

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

**UNIVERSITE DE SAÏDA - Dr MOULAY TAHAR**



**FACULTE DES SCIENCES**  
**Département de Chimie**

## **MEMOIRE**

Présenté par :

**MOSTEFAI Chafika**

**MANSOURI Fatima Zahra**

*En vue de l'obtention du*

**Diplôme de Master en Chimie**

Spécialité : Chimie Organique

### **Thème**

**Optimisation de l'extraction de biomolécules à partir de plantes :  
analyse et applications**

Soutenu le 01/07/2020, devant le jury composé de :

Président	OUICI Houari Boumediene	MCA	Université de Saida
Encadrant	ZAOUI Fatiha	MCA	Université de Saida
Examinatrice	RAMDANI Amina	MCA	Université de Saida
Co-encadreur	ZAOUI Oussama	DOCTORANT	Université d'Ouargla

Année universitaire 2019/2020

## REMERCIEMENT

*Le présent travail a été effectué au laboratoire de chimie ORGANIQUE à l'université de  
Dr. Moulay Tahar Saïda.*

*À travers ce modeste travail, nous tenons à remercier vivement notre encadreuse Mme  
ZAOUI FATIHA pour l'intéressante documentation qu'elle a mise à notre disposition,  
pour ses conseils précieux et pour toutes les commodités et l'assistance qu'elle nous a  
apportées durant notre étude et réalisation de ce travail.*

*Un grand merci à Mr Oussama ZAOUI notre Co-encadreur pour nous aidez a mener  
bien ce travail.*

*Nos remerciements les plus vifs s'adressent aussi à Mr le président Mr Houari OUICI et  
le membre de jury Mme Amina RAMDANI d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer notre  
travail.*

*Nous exprimons également notre gratitude à tous les enseignants qui ont collaboré à notre  
formation depuis notre premier cycle d'étude jusqu'à la fin de notre cursus universitaire.*

*À tous nos collègues d'université et nos camarades du laboratoire, nous leur sommes  
redevable des meilleures moments qu'on a passés ensemble.*

*Nous terminons en pensant, sans les nommer, à tous ceux que nous avons croisé notre  
chemin et qui ont contribué à rendre possible notre parcours.*

# Dédicace

Je dédie ce mémoire :

A mes très chers parents

Qui sont à l'origine de tous ce que je suis aujourd'hui,

Et qui ont sacrifié leur vie pour moi

A toute la famille « MOSTEFAI »

A mon frère

A mes très chères sœurs

A toute mes amies

A tous mes camarades

A mes enseignants

**MOSTEFAI CHAFIKA**

# Dédicace

Je dédie ce mémoire :

A mes très chers parents

Qui sont à l'origine de tous ce que

je suis aujourd'hui, Et qui ont

sacrifié leur vie pour moi

A toute la famille

«MANSOURI et TENNAH»

A mon frère

A mes très chères sœurs

A tous mes amies

A tous mes camarades

A mes enseignants

**MANSOURI FATIMA ZAHRA**

## SOMMAIRE

<b>Introduction générale</b> .....	1
<b>Chapitre I : Etude bibliographique</b>	
<b>I.1 Généralité sur la famille des Fabaceae</b> .....	3
<b>I.2 Rétama raetam</b> .....	3
<b>I.2.1 Description botanique de rétama raetam.</b> .....	3
<b>I.2.2 Systématique de Retama raetam</b> ..	4
<b>I.2.3 Importances de Retama raetam</b> .....	4
<b>I.2.4 Composition chimique</b> .....	5
<b>I.3 Calycotome spinosa</b> .....	5
<b>I.3.1 Description botanique de Calycotome spinosa</b> .....	5
<b>I.3.2 Classification de l'espèce Calycotome spinosa</b> .....	6
<b>I.3.3 Utilisation de la plante</b> .....	6
-Intérêt pharmacologique ... ..	6
<b>I.3.4 Composition chimique</b> .....	6
<b>I.4 Métabolite primaire</b> .....	7
<b>I.5 Les métabolites secondaires</b> .....	7
<b>I.5.1 Les huiles essentielles</b> .....	7
<b>I.5.2 Les alcaloïdes</b> .....	7
<b>I.5.2.1 Classification</b> .....	8
<b>I.5.2.2 Propriétés pharmacologique des alcaloïdes</b> .....	8
<b>I.5.3 Les polyphénols</b> .....	9
<b>I.5.3.1 Biosynthèse des polyphénols</b> .....	9
<b>I.5.3.2. Les principales classes de composés phénoliques dans les plantes</b> .....	9
<b>I.5.3.3 Classification des polyphénols</b> .....	10
a)- Acides phénoliques .....	10
b)- Flavonoïdes .....	11
c)- Tanins .....	12
d)- Les saponines .....	12
<b>I.6 Les différentes méthodes d'extraction</b> .....	12

I.6.1	Percolation	12
I.6.2	Infusion	13
I.6.3	Décoction	13
I.6.4	Macération	13
I.6.5	Digestion	13
I.6.6	L'hydro-distillation	13
I.6.7	Extraction à reflux	14
I.6.8	Extraction au soxhlet	14
I.6.9	Extraction assistée par micro-ondes	14
I.6.9.1	Mécanisme d'extraction par micro-ondes	14
I.7	Activité antioxydante	14
I.7.1	Les radicaux libres	14
I.7.2	Stress oxydatif	14
I.7.3	Antioxydants	14
I.7.4	Pouvoir anti radicalaire par la méthode du DPPH	16
I.7.5	Le pouvoir réducteur de fer/antioxydant FRAP	16

## Références bibliographiques

### Chapitre II : partie expérimentale

Introduction	24
II.1 Matériel végétal et Échantillonles	24
II.1.1Collecte de l'échantillon de <i>Retama Retam</i>	24
II.1.1.1Présentation du site de récolte	24
I.1.2Collecte de l'échantillon <i>Calycotome Spinosa</i>	25
I.1.2.1Présentation du site de récolte	25
II.1.3 Préparation des échantillons	26
II.2 Screening phytochimique	27
II.2.1Caractérisation des composés phénoliques	27
II.2.1.1Caractérisation des Flavonoïdes	27
II.2.1.2Caractérisation des tanins	28
II.2.2Caractérisation des alcaloïdes	28
II.2.2.1Extraction par solvant organique apolaire et l'analyse phytochimique	28
II.3 Extraction des huiles essentielles	28

<b>II.4</b> Extraction des alcaloïdes .....	29
<b>II.4.1</b> Extraction des alcaloïdes totaux ( fixes) .....	29
<b>II.4.1.1</b> Extraction par les solvants organiques apolaires en milieu alcalin (Stas–Otto) .....	29
<b>II.4.1.2</b> Extraction par l’alcool acide .....	30
<b>II.4.2</b> Extraction des alcaloïdes volatiles .....	33
<b>II.5</b> Extraction des composés phénolique .....	35
<b>II.5.1</b> Extraction des composés phénolique par macération .....	35
<b>II.5.2</b> Extraction des composés phénolique par soxhlet .....	36
<b>II.5.3</b> Extraction assisté par micro-ondes .....	36
<b>II.6</b> Extraction des flavonoïdes .....	37
<b>II.6.1</b> Affrontement par l’ether de pétrole .....	37
<b>II.6.2</b> Affrontement par chloroforme .....	38
<b>II.6.3.</b> Affrontement par l’acétate d’éthyle .....	38
<b>II.6.4.</b> Affrontement par le n-butanol .....	39
<b>II.7</b> Dosage de polyphénols .....	43
<b>II.8</b> Dosage de flavonoïdes .....	44
<b>II.9</b> Activité antioxydante .....	45
<b>II.9.1</b> Activité de piégeage des radicaux libres DPPH .....	45
<b>II.9.2</b> Test de la réduction de fer FARP .....	46
<b>II.10</b> Optimisation des conditions d’extraction par la méthodologie de surface de réponse .....	48
<b>II.10.1</b> Etudes préliminaires .....	48
<b>II.10.1.1</b> Choix du solvant .....	48
<b>II.10.1.2</b> Concentration de solvant .....	48
<b>II.10.1.3</b> Temps d’extraction .....	48
<b>II.10.1.4</b> La Puissance .....	48
<b>II.10.1.5</b> Ratio solide/liquide .....	49
<b>II.10.2</b> Construction du plan .....	49
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Chapitre III : Résultats et discussions</b>	
<b>Introduction</b> .....	53
<b>III.1</b> Screening phytochimique .....	53
<b>III.2</b> Extraction des huiles essentielles .....	55

<b>III.3</b> Extraction des alcaloïdes .....	55
<b>III.3.1</b> Alcaloïdes fixes .....	55
<b>III.3.1.1</b> Aspect des extraits brutes .....	55
<b>III.3.1.2</b> Rendement d'extraction des alcaloïdes .....	56
<b>III .4</b> Extraction des polyphénols .....	56
<b>III .4.1</b> Aspect des extraits brutes .....	56
<b>III .4.2</b> Rendement d'extraction des composés phénoliques .....	57
<b>III .5</b> Extraction spécifique aux flavonoïdes .....	58
<b>III .5.1</b> Rendement d'extraction des flavonoïdes par affrontement de solvants .....	58
<b>III.6</b> Dosage de polyphénols .....	59
<b>III.7</b> Activité anti oxydante .....	60
<b>III.7.1</b> Activité de piégeage des radicaux libres (DPPH) .....	60
<b>III.7.1</b> Test de la réduction du fer FRAP .....	61
<b>III.8</b> Optimisation des conditions d'extraction par la méthodologie de surfaces .....	62
des réponses	
<b>III.8.1</b> La plante <i>Retama Raetam</i> .....	62
<b>III.8.1.1</b> Tests préliminaires .....	62
<b>III.8.1.2.</b> La méthodologie de surface de réponses .....	63
<b>III.8.1.2.1</b> Construction du plan expérimental .....	63
<b>III.8.1.2.2</b> Construction du plan d'expérience Plan d'expérience BBD .....	64
<b>III.8.1.2.3</b> Analyse des résultats .....	65
<b>III.8.1.2.3.1</b> Analyse de la variance (ANOVA) .....	65
<b>III.8.1.2.3.2</b> Coefficient de détermination R <sup>2</sup> .....	65
<b>III.8.1.2.3.2</b> Effets des facteurs .....	66
<b>III.8.1.2.4</b> Modèle mathématique .....	68
<b>III.8.1.2.5</b> Conditions optimales.....	69
<b>III.8.2</b> La plante <i>Calycotome Spinosa</i> .....	69
<b>III.8.2.1</b> Tests préliminaires .....	69
<b>III.8.2.2</b> La méthodologie de surface de réponses .....	70
<b>III.8.2.2.1</b> Construction du plan expérimental .....	70
<b>III.8.2.2.2</b> Construction du plan d'expérience Plan d'expérience Box- Behenken .....	71
<b>III.8.2.2.3</b> Analyse des résultats.....	72



<b>III.8.2.2.3.1</b> Analyse de la variance (ANOVA) .....	72
<b>III.8.2.2.3.2</b> Coefficient de détermination R <sup>2</sup> .....	72
<b>III.8.2.2.3.2</b> Effets des facteurs .....	73
<b>III.8.2.2.4</b> Modèle mathématique .....	76
<b>III.8.2.2.5</b> Conditions optimales .....	76
<b>Références bibliographiques</b>	
Conclusion .....	78
Résumé	

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>DPPH :</b>	2,2-diphényl-1-pyrcil-hydrazyl
<b>FRAP :</b>	Capacités réductrices ferriques d'antioxydants ( <i>Ferric reducing/antioxidant power</i> )
<b>EtOH :</b>	éthanol
<b>EAM :</b>	Extraction assisté par micro-ondes
<b>TPC:</b>	Teneur en Composés Phénoliques
<b>Abs :</b>	Absorbance.
<b>MSR :</b>	Méthode de Surface de Réponse.
<b>ANOVA:</b>	Analyse de la variance
<b>BBD:</b>	Box-Behnken Design
<b>EC50 (IC50) :</b>	Concentration inhibitrice à 50 %
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficient de détermination
<b>TCA</b>	Acide trichloro-acétique
<b>E.D</b>	Eau distillée
<b>TF</b>	Teneur de flavonoïdes
<b>%:</b>	Pourcentage
<b>ERO</b>	Espèces réactives de l'oxygène ou oxygénées

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I.1</b> :Les principales classes de composés phénoliques dans les plant .....	10
<b>Tableau II. 1</b> : Les données climatiques de la région de boussemghoun.....	25
<b>Tableau II.2</b> : Données climatiques de la région d'El Kheiter.....	25
<b>Tableau II.3</b> :photos de la différente partie de la plante <i>retama raetam</i> .....	26
<b>Tableau II.4</b> : photos des différentes partie de la plante <i>calycotome spinosa</i> .....	27
<b>Tableau II.5</b> : Les différentes combinaisons effectuées pour l'optimisation des conditions d'extraction de la plante <i>retama raetam</i> et <i>Calycotome Spinosa</i> .....	50
<b>Tableau III.1</b> : Résultats de screening phytochimique pour les plantes étudiées .....	54
<b>Tableau III.2</b> : Résultats de screening phytochimique de caractérisation des alcaloïdes de <i>Retama Raetam</i> .....	55
<b>Tableau III.3</b> : Résultats de screening phytochimique de caractérisation des alcaloïdes de <i>Calycotome Spinosa</i> .....	55
<b>Tableau III.4</b> : aspect des extraits brutes d'alcaloïdes .....	57
<b>Tableau III.5</b> : rendement d extraction des alcaloïdes .....	57
<b>Tableau III.6</b> : aspect des extrait ethanologique .....	57
<b>Tableau III.7</b> : rendement d'extraction des composés phénoliques par différentes méthodes .....	58
<b>Tableau III.8</b> : rendement d'extraction spécifique aux flavonoïdes par différents solvants de <i>Retama Raetam</i> .....	59
<b>Tableau III.9</b> : rendement d'extraction spécifique aux flavonoïdes par différents solvants de <i>Calycotome Spinosa</i> .....	60
<b>Tableau III.10</b> :teneur de composés phénoliques par différentes méthodes .....	61
<b>Tableau III.11</b> : IC50 de réduction du DPPH par les extraits .....	63
<b>Tableau III.12</b> : EC50 de réduction du fer par les extraits .....	65
<b>Tableau III.13</b> :Résultats des analyses préliminaires pour MAE .....	65
<b>Tableau III.14</b> :Les valeurs codées et les valeurs réelles correspondantes	

des paramètres d'optimisation utilisé dans l'analyse de la surface de réponse ...	67
<b>Tableau III.15 :</b> Plan d'expérience Box- Behenken pour l'optimisation des conditions d'extraction de la plante <i>Retama Raetam</i> .....	67
<b>Tableau III.16 :</b> Analyse de la variance pour l'effet des facteur sur le rendement d'extraction .....	68
<b>Tableau III.17 :</b> Résultats des analyses préliminaires pour MAE .....	73
<b>Tableau III.18 :</b> Les valeurs codées et les valeurs réelles correspondantes des paramètres d'optimisation utilisé dans l'analyse de la surface de réponse ...	74
<b>Tableau III.19 :</b> Matrice du modèle de BBD et les valeurs expérimentales et prédites du plan d'expériences .....	74
<b>Tableau III.20 :</b> Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur le rendement d'extraction .....	76

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure I.1</b> : Retama raetam .....	4
<b>Figure I.2</b> : Calycotome spinosa .....	6
<b>Figure I.3</b> :Structure du noyau phénol .....	9
<b>Figure I.4</b> : Structure chimique des acides hydroxybenzoïques (a) et Structure chimique des acides hydroxycinnamiques (b) .....	10
<b>Figure I.5</b> : Structure de base des flavonoïdes .....	11
<b>Figure I.6</b> : Les principales classes de flavonoïdes .....	11
<b>Figure I.7</b> : Structure chimique des tanins .....	12
<b>Figure II.1</b> : Site d'échantillonnage .....	24
<b>Figure II.2</b> : Localisation de la commune boussemghoun .....	24
<b>Figure II.3</b> : Site d'échantillonnage .....	25
<b>Figure II.4</b> : photo Montage hydro-distillation .....	29
<b>Figure II. 5</b> : montage de hydro-distillation pour l'extraction spécifique des alcaloïdes volatiles .....	33
<b>Figure II. 6</b> : photo montage de macération .....	35
<b>Figure II.7</b> :photo de montage d'extraction avec soxhlet .....	36
<b>Figure II. 8</b> : photo de montage d'extraction assistée par micro-ondes .....	37
<b>Figure II.9</b> : photo de préparation la courbe étalonnage .....	43
<b>Figure II.10</b> : photo montre la préparation du courbe étalonnage .....	45
<b>Figure II.11</b> : photo de l'échantillon avant et après incubation .....	46
<b>Figure II.12</b> : les différentes étapes de l'activité antioxydante FRAP .....	47
<b>Figure III.1</b> : rendement d'extraction des composés phénoliques par différentes méthodes .....	58
<b>Figure III.2</b> : rendement d'extraction Spécifique au flavonoïdes par différente méthode de la plante <i>Retama Raetam</i> .....	59

<b>Figure III.3</b> : rendement d'extraction spécifique aux flavonoïdes par différents solvants .....	60
<b>Figure III.4</b> : courbe étalonnage pour estimation du teneur de polyphénols .....	61
<b>Figure III.5</b> : teneur de composés phénoliques par différentes méthodes .....	62
<b>Figure III.6</b> : Variation du pourcentage d'inhibition en fonction .....	63
de la concentration en extrait	
<b>Figure III.7</b> : IC50 de réduction du DPPH par les extraits.....	63
<b>Figure III.8</b> :pouvoir réducteur en fonction de concentration des extraits de plantes .....	64
<b>Figure III.9</b> :EC50 de réduction du fer par les extraits .....	64
<b>Figure III.10</b> : Graphiques des valeurs observées en fonction.....	68
des valeurs prévues pour le rendement d'extraction	
<b>Figure III.11</b> : Représentation spatiale des modèles de surfaces de réponses 3D et 2D des interactions (A): Temps/EtOH%, (B): Puissance/EtOH%, (C):Ratio (L/S)/EtOH%.....	70
<b>Figure III.12</b> : Représentation spatiale des modèles de surfaces de réponses 3D et 2D des interactions (D): Puissance/Temps, (E): Ratio (L/S)/Temps, (F):Ratio (L/S)/Puissance .....	71
<b>Figure III.13</b> : les conditions expérimentales optimales de la plante retama raetam .....	72
<b>Figure III.14</b> :Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le rendement d'extraction.....	75
<b>Figure III.15</b> :Représentation spatiale des modèles de surfaces de réponses 3D et 2D des interactions (A): Temps/EtOH%, (B): Puissance/EtOH%, (C):Ratio (L/S)/EtOH%.....	78
<b>Figure III.16</b> :Représentation spatiale des modèles de surfaces de réponses 3D et 2D des interactions (D): Puissance/Temps, (E): Ratio (L/S)/Temps, (F):Ratio (L/S)/Puissance .....	79
<b>Figure III.17</b> : les conditions expérimentales optimales calycotome spinosa .....	79

## LISTE DES SCHEMAS

<b>Schéma I.1:</b> Réaction de réduction du DPPH .....	16
<b>Schéma I.2:</b> Réaction de la méthode FRAP .....	16
<b>Schéma II.1 :</b> protocole d'extraction des alcaloïdes totaux en milieu alcalin .....	31
<b>Schéma II.2 :</b> protocole d'extraction des alcaloïdes totaux par alcool acide .....	32
<b>Schéma II.3 :</b> protocole d'extraction des alcaloïdes volatiles .....	34
<b>Schéma II.4 :</b> protocole d'extraction assiste par micro onde des polyphénols et flavonoïdes par affrontement de solvant .....	40
<b>Schéma II.5 :</b> protocole d'extraction des polyphénols et flavonoïdes par affrontement de solvant par macération .....	41
<b>schéma II.6 :</b> protocole des polyphénols et flavonoïdes par affrontement de solvant par soxhlet .....	42
<b>Schéma II.7 :</b> protocole de dosage des composés phénoliques .....	44
<b>Schéma II.8 :</b> protocole de dosage des flavonoïdes .....	45
<b>Schéma II.9 :</b> Protocole de l'optimisation des conditions extraction .....	51

# Introduction Générale



---

## **Introduction générale :**

Dans les années 90 un nouveau concept est apparu comme solution nouvelle pour une chimie plus propre et respectueuse pour l'homme et son environnement ,c'est celui de la chimie verte nommé aussi chimie durable ou chimie douce qui vient pour but de limiter l'impact négatif de la chimie noire , comme proposés en 1998 par les chimistes américains Paul T. Anastas et son frère John C. Warner appartenant à l'EPA (United States Environmental Protection Agency) 12 principes afin de maîtriser le cycle de vie des produits et prévenir les pollutions en source.

Nous notons ci-dessous ces principes : [1]

**Prévenir la production de déchets :** il vaut mieux produire moins de déchets qu'investir dans leur élimination.

**Economiser les atomes :** lors des synthèses, le produit final doit contenir le maximum de fonctionnalités pour le minimum d'atomes.

**Concevoir des synthèses chimiques moins dangereuses :** nouveaux procédés utilisant et créant des substances faiblement toxiques (voire non toxiques) pour les humains et sans conséquence sur l'environnement.

**Concevoir des produits chimiques plus sûrs :** conjuguer efficacité maximale et toxicité minimale.

**Réduire l'utilisation de solvants organiques et d'auxiliaires :** choisir des substances alternatives et peu volatiles.

**Améliorer l'efficacité énergétique :** minimiser les besoins énergétiques des procédés chimiques par la mise au point de méthodes de synthèse à température et pression ambiantes ou dans d'autres milieux réactionnels de synthèse.

**Utiliser des matières premières renouvelables :** privilégier les matières premières renouvelables (non fossiles).

**Réduire les produits dérivés :** privilégier des voies de synthèse qui ne génèrent pas de co-produits, ceux-ci pouvant notamment générer des déchets.

**Utiliser la catalyse :** favoriser l'utilisation de catalyseurs permettant à très faible concentration d'accélérer les réactions chimiques et de limiter le nombre d'étapes dans les processus réactionnels.

---

**Concevoir des substances à dégradation finale dans des conditions naturelles** : tenir compte dès leur conception du mode de dégradation finale des produits chimiques.

**Mettre au point des méthodes d'analyse en temps réel** : permettre une surveillance et un contrôle en temps réel et en cours de production pour prévenir les pollutions.

**Développer une chimie toujours plus sûre** : choix de substances moins dangereuses pour réduire les risques d'accidents chimiques (rejets, explosions et incendies).

La flore algérienne est caractérisée par sa diversité florale: méditerranéenne, saharienne et paléotropicale, l'identification de cette flore a été décrite par plusieurs botanistes à titre d'exemple celle de Quézel et Santa (1962-1963), intitulée « la nouvelle flore de l'Algérie et régions désertiques méridionales ».

Au sahara enregistre plusieurs espèces végétales parmi eux les espèces des Fabaceae, la famille des Fabacées (ex. Légumineuses) qui est la plus importante famille parmi les dicotylédones. C'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme, qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales [2] cette espèce est aussi connue par sa richesse en diverses substances bioactives, tels que les flavonoïdes sont présents presque dans toutes les espèces, les alcaloïdes, les tanins .....etc , ces derniers qui sont connue par le plan biologique .

Dans notre travail, nous avons étudié deux espèces médicinales (**Retama Raetam** et **Calycotome Spinosa**) appartenant à la famille des Fabaceae, dont le but consistera d'abord à réaliser des extractions et de quantifier les familles des composés chimiques tels que les polyphénols , flavonoïdes et alcaloïdes. Puis une optimisation d'extraction sera réalisée par la méthodologie de surface de réponse en utilisant le logiciel JMP. Notre manuscrite est subdivisé en trois chapitres essentiels :

- ❖ Chapitre I : consacré à une étude bibliographique sur les plantes appartenant à la famille Fabaceae et ses métabolites secondaires ainsi que les différentes techniques d'extraction.
- ❖ Chapitre II : présente notre partie expérimentale.
- ❖ Chapitre III : porte sur nos résultats et nos discussions.

# Chapitre I

Etude bibliographique

## **I.1 Généralités sur la famille des Fabaceae :**

La famille des fabaceae est une des plus importantes familles végétales qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme, qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales [3].

Le nom de la Famille des Fabaceae, découle du nom de genre Faba (du latin faba, fève) est la fève, anciennement Faba vulgaris, maintenant Vicia faba. La famille est aussi appelée couramment Légumineuses (Leguminosae) [4].

Le terme Légumineuse vient du mot légume, qui désigne les aliments de l'homme d'origine végétale sous forme de graines sèches ou d'herbes fraîches.

La famille des Fabaceae contient environ 20 000 espèces, la plaçant en seconde position après les Poaceae en termes de diversité [3].

Les plantes de la famille des Fabacées sont généralement de plantes herbacées, arbustes, arbres ou plantes grimpantes à lianes volubiles [5] possédant plusieurs caractères morphologiques en commun, Néanmoins, on observe aussi dans cette famille de très nombreux types floraux, dues à plusieurs tendances évolutives, plus ou moins synchrones, et en particulier, une réduction du nombre des étamines et la création d'une fleur zygomorphe. Les feuilles également des plantes de cette famille présentent une évolution morphologique [6].

## **I.2 Rétama raetam :**

### **I.2.1 Description botanique de Rétama Raetam :**

Les Rétames sont des légumineuses arbustives, occupant les zones arides, semi-arides et côtières, leur nom dérive du nom biblique (ROTEM) qui fut changé par les arabes en (R'tem) ou (retam) [7], cette plante arbuste saharien de 1 à 3,5 m de hauteur à rameaux veloutés, fleurs blanches de 8-10 mm, étendard égalant la carène ou plus long, gousse non dilatée sur sa nature ventrale contenant une graine [8].

