



*Louange à dieu qui, grâce à son aide et sa générosité, nous
a permis de réaliser ce travail*





Remerciements

Nous adressons nos sincères remerciements :

A Mme FERNANE Farida professeur à l'université mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou qui nous a fait l'honneur de diriger ce travail en nous faisant bénéficier de son expérience. Vos précieux conseils, bienveillance et professionnalisme forcent l'admiration. Veuillez accepter notre sincère reconnaissance.

A Dr. MAMOU Marzouk maître de conférence en chimie analytique, Pour sa disponibilité, sa générosité et pour les directives précieuses qu'il nous a prodiguées tout au long de ce travail. Nous vous remercions de nous avoir accordé l'accès au laboratoire de chimie analytique, nous ne pouvions espérer un meilleur accueil que celui qui nous a été octroyé. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

A Mme AYATI Fadila maître de conférences à l'université de mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, qui nous a fait l'honneur de présider notre jury et pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Hommage respectueux,

A Monsieur BENCHOUAK Mounir, maître-assistant à l'université mouloud Mammeri
Nous avons le privilège et l'honneur de vous avoir parmi les membres de notre jury. Nous tenons à vous remercier et à vous exprimer notre respect.

A Mme Belmahdi Lila maître-assistant à l'université mouloud Mammeri
Nous avons l'honneur de vous avoir parmi les membres de notre jury. Nous vous remercions et nous vous exprimons notre respect

A tous les résidents du laboratoire de chimie analytique pour leur accueil chaleureux, leurs conseils et leur aide. Nous remercions tout particulièrement Dr. BOURSOUTI, Dr ABDENOURI et Dr AKROUM, veuillez trouver, avec ce travail, un témoignage de toutes nos estimations.

A tous les membres du laboratoire de chimie pharmaceutique, pour leur gentillesse et disponibilité





Dédicaces

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... tous les mots ne sauraient exprimer ma gratitude, mon amour, ma reconnaissance. C'est, ainsi, que Je dédie ce mémoire

à...

À mes chers parents

Je ne saurais vous remercier pour tous vos sacrifices, votre présence et votre soutien inconditionnel durant toutes ces années. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir encouragée sans cesse sur cette voie qui aboutit ce jour. Que Dieu tout puissant vous garde toujours à mes côtés et vous procure santé, bonheur et longue vie pour que vous demeuriez le flambeau qui illumine mon chemin.

À mes chères sœurs

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon amour et mes pensées. Je vous remercie pour tout le soutien et les encouragements que vous m'avez apportés. Vous êtes ma source d'inspiration et ma motivation quotidienne.

Je remercie dieu de vous avoir toujours à mes côtés. Je vous souhaite plein de succès, joie, et prospérité dans la vie.

À mes cher(e)s ami(e)s

Je vous remercie pour tous vos encouragements. Je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie comblée de bonheur, santé et réussite. Une dédicace particulière à Sarah CHETTIR,

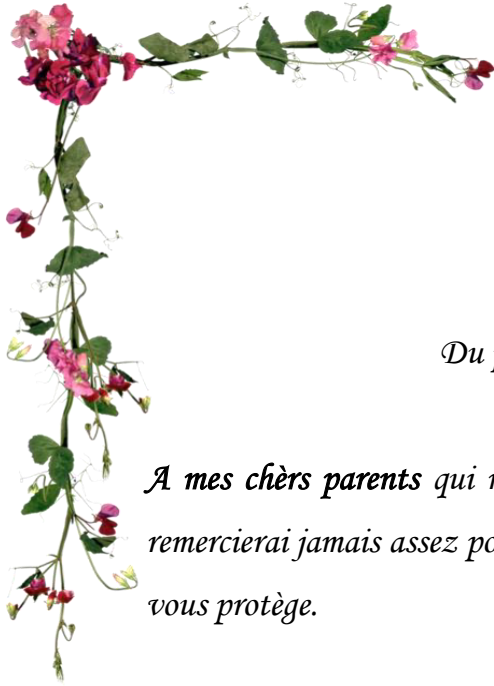
Dihia et Ghnima.

À ma binôme Katia

Ça a été un plaisir de travailler avec toi. Ça a été un réconfort de t'avoir à mes côtés à chaque étape qui nous séparait de notre projet. Merci...

Massika





Dédicaces

Du plus profond de mon cœur je dédie ce travail

A mes chers parents qui n'ont jamais cessé de me combler d'amour et de joie. Je ne vous remercierai jamais assez pour votre soutien et sacrifices tout au long de mes études. Que dieu vous protège.

A ma grande mère et mon oncle, je vous aime. Inchallah Dieu vous donnera la bonne santé et longue vie.

A mes chères sœurs : Sarah, Souad, Raniya et Nesrine, Thilli d'avoir été présentes toujours pour moi dans les moments les plus durs, je vous aime.

A mon fiancé Ali, qui a toujours fait de son mieux pour m'aider et qui a été là tout le long de mes études.

A Dihia, Ghnima et tous mes amis qui ont toujours étaient présents pour moi.

A ma chère binôme Massika et toute la famille BOUALEM et a tous ceux qui ont participés de près ou de loin à ce projet.

Katia



Sommaire

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale..... 1

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1- Généralités sur les plantes médicinales	3
1-1-Présentation de l'olivier.....	3
1-2-Présentation de l'eucalyptus	3
2- Généralités sur les composés poly phénolique	4
2-1-Composés phénoliques	4
2-2-Flavonoïdes.....	5
2-3- Tanins	6
2-4- Alcaloïdes	8
2-5- Terpénoïdes	8
3- Techniques de dosages et d'analyses	8
3-1-Chromatographie liquide à haute performance	8
3-2-Spectrophotométrie UV-visible.....	9
3-3-Spectroscopie moléculaire IR.....	9

Partie Expérimentale

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

1- Matériel végétal	10
2- Produits chimiques, matériel et verreries du laboratoire	10
3- Evaluation du taux d'humidité du matériel végétal.....	11
4- Tests phytochimiques	11
4-1-Identification des tanins.....	12
4-2-Identification des flavonoïdes.....	12
4-3-Identification des terpenoïdes	12
4-4-Identification des alcaloïdes	12
5- Extraction des polyphénols.....	12
5-1-Extraction des flavonoïdes	12
5-2-Extraction des tanins.....	13
6- Dosages spectrophotométriques des polyphénols	14

6-1- Dosage des polyphénols totaux	14
6-2- Dosage des flavonoïdes	14
7- Analyse des polyphénols par HPLC	15
8- Dosage des extraits secs des polyphénols par ATR	16

Chapitre 3 : Résultats et discussions

1- Taux d'humidité du matériel végétal.....	17
2- Tests phytochimiques	18
3- Rendements d'extraction en métabolites secondaire.....	19
4- Teneur en polyphénols totaux.....	23
5- Teneur en flavonoïdes	25
6- Résultats de l'analyse par HPLC	27
7- Résultats de l'analyse par spectroscopie IR	30
Conclusion générale	35

Références bibliographiques

Glossaire

Annexes

Résumé

Ce travail a porté sur l'étude quantitative et qualitative des polyphénols extraits des feuilles d'olivier de la famille des Oléacées et d'eucalyptus appartenant à la famille des Myrtaceae.

Afin d'évaluer le taux d'humidité des feuilles de nos plantes, nous avons réalisé un séchage à l'étuve lequel nous a permis d'éliminer une bonne proportion d'eau contenue dans ces feuilles.

La présence des métabolites secondaires dans les échantillons de feuilles de nos plantes a été conclue par des tests phytochimiques. Ces derniers sont basés sur l'incorporation de certains réactifs qui réagissent avec ces métabolites secondaires en donnant des précipités ou colorations spécifiques.

L'extraction des flavonoïdes et tanins a été conduite par macération dans des solvants polaire. Les extraits obtenus ont été dosés par colorimétrie en utilisant le réactif de Folin pour les polyphénols totaux et d' AlCl_3 pour les flavonoïdes.

Le dosage par HPLC mené à l'aide de réactifs standards (acides gallique, cinnamique, coumarique et caféique) a révélé la présence de certains de ces étalons dans la plupart de nos extraits. Toutefois, ce dosage révèle la présence de multitudes d'autres composés chimiques lesquels nécessitent d'être identifiés.

L'analyse par spectroscopie IR révèle des groupements fonctionnels caractéristiques qui démontrent la présence des phénols dans nos extraits.

Mots clés : Extraction, flavonoïdes, tanins, dosage HPLC, dosage UV-visible, analyse IR.

Abstract

This work focused on the quantitative and qualitative study of polyphenols extracted from olive leaves of the family Oleaceae and eucalyptus belonging to the Myrtaceae family.

In order to evaluate the moisture content of the leaves of our plants, we carried out drying in an oven which allowed us to eliminate a good proportion of water contained in those leaves.

The presence of secondary metabolites in the leaf samples of our plants was concluded by phytochemical tests. Those are based on the incorporation of certain reagents that react with these secondary metabolites giving specific precipitates or colorations.

Extraction of flavonoids and tannins was conducted by maceration in polar solvents. The extracts obtained were assayed by colorimetry using the Folin reagent for total polyphenols and AlCl_3 for flavonoids.

The HPLC assay using standard reagents (gallic, cinnamic, coumaric and caffeic acids) revealed the presence of some of these standards in most of our extracts. However, this assay revealed the presence of multitudes of other chemical compounds that need to be identified.

IR spectroscopy analysis revealed characteristic functional groups that demonstrate the presence of phenols in our extracts.

Key words: Extraction, flavonoids, tannins, HPLC assay, UV-visible assay, IR analysis.

Liste des abréviations :

AG : Acide Gallique.

AMTIR : matériaux amorphes transmettant les rayonnements IR

ATR : Réflexion Totale Atténuée.

CONV : Composés Organiques Non Volatile.

COV : Composés Organique Volatile.

EAG : Quantité équivalente en Acide Gallique.

ERT : Eucalyptus Région de Tigzirt.

ERB : Eucalyptus Région de Boghni.

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance.

RP-HPLC : Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse.

RT : Région de Tigzirt.

RB : Région de Boghni.

TCs : Tanins condensés.

THs : Tanins hydrolysables.

IR : Infrarouge.

ORT : Olivier Région de Tigzirt.

ORB : Olivier Région de Boghni.

Liste des tableaux

Tableau 01- Liste des produits chimiques.....	10
Tableau 02- Equipements utilisés et leur caractérisation.....	11
Tableau03- Concentration des solutions étalon d'acide gallique.....	14
Tableau 04- Concentration des solutions étalon de quercétine.....	15
Tableau 05- Résultat des tests phytochimiques effectués sur les extraits aqueux d'olivier et d'eucalyptus.....	19
Tableau 06- Quantité équivalente en acide gallique des extraits des différents solvants.....	24
Tableau 07- Concentration en flavonoïde en quantité équivalente en quercétine.....	27
Tableau 08- Valeurs du temps de rétention pour les quatre standards.....	28
Tableau 09- Comparaison des temps de rétention des différents chromatogrammes par rapport aux standards utilisés.....	29
Tableau 10- Informations sur le spectre IR des extraits des tanins obtenus des feuilles sèches d'eucalyptus récoltées à Tizirt.....	30
Tableau 11- Informations sur le spectre IR des extraits des tanins obtenus des feuilles sèches d'olivier récoltées à Tizirt.....	31
Tableau 12- Informations sur le spectre IR des extraits des tanins obtenus des feuilles sèches d'eucalyptus récoltées de Boghni.....	32
Tableau 13- Informations sur le spectre IR des extraits des flavonoïdes obtenus des feuilles sèches d'eucalyptus récoltées de Tizirt.....	33
Tableau 14- Informations sur le spectre IR des extraits des flavonoïdes obtenus des feuilles fraîches d'olivier lavées avec l'eau distillées et récoltées de Boghni.....	34

Liste des figures

Figure 01- Structure des phénols.....	4
Figure 02- Structure des trois familles d'isomères naturels des flavonoïdes.....	5
Figure 03- Exemples de tanins hydrolysables.....	7
Figures 04- Structures des tanins condensés.....	7
Figure 05- Teneur en eau des échantillons de feuille d'eucalyptus de Boghni (RB).....	17
Figure 06- Teneur en eau des échantillons des feuilles d'olive de Boghni (RB).....	17
Figure 07- Teneur en eau des échantillons des feuilles d'eucalyptus de Tigzirt (RT).....	17
Figure 08- Teneur en eau des échantillons d'olivier de Tigzirt (RT).....	17
Figure 9- Résultats du criblage phytochimique.....	18
Figure 10- Rendement des feuilles fraîches en tanins	20
Figure 11- Rendement des feuilles fraîches en flavonoïdes.....	20
Figure 12- Rendement des feuilles sèches en tanins.....	21
Figure 13- Rendement des feuilles sèches en flavonoïdes.....	21
Figure 14- Extrait des feuilles de plantes à partir des différents solvants extracteurs.....	24
Figure 15- Quantité équivalente en AG des extraits de RB et RT des différents solvants.....	25

Annexe 1

Figure 1-Variation de l'absorbance en fonction de la concentration en AG dans l'eau.

Figure 2 - Variation de l'absorbance en fonction de la concentration en AG dans l'Ethanol.

Figure 3 - Variation de l'absorbance en fonction de la concentration en quercétine.

Annexe 2

Figure 1 - Chromatogramme du mélange des quatre standards Acide Gallique, Acide Caféique, Acide Coumarique et Acide Cinnamique élués successivement.

Figure 2- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de flavonoïdes obtenus avec les feuilles fraîches d'eucalyptus non lavées avec l'eau distillée et récoltées à Boghni.

Figure 3- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de flavonoïdes obtenus avec les feuilles fraîches d'eucalyptus lavées avec l'eau distillée et récoltées à Boghni.

Figure 4– Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de flavonoïdes obtenus avec les feuilles fraîches d'eucalyptus lavées avec l'eau distillée récoltées de Tizirt.

Figure 5- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de flavonoïdes obtenus avec les feuilles fraîches d'eucalyptus non lavées avec l'eau distillée et récoltées de Tizirt.

Figure 6- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de flavonoïdes obtenus avec les feuilles fraîches d'olivier non lavées avec l'eau distillée et récoltées de Boghni.

Figure 7- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de flavonoïdes obtenus avec les feuilles fraîches d'olivier lavées avec l'eau distillée et récoltées à Boghni.

Figure 8- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de flavonoïdes obtenus avec les feuilles fraîches d'olivier non lavées avec l'eau distillée et récoltées à Tizirt.

Figure 9– Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de flavonoïdes obtenus avec les feuilles fraîches d'olivier lavées avec l'eau distillée et récoltées à Tizirt.

Figure 10– Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de tannins obtenus avec les feuilles fraîches d'eucalyptus non lavées avec l'eau distillée et récoltées à Boghni.

Figure 11- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de tannins obtenus avec les feuilles fraîches d'eucalyptus lavées avec l'eau distillée et récoltées à Boghni.

Figure 12- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de tannins obtenus avec les feuilles fraîches d'eucalyptus non lavées avec l'eau distillée et récoltées à Tizirt.

Figure 13- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de tannins obtenus avec les feuilles fraîches d'eucalyptus lavées avec l'eau distillée et récoltées à Tizirt.

