrait).

Abs échantillon : absorbance en présence d'extrait ou de standard.

La concentration efficace (EC_{50}) qui est la concentration d'extrait de plante ou de l'antioxydant de référence responsable de 50% d'inhibition des radicaux DPPH, est déterminée sur le graphique représentant le pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des extraits ou des antioxydants de référence.

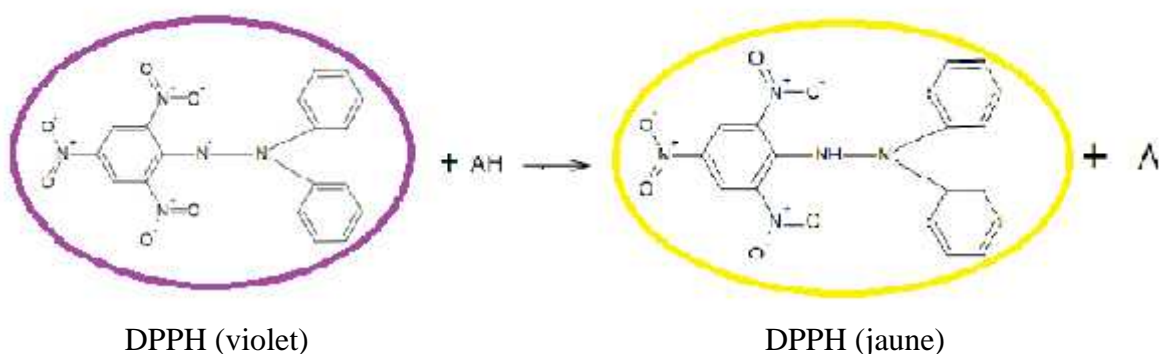


Figure 7: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH[•] entre l'espèce radicalaire DPPH[•] et un antioxydant (AH).

II.3.6. Analyse des extraits par CCM analytique

La chromatographie sur couche mince CCM est une technique de séparation des constituants d'un mélange complexe par entraînement à l'aide d'une phase mobile (solvant) le long d'une phase stationnaire (gel de silice) en se basant sur les phénomènes d'adsorption et de partage. La séparation a été effectuée en utilisant une plaque CCM analytique de dimension (9 cm × 10 cm) en gel de silice avec deux systèmes d'élution :

- ❖ Acétate d'éthyle/Hexane (3/7) en (v/v) pour les extraits de chloroforme et d'acétate d'éthyle.
- ❖ n-Butanol/Acide acétique/l'eau (60 /15 /25) en (v/v/v) pour les extraits de n-Butanol et de méthanol (Diallo et al. 2004).

Après migration, la plaque est séchée à l'air libre et révélée par une lampe UV à deux longueurs d'onde = 365, 254 nm et par le diiode.

II.3.7. Fractionnement de l'extrait butanolique par chromatographie sur colonne

Dans une colonne de 3 cm x 50 cm est ajouté une petite quantité de coton qui empêche le gel de silice de s'échapper par la valve. 30 g de gel de silice en suspension dans le chloroforme ont été utilisés pour le montage de la colonne. L'extrait butanolique (1 g) sous forme de poudre a été mélangé avec une petite quantité de silice, le tout est ajouté délicatement au sommet de la colonne. En premier lieu, nous avons procédé à un lavage de la colonne par chloroforme afin d'éliminer le chlorophylle. L'élution est contrôlée par des CCM analytiques visualisés sous lampe UV à 365 et 254 nm. Le tableau I résume les volumes, la composition de l'éluant et le numéro de fraction des solvants utilisés pour effectuer la chromatographie.

Tableau I: Fractionnement de l'extrait butanolique.

Solvant	Volume de fraction	Fractions	
AcOEt-MeOH			
100 % - 0 %	100 ml	F 1	F 1
90 % - 10 %	250 ml		
85 % - 15 %	100 ml		
80 % - 20 %	250 ml	F 3	F 2
70 % - 30 %	250 ml		
60 % - 40 %	100 ml	F 4 – F 5	F 3
50 % - 50 %	100 ml	F 6	F 4
40 % - 60 %	250 ml		
0 % - 100%	250 ml	F 7	F 5

III. Résultats et discussions

III.1. Détermination de rendement d'extraction :

Dans ce travail, deux procédés d'extraction ont été utilisés. Dans le but de pouvoir comparer les résultats découlant des différents tests et analyses mises au point dans la présente étude, nous avons retenu les mêmes solvants organiques employés de façon séquentielle, en commençant par le solvant le moins polaire le chloroforme et on termine l'extraction par le solvant le plus polaire le n-butanol qui est remplacé dans la méthode d'extraction au Soxhlet, par le méthanol, un solvant plus commode. Les rendements des extractions sont mentionnés dans le tableau ci-après.