En Algérie les *Rétames* occupent une surface considérable du nord vers le sud [9].

Le genre Rétama compte trois espèces : *Retama monosperma*, *Retama sphaerocarpa* et *Retama raetam*.



**Figure I.1 :** *Retama raetam* (Forssk.) Webb et Berth.

### I.2.2 Systématique de *Retama raetam* [8] :

Règne :	Végétal
Embranchement :	Spermaphytes
Sous embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Ordre :	Fabales
Super famille :	Légumineuses
Famille :	Fabacées
Sous famille :	Papilionacées
Genre :	Rétama
Espèces	Rétama raetam

### I.2.3 Importance de *Retama raetam* :

#### -Intérêt écologique:

Les rétames jouent un rôle très important dans le maintien de l'équilibre des milieux naturels et des écosystèmes, reconnues comme étant des plantes des zones arides et semi arides. Les rétames s'adaptent aux conditions les plus extrêmes de sécheresse et de salinité grâce à leurs morphologie et leurs structure xéromorphique botanique.

D'après [10] *Rétama raetam* grâce à son potentiel germinatif élevé. Sa tolérance au stress hydrique et son mode de ramification radicalaire, peut être considéré comme une espèce

pionnière apte à coloniser les cordons dunaires. Son utilisation dans les opérations de végétation de ces milieux fragiles est recommandable.

#### **-Intérêt pharmacologique:**

En médecine traditionnelle, *Rétama raetam* est utilisé dans le traitement de plusieurs maladies comme l'eczéma La partie aérienne de *Retama raetam* est utilisée, en infusion, en poudre ou en compresse, pour le traitement du rhumatisme, les blessures et les piqûres de scorpion, elle est utilisée aussi contre les morsures de serpent [11] en outre, des études expérimentales ont révélé que *Retama raetam* possède une activité antioxydante [12].

#### **I.2.4 Composition chimique :**

Selon des études phytochimiques *Retama raetam* est riche en flavonoïdes, alcaloïdes et en polysaccharides [13] Les graines contiennent de daidzéine, vicienin-2, la naringénine, l'apigénine, le kaempférol, la quercétine et le kaempférol 7-O-glucoside [14] les feuilles contient la daidzéine, la daidzéine 7- 4'-diméthyl éther, chrysoeriol 7-O-glucoside et orientine .

Alors que la partie aérienne est riche en deux nouveaux flavonoïdes, lutéoline 4'-O-neohesperidoside et 5,4'-dihydroxy— (3",4"-dihydro-3", 4"-dihydroxy)-2", 2"-diméthylpyrano-(5", 6": 7,8)-flavone [15].

#### **I.3 Calycotome spinosa :**

##### **I.3.1 Description botanique de la Calycotome Spinosa :**

Le nom Calycotome, du grec calyx et temno qui signifient calice et je coupe, [16] Le nom scientifique de cette plante c'est le « Calycotome spinosa L Link » et elle est connue par le nom d'arabes « Guendoul ».

Le Calycotome est présent sous forme d'un arbuste épineux pouvant atteindre 1 et même 2 m de hauteur , les rameaux sont fortement imbriqués, la racine porte habituellement des nodosités. [17] les tiges sont dressés , les feuilles trifoliées ovales et les fleurs sont jaune de 12 à 18mm de longe.

Le Calycotome préfère les sols siliceux ,il vit dans les montagnes proches du littoral ,en région méditerranéenne, les Clycotomes sont représentés principalement par trois espèces (C. spinosa, C. villosa, C. villosa subsp. intermedia) [18,19].



**Figure I.2 :** Calycotome Spinosa

### **I.3.2 Classification de l'espèce Calycotome spinosa [17] :**

Embranchement :	Spermaphytes
Sous embranchement :	Angiospermes
Classe :	Eudiotés
Ordre :	Fabales
Famille :	fabacées
Genre espèces :	Spinosa L LINK

### **I.3.3 Utilisation de la plante :**

Les genêts sont capables grâce aux nodosités sur leur racines, de fixer l'azote atmosphérique et d'enrichir le sol en produits azotés. Les ruminants évitent cette plante à cause de ses épines.

#### **-Intérêt pharmacologique:**

Dans les indications thérapeutiques, le Calycotome spinosa est utilisée comme un anti-ictérique [20], les fleurs et les feuilles de Calycotome spinosa L Link sont riches en flavonoïdes, qui sont utilisées dans le traitement des maladies cardiovasculaires, des cas de cancer, le genêt épineux a des propriétés antioxydants et anti inflammatoires [21].

### **I.3.4 Composition chimique:**

Calycotome Spinosa se distingue des autres espèces par sa teneur en matières azotées totales élevée (33,7%) en formant un groupe homogène à part, la teneur en matière sèche des feuilles arbustes étudiés est comprise entre 28,20%, 63,57% de la matière organique. La teneur en tanins hydrolysables des espèces arbustives est généralement élevée surtout chez Calycotome

Spinosa. Cette plante est l'espèce la plus riche en composés phénoliques et en tanins totaux avec 119,43 et 83,68 g équivalent acide tannique/kg MS respectivement pour les deux composés [22].

#### **I.4 Métabolite primaire :**

Un métabolite primaire est un type de métabolite qui est directement impliqué dans la croissance, le développement et la reproduction normale d'un organisme ou d'une cellule.

Les métabolites primaires sont caractérisés par leur caractère nécessaire et vital à la survie de la cellule de l'organisme: les glucides, Les lipides, Les acides aminés.

#### **I.5 Les métabolites secondaires :**

Les métabolites secondaires végétaux sont des molécules essentielles à la vie des plantes. Ils sont également des sources importantes pour les produits pharmaceutiques, les additifs alimentaires et les arômes [23].

On peut classer les métabolites secondaires en trois grands groupes : les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine [24].

##### **I.5.1 Les huiles essentielles:**

Les huiles essentielles appelées aussi essences sont des substances volatiles odoriférants d'aspect fluide à épais et de couleur variable, elle est sécrétée par des cellules spécialisées se trouvant aussi bien dans les feuilles , les fleurs , les racines et les graines .

Les huiles essentielles sont des messagers chimiques utilisés par les plantes aromatiques pour interagir avec leur environnement, elle est composée d'une centaine de molécules terpéniques et les composés oxygénés . Il y'a plusieurs techniques variables pour obtenir les huiles essentiels, selon la partie du végétal traitée, selon sa fragilité de la plante utilisée, selon ses caractéristiques botaniques parmi ces méthodes : hydrodistillation.

##### **I.5.2 Les alcaloïdes :**

Un alcaloïde est un composé organique naturel hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome.

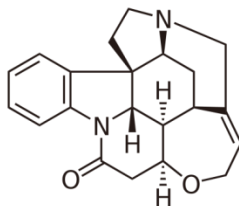
Les alcaloïdes renferment toujours du carbone, de l'hydrogène et de l'azote, et le plus Souvent, en plus, de l'oxygène (exceptionnellement quelques alcaloïdes contiennent du soufre). Ils sont



donc des produits aminés naturels qui ont des effets physiologiques sur l'organisme humain [25,26].

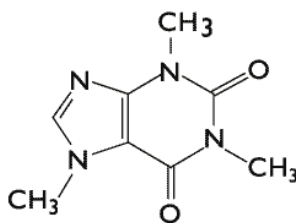
### I.5.2.1 Classification des alcaloïdes [27] :

-**alcaloïdes vrais** : ils dérivent d'acides aminés, et présentent au moins un hétérocycle.



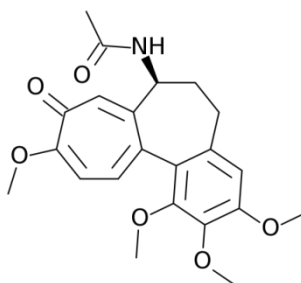
**La strychnine**

-**Pseudo- alcaloïdes** : qui ne dérivent pas d'acides aminés.



**La caféine**

-**Proto- alcaloïdes** : qui dérivent d'acides aminés mais pour lesquels l'azote est en dehors des structures cycliques.



**Colchicine**

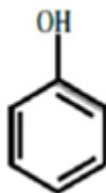
### I.5.2.2 Propriétés pharmacologique des alcaloïdes :

- Un traitement pour les maux de tête [28].
- La stimulation de la circulation sanguine, en cas de rhumatisme [29].
- Jouent le rôle d'anesthésiques locaux (cocaïne) [30].

### I.5.3 Les polyphénols :

Les polyphénols sont des métabolites secondaires des végétaux qui disposent d'une extrême variété de structures et d'activité biologiques [31], Ces composés sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois. [32,33].

L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau phénolique à 6 carbones auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction [34,35].



**Figure I.3 :** Structure du noyau phénol. [36]

Le terme « composés phénoliques végétaux » englobe les phénols simples, les acides phénoliques, les coumarines, les flavonoïdes, les stilbènes, les tannins, les lignines et les lignanes [37].

#### **I.5.3.1 Biosynthèse des polyphénols :**

La plupart des molécules phénoliques sont formées à partir de deux acides aminés aromatiques, tyrosine et phénylalanine.

Ces acides aminés sont formés de façons variables suivant les végétaux [38].

Les composés phénoliques des végétaux sont biosynthétisés par des voies différentes [39] : voie Shikimique, voie Acétate-Malonate ou voie des polycétides et voie acétate Mevalonate.

#### **I.5.3.2. Les principales classes de composés phénoliques dans les plantes :**

**Tableau I.1 :** Les principales classes de composés phénoliques dans les plantes [40]

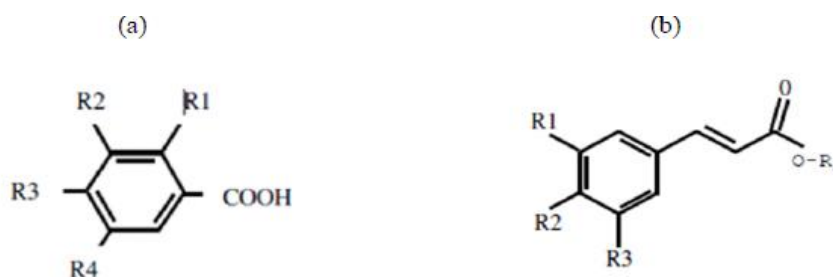
nombre d'atomes de carbone	squelette de base	classe
6	C6	phénols simples, benzoquinones
7	C6 - C1	acides phénoliques
8	C6 - C2	acétophénone, acide phénylacétique
9	C6 - C3	acide hydroxycinnamique, polypropène, coumarine, isocoumarine
10	C6 - C4	naphthoquinone
13	C6 - C1 - C6	xanthone
14	C6 - C2 - C6	stilbène, anthraquinone
15	C6 - C3 - C6	flavonoïdes, isoflavonoïdes
18	(C6 - C3) 2	lignanes, neolignanes
30	(C6 - C3 - C6) 2	biflavonoïdes
n	(C6 - C3) n	lignanes
	(C6) n	catecholmelanine
	(C6 - C3 - C6) n	(tanins condensés)

### I.5.3.3 Classification des polyphénols :

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux.

#### a)-Acides phénoliques :

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils sont représentés par deux sous-classes, les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (C6-C1) (Figure 4 (a)) et les dérivés de l'acide hydroxycinnamique (C6-C3) (figure (b)) [41].



**Figure I.4 :** Structure chimique des acides hydroxybenzoïques (a) et Structure chimique des acides hydroxycinnamiques (b).

#### b)-Flavonoïdes :

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres.

Elles sont omni présentes dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge et d'autres parties de la plante [42]. Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, possèdent le même élément structural de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés en une configuration C6-C3-C6 [43].

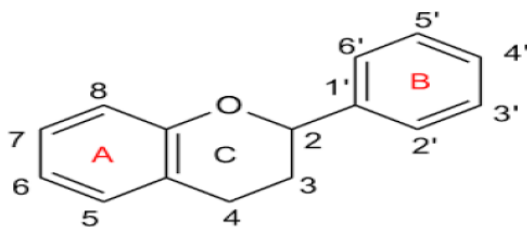


Figure I.5 : Structure de base des flavonoïdes [44]

### -Les principales classes de flavonoïdes :

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, de degré d'insaturation, l'oxydation et la cyclisation

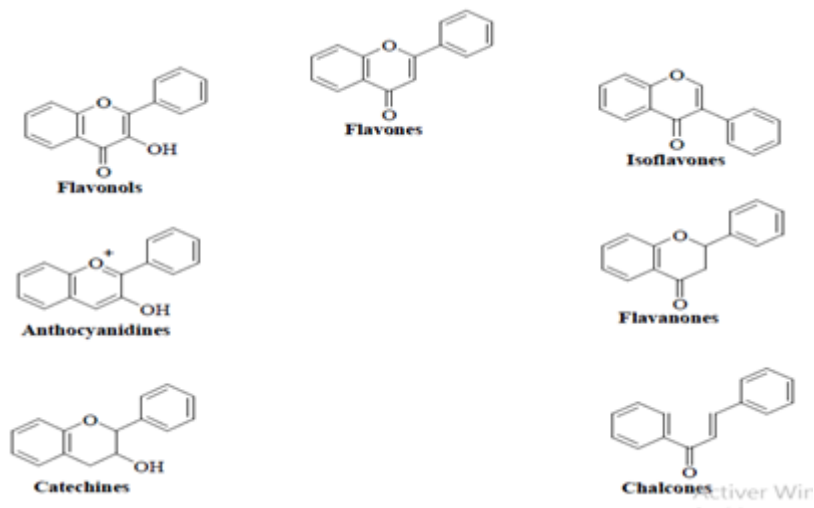


Figure I.6 : Les principales classes de flavonoïdes

### c)-Tanins :

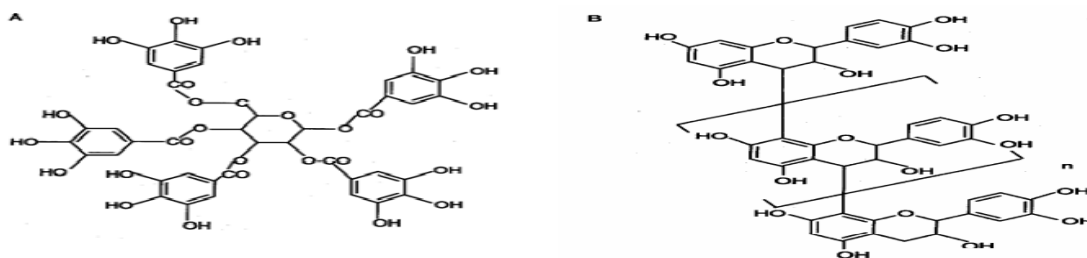
Les tanins sont définis comme des composés polyphénoliques de poids moléculaires ont une complexité variable. Ils ont la capacité de se lier fortement à des macromolécules, Ces composés sont présents dans un grand nombre de produits d'origine végétale utilisés en tant que nourriture animales ou humaine [45] Les tanins sont divisés en deux groupes :

## 1) Tanins hydrolysables (figure A)

Ce sont des hétéro-polymères possédant un noyau central constitué d'un polyol.

## 2) Tanins condensés (figure B)

Les tanins condensés sont des composés complexes définis chimiquement comme étant des oligomères (2 à 10 unités de Flavanes hydroxyles).



**Figure I.7 :** structure chimique des tanins [46]

**d)- Les saponines :**

Les saponines sont des métabolites secondaires hétérosidique présents dans de nombreuses plantes et quelques organismes marins, ces composés peuvent former une mousse persistante une fois agités avec de l'eau [47].

**I.6 Les différentes méthodes d'extraction :****I.6.1 Percolation :**

Elle consiste à laisser couler un solvant généralement chaud sur un solide finement broyé à fin de dissoudre les particules solubles. L'exemple type de cette méthode est la préparation du café [48].

**I.6.2 Infusion :**

Une infusion est préparée en versant de l'eau bouillante sur une quantité spécifique de matière végétale [49] on le laisse infuser pendant le temps nécessaire, le temps d'infusion est variable suivant la nature de la plante la préparation du thé est l'exemple type de cette opération [50].

**I.6.3 Décoction :**

C'est opération de faire tromper le solide dans un solvant liquide mis en ébullition, C'est une opération brutale qui doit être réserver à l'extraction de principes actifs thermorésistants, elle s'applique généralement aux parties les plus dures des plantes: racines, graines...

La différence entre décoction et infusion, c'est la température à laquelle les principes actifs sont extraites [48,51].

**I.6.4 Macération :**

Dans cette méthode la matière végétale broyée est mise dans un récipient fermé en présence d'un solvant d'extraction sous agitation et a température ambiante, l'opération est bien généralement lente mais c'est la seule méthode utilisable pour l'extraction de molécules fragiles (thermosensibles).

Une macération efficace peut durer environ 3 à 10 jours ce qui implique quelques inconvénients: fermentation ou contamination bactérienne (dans le cas où le solvant utilisé est l'eau) ce qui entraîne une dégradation rapide des molécules actives [48-52-53].

**I.6.5 Digestion :**

La digestion est une macération à chaud. Cette opération et la macération sont utilisées particulièrement en pharmacie et en parfumerie. Il s'agit là d'une opération plus rapide que la précédente [50].

**I.6.6 L'hydro-distillation :**

Le principe de l'hydro-distillation correspond à une distillation hétérogène. le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. l'ensemble est ensuite porté à ébullition. Les composants de l'huile essentielle forment un mélange azéotropique avec de l'eau, lorsque l'on chauffe le ballon qui contient la solution aqueuse, l'eau se vaporise, cette vapeur casse les cellules végétales, libérant les molécules d'intérêt, les plus volatiles d'entre elles sont emportées avec la vapeur, celle-ci est ensuite refroidie dans un condenseur.

**I.6.7 Extraction à reflux :**

Cette méthode consiste à mettre la poudre des plantes dans un solvant et chauffer jusqu'à l'ébullition, le reflux consiste à condenser les vapeurs et à renvoyer ce condensat dans le système d'où il provient pour éviter toute perte de matières ni les réactifs ni les produits obtenus.

### **I.6.8 Extraction au soxhlet :**

Le soxhlet permet d'extraire une substance présente dans un solide pour la faire passer dans un solvant. Cette technique est utilisée pour les molécules peu ou pas volatiles et stables à la température.

Le corps en verre de l'extracteur, contient une cartouche en cellulose (matière pénétrable pour le solvant) remplie de matière végétale. Cette cartouche est fixée sur un réservoir de solvant (ballon) et est surmontée d'un réfrigérant [54,55,56] quand le liquide atteint le niveau de débordement, un siphon aspire la solution de la cartouche et la décharge de nouveau dans le ballon à distiller, portant les corps dissous extraits dans le liquide [57].

Les solvants les plus utilisés sont le dichlorométhane, le chloroforme, le toluène, l'hexane, le mélange hexane/acétone ou le méthanol [58].

Cette méthode simple. Elle a l'avantage de mettre rapidement l'échantillon en contact avec le solvant frais. A la fin de l'extraction la filtration n'est pas nécessaire. Cependant elle nécessite beaucoup de temps et de solvant pour une seule extraction[59], La possibilité de dégradation thermique des composés [60].

### **I.6.9 Extraction assistée par micro-ondes :**

MAE est une technique d'extraction relativement nouvelle, qui utilise l'énergie des micro-ondes pour chauffer le solvant et l'échantillon et pour augmenter le transfert de masse des solutés de la matrice de l'échantillon dans le solvant. L'utilisation des micro-ondes pour l'extraction des constituants des plantes en est encore à ses débuts [61].

#### **I.6.9.1 Mécanisme d'extraction par micro-ondes :**

Le mécanisme de chauffage par micro-ondes, aussi appelé chauffage diélectrique, le micro-ondes consiste à chauffer le solvant en contact avec l'échantillon au moyen de l'énergie des micro-ondes [62].

Les substances sont soumises à un champ électrique statique ou alternatif, il procède donc par un mécanisme de polarisation dipolaire des molécules ou par conduction ionique des ions en phase liquide ou incrustés dans les interstices solides [63].

La chauffe par micro-ondes s'effectue de l'intérieur vers l'extérieur. Cette particularité entraîne une extraction des principes actifs végétaux par surpression interne.

Les micro-ondes qui peuvent facilement pénétrer dans les pores de l'échantillon, ce qui permet au solvant piégé dans les pores de chauffer de manière uniforme et rapide. Contrairement au chauffage conventionnel où le récipient met longtemps à chauffer puis à transférer son énergie au solvant [64].

MAE présente généralement des avantages évidents avec un temps d'extraction plus court et la réduction de consommation du solvant, cette méthode peut être mauvaise lorsque la filtration est nécessaire ou les solvants sont non polaires [57].

## **I.7. Activité antioxydante :**

### **I.7.1 Les radicaux libres :**

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couches externes [65,66] ce qui le rend instable et très réactif; par conséquent, il peut réagir rapidement avec un autre composé, en essayant de capturer l'électron nécessaire pour gagner sa stabilité. Le plus simple des radicaux libres est un atome d'hydrogène, avec un proton et un électron unique [67].

### **I.7.2 Stress oxydatif :**

Le stress oxydatif apparaît donc quand un déséquilibre se forme dans la balance anti/pro-oxydants. C'est seulement à ce moment que les Espèces réactives de l'oxygène ou oxygénées ERO vont exercer leur action délétère sur l'organisme [68].

### **I.7.3 Antioxydants :**

Les antioxydants sont des composés qui protègent les cellules du corps [69], un antioxydant est défini comme une substance qui est capable de ralentir ou d'inhiber le phénomène d'oxydation. [70] avant que les molécules vitales ne soient endommagées.

Plusieurs études s'accordent aujourd'hui sur l'importance de la contribution des antioxydants exogènes apportée par l'alimentation, dans la lutte contre les maladies associées au stress oxydant [71,72] Ces antioxydants, essentiellement d'origine végétale, sont apportés sous la forme de composés phénoliques, des vitamines et des caroténoïdes.

### **I.7.4 Pouvoir anti radicalaire par la méthode du DPPH :**



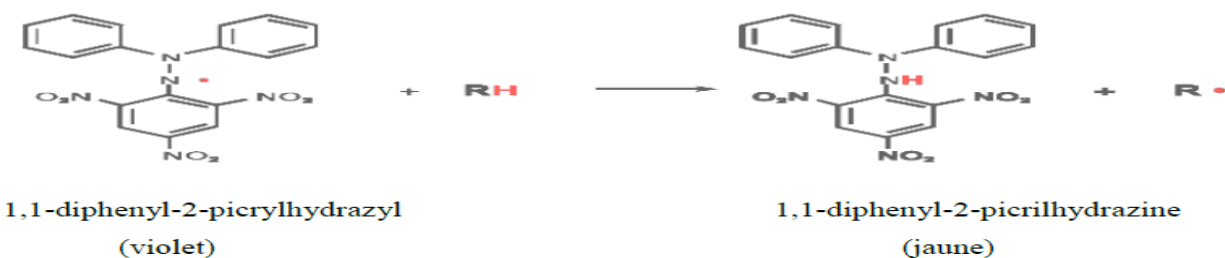
Le DPPH est un radical libre stable violet en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm, il est utilisé pour déterminer la capacité antioxydante.

La méthode du DPPH est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire stable DPPH en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH), qui aboutit à la formation d'une forme non radicalaire, le DPPH-H. Ainsi plus la perte de couleur est rapide plus le donneur d'hydrogène est considéré comme un antioxydant fort [73].

On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation:



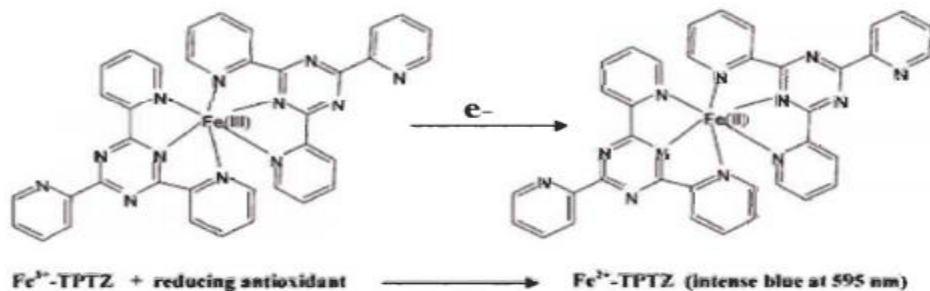
(AH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphenyle picryl hydrazine (jaune) [74].



**Schéma I.8 :** Réaction de réduction du DPPH [75]

### I.7.5 Le pouvoir réducteur de fer/antioxydant FRAP :

FRAP est un test direct récemment mis au point pour déterminer le "pouvoir antioxydant total". Cette méthode est basée sur la réduction de fer ferrique en sel de fer par les antioxydants qui donnent la couleur bleu, l'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotomètre à 700 nm.



