

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE MOULOD MAMMERI DE TIZI-OUZOU



**Faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques**

**Département de Biochimie-Microbiologie**

**Mémoire de fin d'études**

En vue de l'obtention d'un diplôme de Master en biologie  
Option : Biochimie Appliquée

**Etude de quelques caractéristiques biochimiques et  
pharmacologiques de poudre d'*Anacyclus clavatus***

**Présenté par :** Mr LARABI Toufik

Mr OUCHAFA Ahmed

**Soutenu le :** 29/06 /2016

**Devant le jury**

M<sup>me</sup> LARDJENE Nadia

M<sup>r</sup> ASLA Tarik

M<sup>me</sup> SENANI Nassima

M<sup>me</sup> BENAHMED DJILALI Adiba

**Présidente** Maître de Conférences (A) à l'UMMTO

**Examineur** Maître Assistant (A) à l'UMMTO

**Examinatrice** Maître Assistante (A) à l'UMMTO

**Promotrice** Maître de Conférences (A) à l'UMMTO

## **Remerciements**

*On remercie DIEU tout puissant, maître des cieux et de la terre, qui nous a permis de mener à bien ce travail.*

*Tout d'abord on tient surtout à adresser nos plus vifs remerciements à notre promotrice **Melle. BENAHMED DJILALI Adiba**, Maître de conférences qui nous a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, pour sa grande patience, pour sa disponibilité et ses conseils judicieux.*

*Ce travail à été réalisé aux laboratoires communs (I et II) d'analyses physico-chimiques, ainsi que le laboratoire pédagogique de microbiologie de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou (UMMTO), ainsi que les laboratoires de Chimie Pharmaceutique et de Rhéologie de l'Université de Boumerdes. et aussi au laboratoire de SAIDAL à Dar- El Beida.*

*On tient à remercier Mr DAHMANI .Y Directeur Général de Saidal et Mme SAADI .S responsable du laboratoire qui nous ont accueillis au sein de leur laboratoire pour la réalisation des analyses pharmacologiques qu'ils ont suivies avec un vif intérêt et dont on a toujours apprécié les critiques et conseils et les suggestions scientifiques.*

*Nos vifs remerciements pour Mr NABIEV Mohamed professeur à l'université de Boumerdes.*

*Nos profonds remerciements s'adressent aussi à Mme Senani et Mr Asla Qui ont accepté d'examiner notre manuscrit.*

*A tous les Ingénieurs, Enseignants et le Doyen Mr HOUALI de la faculté de Sciences Biologiques et des sciences Agronomiques*

*A Mr MATI Responsable de la spécialité Biochimie*

*On remercie toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*Un grand merci à tous.*

## ***DEDICACE***

*On dédie ce travail à nos **Parents** toute notre  
gratitude  
Pour leurs soutien toute au long de nos études  
A nos **Sœurs et Frères**  
A nos **Amis**  
A ceux qui nous ont tout donné sans rien en retour*

# Liste des figures

---

## Liste des figures

|   |    |
|---|----|
| Figure 1 : Aspect morphologique d' <i>Anacyclus clavatus</i> .....  | 5  |
| Figure 2 : <i>plantule d'Anacyclus clavatus</i> .....   | 5  |
| Figure 3 : <i>d'Anacyclus clavatus</i> au stade adulte .....  | 6  |
| Figure 4 : Caractéristiques climatiques .....   | 6  |
| Figure 5 : Caractéristiques du sol .....  | 7  |
| Figure 6 : voie de l'acide shikimique .....   | 9  |
| Figure 7 : Voie du phénylpropanoïde .....   | 10 |
| Figure 8 : Quelques exemples d'acides phénoliques .....   | 11 |
| Figure 9 : Structure de base des flavonoïdes .....  | 13 |
| Figure 10 : Aspect des parties aériennes (feuilles et tiges) d' <i>Anacyclus clavatus</i> .....   | 18 |
| Figure 11 : Poudre d' <i>Anacyclus clavatus</i> conditionnée .....  | 19 |
| Figure 12 : Protocole d'extraction des polyphénols .....  | 25 |
| Figure 13 : protocole du dosage des polyphénols totaux .....  | 26 |
| Figure 14 : protocole du dosage des polyphénols totaux .....  | 26 |
| Figure 15 : Appareil de la Chromatographie liquide haute performance .....  | 28 |
| Figure 16 : Montage de l'extraction de la matière grasse par soxlet .....   | 28 |
| Figure 17 : Appareil de la Chromatographie phase gazeuse .....  | 29 |
| Figure 18 : Appareil de granulomètre de diffraction par laser .....   | 30 |
| Figure 19 : Appareil de la pastilleuse (HERAZOG) .....  | 31 |
| Figure 20 : Photo d'un Friabilimètre de type (ERWEKA TA 40) .....   | 32 |
| Figure 22 : Appareil Dessiccateur (Sartorius MA 45) .....   | 32 |
| Figure 23 : Appareillage de dissolution (SOTAX) .....   | 34 |
| Figure 24 : Chromatogramme d'HPLC des standards .....   | 38 |
| Figure 25 : Chromatogramme d'HPLC de l'extrait .....  | 39 |
| Figure 26 : Profil d'acides gras de la poudre d' <i>anacyclus clavatus</i> .....  | 40 |
| Figure 27 : Profil d'acides gras de la poudre d' <i>anacyclus clavatus</i> .....  | 41 |
| Figure 28 : aspect morphologique des comprimés .....  | 43 |
| Figure 29 : Aspect morphologique des comprimés après leur émergence dans les trois milieux (eau distillée ; HCL ; solution phosphatée saline) ..... | 45 |
| Figure 30 : Taux de gonflement des comprimés dans l'eau distillée, la solution tampon Phosphatée pH 6,8 et HCL 0,1N .....                           | 46 |
| Figure 31 : Aspect morphologique des comprimés après leur érosion .....   | 47 |

# Liste des tableaux

---

## Liste des tableaux

|  |    |
|--|----|
| Tableau 1 : Principales classes de flavonoïdes .....   | 10 |
| Tableau 2 : Vitesse et gradients d'éluion .....  | 23 |
| Tableau 3 : condition opératoire de la CPG .....   | 25 |
| Tableau 4 : Résultats des paramètres physico-chimiques des feuilles et tiges .....                     | 32 |
| Tableau 5 : Composition en minéraux.....   | 32 |
| Tableau 6 : Résultats des tests phytochimique effectués sur la poudre .....                            | 34 |
| Tableau 7 : Teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes des extraits aqueux et éthanoïques .....         | 35 |
| Tableau 8 : Temps de rétention des flavonoïdes standards .....   | 37 |
| Tableau 9 : Temps de rétention des flavonoïdes présents dans l'extrait <i>d'anacyclus clavatus</i> ... | 37 |
| Tableau 10 : teneur en % d'acides gras .....   | 40 |
| Tableau 11 : poids ; diamètres et l'épaisseur de 10 comprimés .....                                    | 43 |
| Tableau 12 : résultats des tests galéniques .....  | 44 |
| Tableau 13 : Concentration de chlorophylle dans les trois milieux .....                                | 45 |

---

**Sommaire**

|   |    |
|---|----|
| Introduction .....  | 1  |
| 1. Recherche bibliographique.....   | 5  |
| 1.1. Généralités sur <i>Anacyclus clavatus</i> .....                                  | 5  |
| 1.1.1. Classification .....   | 5  |
| 1.1.2. Description botanique.....   | 6  |
| 1.1.3. Caractéristiques climatiques.....  | 7  |
| 1.1.4. Caractéristiques de sol.....   | 8  |
| 1.1.5. Usage traditionnel.....  | 8  |
| 1.1.6. Propriétés biologiques .....   | 9  |
| 1.2. Les composés phénoliques .....   | 9  |
| 1.2.1. Généralités.....   | 9  |
| 1.2.2. Voies de biosynthèse .....   | 9  |
| 1.2.3. Classification des polyphénols .....   | 11 |
| 1.2.4. Propriétés biologiques des polyphénols .....                                   | 15 |
| 2. Matériel et méthode .....  | 17 |
| 2.1. Matériels .....  | 17 |
| 2.1.1. Appareillages et verrerie.....   | 17 |
| 2.1.2. Produits et réactifs utilisés.....   | 18 |
| 2.1.3. Matériel végétal .....   | 18 |
| 2.2. Caractérisation physico-chimique de la poudre de la plante .....                 | 20 |
| 2.2.1. Le pH .....  | 20 |
| 2.2.2. Détermination de l'acidité titrable.....                                       | 20 |
| 2.2.3. Humidité (teneurs en eau) .....  | 21 |
| 2.2.4. Teneurs en cendres .....   | 21 |
| 2.2.5. Composition minérale .....   | 23 |
| 2.3. Analyse phytochimique .....  | 23 |
| 2.4. Détermination de la teneur en polyphénols totaux .....                           | 25 |
| <i>Principe</i> .....   | 25 |
| 2.4.1 Protocole d'extraction .....  | 25 |
| 2.4.2. Dosage des polyphénols totaux .....  | 26 |
| 2.5. Dosage des flavonoïdes .....   | 27 |
| 2.6. Identification des flavonoïdes par HPLC couplée à un détecteur UV –Visible ..... | 28 |
| 2.6.1. Préparation de l'échantillon.....  | 28 |

|   |    |
|---|----|
| 2.6.2. Préparation des Standards (étalons).....   | 28 |
| 2.7. Analyse de profil d'acide gras .....   | 29 |
| 2.7.1. Extraction de la matière grasse.....   | 29 |
| 2.7.2. Chromatographie phase gazeuse (CPG).....   | 30 |
| 2.8. Analyses rhéologiques de la poudre obtenue .....   | 31 |
| 2.8.1 Analyse granulométrique.....  | 31 |
| 2.8.2. Indice de gonflement .....   | 31 |
| 2.9. Elaboration des comprimés à base d' <i>anacyclus clavatus</i> .....                              | 32 |
| 2.9.1. Analyses galéniques des comprimés .....  | 32 |
| 3. Résultats et discussion .....  | 36 |
| 3.1. Résultats des paramètres physico-chimiques des matières premières.....                           | 36 |
| 3.2. Composition en minéraux de la poudre d' <i>Anacyclus clavatus</i> .....                          | 36 |
| 3.3. Résultats d'analyse phytochimique de poudre et d'infusé d' <i>Anacyclus clavatus</i> .....       | 37 |
| 3.4. Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes.....  | 38 |
| 3.5. Identification des flavonoïdes (quercétine ; catéchine ; acide hydroxybenzoïques) par HPLC ..... | 38 |
| 3.6. Résultat du Profil d'acides gras de la poudre d' <i>Anacyclus clavatus</i> .....                 | 41 |
| 3.7. Résultat des analyses rhéologiques .....   | 43 |
| 3.7.1 Résultat de la granulométrie .....  | 43 |

## Introduction générale

---

Pour se soigner, l'homme a longtemps eu recours à des remèdes traditionnels à base de plantes médicinales (tisanes, poudres et décoctions), administrés par friction, inhalation, cataplasme, massage ou encore par voie orale. Le nombre d'espèces de plantes à fleurs connues est évalué de 500 000, parmi ces espèces, on estime à environ 34 000 espèces encore inconnues à ce jour et 80.000 possèdent des propriétés médicinales (Quyoun, 2003).

En général, les plantes contiennent des métabolites secondaires qui peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes, par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme central.

Ces molécules participent ainsi, de manière très efficace à la tolérance des végétaux aux stressés variés.

De point de vue application, ces molécules constituent souvent la base des principes actifs des plantes médicinales. Ainsi, l'industrie pharmaceutique s'appuie largement sur la diversité et les propriétés biologiques des métabolites secondaires des végétaux pour le développement de nouveaux médicaments (Terra *et al.*, 2007).

Environ 25-30% des médicaments disponibles sont dérivés des produits naturels (plantes, animaux, bactéries et champignons) (Muanda, 2010).

Actuellement, de nombreuses études portent sur la recherche, l'identification et l'utilisation des composés d'origine naturelle afin d'évaluer les vertus thérapeutiques de ces plantes (Benabdelkader, 2012).

Notamment, l'extraction des polyphénols, qui suscitent beaucoup d'intérêt grâce à leur pouvoir antioxydant, est une étape très importante dans l'isolement ainsi que dans l'identification des composés secondaires (Mahmoudi *et al.*, 2013).

En Algérie il existe plusieurs plantes médicinales méconnues par la population ou peu utilisées. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail. Il s'agit d'étudier certaines propriétés (biochimiques et pharmacologiques) de l'espèce *Anacyclus clavatus*, plante médicinale réputée en médecine traditionnelle algérienne pour ses vertus thérapeutiques principalement la propriété anti-inflammatoire.

Pour cela on s'est fixé les objectifs suivants:

- ❖ Analyse phytochimique des parties aériennes (feuilles et tiges) d'*Anacyclus clavatus* ;
- ❖ Détermination de la composition biochimique et certains paramètres physico-chimiques d'*Anacyclus clavatus* ;
- ❖ Extractions, dosages et identification de certaines substances bioactives (polyphénols totaux et identification des flavonoïdes par HPLC) ;

# Introduction générale

---

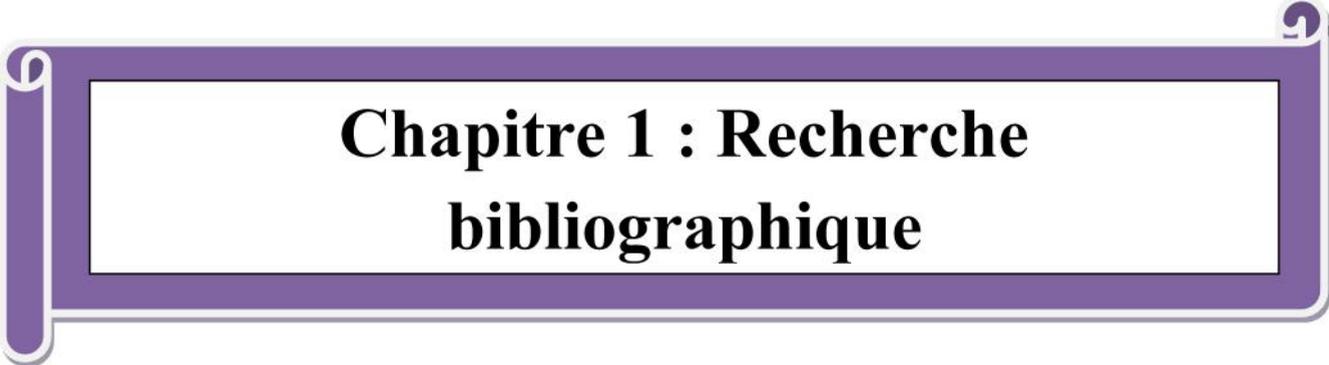
❖ Essai d'élaboration des comprimés à base la poudre *Anacyclus clavatus* et analyses galéniques des ces comprimés.

Le présent manuscrit comporte trois chapitres à savoir :

❖ Le premier est une synthèse des données bibliographiques qui traite la description botanique et les propriétés attribuées à l'espèce étudiée.

❖ Le deuxième chapitre porte sur les manipulations et les expérimentations faites sur la partie aérienne de la plante en question.

❖ Le dernier révèle tous les résultats obtenus ainsi que leur discussion, et à la fin, on termine par une conclusion.



# **Chapitre 1 : Recherche bibliographique**

## 1. Recherche bibliographique

### 1.1. Généralités sur *Anacyclus clavatus*

*Anacyclus clavatus* (desf.) pers. est une plante herbacée de la famille des Astéracées.

Communément connue par Anacycle en massue, en Algérie, elle est connue sous le nom, Bssibssa.

#### 1.1.1. Classification

*Anacyclus clavatus* espèce largement distribuée dans les pays méditerranéens, elle s'adapte aux environnements humides et ouverts, et elle se développe habituellement aux bords des routes et des champs (Quezel et Santa, 1963).