Tableau II : Rendements obtenus des deux procédés d'extraction.

Méthode d'extraction	Extrait	Rendement (%)
Macération	CHCl ₃	1,05
	AcEOt	1,05
	n-BuOH	2,87
Soxhlet	CHCl ₃	1,09
	AcEOt	2,01
	MeOH	1,58

D'après le tableau 2, le rendement le plus élevé dans les deux méthodes d'extraction a été enregistré avec le solvant n-BuOH (macération) suivi par l'AcEOt (Soxhlet), avec des pourcentages de 2.87 et 2.01 % respectivement.

Remarquablement, les deux solvants CHCl₃ et AcEOt ont donné en macération le même rendement (1.05%), quasi similaire de celui de CHCl₃ dans la méthode d'extraction au Soxhlet (1.09%).

La figure ci-dessous présente les rendements des différents extraits :

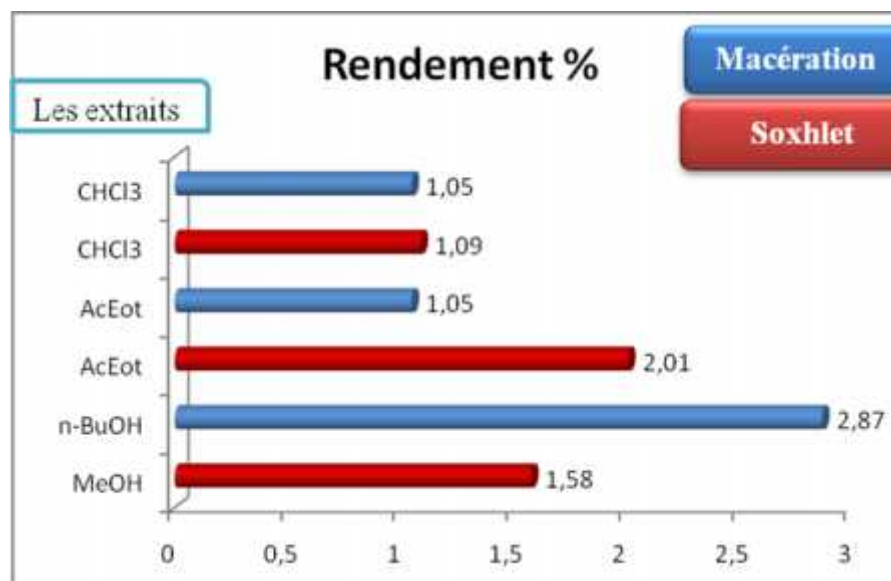


Figure 8: Histogramme représentant les rendements des deux procédés d'extraction.

III.2. Teneur en phénols totaux et flavonoïdes et pouvoir antioxydant

Nous avons quantifié les composés phénoliques dans les différents extraits issus des deux procédés d'extraction (macération et Soxhlet) de la plante médicinale étudiée *Ammodaucus leucotrichus*.

La raison principale du choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes des plantes leur sont attribués. La méthode de dosage des phénols totaux est celle dans laquelle on utilise le réactif de Folin-Ciocalteu (Kim et *al.* 2003). L'acide gallique a été utilisé comme standard. Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (Kim et *al.* 2003 ; Zhishen et *al.* 1999) en utilisant comme standard la catéchine. La teneur en phénols totaux et flavonoïdes est exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique (EAG) et catéchine (ECAT) par gramme d'extrait de plante sèche. Les courbes d'étalonnages sont représentées dans les figures 9 et 10.