Figure 14- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de tannins obtenus avec les feuilles fraîches d'olivier non lavées avec l'eau distillée et récoltées à Boghni.

Figure 15- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de tannins obtenus avec les feuilles fraîches d'olivier lavé avec l'eau distillée et récoltées à Boghni.

Figure 16- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de tannins obtenus avec les feuilles fraîches d'olivier non lavées avec l'eau distillée et récoltées à Tizirt.

Figure 17- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de tannins obtenus des feuilles fraîches d'olivier lavées avec l'eau distillée et récoltées à Tizirt.

Figure 18- chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de tannins obtenus avec les feuilles sèches d'eucalyptus et récoltées à Tizirt.

Figure 19- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de tannins obtenus des feuilles sèches d'eucalyptus récoltées à Boghni.

Figure 20- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de tannins obtenus des feuilles sèches d'olivier et récoltées à Boghni.

Figure 21- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de tannins obtenus des feuilles sèches d'olivier et récoltées à Tizirt.

Figure 22- Chromatogramme d'analyse HPLC des extraits de flavonoïdes obtenus des feuilles sèches et récoltés à Boghni.

Figure 23- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de flavonoïdes obtenus avec les feuilles sèches et récoltées à Boghni.

Figure 24: Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de flavonoïdes obtenus des feuilles sèches et récoltées à Tizirt.

Figure 25- Chromatogramme de l'analyse des extraits de flavonoïdes obtenus des feuilles sèches et récoltées à Tizirt.

Annexe 3

Figure 1- Spectre infrarouge des extraits des tannins obtenus des feuilles d'eucalyptus séchées.

Figure 2- Spectre infrarouge des extraits des tannins obtenus des feuilles d'olivier séchées et récoltées à Tizirt.

Figure 3 - Spectre infrarouge des extraits des tannins obtenus des feuilles d'eucalyptus séchées et récoltées à Boghni.

Figure 4 - Spectre infrarouge des extraits de flavonoïdes obtenus des feuilles d'eucalyptus sèches et récoltées à Tizirt.

Figure 5 - Spectre infrarouge des extraits de flavonoïdes obtenus des feuilles d'olivier lavé et récoltées à Boghni.

Introduction générale

Introduction générale

L'exploitation des plantes médicinales dans le domaine thérapeutique est connue à travers le monde depuis de nombreux siècles. En effet, la médecine traditionnelle s'est toujours basée sur les ressources naturelles, notamment les plantes médicinales, pour traiter beaucoup de maladies. Depuis, les plantes présentent des intérêts multiples mis à profit dans la biotechnologie tant dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique.

La valeur thérapeutique des plantes médicinales réside dans leur richesse en huiles essentielles, huiles végétales et métabolites secondaires. Ces derniers se retrouvent dans une large gamme de plantes qui sont un élément très utile pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques mais aussi comme matière première.

L'organisation mondiale de la santé n'a établi aucune définition précise pour les plantes médicinales. Cependant, elle définit les médicaments à base de plantes médicinales en les classant parmi les médecines et formes de médicaments traditionnelles. Par ailleurs, la pharmacopée française définit le médicament à base de plante comme une drogue dont au moins une partie possède des propriétés bénéfiques pour la santé. Pour une même plante, la concentration de ces molécules peut varier d'un organe à un autre.

Actuellement, les vertus thérapeutiques des plantes connaissent un regain d'intérêt grâce à une meilleure connaissance de la composition des plantes, au développement des méthodes extractives et aux progrès des techniques d'analyses physicochimiques afin de donner naissance à de nouveaux principes actifs.

La classification des métabolites secondaires est vaste. Nous distinguons entre autres les alcaloïdes, les terpénoïdes, les composés phénoliques, les hétérosides, les flavonoïdes et les tannins. Cependant les méthodes de dosages appropriées à ces composés s'avèrent de plus en plus délicates du fait de la complexité de leur composition chimique.

Notre présente étude s'articule sur le dosage par HPLC, UV et IR des polyphénols (tanins et flavonoïdes) extraits des feuilles d'olivier et Eucalyptus.

Ce présent mémoire comporte trois chapitres :

Le premier chapitre comporte une synthèse bibliographique abordant une présentation générale des deux plantes médicinales étudiées, l'olivier et l'Eucalyptus. Les principaux métabolites secondaires ainsi que leurs classifications, propriétés physiologiques et leur intérêt en pratique médicale sont définis.

Le choix de ces deux plantes, dans le cadre de notre étude, est dicté par le fait qu'elles sont largement utilisées en thérapie traditionnelle. Les parties prises en considération pour réaliser cette étude sont les feuilles.

Le deuxième chapitre consacré aux techniques expérimentales relatives aux extractions et dosages des polyphénols des deux plantes choisies. Ainsi le matériel mis en œuvre, les méthodes d'extractions et les protocoles de dosages qualitatifs et quantitatifs y sont détaillés.

Le troisième chapitre rassemble les principaux résultats obtenus relatifs aux rendements d'extraction et analyse qualitative et quantitative par HPLC, UV/visible et Infra rouge. D'éventuelles interprétations des différents résultats sont insérées dans ce chapitre.

Une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats et interprétations et les éventuelles perspectives sont présentés à la fin de ce manuscrit.



Chapitre 1

Synthèse bibliographique



1- Généralités sur les plantes médicinales

Les plantes médicinales regroupent toutes les plantes dont l'un de leurs organes contient une ou plusieurs substances chimiques qui sont destinées à produire une activité pharmacologique. Elles représentent la forme la plus ancienne et la plus répandue de la médication traditionnelle [1].

Actuellement grâce aux progrès scientifiques considérables enregistrés depuis la fin du XIXème siècle (techniques d'analyses et extractions...) les plantes médicinales constituent des ressources inestimables qui ont été utilisées pour trouver de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments [1].

1-1- Présentation de l'olivier

L'olivier est un arbre de la famille des oléacées dont la taille avoisine 10m de long. Il se reconnaît facilement par l'aspect tortueux de son tronc, ses feuilles de forme oblongues à ovales-lancéolées et par ses fleurs regroupées en petites inflorescences en forme de grappes dressées, naissant à l'aisselle des feuilles [2].

L'olivier du latin "Olea", son fruit était "Oliva" et le jus que l'on tirait "Oléum" est devenu "huile" après bien des transformations [3].

1-2- Présentation de l'Eucalyptus

L'eucalyptus appartient à la famille des Myrtaceae. Ce sont de grands arbres dont certains peuvent dépasser 100m de hauteur, mais la moyenne des espèces les plus courantes est de 40 à 50 m. Le tronc comprend une écorce à la base foncée et rugueuse et, en hauteur, lisse, gris cendre laissant s'exfolier son épiderme en longs lambeaux souples et odorants [3].

Les eucalyptus portent des feuilles persistantes, coriaces, glabres mais différentes en fonction de l'âge des rameaux. Les jeunes rameaux possèdent des feuilles larges, courtes, opposées, sessiles, ovales, bleu-blanc et cireuses, avec un vrai limbe nervuré. Les rameaux plus âgés possèdent des feuilles aromatiques, falciformes, longues de 12 à 30 cm, étroites, pointues, épaisses, vert foncé, courtement pétiolées, alternes et pendantes verticalement. Les fleurs naissent à l'aisselle des feuilles et sont de couleur blanc crème, en toupie surmontée d'une pseudo-corolle en forme de coiffe qui tombe lors de l'épanouissement, laissant apparaître un panache d'étamines [4].

2- Généralités sur les composés polys phénoliques

Tous les êtres vivants possèdent un métabolisme primaire qui fournit les molécules de base (acides nucléiques, lipides, protéines, acides aminés et glucides). Les plantes produisent, en plus, un grand nombre de composés qui ne sont pas issus directement lors de la photosynthèse, mais résultent des réactions chimiques ultérieures. Ces composés sont appelés métabolites secondaires [5].

Nous retrouvons ces métabolites secondaires dans des plantes dites plantes aromatiques. Ce sont des plantes dont la composition chimique est complexe, constituée de deux fractions [6] :

- La première fraction dite volatile (COV) est présente dans différents organes de la plante selon la famille. Elle est composée de métabolites secondaires qui constituent l'huile essentielle. Ces plantes aromatiques ont la particularité de renfermer au sein de leurs organes sécréteurs, des cellules génératrices de métabolites secondaires.
- La deuxième fraction dite non volatile (CONV), composée essentiellement de coumarines, flavonoïdes, polyphénols jouant un rôle fondamental dans l'activité biologique de la plante [6].

2-1- Composés phénoliques

Les composés phénoliques des végétaux correspondent à un ensemble étendu de molécules qui ont en commun un noyau benzénique portant un ou plusieurs hydroxyyles libres ou engagés dans une autre fonction (**figure 1**).

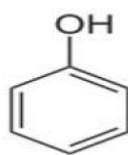


Figure 1- Structure du phénol [7].

Les composés phénoliques sont des molécules provenant du métabolisme secondaire et qui sont ubiquitaires du règne végétal. Ils interviennent dans différents aspects de la vie de la plante **[8]**:

- Dans la physiologie de la plante (lignification, interactions symbiotiques...).
- Dans les mécanismes de défenses (interactions biotiques et abiotiques) ou encore dans la coloration des fleurs [8].

Comme la plupart des métabolites secondaires, les polyphénols sont synthétisés par les plantes afin d'accomplir certaines fonctions. Ils sont généralement impliqués dans [9]:

- La croissance et la reproduction des plantes ;
- La défense contre les rayonnements ultraviolets ;
- La défense contre l'agression par les pathogènes, les parasites et les prédateurs ;
- La production des arômes et parfums et la contribution dans la pigmentation ;
- La protection des cultures contre la germination des graines avant la récolte [9].

Par ailleurs les polyphénols sont bénéfiques pour l'homme vis-à-vis de certaines maladies de par leur action sur le métabolisme humain [7].

De plus, ils sont des antioxydants qui agissent comme agents réducteurs et extincteurs d'oxygène singulet [10].

2-2- Flavonoïdes

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 [11].

La structure des flavonoïdes s'organise autour d'un squelette 1,3-di-phenylpropanoïde C₆-C₃-C₆, dans lequel deux cycles aromatiques C₆ (nommés A et B) sont reliés par l'intermédiaire d'un chaînon propanoïde C₃. Celui-ci est souvent engagé dans un lien éther avec un des cycles aromatiques C₆, conduisant à la formation d'un hétérocycle nommé C (Figure 2) [12].

Selon la position relative des deux cycles aromatiques C₆ sur le chaînon propanoïde, trois familles d'isomères naturels ont été définies : les flavonoïdes, les iso-flavonoïdes et les néo-flavonoïdes [13].

Les flavonoïdes comptent parmi les plus représentatifs des substances élaborées par les plantes à travers leurs métabolismes secondaires. Ces substances possèdent des propriétés colorantes, aromatique, médicinales et cosmétologiques et confèrent à la plante des avantages adaptatifs. De nombreux principes actifs sont bénéfiques pour l'homme et l'animal [14].

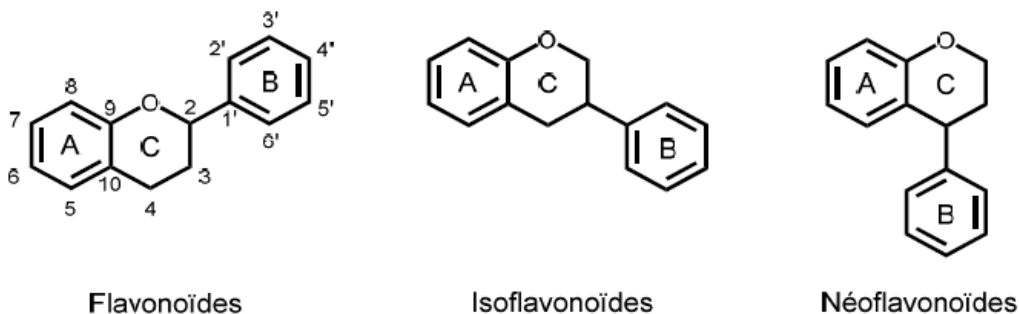


Figure 2 - Structure des trois familles d'isomères naturelles des flavonoïdes [12].

Les flavonoïdes jouent un rôle important dans la défense des plantes contre les agressions parasitaires ou abiotiques. De plus, ils permettent aux plantes de survivre sur les sols riches en métaux toxiques comme l'aluminium [14].

Par ailleurs, les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires, analgésiques, antifongiques et antibactériennes, mais également spasmolytiques permettant une relaxation des muscles lisses. De plus, ils jouent un rôle d'antioxydants en éliminant les espèces oxygénées, les radicaux hydroxyles et peroxydes et en réduisant la peroxydation des lipides [15].

D'autre part, les flavonoïdes peuvent agir sur le système vasculaire en limitant l'agrégation des plaquettes. Ils présentent aussi des propriétés anti tumorales par induction de l'apoptose et par l'inhibition à la fois de la multiplication des cellules carcinogènes et la prolifération des lymphocytes T [16].

2-3- Tanins

Les tannins sont des substances présentes essentiellement dans les écorces. Ce sont des polyphénols, solubles dans l'eau et insolubles dans les solvants organiques apolaires [17]. Ils forment, après coagulation, des composés très stables avec les protéines. Ils ont la propriété de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible [18].

Ils possèdent d'autres propriétés telles que l'aptitude à la précipitation des alcaloïdes, de la gélatine et d'autres protéines [19].

Selon la nature des assemblages moléculaires, les tanins sont subdivisés en deux groupes ; les tanins hydrolysables et les tanins condensés [20].

- **Tanins hydrolysables (Figure 3)** : Ce sont des esters de glucose et d'acide gallique. Ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par l'hydrolyse chimique et enzymatique. Ils libèrent alors une partie non phénolique (souvent du glucose) et une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique, soit un dimère de ce même acide qui est l'acide ellagique [21].

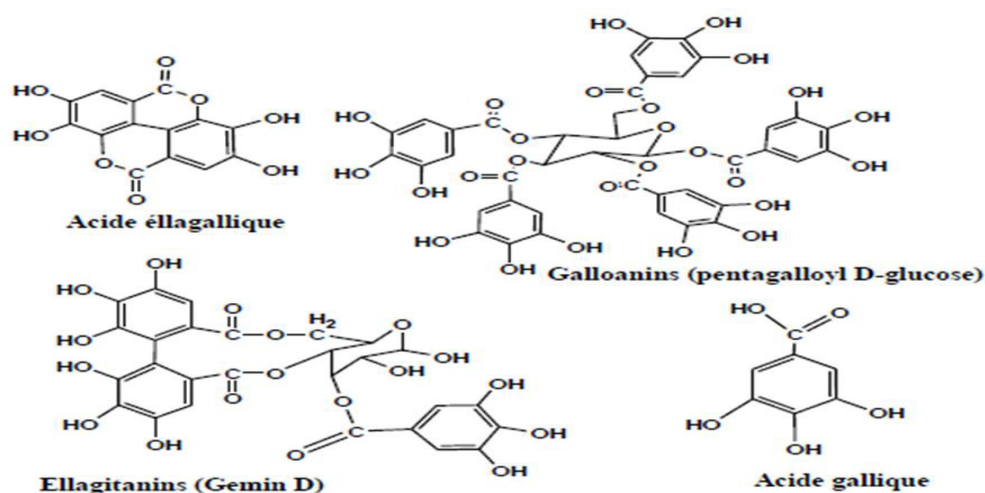


Figure 3- Exemples de tanins hydrolysables [22].