Principalement, en Algérie le genre *Anacyclus* est représenté par deux espèces, à savoir *Anacyclus pyrethrum* L. et *Anacyclus clavatus* pers. (Julien, 1894).

*Anacyclus clavatus* (Figure 1) est une plante annuelle herbacée verte-blanchâtre, avec un cycle végétatif très court fleurissant entre avril et juin, pubescente de 20 à 50 cm, à tige de 20 -40cm, ses feuilles sont bipennatiséquées à segments très étroits. Les fleurs sont hétérogames et recueillies dans des capitules terminaux rayonnés de 2,5 à 3 cm de diamètre.

Ladite espèce est classée selon Cronquist (1981) comme suit :

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Asteridae

Ordre : Asterales

Famille : Asteraceae

Genre : *Anacyclus*

Espèce : *Anacyclus clavatus* (desf.) pers



**Figure 1 :** Aspect morphologique d'*Anacyclus clavatus*.

## 1.1.2. Description botanique

### • Plantule

Les cotylédons sont petits, 5-7 x 3-5 mm, ovales, arrondis à base large, sessiles et glabres. Les deux premières feuilles vraies sont dressées, courtes et divisées en un lobe terminal et 3 à 5 lobes latéraux étroits, opposés ou non. Les feuilles ultérieures, toutes pétiolées, sont irrégulièrement divisées 2-3 fois en segments étroits et mucronés (Figure 2).

L'axe hypocotylé est court, 5 à 10 mm, et souvent violacé. La plantule, disposée en rosette lâche, est vert foncé et velue (Selles, 2012).



**Figure 2 :** plantule d'*Anacyclus clavatus*

### • La Plante au stade adulte

Au stade adulte (Figure 3) la plante a 20 à 60 cm de longueur, à tiges dressées ou ascendantes, ramifiées, plus ou moins velues. Feuilles bipennatiséquées à segments linéaires.

# Chapitre 1 : Recherche bibliographique

Capitules terminaux de 25 à 30 mm, à fleurs en tube, jaunes, et à fleurs ligulées blanches ou parfois sans ligule.

Pédoncules élargis après la floraison. Réceptacle muni de paillettes. Akènes externes petits, aplatis, entourés d'une aile fibreuse blanchâtre à sommet arrondi, ceux du centre non ailés.

Floraison : mars juin (Anonyme 3).



Figure 3 : *d'Anacyclus clavatus* au stade adulte

- **Habitat**

Elle pousse au bord des routes, et des terres enlevées les prairies sèches nitrophiles, jusqu'à à 1.600 mètres au-dessus la mer.

- **Répartition**

Elle est abondante dans toute la Méditerranée, presque dans tout le territoire, rare dans le nord, Navra : presque tout le territoire au sud du bassin versant ; rare dans les vallées de l'Atlantique

### 1.1.3. Caractéristiques climatiques

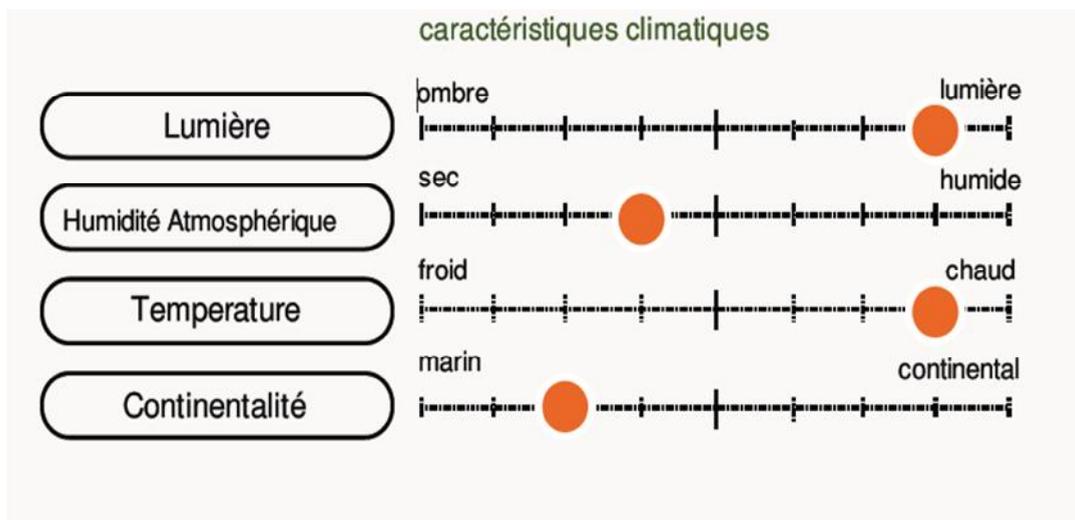


Figure 4 : Caractéristiques climatiques

## 1.1.4. Caractéristiques de sol

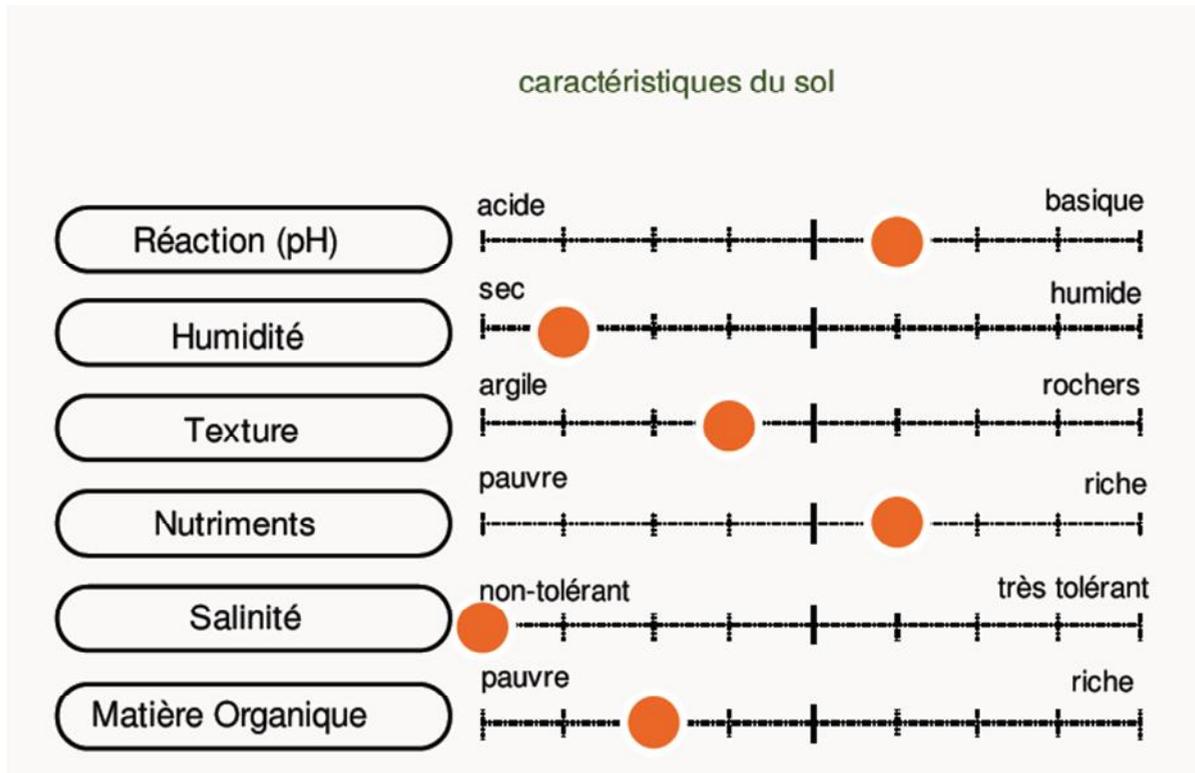


Figure 5 : Caractéristiques du sol

## 1.1.5. Usage traditionnel

Plusieurs espèces d'*Anacyclus* ont été utilisées en médecine traditionnelle, comme par exemple, *Anacyclus pyrethrum*, *Anacyclus radiatus*, *Anacyclus valentinus*, *Anacyclus cyrtolépodoïde*, et *Anacyclus clavatus*.

L'espèce *Anacyclus clavatus* est connue depuis l'antiquité pour ses propriétés médicinales. Ses feuilles et ses tiges sont utilisées dans l'alimentation dans les salades ou compote et comme des tisanes digestives (Tardío, 2006 ; Pardo de Santayana et Morales, 2010 ; Benitez, et al, 2010) aussi contre les ulcères gastriques (Pottier Alapetite, 1981).

Elle est également utilisée sous forme de plâtre anti-inflammatoire (Pardo de Santayana et Morales, 2010).

Les racines sont utilisées pour traiter diverses pathologies, elles sont particulièrement efficaces contre les infections de la peau, notamment les maladies fongiques.

Selon notre spécifique enquête dans quelques régions d'Algérie, l'*Anacyclus clavatus* est utilisée comme remède traditionnel. Spécialement en Kabylie, cette plante connaît plusieurs appellations « walmam » dans la région de Brouira, « chib el hart » du côté des Ouadias et « tazdelt » à Lareba nath irathen. Au niveau de ces contrées l'*Anacyclus*

# Chapitre 1 : Recherche bibliographique

---

*clavatus* est conseillée pour les problèmes gastriques, traite les hémorroïdes de même qu'elle est employée comme plante comestible dans la préparation du couscous et comme aliment végétal destiné au bétail.

A Oum El Bouaghi et Djelfa situées en Algérie, elle est connue sous le nom de « Kraa el djaja », les fleurs d'*Anacyclus clavatus* préparées en infusion sont préconisées contre l'anxiété, alors que les tiges sont destinées à apaiser les crises d'ulcère de l'estomac.

## 1.1.6. Propriétés biologiques

Les études de Hammami *et al.* (2012) ont montré que les huiles essentielles d'*Anacyclus clavatus* possèdent une activité antibactérienne envers *Pseudomonas aeruginosa*, et une activité antifongique plus importante contre *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* et *Candida parapsilosis*.

Rimbau *et al.* (1999), ont évalué l'activité anti-inflammatoire des extraits d'*Anacyclus clavatus* contre la synthèse des cytokines.

Les huiles essentielles de cette plante possèdent plusieurs composés à effets thérapeutiques, en particulier l' $\alpha$ -cadinol qu'a un effet toxique sélectif contre les cellules humaines d'adénocarcinome du côlon (Sylvestre, 2006) et le  $\beta$ -élémane a été utilisé comme médicament anti-tumoral (Yi-Qun, 2008).

## 1.2. Les composés phénoliques

### 1.2.1. Généralités

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des végétaux. Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (Urquiaga et Leighton, 2000).

### 1.2.2. Voies de biosynthèse

Différentes voies de biosynthèses des polyphénols rapportées par la bibliographie sont résumées ci-dessous :

# Chapitre 1 : Recherche bibliographique

## 1.2.2.1. Voie du shikimate

La voie de l'acide shikimique (Figure 6) est la voie la plus importante pour la biosynthèse des composés aromatiques dans les plantes et les micro-organismes, y compris les acides aminés aromatiques : la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane (Boubekri, 2014). Ce sont des métabolites primaires qui servent de précurseurs pour de nombreux produits naturels (secondaires) tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques, les coumarines, les alcaloïdes... (Ghasemzadeh, 2011).

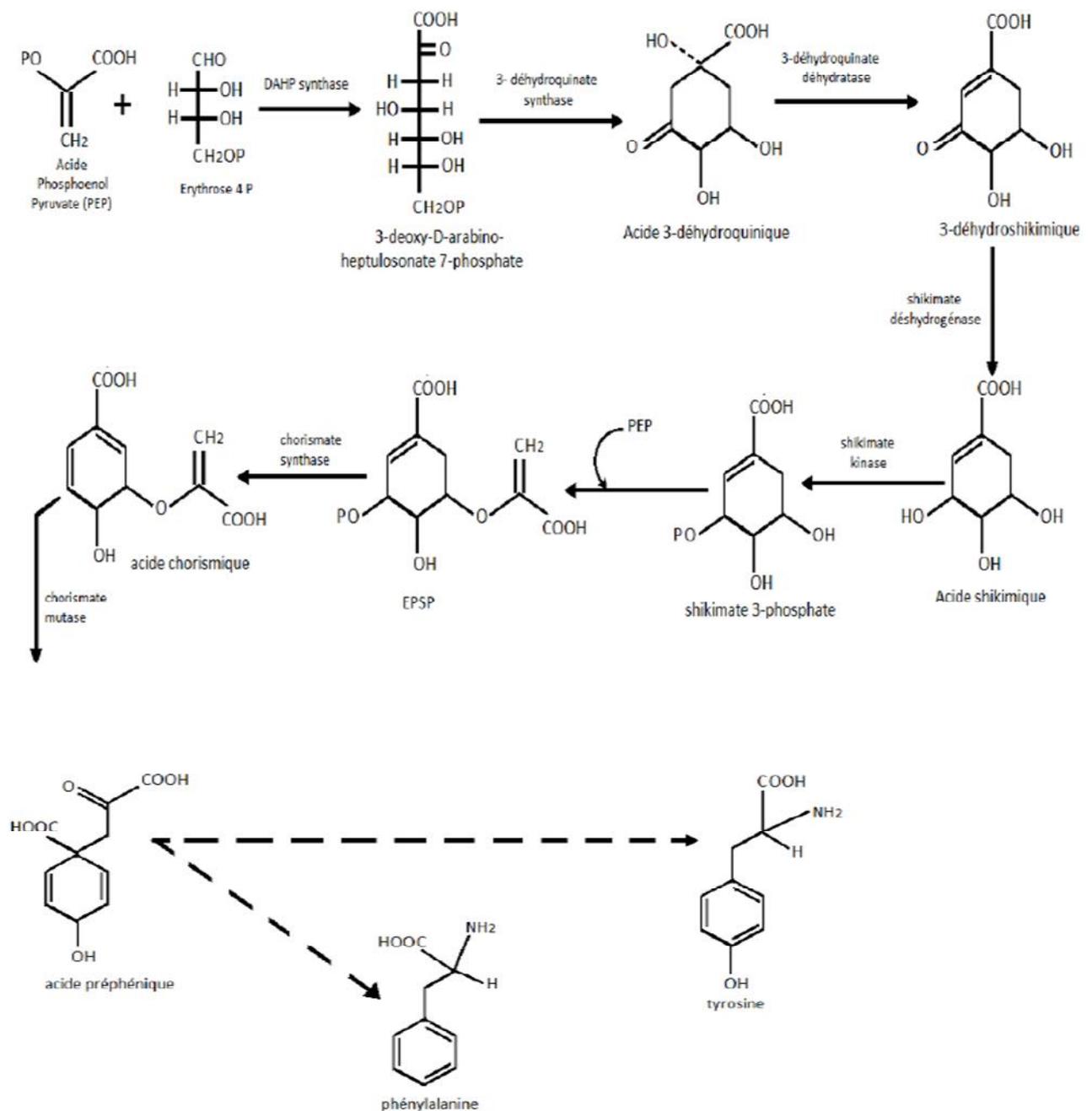


Figure 6 : voie de l'acide shikimique (Boubekri, 2014)

## 1.2.2.2. Voie de phénylpropanoïde

La voie de phénylpropanoïde (Figure 7) commence par la phénylalanine qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose (Zeghad, 2009).