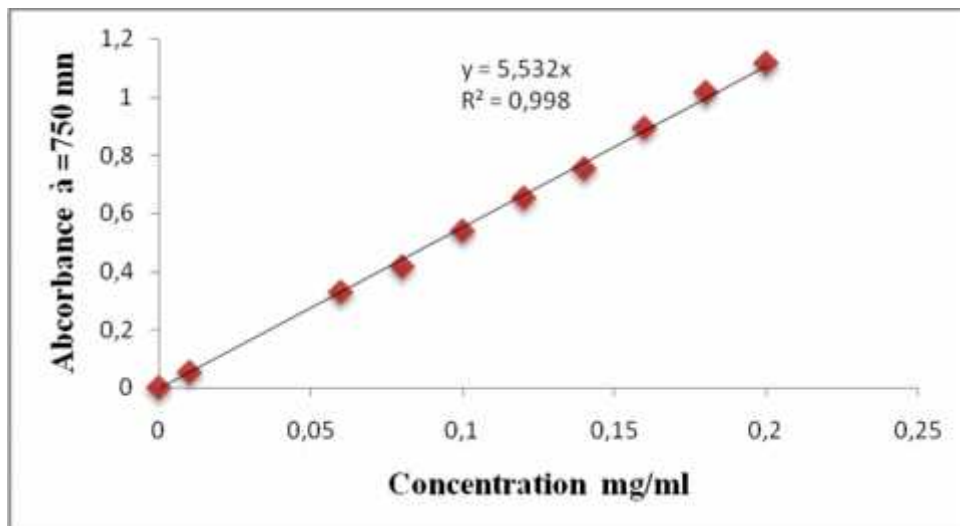


Figure 9: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

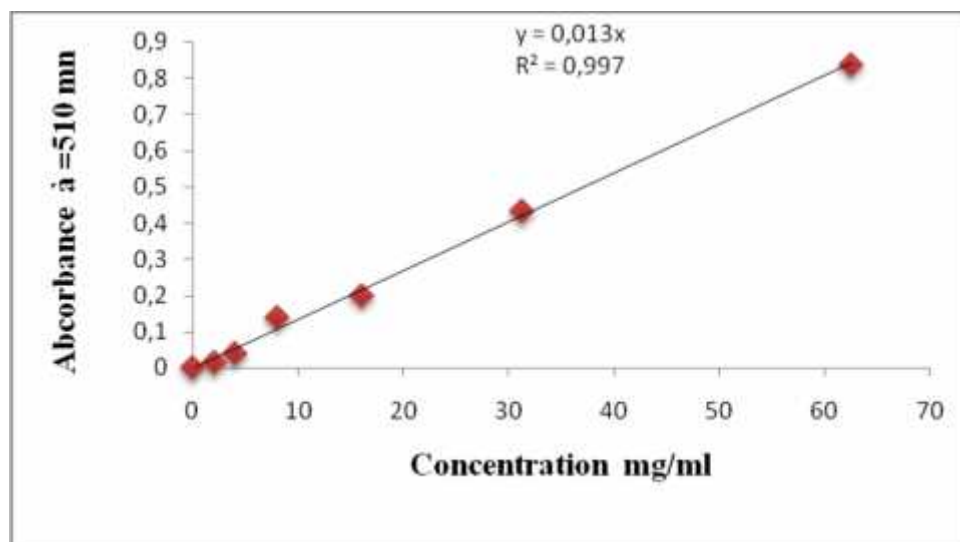


Figure 10: Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

L'activité antiradicalaire est très importante du fait du rôle délétère des radicaux libres dans le domaine alimentaire et dans les systèmes biologiques. La méthode du radical de DPPH, utilisée dans la présente étude, est une procédure commune dans laquelle l'activité antioxydante de l'échantillon étudié est estimée par le degré de décoloration de la solution de DPPH. Ce chromogène violet, facile à utiliser et d'une grande sensibilité, permet l'analyse rapide de l'activité antioxydante d'un grand nombre d'échantillons et donne des résultats reproductibles. Les capacités antioxydantes de nos extraits et des standards sont représentées

par les valeurs d'EC₅₀ déterminées à partir des courbes représentant les pourcentages d'inhibition (PI%) en fonction des concentrations de chaque extrait et de chaque standard (figure 12, 13, 14 et 15). Les teneurs et les valeurs d'EC₅₀ sont mentionnés dans le tableau ci-après.

Tableau III: Teneur en phénols totaux et flavonoïdes et valeurs d'EC₅₀.

Méthode d'extraction	L'extrait et standards	Teneur		EC ₅₀ (mg/l)
		phénols totaux (mg/g) EAG	Flavonoïdes (mg/g) ECAT	
Macération	CHCl ₃	40,371 ± 0,685	37,960 ± 6,276	262,89 ± 0,772
	AcEOt	312,424 ± 23,457	231,381 ± 12,867	42,25 ± 0,941
	n-BuOH	165,401 ± 18,076	136,177 ± 5,587	8,84 ± 0,543
Soxhlet	CHCl ₃	73,602 ± 0,279	46,999 ± 5,321	557,24 ± 1,304
	AcEOt	228,36 ± 5,964	221,438 ± 11,749	229,72 ± 0,340
	MeOH	331,254 ± 2,259	153,651 ± 12,895	93,34 ± 0,003
	V C	////	////	14,23 ± 0,015
	Trolox			16,30 ± 0,003
	BHA			16,83 ± 0,006
	V E			14,66 ± 0,010

Les valeurs représentent la moyenne de trois essais ± Ecart type.