**Schéma I.9 :** Réaction de la méthode FRAP [76]

**Références bibliographiques**

- [1].Paul T. Anastas et John C. Warner, Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press, New York, 1998.
- [2].Saoudi, M. (2008). Les bactéries nodulant les légumineuses 5BNLP) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. Thèse de Magister : Génomique et Techniques Avancées de Végétaux. Constantine : Université Mentouri de Constantine. 11-12
- [3].BOKHARI H .TAIEB B ;mémoire doctorat extraction, dosage et analyse des polysaccharides pariétaux des racines de *retama raetam* ; université mohamed boudiaf ORAN ; p6 ; 2016 .
- [4].SAOUDI Mouna (2007) Les Bactérie ondulant les légumineuses;Caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus Armatus*,Thèse de magister ,Université Mentouri de Constantine ,27p.
- [5].SPICHIGER R.E., SALVLAIMEN V., FIGEAT M., JAMMONOB D., 2004-Botanique systématique des plantes à fleurs .éd :press polytechnique et universitaire romande,203-206p in Bouredje.n, 2005, étude anatomique et biochimique des protéines et des acides aminés
- [6].Morel S. (2011). Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae). Thèse de doctorat. Université d'Angers.
- [7].Zohary Michael, (1962). Plant life of Palestine, Israel, and Jordan, Ronald, New York. Science 11 may: Vol. 163. no.3515, p.523. DOI:10.1126/science.136.3515.523.
- [8]. Quezel et Santa ; (1962). Nouvelle flore de l'Algérie. Tome I.p 156-162.
- [9]. Thomas, 1968 Thomas, J.P., 1969.-Ecologie et dynamique de la végétation de la dune littorale dans la région de Djidjelli. *Bull. Soc. Hist. Nat. Afr.nord*, 59: 37-98.
- [10].Farchichi, A., (1996). La lutte contre l'ensablement et pour la stabilisation des dunes: Essai de la fixation biologique des dunes en Tunisie présaharienne. Recherches sur la désertification dans la Jeffara. *Rev. Tunis. Geogr.* 12: 49–102.
- [11].CHEHMA A., DJEBAR M.R., HADJAIDJI F et ROUABEH L., 2005 : Etude floristique spatiotemporelle des parcours sahariens du Sud-Est algérien. *Sécheresse* ; 16 (4).p 1-11.
- [12].Saadaoui.B et al ; 2007. Etude de la composition et du pouvoir antioxydant des composés phénoliques de quelques espèces végétales de l'aride tunisien. *Revue des régions arides*. ISSN

0330-7956.2007(1), pp.316-321[6 page(s) (article)]. ed. : Institut des régions arides, Médenine, Tunisie

[13].Abdel Halim, O.B., Abdel Fattah, H., Halim, A.F., Murakoshi, I., (1997). Comparative chemical and biological studies of the alkaloidal content of Lygos species and varieties growing in Egypt. Acta Pharm. Hung. 67 (6), 241–247.

[14].El-Sherbeiny AEA, El-Sissi HI, Nawwar MAM, El-Ansari MA. (1978). ethnomedical approach to the identification of news drugs for the Planta. Med; 34:335.

[15].Kassem .M, Mosharrafa .S.A, Saleh.N.A.M, Abdel-Wahab S.M, (2000). Two new flavonoids from *Retama raetam*. Fitoterapia; 71: 649-654.

[16].Guide illustré de la flore algérienne ,wilaya d'alger(2010 -2011) ; mairie de paris avec le soutien du ministère des affaires étrangères européennes de la république française.N°ISBN :978-2-7466-4242-3.p29.

[17].Damerdji A. et Djeddid A. (2012). Les orthoptéroïdes associés à une plante xérophile (*Calycotome spinosa* L. (Link) (Fabacees) dans la région de tlemcen (nord-ouest algérien) Université Aboubekr Belkaid-Tlemcen. (Algerie). 111 – 123

[18].Quèzel P., Santa S., (1963) .Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome2, Ed. Centre nationale de la recherche scientifique, Paris, pp.935-936.

[19].Domínguez E., *Calicotome villosa* Link. (Ed. Ketres) Valdés B., Talavera. S., Fernández Galiano E., *Flora Vascular de Andalucía Occidental*, Vol. 2, 1987, pp. 45-170.

[20].Sari M., Hendel N., Sarri D., Boudjelal A., Benkhaled A. (2013). Ethnobotanical study Of medicinal Flora used by the people of the Forest El Haourane-Msila(Alegria). Journal Of Ecoagritourism,. 9(2): 27.

[21].Larit F., Benyahla S., Benayache S., Benayache F., Leon F., Brouard I., Bermijo J. (2012). Flavonoïdes Fromcalycotomespinosal. Lnk.Int. J. Med.Arom. Plants,. 2(1): 34-37.

[22].Mebirouk-Boudechiche L., Cherif M., Boudechiche L. et Sammar F. (2014). Teneurs en composés primaires et secondaires des feuilles d'arbustes fourragers de la région humide d'Algérie Revue Méd. Vét. 165, 11-12, 344-352.

[23].Ramakrishna A and Ravishankar G A. (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signaling & Behavior. 6(11), 1-12.

[24].Krief S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal, thèse doctorat, muséum national d'histoire naturelle. 32p.

- [25].Nultsch, W. (1969). Botanique Générale, *Éd. Louis Pasteur*, 319-320.
- [26].Vallet, A. (1996). Contribution à l'étude de la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques chez le *Datura innoxia* Mill, transformation par *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes* et culture de chevelus lacunaires. Mémoire d'Études Approfondies (D.E.A) en génie enzymatique, bioconversion et microbiologie. Université de Picardie Jules Vienne.
- [27].DEHAK K. -Méthodes d'extraction et de séparation des substances naturelles-Université KASDIMerbahOuarglafévrier2013
- [28].Bruneton, J., (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Editions TEC & DOC, 3ème édition, PP 783- 785
- [29].Asekun, O.T., Adeniyi, B.A. (2004). Antimicrobial and cytotoxic activities of the fruit essential oil of *Xylopiya aethiopica* from Nigeria. *Fitoterapia*, 75 :368-370.
- [30].Kansole, M.M.R. (2009). Etude ethnobotanique, phytochimique et activité biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso : cas de *Leucas martinicansis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia oppossta vahl* et *Orthosiphon pallidus* royle ex benth. Mémoire d'Études Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Université Burkina Faso.
- [31].Bouayed,J., Rammal,H., Younos,C., Dicko,A., Soulimani,R., 2008. Caractérisation et bioévaluation des polyphénols : nouveaux domaines d'application en santé et nutrition. *Phytothérapie* (2008) 6: 71–74.
- [32].Bénard C. (2009). Etude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de cultures sur le contenu en polyphénols chez la tomate. Thèse de doctorat de l'INPL en sciences Agronomiques. Faculté Agronomie et Environnement Université nancy INRA 175p.
- [33].Zeghad N. (2009). Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Thèse de Magister en Biotechnologie Végétale. Université Mentouri Constantine, Faculté des sciences de la nature et de la vie, 84p.
- [34].Omar, S.H., 2010. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia Pharmaceutica*. 78: 133–154.
- [35].Karabourniotis, G., Fasseas, C. 1996. The dense indumentum with its polyphenols content may replace the protective role of the epidermis in some young xeromorphic leaves. *Canadian Journal of Botany*. 74: 347–351.

- [36].Sarni-Manchado, P., et Cheynier, V. 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Tec et Doc Lavoisier. P : 02-11.
- [37].Stalikas C D (2007) Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 3268–3295
- [38].Macheix JJ, Fleuried A et Jay-Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. Presses Polytechniques et Universitaire Romandes, 87- 149.
- [39].Thayumanavan B and Sadasivam S. (2003) Molecular Host Plant Resistance to Pests. CRC Pres LLC.
- [40] Mann J., Daridson R.S., Hobbs J.B., Banthorope D.V. et Harborne J.B. 1994."Natural Product : Their chemistry and biological significance", 1ere Edition
- [41]. Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3ème édition. Médicales Internationales-Tec et Doc. Paris, pp 370-401.
- [42].TSIMOGIANNINS, D.I., OREOPOULOU, V. (2006). The contribution of flavonoid C-ring on DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovat Food Sci Emerg Tech*, 7: 140-146.
- [43].BELYAGOUBI-BENHAMMOU. (2012). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien, Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen, 12.
- [44].LAMAISON J.L.C ET CARNET A. (1990). Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poir) D.C en fonction de la végétation. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 65: 315-320
- [45].DELCAMBRE A. (2010). Une approche moléculaire de l'astringence des vins : utilisation de sondes pour l'étude des interactions entre protéines de la salive et polyphénols. Thèse de doctorat de Chimie analytique et environnement Université de Bordeaux I. Ecole doctorat des sciences chimiques 176p.
- [46].BENNIK A., 2002.interaction of plant polyphenols with salivary proteins . Critical Review in Oral Biological Medicine ,13(2) ; 184-196
- [47].KONE D. Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes extraction, identification d'alcaloïdes-caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydant.Thèse de Doctorat. France: L'université Paul Verlaine de Metz –UPVM, 2009, 22.

- [48].LEYBROS, J. AND P. FRÉMEAUX (1990). "Extraction solide-liquide aspects théoriques." techniques de l'ingénieur, traité Génie des procédés J1 077 06
- [49].SOFOWERA A. (2010) Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Karthala, Economie et Développement. Paris: 384
- [50].GROUBERT, A. (1984). techniques d'extraction végétale. Montpellier, pharmacie.
- [51] Kalla, A. Etude et valorisation des principes actifs de quelques plantes du sud algérien : *Pituranthos scoparius*, *Rantherium adpressum* et *Traganum nudatum*. Thèse doctorat. Université Mentouri – Constantine. 2012
- [52].BEN AMOR B. (2008).Maitrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs ; texturation par détente instantanée contrôlée DIC.Thèse de doctorat de Génie des Procédés Industriels. Faculté UFR des sciences. Université de la Rochelle pp 3-11.
- [53].AIACHE JM, BEYSSAC E, CARDOT JM, HOFFART V ET RENOUX R. (2008). Initiation à la connaissance du médicament. Ed Masson, Paris. pp116-213 .
- [54].QUAN L., Li S.F., TIAN S.J., XU H., LIN A.Q., GU L. 2004.-Determination of Organochlorine pesticides residue in Ginseng root by orthogonal array design Soxhlet Extraction and gas chromatography. *Chromatographia*, 1: 89-93.
- [55].SARKER S.D., LATIF Z., GRAY A.I. 2006.-Natural Products Isolation, Second Edition, Humana Press Inc.
- [56].HERZI N. 2013.-Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de L'extraction au CO<sub>2</sub>-supercritique et des techniques conventionnelles. Thèse de docteur. Université de toulouse.
- [57].WANG L. ET WELLER C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants.*Trends in Food Science & Technology*. 17, 300–312.
- [58]. E. Jardé, « Composition organique boues résiduaires de stations d'évaporation lorraines caractérisation moléculaire et effet de la biodégradation», Thèse de doctorat, Université de Lyon,France(2002)
- [59]. Penchev PI. (2010). Étude 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 de Doctorat de Génie des Procédés et de l'Environnement. Université de Toulouse, Institut National Polytechnique de Toulouse, 218p.

- [60].Bouthaina BEN AMOR 2008 MAITRISE DE L'APTITUDE TECHNOLOGIQUE DE LA MATIERE VEGETALE DANS LES OPERATIONS D'EXTRACTION DE PRINCIPES ACTIFS ; TEXTURATION PAR DETENTE INSTANTANEE CONTROLEE DIC.thèse de doctorat UNIV DE LA ROCHELLE Discipline: Génie des Procédés Industriels
- [61].Ajay shukla, Ramchandra Gupta, Prabhakar Sharma, jain, A.P., 2013. Comparative Study of Microwave Assisted With Conventional Extraction of Calcium Sennosides from Senna Leaf.Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical SciencesJournal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences 4, 103.
- [62].JAIN, T., JAIN, V., PANDEY, R., VYAS, A., SHUKLA, S., 2009. Microwave assisted extraction for phytoconstituents-An overview. Asian J Res Chem 2, 19-25.
- [63]. Galema, saskia. (1997). Microwave chemistry. *Chemical Society Reviews*, vol. 26, p.233-238.Science,Turkey.
- [64].V. Lopez-avila, extraction | Microwave-Assisted Extraction, Editor(s): Ian D. Wilson, Encyclopedia of Separation Science, Academic Press, 2000, Pages 1389-1398, ISBN 9780122267703,sciencedirect.com
- [65].Clarkson P. M and Thompson H .S.,2000. Antioxydant : what role do they play in physical activity and health? American journal clinical nutrition, 72: 637-646.
- [66].Gilgun –sherki Y., Melamed E. and Offen D., 2001. Oxidative stress induced neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 40: 959-975.
- [67].Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean, *British Journal of Pharmacology*.142, 231–255
- [68].Favier, A.(2003).Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhensiondes mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, p108-115.
- [69].Mokrani, A., Mindjou, S., Bachir-bey, M., ET LouailechE, H., 2009. Evaluation du pouvoir antioxydant de quelques variétés d'ail. Université Abderrahmane MIRA de Béjaia, Faculté de Sciences de la Nature et de la Vie, Département des Sciences Alimentaires et Département de biologie physico-chimique. Route de Targa-Ouzemour, 06000, Béjaia.

- [70]. Shimizu, H. (2004). Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study, *Stroke*, 35 (9) : 2072-2077.
- [71]. Frankel, E. N., Kanner, J., Kinsella, J. E. (1993). Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* ; 341 : 454-7.
- [72]. Hertog, M. G. L., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan, M. B., Kromhout, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen Elderly Study. *Lancet*; 342 : 1007-11.
- [73]. BELMOKHTAR zoubir 2015 thèse de doctorat USTOMB Oran 2015 - Identification et caractérisation des molécules du métabolisme secondaire de *Retama monosperma*. L. Boiss, intérêt pharmaceutique. Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16(3), 144-158.
- [74]. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss. Technology* 28, 25–30.
- [75]. Molyneux, P., 2004. The use of the stable free radical diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science Technology*. 26 (2), 211-219.
- [76]. Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolic in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food. Chem.*, 53: 4290-302.



# Chapitre II

## Partie expérimentale

**Introduction :**

Ce présent chapitre désigne la description de l'ensembles des expériences effectuées nécessaire a l'extractions des biomolécules (poly phénol ; Flavonoïdes , alcaloïdes , tanins ect .) a partir de deux plantes médicinales la *Retama Retam* et la *Calycotome Spinosa*.

**II.1.Matériels végétales et Echantillonnés :****II.1.1Collecte de l'échantillon de *Retama Retam* :**

Le matériel végétal est constitué des parties aériennes de la plante *retamaraetam* : racines , fleurs et rameaux , sont représentées dans le tableau II.3 et ils ont été récoltées dans la wilaya de Bayadh exactement Boussemghoun (figure 1,2) durant le mois de février 2019.

**II.1.1.1.Présentation du site de récolte**

**Figure II.1:** Site d'échantillonnage



**Figure II.2:** Localisation de la commune Boussemghoun

**Tableau II. 1 : Les données climatiques de la région de Boussemghoun**

Coordonnées géographiques de Boussemghoun	Latitude: 32.8643, Longitude: 0.02012 32° 51' 51" Nord, 0° 1' 12" Est
Superficie de Boussemghoun	58 610 hectares 586,10 km <sup>2</sup>
Altitude de Boussemghoun	992 m
Climat de Boussemghoun	Climat désertique sec et froid (Classification de Köppen: BWk)

**I.1.2.Collecte de l'échantillon *Calycotome Spinosa*:**

Le matériel végétal est constitué des parties aériennes de la plante *calycotome spinosa* : racines , tiges ,fleurs et feuilles , ils sont représentées dans le tableau II.4 et ils ont été récoltées dans la région d'El Kheither (figure 3) durant le mois de février 2019

**I.1.2.1.Présentation du site de récolte :****FigureII.3 : Site d'échantillonnage****Tableau II.2 : Données climatiques de la région d'El Kheiter**

Coordonnées géographiques d'El Kheiter	Latitude: 34.1434, Longitude: 0.0732471 34° 8' 36" Nord, 0° 4' 24" Est
Superficie d'El Kheiter	102 310 hectares 1 023,10 km <sup>2</sup>
Altitude d'El Kheiter	984 m
Climat d'El Kheiter	Climat semi-aride sec et froid (Classification de Köppen: BSk)






La reconnaissance botanique de deux plantes étudiées *Retama Raetama* ,*Calycotome Spinosa* a été faite par Monsieur Eddoud Amar du département des sciences biologiques de l'université Kasdi Merbah de Ouargla.

### II.1.3 Préparation des échantillons :

Les échantillons ont été nettoyés et coupés en petits morceaux, et ils ont ensuite suivi par un séchage à la température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité afin d'éviter la dégradation des principes actifs et le développement des moisissures et la photo-oxydation pendant 21 jours dans un endroit aéré jusqu'à l'obtention d'un poids fixe (matière sèche). Une fois séchés, ils sont broyés à l'aide d'un mortier ensuite ils ont été broyés à l'aide d'un broyeur électrique .la poudre a été récupérée et tamisée à l'aide d'un tamiseur dont les dimensions des pores sont  $\leq 125 \mu\text{m}$ , afin d'obtenir une poudre plus lisse sans grumeaux.

Le broyat obtenu a été conservé dans des flacons fermés en verre dans un endroit sec et à l'abri de l'humidité et de la lumière jusqu'à son utilisation.

**Tableau II.3 : photos de la différente partie de la plante *Retama Raetam* :**

Partie de la plante	Racines	Rameaux	Feuilles
Matière végétale récoltées			
Matière végétale broyée			

**Tableau II.4 : photos des différentes parties de la plante *Calycotomespinosa* :**

Partie de la plante	Racines	Tiges	Feuilles	Fleurs
Matière végétale récoltées				
Matière végétale broyée				

## II.2. Screening phytochimique :

Les tests phytochimiques qualitatifs permettent de détecter différentes familles chimiques présentes dans un extrait végétal par des réactions de coloration, de précipitation et d'observations sous lumière ultra-violette. Les techniques de caractérisation qualitatives, utilisées au cours de cette étude sont celles décrites par [1,2]

Les résultats obtenus ont été évalués comme suit :

- Réaction très positive : + + +
- Réaction positive : + +
- Réaction moyennement positive : +
- Réaction négative : -

### II.2.1. Caractérisation des composés phénoliques :

#### II.2.1.1. Caractérisation des Flavonoïdes:

Nous avons pris 10 g de plante, et est mise en poudre, puis mélangé avec 100 ml d'une solution HCl (1%). Ce mélange est macéré durant 24h, après filtration nous avons ajouté NH<sub>4</sub>OH au filtrat jusqu'à la basicité. L'apparition d'une couleur jaune claire ou orange indique la présence des flavonoïdes

### II.2.1.2. Caractérisation des tanins :

Dans un tube à essai, nous avons introduit 1 ml d'infusé à 5 % puis 200  $\mu$ l de solution aqueuse de  $\text{FeCl}_3$  à 1%. La présence des tanins galliques ou catéchiques se traduit par le développement d'une coloration verdâtre et bleue noirâtre, respectivement.

### II.2.2. Caractérisation des alcaloïdes :

La caractérisation générale des alcaloïdes s'effectue sur un extrait aqueux acide de l'échantillon par une extraction par solvant organique apolaire.

#### II.2.2.1 Extraction par solvant organique apolaire et l'analyse phytochimique :

2g d'échantillon sec réduit en poudre fine sont humectés par 1 à 2 ml de solution aqueuse d'ammoniaque ( $\text{NH}_4\text{OH}$  à 10% ou par 5 ml d'une solution de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )) pour déplacer les alcaloïdes, pendant 30 minutes, puis on ajoute de 15 ml dichlorométhane et on filtre pour obtenir une solution extractive de coloration verte ensuite on passe à l'extraction liquide-liquide on ajoute 2 à 4 ml d'acide chlorhydrique dilué à 1/10 et on agite pour déplacer les alcaloïdes à la phase aqueuse et on la répartie sur 3 tubes :

Réaction positive : la formation d un précipite indique la présence des alcaloïdes

Réactif de BOUCHARDAT : Solution iodo-iodurée : précipités bruns

Réactif de DRAGENDORFF : Solution iodo-bismuthite de potassium : précipités orangés à rouge-vermillon

Réactif de VALSER-MAYER : solution de mercuri-iodure de potassium : précipité blanc jaunâtre.

**Remarque :** La spécificité de ces réactifs n'est pas absolue; certains composés (protéines, lignanes, coumarines) peuvent donner des réactions faussement positives avec le réactif de Dragendorff

### II.3. Extraction des huiles essentielles : [3,4].

Hydrodistillation était la méthode adoptée pour faire extraire les huiles essentielles de la plante *Retama raetam* à l'aide du montage classique représenté dans la figure 4.

Une masse importante de la partie aérienne (rameaux et fleurs) de la plante sèche est découpée en petits morceaux pour faciliter leur introduction dans un ballon en verre, ajouter un

volume adéquat d'eau distillée, l'eau ensuite chauffée jusqu'à ébullition, pour que les vapeurs d'eau produites entraînent les constituants volatiles.

- Relargage de la solution obtenue (le distillat) par l'ajout d'une solution aqueuse de NaCl
- Extraction liquide-liquide par l'éther d'éthyle
- Evaporation de solvant organique pour obtenir un résidu (les huiles essentielles).



**Figure II.4 :** Photo du Montage de l'hydro-distillation

## **II.4.Extraction des alcaloïdes :**

### **II.4.1.Extraction des alcaloïdes totaux ( fixes) :**

L'extraction des alcaloïdes est basée sur la différence de solubilité des alcaloïdes en milieu acide et en milieu alcalin.

En basant sur les résultats de criblage phytochimique, de la littérature et de la disponibilité beaucoup plus on a choisi la partie ( rameau) pour l'extraction des alcaloïdes.

#### **II.4.1.1. Extraction par les solvants organiques apolaires en milieu alcalin (Stas-Otto) :**

Comme est montré dans le schéma II.1, une masse de 20 g de rameaux broyés est délipidée par une macération dans de l'éther de pétrole à la température ambiante et sous agitation mécanique pendant 24h - Alcalinisation du marc obtenu par ajout de l'ammoniaque 0.5 N pendant une nuit afin de libérer les alcaloïdes de leurs combinaisons salines.

- Extraction solide-liquide à l'aide d'un extracteur Soxhlet avec un volume de 200 ml de dichlorométhane pendant 4 à 5 heures (au moins 5 cycles pour un épuisement total)
- Concentration de la phase organique sous pression réduite.
- Reprise par un acide dilué  $H_2SO_4$  0,5N
- Basification de la solution obtenue par ammoniaque pour ajuster le pH à 9

- Extraction liquide-liquide par l'éther d'éthylique jusqu'à épuisement ( l'épuisement à été contrôlé par le test avec les réactifs spécifiques des alcaloïdes )
- Evaporation de la phase organique d'alcaloïdes pour obtenir l'extrait d'alcaloïdes totaux
- Le résidu sec obtenu est récupéré et conserver.

#### **II.4.1.2.Extraction par l'alcool acide :**

L'extraction des alcaloïdes totaux de la plante *Retam araetam* dans un milieu acide a été réalisée selon la référence [5] comme est illustré dans la schéma II. 2 :

- Une masse de 20 g de rameaux broyés est délipidée par une macération dans de l'éther de pétrole à la température ambiante et sous agitation mécanique pendant 24h ,
- Le marc obtenu a été subi à une extraction solide-liquide à l'aide d'un extracteur Soxhlet pendant 4 à 5 heures (au moins 5 cycles) avec un volume de 200 ml d'un mélange (Méthanol/ acide acétique) 15 % pour obtenir une solution extractive contient les alcaloïdes plus d'autres molécule bioactives ,
- Alcalinisation de la solution obtenue avec l'ammoniaque de 0,5N jusqu'à pH=9
- Concentration et alcalinisation encore fois pour garder le pH=9
- Solution obtenue est extraite par le chloroforme jusqu'à l'épuisement total de la phase aqueuse (l'épuisement à été contrôlé par le test avec les réactif spécifiques des alcaloïdes)
- Evaporation de la phase organique d'alcaloïdes pour obtenir l'extrait d'alcaloïdes totaux
- Le résidu sec obtenu est récupéré et conserver.