- **Tanins condensés** : Ce sont des oligomères ou des polymères de flavane-3 ol dérivés de la (+) catéchine ou de ses nombreux isomères (Figure 4).
- Ils ont la propriété de coaguler les protéines du derme, d'où leur utilisation dans le tannage des peaux [20].

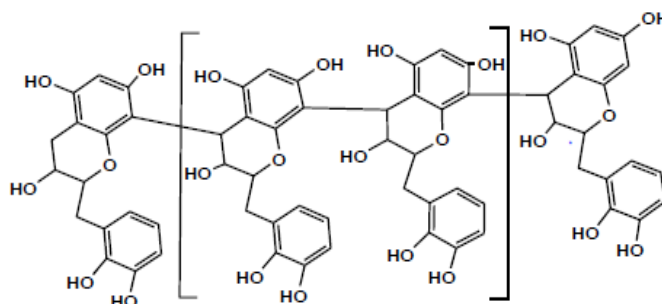


Figure 4- Structure des tanins condensés [22].

Les tannins sont majoritairement stockés dans les tissus épidermiques et sub-épidermiques, mais peuvent être aussi présents dans le péricarpe des fruits et des racines. Dans une même espèce végétale synthétisant les deux classes de tannins, il y a une distribution des tanins hydrolysables et des tanins condensés dans des organes différents de la plantes [23].

Au niveau des plantes, les tannins jouent un rôle de défense face aux agressions extérieures (insectes, mammifères herbivores...). La synthèse des tannins est l'un des mécanismes de défense des plantes contre les attaques des phytopathogènes [23].

Parmi les applications médicales des tanins nous pouvons citer [24, 25] :

- Les tanins possèdent un effet anti-diarrhéique,
- Sont vasoconstricteurs et limitent la perte en fluides de la peau,
- Possèdent un effet antiseptique,

- Sont antioxydants ;
- Possèdent des activités antibactériennes, antivirales et antifongiques.

2-4- Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances naturelles et organiques provenant essentiellement des plantes et qui contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique, avec un degré variable de caractère basique [26].

Les alcaloïdes sont principalement extraits des plantes fleurissantes. Ce sont des composés relativement stables qui sont stockés dans les plantes en tant que produits des différentes voies biosynthétiques. Généralement, ils sont synthétisés à partir des acides aminés, tels que la lysine, la tyrosine et le tryptophane [26].

Les alcaloïdes interviennent dans plusieurs médicaments du système nerveux, particulièrement les transmetteurs chimiques tels que l'acétylcholine, la norépinephrine, la dopamine et la sérotonine [27].

Les alcaloïdes exercent de puissantes actions pharmacologiques qui sont généralement variées et dépendent de leur composition chimique telles que : Analgésique, Stimulant centrale, Anti-tumoraux, Antalgique [28].

2-5- Terpénoïdes

Les terpénoïdes, parfois appelés isoprénoïdes, forment une classe large et diverse de composés organiques rencontrés dans la nature, similaires aux terpènes, dérivant d'unités isopréniques à cinq atomes de carbone assemblées et modifiées de milliers de façons [29].

Les propriétés pharmacologiques identifiées pour les terpénoïdes, notamment les mono-terpènes et diterpènes sont : antiseptiques, anti-inflammatoires, antispasmodiques, anti-tumorales, anti-hypertensives et analgésiques [27].

3- Techniques de dosages et identifications des polyphénols

3-1- Chromatographie liquide à haute performance

La chromatographie est une technique de séparation et d'analyse quantitative et qualitative. Son principe de base repose sur les équilibres de concentrations des composés entraînés entre deux phases non miscibles dont l'une, dite stationnaire, est conditionnée dans une colonne et l'autre dite mobile qui se déplace au contact de la première [25].

L'échantillon à analyser est poussé par un liquide (appelé phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie. Le débit d'écoulement de la phase mobile est élevé ce qui entraîne une augmentation de la pression dans le système. Ce débit élevé diminue le temps nécessaire pour séparer les composants le long de la phase stationnaire. La fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants. En effet, pour un même volume de phase stationnaire la surface d'échange augmente si les "grains" qui la composent sont de diamètre plus petit. Les pics obtenus sont plus étroits et le seuil de détection est également plus bas. La combinaison de ces attributs - rapidité et résolution élevées - conduit à l'appellation "haute performance".

Les phases mobiles utilisées sont des mélanges d'eau et d'un solvant organique miscible (acétonitrile, méthanol) ou des combinaisons de solvants organiques (alcools, hexane, dichlorométhane...) miscibles entre eux [25].

Souvent, la composition de la phase mobile est modifiée au cours de l'analyse, c'est le mode dit "gradient". Par exemple, sur une colonne apolaire, en utilisant un mélange eau/méthanol comme phase mobile, les composants les plus hydrophobes sont élués avec une concentration élevée en méthanol alors que les composants plus hydrophiles sont élués préférentiellement avec une concentration faible en méthanol. Selon la nature de la phase stationnaire et la nature des composés à séparer, on commencera par une concentration élevée en méthanol ou le contraire [25].

3-2- La spectrophotométrie UV-Visible

La spectrophotométrie UV-Visible est une technique d'analyse qualitative et quantitative. Elle est fondée sur l'étude de changement de l'intensité de la lumière traversant une solution colorée, dans un domaine d'application compris entre 200 et 800nm afin de déterminer la concentration des substances absorbantes [30].

Le résultat correspond à des spectres d'émission ou d'adsorption, qui ressemblent à des courbes de variation d'absorption en fonction de la longueur d'onde [30].

3-3- Spectroscopie moléculaire IR

La spectrométrie IR s'utilise principalement pour l'analyse qualitative d'une molécule. Elle permet de mettre en évidence la présence d'une liaison particulière. La région du spectre IR s'étend dans l'intervalle du nombre d'onde 4000 cm^{-1} à 670 cm^{-1} .

Pour obtenir un spectre infrarouge, une quantité d'échantillon d'un composé est placé dans un appareil muni d'une source de radiation infrarouge. Le spectrophotomètre émet une radiation qui traverse l'échantillon en balayant automatiquement une gamme de fréquence données, puis il trace un graphique de pourcentage de radiation transmise en fonction des nombres d'ondes dans lesquelles les radiations absorbées par les molécules apparaissent sous la forme de bande [31].



Chapitre 2

Matériel et méthodes



MATERIEL**1- Matériel végétal**

Les échantillons de feuilles d'Oliviers et Eucalyptus ont été récoltés sur deux différentes stations de la wilaya de Tizi Ouzou, à savoir :

- Talakhelouf située à Boghni sur une altitude de 550m.
- Tizirt à une altitude de 200m.

La récolte de la matière végétale a été effectuée dans des endroits exempts de pollution et d'habitations dans le but d'écarter tout impact environnemental sur la composition chimique des espèces.

La récolte a été effectuée à la fin du mois de Mars 2019 très tôt le matin afin d'éviter les effets de la rosée et avant que le soleil ne commence à darder ses rayons.

Afin d'évaluer l'effet du séchage sur le rendement et la composition chimique des différents extraits poly phénoliques obtenus, nous avons départagé les échantillons de feuilles en deux moitiés :

- Une première moitié est manipulée à l'état frais immédiatement après la récolte.
- L'autre moitié est séchée à l'air libre, conservée à l'ombre et à l'abri de la lumière à une température ambiante durant 20 jours.

2- Produits chimiques, matériel et verrerie du laboratoire

Lors de la conduite de nos expériences d'extraction et de dosage des polyphénols, nous nous sommes servis des produits chimiques et matériels listés dans les tableaux 1 et 2.

Tableau 1- Liste des produits chimiques

Nom des produits chimique	Pureté %	Fabriquant
Acétate d'éthyle	99.5%	SIGMA-ALDRICH
Butanol	99%	BIOCHEM
Chloroforme	99%	BIOCHEM
Ether d'éthylrique	99.5%	SIGMA-ALDRICH
Ether de pétrole	95%	SIGMA-ALDRICH
Méthanol	99,9%	SIGMA-ALDRICH
Ethanol	96%	Riedel-de Haen
HCl	36 ,5-38%	SIGMA-ALDRICH
Acide sulfurique	95-97%	SIGMA-ALDRICH
Acide coumarique	Gradient étalon	/
Acide cinamique	99,5%	BIOCHEM
Acide gallique	100%	/
Acide caféïque	95%	ALDRICH

Tableau 2 – Equipements utilisés et leurs caractéristiques

Nom	Marque	Usage
Bain ultrasons	Advantage-Lab	Agitateur
Balance Analytique	KERN	Pesée
Chaîne HPLC	SHIMADZU	Dosage qualitatif
Etuve	Memmert	Séchage et stérilisation
Rotavapeur	kottermann	Evaporation
Spectrophotomètre UV/Visible	PerkinElmer	Dosage quantitatif
Spectrophotomètre IR	SHIMADZU	Identifiant des bandes

Quant à la verrerie et petits matériels utilisés ils consistent en : ballons (150 et 250mL), béchers, fioles (10, 20, 25 et 50mL), pipettes (1, 10 et 20 ml), micropipettes (1000 μ L), spatules, entonnoirs et papier filtre.

METHODES

3- Evaluation du taux d'humidité du matériel végétal

Le taux d'humidité, ou la teneur en eau, est définie comme étant la perte de masse subie par la matière végétale soumise à une opération de séchage ou à une dessiccation par évaporation [32].

Afin d'évaluer le taux d'humidité du matériel végétal, nous avons adopté la technique de dessiccation par évaporation : Une masse m_1 de matière végétale est soumise à une dessiccation à l'étuve à une température de 105°C jusqu'à masse m_2 constante.

Le taux d'humidité est évalué à l'aide de la formule suivante [32].

$$H(\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\%$$

Avec :

H : teneur en eau (%)

m_1 : masse de l'échantillon avant dessiccation (g)

m_2 : masse de l'échantillon après dessiccation (g)

4- Tests phytochimiques

Ces tests ont pour but d'attester la présence ou non des différents polyphénols dans les échantillons des feuilles de nos plantes. Nous avons procédé de la manière suivante :

5 g de matériel végétal sont introduits dans 100 mL d'eau bouillante et laissés infuser 15 à 30 minutes. Cet infusé est utilisé pour la caractérisation des tanins, des flavonoïdes, des terpénoïdes et des alcaloïdes [33].

4-1- Identification des tanins

L'identification des tanins a été conduite selon le protocole suivant : Verser dans un tube à essai 5mL de l'infusé à 5%, puis ajouter 1mL de la solution aqueuse de FeCl_3 à 1%. En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre [33].

4-2- Identification des flavonoïdes

L'identification des flavonoïdes est conduite selon le protocole suivant : Verser dans un tube à essai 2mL d'infusé de plante auxquels on ajoute quelques gouttes de solutions aqueuses de HCl à 2% et FeCl_3 à 1%. La présence des flavonoïdes est révélée par l'apparition d'une couleur verdâtre [34].

4-3- Identification des terpénoïdes

A 2,5mL d'infusé de plante, nous ajoutons 0,4mL de chloroforme et 0,6mL d'acide sulfurique concentré. La présence des terpénoïdes est indiquée par la formation d'un anneau marron rouge à l'interphase [35].

4-4- Identification des alcaloïdes

Introduire dans chacun, des deux tubes à essai, 1mL d'extrait à analyser, acidifie avec quelques gouttes de HCl concentré. Deux réactifs sont utilisés pour mettre en évidence la présence des alcaloïdes [36] :

- Le réactif de Wagner indique leur présence par apparition d'un précipité blanc,
- Le réactif de Mayer, dans le second tube indique la présence des alcaloïdes suite à l'apparition d'un précipité brun.

5- Extraction des polyphénols**5-1- Extraction des flavonoïdes**

L'extraction des flavonoïdes est effectuée selon le protocole suivant [37] : 30g de matériel végétal cisailés sont macérés dans 100mL de méthanol durant 72 heures. Le macérat recueilli après filtration est évaporé au rota vapeur pour éliminer le méthanol (à 64,5°C). Le résidu obtenu est repris dans 50mL d'eau distillée tiède. Puis une série d'extraction Liquide/Liquide est effectuée sur cette fraction aqueuse par ajout de plusieurs solvants organiques non miscibles et à polarité croissante. La procédure adoptée est la suivante [37] :

- Lavage avec trois fractions de 30mL de chloroforme pour éliminer la chlorophylle et les lipides,
- Lavage avec trois fractions de 30mL d'éther diéthylique pour extraire les génines et les flavonoïdes libres,
- Lavage avec trois fractions d'acétate d'éthyle permettant d'éliminer les monosides et d'entraîner les hétérosides flavonoïques.
- Enfin lavage avec trois fractions de butanol à 30mL.

L'extraction est achevée par évaporation de la phase alcoolique obtenue à 55°C pour récupérer un résidu sec pesé et stocké pour une analyse ultérieure [37].

5-2- Extraction des tanins

30g du matériel végétal est porté à une macération durant 24 h dans 100 mL d'éther de pétrole. Après filtration, le marc est récupéré alors que la chlorophylle et les lipides sont éliminés.

Le traitement du macérat est effectué avec 50mL d'éther diéthylique durant 30 minutes, afin d'éliminer les phénols, les catéchines et l'acide oxybutyrique.

Le marc est repris une seconde fois dans 100mL de méthanol pendant 30 minutes. Puis le filtrat méthanolique est évaporé. Le résidu récupéré est pesé et conservé dans un flacon propre [37].

Le rendement des différents extraits polys phénoliques est calculé à la base de la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{masse de l'extrait sec obtenu}}{\text{masse de la matière végétale prise initialement}} \times 100\%$$

6- Dosages spectrophotométriques des polyphénols

6-1- Dosage des polyphénols totaux

Ce dosage est effectué sur les extraits obtenus par macération de 1g de matière végétale dans 10mL de chacun des deux solvants éthanol et eau distillée.

La quantification des polyphénols totaux s'effectue au moyen du réactif de Folin-ciocalteu, ce dernier donne une coloration bleue avec les polyphénols totaux et absorbe aux environs de 765 nm.

La solution mère à 1mg/ml est obtenue en solubilisant 50mg d'acide gallique dans 50mL de solvant

Les étalons sont préparés à partir de cette solution mère en prélevant différents volumes à différentes concentrations illustrés ci-dessous (Tableau 3).

Le protocole du dosage est effectué comme suit :

Dans une fiole jaugée de 25mL contenant initialement 9mL du solvant, on introduit :

1mL d'extrait ou d'étalon ; 1mL du réactif de Folin ;

Après 5min, 10mL de Na_2CO_3 (7%), sont additionnées au mélange. L'ensemble ajusté au trait de jauge (avec le solvant) et préalablement agité est incubé à 23°C pendant 90 minutes.

L'absorbance est ensuite lue à 765 nm par un spectrophotomètre UV-Visible.

La teneur des composés phénoliques est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait. ($\mu\text{g EAG/g}$ d'extrait).