D'après les résultats obtenus, on constate que les teneurs en composés phénoliques totaux et flavonoïdes des différents extraits varient entre 40,371 et 331,254 mg EAG/g pour les phénols totaux et entre 73,602 et 231,381 mg CAT /g pour les flavonoïdes. On constate aussi que la teneur en phénols totaux est toujours supérieure à la teneur en flavonoïdes. A l'exception avec solvant AcEOt, l'extraction au Soxhlet s'est montrée plus efficace que la macération en terme d'extraction des composés phénoliques et flavonoïdes. Par contre, les extraits issus de la macération possèdent les meilleurs pouvoirs antiradicalaires. Le solvant n-butanol donne l'extrait le plus actif avec une valeur d'EC₅₀ de 8.84 mg/l. Il est à signaler que cet extrait butanolique est presque deux fois plus actif que les quatre standards utilisés dans cette étude. A la lumière des ces résultats, on peut conclure que l'extraction au Soxhlet est la meilleure méthode en terme de quantité, pour extraire plus de composés phénoliques, et la macération est la méthode la mieux appropriée pour avoir des composés phénoliques de qualité dotés du pouvoir antioxydant.

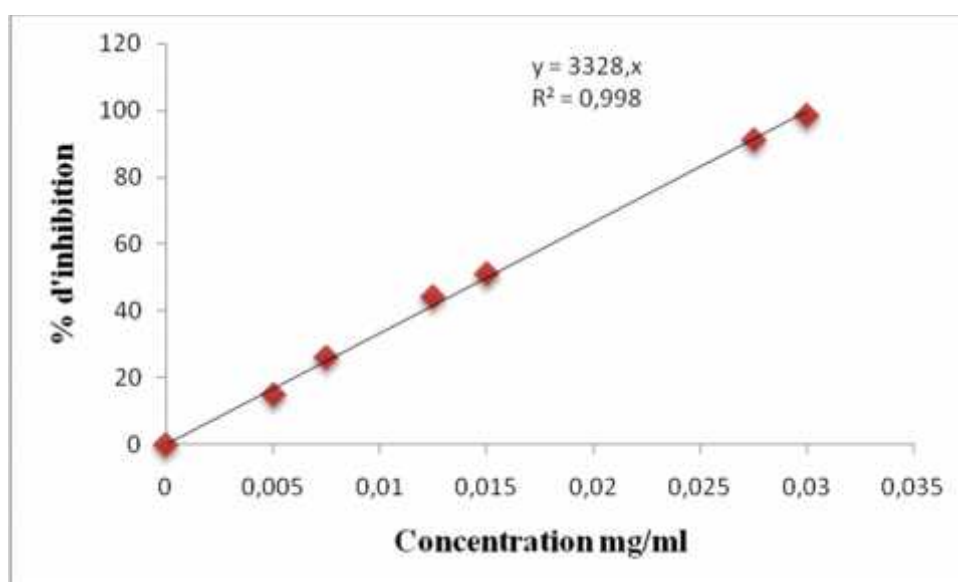


Figure 11: Pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration de la VC.

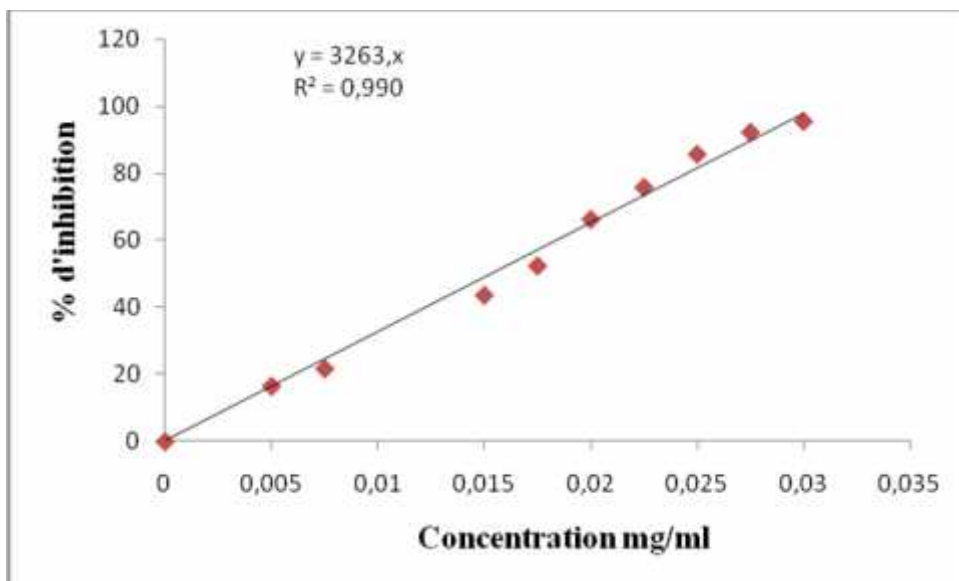


Figure 12: Pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration de la BHA.