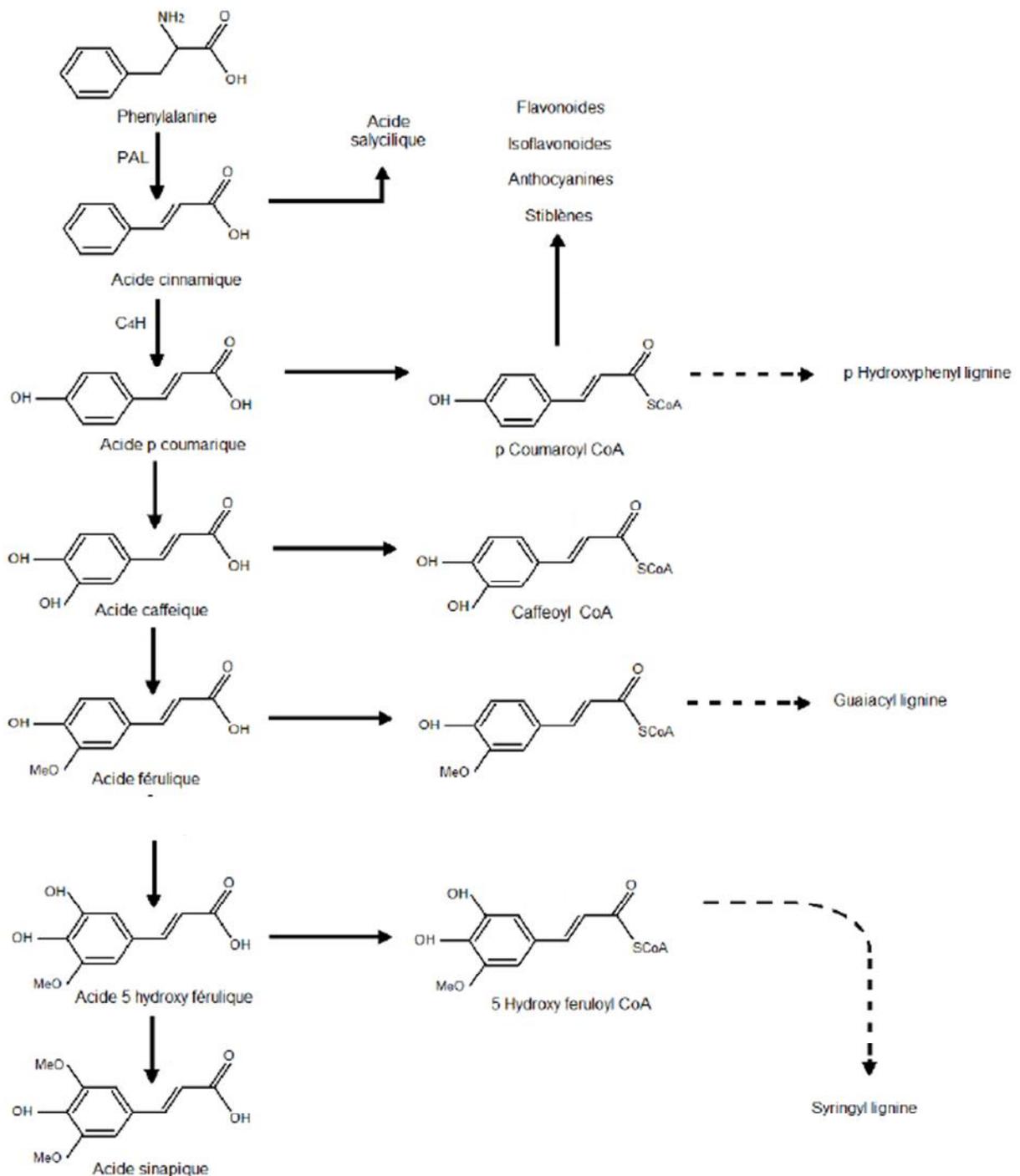


Figure 7 : Voie du phénylpropanoïde (Hoffmann et al., 2004).

## 1.2.3. Classification des polyphénols

Les polyphénols peuvent se diviser en deux grands groupes : les non flavonoïdes dont les principaux composés sont : les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les lignines et les coumarines (Hoffmann, 2003) et les flavonoïdes, dont on caractérise principalement : les flavones, les flavanones, les flavonols, les isoflavonones, les anthocyanines, les proanthocyanidines et les flavanols (Pincemail et *al.*, 2007).

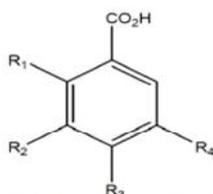
### 1.2.3.1. Les non flavonoïdes

Cinq classes de non flavonoïdes ont été répertoriées. Il s'agit de :

#### ✓ *Les acides phénoliques*

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes distincts qui sont les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques (Figure 8).

#### Acides hydroxybenzoïques C6-C1



R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>3</sub>=OH Acide *p*-hydroxybenzoïque

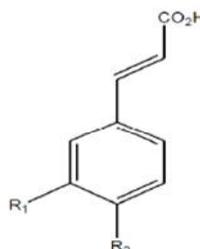
R<sub>1</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OH Acide protocatéchique

R<sub>1</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>2</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub>=OH Acide vanillique

R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=OH Acide gallique

R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H Acide salicylique

#### Acides hydroxycinnamiques C6-C3



R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H Acide cinnamique (non phénolique)

R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OH Acide *p*-coumarique

R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OH Acide caféique

R<sub>1</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=OH Acide férulique

**Figure 8** : Quelques exemples d'acides phénoliques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

#### ✓ *Les stilbènes*

Les stilbènes présentent deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, formant un système conjugué. Les stilbènes se trouvent en petites quantités dans l'alimentation humaine (Belkheiri, 2010). Ils sont généralement isolés des plantes sous formes hydroxylés, méthylés, esterifiés, glycosylés ou même prenylés. Leur solubilité est négligeable dans l'eau et accrue dans la plupart des solvants organiques (Jean-Denis, 2005).

## ✓ *Les lignines*

La lignine est un polymère fortement ramifié, formé par trois alcools phénoliques simples. Les alcools sont oxydés en radicaux libres par une enzyme ubiquiste chez les plantes la peroxydase. Les radicaux libres réagissent ensuite spontanément et au hasard pour former la lignine (Hopkins, 2003).

## ✓ *Les lignanes (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)<sub>2</sub>*

Les lignanes répondent à une représentation structurale de type (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)<sub>2</sub> l'unité (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) est considérée comme un propylbenzène. Ce sont des composés phénoliques bioactifs, non-nutritifs, non caloriques. On les trouve en plus forte concentration dans le lin et les graines de sésame et en faibles concentrations dans les fruits et les légumes (Peterson et *al.*, 2010).

## ✓ *Les coumarines C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>*

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone (Lacy, 2004). Ce sont des composés phénoliques cyclisés qui dérivent des acides *t*-cinnamique et *p*-coumarique pour la majorité d'entre eux (Boubekri, 2014). Les coumarines ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration mais aussi suivant l'espèce. Dans la cellule, les coumarines sont principalement présentes sous forme glycosylée. Cette glycosylation serait une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques des coumarines sur la cellule et la croissance (Hoffmann, 2003).

### **1.2.3.2. Les flavonoïdes**

#### ✓ *Définition*

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange (Piquemal, 2008), cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ; (flavus = jaune) (Male\_Év et Kunti, 2007).

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. On les trouve dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes. (Guignard, 1996).

Les travaux relatifs aux flavonoïdes sont multiples depuis la découverte du célèbre "french paradox" correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez les habitants des régions méditerranéennes (Ghedira, 2005).

# Chapitre 1 : Recherche bibliographique

## ✓ Structure

Tous les flavonoïdes possèdent la même structure de base (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), ils contiennent quinze atomes de carbone dans leur structure de base : deux cycles aromatiques A et B à six atomes de carbones liés avec une unité de trois atomes de carbone qui peut ou non être une partie d'un troisième cycle C (Tapas, 2008) (Figure 9).

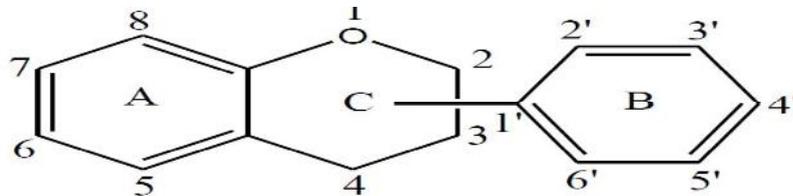


Figure 9 : Structure de base des flavonoïdes (Dacosta, 2003).

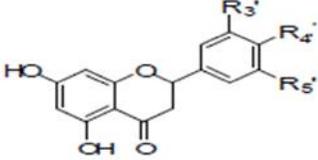
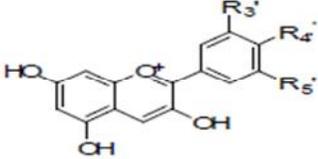
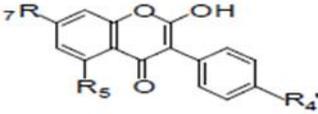
## ✓ Classification

Le tableau 1 donne les principales classes de flavonoïdes.

Tableau 1 : Principales classes de flavonoïdes (Scalbert et Williamson, 2000)

| classe    | Structure chimique | R <sub>3</sub> ' | R <sub>4</sub> ' | R <sub>5</sub> ' | exemple    |
|-----------|--------------------|------------------|------------------|------------------|------------|
| flavones  |                    | H                | OH               | H                | Apigénine  |
|           |                    | OH               | OH               | H                | Lutéoline  |
|           |                    | OH               | OCH <sub>3</sub> | H                | Diosmétine |
| Flavonols |                    | H                | OH               | H                | Kaempférol |
|           |                    | OH               | OH               | H                | Quercétine |
|           |                    | OH               | OH               | OH               | Myrecétine |
| flavanols |                    | OH               | OH               | H                | Catéchine  |

# Chapitre 1 : Recherche bibliographique

|                 |  |                |                |                  |               |
|-----------------|--|----------------|----------------|------------------|---------------|
| flavanones      |   | H              | OH             | H                | Naringénine   |
|                 |  | OH             | OH             | H                | Eriodictyol   |
| Anthocyanidines |   | H              | OH             | H                | Pelargonidine |
|                 |  | OH             | OH             | H                | Cyanidine     |
|                 |  | OH             | OH             | OH               | Delphénidine  |
| isoflavones     |  | R <sub>5</sub> | R <sub>7</sub> | R <sub>4</sub> ' |               |
|                 |  | OH             | OH             | OH               | Genisteine    |
|                 |  | H              | O-Glu          | OH               | Daidezine     |

## 1.2.4. Propriétés biologiques des polyphénols

Les effets bénéfiques des polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire (Leong et Shui, 2002).

Actuellement, les industriels commercialisent maintenant des aliments enrichis en polyphénols ou des suppléments alimentaires. De plus, leur activité antioxydant assure une meilleure conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidique.

Dans l'industrie cosmétique, les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes dans la santé et la beauté de la peau. En phytothérapie, même si certaines indications sont communes à plusieurs classes (les propriétés vasculoprotectrices, sont par exemple aussi bien attribuées aux flavonoïdes qu'aux anthocyanes, tanins et autres coumarines), chaque classe chimique semble être utilisée pour des bénéfices spécifiques (Hannebelle *et al*, 2004).

En ce qui concerne les flavonoïdes, ces composés peuvent empêcher les dommages oxydatifs par différents mécanismes d'actions : soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxydes et peroxydes (Hodeket *et al*, 2002) ; soit par chélation des métaux (le fer

## Chapitre 1 : Recherche bibliographique

---

et le cuivre) qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires ; soit l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres (Van Acker *et al.* 1996 ; Benavente-Garcia *et al.*, 1997). Ils jouent un rôle très important dans le traitement du diabète (inhibant l'aldose réductase), de la goutte (inhibant la xanthine oxydase), des inflammations (inhibant la lipoxigenase, la phospholipase et la cyclooxygenase), des hépatites, des tumeurs, de l'hypertension (quercétine), des thromboses (flavonols), des allergies et des affections bactériennes et viraux (anti-HIV) (Anderson *et al.* 1996 ; Cowan, 1999 ; Yao *et al.*, 2004). Mais, on attribue également aux flavonoïdes des propriétés neurosédatives, antispasmodiques, diurétiques, anti-oestrogènes (isoflavones), contre la sénescence cérébrale et ses conséquences telle l'altération de la mémoire et la confusion.

D'autres part, les citro flavonoïdes (flavonoïdes provenant de divers *Citrus*) et la fragilité capillaire (insuffisance veino-lymphatique, crise hémorroïdaire) (Hennebelle *et al.*, 2004).

## **Chapitre 2 : matériel et méthodes**

## Chapitre 2 : Matériels et méthodes

---

- Cadre de l'étude

La présente étude rentre dans le cadre de projet de recherche de notre promotrice Melle BENAHMED DJILALI Adiba visant la valorisation de certaines plantes médicinales locales afin de découvrir de nouveaux principes actifs à intérêt pharmacologique.

Pour cela, nous nous sommes intéressés à étudier l'espèce locale *Anacyclus clavatus* et à évaluer certaines de ses propriétés (physico-chimiques et pharmacologiques) visant une application pharmaceutique sous forme des comprimés à effet thérapeutique.

Notre étude expérimentale a été réalisée au sein de différents laboratoires :

-Laboratoires Communs (I et II) d'Analyses Physico-chimiques, ainsi que le Laboratoire pédagogique de Microbiologie de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou (UMMTO) ;

-Les laboratoires de Chimie Pharmaceutique et de Rhéologie de l'Université de Boumerdes ;

-Laboratoire des Analyses Galéniques à SAIDAL DAR EL BEIDA.

### 2.1. Matériels

#### 2.1.1. Appareillages et verrerie

L'ensemble des appareillages et verrerie utilisés dans cette étude sont cités comme suit :

- ✓ Balance de précision (KERN 770) ;
- ✓ Spectrophotomètre (EV 9200) ;
- ✓ HPLC (WATERS 270944) ;
- ✓ Appareil HPLC lié à un détecteur UV (Waters) ;
- ✓ Colonne de 250-4 ,5µm HYPERSIL ODC ;
- ✓ CPG (Chrompack CP 9002) ;
- ✓ pH mètre (INOLAB) ;
- ✓ Bain marie (MEMMERT) ;
- ✓ Four à moufle (NABERTHERM) ;
- ✓ Dessiccateur (SARTORIUS MA 45) ;
- ✓ Etuve (MEMMERT) ;
- ✓ Friabilimètre de type (ERWEKA TA 40).
- ✓ Dissolu test (SOTAX)
- ✓ Agitateur (MEMMERT) ;
- ✓ Réfrigérateur ;
- ✓ Tubes à essais ;
- ✓ Pipettes et micropipettes ;

- ✓ Bêchers ;
- ✓ Fioles et flacons en verre ;
- ✓ Erlenmeyers ;
- ✓ Entonnoirs ;
- ✓ Capsules en porcelaine ;
- ✓ Papier filtre Wattman ;
- ✓ Papier aluminium ;
- ✓ Vials HPLC avec bouchons septum ;

### 2.1.2. Produits et réactifs utilisés

- ✓ Eau distillée ; solvants (Méthanol, Ethanol, Propanol, Iso-butanol, Chloroforme, Ether-chloroforme, Acétone, Hexane et acétonitrile) ;
- ✓ Acides (HCl ; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ;
- ✓ Réactifs (Folin-Ciocalteu, Dragendroff, Ammoniaque) ;
- ✓ Sels (Carbonate de sodium ; Acétate de sodium) ;

### 2.1.3. Matériel végétal

#### 2.1.3.1. Provenance et identification

L'espèce étudiée a été récoltée dans la région de Tizi-Ouzou la période de Mars 2016. L'opération de récolte est réalisée le matin tel recommandé par Nogaret-Ehrhat, (2008).

En ce qui concerne, l'identification botanique de notre espèce a été réalisée au niveau du Laboratoire de Département d'Ecologie par Mr Benghanem Nabil.

#### 2.1.3.2. Conservation

Comme toute plante n'est généralement pas utilisée immédiatement après la cueillette, il est nécessaire de connaître les meilleures méthodes pour en conserver ses principes actifs et par conséquent ses propriétés thérapeutiques. La conservation des plantes médicinales impose trois étapes : la dessiccation, le conditionnement et le stockage.

##### ➤ *Dessiccation*

La dessiccation consiste à éliminer progressivement l'humidité des plantes. Une plante bien sèche ne contient normalement pas plus de 10 % d'humidité, ce qui empêche d'éventuelles altérations.