Tous les essais sont reproduits au moins trois fois. [38].

Tableau 3 - Concentrations des solutions étalons d'acide gallique

Concentrations des solutions filles ($\mu\text{g/mL}$)	Volumes prélevés (mL)
20	1
40	2
60	3
80	4
100	5

6-2- Dosage des flavonoïdes

La détermination de la teneur des flavonoïdes a été effectuée par la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl_3). Elle est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les

différents extraits. Le chlorure d'Aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et absorbe dans le visible à 435 nm [39].

Le dosage est effectué depuis une gamme d'étalon préparée à partir de la solution mère de quercétine à 0,12 mg/mL obtenue en dissolvant 6 mg de quercétine en poudre dans 50 ml de méthanol en prenant soin de mélanger vigoureusement. Des solutions filles sont préparées à partir de cette solution mère pour des concentrations comprises entre 0,018 et 0,06 mg/mL.

Dans un tube à essai, 1ml de la solution de $AlCl_3$ à 2% (solubilisé dans du méthanol), est ajouté à 1ml d'extrait ou d'étalon. Après une incubation de 10minutes, l'absorbance est lue à 435nm grâce à un spectrophotomètre UV [39].

Tableau 4 - Concentration des solutions étalons de Quercétine.

Concentration des solutions filles (mg/mL)	Volume prélevé depuis la solution mère (mL)
0,018	3
0,024	4
0,03	5
0,042	7
0,06	10

7- Analyse des polyphénols par HPLC

Les composés phénoliques d'origine naturelle ont la propriété d'être solubles dans les solvants polaires, ce qui rend possible l'utilisation de la phase inverse en HPLC (RP-HPLC) pour leur dosage [40].

- Préparations des échantillons et des standards

La mise en solution des échantillons est réalisée par dissolution de 5mg d'extrait dans 1mL de méthanol.

Les standards sont préparés par solubilisation de 10mg de chaque étalon dans 20mL de méthanol

- Conditions de l'analyse HPLC

A la base des données de la littérature, nous avons fixé les conditions expérimentales suivantes [40] :

1- La colonne est de type C18 de 25cm de longueur composée de particules de 5 μ m de diamètre,

- 2- Détection UV à 280nm. Le choix de cette longueur d'onde est établi en fonction des spectres d'absorbance des polyphénols
- 3- Une température de 30°C et un volume d'injection de 10µl, avec un débit de 1ml/min.
- 4- Le temps d'analyse est de 40 min
- 5- La phase mobile est constituée de deux solvants A et B. Le solvant A est de l'acide formique à 0.1%. Le solvant B est de l'Acétonitrile.

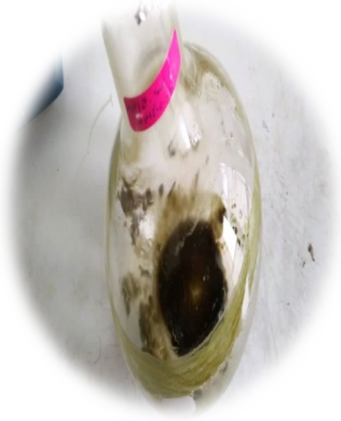
Les échantillons de polyphénols sont élués selon un gradient de concentration de :

- 0 à 3,2 min pour la phase mobile composée de 4% d'Acétonitrile et 96% d'acide formique ;
- 3,2min à 32min pour la phase mobile composée de 4% d'Acétonitrile et 100% d'acide formique ;
- 32min à 34,4min pour la phase mobile composée de 100% d'Acétonitrile ;
- 34,4min à 40 min (100% à 4% de B).

Les chromatogrammes sont illustrés dans l'annexe 2. L'identification des pics se fait par comparaison à des composés de références. A cet effet, nous avons utilisé quatre standards d'étalonnages : Acide gallique, Acide coumarique Acide cinnamique et Acide caféique [40].

8- Dosage des extraits secs de polyphénols par ATR :

Les extraits secs de tanins et flavonoïdes ont été caractérisés par spectroscopie ATR (en transmittance) à l'aide d'un appareil de marque Shimadzu muni d'une sonde en Germanium. Cet appareil est piloté d'un logiciel permettant d'obtenir des spectres identifiables à la base des tables standards de la spectroscopie infra-rouge.



Chapitre 3

Résultats et discussions



1- Taux d'humidité du matériel végétal :

La technique de dessiccation à l'étuve, à 105°C, nous a permis d'évaluer le taux d'humidité des échantillons des feuilles d'Olivier et Eucalyptus récoltées depuis Tizirt et Boghni.

Les résultats sont représentés sur les figures 5, 6, 7, 8.

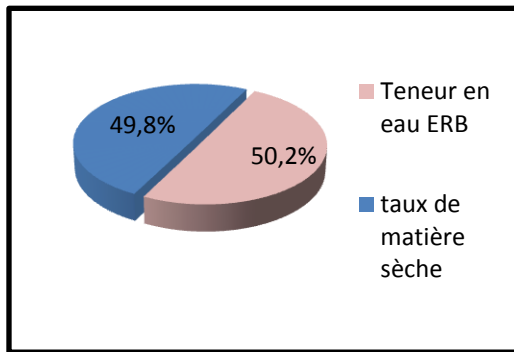


Figure 5 – Teneur en eau des échantillons de feuilles d'eucalyptus de Boghni.

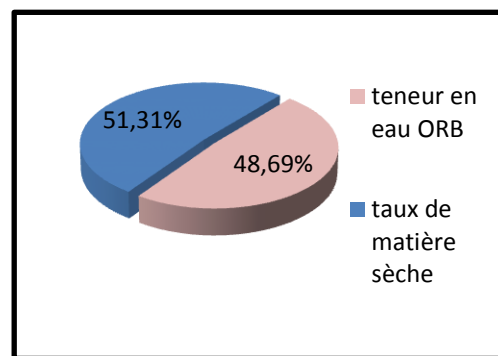


Figure 6- Teneur en eau des échantillons de feuilles d'olivier de Boghni.

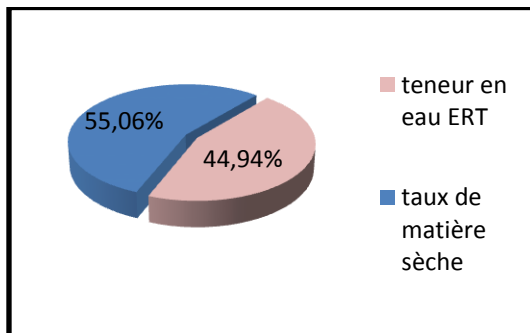


Figure 7 - Teneur en eau des échantillons de feuilles d'eucalyptus de Tizirt.

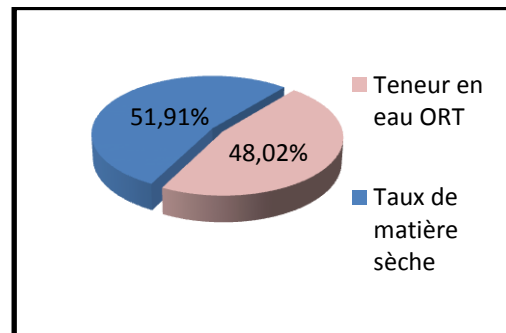


Figure 8 - Teneur en eau des échantillons de feuilles d'olivier de Tizirt

Les résultats présentés sur les figures 5 à 7, montrent que pour les échantillons de feuilles d'Eucalyptus, le taux d'humidité est de l'ordre de 50% et 44% respectivement à Boghni et Tizirt. Aussi, nous constatons que pour l'Olivier le taux d'humidité n'excède pas 48% pour les deux régions. En effet, il semble que les régions où la végétation est abondante sont caractérisées par un taux d'humidité atmosphérique élevé auquel correspond une température inférieure [41].

2- Tests phytochimiques :

Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et /ou de précipitation. L'extraction des différentes familles de métabolites secondaires nécessite l'utilisation de l'eau comme solvant.

L'identification effectuée sur les différents extraits aqueux, révèle la présence ou non des métabolites secondaires dans les feuilles de ces espèces ;

Nous présentons sur la figure 9 et le tableau 5, les résultats du criblage phytochimique effectué sur les différents extraits aqueux de nos échantillons de plante.

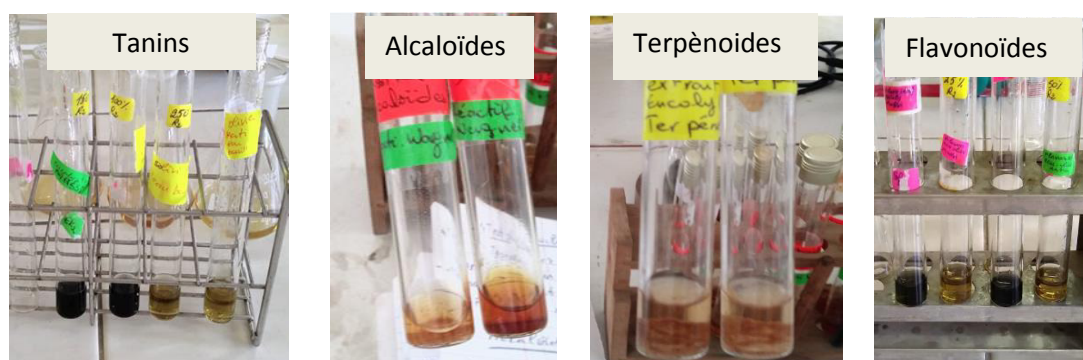


Figure 9 - Résultats du criblage phytochimique

Quartres situations sont envisagées :

- (+) : le réactif présente une faible opacité ou léger précipité (présence en faible quantité).
- (+ +) : le réactif produit une légère coloration ou précipitation.
- (+ + +) : le réactif produit une floculation ou un précipité lourd
- (-) : cas d'absence de précipitation ou de coloration.

Le tableau ci-dessous montre les résultats des tests phytochimiques obtenus pour le criblage des flavonoïdes, tanins, terpenoides et alcaloïdes :

Tableau 5- Résultats des tests phytochimiques effectués sur les extraits aqueux d'Olivier et d'Eucalyptus

Extrait aqueux	Tanins	Flavonoïdes	Terpenoïdes	Alcaloïdes	
				Réactif de Mayer	Réactif de Wagner
Extrait aqueux (Olivier RB)	+++	+++	+	+++	-
Extrait aqueux (Olivier RT)	+++	+++	+	-	++
Extrait aqueux (Eucalyptus RB)	+++	++	+++	+++	+++
Extrait aqueux (Eucalyptus RT)	+++	++	+++	++	+++

Sur l'ensemble des résultats regroupés dans le tableau 5, nous constatons que les métabolites secondaires sont plus ou moins présents sur tous les extraits aqueux des échantillons de feuilles d'olivier et d'eucalyptus.

3- Rendements d'extraction en métabolites secondaires

L'isolation des flavonoïdes et des tanins a été effectuée sur les échantillons des feuilles d'olivier et d'eucalyptus récoltées des deux régions, ce qui a permis d'évaluer l'influence de 03 facteurs sur le rendement en métabolites secondaires, à savoir :

- L'altitude.
- Le lavage à l'eau distillée.
- Le séchage à l'air libre pendant 20 jours à température ambiante.

Les résultats sont présentés sur les figures 10, 11, 12, 13.

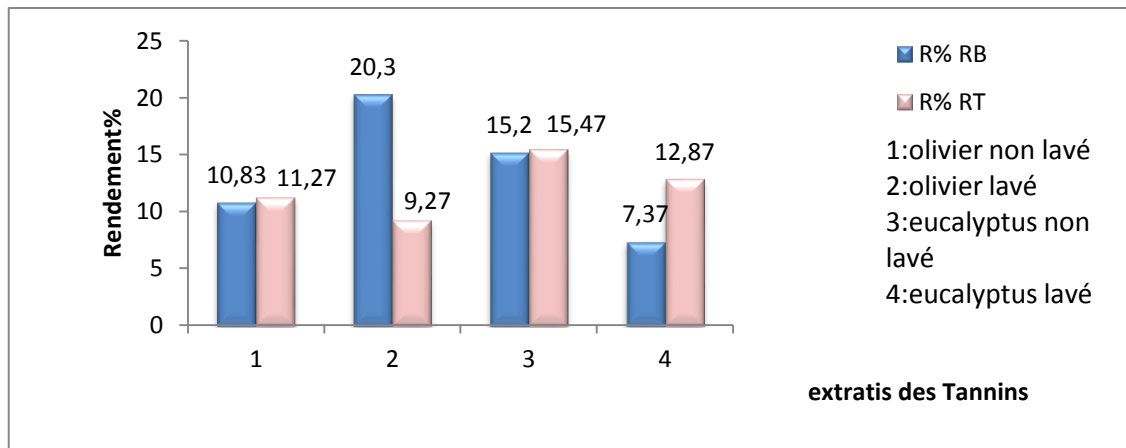


Figure 10 - Rendements des feuilles fraîches en tanins.

1- l'extraction des tanins des feuilles d'olivier sans un éventuel lavage à l'eau distillée, nous donne des rendements voisins pour les deux régions, avec une valeur de (10.83%) pour la région de Boghni et (11.27%) pour la région de Tizirt.

2-pour les tanins extraits des feuilles d'olivier lavées à l'eau distillée, la différence est significative nous avons enregistré un rendement de 20,3% à la région de Boghni alors qu'il est de 9,7% à la région de Tizirt.

3- concernant l'extraction des tanins des feuilles d'eucalyptus sans lavage à l'eau distillée, les rendements des deux régions sont voisins (soit une différence de 0.27%).

4-Pour les tanins extraits des feuilles d'eucalyptus lavées à l'eau distillée, le rendement des tanins extrait de la région de Tizirt dépasse celui de la région de Boghni (avec une différence de 5.5%)

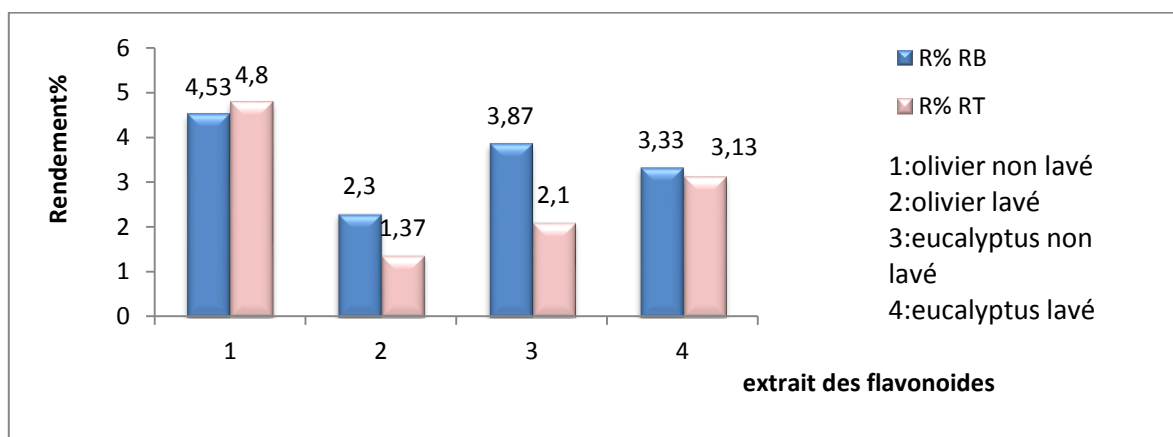


Figure 11- Rendements des feuilles fraîches en flavonoïdes.