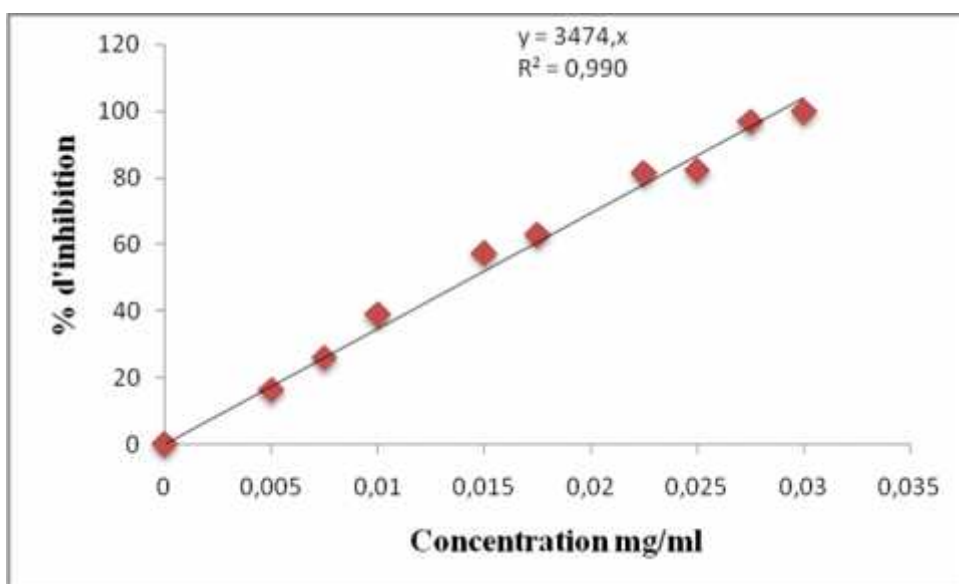


Figure 13: Pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration de la VE.

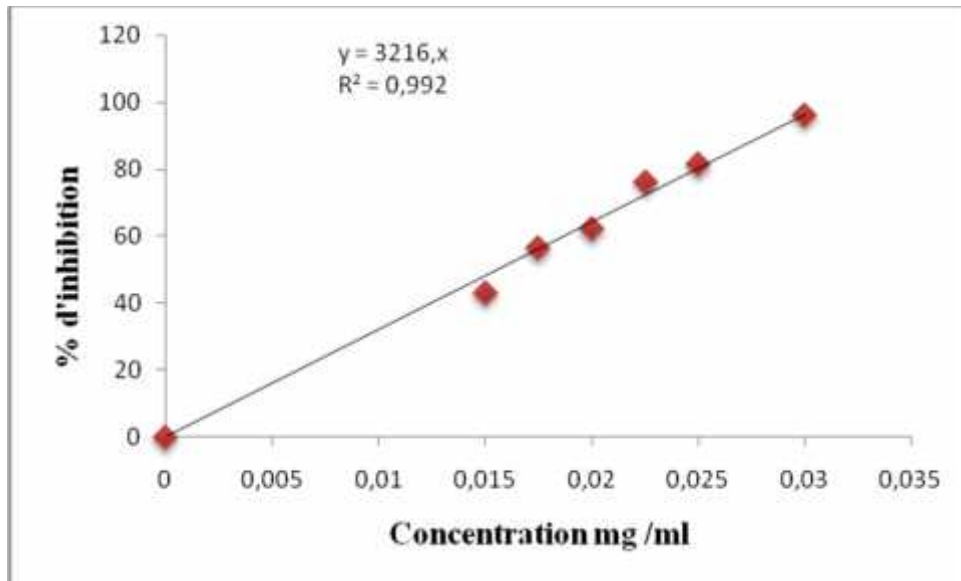


Figure 14: Pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration de la Trolox.

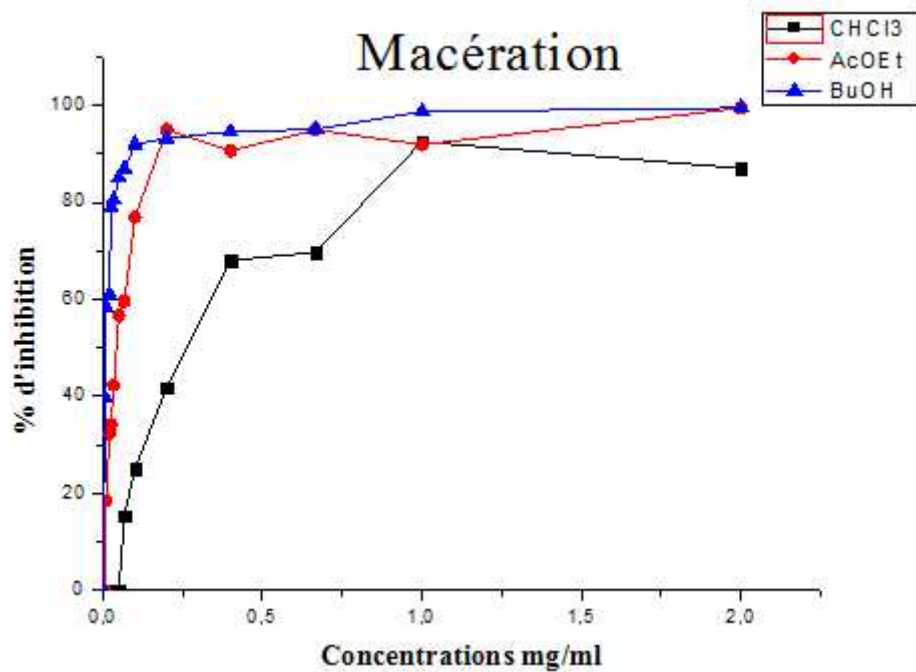


Figure 15: Pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration de méthode Macération.