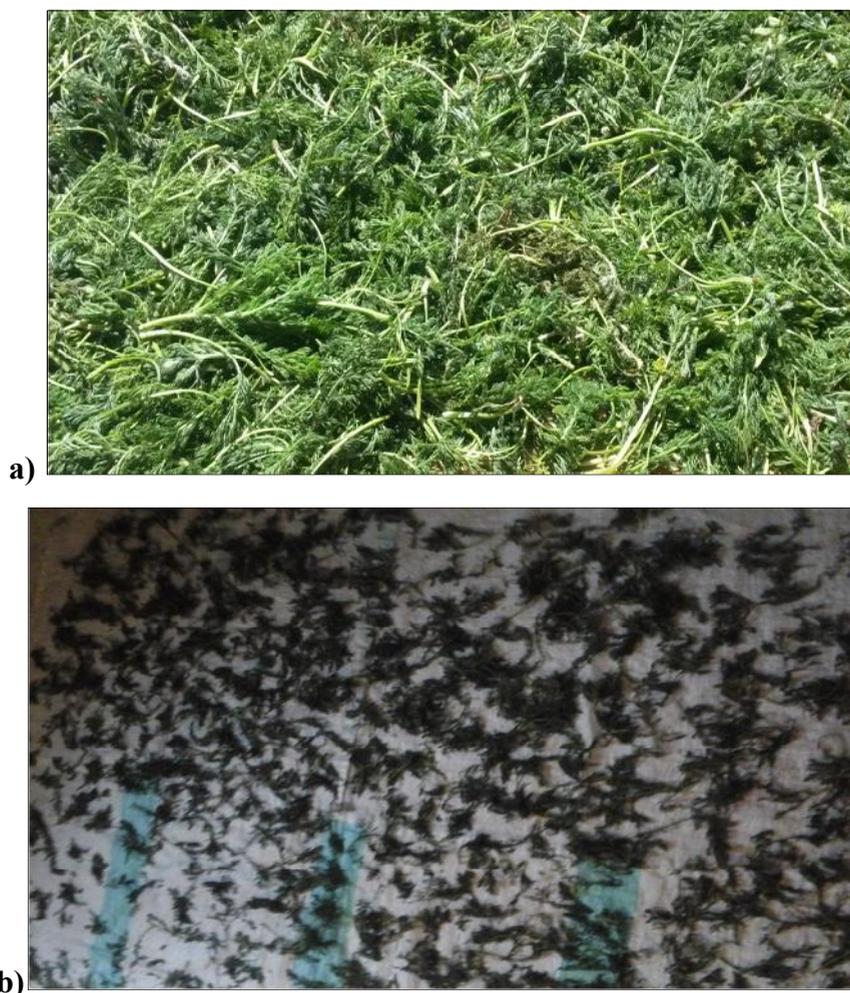
Dans notre cas on a opté pour le séchage à l'air libre à l'ombre des parties aériennes (feuilles et tiges) de notre espèce (Figure 10 a). Ce mode de séchage est préconisé dans le cas

## Chapitre 2 : Matériels et méthodes

de séchage des plantes médicinales et aromatiques et ce afin de sauvegarder leurs propriétés initiales intactes après séchage (Nogaret-Ehrhat, 2008).

Après récolte, ces parties sont nettoyées (débarrassées des débris), par la suite étalées en fine couche sur un carton propre étendu par terre ensuite laissées sécher à l'ombre à l'abri de la poussière et dans des endroits bien aérés, la température de l'air de séchage était 37°C (Figure 10 b).

Le temps de séchage pour atteindre une humidité recherchée de l'ordre de 4% était de 15 jours.



**Figure 10 :** Aspect des parties aériennes (feuilles et tiges) d'*Anacyclus clavatus*

a) : au moment de la récolte ; b) : après 15 jours de séchage à l'air libre

### 2.1.3.4. Conservation et stockage

La poudre issue de broyage des feuilles et des tiges sèches est tamisée à l'aide d'un tamis de 500µm et conservée dans des flacons fermés hermétiquement et enfin stockée dans un endroit à l'abri de lumière et d'humidité (Figure 11).



**Figure 11** : Poudre d'*Anacyclus clavatus* conditionnée.

### 2.2. Caractérisation physico-chimique de la poudre de la plante

#### 2.2.1. Le pH

Il définit l'acidité de produit considéré, mesuré à l'aide d'un pH-mètre.

➤ **Mode opératoire**

- 1.10 ml d'eau distillée chaude sont ajoutés à 2g d'échantillon ;
2. Broyer le mélange et laissé refroidir ;
3. Etalonner le pH-mètre, en utilisant des solutions tampons ;
4. Prélever comme prise d'essai un volume V de l'échantillon suffisamment important pour permettre l'immersion de l'électrode, noter ensuite la valeur du pH-mètre. il faut rincer l'électrode avec l'eau distillée avant après chaque mesure.

#### 2.2.2. Détermination de l'acidité titrable

L'acidité titrable est la somme des acides minéraux et organiques libres, exprimée selon l'équation suivante :

$$A\% = \frac{250 V_1 \times 100}{(V_0 M \times 10) \times 0.07} = \frac{175V_1}{(V \times M)} \dots\dots (1)$$

Soit :

M : Masse en gramme du produit prélevé.

V<sub>0</sub> : Volume en millilitres de la prise d'essai.

V<sub>1</sub> : Volume en millilitres de la solution d'hydroxyde de sodium à 0,1 N utilisé.

0,07 : facteur de conservation de l'acidité titrable en équivalent d'acide citrique.

➤ **Mode opératoire**

- 1- Chauffer 50 ml d'eau distillée jusqu'à l'ébullition, rajouter 10g de poudre puis mettre le mélange dans le bain marie pendant 30 min ;
- 2- Laisser refroidir puis ajuster à 100 ml avec l'eau distillée ;

## Chapitre 2 : Matériels et méthodes

---

3-Filtrer le mélange, puis récupérer 10 ml du filtrat et ajouter quelques gouttes de phénophtaléine, ensuite titré avec NaOH jusqu'à virage de couleur rose persistant.

### 2.2.3. Humidité (teneurs en eau)

#### ➤ *Mode opératoire*

1. Peser 5g du matériel végétal frais dans une trois capsules en porcelaine ;
2. Mettre les capsules dans l'étuve à  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 3h ;
3. Retirer les capsules de l'étuve, les placer dans le dessiccateur, après refroidissement les peser.
4. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

La teneur en eau est déterminée selon la formule suivante :

$$H = \frac{M1 - M2}{M} \times 100 \dots\dots\dots(2)$$

Soit :

H : humidité en (%) ;

M1 : Masse de la capsule + matière fraîche avant séchage en (g) ;

M2 : Masse de l'ensemble après séchage en (g) ;

M : Masse de la prise d'essais en (g).

### 2.2.4. Teneurs en cendres

Les cendres totales sont le résidu de composés minéraux qui reste après l'incinération d'un échantillon contenant des substances organiques d'origine animale, végétale ou synthétique.

#### ➤ *Principe*

L'échantillon est calciné à  $550^\circ\text{C}$  dans un four à moufle jusqu'à l'obtention de cendres blanchâtres de poids constant.

#### ➤ *Mode opératoire*

1. Dans des capsules en porcelaine, peser 4g d'échantillon ;
2. Placer les capsules dans un four à moufle réglé à  $550 \pm 15^\circ\text{C}$  pendant 5heures jusqu'à obtention d'une couleur grise claire ou blanchâtre ;
3. Retirer les capsules du four et les mettre à refroidir dans le dessiccateur, puis les peser.

La matière organique sera calculée selon l'équation suivante :

$$MO(\%) = \frac{M1 - M2}{P} \times 100 \dots\dots\dots(3)$$

Soit :

MO : Matière organique (g) ;

M1 : Masse de la capsule + prise d'essai (g) ;

M2 : Masse de la capsule + cendre (g) ;

P : Masse de la prise d'essai (g).

La teneur en cendres (Cd) est déterminée comme suit :

$$CD = 100 - MO (\%) \dots\dots\dots (4)$$

### 2.2.5. Composition minérale

Les éléments minéraux (Mg, Cu, Fe, Cd, K, Na, Co, Cr, Mn, Ni et Pb) sont déterminés à partir des cendres obtenues par le spectrophotomètre d'adsorption atomique de type (VARIAN AA 240) lié à l'atomiseur de flamme (GTA 120).

### 2.3. Analyse phytochimique

Les tests phytochimiques réalisés ont pour objectif de détecter les différentes familles de composés existantes dans *Anacyclus clavatus* au moyen des réactions de précipitation ou de coloration en utilisant des réactifs spécifiques à chaque famille.

La colorimétrie est la principale voie d'identification de ces groupes de substances en solution. Il s'agit principalement des alcaloïdes, des flavonoïdes, des hétérosides, des quinones, des saponines et des tanins.

En effet, le screening est effectué soit sur la poudre obtenue soit sur l'extrait de la poudre (l'infusé).

- **Préparation de l'infusé**

Dans un erlenmeyer de 250 ml, introduire 20g de poudre végétale dans 100 ml d'eau distillée bouillante. Laisser infuser pendant 15 mn puis filtrer sur papier filtre.

Le filtrat est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée.

L'infusé ainsi obtenu est utilisé pour la recherche des différents composés chimiques.

## Chapitre 2 : Matériels et méthodes

---

- **Identification des alcaloïdes**

On ajoute 20ml d'ammoniaque (1/2) à 5g de la poudre, plus 50ml d'un mélange éther-chloroforme (3/1). Le filtrat est épuisé par HCl (2N).

L'identification des alcaloïdes est réalisée en ajoutant 2 gouttes du réactif de Dragendorff. Qui donne un précipité rouge.

- **Identification des flavonoïdes**

A 5ml de l'infusé, on ajoute 5ml d'HCl, un copeau de Mg et 1ml d'alcool iso butanol.

La réaction est positive lorsque la coloration est rouge orangé.

- **Identification des tanins**

Introduire dans un tube à essai 5 ml de l'infusé, ajouter goutte à goutte la solution aqueuse de  $FeCl_3$  à 5% : en présence des tanins, il se développe une coloration verdâtre.

- **Identification des tanins galliques**

On sature le filtrat par l'acétate de sodium, puis on lui ajoute quelques gouttes de  $FeCl_3$ .

La réaction est dite positive lorsque la coloration bleu noirâtre apparaît.

- **Identification des anthocyanes**

Introduire dans un Erlenmeyer 5ml de l'infusé, ajouter quelques gouttes d'HCl.

La réaction positive est déterminée par une coloration rouge.

- **Identifications des leuco-anthocyanes**

A 2g de poudre, on ajoute 20ml (propanol /acide chlorhydrique) (V/V). On porte le mélange au bain marie bouillant pendant quelques minutes.

Les leuco-anthocyanes sont détectés grâce à une coloration rouge de la solution.

- **Identifications des quinones libres**

On ajoute 2ml d'HCl (1N) à 2g de poudre végétale, plus 20ml de chloroforme, puis on laisse le mélange pendant 3h. Après on filtre le mélange. On ajoute au filtrat 5ml d'ammoniaque (1/2).

La réaction positive est déterminée par l'apparition d'une couleur rouge-violette.

- **Identification des saponosides**

Dans deux tubes à essais fermés, on met dans l'un 5ml d'HCl à 0,1N, dans l'autre 5ml de NaOH 0,1N. On introduit dans chacun 2 à 3 gouttes d'infusé. Ensuite bien agiter verticalement pendant 30s et laissé reposer 15min.

Une réaction positive est déterminée par la présence ou non d'une mousse persistante.

## Chapitre 2 : Matériels et méthodes

---

1<sup>er</sup> cas : en présence des saponines stéroïdiennes, on obtient dans les deux tubes le même volume de la mousse ;

2<sup>ème</sup> cas : si la plante contient des saponines triterpéniques, en milieu basique il y'aura formation d'une mousse quelque fois plus grande par stabilité et par volume.

- **Identifications des glucosides**

On ajoute quelques gouttes d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 2g de poudre végétale. Une coloration rouge brique ensuite violette se manifeste en présence des glucosides.

### **2.4. Détermination de la teneur en polyphénols totaux**

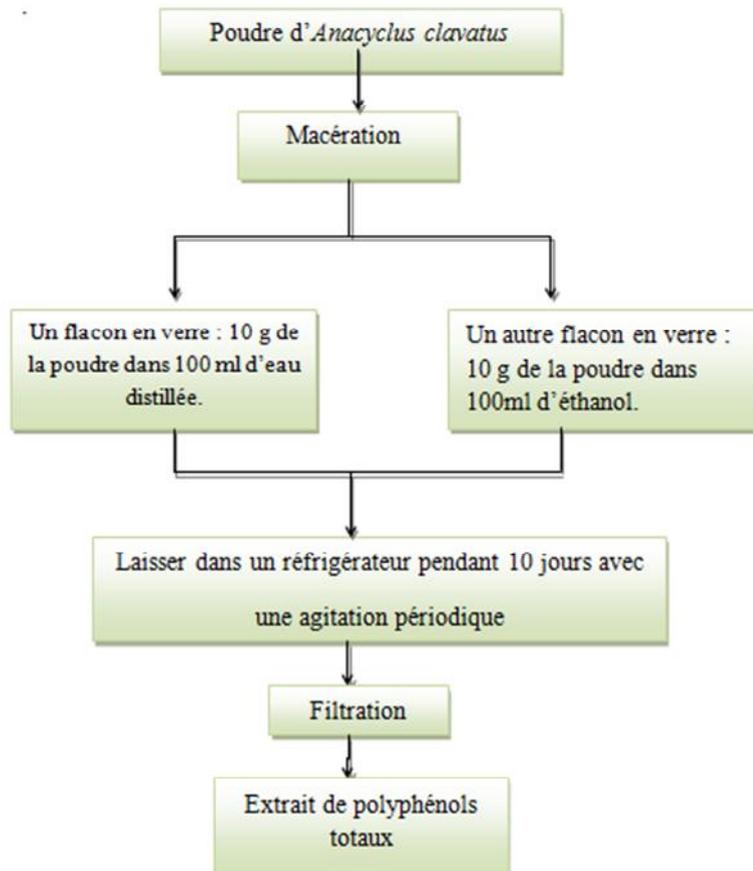
#### **Principe**

La teneur en composés phénoliques des extraits d'*Anacyclus clavatus* a été estimée par la méthode au Folin-Ciocalteu décrite par Li *et al.* (2007). Cette méthode est basée sur la réduction en milieux alcalin de la mixture phosphotungstique phosphomolybdique du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation des produits de réduction de couleur bleue.

Ces composés présentent un maximum d'absorption à 765 nm, l'intensité étant proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (Georgé *et al.*, 2005 ; Boizot et charpentier, 2006).

#### **2.4.1 Protocole d'extraction**

Suivant le protocole (Figure 12), 10g de matériel végétal finement broyé est soumis à l'extraction par macération dans deux solutions (aqueuse et éthanoïque) pendant 10jours à 4°C dans le réfrigérateur, avec agitation de temps en temps. Le macéra de chaque échantillon est ensuite filtré à l'aide d'un papier filtre Wattman et conservé à 4°C pour des dosages ultérieurs.