- Le lavage des feuilles d’olivier a donné un rendement élevé en flavonoïdes pour la région de Boghni (soit 2,3%) alors qu’il est de 1,37% pour la région de Tizgirt.
- Concernant l’olivier non lavé les rendements en flavonoïdes étaient proches pour les deux régions (soit une différence de 0,27%) ;
- Tandis que le rendement en flavonoïdes de l’olivier lavé est plus important pour la région de Tizgirt que pour la région de Boghni (soit 4,8%).

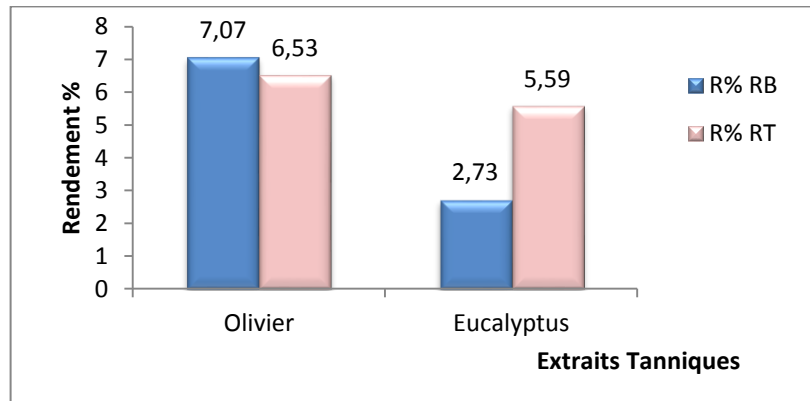


Figure 12 - Rendement des feuilles sèches en tanins.

Les résultats indiquent que les extraits des feuilles d’olivier n’aboutissent pas à une différence significative du rendement en tanins entre les deux régions, l’écart est estimé à 0,54% contrairement aux extraits des feuilles d’eucalyptus récolté de la région de Tizgirt qui ont un rendement 2 fois plus élevé par rapport à celui trouvé au niveau de la région de Boghni.

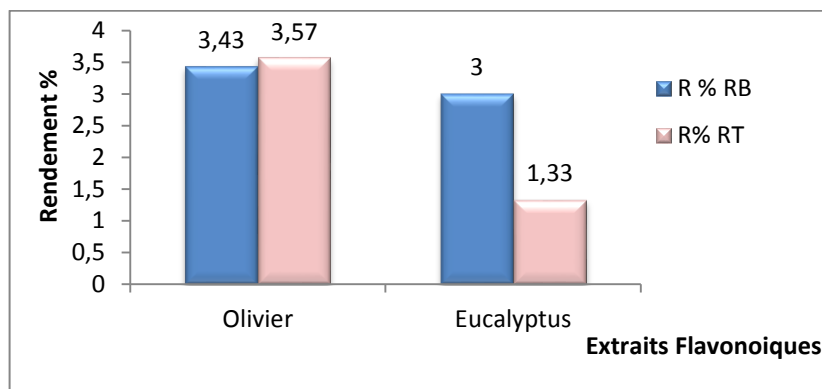


Figure 13 - Rendements des feuilles sèches en flavonoïdes.

Le rendement en flavonoïdes extraits des feuilles de l’olivier n’aboutit pas à une différence significative de rendement entre les deux régions, l’écart est estimé à 0,14%.

Contrairement aux extraits des feuilles d'eucalyptus récolté de la région de Boghni qui ont un rendement 3 fois plus élevé par rapport à celui trouvé au niveau de la région de Tigzirt.

➤ **Discussion du rendement**

L'ensemble des feuilles traitées sont riches en tanins alors qu'elles présentent un faible rendement en flavonoïde, probablement dû à leur localisation distale dans la plante (racines, fleurs).

Le lavage des feuilles d'olivier et d'eucalyptus donne des rendements variables en polyphénols d'une région à une autre. Nous pouvons déduire que cette variabilité est influencée par d'autres facteurs tels que les conditions et les paramètres d'extraction (température d'extraction, le solvant d'extraction).

Notre étude souligne que le séchage à l'air libre semble limiter les rendements des extraits en polyphénols, ce qui ne concorde pas avec les données biologiques qui stipulent que l'élimination d'eau préserve les composés phénoliques en stoppant leur dégradation enzymatique [42]. On pense que ce faible rendement est dû à l'inefficacité de la méthode de séchage utilisée.

A travers tous ces résultats nous suggérons d'attribuer aux variations des rendements en flavonoïdes et tanins les facteurs suivants :

- **La récolte :**

Le réveil printanier (mars-avril) influence sur le rendement en métabolite secondaire de l'olivier qui se manifeste par l'apparition de nouvelles pousses terminales, et de l'eucalyptus qui se révèle par formation de nouvelles feuilles jeunes et ce car les sommités fleuries et les feuilles doivent être récoltées avant la floraison.

- **Les sols :**

Ils se diffèrent selon leurs structures et leurs textures, ils peuvent être de gravier, de sable, d'argile ou d'alluviale, tous sont différents également dans leurs contenus en matière organique et minérale, et leurs propriétés physico-chimiques surtout la teneur en eau. Chaque espèce favorise un type de sol pour leur croissance.

- **Les facteurs climatiques :**

L'influence des facteurs climatiques sur l'évolution des deux espèces « olivier et eucalyptus » peut s'expliquer par leurs capacités à modifier la réponse cellulaire de telle sorte que les végétaux

perçoivent les signaux environnementaux et les transmettent à la machinerie cellulaire pour activer des mécanismes de réponse. Ces dernières seront modifiées et de nouvelles fonctionnalités apparaissent : tels que le manque de capacité synthétique des métabolites secondaires et la perturbation de quelques rôles physiologiques essentiels comme la photosynthèse et la respiration.

▪ **L'effet de l'eau :**

L'eau est considérée comme un composant principal de la matière vivante et fournit un milieu indispensable pour toutes les réactions chimiques à l'intérieur des cellules. Il est parmi les facteurs principaux qui affectent la distribution et la croissance des plantes en général, et médicinales, en particulier.

▪ **La lumière :**

Indispensable à la photosynthèse, les exigences en lumière varient en fonction du stade de croissance. Les effets de la lumière sur les espèces médicinales :

- L'effet de la lumière sur la respiration.
- L'effet de lumière sur la floraison.
- L'effet de la lumière sur la qualité des métabolites secondaires.

4- Teneur en polyphénols totaux

Afin de déterminer le meilleur solvant extracteur nous avons réalisé plusieurs extractions dans plusieurs solvants (eau, eau bouillante et l'éthanol).

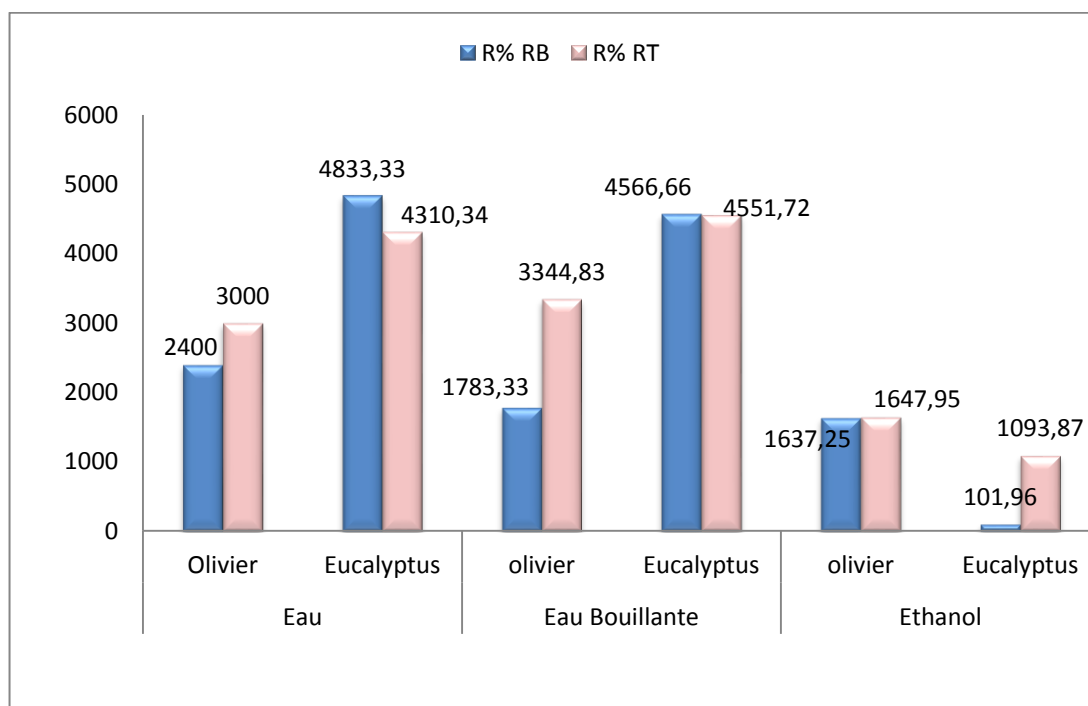
A partir de la courbe d'étalonnage annexe 1 (figures 1 et 2), on détermine les concentrations des polyphénols totaux des deux plantes sèches.



Figure 14- Extraits des feuilles de plantes à partir des différents solvants extracteurs.

Tableau 6- Quantité équivalente en acide gallique des extraits dans différents solvants.

Solvants	Espèces	$\mu\text{g EAG/g d'extract}$ (RB)	$\mu\text{g EAG/g d'extract}$ (RT)
Eau	Olivier	2400	3000
	Eucalyptus	4833,33	4310,34
Eau bouillante	Olivier	1783,33	3344,83
	Eucalyptus	4551,72	4566,66
Ethanol	Olivier	1637,25	1647,95
	Eucalyptus	101,96	1093,87

**Figure 15** - Quantité équivalente en AG des extraits de RB et RT dans différents solvants.

La quantité équivalente en Acide gallique est plus élevée dans l'extrait de l'eau distillée et de l'eau bouillante par rapport à l'extrait de l'Ethanol et ce pour l'olivier et l'Eucalyptus récoltés des deux régions.

En comparant les résultats des deux régions nous constatons que les meilleures quantités équivalentes en AG ont été enregistrées pour l'olivier et l'eucalyptus dans l'eau bouillante de la région de Tizirt pour des valeurs respectives de (4566.66) et (3344,83) $\mu\text{g EAG/g}$ d'extraits.

Tandis que la région de Boghni a enregistré des valeurs plus élevées dans l'extrait d'eau 2400 et 4833,3 µg EAG/g d'extrait d'olivier et d'eucalyptus respectivement.

5- Teneur en flavonoïdes

A partir de la courbe d'étalonnage annexe 1 (figure 3), la concentration des extraits méthanoliques des espèces récoltées des deux régions est estimée par l'équation suivante :

$$Y = 35.16X \text{ avec un coefficient de régression } R^2 = 0.996.$$

Correspondant à la forme $Abs = a[C]$.

La quantification des flavonoïdes par la méthode de trichlorure d'Aluminium révèle les résultats montrés dans le tableau 7.

- Plante d'eucalyptus fraîche :

La concentration des flavonoïdes dans les extraits de la RB est de 1,49 % Tandis que les extraits de RT obtenues sont de 4,681 %.

L'élimination des traces de poussière par lavage des feuilles donne une valeur de 1,43% et une valeur supérieure de 1,50 % pour la RT.

- Plante d'olivier fraîche :

L'élimination des traces de poussières par lavage rapporte une concentration d'extraits en flavonoïdes de 0,97% pour la RT qui est inférieure à la valeur d'extrait de RB soit de 1,52%.

La concentration de l'extrait en flavonoïdes pour RB sans lavage 4,89% est supérieure à l'extrait de la RT (soit 1,65%).

- La matière sèche :

La concentration la plus élevée en flavonoïdes est enregistrée pour les extraits d'olivier de la RB (soit 3,41).

Tandis qu'elle est plus élevée pour la RT par rapport à l'eucalyptus (soit une valeur de 2,05 %).

Tableau 7 - Concentrations en flavonoïdes en quantité équivalente de quercétine.

Extrait	La prise d'essai (mg)	(mg EQ/g d'extrait)	Quantité équivalente en quercétine en pourcentage%
Matière fraîche			
Extrait Eucalyptus non lavé RB	2,67	0.0199	1,49
Extrait eucalyptus lavé RB	3,49	0.025	1,43
Extrait olivier non lavé RB	3,95	0.0967	4,89
Extrait olivier lavé RB	6,5	0.0496	1,52
Extrait olivier non lavé RT	2,87	0.0237	1,65
Extrait olivier lavé RT	9,61	0.0468	0,97
Extrait eucalyptus non lavé RT	2	0.0167	4,681
Extrait eucalyptus lavé RT	4,93	0.037	1,50
Matière sèche			
Extrait olivier RT	2,89	0.0385	2,66
Extrait eucalyptus RT	2,11	0.0217	2,05
Extrait olivier RB	2.93	0.05	3,41
Extrait eucalyptus RB	13.42	0.061	0,90

➤ **Discussion de la teneur :**

On peut conclure que :

Plusieurs facteurs peuvent influencer la teneur en composés phénoliques :

- Les facteurs extrinsèques : les conditions climatiques et environnementales, la localisation géographique.
- La durée et les conditions de stockage.
- La méthode d'extraction et de dosage utilisée, la nature et la concentration du solvant.
- Les facteurs intrinsèques : l'espèce étudiée, la partie ou le stade végétal.

6- Résultats de l'analyse HPLC

La vaste gamme de polarité des composés phénoliques nécessite souvent de travailler en gradient d'éluion pour éviter les co-élutions et éluer l'ensemble des composés. L'ordre d'éluion de ces composés étant aussi déterminé par la nature et le gradient des solvants utilisés (donc de la nature de la phase mobile).

Le profil d'éluion a été suivi à 280nm, longueur d'onde caractéristique des composés phénoliques. En effet, tous les phénols sont détectés dans la région de l'ultraviolet avec un pic d'absorption maximale à 280nm dû à la présence du cycle phénolique [43].

De plus la présence de pics marqués dans presque tous les extraits que ce soit des tannins ou des flavonoïdes suggère que d'autres polyphénols seraient élués. Ceci nous permet d'envisager la présence de différentes sous familles poly phénoliques dans nos extraits.

La comparaison des temps de rétention des composés présents dans nos extraits avec ceux des différents standards (Acide gallique, Acide caféique, Acide Coumarique, Acide Cinnamique) nous a permis de suspecter la présence éventuelle de certains composés phénoliques.

Nous résumons dans le tableau 8 les temps de rétention obtenus pour le mélange des quatre standards à la base du chromatogramme affiché sur la figure 1 (annexe 2).

Tableau 8- Valeurs du temps de rétention pour les quatre standards.