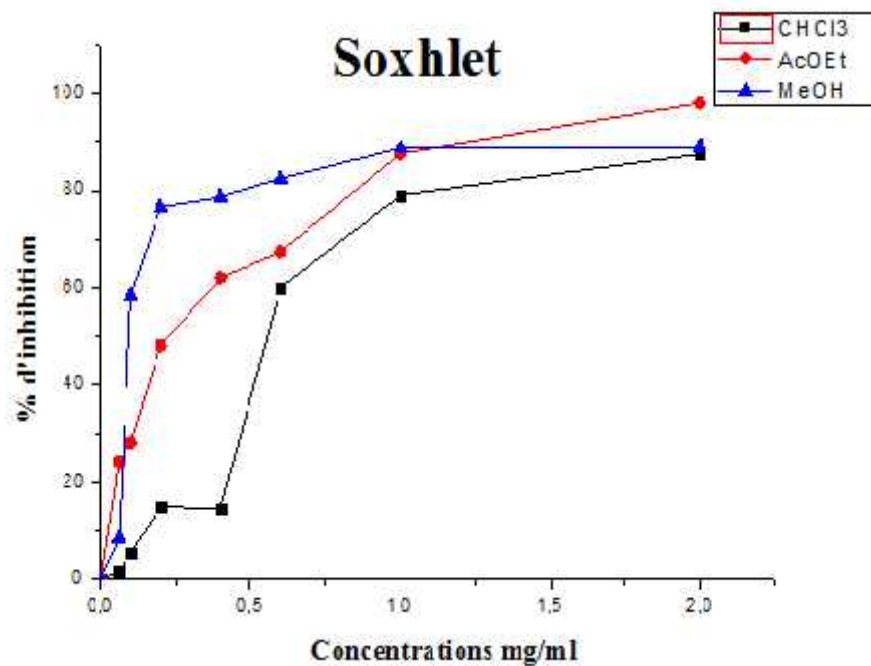


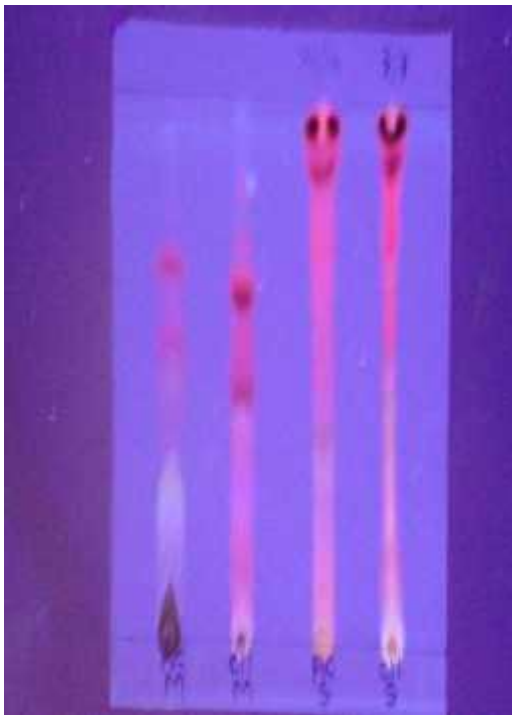
Figure 16: Pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration de méthode Soxhlet.

III.3. Chromatographie sur couches minces (CCM)

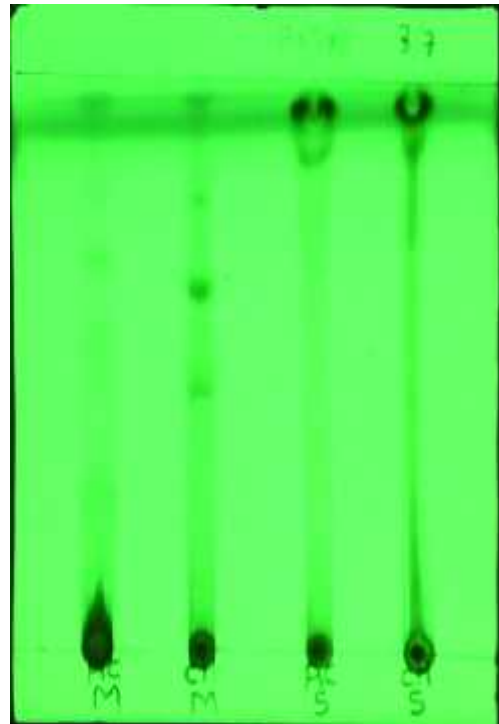
Par ses faibles contraintes techniques, son emploi simple et son coût modeste, la CCM est un outil de choix pour l'analyse phytochimiques de fractions, ainsi que de produits purs isolés.