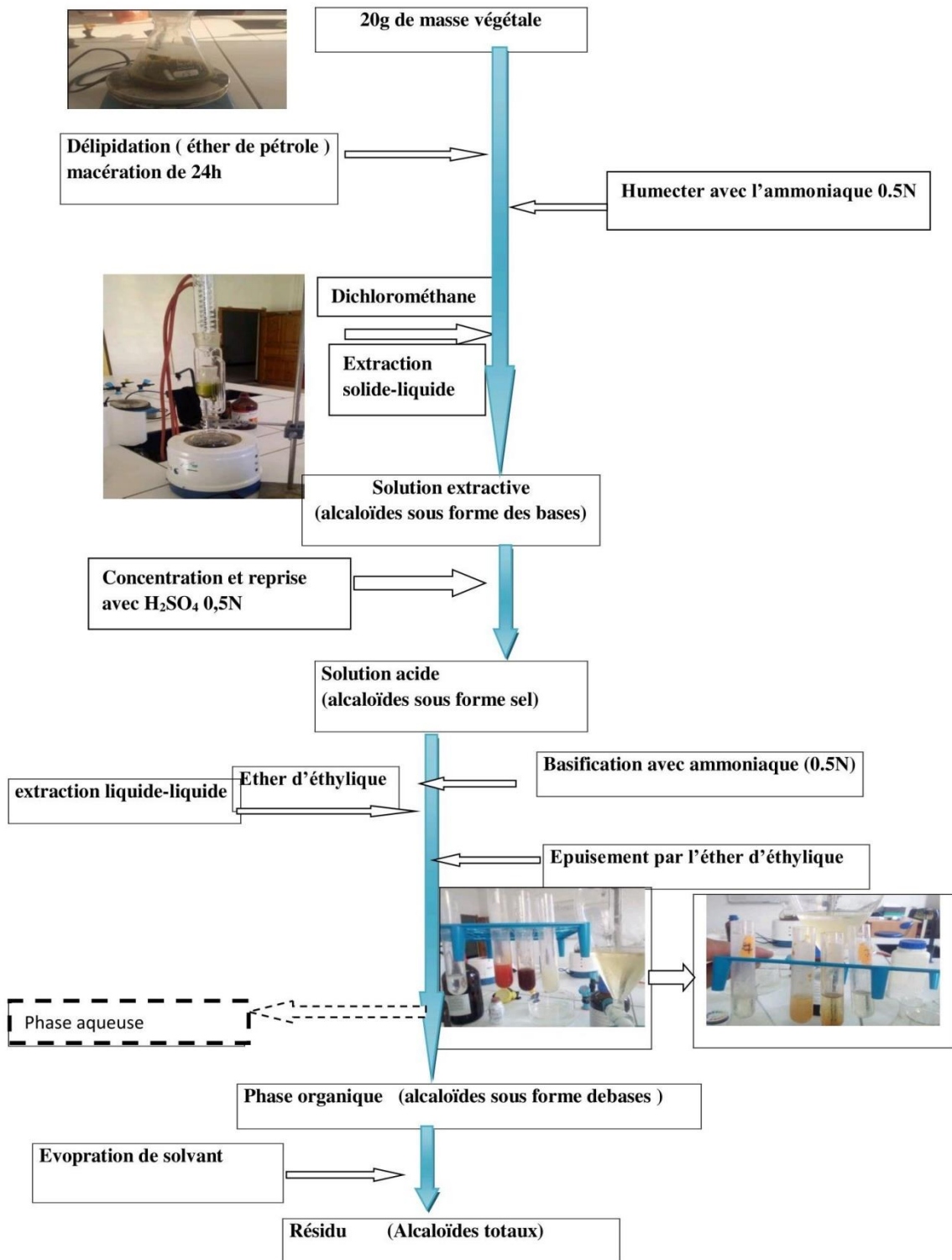


Schéma II.1 : Protocole d'extraction des alcaloïdes totaux en milieu alcalin

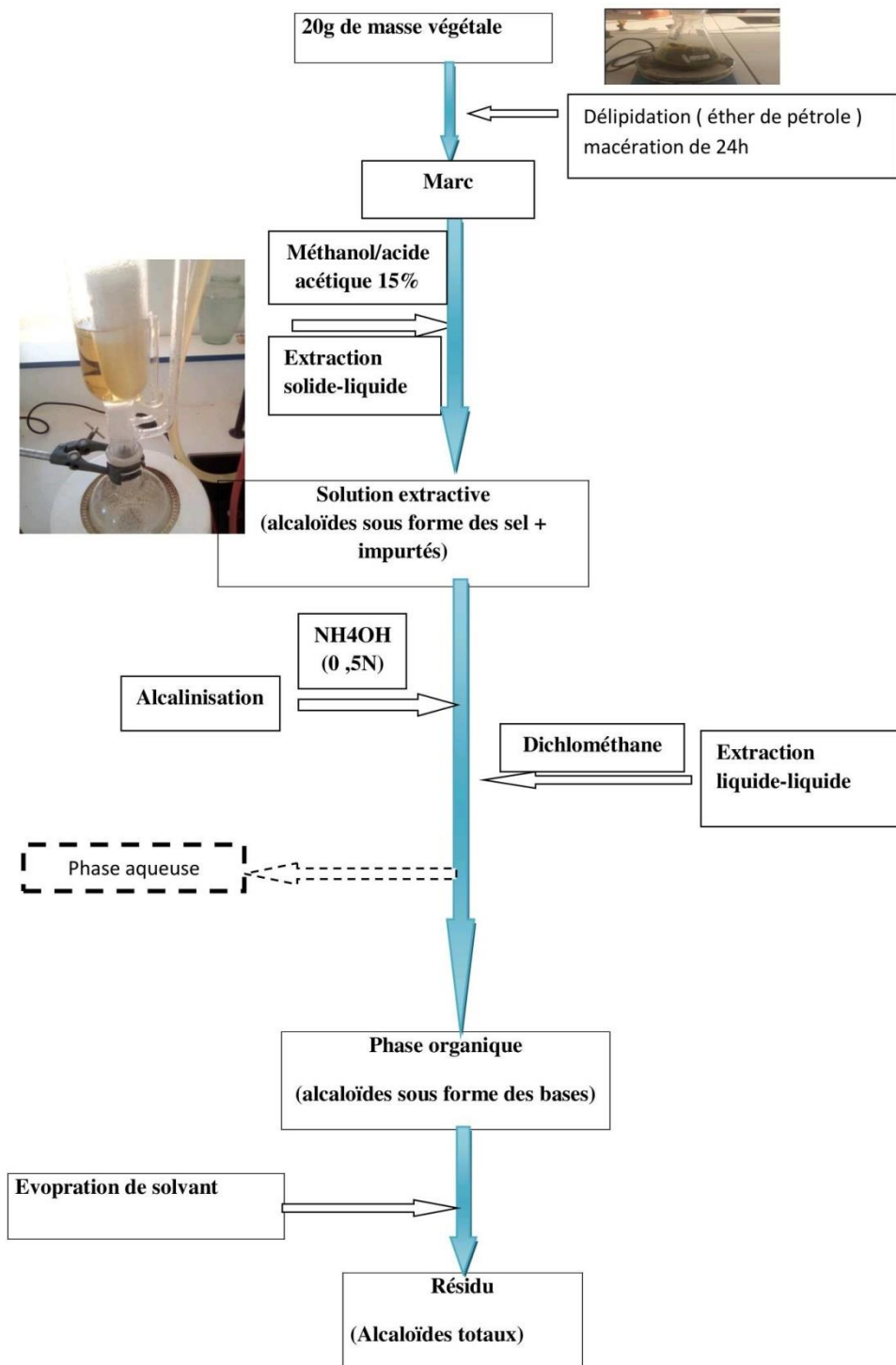
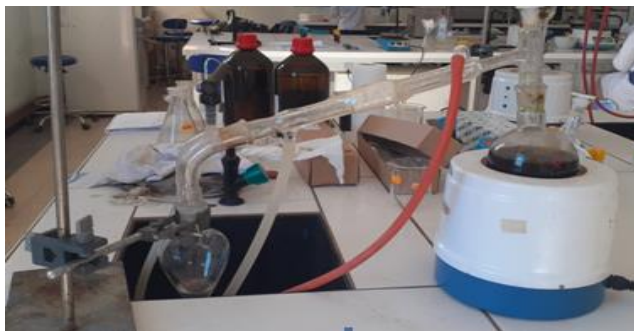


Schéma II.2 : Protocole d'extraction des alcaloïdes totaux par alcool acide

#### II.4.2 Extraction des alcaloïdes volatiles :

D'après la littérature il n'y a pas des travaux pour l'extraction spécifiques à des alcaloïdes volatiles si pour cela on a tenté avec ce protocole adoptée par

- Une masse de 20 g de rameaux broyés est délipidée par une macération dans de l'éther de pétrole à température ambiante et sous agitation mécanique pendant 24h ,
- alcalinisation la masse végétale par l'ajout de l'ammoniaque 0.5 N pendant une nuit afin de libérer les alcaloïdes de leurs combinaisons salines
- la masse humecté par un base a subit à une hydrodistillation
- tester la solution extractive avec les réactifs spécifiques des alcaloïdes
- Relargage par l'ajout d'une solution aqueuse de NaCl
- Extraction liquide-liquide avec l'hexane pour extraire les alcaloïdes volatiles
- Evaporation de la phase organique d'alcaloïdes pour obtenir l'extrait d'alcaloïdes volatiles



**Figure II.5 : montage de hydro-distillation pour l'extraction spécifique des alcaloïdes volatiles**

#### Calcul du rendement des alcaloïdes pures :

Le pourcentage en alcaloïdes totaux ou volatiles est calculé par la formule :

$$R(\%) = (M/M_0) \times 100$$

**R** : Rendement des alcaloïdes en (%)

**M** : Masse en grammes de l'extrait sec résultant

**M<sub>0</sub>** : Masse en grammes du matériel végétal de départ

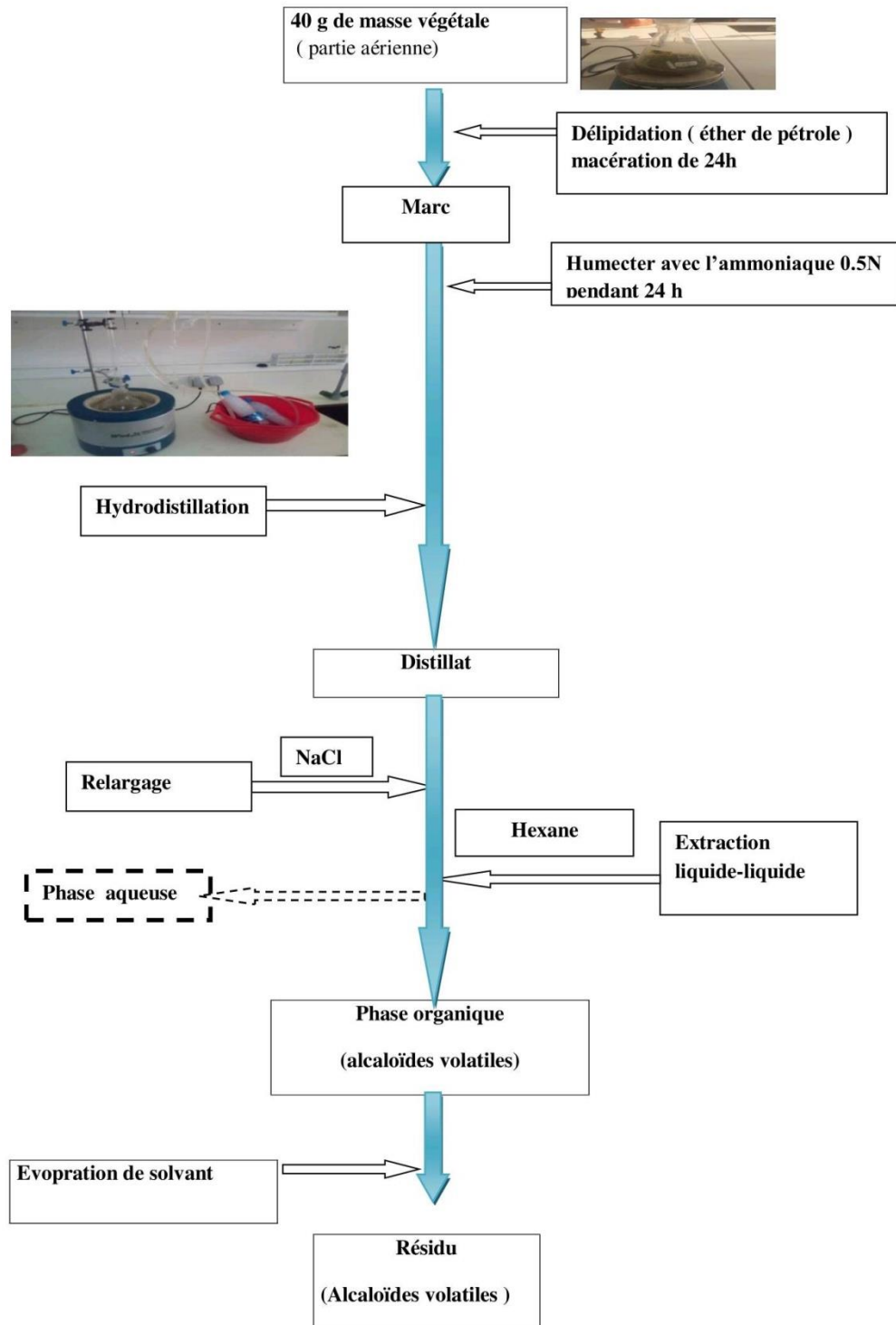


Schéma II.3 : protocole d'extraction des alcaloïdes volatiles

## II.5.Extraction des composés phénoliques :

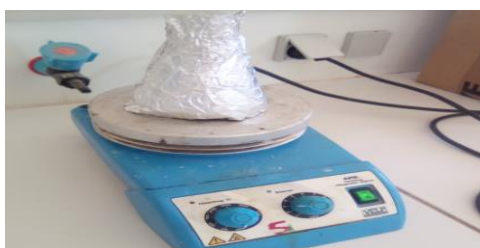
Pour l'extraction des polyphénols il existe plusieurs méthodes, on a choisi deux méthodes conventionnelles (Macération , Soxhlet ) et une méthode d'extraction assistée par micro-ondes qui constitue une des méthodes de chimie verte.

### II.5.1.Extraction des composés phénoliques par Macération :

La macération (extraction solide-liquide) est une opération qui consiste à laisser séjourner la matière végétale (broyat) dans le méthanol aqueux pour extraire les principes actifs (composés phénoliques et flavonoïdes). Cette méthode d'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par [6] avec quelques modifications voir la figure II.6.

- Mettre la matière végétale (10 g) rameaux broyés dans un mélange de 100 ml hydroalcoolique éthanol/Eau (70:30) sous une agitation mécanique à température ambiante et à l'obscurité pendant 48 h , Cette macération est répétée 2 fois avec renouvellement du solvant , après filtration sur un papier filtre et une centrifugation pendant 10 min à 3000 t/min.

La délipidation des échantillons est nécessaire dans cette étude parce que leur contenu en lipides pourra fausser les résultats du dosage des polyphénols et flavonoïdes après, alors on fait laver le filtrat par une extraction liquide-liquide 3 fois avec 1/3 de son volume , ensuite le solvant est évaporé à sec à 55°C.



**Figure II.6 :** Photo montage de Macération

### II.5.2.Extraction des composés phénolique par Soxhlet :

L'extraction par Soxhlet est une technique générale et bien établie, et qui dépasse en performance les autres techniques conventionnelles d'extraction, excepté dans le cas de l'extraction des composés thermo sensibles :

-Comme est montré dans la figure II.7, une masse végétale (10 g) de rameaux broyés est placée dans une cartouche cellulose introduite dans le réservoir de Soxhlet. Le ballon est rempli avec un mélange hydro-alcoolique de 100 ml éthanol/Eau(70:30) et surmonté l'extracteur d'un réfrigérant.

À l'aide d'un chauffe ballon porter à ébullition. , après une douzaine de siphonages, le solvant s'enrichit en substances solubles. Celui-ci passe par la tubulure et il est condensé par le réfrigérant et on récupère la solution extractive.

Pour la délipidation on fait laver le filtrat par une extraction liquide-liquide 3 fois, ensuite le solvant est évaporé à sec à 55°C



Figure II.7 : Photo de montage d'extraction avec Soxhlet

### II.5.3.Extraction assisté par micro-ondes :

En utilisant un micro-onde d'une marque CMW-M2005W qui fonctionne à une fréquence de 2450kHz et une puissance d'entrée nominale de 1050W, et une puissance de sortie maximale de 700 W , avec ses dimensions extérieures (P xLxH) (440 x 358 x 259 mm) d'une capacité de 20 L, Ce micro-onde a été modifié afin de condenser les vapeurs générées lors de l'extraction . Comme est montré dans la figure II.8 On introduit une masse végétale (10 g) de rameaux

broyés dans un ballon surmonté d'un réfrigérant, et remplir le ballon avec un mélange de hydro-alcoolique 100 ml éthanol/Eau (70:30).

Le mélange a été irradiée pendant 10 mn d'une manière discontinue. après filtration sur papier filtre le filtra a subit à une centrifugation pendant 10 min à 3000 t/min ,Pour la délipidation on fait laver le filtra par une extraction liquide-liquide 3 fois , ensuit le solvant est évaporé à sec à 55°C



**Figure II.8 :** Photo de montage d'extraction assistée par micro-ondes

## **II.6.Extraction des flavonoïdes :**

Suivant les mêmes étapes précédentes pour obtenir les trois phases ou trois solutions extractives hydro-éthanolique (70/30) par les trois déférentes méthodes ( macération ,soxhlet et l'extraction assistée par micro-ondes) , on fait concentrer le filtra et on fait un fractionnement par déférents solvants.

Cette étape se repose sur la spécificité et la polarité des solvants organiques vis-à-vis des flavonoïdes séparées contenus dans la solution aqueuse obtenue.

-quatre solvants à polarité croissante a savoir : Ether de pétrole , Chloroforme, Acétate d'éthyle et le n-Butanol

### **II.6.1.Affrontement par l'éther de pétrole :**

Avant l'extraction des différents flavonoïdes, les trois phases aqueuses obtenues après évaporation ont été débarrassées des cires, des lipides et de la chlorophylle par trois lavages successifs avec l'éther de pétrole[7] (élimine tous les composés non phénolique : les caroténoïdes et les pigments chlorophylliens, les graisses).

Le Protocole de cette phase selon la référence [8] est le suivant (schéma II.4) :

- Ajouter 1/3 volume d'éther de pétrole au volume de la phase aqueuse obtenue (v/v)
- Bien agiter et laisser reposer le mélange, aux moins 20mimute jusqu'à l'obtention de deux

phases, une phase organique ou éther de pétrole (coté supérieur) et une phase aqueuse (coté inférieur)

- Récupérer la phase organique dans un récipient en verre ;
- Répéter la procédure trois fois ;
- La phase éther de pétrole est rejetée.

A la fin de cette manipulation, 50 ml de chaque phase aqueuse suivi l'affrontement par chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol. Le reste de chaque phase, contenant les composés phénolique et flavonoïdes, a été évaporé au rotavap ( $T = 45^{\circ}\text{C}$ , et répéter 3 fois R 3) et l'extrait obtenu a été récupéré et conservé à la température ambiante jusqu'à son utilisation.

### **II.6.2.Affrontement par chloroforme :**

La phase aqueuse obtenue à partir le lavage avec éther de pétrole a été réalisée avec chloroforme qui permet à extraire les aglycones (composés simples tels que les acides phénols et les flavonoïdes).

Dans ce cas, le mode opératoire de cette phase est comme suit [8]:

- Ajouter un volume la phase aqueuse (v/v) aux 1/3 ml de chloroforme
- Bien agiter et laisser reposer le mélange au moins 20 minute jusqu'à l'obtention de deux phases, une phase organique du chloroforme (coté supérieure) et une phase aqueuse (coté inférieur)
- Répéter la procédure trois fois
- Évaporer la phase organique obtenue pour obtenir un résidu sec ( extrait chloroformique )

### **II.6.3.Affrontement par l'acétate d'éthyle :**

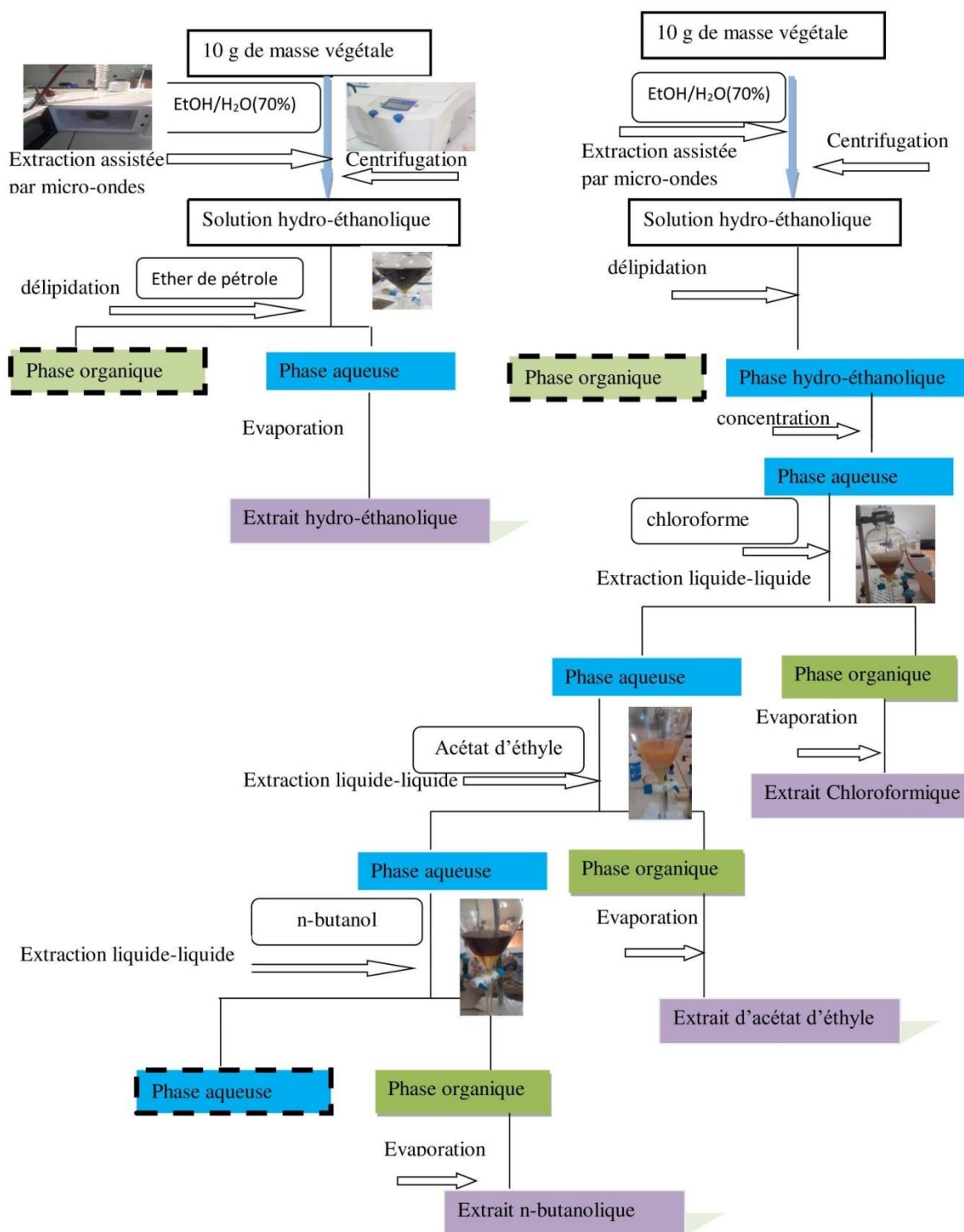
Dans ce cas la phase aqueuse utilisée est celle qui a été obtenue à partir de la phase chloroforme Cette phase a été réalisée par l'acétate d'éthyle. Elle a été effectuée selon le même protocole précédent, et la phase organique obtenue a été est évaporé également pour obtenir un résidu sec ( extrait d'acétate d'éthyle )

### **II.6.4.Affrontement par le n-butanol :**

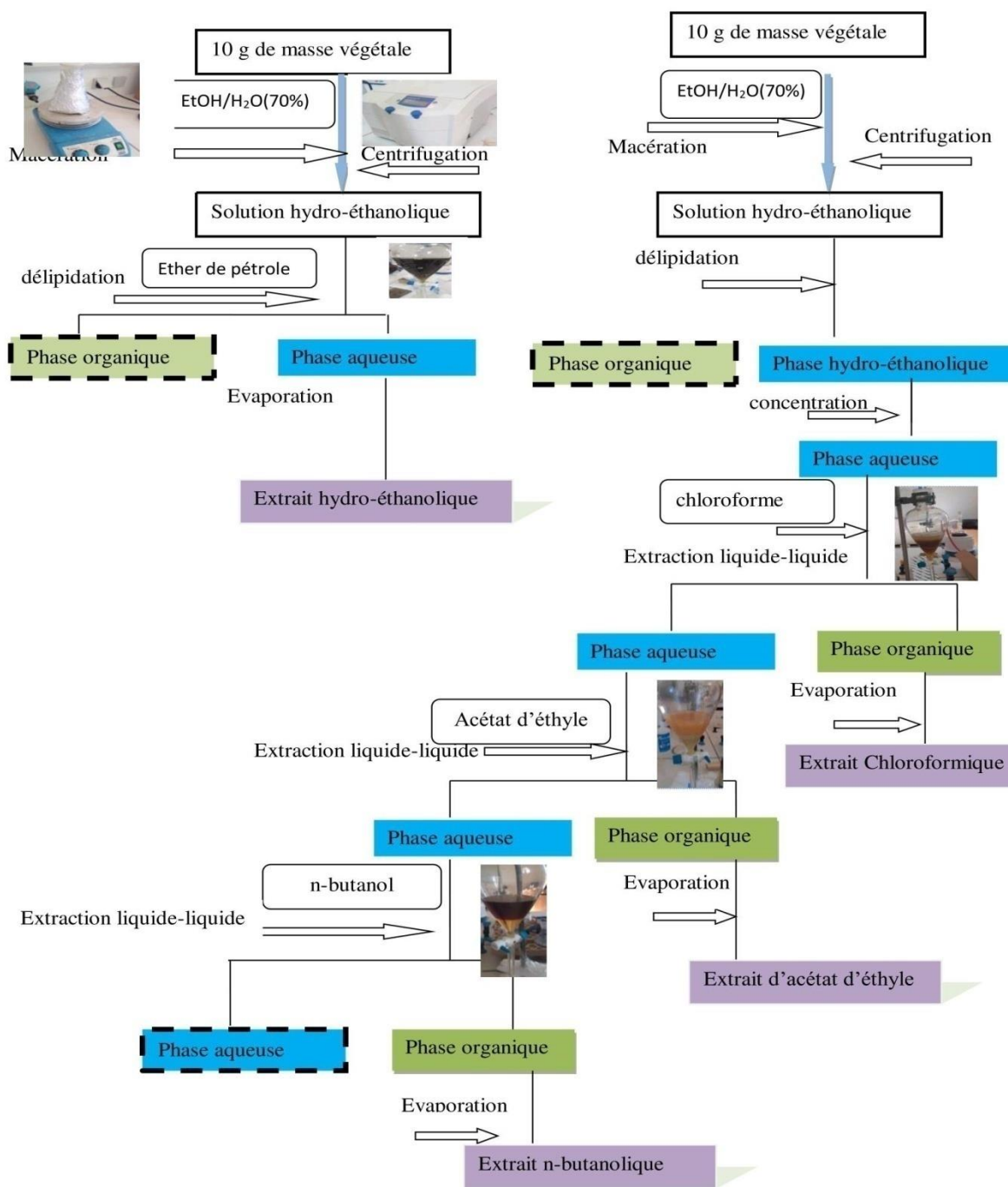
On ajoute le n-butanol à la phase aqueuse obtenue a partir de la phase de l'acétate d'éthyle la phase organique (coté supérieure phase de n-butanol)

- Évaporer la phase organique obtenue pour obtenir un résidu sec ( extrait n-butanolique )