Standard	Acide Gallique	Acide Caféique	Acide Coumarique	Acide Cinnamique
Temps de rétention (min)	7,136	15,245	16,981	21,805
Temps de rétention ±2% (min)	[6,993 ; 7,278]	[14,940 ;15,549]	[16,641 ;17,320]	[21,369 ;22,241]

- **Résultats de l'analyse HPLC sur les extraits obtenus à partir matière végétale fraîche**

Les différents chromatogrammes obtenus sont présentés sur les figures de 2 à 17 rassemblées en annexe 2.

Les résultats du temps de rétention des différents tannins et flavonoïdes extraits des feuilles sèches et fraîches d'Olivier et Eucalyptus récoltées au niveau des deux régions Boghni et. Tizirt sont résumés dans le tableau 9.

- **Résultats de l'analyse HPLC sur les extraits obtenus à partir des feuilles végétales sèche**

Les différents chromatogrammes obtenus sont présentés sur les figures 10 à 17 rassemblées en annexe 3. Les résultats du temps de rétention des différents tannins et

flavonoïdes extraits des feuilles fraîches et sèches d'Olivier et Eucalyptus récoltées au niveau des deux régions Boghni et Tizirt sont résumés dans le tableau 9.

Tableau 9 - Comparaison des temps de rétention des différents chromatogrammes par rapport aux standards utilisés.

Figure	N° du pic correspondant à chaque chromatogramme	Temps de rétention (min)	Aire des pics majoritaires (mv/min)	Type du standard
3	1	15,323	161652	Acide caféique
10	3	15,179	116507	Acide caféique
11	9	15,216	635222	Acide caféique
	12	16,442	456929	Acide Coumarique
12	13	15,067	315879	Acide Caféique
	21	16,963	89285	Acide Coumarique
13	11	15,057	305908	Acide caféique
	19	17,101	244772	Acide Coumarique
	20	21,785	102096	Acide Cinnamique
14	5	16,73	137083	Acide Coumarique
15	5	16,73	205891	Acide Coumarique
16	3	17,509	268676	Acide Coumarique
17	4	16,741	109114	Acide Coumarique
18	10	15,019	263726	Acide Caféique
	16	17,042	170209	Acide Coumarique
19	11	15,181	350024	Acide Caféique
	17	17,008	364867	Acide Coumarique
20	6	21,911	230512	Acide Cinnamique
21	9	16,905	130792	Acide Coumarique
	17	21,864	652918	Acide Cinnamique
24	1	15,283	140711	Acide Caféique

Par comparaison des différents chromatogrammes par rapport à celui des quatre standards figure1 (annexe 2), ainsi que des données dressées dans les tableaux 8 et 9 nous pouvons élaborer les constats suivants :

- Absence de l'acide gallique dans l'ensemble des extraits analysés. En effet, l'acide gallique a été élué à 7,13 min et aucun pic n'a été détecté à ce temps sur l'ensemble des chromatogrammes rassemblés en annexe 2.
- Tous les chromatogrammes rassemblés en annexe 2 présentent un ensemble de pics pour des temps de rétention compris entre 22,658 et 36,898min. La plupart de ces pics ne peuvent être identifiés car notre gamme d'étalon était limitée à quatre standards.
- Tous nos extraits sont riches en Acide caféique, Acide Coumarique mais l'acide Cinnamique n'est présent que dans certains d'entre eux.

Toutefois, il demeure que la méthode de dosage HPLC que nous avons adopté mérite d'être enrichie pour pallier au problème de superposition des pics (mauvaise séparation chromatographique) observée sur l'ensemble des chromatogrammes obtenus. A ce stade, nos résultats d'analyse HPLC, malgré leur insuffisance, confirment la complexité de la composition chimique des différents extraits poly phénoliques étudiés.

7- Résultats de l'analyse par spectroscopie infrarouges :

Les spectres infrarouges des trois extraits de tannins et des deux extraits de flavonoïdes sont présentés par les figures 1, 2, 3, 4, 5 rassemblées dans l'annexe 3.

Nous rassemblons dans les tableaux 10, 11 et 12 les principales bandes relatives aux spectres IR des extraits des tanins obtenus à partir des feuilles sèches d'eucalyptus et olivier de Tizirt ainsi que celles de Boghni.

Tableau 10- Informations sur le spectre IR des extrait de tanins obtenus des feuilles sèches d'eucalyptus récoltées à Tizirt.

Echantillon	Bande d'adsorption cm^{-1}	Fonction attribuée	Intensité du pic	Type de bande
Extraits des tannins obtenus des feuilles d'eucalyptus séchées	3410,15	Alcool (-OH)	Large	Bande de valence
		Acide (-OH)		
	2935,66	Alcane (-C-H)	Moyenne	Bande de valence
		Acide (-OH)		
	1732,08	Acide (-OH)	/	Bande de valence
	1687,71	Acide (C=O)	Large et intense	Bande de valence
	1456,26	Alcane (CH ₂)	Fine	Bande de déformation
	1188,15	Alcène aromatique (C=C)	/	Bande de valence
Ester(C-O)		/		

La bande large à $3410,15 \text{ cm}^{-1}$, montre la présence des groupements fonctionnels alcool et Acide. Ainsi les bandes à $2935,66 \text{ cm}^{-1}$; $1732,08 \text{ cm}^{-1}$ et $1687,71 \text{ cm}^{-1}$ montrent la présence des groupements fonctionnels acide.

La bande fine à $1456,26 \text{ cm}^{-1}$ indique la présence du groupement alcane CH_2 . La bande $1188,15 \text{ cm}^{-1}$ désigne la présence des alcènes aromatiques et les groupements fonctionnels ester.

En se référant aux structures de bases des tannins, nous pouvons conclure que le spectre obtenu montre clairement que les tannins extraits des feuilles sèches d'eucalyptus récoltées à Tizirt sont de nature phénolique.

Tableau 11- Informations sur le spectre IR des extraits de tannins obtenus des feuilles sèches d'olivier récoltées de Tizirt.

Echantillon	Bande d'adsorption cm^{-1}	Fonctions attribuées	Intensité du pic	Type de la bande
Extraits des tannins obtenus des feuilles d'olivier sèches et récoltées à Tizirt.	3282,84	Acide (-OH)	Large	Bande de valence
	2935,66	Alcane (-C-H)	Moyenne	Bande de valence
		Acide (-OH)		
	1689,64	Alcène C=C	large et intense	Bande de valence
		Acide (C=O)		
	1637,56	Alcène (C=C)	Faible	Bande de valence
	1508,18	Alcène aromatique (C=C)	Faible	Bande de valence
	1458,18	Alcane (CH ₂)	Faible	Bande de déformation
1273,02	Ether (C-O)	Faible	Bande de valence	
	Ester (C-O)	Faible		

Les informations du spectre IR des extraits de tannins montrent la présence de plusieurs types de bande d'adsorptions (large, Moyenne et faible).

- La bande large à $3282,84 \text{ Cm}^{-1}$ indique la présence du groupement fonctionnel acide (COOH), la bande moyenne $2935,66 \text{ Cm}^{-1}$ représente un groupement alcane (-C-H) et un groupement fonctionnel acide (COOH).
- La présence d'un groupement alcène et un alcène aromatique ($1637,56 \text{ Cm}^{-1}$ et $1508,18 \text{ Cm}^{-1}$) respectivement.
- Le groupement alcane(CH₂) a une bande de longueur d'onde $1458,18 \text{ Cm}^{-1}$.
- La bande $1273,02 \text{ Cm}^{-1}$ désigne les deux fonctions caractéristiques Ester (C-O) et Ether (C-O).

Toutes les fonctions caractéristiques trouvées signifient la présence des composés phénoliques.

Tableau 12- Informations sur le spectre IR des extraits des tannins obtenus des feuilles sèches d'eucalyptus récoltées de Boghni.

Echantillons	Bandes d'adsorption cm^{-1}	Fonction Attribuées	Intensité du pic	Type de la bande
Extraits des tannins obtenus des feuilles d'eucalyptus sèches et récoltées à Boghni.	3331,07	Alcool (OH)	Large	Bande de valence
		Acide (-OH)		
	2933,53	Alcane (-C-H)	Faible	Bande de valence
		Acide (-OH)		
	1608,63	Alcène C=C	Faible	Bande de valence
	1454,33	Alcane(CH ₂)	Faible	Bande de déformation
		Alcène aromatique C=C	Faible	Bande de valence
	1232,51	Ether C-O	Faible	Bande de valence
Ester C-O		Faible		

La bande large à $3331,07 \text{ Cm}^{-1}$ montre la présence du groupement fonctionnel alcool (OH) et Acide (-COOH).

La bande $2933,53\text{Cm}^{-1}$ désigne la présence d'un Alcane (-C-H) et un Acide (-COOH).

La bande 1454Cm^{-1} montre la présence d'un groupement alcane (CH₂) et un Alcène aromatique (C=C)

La bande $1232,51\text{Cm}^{-1}$ montre la présence de deux fonctions Ether (C-O) et Ester (C-O).

On se référant aux structures de bases des tannins nous pouvons conclure que l'extrait des tannins des feuilles sèches d'eucalyptus est de nature phénolique.

Tableau 13- Informations sur le spectre IR des extraits des flavonoïdes obtenus des feuilles sèches d'eucalyptus récoltées de Tizirt.

Echantillons	Bande d'adsorption (cm ⁻¹)	Fonctions attribuées	Intensité du pic	Type de la bande
Extraits de flavonoïdes obtenus des feuilles d'eucalyptus sèches et récoltées à Tizirt	3414	Alcool (-OH)	Large	Bande de valence
		Acide (-OH)		
	2937,59	Alcane (-C-H)	Fine et Intense	Bande de valence
		Acide (-OH)		
	1822,73	Cétone Cyclique	/	Bande de valence
	1664	Alcène C=C	Fine et Intense	Bande de valence
	1516,05	Alcène aromatique C=C	/	Bande de valence
	1271	Ester C-O	Faible	Bande de valence
		Acide C-O	Faible	
1170,79	Ester C-O	Faible	Bande de valence	

Le spectre infrarouge des extraits de flavonoïdes montre une variété de groupements fonctionnels tels que :

- La bande large à 3414 cm⁻¹ montre la présence de deux groupements fonctionnels alcool (OH) et acide (COOH).
- La bande fine et intense 2937,59 cm⁻¹ désigne la présence d'un alcane CH₂ et une fonction Acide (O-H).
- La bande 1822,72 cm⁻¹ représente une cétone cyclique.
- La bande 1516,05 Cm⁻¹ montre la présence d'un alcène aromatique.
- La bande 1271 Cm⁻¹ représentent les groupements fonctionnels ester et acide.

L'analyse spectroscopique de l'extrait des flavonoïdes obtenus des feuilles d'olivier a permis d'enregistrer les résultats du tableau 14.

Tableau 14- Informations sur le spectre IR (Extrait des flavonoïdes à partir de la matière fraîche des feuilles d'olivier lavées avec l'eau distillée (Région de Boghni)

Echantillon	Bande d'adsorption (cm ⁻¹)	Fonction Attribuées	Intensité du pic	Type de la bande
Extraits de flavonoïdes obtenus des feuilles d'olivier lavé et récoltés à Boghni.	3425,58	Alcool (-OH)	Large	Bande de valence
		Acide (-OH)		
	2933,73	Alcane (-C-H)	fine et intense	Bande de valence
		Acide (-OH)		
	1720,5	Cétone cyclique	/	Bande de valence
	1689,64	Alcène (C=C)	fine et intense	Bande de valence
		Cétone insaturé	/	
	1631,78	Alcène(C=C)	/	Bande de valence
	1514,12	alcène aromatique (C=C)	/	Bande de valence
	1462,04	Alcane (CH ₂)	/	Bande de déformation
	1269,16	Ether (C-O)	Faible	Bande de valence
		Ester (C-O)	/	
		Acide (C=O)	/	
1163,08	Ether (C-O)	Faible	Bande de valence	

De même pour les flavonoïdes, nous avons repéré pratiquement les mêmes bandes caractéristiques que celles annoncées pour les précédents tableaux.

Tous les spectres infra rouges réalisés pour les tannins et flavonoïdes montrent que les extraits obtenues sont de nature poly phénoliques car ils sont riches en fonctions caractéristiques de polyphénols tels que : la fonction Acide, Alcool, Ester, Ether et cétone cyclique.

Conclusion générale

Les plantes médicinales représentent une source fiable et inépuisable de métabolites secondaires connues pour leurs propriétés thérapeutiques. Parmi ces métabolites nous trouvons les polyphénols qui suscitent actuellement beaucoup d'intérêt dans le domaine pharmaceutique.

Le présent travail avait pour objectif de doser les polyphénols contenus dans les feuilles de deux plantes médicinales, via des techniques spectroscopiques et chromatographiques. Pour s'y faire, nous avons adopté une démarche expérimentale basée sur les tests phytochimiques, l'évaluation des rendements d'extraction puis dosages spectroscopiques et chromatographiques des différents extraits polyphénoliques obtenus.

Au préalable, le taux d'humidité des échantillons de feuilles d'olivier et d'eucalyptus récoltées à des endroits d'altitude différente a été évalué. Les résultats obtenus montrent que nos échantillons sont composés d'environ 50% d'eau.

Le criblage phytochimique des différents extraits aqueux montre une riche composition de la partie aérienne en polyphénols essentiellement des tannins. La présence des flavonoïdes, terpénoïdes et alcaloïdes est quasiment variable.

L'extraction des métabolites secondaires depuis les feuilles de nos échantillons nous a permis de constater que les rendements en tannins sont plus importants que ceux des flavonoïdes.

Un dosage par spectrophotométrie UV a permis la quantification des polyphénols totaux en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu. Les résultats obtenus montrent que les extraits des feuilles d'olivier et d'eucalyptus attestent une abondance en composés phénoliques. En effet, nous avons enregistré des teneurs de 2400 à 4833,33 et de 3344,83 et 4566,66mg d'acide gallique par gramme d'extrait aqueux respectivement pour des échantillons de plantes récoltés à haute et basse altitude.

Le dosage des flavonoïdes par la méthode au chlorure d'Aluminium ($AlCl_3$) nous a révélé une teneur en flavonoïde importante pour les feuilles fraîches (4,89%) et sèches (3,41%) d'olivier récoltées à haute altitude. A basse altitude, nous avons enregistré une teneur importante en flavonoïdes pour les feuilles fraîche (4,681%) et sèche (2,05%) d'eucalyptus.

Nous avons tenté de mener une analyse quantitative de nos extraits de tanins et flavonoïdes par HPLC. Les résultats obtenus ont révélé la présence des acides Coumarique, caféique et cinnamique dans la plupart de nos extraits. Tandis que l'acide gallique n'a pas été détecté dans nos conditions chromatographiques.

L'analyse infrarouge a révélé la présence des fonctions alcool, acide, éther et ester. Ce qui témoigne de l'omniprésence des composés phénoliques dans tous nos extraits (tanins et flavonoïdes).

Au terme de notre étude, nous pouvons conclure d'un côté que les deux plantes peuvent présenter un caractère pharmacologique intéressant du fait de leur composition chimique aussi variée et diversifiée.