De ce fait nous avons opté pour cette technique dans le but de caractériser les différents constituants des extraits qui ont permis d'avoir une très bonne séparation chromatographique et une visibilité acceptable des spots.

Les CCM analytiques des différents extraits montraient clairement que les extraits polaire (n-BuOH et MeOH) sont plus riches en composés que les autres extraits ce qui signifie que la polarité élevée contenant plus de produits polaire que les produits apolaire. Les extraits CHCl3 et Acétate dans les deux méthodes présentent presque le même profil chromatographique ce qui implique qu'ils ont des compositions chimiques similaires.



Révéle à 365 mn

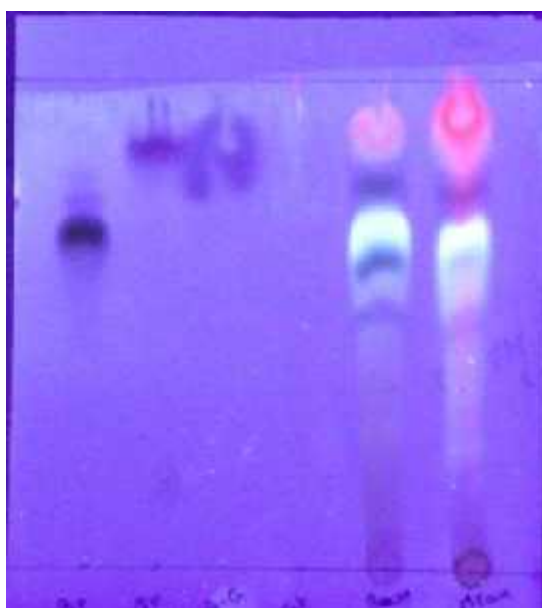


Révéle à 254 nm

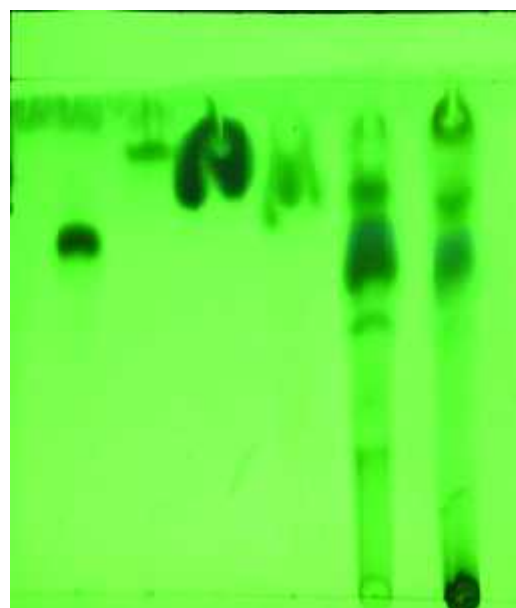


Révéle par Diode

Figure 17: Chromatogrammes analytiques des extraits de droite à gauche: Chloroforme, Acétate d'ethyle (Soxhlet) et Chloroforme, Acétate d'ethyle (Macération).



Révéle à 365 mn



Révéle à 254 nm



Révéle par Diode

Figure 18: Chromatogrammes analytiques des extraits et standards de droite à gauche: n-butanol, Méthanol, Catéchine, Acide gallique, Quercitine, Rutine.

III.4. Fractionnement de l'extrait butanolique par chromatographie sur colonne

Nous avons opté au fractionnement de l'extrait butanolique afin de trouver les molécules individuelles responsables à l'activité antioxydante. Pour cela, une séparation chromatographique par CCM préparative a été accomplie après avoir choisi les bonnes conditions pour purification notamment la phase mobile.

On a obtenu sept fractions, les fractions 1 et 2 contiennent principalement de la chlorophylle, la fraction 3 est un complexe et les fractions 4 et 5 sont rassemblées par ce qu'elles présentent le même profil chromatographique. Les fractions 6 et 7 sont obtenues à l'état de trace.

IV. CONCLUSION

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante que la chimiothérapie. Ce regain d'intérêt vient d'une part, du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs, et d'autre part, du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires.

Les extraits naturels issus des plantes contiennent une variété de composés phénoliques auxquelles on attribue des capacités antioxydantes.