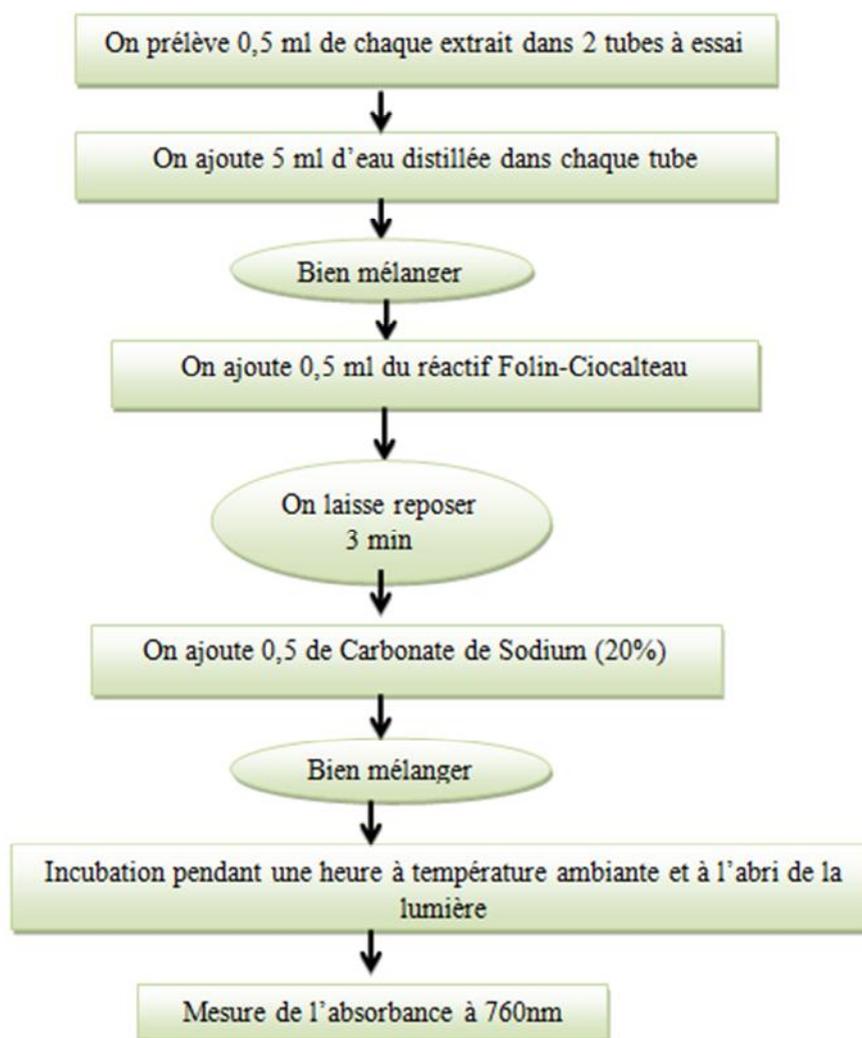
**Figure 12** : Protocole d'extraction des polyphénols

### 2.4. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits est réalisé selon la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par Juntachote *et al* (2006)

Les différentes étapes de dosage sont résumées dans le diagramme de la Figure 13.

La teneur en polyphénols est calculée à partir de l'équation de régression établie avec l'acide gallique (gamme d'étalonnage) (Voir Annexe N°4).



**Figure 13** : protocole du dosage des polyphénols totaux (Juntachote *et al.* 2006)

### 2.5. Dosage des flavonoïdes

#### *Principe*

La teneur en flavonoïdes des 2 extraits est estimée par la méthode décrite par Bahorun *et al.* (1996). Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle libre en position susceptible de donner, en présence de chlorure d'aluminium, un complexe jaunâtre par chélation de l'ion  $Al^{+3}$ . La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présents dans l'extrait (Basli *et al.*, 2012).

#### *Mode opératoire*

Un millilitre de la solution  $AlCl_3$  (2%) est ajouté à 1 ml de la solution de l'échantillon ou standard (préparé dans le méthanol) contenant différentes concentrations. Le mélange est laissé réagir pendant 10 min puis la lecture est faite à 430 nm.

## Chapitre 2 : Matériels et méthodes

La concentration des flavonoïdes dans les extraits étudiés est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0-14 µg/ml) et exprimée en microgramme d'équivalent de quercitrine par milligramme MS (µg EQ/mg MS).

### 2.6. Identification des flavonoïdes par HPLC couplée à un détecteur UV –Visible

#### 2.6.1. Préparation de l'échantillon

On fait dissoudre 0,5 g de BHT dans 500 ml du méthanol, on prélève 20 ml de cette solution puis on additionne 0,5g de poudre d'*Anacyclus clavatus*, on ajoute 10 ml de HCl (1M) ensuite on agite pendant 15 min, après on porte le mélange à l'incubation dans un bain marie pendant 2 h à 90 °C (Benahmed djilali, 2016).

Après incubation, on filtre le mélange à travers un microfiltre de 0,45 ou 0,22 µm. L'échantillon filtré est conservé dans un Vial d'HPLC teinté à une température de 2°C avant son injection dans l'appareil d'HPLC (Figure 18).

Le tableau ci-dessous présente le gradient d'élution adopté pour ce type d'analyse.

**Tableau 1** : Vitesse et gradients d'élution (%)

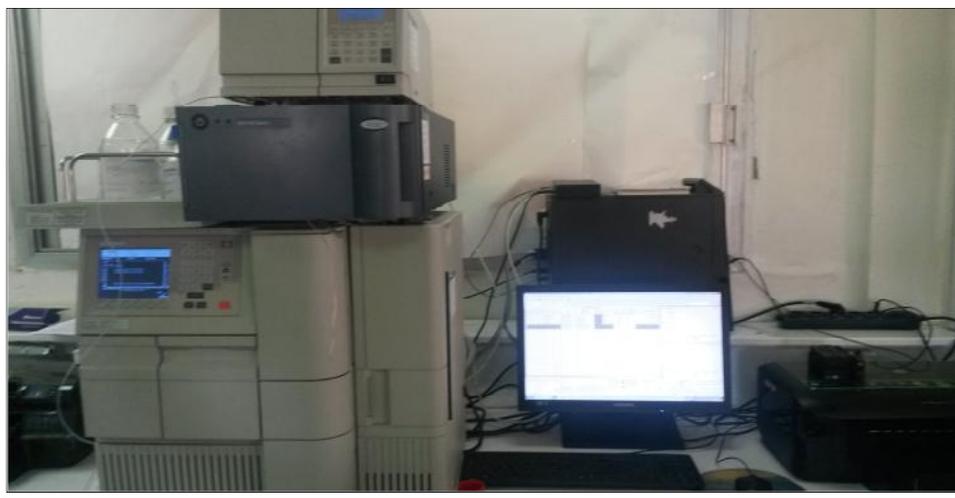
| Phase A | Phase B | Temps d'élution (min) |
|---------|---------|-----------------------|
| 15      | 85      | 0 -12                 |
| 40      | 60      | 12 -14                |
| 60      | 40      | 14 -18                |
| 80      | 20      | 18 -20                |
| 90      | 10      | 20 -24                |
| 100     | 0       | 24 -28                |

Phase A : Acétonitrile pure

Phase B ; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,2%)

#### 2.6.2. Préparation des Standards (étalons)

Trois étalons de flavonoïdes (Quercétine, Catéchine et Acide hydroxybenzoïques) ont été analysés. Ces étalons sont préparés dans l'éthanol à raison (50 mg de chaque étalon dans 10 ml d'éthanol) ensuite on agite pendant 15 min. Les solutions ainsi obtenues sont filtrées à travers un microfiltre de 0,45 ou 0,22 µm.



**Figure 14** : Appareil de la Chromatographie liquide haute performance (WATERS 270944)

### 2.7. Analyse de profil d'acide gras

#### 2.7.1. Extraction de la matière grasse

➤ *Principe*

L'extraction de la matière grasse totale est effectuée par un solvant organique (Hexane). Le taux de cette matière grasse brute est déterminé par pesage d'huile obtenue après évaporation du solvant organique.

➤ *Mode opératoire* (Iso659 octobre1998)

- Placer la cartouche contenant la prise d'essai (27g de la poudre de la plante) dans le Soxlet;
- Verser dans le ballon la quantité nécessaire 400ml de solvant (Hexane).
- Adapter le ballon au Soxlet et mettre le tout sur un chauffe ballon.
- Après une extraction d'une durée de 1h, éteindre l'appareil (Figure 19) et laisser refroidir.
- Eliminer le solvant par évaporation dans un rotavapeur et peser le ballon contenant le résidu huileux.



**Figure 15** : Montage de l'extraction de la matière grasse par soxlet

### 2.7.2. Chromatographie phase gazeuse (CPG)

Avant d'injecter notre échantillon dans l'appareil de CPG (Figure 20), nous avons réalisé une méthylation de notre matière grasse selon la méthode éthero-chlorhydrique.

#### *Mode opératoire*

Mettre 0,2 g de matière grasse extraite précédemment dans des tubes à sceller, ajouter 0,5 ml de méthanol et 0,5 ml d'acide sulfurique, sceller les tubes, les porter à 140C° dans une étuve à sec pendant 2 heures.

L'injection dans l'appareil de CPG a été réalisée en respectant les conditions citées dans tableau ci-dessous.

**Tableau 2 : Conditions opératoires de la CPG**

|                    |                       |
|--------------------|-----------------------|
| Chromatographe     | Chrompack CP 9002     |
| Détecteur          | FID (250°C)           |
| Injecteur          | SPILT 1/100(250°C)    |
| Gaz vecteur        | Azote                 |
| Colonne Capillaire | DB23 (50%Cyanopropyl) |
| Longueur           | 30m                   |
| Diamètre intérieur | 0,32mm*0,25 UM        |
| Epaisseur          | 0,25µm                |
| Températures       |                       |
| Injecteur          | 250°C                 |
| Détecteur          | 250°C                 |

## Chapitre 2 : Matériels et méthodes

|                   |                                |
|-------------------|--------------------------------|
| Four              | 150°C-----3°C /mn 240C° (10mn) |
| Quantité injectée | 01 UL                          |
| Vitesse du papier | 0,5 cm/mn                      |



**Figure 16** : Appareil de la Chromatographie phase gazeuse (CHROMPACK CP 9002)

### 2.8. Analyses rhéologiques de la poudre obtenue

#### 2.8.1 Analyse granulométrique

La granulométrie correspond à la distribution de taille des particules. En dessous d'une taille critique, les particules subissent entre elles des forces attractives et répulsives.

Ces particules ont tendance à s'agglomérer ou à adhérer à la surface qui les supporte lorsque l'attraction est supérieure à la répulsion.

Les techniques d'analyses granulométriques sont multiples : séparation mécanique ou par l'intermédiaire d'un gaz, variation de résistance électrique d'un milieu liquide, diffraction laser, centrifugation ....

L'analyse de la granulométrie de notre poudre a été réalisée à l'aide de granulomètre de diffraction par laser (Figure 17) afin d'identifier la taille et la répartition des particules.



**Figure 17 :** Appareil de granulométrie de diffraction par laser

### 2.8.2. Indice de gonflement

#### *Principe*

L'indice de gonflement est le volume, en millilitres, qu'occupe 1g de drogue gonflée dans l'eau, y compris le mucilage qui y adhère. Ce paramètre confirme la présence de polysaccharides (mucilages, gommés) dans la drogue végétale.

#### *Mode opératoire*

Dans une éprouvette graduée à bouchon rodé, de 20 cm de hauteur sur 20 mm de diamètre, introduire 1g de la poudre. Humecter la poudre avec 1ml d'alcool et ajouter 25 ml d'eau. Agiter énergiquement toutes les 10 min pendant 1 h. Laisser reposer pendant 3h. Mesurer le volume occupé par la poudre. Effectuer 3 essais simultanément.

L'indice de gonflement est donné par la moyenne des 3 essais.

Les plantes à mucilages possèdent un indice de gonflement supérieur ou égal à 10.

### 2.9. Elaboration des comprimés à base *d'anacyclus clavatus*

Les comprimés sont obtenus par une compression directe (Figure 18) de la poudre *d'anacyclus clavatus* prètamisée à l'aide d'un tamis de 500µm. La compression est faite manuellement avec une force de 200 KN.

Les comprimés ainsi obtenus présentent des résistances mécaniques suffisantes pour pouvoir être manipulés sans s'effriter, ni se briser. :



Figure 18 : Appareil de la pastilleuse (HERAZOG)

#### 2.9.1. Analyses galéniques des comprimés

Certaines propriétés physiques et galéniques des comprimés élaborés ont été déterminées citant : poids moyen de 20 comprimés, l'épaisseur, la dureté et la friabilité, l'humidité) y compris l'étude in vitro (Taux de gonflement et d'érosion et test de dissolution) a été effectuée dans les trois solutions (eau distillée, HCl 0,1N et la solution phosphatée saline tamponnée à pH 6,8) selon la Pharmacopée Européenne 2014 (PE, 2014).

##### 2.9.1.1. La friabilité (perte en masse des comprimés)

Elle est déterminée au moyen d'un Friabilimètre (Figure 19).

On fait tourner 10 comprimés à une vitesse de 25 r.p.m pendant 4mn puis on répète encore une autre fois la pesée.

La friabilité (taux d'effritement <1%) est exprimée par l'équation (18) :

$$F(\%) = (P_0 - P_1) / P_0 \cdot 100 \dots \dots \dots (4)$$

F : La friabilité (perte en masse en %).

## Chapitre 2 : Matériels et méthodes

---

$P_0$  : Poids initial des comprimés (g).

$P_1$  : Poids final des comprimés (g).

En règle générale, l'essai est effectué sans répétition.



**Figure 19** : Photo d'un Friabilimètre de type (ERWEKA TA 40).

### *2.9.1.2. L'humidité des comprimés*

Ce test consiste à déterminer le poids sec du comprimé en séchant à 105°C pendant 05mn.

L'humidité a été déterminée en utilisant un dessiccateur de type Sartorius MA 45 (Figure 20).



**Figure 20** : Appareil Dessiccateur (Sartorius MA 45)

### **2.9.1.3. Taux de gonflement**

Sachant que les comprimés une fois consommés pénètrent dans le tube digestif où l'estomac et ils vont subir un processus spontané d'absorption par les macromolécules telles que (protéines, cellulose...) s'accompagnant d'une importante augmentation du volume.

Dans le but de montrer le comportement rhéologique des constituants de nos comprimé au niveau de l'estomac trois milieux similaires aux liquides gastriques : l'eau distillée, solution HCl (0,1N) et la solution phosphatée saline pH 6,8 ont été proposés.

Pour réaliser ce test, les comprimés ont été pesés avec précision puis placés dans des bécher contenant 100 ml de chaque solution ;

Après 5, 10, 20 mn d'incubation à température ambiante, chaque comprimé a été retiré du milieu et légèrement épongé avec le papier absorbant pour enlever l'excès du liquide puis repesé ( $W_1$ ).

La prise d'eau par les comprimés a été déterminée par la méthode de gain de poids à l'équilibre en utilisant l'expression suivante :

$$\text{Changement de poids (\%)} = (W_1 - W_0) / W_0 * 100 \dots\dots\dots(5)$$

$W_0$ : Poids initial du comprimé (g).

$W_1$ : Poids final du comprimé (g).

### **2.9.1.4. Taux d'érosion**

L'essai d'érosion suit immédiatement le test de gonflement. Ce test consiste à déterminer le poids sec d'un comprimé humide en séchant à 80C° pendant 24 h. L'érosion des comprimés a été déterminée par l'expression suivante :

$$ER(\%) = (W_0 - W_1) / W_0 * 100 \dots\dots\dots (6)$$

$W_0$ : Poids du comprimé humide(g).

$W_1$ : Poids du comprimé après dessiccation (g).

### **2.9.1.5. Test de dissolution (Cinétique de libération de la chlorophylle)**

Le temps moyen de dissolution est déterminé sur six comprimés (PE, 2014; Sriamornsak *et al.* 2007). Ce test consiste à placer chaque comprimé dans 500 ml du liquide de dissolution dans l'appareil de dissolution SOTAX (Figure 21) muni des palettes fonctionnant à 50 r.p.m et la température du milieu est réglée à 37± 0,5 °C

## Chapitre 2 : Matériels et méthodes

En se basant sur la composition de notre plante, nous nous sommes intéressés à suivre la cinétique de libération de la chlorophylle étudiée ici comme substance active dans divers milieux liquides (eau distillée, HCl 0,1 N et la solution tampon de phosphate pH 6,8).