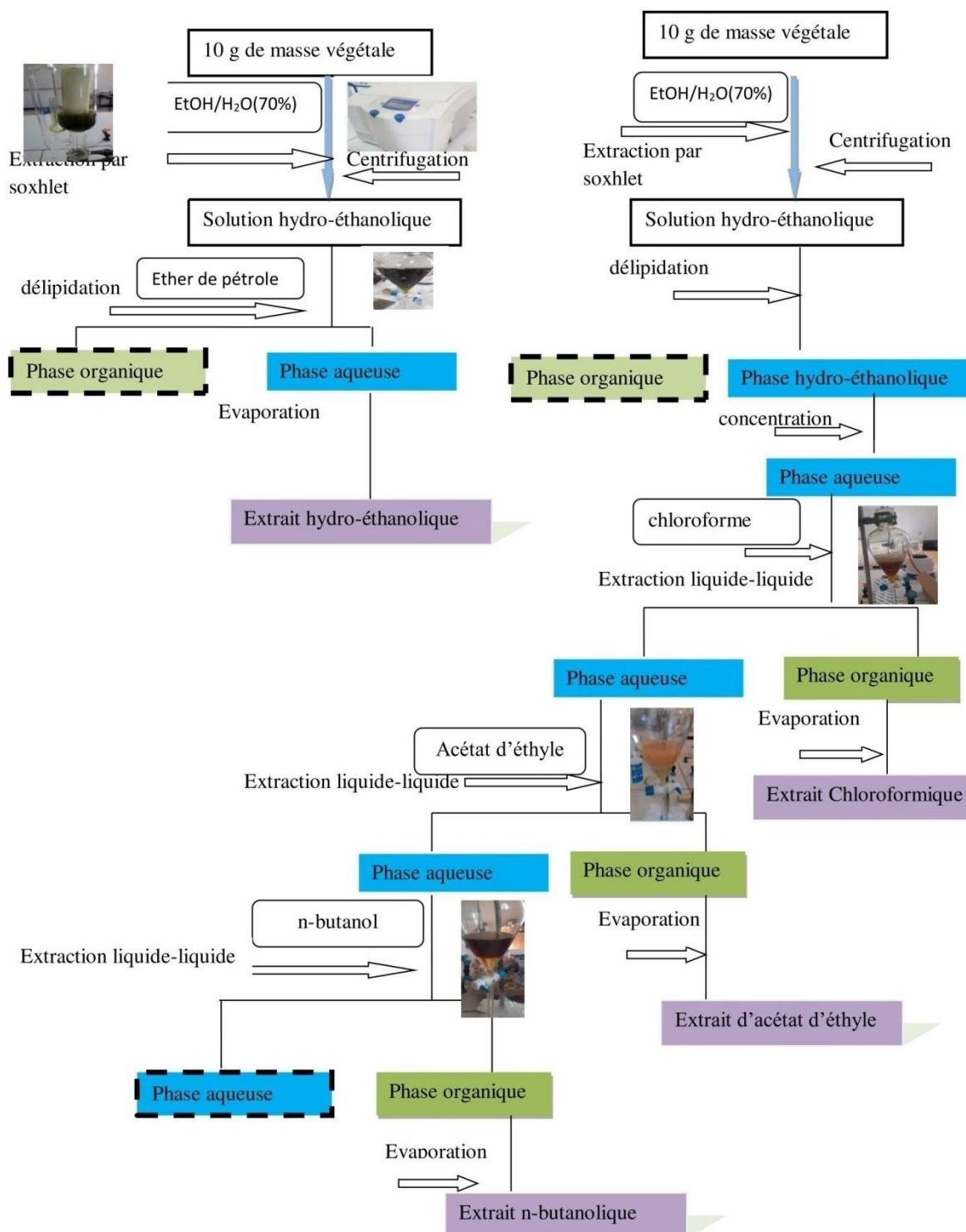




**Schéma II.4 :Protocole d'extraction assistée par micro onde des poly phénols et flavonoïdes par affrontement de solvant**



**Schéma II.5 : protocole d'extraction des polyphénols et flavonoïdes par affrontement de solvant par macération**



**Schéma II.6 : Protocole des polyphénols et flavonoïdes par affrontement de solvant par Soxhlet**

## II.7. Dosage de polyphénols :

### Principe :

En milieu basique et en présence de composés phénoliques, le mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) est réduit en oxydes bleu de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ) lors de l'oxydation des poly phénols. La coloration bleu obtenue est proportionnelle au taux des composés phénoliques [9].

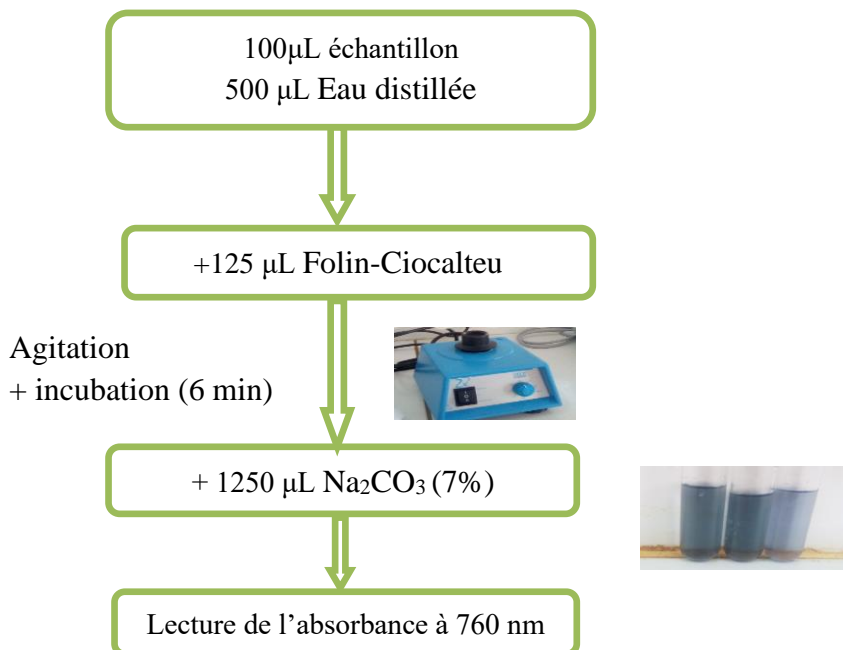
### Protocole :

Les composés phénoliques totaux ont été dosés avec le réactif de Folin-Ciocalteu , 0.100 mL de la fraction d'échantillon diluée a été ajouté à 0,5 mL d'eau distillée et à 0,125 mL de réactif Folin-Ciocalteu. Le mélange a été agité et incubé pendant 6 min avant d'ajouter 1,25 ml  $Na_2CO_3$  (7%).

La solution a ensuite été ajustée avec de l'eau distillée à volume final de 3 ml et bien mélangé. Après incubation dans le noir, l'absorbance a été lue à 760 nm par rapport à un blanc préparé. la teneur a été exprimé en milligrammes d'équivalent acide gallique par gramme de résidu sec. la courbe d'étalonnage (figure II.9) avec de l'acide gallique est comprise entre 200-20 $\mu$ g.



**Figure II.9 :** photo de préparation la courbe étalonnage



**Schéma II.7 : Protocole de dosage des composés phénoliques**

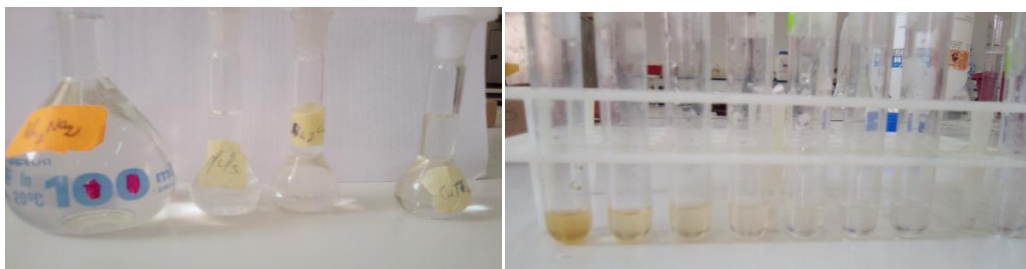
### II.8. Dosage des flavonoïdes :

#### principe :

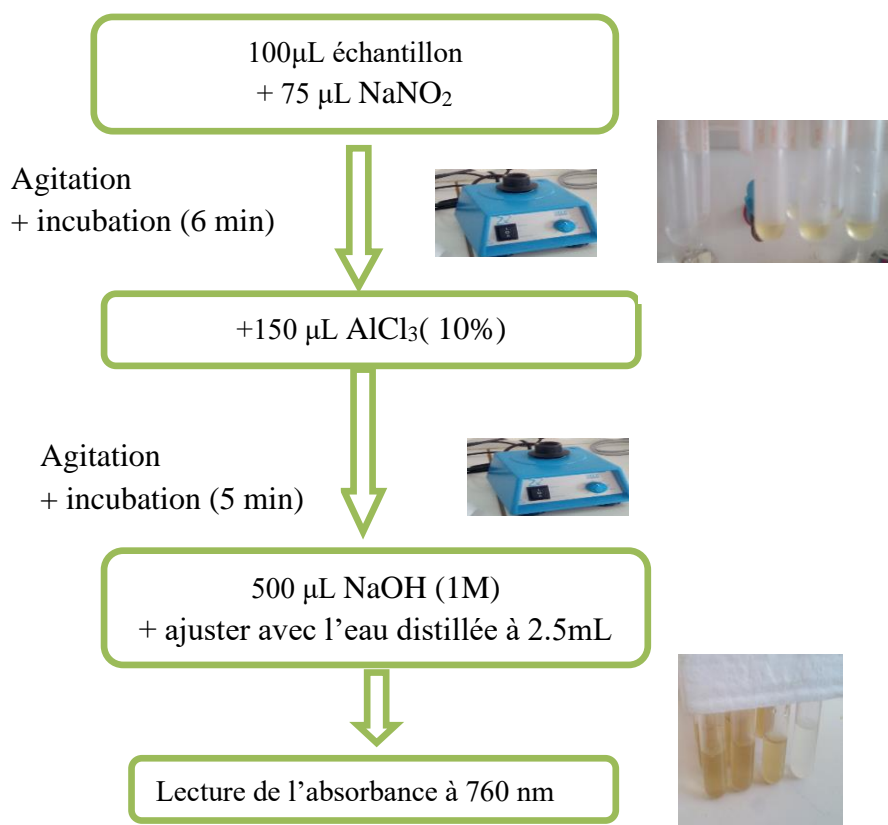
Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement (CO), un complexe en présence de chlorure d'Aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (Fer et Aluminium) [10].

#### Protocole :

0.1mL de standard ou échantillon a été ajoutée à 0.075 ml de solution de  $\text{NaNO}_2$  (7%) et mélangée à l'aide d'un vortex et incubé pendant 6 min avant d'ajouter 0.150 ml de  $\text{AlCl}_3$  (10%). Après 5 min, 500 ml de NaOH de solution (1 M) a été ajoutée. Le volume final a été ajusté à 2,5 ml, soigneusement mélangé et l'absorbance du mélange a été déterminée à 510 nm. Les flavonoïdes totaux étaient exprimés en mg standard par gramme de résidu sec (mg EC / g de Ms), Les échantillons ont été analysés trois fois.



**Figure II.10** : photo montre la préparation du courbe étalonnage



**Schéma II.8** : Protocole de dosage des flavonoïdes

## II.9. Activité antioxydante

### II.9.1. Détermination de l'activité de piégeage des radicaux libres (DPPH) : [11,12,13,14]

0,05 ml des extraits bruts ont été mélangés avec 1,95 ml d'une solution de DPPH fraîchement préparée à une concentration de 24 mg dans 100 ml de méthanol. Après 1/2 heure d'incubation des échantillons dans l'obscurité, l'absorbance mesurée a été réalisée à 515 nm, avec un contrôle

positif (acide ascorbique). Les pourcentages d'inhibition du radical libre de DPPH, en fonction des concentrations d'extraits, ont été déterminés en utilisant l'équation:

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



**Figure II.11** : photo de l'échantillon avant et après incubation

La capacité anti-oxydante a été déterminée à partir de la valeur de la IC50, qui correspond à la concentration de l'antioxydant nécessaire pour piéger 50% de DPPH dans la solution à examiner

### **II.9.2. Test de la réduction du fer FRAP (Ferricreducing-antioxidant power) : [11,12]**

Cette méthode est basée sur la réduction de fer ferrique en sel de fer par les antioxydants qui donnent la couleur bleu, elle se fait en 5 étapes :

Etape 1 : Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations (de 0,007 à 2,5 mg/ml) est mélangé avec 2,5 ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium  $K_3Fe(CN)_6$  à 1%.

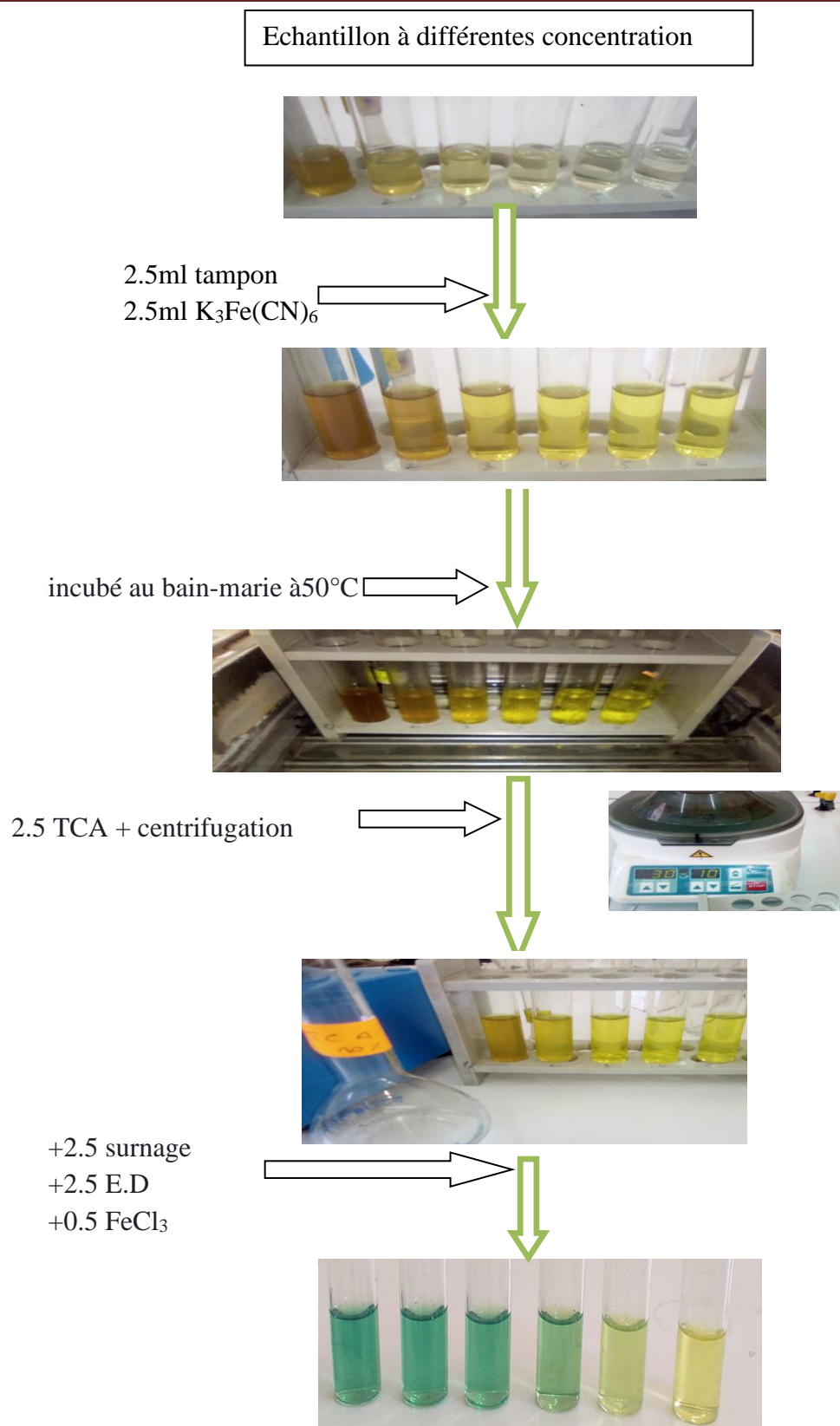
Etape 2 : L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min

Etape 3 : Ensuite, 2,5 ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction.

Etape 4 : Les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min.

Etape 5 : Un aliquote (2,5 ml) de surnageant est combinée avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution aqueuse de  $FeCl_3$  (Chlorure ferrique) à 0,1%.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé,



**Figure II.12** : Les différentes étapes de l'activité antioxydante FRAP



## **II.10.Optimisation des conditions d'extraction par la méthodologie de surface de réponse :**

L'optimisation de l'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante est réalisée (Schéma II.9) par la méthode des surfaces de réponse en utilisant le logiciel JMP, quatre paramètres ayant une influence significative ont été sélectionnés qui sont : la concentration du solvant, le temps, la puissance et le ratio solide liquide, et pour chaque paramètre, trois niveaux sont fixés : niveau bas (-1), niveau élevé (+1) et un niveau intermédiaire (0).

### **II.10.1.Etudes préliminaires :**

Les études préliminaires permettent la détermination des niveaux inférieurs et supérieurs des variables du plan expérimental utilisé à fin de sélectionner un meilleur intervalle pour chaque paramètre

#### **II.10.1.1.choix du solvant :**

Choisir le bon solvant en utilisant quatre différents solvants : Méthanol 50%, Ethanol 50 %, Acétone 50 % et Eau, sachant que le temps et la puissance d'extraction sont fixés à 5 minutes, 500 watt et le ratio solide liquide 1g/20ml respectivement. Le meilleur solvant a été choisi sur la base de contenu le plus élevé de composés phénoliques.

#### **II.10.1.2.Concentration de solvant :**

La meilleure concentration de solvant a été déterminée en utilisant le meilleur solvant choisi dans l'étape précédente, en allant de 20 à 80 % (v/v).

#### **II.10.1.3.Temps d'extraction :**

L'impact du temps d'extraction a été également étudié en utilisant le meilleur solvant et à la meilleure concentration en allant de (2, 3, 4, 5,6 min) .

#### **II.10.1.4.La Puissance :**

Dans cette étape, les deux paramètres précédents : % solvant, le temps d'extraction ont été fixés tout en variant la puissance (200, 300, 400,500 ,600 W).

**II.10.1.5 Ratio solide/liquide :**

Nous avons procédé à la détermination du ratio (solide/liquide), en fixant le solide (1g de la poudre) et en variant le volume de solvant comme suite : (10, 15, 20, 25,30 ml).

**Optimisation des conditions d'extraction :****Procédures de l'extraction :**

1g d'échantillon dans une ballon en verre de 250 ml à fond plat plat surmontée d'un réfrigérant. Le mélange a été irradié à des différentes concentrations, à des différentes puissance, pendant différents temps, pour différents volumes de solvant puis filtré et centrifugé, ensuit évaporation du solvant pour obtenir un extrait brute. Les extraits ont été conservés à 4°C jusqu'aux analyses et dosages.

**II.10.2.Construction du plan :**

En se basant sur les observations des études préliminaires, les gammes de chaque variable indépendante : concentration en éthanol (X1), puissance de l'extraction (X2), temps de l'extraction (X3) et du ratio (X4) influençant l'extraction ont été introduits dans le plan BBD.

Ethanol concentration( % )	(-1)	(0)	(+1)
temps (min)	(-1)	(0)	(+1)
puissance (W)	(-1)	(0)	(+1)
ratio solide/liquide	(-1)	(0)	(+1)

Selon la formule  $N = 2k(k-1) + C_p$ ..... (VI) ; 27 essais seront réalisés de manière à pouvoir estimer le model mathématique de la réponse investiguée.

Où :  $N$  : est le nombre d'expériences.

$k$  : est le nombre de facteurs.

$C_p$  : est le nombre de points centraux [5]

**Tableau II.5 :** Les différentes combinaisons effectuées pour l'optimisation des conditions d'extraction de la plante

<i>Retama Raetam</i>					et	<i>Calycotome Spinosa</i>				
Essai	EtOH%	Temps	Puissance	S/L		Essai	EtOH%	Temps	Puissance	S/L
1	-1	0	0	1		1	0	1	0	-1
2	0	-1	0	1		2	0	1	0	1
3	0	1	0	1		3	1	0	0	-1
4	1	1	0	0		4	-1	-1	0	0
5	1	0	-1	0		5	0	0	1	-1
6	1	0	1	0		6	0	0	0	0
7	-1	0	0	-1		7	0	-1	0	-1
8	-1	-1	0	0		8	0	0	0	0
9	0	1	0	-1		9	1	-1	0	0
10	0	0	-1	1		10	-1	0	0	1
11	-1	1	0	0		11	-1	0	0	-1
12	0	-1	0	-1		12	1	1	0	0
13	0	0	1	1		13	0	-1	-1	0
14	-1	0	1	0		14	0	0	1	1
15	0	0	1	-1		15	1	0	-1	0
16	0	-1	-1	0		16	0	1	-1	0
17	1	0	0	-1		17	-1	0	-1	0
18	1	-1	0	0		18	0	0	-1	-1
19	0	-1	1	0		19	-1	1	0	0
20	0	0	-1	-1		20	1	0	1	0
21	0	1	-1	0		21	-1	0	1	0
22	0	0	0	0		22	0	1	1	0
23	1	0	0	1		23	0	0	-1	1
24	-1	0	-1	0		24	0	-1	1	0
25	0	1	1	0		25	1	0	0	1
26	0	0	0	0		26	0	0	0	0
27	0	0	0	0		27	0	-1	0	1

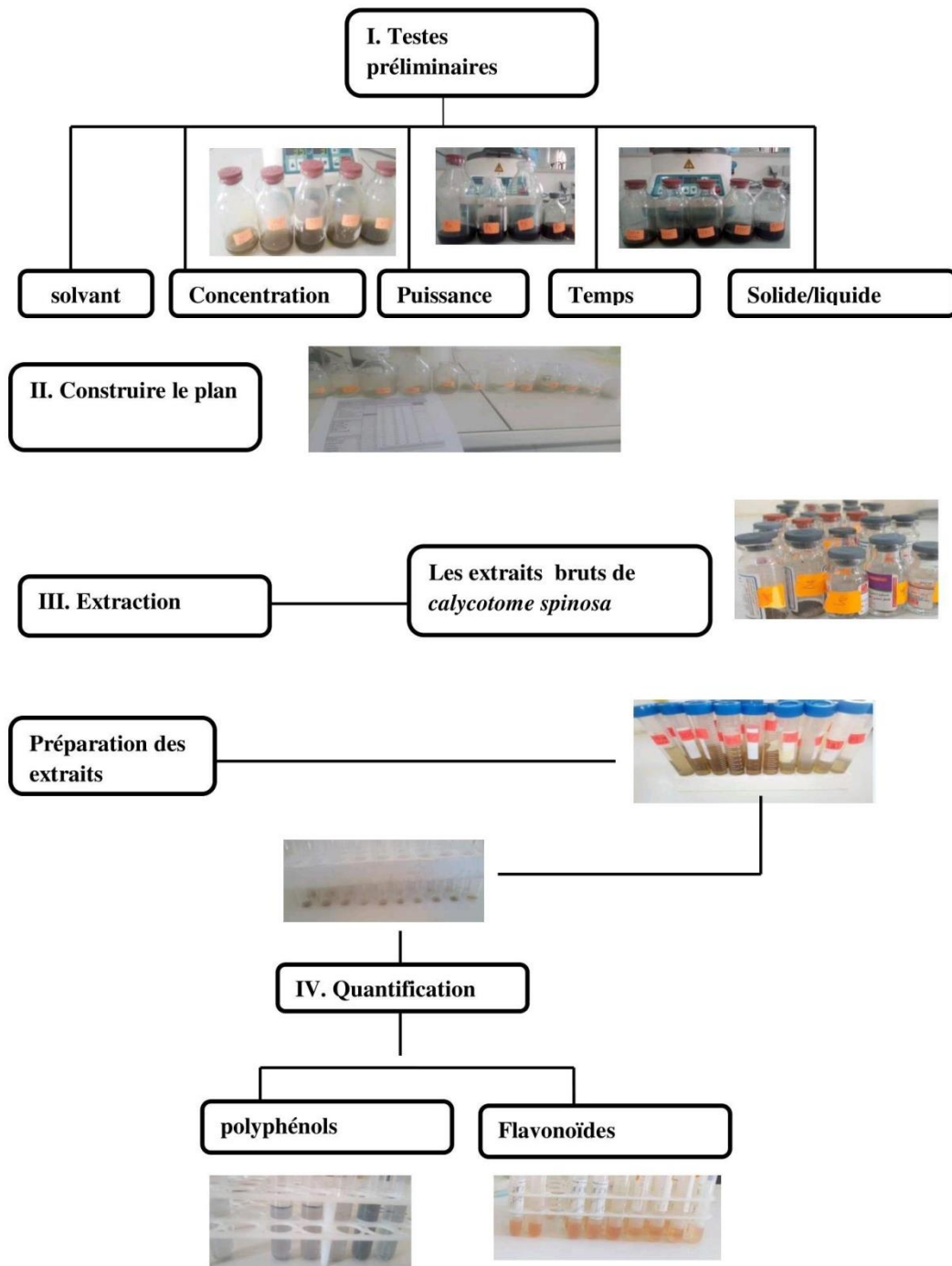


Schéma II.9 : Protocole de l'optimisation des conditions extraction

## Références bibliographiques

- [1]. TREASE G.E. & EVANS W.C., (1989) : A text book of pharmacognosy (13 th Edition )  
BacilluereTinalLtd,London
- [2]. HARBORNE J.B.,(1998):Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants  
analysis.Third Edition.ISBN:0-412-57260-5 (HB) and 0-412-57270-2 (PB).
- [3]. HAYET EDZIRI , MAHA MASTOURI , IMED CHÉRAIF & MAHJOUR AOUNI (2010)  
Chemical composition and antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the flower oil of  
Retamaraetam (Forssk.) Webb from Tunisia, Natural Product Research: Formerly Natural  
Product Letters, 24:9, 789-796, DOI: 10.1080/14786410802529190
- [4].Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de licence en chimie Filière :chimie  
Spécialité : chimie organique Thème Extraction d'huile essentielle et l'étude phytochimieque de  
la plante retamaraetam Présenté par :MELLE BEN ZROUGA DJAHIDA MELLE  
BOUCHUICHA SIHAM Soutenu le : 09 / 06 /2015 devant le jury composé de :  
dosage polyphénols flavonoïdesdpphfrap
- [5].MAKKAR H.P.S., SIDHURAJU P. ET BECKER A. (2007). Plant secondary  
metabolites.Methods of molecular biology.Humana press.
- [6].HAMIA C., GUERGAB A., RENNANE N., BIRACHE M., HADDAD M., SAIDI M ET  
YOUSFI M. (2014) Influence des solvants sur le contenu en composés phénoliques et l'activité  
antioxydante des extraits du rhanteriumadpressium. *Annales des sciences et technologie*. Vol 6.  
N° 1.
- [7].KEBIECHE M., LAKROUN Z., MRAÏHI Z ET SOULIMANI R. (2011) Effet  
antidiabétogène et cytoprotecteur de l'extrait butanolique de *Ranunculus repens* L. et de la  
quercétine sur un modèle expérimental de diabète alloxanique. *Phytothérapie*. 9: 274-282.
- [8].RIHANE K ET BENLAHARCHE R. (2013) activité antibactérienne des polyphénols et  
flavonoïdes d'extraits à partir deux plantes médicinales : artémisia herba alba et ocimum  
basilicum sur escherichia coli et staphylococcus aureus. *Mémoire de master* université  
mentouriconstantine
- [9]. BOIZOT,NATHALIE and J.CHARPENTIER. "Methode rapide d'évaluation di contenu en  
composes phenoliques des organes d'un arbre forestier "(2006) .
- [10].RIBEREAU-GAYON, P., 1968. Les tannins, les composés phénoliques des végétaux. Paris.  
EdDunod.173-201

- [11].BOUGANDOURA, NABILA & BENDIMERAD, NASSIMA. (2013). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* sp. *Nepeta* (L.) Briq.. Revue «Nature & Technologie». B-Sciences Agronomiques et Biologiques. 15.
- [12].Serairi-Beji R, AidiWannes W, Hamdi A, et al. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Asparagus albus* leaves in carbon tetrachloride-induced liver injury rats. *J Food Biochem.* 2017;e12433. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12433>
- [13].MEBARKA BOUZIANE ET AL ,Antioxidant and antibacterial properties of *Brocchiacinerea* (Vis.) and *Matricariapubescens* (Desf.) ethyl acetate extracts and their fractions,*DerPharmaChemica*, 2016,8 (17):232-239
- [14].TLILI MOHAMMED LAID 2014 Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de *Pergulariatomentosa* issue de quatre sites sahariens différents (Sahara septentrional)Mémoire de magister UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA
- [16].BEZERRA, M.A., SANTELLI, R.E., OLIVEIRA, E.P., VILLAR, L.S., ESCALEIRA, L.A., 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry.*Talanta* 76.