Dans le présent travail, on s'est intéressé à la quantification des phénols totaux et des flavonoïdes et à la mesure du pouvoir antioxydants des différents extraits obtenus par deux méthodes d'extraction, Soxhlet et macération d'une plante médicinale: *Ammodaucus lecotrichus*, largement utilisées en médecine traditionnelle dans le sud Algérien.

Les résultats obtenus ont montré une bonne activité antioxydante de certains extraits notamment l'extrait butanolique obtenu par macération.

Ainsi, des études complémentaires restent nécessaires pour approfondir les résultats obtenus et déterminer les molécules actives responsables de cette activité.

V. Références bibliographiques

*Bahorun T (1997). Substances naturelles actives. La flore Mauricienne .une source d’approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research council Mauritius. pp 83-94.

*Bourgou, S., Ksouri, R., Bellila,A., Skandrani, I., Falleh, H., Marzouk, B (2008). Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa*L. shoots and roots.C. R. Biologies, 331: p 48–55.

*Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm. Wiss. Technol.* 28: p 25-30.

*Bubonja-Sonje M, Giacometti J and Abram M (2011). Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*, 127, 1821-1827.

*Diallo D., Sanogo R., Yasambou H., Traré A., Coulibaly K., Maïga A. (2004). Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* lam. (Rhamnaceae) utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *C.R.Chimie*, 7 :1073-1080.

*Gulcin I, Huyut Z, Elmastas M and Aboul-Enein H Y (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3, 43-53.

*Hansraj, D. Ou, B., Prior, R.L (2006). The chemistry behind antioxidant capacity assay. *Jornal of Agricultural and Food chemistry*, 1841-1856, p 53.

*Hellal.Z. (2011), Contribution à l’étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de Magister, Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou.

*Hu F B (2003). Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 544-551.

*Ketsawatsakul U, Whiteman M and Halliwell B (2000). A reevaluation of the peroxynitrite scavenging activity of some dietary phenolics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279, 692-699.

*Kim, D.O., Seung, W.J. and Lee C.Y (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81 321–326.

*Majhenic L., Kerget M.S., et Knez Z (2007), Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 1258–1268, p104.

*Robards, M.D., Piatt, J.F., Rose, G.A., (1999). Maturation, fecundity, and intertidal spawning of Pacific sand lance (*Ammodytes hexapterus*) in the northern Gulf of Alaska. *J. Fish. Biol*, 1050–1068, p54.

*Turkmen, N., Velioglu, Y. S, Sari, F., Polat,G (2007). Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*: 484-496, p12.

*Zhishen, J., Mengcheng T. and Jianming W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64 555- 559.

Résumé :

La recherche actuelle porte essentiellement sur l'étude de molécules antioxydantes d'origine naturelle. Dans ce contexte nous avons tenté d'évaluer l'activité antioxydante des extraits préparés à partir de *Ammodaucus leucotrichus*. L'analyse quantitative de ces extraits, a donné des teneurs allant de 40.371 à 331.254 mg EAG/g d'extrait en composés phénoliques et de 37.960 à 231.381 mg ECAT/g d'extrait en flavonoïdes.

L'évaluation quantitative du pouvoir piégeur des extraits vis-à-vis du DPPH confirme que l'extrait butanolique est le plus actif, avec une valeur d'EC₅₀ de l'ordre de 8.84 mg/l. Cet extrait s'est montré presque deux fois plus actif que les quatre standards utilisés dans cette étude à savoir : VC, VE, Trolox, BHA dont les valeurs d'EC₅₀ sont respectivement 14.23, 14.66, 16.30, 16.83 mg/l.

D'après les résultats obtenus dans ce travail, la plante *Ammodaucus leucotrichus* pourrait constituer une source importante d'antioxydants naturels.

Mots clés: *Ammodaucus leucotrichus*, molécules antioxydantes, Activité antioxydante, les composés phénoliques.

:

العلمية الحديثة	الطبية تهتم	النشاطية	هذا السياق
التجريبية	تقدير النشاطية	<i>Ammodaucus leucotrichus</i>	
التقدير	الفينولية أنها	الترتيب بين 40,371 331,254 ميليغرام	
الغاليك /	الفينولية و بين	37,960 231,381 ميليغرام مكافئ الكاتوشين /	
للفلافنويدات	تعيين		
" n-butanol " يمتلك	عالية	8,84 ميليغرام /	هذا المستخلص
اظهر فعالية تقريبا مضاعفة لمضادات الاكسدة المعيارية الاربعة VC, VE, Trolox, BHA ذات القيم المتتالية:			
14.23, 14.66, 16.30, 16.83 ميليغرام /			
التجريبية	<i>Ammodaucus leucotrichus</i>	عالية	.
فتاحية : <i>Ammodaucus leucotrichus</i> الجزيئات الطبيعية، الفينولية.			