### *Dosage de la chlorophylle*

La chlorophylle est quantifiée à une longueur d'onde de 660nm et a 642,5nm (Ramash, 2000). La quantité de chlorophylle est déterminée en utilisant la relation suivante :

$$\text{Chlorophylle totale} = 7,12A_{660} - 16,8A_{642,5} \dots \dots \dots (7)$$



**Figure 21** : Appareillage de dissolution (SOTAX)

## **Chapitre 3 : Résultats et discussion**

## Chapitre 3 : Résultats et discussion

### 3 .Résultats et discussion

#### 3.1. Résultats des paramètres physico-chimiques

Les résultats de quelques paramètres physico-chimiques des parties aériennes (feuilles et tiges) fraîches d'*Anacyclus clavatus* sont résumés dans le tableau ci-dessous. Ils sont présentés sous forme de la moyenne de trois essais  $\pm$  l'écart-type (ET).

**Tableau 4 : Résultats des paramètres physico-chimiques des feuilles et des tiges fraîches D'*Anacyclus clavatus***

| Paramètres                          | Teneurs moyennes $\pm$ ET |
|-------------------------------------|---------------------------|
|                                     | Feuilles et Tige          |
| pH à T 20°C                         | 5,89 $\pm$ 0,028          |
| Humidité (%)                        | 87,03 $\pm$ 0,761         |
| Taux de cendres (%)                 | 14,22 $\pm$ 0,02          |
| Acidité (g Acide citrique /100g MS) | 0,44 $\pm$ 0,90           |

Il ressort de ce tableau que, les feuilles et les tiges d'*Anacyclus clavatus*, possède une humidité très élevée et un pH légèrement acide.

La teneur en eau trouvée renseigne sur le degré de conservation de cette matière végétale qu'est plus susceptible aux différentes altérations, raison pour laquelle, le séchage est préconisé dans notre cas, afin de sauvegarder ses qualités biochimiques et pharmacologiques initiales pendant une longue durée de conservation.

Nos résultats coïncident avec ceux trouvés par Kherbache, (2014), qui rapportent la valeur de 87,89% à l'humidité et de 5 pour le pH pour la même plante.

#### 3.2. Composition en minéraux des parties aériennes (feuilles et tiges) d'*Anacyclus clavatus*

**Tableau 5 : Compositions minérales**

| Minéraux         | Mn    | Cr | Ni  | Cd | Cu    | Fe         | Pb   | Zn         | Mg          | Na          | K |
|------------------|-------|----|-----|----|-------|------------|------|------------|-------------|-------------|---|
| Teneur en (g/Kg) | 354.1 | –  | 6.2 | –  | 105.2 | 5406.<br>5 | 64.9 | 507.8<br>5 | 15096.<br>3 | 52208.<br>0 | – |

## Chapitre 3 : Résultats et discussion

---

Les résultats de la composition chimique révèlent que, notre plante possède des teneurs élevées en Fe, Na et Mg. Ces éléments sont indispensables au fonctionnement de l'être humain surtout les gens qui souffrent de l'anémie et il joue des rôles différents comme pour le magnésium est présent dans presque toutes les cellules de l'organisme, où il participe entre autres à plus de 300 réactions enzymatiques. Au total, le corps contient environ 25 g de ce minéral : 60 % est stocké dans les os, dont il aide à maintenir la structure. Un quart est utilisé par les muscles, où il contribue à la décontraction musculaire. Le reste se répartit à la fois dans le cerveau et dans des organes-clés comme le cœur, le foie ou les reins : le magnésium sert à la transmission de l'influx nerveux, à la fabrication de protéines et à la régulation du rythme cardiaque. Autre vertu importante : il a un effet régulateur sur le transit intestinal... d'où son indication auprès des nourrissons souffrant de constipation passagère. Le fer aussi est indispensable pour le bon fonctionnement de Corps humaine car c'est un oligo-élément minéral qui entre dans la composition de l'hémoglobine des globules rouges, de la myoglobine des muscles, et de nombreuses réactions enzymatiques nécessaires à la respiration des cellules. Par contre, elle est pauvre en K. Entre autre, le Mn et le Cu se trouvent en quantités considérables

En effet la richesse en minéraux est attribuée aux conditions de culture (type de sol, eau)

De point de vue métaux lourds, la plante étudiée ne possède pas des métaux lourds tels que le Cr et le Cd qui sont extrêmement toxiques même à faibles concentrations, ces éléments causent de sérieux dommages telle que l'ostéoporose par ingestion (Nawro *et al* , 2006). Ces résultats sont similaires à ceux qu'ont été montrée par Kherbache, (2014) en analysant la même espèce de la région de Setif.

### 3.3. Résultats d'analyse phytochimique

L'analyse phytochimique des extraits de plantes est une étape préliminaire et d'une grande importance, puisqu'elle révèle la présence des constituants bioactives responsables des vertus thérapeutiques.

La mise en évidence des différentes classes des métabolites secondaires constituant la poudre des feuilles et des tiges d'*Anacyclus clavatus* a été faite selon les méthodes standards du screening phytochimique.

Les résultats de cette analyse sont portés dans le tableau suivant :

## Chapitre 3 : Résultats et discussion

**Tableau 6 : Résultats des tests phytochimique effectués sur les parties aériennes (feuilles et tiges) d'*Anacyclus clavatus***

| Métabolites secondaires          | Quantité |
|----------------------------------|----------|
| Alcaloïdes                       | ( + )    |
| Anthocyanes et leuco-anthocyanes | ( )      |
| Flavonoïdes                      | (+++)    |
| Glucosides                       | ( + )    |
| Senosides                        | ( )      |
| Tanins                           | (+++)    |
| Tanins gallique                  | (+++)    |
| Quinones libres et combinées     | ( )      |

(+++): Abondance ; (++) : moyenne ; (+) : faible ; ( ) : absence.

Ce tableau montre que la plante possède plusieurs composés à savoir :

- Les alcaloïdes : ils sont présents dans la plante mais à faible quantité.
- Les anthocyanes et les leuco-anthocyanes : l'infusé de la plante est dépourvue de ce type de métabolites ;
- Les flavonoïdes : ce type de métabolites secondaires est présent dans la plante avec des quantités considérables.
- Les glucosides : pour la recherche des composés réducteurs (Glucosides) la réaction à été positive (obtention de précipité rouge brique).
- Les Senosides : Absence de la mousse persistante reflète l'absence de ce type de métabolite.
- Les tanins et les tanins galliques : d'après la coloration obtenu avec  $Fe Cl_3$ , l'infusé de cette plante contient des tanins catéchiques et galliques.
- Les quinones libres et combinées : l'absence de couleur rouge violette indique que l'infusé est dépourvu de quinones.

Les résultats trouvés sont similaires avec ceux signalés par Selles, (2012) caractérisant l'espèce *Anacyclus pyrethrum* de même famille.

## Chapitre 3 : Résultats et discussion

### 3.4. Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes

Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits (aqueux et éthanoïques) de l'*Anacyclus clavatus* ont été déterminées par la méthodes. Les résultats trouvés sont présentés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 7 : Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits aqueux et éthanoïques d'*Anacyclus clavatus***

| <b>Extrait</b>            | <b>Polyphénols</b><br>( $\mu\text{g}$ d'équivalent d'acide gallique / mg MS) | <b>Flavonoïdes</b><br>( $\mu\text{g}$ d'équivalent de quercétine / mg MS) |
|---------------------------|--|---|
| <b>Extrait aqueux</b>     | 82,06 $\pm$ 2.78   | 16,56 $\pm$ 1,97  |
| <b>Extrait éthanoïque</b> | 127.88 $\pm$ 4.98  | 11.76 $\pm$ 1.14  |

Nous constatons d'après ce tableau qu'un taux important de polyphénols est observé dans l'extrait éthanoïque en comparaison avec l'extrait aqueux qui possède un taux plus au moins important.

Cependant, les taux de flavonoïdes trouvés dans les deux extraits analysés sont faibles.

Cette différence pourrait être expliquée d'une part par le type et la nature de ces composés à extraire et les conditions d'extraction d'autre part.

selon des travaux antérieurs, l'éthanol est choisi comme meilleure solvant d'extraction des polyphénols (Aliboudhar et al, 2013)

Nos résultats coïncident avec ceux de Aliboudhar (2013) qui a signalé une teneur de 131,30  $\pm$  6,88  $\mu\text{g}$  EAG/ mg de polyphénols estimée dans l'd'extrait éthanoïque contre 179, 06 $\pm$  3,24  $\mu\text{g}$  dans l'extrait EAG/ mg trouvée aqueux. De même a obtenu de valeurs faibles en flavonoïdes 16,39 $\pm$  1,38 et 9,96 $\pm$  0,43  $\mu\text{g}$  EAG/ mg respectivement ont été trouvées dans l'extrait aqueux et éthanoïque.

### 3.5. Identification des flavonoïdes (quercétine ; catéchine ; acide hydroxybenzoïques) par HPLC

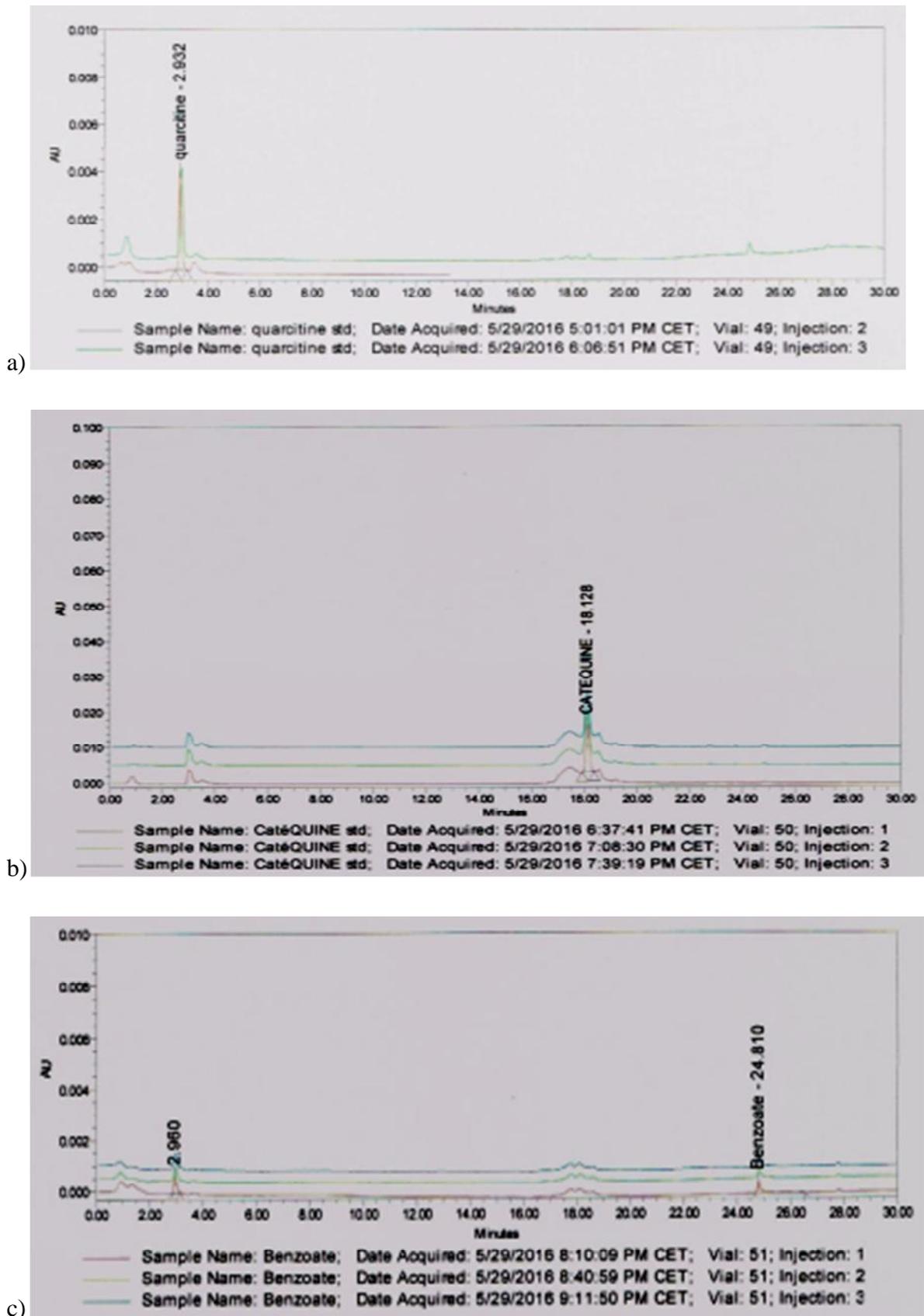
L'identification des flavonoïdes dans la poudre des parties aériennes (feuilles et tiges) de notre plante a été faites grâce à des standards (quercétine ; catéchine ; acide hydrox benzoïque) pour la comparaison.

## Chapitre 3 : Résultats et discussion

---

Les chromatogrammes d'HPLC des standards et l'extrait de notre sont représentés dans les figures 24 et 25.

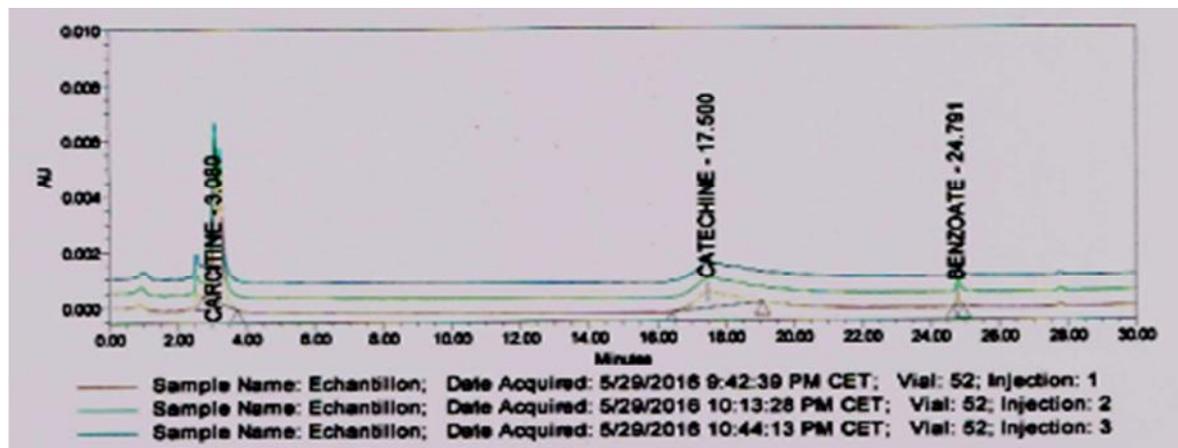
## Chapitre 3 : Résultats et discussion



**Figure 14** : Chromatogramme d'HPLC des standards

a) quercetine, b) : catéchine , c) :Acide hydroxybenzoïque

## Chapitre 3 : Résultats et discussion



**Figure 25 :** Chromatogramme d'HPLC de l'extrait de la poudre des feuilles et tiges d'*Anacyclus clavatus*

La comparaison des temps de rétention des standards avec ceux enregistrés dans l'extrait de notre plante sont marqués dans les deux tableaux 8 et 9.

**Tableau 8 : Temps de rétention des flavonoïdes standards**

| Les standards de flavonoïdes | Temps de rétention (min) | Quantité (g) |
|------------------------------|--------------------------|--------------|
| Quercétine                   | 2.59                     | 0.05         |
| Catéchine                    | 18.12                    | 0.05         |
| Acide hydroxy-benzoïque      | 24                       | 0.1          |

**Tableau 9 : Temps de rétention des flavonoïdes présents dans l'extrait *d'anacyclus clavatus***

| Les standards de flavonoïdes | Temps de rétention (min) | Quantité(g) |
|------------------------------|--------------------------|-------------|
| Quercétine                   | 3.08                     | 0.076       |
| Catéchine                    | 17.50                    | 0.14        |
| Acide hydrox benzoïque       | 24.50                    | 0.22        |

Il ressort des deux tableaux, que l'extrait d'*Anacyclus clavatus* possède les trois flavonoïdes analysés et nous remarquons que l'acide hydroxybenzoïque est le composé majoritaire avec une teneur de 0,22 g se trouvant dans 0,5 de MS de plante.