# Chapitre III

Résultats et discussions

**Introduction :**

Dans ce présent travail nous avons réalisés en premier lieu l'extraction des biomolécules à partir de deux plante de la familles Fabaceas (*Retama Raetam* et *Calycotome Spinosa* ). Plusieurs techniques ont été utilisés .La caractérisation des produits obtenus a été effectuée par une analyse qualitative, soit sur la formation de complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit sur la formation de complexes colorés, en utilisant des réactions de coloration .En second lieu nous avons déterminés les conditions optimales de l'extraction a l'aide du plan expérience suivi d'une modélisation mathématique du rendement d'extraction en fonction des différents paramètres étudiées (la concentration de solvant, le temps, la puissance et le ratio liquide/solide et le rendement d'extraction (la réponse) ).

**III.1 Screening phytochimique :**







Les tests de caractérisation sont basés en partie sur l'analyse qualitative, soit sur la formation de complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit sur la formation de complexes colorés, en utilisant des réactions de coloration

Les résultats sont classés selon l'apparition en :

- Réaction très positive : + + +
- Réaction positive : + +
- Réaction moyennement positive : +
- Réaction négative : -

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau

**Tableau III.1:** Résultats de screening phytochimique pour les plantes étudiées.

	<i>Retama Raetam</i>		<i>Calycotome Spinosa</i>	
Flavonoïdes		++		+++
Tanins		+		+++
Saponines		++		+




Les tests phytochimiques réalisés de la partie aérienne de différentes plantes ont révélé la richesse en métabolites secondaires .







Les flavonoïdes et les tanins existent dans toutes les extraits dont les extrait de calycotome est fortement positif alors que les extrait de retama raetam sont moins positives les résultats sont identique avec les résultat de [1]

Pour les saponines on a trouvé une présence plus ou moins abondante pour Retama Raetam et moyennement positif dans la plante *Calycotome Spinosa*

**Tableau III.2:** Résultats de screening phytochimique de caractérisation des alcaloïdes de *Retama Raetam*

<i>Retama raetam</i>				
partie de la plante	Dragendorff	Bouchardat	Mayer	Photo
rameaux	+++	++	+	
Racines	+	+	-	
Fleurs	+	+	-	

**Tableau III.3:** Résultats de screening phytochimique de caractérisation des alcaloïdes de *Calycotome Spinosa*

<i>Calycotome spinosa</i>				
partie de la plante	Dragendorff	Bouchardat	Mayer	Photo
Racines	++	++	+	
Tiges	+++	++	++	
Feuilles	++	++	+	
Fleurs	+	-	-	

Pour la recherche des alcaloïdes on a fait les tests pour les différentes parties de la plantes pour nous faciliter l'étape de l'extraction des alcaloïdes et d'après les résultats obtenus il ressort de cette analyse que les alcaloïdes sont présent au niveau de tout les extraits des

plantes à l'exception de l'extrait de fleurs et racines qui révèle un test négatif avec le réactif Mayer dans la plante *Rétama Raetam* et aussi l'extrait de fleurs donne un test négatif avec le réactif Mayer et bouchardât dans *Calycotome spinosa*, et d'après les tests qui ont été faits dans les différentes parties de la plante on ressort que les rameaux de *Retama Raetam* et les tiges de *Calycotome Spinosa* sont les plus riches en alcaloïdes. Les résultats trouvés sont semblables aux résultats trouvés par [1] et [2].

**Remarque :** on a rencontré un problème de filtration avec le test pour les fleurs, peut-être que ces résultats négatifs reviennent à ce problème.

### III.2 Extraction des huiles essentielles :

Nous avons fait l'extraction de l'huile essentielle de *Rétama Raetam*, et *calycotome spinosa* par le montage d'hydrodistillation et on observe dans nos expériences que le résultat est nul (absence de résidus d'huile) dans les deux plantes. Le résultat est en accord avec les résultats trouvés par [3] sur la plante *raetam* contrairement avec les résultats de [4] qui ont mentionné que les huiles représentent 8 %.

Les compositions chimiques des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation sont nonanal (35,75%), -humulène (29,29%), acétaldéhyde (7,84%), et pour le *calycotome* les résultats de [5] ne correspondent pas à nos résultats.

La composition chimique de l'huile rapportée par [5] a été étudiée partiellement. Ils ont identifié 21 composés représentant 26% de la composition totale de l'huile essentielle.

La composition totale de l'huile essentielle. Cette dernière est caractérisée principalement par eicosane (1,5%), heneicosane (2,8%), pentacosane (2,6%), tétracosane (2,6%), tricosane (1,9%), eugénol (1,8%), isoeugénol (1,8%), fenchone (1,8%). Ces différences sont dues à plusieurs facteurs : facteurs climatiques et environnementaux, à l'organe de la plante, la situation géographique, l'âge, la période de la cueillette.



Le montage utilisé n'est pas adéquat pour cette expérience (Clevenger) [6].

### III.3 Extraction des alcaloïdes avec les trois méthodes :

#### III.3.1 Alcaloïdes fixes :

##### III.3.1.1 Aspect des extraits brutes :

**Tableau III.4 :** Aspect des extraits brutes d'alcaloïdes

<i>Retama raetam</i>		
Méthode	Stas-otto	Par alcool acide
Résidu		

<i>Calycotome Spinosa</i>		
Méthode	Stas-otto	Par alcool acide
Résidu		

### III.3.1.2 Rendement d'extraction des alcaloïdes :

**Tableau III.5 :** Rendement extraction des alcaloïdes

<i>Retama raetam</i>		
Méthode	Stas-otto	Par alcool acide
Rendement	0.0725%	1.3705%
<i>Calycotome Spinosa</i>		
Méthode	Stas-otto	Par alcool acide
Rendement	0.1295%	1.5725%

Les tests préliminaires réalisés au préalable ont permis de mettre en évidence la présence des alcaloïdes dans toutes les différentes parties de deux plantes étudiées et fortement positive




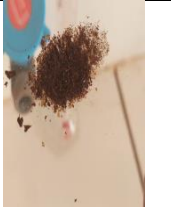


L'extraction des alcaloïdes totaux de *Retama Raetam* et *Calycotome Spinosa* nous a permis d'obtenir un extrait de couleur vert et vert foncé, pour l'extraction d'alcool acide la présence des alcaloïdes est forte 1.3705% et 1.5725% respectivement par rapport à l'extraction en milieu alcalin moyennement forte 0.0725% et 0.1295% considérant que les étapes dans la première méthode sont des étapes de purification. Les principaux types d'alcaloïdes dans la plante *raetam* sont : Sparteine, Ammodendrine, N-Méthylcytisine, Dehydroretamine, 5,6-Dehydrolupanine,  $\alpha$ -Isolupanine, Anagyrine.

### III.4 Extraction des polyphénols :

Les parties aériennes de la plante *Calycotome Spinosa* et *Retama Raetam* ont été soumises à une macération, extraction par Soxhlet et MAE, après évaporation de l'alcool, on obtient nos extraits.

#### III.4.1 Aspect des extraits brutes :

**Tableau III.6 :** Aspect des extraits éthanologiques

<i>Retama raetam</i>			<i>Calycotome Spinosa</i>		
Macération	Soxhlet	E A M	Macération	Soxhlet	E A M
					
Extrait éthanologique	Extrait éthanologique	Extrait éthanologique	Extrait éthanologique	Extrait éthanologique	Extrait éthanologique

### III.4.2 Rendement d'extraction des composés phénoliques :

#### Calcul du rendement :

Le pourcentage en composés phénoliques est calculé par la formule :

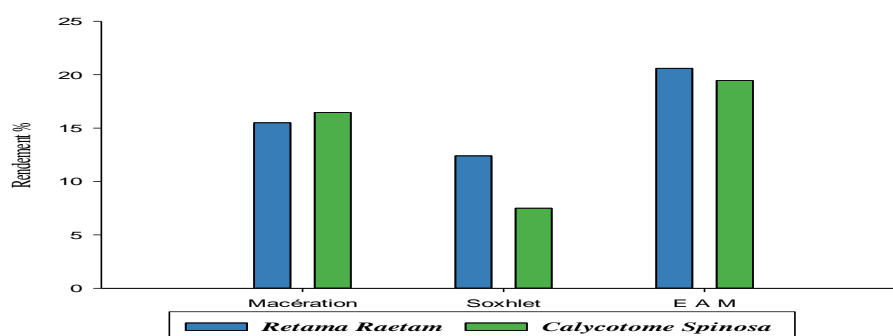
$$R(\%) = (M/M_0) \times 100 \quad M : \text{Masse en grammes de l'extrait sec résultant}$$

$$R : \text{Rendement en (\%)} \quad M_0 : \text{Masse en grammes du matériel végétal de départ}$$

Rendements des extractions obtenus après concentration des extraits hydro alcooliques du matériel végétal étudié sont regroupés dans le tableau suivant :

**Tableau III.7 :** Rendement d'extraction des composés phénoliques par différentes méthodes

Méthode	<i>Retama raetam</i>		<i>Calycotome spinosa</i>
	Extrait	R %	R %
<b>Macération</b>	Ethanolique	15.50%	16.47%
<b>Soxhlet</b>	Ethanolique	12.40%	7.50%
<b>E A M</b>	Ethanolique	20.60%	19.45%



**Figure III.1 :** Rendement d'extraction des composés phénoliques par différentes méthodes

D'après ces résultats, nous pouvons déduire que :

- Le rendement le plus élevé dans nos extraits éthanolique a été obtenu par la méthode d'extraction avec EAM dans les deux plantes *Retama Raetam* et *Calycotome Spinosa* avec rendement de 20.60% et 19.45% respectivement suivie par la méthode d'extraction par la méthode de macération 15.50% ,16.47% enfin par soxhlet avec des valeurs de 12.40% et 7.50%,

Le rendement d'extraction est le rapport de la quantité de substances naturelles extraites par l'action extractive d'un solvant à la quantité de ces substances contenues dans la matière végétale. Il est dépend de plusieurs paramètres tels que: le solvant, le pH, la température, le temps d'extraction et la composition de l'échantillon [7].

D'après [7], l'utilisation combinée de l'eau et du solvant organique peut faciliter l'extraction des substances chimiques qui sont solubles dans l'eau et / ou dans le solvant organique

### III.5 Extractions spécifique aux flavonoïdes :

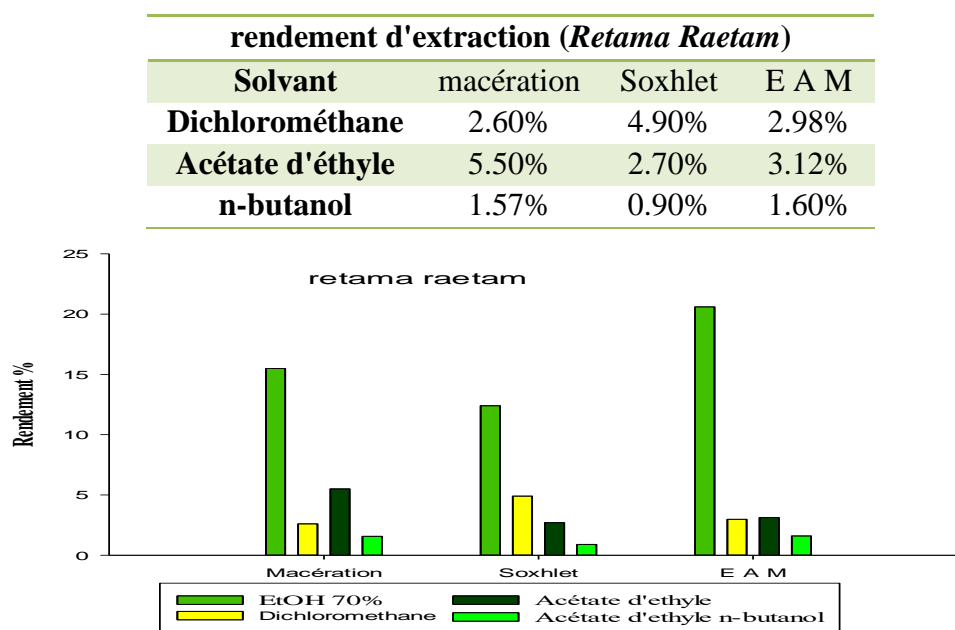
Les parties aériennes de la plante *Retama Raetam* et *Calycotome Spinosa* ont été soumises à une macération, extraction par Soxhlet et MAE, après évaporation de l'alcool, une extraction liquide-liquide est faite pour la phase aqueuse avec trois solvants l'acétate d'éthyle et le butanol et dichlorométhane puis après l'évaporation à sec.

#### III.5.1 Rendement d'extraction des flavonoïdes par affrontement de solvants :

L'extraction des différents flavonoïdes a été procédée comme suit :

- Extraction des aglycones ou les génines libres (phase chloroforme).
- Extraction des mono-glycosides et partiellement le di-glycosides (phase acétate d'éthyle).
- Extraction du reste de diglycoside et triglycosides (phase n-butanol).

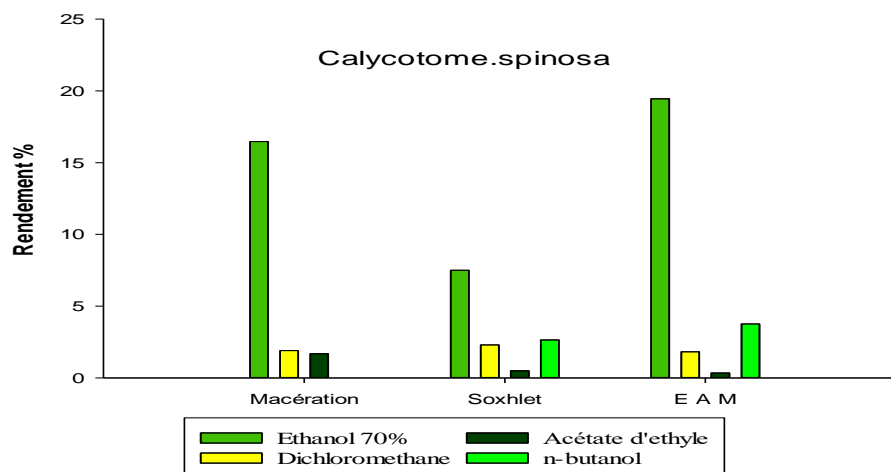
**Tableau III.8 :** Rendement d'extraction spécifique aux flavonoïdes par différents solvants de *Retama Raetam*



**Figure III.2 :** Rendement d'extraction Spécifique au flavonoïdes par différente méthode de la plante *Retama Raetam*

**Tableau III.9 :** Rendement d'extraction spécifique aux flavonoïdes par différents solvants de *Calycotome Spinosa*

rendement d'extraction ( <i>Calycotome Spinosa</i> )			
Solvant	macération	Soxhlet	E A M
Dichlorométhane	1.90%	2.30%	1.82%
Acétate d'éthyle	1.68%	0.50%	0.34%
n-butanol	0.01%	2.64%	3.76%



**Figure III.3 :** rendement d'extraction spécifique aux flavonoïdes par différents solvants

Au vu des résultats des tableaux III.8 et III.9 les plantes sont riches en différents types de flavonoïdes. Ces composés se sont confirmés par l'apparition des colorations, sur les deux plantes le rendement

- Dans la phase dichlorométhane de la méthode de Soxhlet est plus élevée (presque le double) 4.90% et 2.30% que ceux dans les deux autres méthodes MEA avec les valeurs suivantes : 2.98% et 1.82% et la méthode de macération (2.60%, 1.90%)

- Dans la phase acétate d'éthyle les rendements de la méthode Soxhlet et EAM sont proches pour Ratama (2.70% et 3.12%) et (0.50%, 0.34%) pour Calycotome Spinosa et pour la méthode de macération le rendement est élevé par rapport aux méthodes précédentes 5.50%, 1.68%

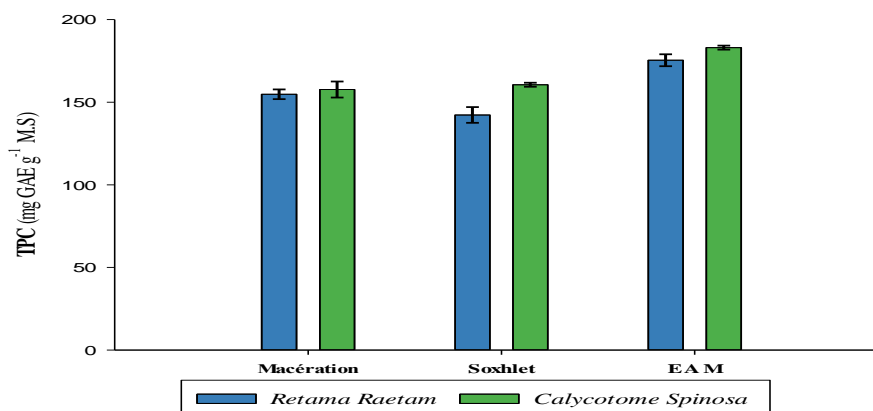
- Dans la phase n-butanol de la plante Retama raetam le rendement de l'extraction macération et EAM est presque le même (1.57%, 1.60%) et par l'extraction Soxhlet un peu faible avec un rendement de 0.90% et pour la plante Calycotome Spinosa le rendement dans la macération est très faible 0.01% et les autres méthodes presque proches (2.64%, 3.76%).

### III.6 Dosage de polyphénols :

L'analyse quantitative des polyphénols totaux de l'extrait aqueux de *Retama Raetam* et de *Calycotome Spinosa*, a été déterminée à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage, tracée en utilisant l'acide gallique comme standard. La quantité des polyphénols a été rapportée en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EAG}/\text{mg Ex}$ ).

Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage, ayant l'équation:

### Dosage de composés phénoliques de différentes méthodes :



**Figure III.5 :** Teneur de composés phénoliques par différentes méthodes

À partir de la courbe d'étalonnage Figure III.4, les résultats du dosage des polyphénols totaux des extraits sont illustrés dans le tableau III.10, Ces résultats indiquent clairement des différences au niveau des teneurs. Ils dévoilent également que la valeur la plus élevée est observée dans l'extrait de *Retama Raetam* obtenue avec éthanol comme solvant dans trois méthode la valeur de teneur des composés élevée dans la méthode EAM (175.71 ± 2.09 ± 1.29 mg E AG/g MS)e, tandis que la valeur faible est observée dans de la méthode desoxhlet 142.60 ± 2.76 et la valeur dans la méthode macération est de 155.13 ± 1.70

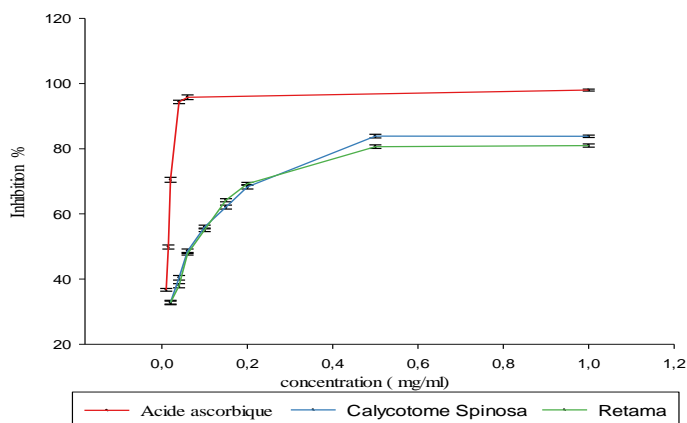
Pour *Calycotome Spinosa* la valeur élevée est aussi dans la méthode de EAM 182.60 ± 1.29 mg E AG/g MS et la faible valeur observée dans la méthode de macération 157.55 ± 2.87 et 162.03 ± 1.76 c est la valeur obtenu dans la méthode de Soxhlet.

### III.7 Activité anti oxydante :

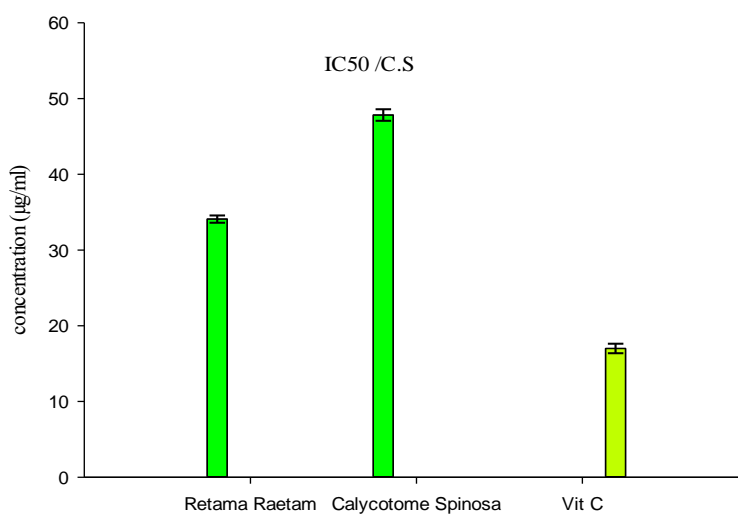
#### III.7.1 Activité de piégeage des radicaux libres DPPH :

Le radical (DPPH) est utilisé pour déterminer la capacité antioxydante. En présence d'un antioxydant, le (DPPH) est réduit en DPPH-H et son absorbance spectrophotométrique diminue.