Cependant les résultats de la présente étude ne constituent qu'une initiation à la recherche des composés phénoliques dans les plantes médicinales. Suite à nos modestes, résultats il serait intéressant d'approfondir notre étude afin de :

- Déterminer les bienfaits pharmacologiques des différents extraits des feuilles d'olivier et eucalyptus,
- Evaluer les activités biologiques, antioxydantes, antibactériennes, antivirales, anticancéreuses et anti-inflammatoires de nos extraits.
- Déterminer la composition chimique de nos extraits et détecter les composés phénoliques inconnues en utilisant des techniques instrumentales plus sophistiquées, et performantes telles que la spectrométrie de masse et la RMN.
- Valider la technique HPLC de dosage de nos extraits.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques :

[1] Halberstein R.A. Medicinal plants: Historical and cross-cultural usage patterns. *Ann Epidemiol.* 2005; 15(9): 686-99.

[1] LEHOUT R., LAIB M., 2015. Comparaison de trois méthodes d'extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes à partir de la plante médicinale-Artemisia herbaalba Asso. Mémoire de master université des frères Mentouri-Constantine, p5.

[2] ARAB.K., BOUCHENAK.O., YAHIAOUI.K ., 2013. Évaluation de l'activité biologique des feuilles de l'olivier sauvage et cultivé-Afrique *Revue Science* 09(3) 159 – 166.

[3] HADDOU D., 2017. L'infestation de la Teigne de l'olivier dans quelques vergers. Mémoire de master université de Tlemcen, p4.

[4] BEY OULD SI SAID Z., 2014. Activités biologiques des huiles essentielles des feuilles et du fruit d'une plante médicinale Eucalyptus globulus, Mémoire de magister Université Abderrahmane Mira – Bejaïa, p 3,4.

[5] MOHAMMEDI Z., 2013. Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie. Thèse de Doctorat université Abou Bakr Belkaid, p 22.

[6] KALAMOUNIC.E., 2010. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de doctorat université de Toulouse p47.

[7] M'HIRI N., 2015. Étude comparative de l'effet des méthodes d'extraction Sur les phénols et l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange « Maltaise Demi Sanguine » et exploration de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier Au Carbone. Thèse de doctorat université de Lorraine. P18

[8] MICHELT., 2011. Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (Hippophaë rhamnoides). Thèse de doctorat université d'orléans, p 40

- [9] MISSAOUI.F., 2018. Extraction verte et caractérisation des molécules bioactives dans les coproduits de la production d'asperge (*Asparagus officinalis* L.) mémoire université de Laval canada p12.
- [10] BARRY J. PARSONS., 2017. AROMATIC Plants: Antioxidant Capacity and Polyphenol Characterisation - *Foods*, 6, 28
- [11] TOUAFEKO., 2010. Etude phytochimique de plantes médicinales Du Nord Et Du Sud Algériens. Thèse de doctorat université de Mentouri Constantine. P 9
- [12] BENGUERBAA., 2008 "Etude phytochimique et de la phase butanolique de l'espèce *Inulacrithmoides* L." Mémoire de magister Université Mentouri Constantine. p 6
- [13] PESSELF., 2013. Synthèse éco-compatible de flavonoïdes fonctionnalisés par le glucose comme antioxydants potentiels. Thèse de doctorat université de Pris-Sud. p25
- [14] SAFFIDIEN K., 2015. Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *Carthamuscaeruleus* L. et de *Plantago major* L. Thèse de doctorat université Ferhat Abbas Sétif. P15
- [15] KHATER F., 2011. Identification Et Validation Fonctionnelle De Nouveaux Genes Potentiellement Impliqués Dans La Biosynthèse Des Composés Phénoliques - Thèse de doctorat de l'Ecole doctorale - Sciences des procédés – Sciences Des Aliments. CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES EN SCIENCES AGRONOMIQUES - MONTPELLIER SUPAGRO p37, 38.
- [16] Harborne JB, Williams CA. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481–504.
- [17] Aguilera-Carbo, A., Augur, C., Prado-Barragan, L. A., Favela-Torres, E., and Aguilar, C. N., 2008."Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins." *Applied microbiology and biotechnology*, 78(2), 189-199.
- [18] Dibong, S. D., Ottou, P. B. M., Vandi, D., Ndjib, R. C., Tchamaha, F. M., and Mpondo, E. M., 2015."Ethnobotanique des plantes médicinales anti hémorroïdaires des marchés et villages du Centre et du Littoral Cameroun." *Journal of Applied Biosciences*, 96, 9072-9093

Références bibliographiques

- [19] Barbehenn, R.V., Jones, C. P., Hagerman, A. E., Karonen, M., and Salminen, J.-P., 2006. "Ellagitannins have greater oxidative activities than condensed tannins and galloyl glucoses at high pH: potential impact on caterpillars." *Journal of chemical ecology*, 32(10), 2253-2267
- [20] Amrouche A., Koko.Y., ZaidiF., 2017. Teneur en composés phénoliques et activité antioxydante d'extrait aqueux de feuilles de *Moringa oleifera*. Mémoire de master université Abderrahmane Mira Bejaia, p11.
- [21] BELLEBCIRL., 2008. Etude des composés phénoliques en tant que marqueurs de biodiversité chez les céréales, Mémoire de Magister université Mentouri de Constantine, p19
- [22] RHAZIN., 2015. Mise au point de mélanges collants écologiques d'*Acacia mollissima* du Maroc. Thèse de doctorat université Hassan II - Maroc
- [23] BRUNETS., 2008. Analyse des mécanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestif des Ruminants. Thèse de doctorat université de Toulouse.
- [24] KriefS., KRIEFS., 2003. Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de doctorat p24. MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
- [25] NICAISE FRANÇOIS BONY., 2013. Stratégie analytique des tradimédicaments: établissement de profils Chromatographiques des métabolites phytochimiques apolaires. École Doctorale, Université De Paris-Sud. p 40
- [26] MAURON.M., 2006. "Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+) anatoxine-a et la (±) camptothécine" - Thèse de doctorat université Joseph Fourier- Grenoble, p13.
- [27] ZEKRIN., 2017. Étude phytochimique et Activités Biologiques des Huiles Essentielles et des Extraits des *M. pulegium*(L.), *M. suaveolens*(Ehrh.) et *M. spicata*(L.) du Moyen , p15.
- [28] DonatienK.,2009. Enquête Ethnobotanique De Six Plantes Médicinales Maliennes Extraction, Identification D'alcaloïdes - Caractérisation, Quantification De Polyphénols : Etude De Leur Activité Antioxydante. Thèse de doctorat université de BAMAKO, p 31.

- [29] François N.M., 2010. Identification De Poly-phénols, Evaluation de leur Activité Antioxydante Et Etude De Leurs Propriétés Biologiques. Thèse de doctorat université Paul Verlaine Metz, p50.
- [30] Ibraim H., Ouazine Y., 2014. Utilisation de la spectrophotométrie UV-Visible, pour l'étude de l'extraction solide- Liquide du thym. Mémoire de master. p
- [31] Larbaoui S., Kachbi A., Ladjal L., Abdlefetteh D., 2017. Détermination des polyphénols dans les extraits de la sauge, du thé et du thym en utilisant les techniques spectroscopiques et les méthodes chimio-métriques.
- [32] Twidell E. Wagner J.J. et Thiex Nancy J., 2002. Use a Microwave oven to determine moisture content of frages ExEx8077. Extension Extra. Paper 282
- [33] Belfekih F., El Yahyaoui O., Chleh M., OuldAbdellahi L., Sammama A., Lrhorfi L., et Bengueddour R., 2017. Screening phytochimique d'arbutus unedo L phytochemical screening of arbutus unedo L.
- [34] Bakhta M., Dali.S., 2017. Extraction et caractérisation des principaux constituants chimiques des trois plantes aromatiques de la Famille des Lamiacées : *Mentha viridis*, *Rosmarinus officinalis* et *Salvia officinalis*. mémoire de Master. Université Abdelhamidi Bnbadis de Mostaganem,
- [35] Das B.K., Al-Amin M.M., Russel S.M., Kabir S., Hanne J.M.A., 2014. Phytochemical screening and Evaluation of Analgesic Activity of *Oroxylum indicum*. Indian Journal of pharmaceutical sciences, 571-575.
- [36] Trease G.E., Evans W.C., 1989. Text Book of pharmacognosy. Londres : 13^e édition, ED., Baillere Tindall.
- [37] Feknous. S., Saidi F., Mohamed said R., 2014. Extraction, caractérisation et identification de quelques métabolites secondaires actifs de la mélisse (*Melissa officinalis* L.). Revue « Nature & Technologie ». A- Sciences fondamentales et Engineering, n° 11. Pages 07 à 13.
- [38] DONATIENK., 2009. Enquête-Ethnobotanique De Six Plantes Médicinales Maliennes Extraction, Identification D'alcaloïdes - Caractérisation, Quantification De Polyphénols : Etude De Leur Activité Antioxydante. Thèse de doctorat de l'université de Bamako.

Références bibliographiques

- [39] LECHEHEB.N; CHAABNA.C; 2017. Valorisation et pouvoir antioxydant des composés phénoliques des feuilles de blé dur (*Triticum durum*) : GTA dur et CIRTA. Mémoire de Master – Université des freres Mentouri Constantine
- [40] Marta N Francisco j. Morales., 2017. Evaluation of an olive leaf extract as a natural source of antiglycative compounds., *food research international* 92 56-63
- [41] *Juniperus Oxycedrus* L. (Cupressacées) Et *Schinus Molle* L. (Anacardiacees) /DJEBAILI.H., L'effet Des Facteurs D'environnement Sur La Variation De Quelques Métabolites Secondaires Chez Deux Espèces Médicinales : Diplôme de Magister en Biologie et Ecologie végétale.p.29
- [42] Hardou., Benbouabdellah. L., 2014. Etude comparative de trois techniques de séchage (étuve, microonde et air libre) des feuilles de laurier en termes de qualité phytochimique et minérale. Université Abderrahmane MIRA de Bejaia. Mémoire de master.
- [43] Beddou F., 2015. Etude phtyochimique et activité biologiques de deux plantes médicinales Sahariennes *Rumex vesicarius* L. et *Anvillea radiata* coss. &Dur. Thèse de doctorat université Abou Bekar Belkaid Telemcen. P117,118.

Glossaire

- **La lignification :** est un phénomène important dans le règne végétal, il s'agit d'une transformation opérée au fil du temps sur certaines parties d'une plante vascularisée qui se transforme en bois, c'est le résultat de la fixation de la lignine. Une plante lignifiée est plus rigide et protégée face aux agressions climatiques.

- **Antioxydants :**

Un antioxydant est une substance qui est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation d'un substrat, tout en étant présent à faible concentration par rapport à ce substrat oxydable.

Annexes

Annexe 1

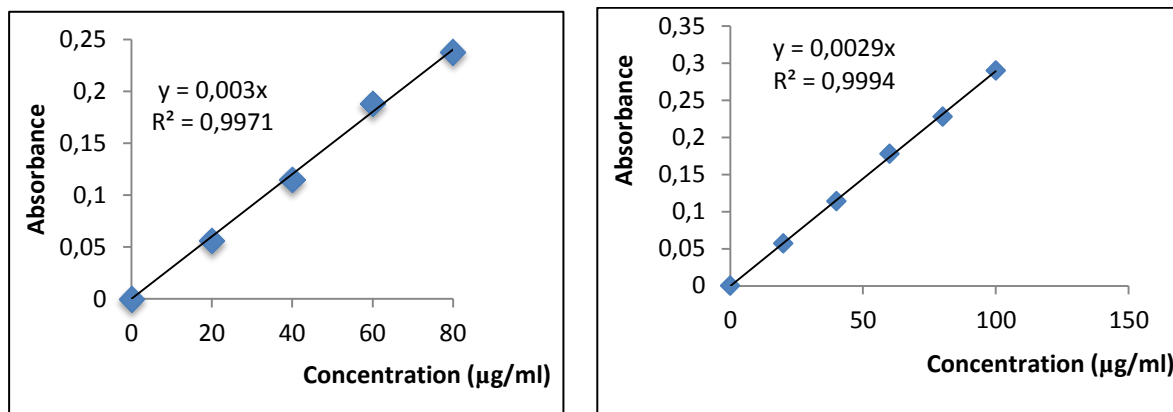


Figure 1- Variation de l'absorbance en fonction de la concentration en AG dans l'eau.

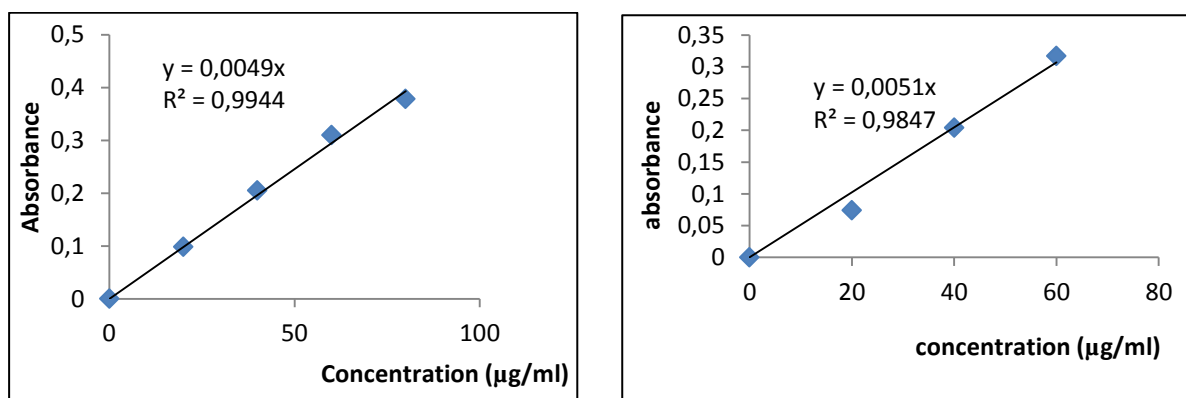


Figure 2 - Variation de l'absorbance en fonction de la concentration en AG dans l'Ethanol.

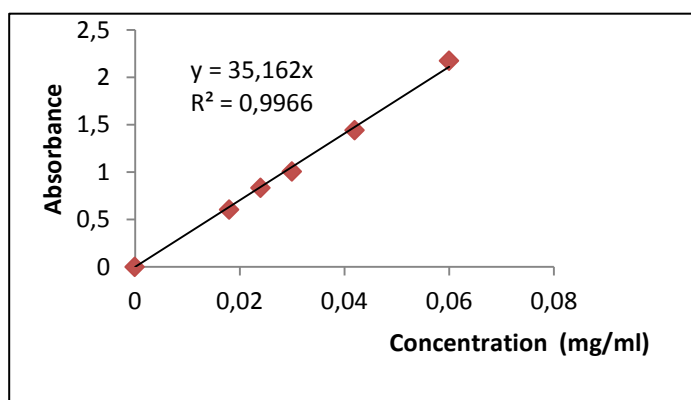


Figure 3- Variation de l'absorbance en fonction de la concentration en quercétine.