Il est à signaler que, les trois composés de flavonoïdes trouvés sont des composés aromatiques responsables de l'arôme de cette plante.

Différentes études ont montrés que la présence de ces flavonoïdes comme les catéchines, acides hydroxybenzoïques et Quercétine peut limiter certains dommages et retarder l'apparition de certaines maladies tel que : les maladies cardiovasculaires et les cancers

Nos résultats sont similaires à ceux de Talbi (2015) qu'a identifié les mêmes types de flavonoïdes d'une plante médicinale *Artemesiacampestris*.

Par manque d'étalons ;il serait intéressant de chercher d'autres composés en utilisant d'autres étalons.

### **3.6. Résultat du Profil d'acides gras de la poudre d'*Anacyclus clavatus***

Le profil d'acides gras des feuilles et tiges d'*Anacyclus clavatus* analysé par la chromatographie en phase gazeuse (CPG) est illustré sur figure 26.

Les pourcentages des composants identifiés sont récapitulés dans le tableau 10 et ce avec des références à l'appui.

# Chapitre 3 : Résultats et discussion

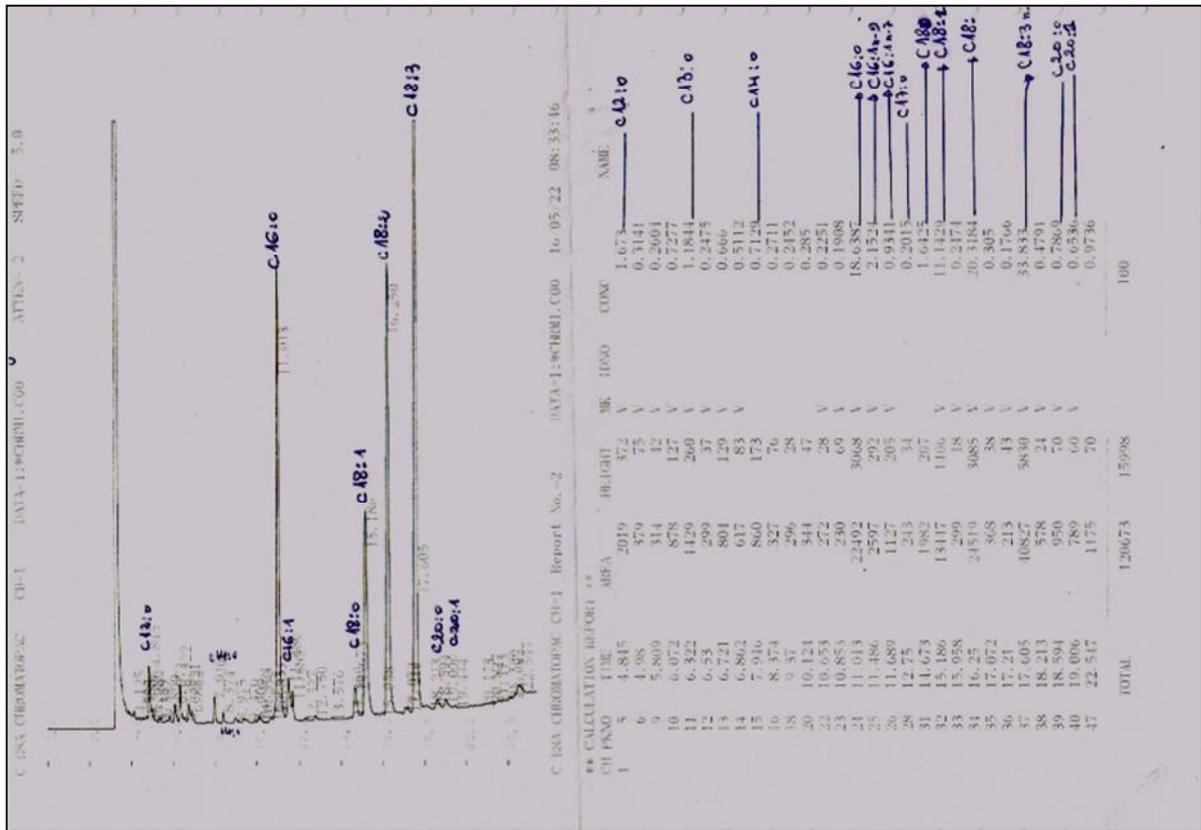


Figure 26 : Profil d'acides gras des parties aériennes (feuilles et tiges) d'*anacyclus clavatus*

## Chapitre 3 : Résultats et discussion

**Tableau 10 : teneur en % d'acides gras identifiés dans la plante**

| Nombre de carbone | Dénomination de l'acide gras     | Nomenclature physiologique | Teneur en % |
|-------------------|----------------------------------|----------------------------|-------------|
| 10                | A. Caprique                      | C10 :0                     | 1.80 %      |
| 12                | A.Laurique                       | C12 :0                     | 1.67 %      |
| 13                | A.Tridécanoïque                  | C13 :0                     | 1.18 %      |
| 14                | Acide myristique                 | C14/0                      | 0.71 %      |
| 16                | Acide palmitique                 | C16 :0                     | 18.63 %     |
| 16                | Acide hypogéique                 | C16 :1 9                   | 2.15 %      |
| 16                | A.Palmétoleïque                  | C16/1n-7                   | 0.93 %      |
| 17                | Acide margarique                 | C17 :0                     | 0.20 %      |
| 17                | Acide margaroléique <sup>4</sup> | C17 :1                     | 0.23 %      |
| 18                | Acide stéarique                  | C18 :0                     | 1.64 %      |
| 18                | Acide oléique                    | C18 :1                     | 11.14 %     |
| 18                | Acide linoléique                 | C18 :2 6                   | 20.31 %     |
| 18                | Acide linoléique                 | C18 :3 3                   | 33.83 %     |
| 20                | Acide arachidique                | C20 :0                     | 0.78 %      |
| 20                | Acide Gadoleïque                 | C20 :1                     | 0.65 %      |

Il ressort de ce tableau qu' 15 acides gras sont identifiés dans les parties aériennes (feuilles et tiges) d'*Anacyclus clavatus* : l'acide palmitique (18,63%), l'acide oléique (11,14%), l'acide linoléique (20,31%) et l'acide linoléique (33,83%).

D'après ces résultats on constate que, les teneurs en acide palmitique (18,63 %) et en acide linoléique (20,31%) sont comparables à la composition de l'huile d'olive qui représente les pourcentages suivants : 17,06% et 18,54% respectivement pour l'acide palmitique et pour l'acide linoléique.

Néanmoins, notre plante contient une forte teneur en Acide linoléique (33,83%) par rapport à l'huile d'olive (1,01%) (Aliboudhar *et al*, 2013). Sachant que cet acide est un acide essentiel non synthétisé par l'organisme humain.

## Chapitre 3 : Résultats et discussion

---

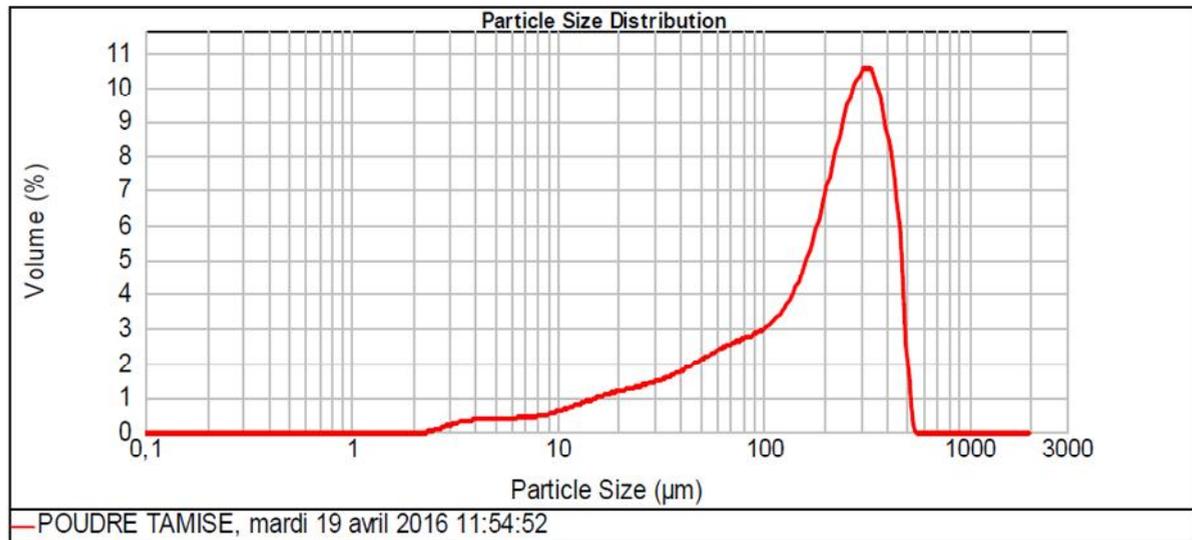
Nous pouvons déduire que la poudre étudiée possède une haute valeur biologique reste à exploiter dans les différents domaines d'application.

Ces acides gras agissent de manière complexe dans l'organisme. Les métabolites issus des oméga-6 sont pro-inflammatoires, pro thrombotiques et hypertenseurs tandis que ceux issus des oméga-3 ont globalement un effet inverse

### 3.7. Résultats des analyses rhéologiques de la poudre

#### 3.7.1 Résultat de la granulométrie

La figure 31 représente la distribution granulaire de la poudre réalisée par diffraction au laser. Nous remarquons que, la taille des particules est très variable pour notre poudre.



**Figure 3 :** Distribution de la taille des particules de la poudre

La poudre est composée de particules majoritaires de taille varie de 275 et 316 µm.

Cette granulométrie attribue à la poudre une propriété pharmacodynamique très intéressante de point de vue écoulement et même la possibilité de pastillage.

Nos résultats sont similaires à ceux trouvés par BENAHMED DJILALI *et al.* 2016 ; et BENAHMED DJILALI *et al.*, 2011) travaillant sur deux poudres de fruits (date sèche et le jujube).

#### 3.7.2. Résultat d'indice de gonflement

Les plantes à mucilages possèdent un indice de gonflement supérieur ou égal à 10 (Moyes, 1976).

Les résultats de ce test montrent que, la poudre de notre plante possède un indice de gonflement proche de 10. Ceci nous mène à déduire que notre plante contient de mucilages. Ces derniers sont de polysaccharides, qui gonflent au contact avec de l'eau générant une consistance visqueuse, parfois collante, semblable à la gélatine.

## Chapitre 3 : Résultats et discussion

Cette propriété est très intéressante dans l'opération de pastillage de notre poudre et qu'est possible sans ajouter des agents liants.

### 3.7.3. Caractérisation physique des comprimés

Les résultats de certains paramètres physiques (poids, diamètre épaisseur) des comprimés obtenus sont représentés dans le tableau 13. Ces paramètres sont déterminés sur 10 comprimés selon la Pharmacopée Européenne (PE, 2015).

**Tableau 11 : Paramètres physiques des comprimés**

| Comprimés   | Poids(g)     | Diamètre (mm) | Epaisseur (mm) |
|-------------|--------------|---------------|----------------|
| 1           | 8.523        | 40.59         | 7.93           |
| 2           | 8.782        | 40.55         | 8.05           |
| 3           | 8.583        | 40.57         | 8.20           |
| 4           | 8.307        | 40.60         | 7.84           |
| 5           | 8.335        | 40.57         | 7.89           |
| 6           | 8.739        | 40.62         | 8.02           |
| 7           | 8.650        | 40.52         | 8.15           |
| 8           | 8.336        | 40.55         | 8.07           |
| 9           | 8.306        | 40.59         | 8.25           |
| 10          | 8.405        | 40.56         | 8.03           |
| Moyenne ±ET | 8,050±0 ,596 | 40,572±0,028  | 8,043±0,43     |

Les 10 comprimés présentent un poids moyen de l'ordre 8g et un diamètre important de l'ordre 40,57mm des poids et d'épaisseur de l'ordre de 8mm.

Globalement, les 10 comprimés ont des dimensions presque identiques (taille uniforme), ce qui facilite la comparaison de leurs propriétés physiques.

En comparant la taille de nos comprimés (Figure 32), avec ceux des médicaments, on remarque qu'elle est importante et ce par faute de moyen, nos comprimés ont été élaborés par une pastilleuse de poinçon plus important.



**Figure 4 :** Aspect morphologique des comprimés élaborés à base d'*Anacyclus clavatus*

### 3.7.4. Les caractéristiques physico-chimiques des comprimés

Les résultats de quelques caractéristiques physico-chimiques des comprimés sont récapitulés dans le tableau

**Tableau 12 :** résultats des tests galéniques

| Propriétés   | Résultats   |
|--|-------------|
| Humidité (%)   | 7,610±0,373 |
| Friabilité (%)   | 0 ,607      |
| Temps de dissolution totale dans les trois solutions étudiées (mn) | 13          |

Il ressort de ce tableau que, les comprimés ont une humidité de l'ordre de 7,6% ; la valeur trouvée indique que nos comprimés ont absorbé l'humidité de l'air lors de stockage en comparant avec l'humidité initiale de la poudre de notre plante.

Nous constatons aussi que, les comprimés ont une friabilité est inférieure à 1. Ce résultat est conforme à la Pharmacopie Européenne (PE, 2015).

En effet, ce paramètre galénique nous renseigne sur l'aptitude des comprimés élaborés à supporter les chocs mécaniques lors de stockage et la conservation. La valeur obtenue pour les comprimés de la poudre d'*Anacyclus clavatus* représente un avantage en termes de compactage et du transport.

La valeur trouvée est proche à celles d'autres comprimés non alimentaires obtenus à partir d'extraits de *Rhinacanthus nasutus* contenant des ingrédients chimiques et celles des

## Chapitre 3 : Résultats et discussion

comprimés de paracétamol additionné de gomme et de gélatine en tant que substances liantes(0,64 -0,91%) (Rongsriyamet *al*,2006).

Le temps de dissolution totale des comprimés dans les trois solutions étudiées est de l'ordre de 13 min donc conforme aux exigences de la Pharmacopée Européenne (PE, 2015) qui préconise un seuil maximal de 15 min.

### 3.7.5. Cinétique de libération de principe actif

Le tableau ci-dessus présente les résultats de libération de la chlorophylle dans les trois solutions étudiées.

**Tableau 23 : Concentration de chlorophylle dans les trois milieux**

|                                      | Eau distillée  | HCl 0,1 N       | Solution phosphatée saline pH 6,8 |
|--------------------------------------|----------------|-----------------|-----------------------------------|
| Concentration en chlorophylle (mg/g) | 1,71<br>±0,082 | 0,374<br>±0,012 | 5,40<br>±0,097                    |

Les résultats obtenus indique qu'une meilleure libération de la chlorophylle comme principe actif est constatée dans la solution phosphatée saline pH 6,8 avec une teneur de 5,40mg/g suivi dans l'eau distillée 1,71mg /g et pour la solution d'HCl la valeur de 0,374mg/g et ce après le même temps de dissolution 13 min.

Alors, on préconise d'utiliser la solution phosphatée saline pH 6,8 comme solution standard pour le dosage de la chlorophylle dans des comprimés de mêmes compositions.

#### ➤ *Taux de gonflements des comprimés*

Ce test a été réalisé dans l'objectif de montrer le comportement rhéologique de la plante étudiée au niveau de l'estomac, pour cela trois milieux similaires au milieu gastrique ont été testés.

Les résultats obtenus montrent qu'un taux de gonflement très élevé de nos comprimés (prise de poids) est observé dans les deux solutions phosphatée saline (100%) et dans l'eau distillée (99,11%) et ce au bout de 20 mn (Figure 33).

En effet, le gonflement des comprimés se traduit par le phénomène d'absorption des composés constituant notre plante les deux solutions testées

## Chapitre 3 : Résultats et discussion

Selon les résultats d'analyse phytochimique, notre plante possède des mucilages et des tanins se sont des substances responsables de cette prise de poids.