L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical (DPPH)



**Figure III.6:** Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en extrait



**Figure III.7:** IC<sub>50</sub> de réduction du DPPH par les extraits

A partir de cette régression, nous avons déduit la valeur correspondante d'IC<sub>50</sub> (concentration inhibitrice de 50 %), qui correspond à la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH. L'acide ascorbique est utilisé à titre de comparaison

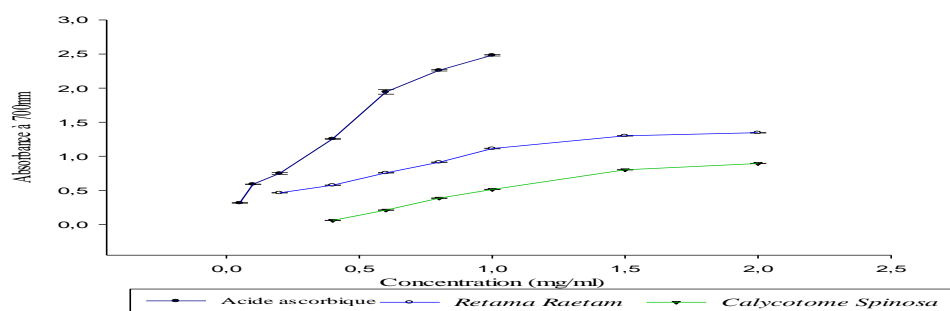
D'après la figure III.6, les extraits présente une activité antioxydante inférieure à celle de l'acide ascorbique

Alors La détermination de l'IC<sub>50</sub> a été faite à partir de la courbe des tendances ,

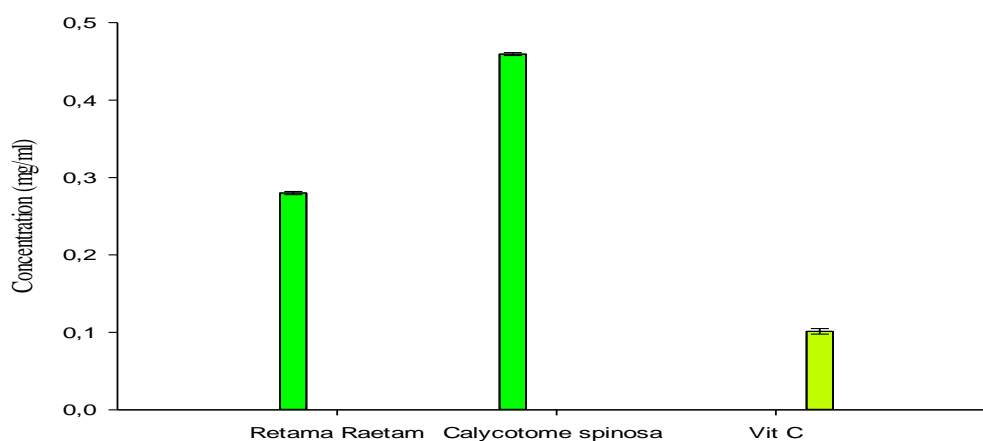
### III.7.1 Test de la réduction du fer FRAP :

Les résultats de l'activité réductrice des extraits méthanoliques des plantes étudiées sont représentés dans figure III.8. Nous constatons que la capacité réductrice est proportionnelle à l'augmentation de la concentration





**Figure III.8 :** Pouvoir réducteur en fonction de concentration des extraits de plantes



**Figure III.9 :** EC50 de réduction du fer par les extraits

La détermination de l'EC50 a été faite à partir de la courbe des tendances,

### III.8 Optimisation des conditions d'extraction par la méthodologie de surfaces des réponses

#### III.8.1 La plante *Retama Raetam* :

##### III.8.1.1 Tests préliminaires :

Les études préliminaires permettent la détermination des niveaux inférieurs et supérieurs des variables du plan expérimentale utilisé à fin de sélectionner un intervalle approprié pour l'extraction des CPT pour chaque variable indépendante. Les résultats des analyses

Le choix du solvant d'extraction est primordial, il joue un rôle déterminant sur la quantité ainsi que sur le type de composés phénoliques à extraire.

Selon les résultats obtenus dans le tableau III.13 l'acétone est le solvant qui a donné la meilleur teneur en polyphénols totaux et qui est de  $164,75 \pm 1,9$  mg EAG/g du à sa meilleur sélectivité et sa faible viscosité [8]. Cependant, vue la toxicité de l'acétone, l'éthanol a été sélectionné comme solvant d'extraction pour les essais de l'étude préliminaire et pour les

essais de MSR, d'autres études ont montré que l'éthanol est le solvant adéquat pour l'extraction des composés phénoliques [9].

#### **Effet de la concentration de l'éthanol :**

La teneur maximale en CPT ( $169,75 \pm 1,29$  mg EAG/g) a été obtenue avec de l'éthanol à 70% qui est fixé pour les expériences de l'étude préliminaire toute fois à partir des résultats de l'étude statistique (Tableau III.14), la gamme de concentration de 50-70% a été choisie pour les essais de MSR.

#### **Temps d'extraction :**

Le temps de 5 min a été sélectionné pour les essais préliminaires, tandis que la gamme 4-6min a été choisie pour les essais de MSR.

#### **Puissance :**

La puissance des micro-ondes a été fixée à 500W pour les essais préliminaires, tandis que la gamme 400-600 W a été choisie pour les essais de MSR.

#### **Ratio solide/liquide :**

La teneur en CPT augmente avec l'augmentation du volume du solvant en raison d'un plus grand gradient de concentration ce qui augmente le transfert de masse. En outre, le volume du solvant doit être suffisant pour assurer une immersion totale de l'échantillon [10].

A partir des résultats obtenus (Tableau III.14), la gamme 15 à 25 ml a été choisie pour l'optimisation MSR

#### **III.8.1.2la méthodologie de surfaces des réponses :**

La méthode de surface de réponse nécessite trois étapes :

- La construction du plan expérimental.
- La modélisation de réponse.
- Les représentations graphiques.

#### **III.8.1.2.1Construction du plan expérimental :**

L'optimisation de la méthode d'extraction est réalisée en employant le plan de Box-Behnken de trois niveaux, pour évaluer l'effet combiné de quatre variables indépendantes : %solvant, le temps, la puissance (MAE), et le ratio liquide/solide

- La concentration du solvant (50, 60 et 70%).
- Le temps d'extraction (4,5 et 6min).
- la puissance d'extraction (400, 500 et 600W).
- ratio liquide/solide d'extraction (15, 20 et 25).

**Tableau III.14 :** Les valeurs codées et les valeurs réelles correspondantes des paramètres d'optimisation utilisé dans l'analyse de la surface de réponse

Niveau	(-1)	(0)	(+1)
Ethanol concentration( % )	50	60	70
temps (min)	4	5	6
puissance (W)	400	500	600
ratio solide/liquide	15	20	25

### III.8.1.2.2 Construction du plan d'expérience Plan d'expérience Box- Behenken

Les rendements d'extraction obtenue dans les différentes conditions expérimentales, à partir des 27 essais sont illustrés dans le tableau

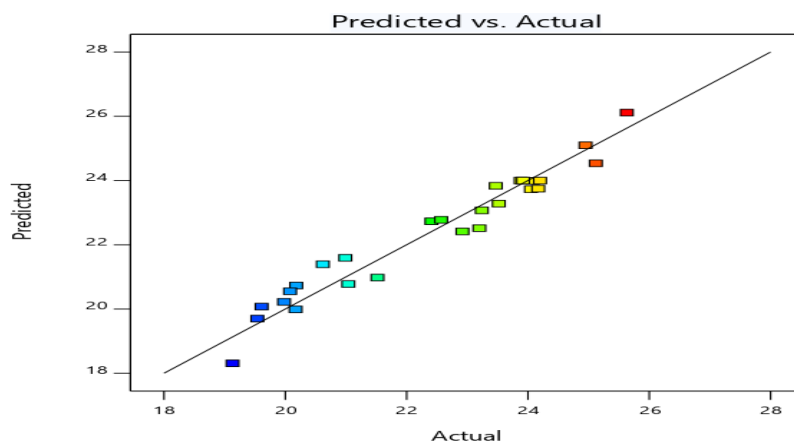
**Tableau III.15 :** Plan d'expérience Box- Behenken pour l'optimisation des conditions d'extraction de la plante *Retama Raetam*

Essai	EtOH %	Temps	Puissance	S/L
1	50	5	500	25
2	60	4	500	25
3	60	6	500	25
4	70	6	500	20
5	70	5	400	20
6	70	5	600	20
7	50	5	500	15
8	50	4	500	20
9	60	6	500	15
10	60	5	400	25
11	50	6	500	20
12	60	4	500	15
13	60	5	600	25
14	50	5	600	20
15	60	5	600	15
16	60	4	400	20
17	70	5	500	15
18	70	4	500	20
19	60	4	600	20
20	60	5	400	15
21	60	6	400	20
22	60	5	500	20
23	70	5	500	25
24	50	5	400	20
25	60	6	600	20
26	60	5	500	20
27	60	5	500	20

Les résultats démontrent que les rendements d'extraction varient de 19,13 à 25,63 mg, Ceci confirme l'influence des paramètres étudiés (concentration du solvant, temps, puissance et ratio) sur le rendement d'extraction .

### III.8.1.2.3 Analyse des résultats :

#### III.8.1.2.3.1 Analyse de la variance (ANOVA) :



**Figure III.10 :** Graphiques des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le rendement d'extraction

#### III.8.1.2.3.2 Coefficient de détermination $R^2$

Selon la référence [11] le  $R^2$  est un paramètre qui nous indique la validité du modèle étudié la valeur de  $R^2$  de ce modèle est égale à 0,95 ce qui signifie qu'uniquement 5% des variations ne sont pas expliquées par le modèle.

L'analyse de la variance de la régression montre que le modèle est très significatif dont la *P-value* est d'environ 0.0001, inférieur à  $<0.05$ , ce qui confirme que le modèle est satisfaisant [12]. Et aussi pour la valeur de lack of fit égale à 0.0606 supérieure à 0,05 non significatif ce qui confirme le modèle est satisfaisant

**Tableau III.16 :** Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur le rendement d'extraction

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-value	p-value	
<b>Model</b>	95.47	14	6.82	16.72	< 0.0001	significant
<b>Linéarité</b>						
<b>A-EtOH</b>	5.01	1	5.01	12.27	0.0044	
<b>B-Temps</b>	8.74	1	8.74	21.42	0.0006	
<b>C-Puissance</b>	1.62	1	1.62	3.97	0.0695	
<b>D-Liquide/solide</b>	11.92	1	11.92	29.23	0.0002	
<b>AB</b>	1.09	1	1.09	2.68	0.1277	
<b>AC</b>	12.85	1	12.85	31.51	0.0001	
<b>AD</b>	17.94	1	17.94	43.97	< 0.0001	
<b>BC</b>	3.86	1	3.86	9.47	0.0096	

<b>BD</b>	19.54	1	19.54	47.90	< 0.0001	
<b>CD</b>	2.09	1	2.09	5.12	0.0430	
<b>A<sup>2</sup></b>	6.91	1	6.91	16.94	0.0014	
<b>B<sup>2</sup></b>	7.08	1	7.08	17.36	0.0013	
<b>C<sup>2</sup></b>	1.72	1	1.72	4.22	0.0623	
<b>D<sup>2</sup></b>	3.35	1	3.35	8.20	0.0142	
<b>Residual</b>	4.89	12	0.4079			
<b>Lack of Fit</b>	4.83	10	0.4834	15.90	0.0606	not significant
<b>Pure Error</b>	0.0608	2	0.0304			
<b>Cor Total</b>	100.36	26				
<b>R<sup>2</sup></b>	0,951233					
<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>	0,894337					
<b>Predicted R<sup>2</sup></b>	0,721226					

### III.8.1.2.3.2 Effets des facteurs :

L'analyse de la variance de la régression des coefficients consiste à analyser l'impact des variables (X1, X2, X3 et X4) à  $p < 0.05$ , afin de déterminer le degré d'influence des facteurs (concentration du solvant, temps, puissance, ratio liquide/solide).

#### Effet linéaire :

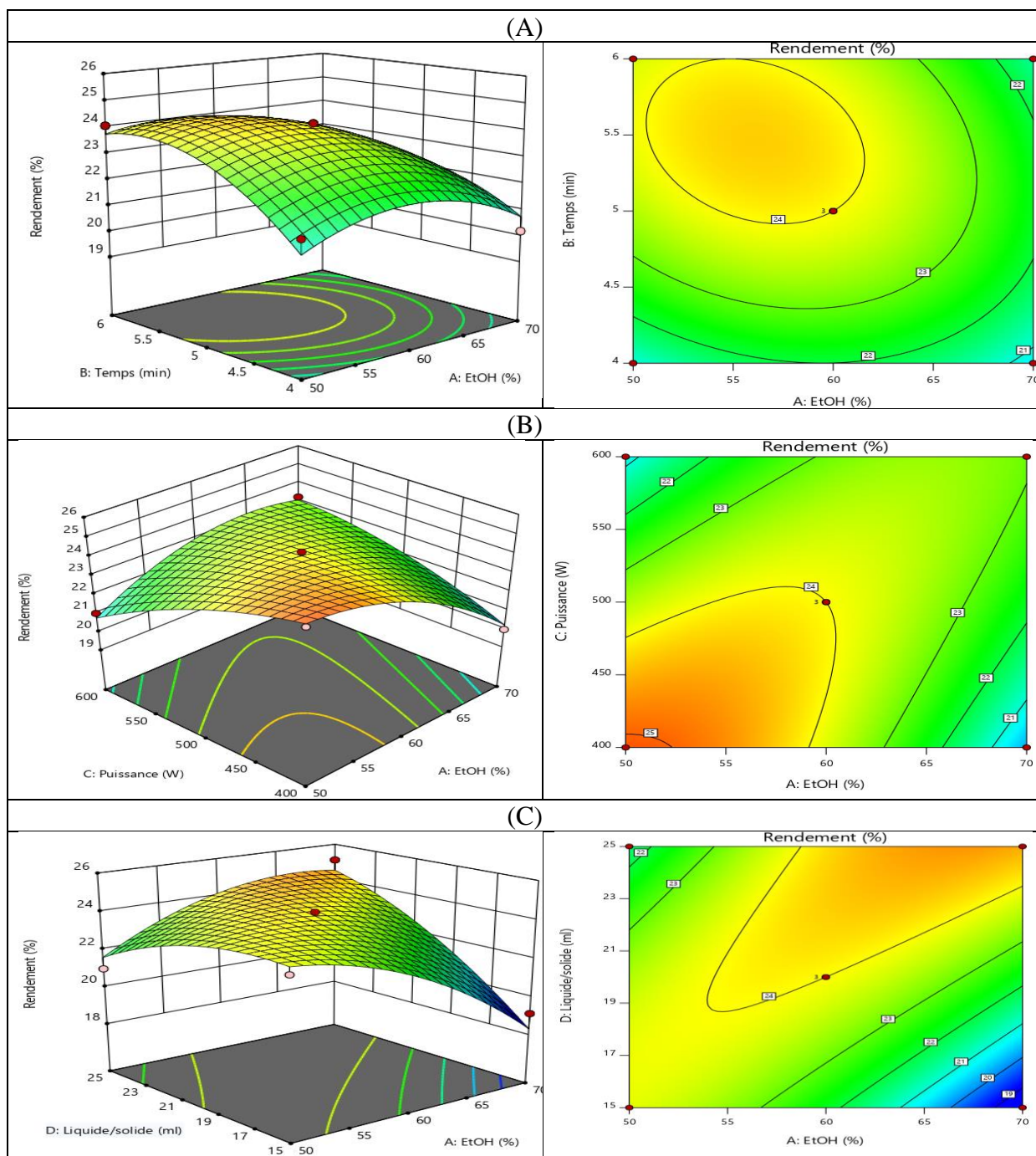
Les trois facteurs ; concentration du solvant et temps et ration Liquide/solide des micro - ondes influencent de manière significative avec des valeurs de ( $P=0.0044$  et  $0.0006$  et  $0,0002$ ) Respectivement. Par contre l'influence de la puissance est non significative.

#### Effet d'interaction :

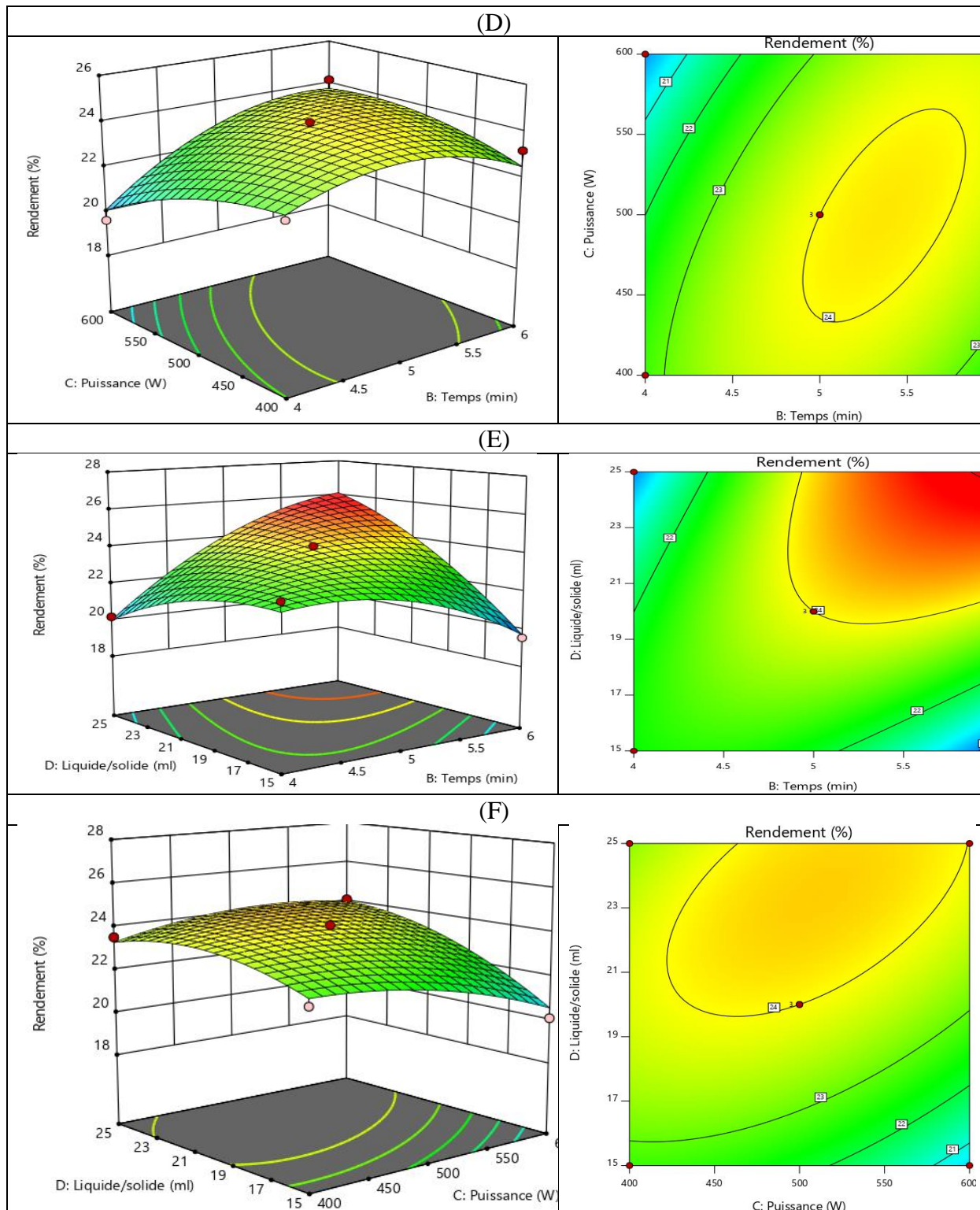
Les trois interactions (AC) et (AD) et (BD) sont hautement significatives ( $p < 0.0001$ ) les interactions (BC) et (CD) sont significative à des valeurs de P ( $0.0096$ ) et ( $0.0430$ ) respectivement. L'interaction (AB) est non significative p ( $0,1255$ ).

#### Effet quadratique :

Les effets quadratiques influencent d'une manière significative sur l'extraction avec des valeurs de ( $P < 0.00014$ ) pour (A\*A) et (B\*B) de ( $P= 0.0013$  et  $P=0.0142$ ) pour (D\*D). Et Il y'a un seul effet quadratique (C\*C ) qui n'est pas significatif avec ( $p= 0,062$ ) .



**Figure III.11 :** Représentation spatiale des modèles de surfaces de réponses 3D et 2D des interactions (A): Temps/EtOH%, (B): Puissance/EtOH%, (C):Ratio (L/S)/EtOH%



**Figure III.12:** Représentation spatiale des modèles de surfaces de réponses 3D et 2D des interactions (D): Puissance/Temps, (E): Ratio (L/S)/Temps, (F): Ratio (L/S)/Puissance

**III.8.1.2.4 Modèle mathématique :**

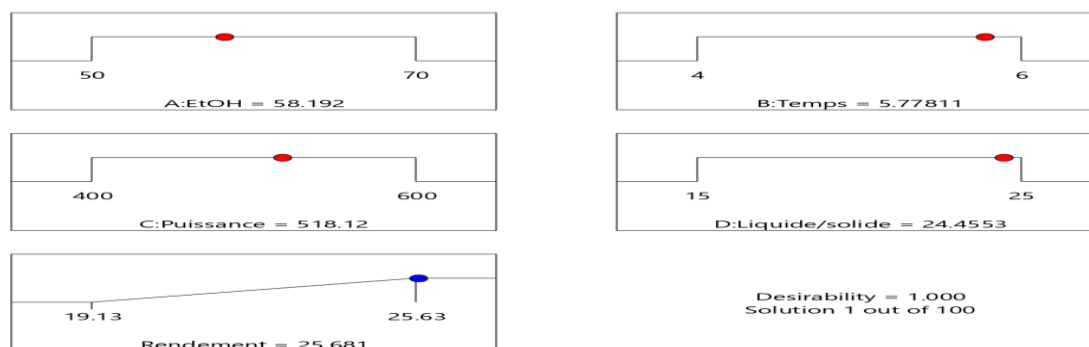
La modélisation mathématique du rendement d'extraction en fonction des différents paramètres est représentée par l'équation suivante qui montre la relation entre la concentration

de solvant, le temps, la puissance et le ratio liquide/solide et le rendement d'extraction (la réponse )

$$\begin{aligned} \text{Rendement} = & 96,92 - 0,18\text{EtOH} + 1,75 \text{ Temps} - 0,132 \text{ Puissance} - 4,006 (\text{Liquide/solide}) - \\ & 0,05(\text{EtOH} * \text{Temps}) + 0,001(\text{EtOH} * \text{Puissance}) + 0,042(\text{EtOH} * \text{Liquide/solide}) + \\ & 0,009(\text{Temps} * \text{Puissance}) + 0,442(\text{Temps} * \text{Liquide/solide}) + 0,001 (\text{Puissance} * \\ & \text{Liquide/solide}) \end{aligned}$$

### III.8.1.2.5 Condition optimales :

Cette étude montre qu'un modèle polynomial d'ordre deux complets peut modéliser correctement le phénomène étudié. Il apparaît que les conditions expérimentales optimales, Obtenues au niveau du domaine expérimental dans la figure III.13



la méthodologie de surface de réponse a montré que les valeurs optimales de rendement d'extraction est de 25,681 % avec une concentration de l'éthanol est de 58,192 à un temps de 5,77811 min et à une puissance de 518,12 W et ration liquide/solide de 24,4553 .

### Optimisation des conditions d'extraction par la méthodologie de surfaces des réponses :

#### III.8.2 La plante *Calycotome Spinosa* :

##### III.8.2.1 Tests préliminaires

Les études préliminaires permettent la détermination des niveaux inférieurs et supérieurs des variables du plan expérimentale utilisé à fin de sélectionner un intervalle approprié pour l'extraction des CPT pour chaque variable indépendante. Les résultats des analyses préliminaires de MAE sont représentés dans le tableau III.17



**La nature de solvant :**

Selon les résultats obtenus (tableau III.17 ) l'éthanol est le solvant qui a donné la meilleure teneur en polyphénols totaux et qui est de  $169 \pm 1,06$  mg

**Effet de la concentration de l'éthanol :**

La teneur maximale en CPT ( $180.5 \pm 1.06$  mg EAG/g) a été obtenue avec de l'éthanol à 60% qui est fixé pour les expériences de l'étude préliminaire toute fois à partir des résultats de l'étude statistique (Tableau), la gamme de concentration de 50-70% a été choisie pour les essais de MSR.

**Temps d'extraction :**

Le temps de 4 min a été sélectionné pour les essais préliminaires, tandis que la gamme 3-5 min a été choisie pour les essais de MSR.

**Puissance :**

La puissance des micro-ondes a été fixée à 400W pour les essais préliminaires, tandis que la gamme 300-500 W a été choisie pour les essais de MSR

**Ratio solide/liquide :**

la gamme 20 à 30 ml a été choisie pour l'optimisation MSR

**III.8.2.2 la méthodologie de surfaces des réponses :**

La méthode de surface de réponse nécessite trois étapes :

- La construction du plan expérimental ;
- La modélisation de réponse ;
- Les représentations graphiques

**III.8.2.2.1 Construction du plan expérimental :**

L'optimisation de la méthode d'extraction est réalisée en employant le plan de Box-Behnken de trois niveaux, pour évaluer l'effet combiné de quatre variables indépendantes :

%solvant, le temps, la puissance (MAE), et le ratio solide -liquide

- La concentration du solvant (60, 70 et 80%).
- Le temps d'extraction (3,4 et 5min).
- la puissance d'extraction (300, 400 et 500W).
- ratio liquide/solide d'extraction (20, 25 et 30).

**Tableau III.18 :** Les valeurs codées et les valeurs réelles correspondantes des paramètres d'optimisation utilisés dans l'analyse de la surface de réponse

Niveau	(-1)	(0)	(+1)
Ethanol concentration( % )	60	70	80
temps (min)	3	4	5
puissance (W)	300	400	500
ratio solide/liquide	20	25	30

### III.8.2.2.2 Construction du plan d'expérience Plan d'expérience Box- Behenken :

Les rendements d'extractions obtenues dans les différentes conditions expérimentales, à partir des 27 essais sont illustrés dans le tableau

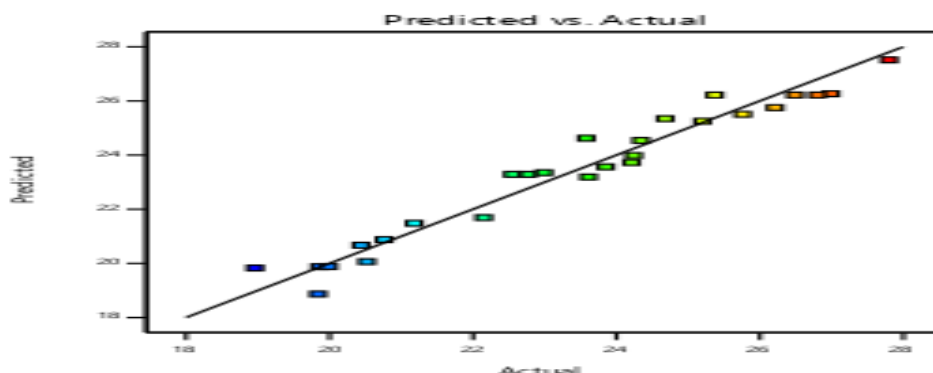
**Tableau III.19** :Matrice du modèle de BBD et les valeurs expérimentales et prédites du plan d'expériences

Essai	EtOH%	Temps	Puissance	S/L
1	70	6	400	20
2	70	6	400	30
3	80	5	400	20
4	60	4	400	25
5	70	5	500	20
6	70	5	400	25
7	70	4	400	20
8	70	5	400	25
9	80	4	400	25
10	60	5	400	30
11	60	5	400	20
12	80	6	400	25
13	70	4	300	25
14	70	5	500	30
15	80	5	300	25
16	70	6	300	25
17	60	5	300	25
18	70	5	300	20
19	60	6	400	25
20	80	5	500	25
21	60	5	500	25
22	70	6	500	25
23	70	5	300	30
24	70	4	500	25
25	80	5	400	30
26	70	5	400	25
27	70	4	400	30

Les résultats démontrent que les rendements d'extraction varient de 18.96 à 27.8 mg, Ceci confirme l'influence des paramètres étudiés (concentration du solvant, temps, puissance et ratio) sur le rendement d'extraction

### III.8.2.2.3 Analyse des résultats :

#### III.8.2.2.3.1 Analyse de la variance (ANOVA) :



**Figure III.14 :**Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le rendement d'extraction

#### III.8.2.2.3.2 Coefficient de détermination $R^2$ :

Selon [11] le  $R^2$  est un paramètre qui nous indique la validité du modèle étudié

la valeur de  $R^2$  de ce modèle est égale à 0,955 ce qui signifie qu'uniquement 5% des variations ne sont pas expliquées par le modèle.

L'analyse de la variance de la régression montre que le modèle est très significatif dont la *P-value* est d'environ 0,0001, inférieur à  $<0,05$ , ce qui confirme que le modèle est satisfait [12]. Et aussi pour la valeur de lack of fit égale à 0,5652 hautement supérieure à 0,05 non significatif ce qui confirme le modèle est satisfaisante.

#### Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur le rendement d'extraction :

**Tableau III.20 :**Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur le rendement d'extraction

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-value	p-value	
<b>Model</b>	159.06	14	11.36	18.48	< 0.0001	Significant
<b>A-EtOH</b>	1.79	1	1.79	2.91	0.1140	
<b>B-Temps</b>	2.27	1	2.27	3.69	0.0787	
<b>C-Puissance</b>	20.78	1	20.78	33.80	< 0.0001	
<b>D-Solide/Liquide</b>	3.18	1	3.18	5.18	0.0420	
<b>AB</b>	4.86	1	4.86	7.91	0.0157	
<b>AC</b>	0.6806	1	0.6806	1.11	0.3134	
<b>AD</b>	16.69	1	16.69	27.14	0.0002	
<b>BC</b>	23.23	1	23.23	37.79	< 0.0001	
<b>BD</b>	1.27	1	1.27	2.06	0.1769	
<b>CD</b>	4.12	1	4.12	6.70	0.0237	
<b>A<sup>2</sup></b>	32.37	1	32.37	52.66	< 0.0001	
<b>B<sup>2</sup></b>	1.84	1	1.84	2.99	0.1092	

<b>C<sup>2</sup></b>	35.54	1	35.54	57.80	< 0.0001	
<b>D<sup>2</sup></b>	20.12	1	20.12	32.74	< 0.0001	
<b>Residual</b>	7.38	12	0.6147			
<b>Lack of Fit</b>	6.25	10	0.6245	1.10	0.5652	not significant
<b>Pure Error</b>	1.13	2	0.5659			
<b>Cor Total</b>	166.44	26				
<b>R<sup>2</sup></b>	0.9557					
<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>	0.9040					
<b>Predicted R<sup>2</sup></b>	0.7686					

### III.8.2.2.3.2 Effets des facteurs :

#### Effet linéaire :

Les deux facteurs ; puissance et ration Liquide/solide des micro-ondes influencent de manière significative avec des valeurs de (P=0.0001 et 0.00420) respectivement. Par contre l'influence de concentration du solvant et temps est non significative avec des valeurs (0,1140 et 0,0787)

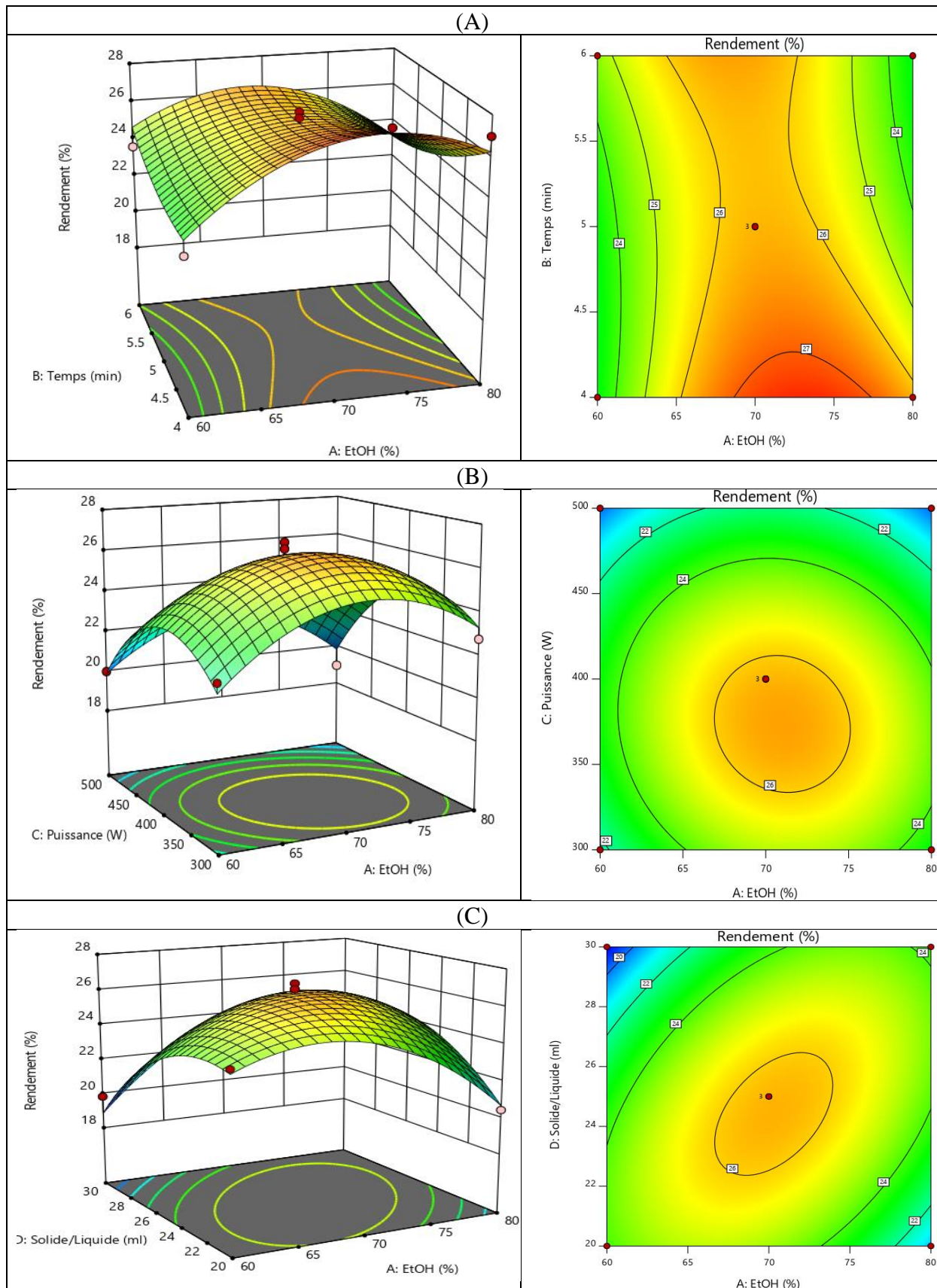
#### Effet d'interaction :

L'interaction (BC) est hautement significative (p<0.0001)

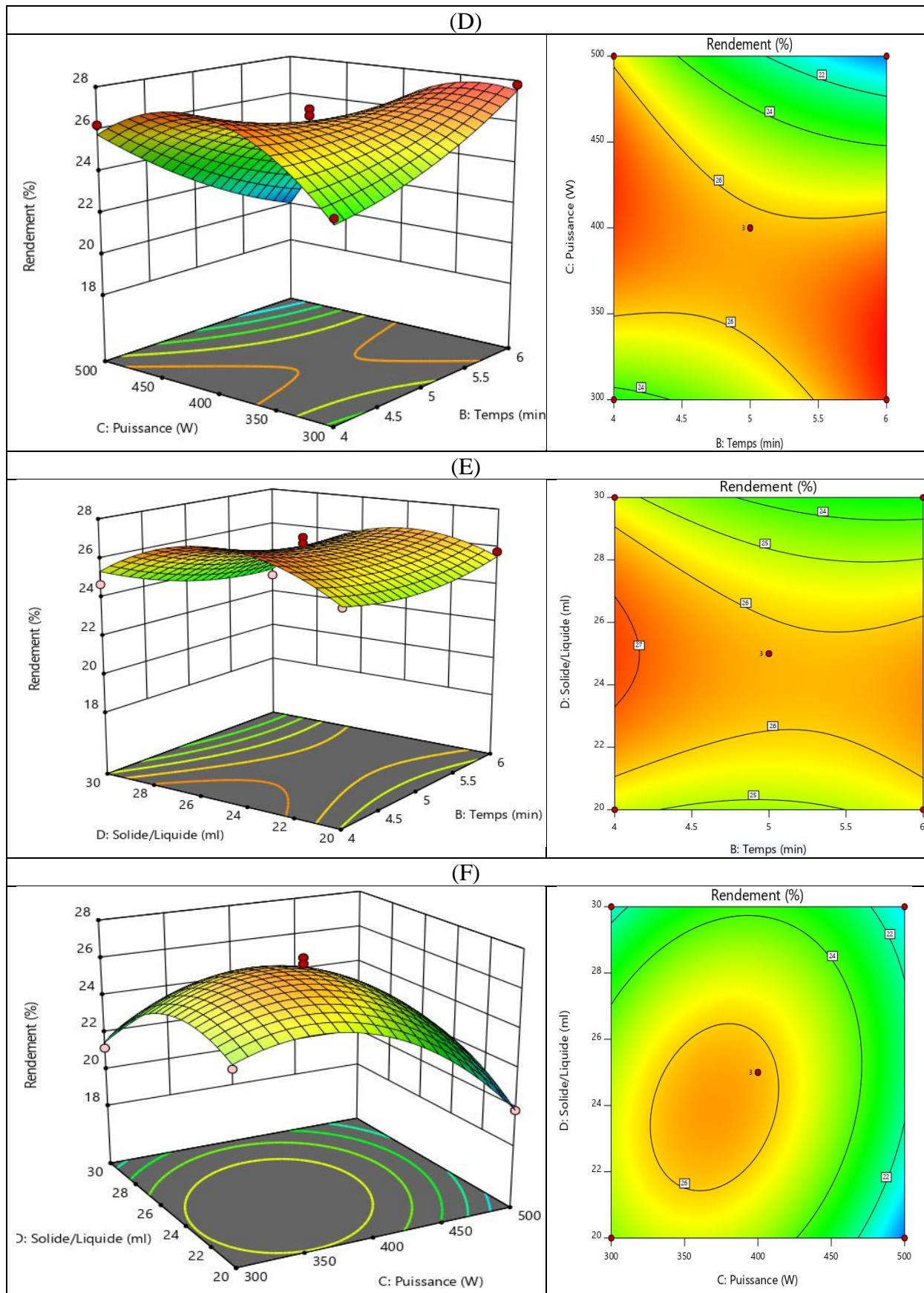
les interactions (AD),(AB)et (CD) sont significatives à des valeurs de P (0.0002) et (0.0157),(0,0237) respectivement. Les interaction (AC) et (BD)sont non significative avec des valeurs p(0,3134) et (0,1769).

#### Effet quadratique :

les effets quadratiques influencent d'une manière significative sur l'extraction avec des valeurs de (P<0.0001) pour (A\*A) et (C\*C) et (D\*D), et Il y'a un seul effet quadratique(B\*B) qui n'est pas significatif avec (p= 0,1092).



**Figure III.15 :** Représentation spatiale des modèles de surfaces de réponses 3D et 2D des interactions (A): Temps/EtOH%, (B): Puissance/EtOH%, (C):Ratio (L/S)/EtOH%



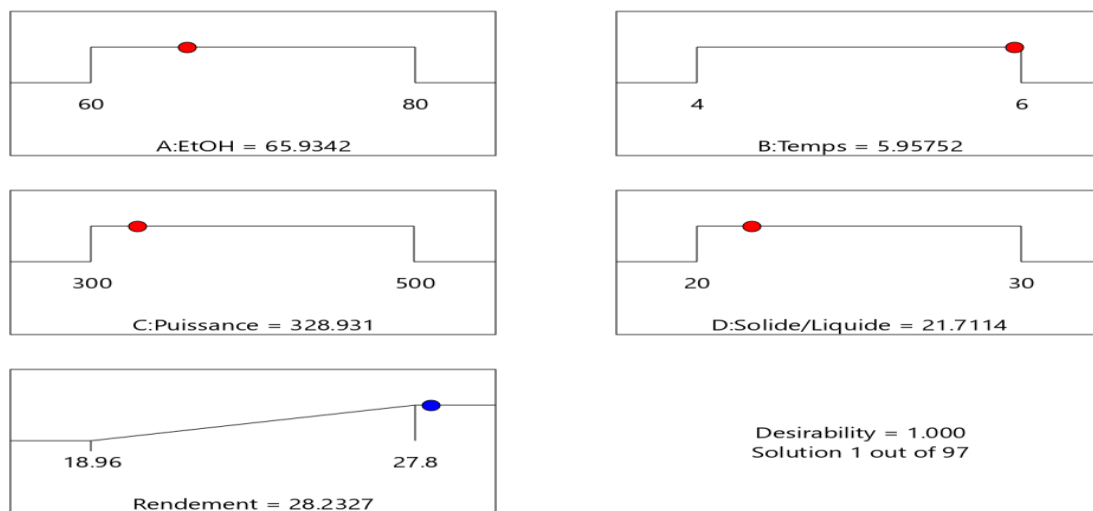
**Figure III.16 :** Représentation spatiale des modèles de surfaces de réponses 3D et 2D des interactions (D): Puissance/Temps, (E): Ratio (L/S)/Temps, (F):Ratio (L/S)/Puissance

### III.8.2.2.4 Modèle mathématique :

$$\text{Rendement} = -182.97 + 3.18\text{EtOH} + 13.85\text{Temps} + 0.29\text{Puissance} + 0.67(\text{Solide/Liquide}) - 0.11(\text{EtOH} * \text{Temps}) - 0.0004(\text{EtOH} * \text{Puissance}) + 0.04(\text{EtOH} * (\text{Solide/Liquide})) - 0.024(\text{Temps} * \text{Puissance}) - 0.11(\text{Temps} * (\text{Solide/Liquide})) + 0.002(\text{Puissance} * (\text{Solide/Liquide}))$$

### III.8.2.2.5 Conditions optimales :

La méthodologie de surface de réponse a montré que les valeurs optimales de rendement d'extraction est de 28,2327 % avec une concentration de l'éthanol est de 65,9342 à un temps de 5,95752 min et à une puissance de 328,9312W et ration liquide/solide de 21,7114 (figure III.17).



**Figure III.17 :** Les conditions expérimentales optimales Calycotome Spinosa

**Références bibliographiques**

- [1].Hadj Moussa A. Contribution à l'étude in vitro de l'effet des extraits de feuilles de *Retama raetam* sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase. Mémoire pour diplôme d'étude supérieur en biologie, option : biochimie, Université Abou BekrBelkaid, Tlemcen, 2012.
- [2].R Cherfia1., M Kara Ali., I Talhi., A Benaissa2., N Chaouche. , (2017). Phytochemical analysis, antioxidant and antimicrobial activities of leaves and flowers ethyl acetate and n-butanol fractions from an Algerian endemic plant *Calycotome spinosa* (L.) Link,196p.
- [3].BEN ZROUGA D.,BOUCHUICHA S.(2015). Extraction d'huile essentielle et l'étude phytochimique de la plante *retamaraetam*. Mémoire de licence en chimie : chimie organique, Université Dr Moulay Tahar de Saida
- [4].JEB El khirilham,TEDRANETSanaa;memoire master contribution à l'etude de l'efficacite biologique et chimique des composees phenolyques de la plante *retamaraetam* ;universitelarbi ben m'hidoum el bouagui 2017-2018
- [5].Loy G., Cottiglia F., Garau D., Deidda D., Pompei R., Bonsignore L., Chemical composition and cytotoxic and antimicrobial activity of *Calycotome villosa* (Poiret) Link leaves, *Il Farmaco*, Vol. 56, Issues: 5–7, July 2001, pp. 433–436.
- [6].HayetEdziri ,MahaMastouri , ImedChéraif&MahjoubAouni (2010) Chemical composition and antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the flower oil of *Retama raetam* (Forssk.) Webb from Tunisia, *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*,24:9, 789-796,
- [7].Quy-Diem D, Artik E, Phuong L, Lien H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*. *J. food and drug analysis* 22(3): 296-302.
- [8].Farhoosh, R., Khodaparast, M. H. H., et Sharif, A. (2009). Bene hull oil as a highly stable. *J. Food Eng.* 1259–1265.
- [9].Spigno G., et De Faveri D.M. (2009). Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. *Journal of Food Engineering*. 93, 210–217.
- [10].Eskilsson, S, C. and Björklund, E. (2000) Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902 (1), 227-250
- [11].Goupy.J.(2006). Les Plans d'expériences. Edition : Revue MODULAD
- [12].Chin Y.F., Jumat S. et Mamot S. (2010). Optimisation of Urea Complexation by Box - Behnken Design. *Sains Malaysiana*. 39: 795-803.



# Conclusion Générale

---

## Conclusion générale

L'objectif de notre travail était de contribuer à l'extraction de deux plantes légumineuses arbustives et *Retama Raetam* et *Calycotome Spinosa*, spontanées de la famille Fabaceae du Sahara algérien. Deux axes ont été visés pour mener ce travail :

Le premier axe consiste à extraire quelques métabolites secondaires majoritaires (les huiles essentielles, flavonoïdes, les composés phénoliques et les alcaloïdes).

Le deuxième axe consiste à l'optimisation des conditions d'extraction assistée par micro-ondes des composés phénoliques à savoir : concentration du solvant, temps, puissance, et ratio liquide/solide, en utilisant le plan d'expériences Box–Behnken.

La récolte des échantillons a été réalisée à partir de deux sites différents BOUSEMGHOUN et AL-KHAITER.

Les résultats obtenus sont comme suite :

A l'issue du screening phytochimique, nous avons détecté la présence métabolites secondaires : flavonoïdes, tanins, saponosides, alcaloïdes dans les différentes parties de deux plantes étudiées.

L'obtention l'huiles essentielles de la partie aérienne de deux plantes *Retama Raetam* et *Calycotome Spinosa* a été accomplie par hydro distillation à l'aide d'un dispositif classique mais le résultat est nul, aucune trace d'huile.

L'extraction des alcaloïdes totaux par deux méthodes en milieu basique et acide a permis d'obtenir des rendements qui sont différentes en fonction des solvants d'extraction et méthodes utilisés, rendement massique de 0.07% et 1.37% pour *Retama Raetam* et 0.12%, 1.57% pour *Calycotome Spinosa*

Pour les composés phénoliques nous avons fait une étude comparative de trois techniques d'extraction des composés phénoliques, et pour cela on a choisi deux techniques classique ( macération et soxhlet) et une technique verte ( extraction assistée par micro-ondes),

La comparaison porte sur le rendement d'extraction et la teneur de polyphénols totaux

L'extrait obtenu par EAM a donné le rendement et la teneur les plus élevées (20.6% ; 175.71 ±2.09) pour *Retama Raetam*, et(19.45% ; 182.60 ±1.29) pour *Calycotome Spinosa*

---

Pour les flavonoïdes nous avons fait une étude comparative de différents solvants (dichlorométhane, acétate d'éthyle et n-butanol) par les trois méthodes précédentes. La comparaison porte sur le rendement d'extraction

L'extraction par macération en présence du solvant l'acétate d'éthyle a donné le rendement le plus élevé ( 5.5%) pour *RetamaRaetam*, et l' extraction assistée par micro-ondes en présence du n-butanol comme solvant a donné le rendement le plus élevé( 3.76%) pour *CalycotomeSpinosa* .

De même les résultats de cette études ont révélés que les extraits des deux plantes ont une activité antioxydante , ceux obtenu par micro onde ont exercés une bonne activité antiradicalaire vis –a vis du radical DPPH et une bonne activité réductrice du FER FRAP . Les résultats d'optimisation en utilisant le plan d'expériences Box–Behnken montrent que les valeurs expérimentales obtenues sont très proches aux valeurs prédites, ce qui confirme la validité des modèles mathématiques pour les deux plates étudiées :

Le modèle mathématique de la méthodologie de surface de réponse a montré que les valeurs optimales de rendement d'extraction de la plante *retama raetam* est de 25,681 % avec une concentration de l'éthanol est de 58,192 à un temps de 5,77811 min et à une puissance de 518,12 W et ration liquide/solide de 24,4553 .

Et pour *calycotome spinosa* le rendement d'extraction est de 28,2327 % avec une concentration de l'éthanol est de 65,9342 à un temps de 5,95752 min et à une puissance de 328,9312W et ration liquide/solide de 21,7114.

Enfin, sur le plan de perspective, afin de d'approfondir ce travail, il serait souhaitable

- Déterminer la composition chimique des extraits étudiés
- Optimisation de conditions étudiées déjà pour d'autres réponses telles que TPC TF et l'activité anti oxydante
- Optimiser d'autres facteurs qui peuvent influencer l'extraction tel que PH, Température
- Elargir cette étude sur d'autres espèces de légumineuses de différentes régions d'Algérie

## Résumé :

Retama Reteam et Calycotome Spinosa sont deux plantes appartenant à la famille des Fabacées qui sont riches en composés de métabolites secondaires.

Ce travail consiste tout d'abord à extraire de ces deux plantes les composés alcaloïdes, flavonoïdes, tanins et phénoliques, en utilisant trois types d'extraction (soxhlet et macération et micro-ondes). Ce travail a été mené pour déterminer les conditions optimales d'extraction, en appliquant le plan expérimental de Box-Behenken. Les modèles mathématiques de la méthodologie de la surface de réponse ont montré que les valeurs optimales de rendement d'extraction de la plante retama raetam sont de 25.681% avec une concentration d'éthanol de 58.192 à un temps de 5.77811 min et à une puissance de 518,12 W et un rapport liquide / solide de 24.45553. et pour le calycotome spinosa, le rendement d'extraction est de 28,2327% avec une concentration d'éthanol de 65,9342 à un temps de 5,95752 min et à une puissance de 328,9312W et un rapport liquide/solide de 21,7114.

**Mots clés :** Box-Behenken. Fabaceae , Méthodes d'extraction , optimisation , les composés phénoliques, micro – ondes .

## Abstract :

Retama Reteam and Calycotome Spinosa are two plants belonging to the Fabaceae family which are rich in secondary metabolite compounds.

This work consists first of all in extracting from these two plants the alkaloid, flavonoid, tannin and phenolic compounds, using three types of extraction (soxhlet and maceration and microwave). Was conducted to determine the optimal extraction conditions, applying the Box-Behenken experimental plan. The mathematical models of the response surface methodology showed that the optimal values of extraction yield of the retama raetam plant is 25. 681% with an ethanol concentration is 58.192 at a time of 5.77811 min and at a power of 518.12 W and liquid / solid ration of 24.45553. and for calycotome spinosa the extraction yield is 28.2327% with an ethanol concentration is 65.9342 at a time of 5.95752 min and at a power of 328.9312W and liquid / solid ration of 21,7114.

**Key words :** Box-Behenken ,fabaceae , extraction methods , optimization , phenolic compounds, microwave.

## ملخص

retama و calycotome spinosa هما نباتان ينتميان إلى عائلة فابسي الغنية بالمركبات الايضية الثانوية يتكون هذا العمل في المقام الأول من استخراج المركبات القلوية والفينولية من النباتات الطبية ، وقد تعرضت هذه النباتات لثلاثة أنواع من الاستخراج (سوكسليت ونقع وميكروويف ودرسنا النمذجة والاستخراج الأمثل باستخدام طريقة الاستجابة السطحية ، وشروط استخلاص البوليفينول: تركيز المذيب ، والقدرة ، التجريبية Box-Behenken والوقت والنسبة (المذيب / المادة). تم تحسينها من خلال تطبيق خطة أوضحت النماذج الرياضية لمنهجية سطح الاستجابة أن القيم المثلى لعائد الاستخراج لمصنع ريتاما رايتام هي 25.681٪ بتركيز إيثانول يبلغ 58.192 في وقت 5.77811 دقيقة وعند قوة 518.12 واط وحصاة سائلة / صلبة 24.4553 وناتج استخلاص الكينكوتوم سبينوزا هو 28.2327٪ بتركيز إيثانول 65.9342 في وقت 5.95752 دقيقة وبقوة 328.9312 واط وحصاة سائلة / صلبة 21.7114

## الكلمات الرئيسية

Fabaceae ,Box behnken , طرق الاستخراج ، التحسين ، المركبات الفينولية الميكروويف