Néanmoins la solution HCl favorise la désintégration des comprimés (libération des constituants de la plante dans ce milieu) avec un taux de gonflement est moins important (46%) (Figure 34).

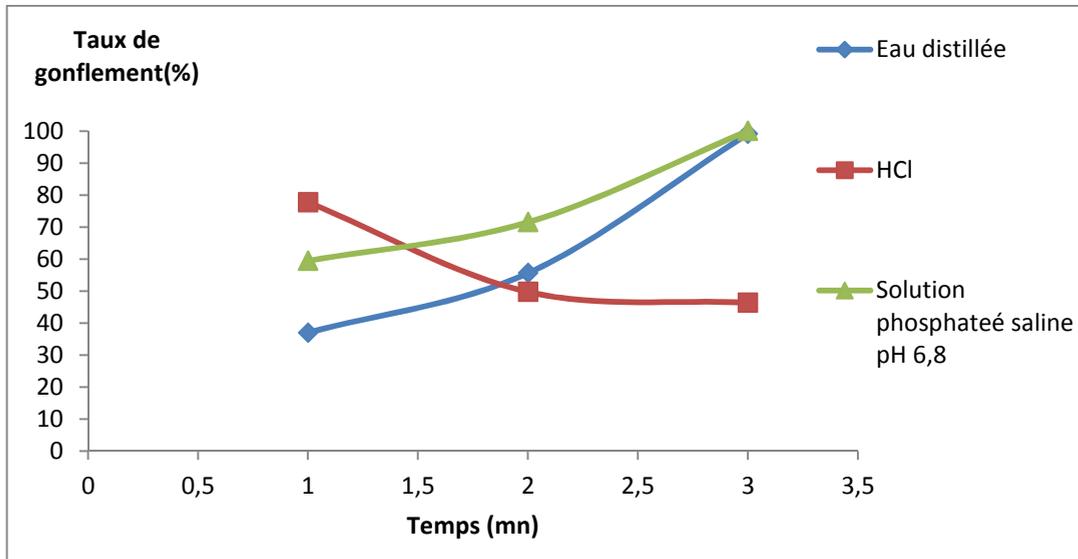
Nous pouvons déduire que la digestion des comprimés de notre plante sera meilleure dans le milieu gastrique (estomac) qui possède le même Ph que la solution HCl.



**Figure 5** : Aspect morphologique des comprimés en fonction du temps d'immersion dans les

## Chapitre 3 : Résultats et discussion

trois milieux (eau distillée ; HCl ; solution phosphatée saline pH 6,8)



**Figure 6 :** Taux de gonflement des comprimés dans l'eau distillée, la solution tampon phosphatée pH 6,8 et l'HCL 0,1N

La figure ci-dessous montre l'aspect des comprimés après séchage à 80°C pendant 10heures. D'après cette figure, nous constatons un taux d'érosion élevé des comprimés dans la solution HCl de l'ordre de (70%), contrairement dans les deux autres solutions ce taux est faible ne dépasse pas les 20%.



**Figure 7 :** Aspect morphologique des comprimés (phénomène d'érosion des comprimés) observés dans l'eau distillée, la solution tampon phosphatée pH 6,8 et l'HCl 0,1N)

## Chapitre 3 : Résultats et discussion

---

Les résultats trouvés coïncident avec ceux de BENAHMED DJILALI et *al.* (2011) qu'ont signalé un taux d'érosion élevé cas des comprimés à base de la poudre de dattes sèche *Mech-Degla* par contre un taux très faible a été constaté pour les comprimé de la poudre de spiruline qu'ont gonflés.

Nous pouvons conclure de cette partie que, la poudre de notre plante possède des propriétés très intéressantes de point de vue aptitudes technologiques (séchage, bon écoulement, compactage) et des propriétés galéniques (dissolution totale rapide avec libération des principes actifs). On préconise d'utiliser cette poudre soit comme principe actif à effet thérapeutique (propriété anti-inflammatoire) soit comme excipient (agent liant) en utilisant ses composés de mucilages par exemple.

### Conclusion :

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Une étude des propriétés physico-chimique et pharmacologique a concerné une plante appartient à la famille des Asteraceae, employée en Algérie grâce à ses propriétés thérapeutiques.

Cette étude confirme globalement la possibilité d'utilisation de la poudre d'*Anacyclus clavatus* comme comprimés pharmaceutiques.

La caractérisation physico-chimique de la poudre d'*Anacyclus clavatus* nous a permis de connaître quelques propriétés physico-chimique tel que le pH légèrement acide ( $5.89 \pm 0.028$ ), sa richesse en eau ( $87.03 \pm 0.761$ ) et en minéraux sodium et magnésium (Mg=1.509 mg/g) et (Na=5.220 mg/g), et une teneur importante en acides gras : l'acide palmitique (18,63%), l'acide oléique (11,14%), l'acide linoléique (20,31%) et l'acide linoléique (33,83%).

Un screening phytochimique a permis l'identification des composés majoritaires de type flavonoïdes et Tanins.

Une méthode de dosage des polyphénols totaux a été effectuée en utilisant le Folin-ciocalteu ainsi que le Carbonate de Sodium comme milieu réactionnel. Ceci nous a permis de faire une estimation de la teneur en polyphénols contenue dans les différentes parties de la plante étudiée. En effet, les teneurs moyennes en polyphénols totaux des feuilles et tiges d'*Anacyclus clavatus* se situent entre  $82,06 \pm 2.78 \mu\text{g EAG/ mg}$  d'extrait Aqueux et  $127.88 \pm 4.98 \mu\text{g EAG/ mg}$  d'extrait éthanolique au moment où celle des flavonoïdes est comprise entre  $16,56 \pm 1,97$  pour l'extrait aqueux et  $11.76 \pm 1.14 \mu\text{g}$  d'équivalent de quercétine / mg d'extrait.

En effet les résultats les résultats de l'analyse qualitative et quantitative obtenus à l'aide de l'application conjointe des techniques chromatographiques ; Méthode spectroscopique et HPLC révèlent que l'extrait chlorhydrique étudié est riche en composés phénoliques : contient de la quercétine, acide hydroxybenzoïque, et catéchine.

A noter que les paramètres pharmaco-techniques des comprimés obtenus à partir de la poudre *Anacyclus clavatus* (Friabilité  $<1$  ; temps de désintégration 13 mn) sont conformes à la pharmacopée européenne. (PH.2010).

En perspective nous envisageons à :

- ✓ Un test microbiologique et étude de l'activité antibactérienne ;
- ✓ Isolement des substances actives ;
- ✓ Tester quelques activités biologiques (anti-tumorale, anti-inflammatoire, anti-hypertensive...).

### Références Bibliographiques :

**Abedini A., 2013.** Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit, (Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes. Thèse de Doctorat, Université de Lille Nord de France. 177 p.

**Aliboudhar H, Tigrine-Kordjani N, Hanifi N0. Et Meklati B., 2013.** Volatiles profiling and antioxidant activity evaluation of different parts of a medicinal plant: *Anacyclus Clavatus*. *J Herbs Spices Med Plants*, 19, 33-47.

Amaral J.S, Seabra.M., Andrade P.B, Valentao P. Et Pereira J.A., **2008.** Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia L.*) leaves. *Bio.Mol.*, 13, 1321-1332.

**Belkheiri N., 2010.** Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse. 143 p.

**Benabdelkader T., 2012.** Biodiversité, bioactivité et biosynthèse de composés terpéniques volatiles des lavandes ailées, *Lavandula stoechas Sensu Lato*, un complexe d'espèces Méditerranéennes d'intérêt pharmacologique. Thèse de Doctorat, ENS Kouba en Algérie et Université Jean-Monnet de Saint-Etienne. France. 204p.

**Benahmed Djilali A, Nabiev M, Gelicus A, Benamara S, Et Allaf., 2016.** Evaluation of physical, pharmacodynamic and pharmacological attributes of hot air dried and swell dried jujube powders

**Benahmed Djilali., 2012.** Analyse des aptitudes technologiques de poudre de dates (*Phoenix-dactylifera.l*) améliorées par la spiruline. Etude des propriétés rhéologiques, nutritionnelles et antibactériennes. Thèse de Doctorat, Université de Boumerdes. 188p.

**Benitez G, Gonzalez-Tejero Mr. Et Molero-Mesa J., 2010.** Pharmaceutical ethnobotany in the western part of Granada province (southern Spain): Ethnopharmacological synthesis. *J Ethnopharma*. 129, 87–105.

**Boubekri C., 2014.** Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de Doctorat, Université Mohamed Khider en Biskra. Algérie. 158 p.

**BERUBE-GAGNON J., 2006.** Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Mémoire de l'université de Québec. 38p.

**Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. mdicales internationales Editions Technique & Documentation, Cachan, [S.I.], p. 647-673.

**Caearolli L, Zanatta L, Alberton EH, Figuerido M. et FOLADOR P., 2008.** Flavonoïdes prospective drug. *Mini rev.med. Chem*. 8,1429-1440.

**Dacosta E., 2003.** Les phytonutriments bioactifs. Edition Yves Dacosta. Paris. P 317.

**Djahra A.B., 2014.** Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L. Thèse de doctorat en Biologie Végétale à l'Université Badji Mokhtar d'Annaba, Algérie. 74 p.

**Floss H. G., 1997.** Natural products derived from un usual variants of the shikimate pathway. *Natural Product Reports*. Volume 14: 433-434.

**European Pharmacopoeia, 8th edition, 2015.**

**Ghedira K., 2005.** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie*. Volume 3(4) : 162 – 169.

**Ghasemzadeh A. et Ghasemzadeh N., 2011.** Flavonoids and phenolicacids : Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*. Volume 5(31) : 6697 – 6703.

**Guignard J.L., 1996.** Abrégé de biochimie végétale, Ed. Masson, Paris, 160 p.

**Hadj salem J., 2009.** Extraction, identification caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivées acyles de ces molécules par voie enzymatiques. Thèse de Doctorat en procédés Biotechnologiques et Alimentaires à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires de Lorraine, France. 217 p.

**Hale AF., 2003.** Screening potato genotypes for antioxidant activity, identification of the responsible compounds, and differentiating russet norkotah strains using AFLP and microsatellite marker analysis. office of graduate studies of texas A M university. Genetics, 260

**Hoffmann L., 2003.** Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinatéhydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Thèse de Doctorat : Université de Louis Pasteur – Strasbourg I, France.

**Hoffmann L., Besseau S., Geoffroy P., Ritzenthaler C., Meyer D., Lapierre C., Pollet B. et Legrand M., 2004.** Silencing of hydroxycinnamoyl coenzyme A shikimate / quinatehydroxycinnamoyl transferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant cell*. Volume 16 (6) : 1446 – 1465.

**Khireddine H., 2013.** Comprimés de poudre de dates comme support universel des principes actifs de quelques plantes. Thèse de Magister, Université de Boumerdes . 140p.

**Hammami S, Ben Salem A, Mastouri M, Falconieri D, Gorcii M, M'henni1 MF, Marongiu B. et Mighri Z., 2013.** Essential oil composition and antimicrobial activities of aerial parts from Tunisian *Anacyclus Clavatus*. *J. Med. Plants Res*, 7, 71-75.

**Macheix JJ, Fleuriet A and Jay-Allemand C. 2005** Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 2005, p. 4-5.

## Références bibliographiques

---

- Juntachote , T., Berghofer, e., Siebenhandl, S., Bauer, F., (2006).** The antioxidative properties of Holy basil and Galangal in cooked ground pork. *Meat. Sc*, Vol 72,pp 446-456.
- Julien A., 1894.** Flore de la région de Constantine. Eds, Imprimerie Louis Marl (Constantine).
- Lee BH, Annis PC, Tumaalii F. et WS Choi., 2004.** Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1,8-cineole against 3 major storedgrain insects. *J Stored Prod Res.* 40, 553-564.
- Mahmoudi S., Khali M. et Mahmoudi N., 2013.** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Revue Nature & Technologie. B- Sciences Agronomiques et Biologiques.* Volume 09 : 35 – 40
- Moyes H., 1976.** Précis de matière médicale Tome 1, édition Masson, Paris. 553p.
- Muanda F.N., 2010.** Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de Doctorat, Université Paul Verlaine-Metz, France. 216 p.
- Nkhili E., 2009.** Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de doctorat en Sciences des Aliments à l'Université d'Avignon et des pays de Vaucluse, France. 318 p.
- Harrar A., 2012.** Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. Mémoire de Magistère en Biochimie et physiologie expérimentale à l'Université Ferhat Abbas de Sétif, Algérie. 58 p.
- Hopkins W.G., 2003.** Physiologie végétale. Edition De Boeck Supérieur. P 280.
- Jean-Denis J. B., 2005.** Caractérisation de polyphénols stilbéniques et de dérivés induits ou constitutifs de la vigne impliqués dans sa défense contre l'agent pathogène du mildiou de la vigne, *Plasmopara viticola* (Berk. and Curt.). Thèse de Doctorat : Université de Neuchâtel, France.
- Omar SH., 2010.** Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. *Science and Pharmacology.* Volume 78 (2) : 133–154.
- Pardo de Santayana M. et Morales R., 2010.** Ethnobotany in the new Europe: People, health and wild plant resources. Eds Berghahn Press (Oxford UK), pp: 283-307.
- Parr A.J. et Bolwell GP., 2000.** Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenol content and profile. *The Journal of the Science of Food and Agriculture.* Volume 80 : 985–1012.
- Peterson J, Dwyer J, Adlercreutz H, Scalbert A, Jacques P. et McCullough ML., 2010.** Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutrition Reviews.* Volume 68 (10) : 571–603.

## Références bibliographiques

---

**Quezel P. et Santa S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales [New Flora of Algeria and Southern desert regions]. Editions du centre national de la recherche scientifique [Editions of the National Center of Scientific Research].

**Quyoun A., 2003.** Mise au point d'une base de données sur les plantes médicinales. Exemple d'utilisation pratique de cette base. Thèse de Doctorat Université Ibn Tofail Faculté des Sci. Kénitra, Maroc. 110 p.

**Rimbau V, Risco E, Canigual S. et Iglesias J., 1999.** Anti-inflammatory Activity of Some Extracts from Plants used in the Traditional Medicine of North-African Countries. *Phytother Res*, 13, 128-32.

**Sarni-Manchado P. et Cheynier V. 2006.** Les polyphénols en agroalimentaire. Edition Lavoisier. P 2–10.

**Scalbert A. et Williamson G., 2000.** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*. Volume 130 : 2073 – 2085.

**Selles C, Dib MA, Allali H. et Tabti B., 2012.** Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of solvent extracts of *Anacyclus pyrethrum* L., from Algeria. *Mediterr J Chem*, 2, 408-415.

**Sylvestre M, Pichette A, Longtin A, Nagau F. et Legault J., 2006.** Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *J Ethnopharma*. 103, 99-102.

**Talbi M., 2015.** Dosage des polyphénols de la plante d'*Artemisia campestris*. L par chromatographie HPLC. Mise en évidence de l'activité biologique. Mémoire de Magister de l'université d'Oran. 104p.

**Tapas A. R., Sakarkar D. M. et Kakde R.B., 2008.** Flavonoïdes as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. Volume 7 (3) : 1089 – 1099.

**Urquiaga I. et Leighton F., 2000.** Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biol. Res*. 2000; 33: 55-6

**Yao K., De Luca V. and Brisson N., 1995.** Creation of a Metabolic Sink for Tryptophan Alters the Phenylpropanoid Pathway and the Susceptibility of Potato to *Phytophthora infestans*. *Plant, Cell*. 1995; 7: 1787-1799.

**Yi-Qun Y, Xia D, Yi-Chang J, Chuan-Xin H, Yi-Zheng W. et Ying-Hui X., 2008.** Antitumor effect of  $\beta$ -elemene in glioblastoma cells depends on p38 MAPK activation. *Cancer Lett*. 264, 127-134.

**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 Doctorat, Université Mentouri, Constantine, Algérie. 83 p.