Annexe 2

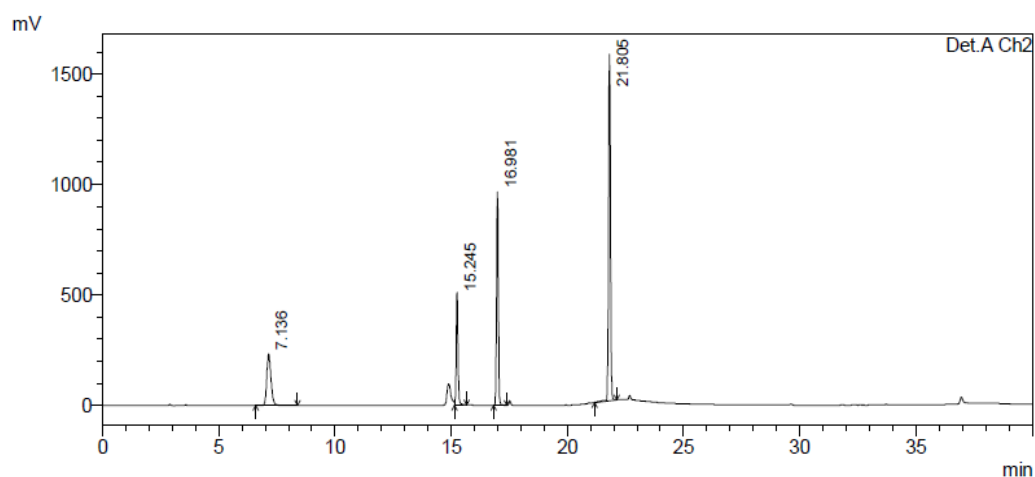


Figure 1- Chromatogramme du mélange des quatre standards Acide Gallique, Acide Caféique, Acide Coumarique et Acide Cinnamique élués successivement

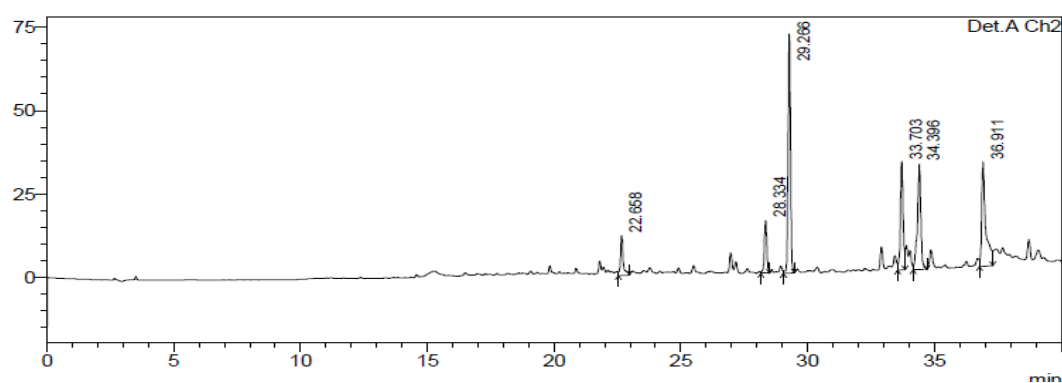


Figure 2- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de flavonoïdes obtenus avec les feuilles fraîches d'eucalyptus non lavées avec l'eau distillée et récoltées à Boghni.

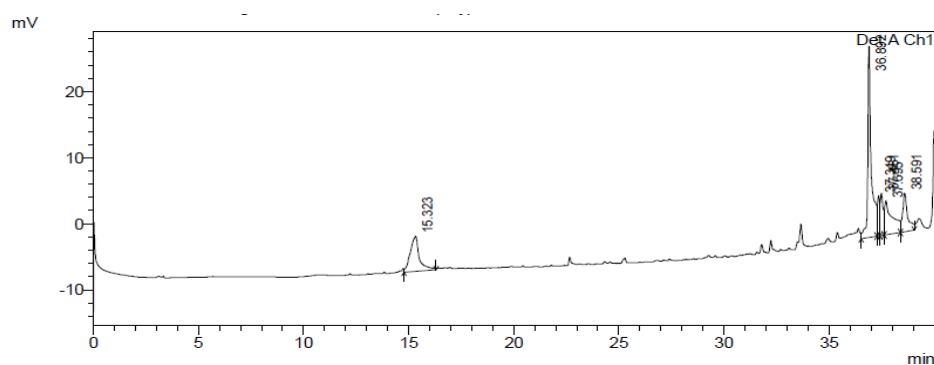


Figure 3- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de flavonoïdes obtenus avec les feuilles fraîches d'eucalyptus lavées avec l'eau distillée et récoltées à Boghni.

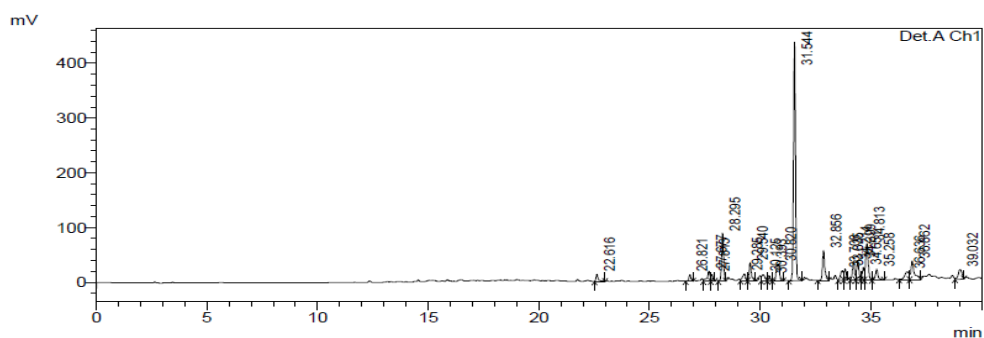


Figure 4- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de flavonoïdes obtenus avec les feuilles fraîches d'eucalyptus lavées avec l'eau distillée récoltées de Tizgirt.

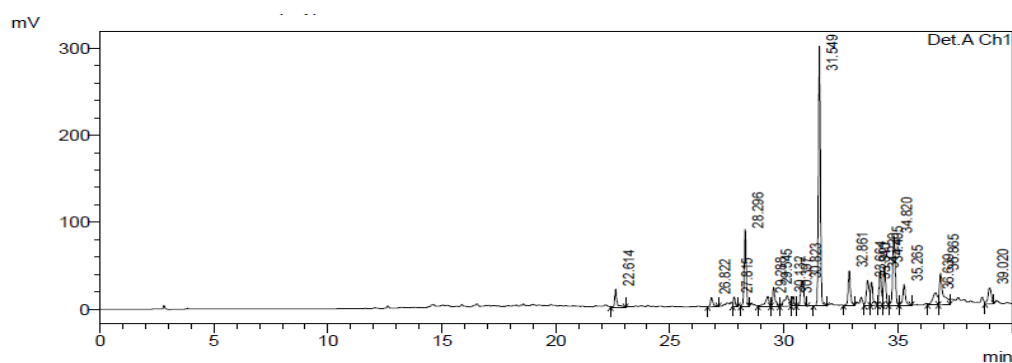


Figure 5- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de flavonoïdes obtenus avec les feuilles fraîches d'eucalyptus non lavées avec l'eau distillée et récoltées de Tizgirt.

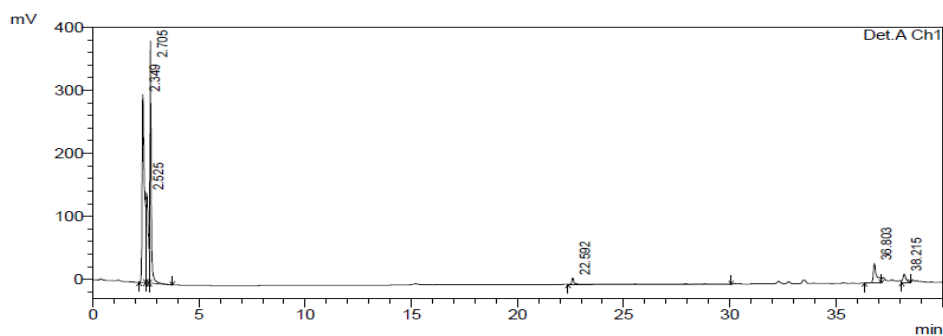


Figure 6- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de flavonoïdes obtenus avec les feuilles fraîches d'olivier non lavées avec l'eau distillée et récoltées de Boghni.

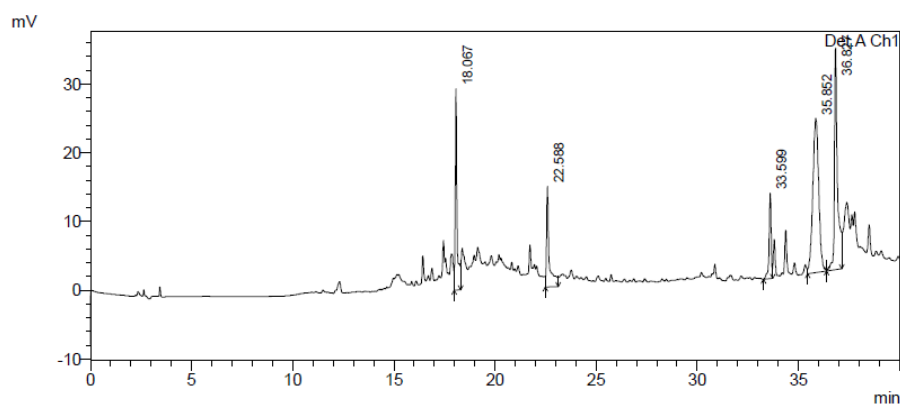


Figure 7- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de flavonoïdes obtenus avec les feuilles fraîches d'olivier lavées avec l'eau distillée et récoltées à Boghni.

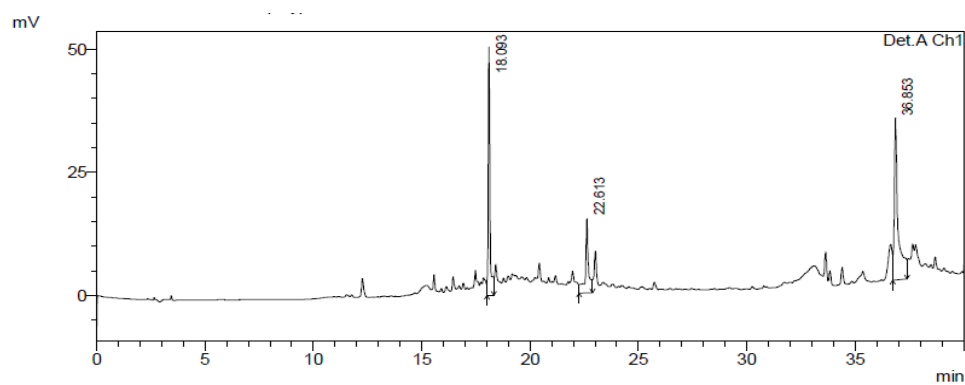


Figure 8- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de flavonoïdes obtenus avec les feuilles fraîches d'olivier non lavées avec l'eau distillée et récoltées à Tizirt.

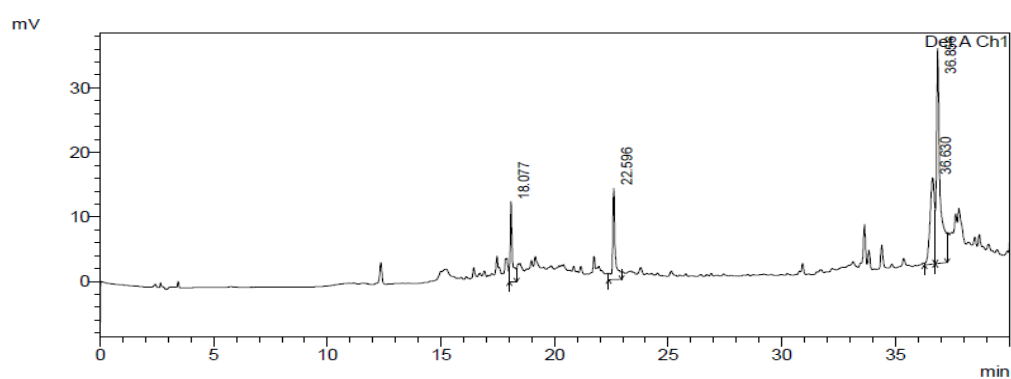


Figure 9- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de flavonoïdes obtenus avec les feuilles fraîches d'olivier lavées avec l'eau distillée et récoltées à Tizirt.

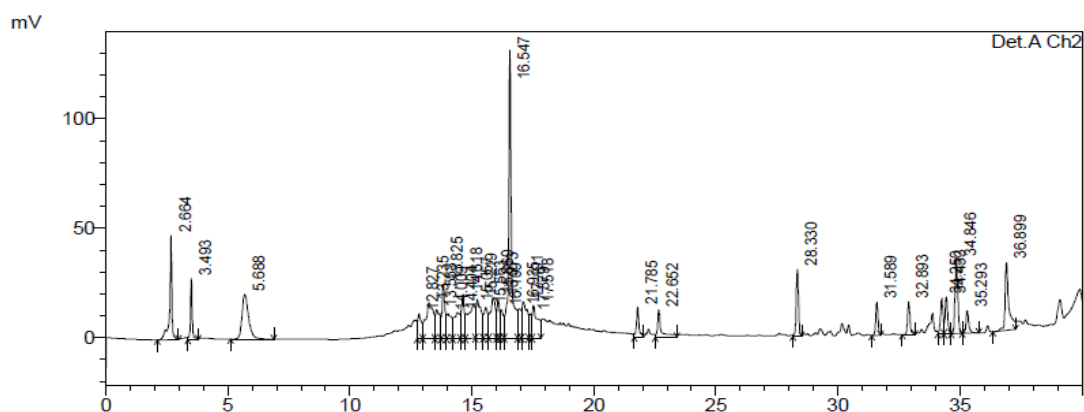


Figure 13- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de tannins obtenus avec les feuilles fraîches d'eucalyptus lavées avec l'eau distillée et récoltées à Tizirt.

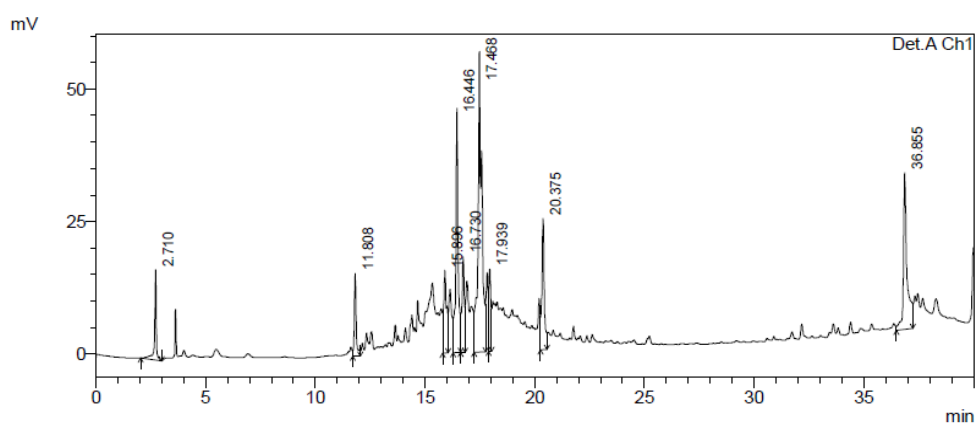


Figure 14- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de tannins obtenus avec les feuilles fraîches d'olivier non lavées avec l'eau distillée et récoltées à Boghni.

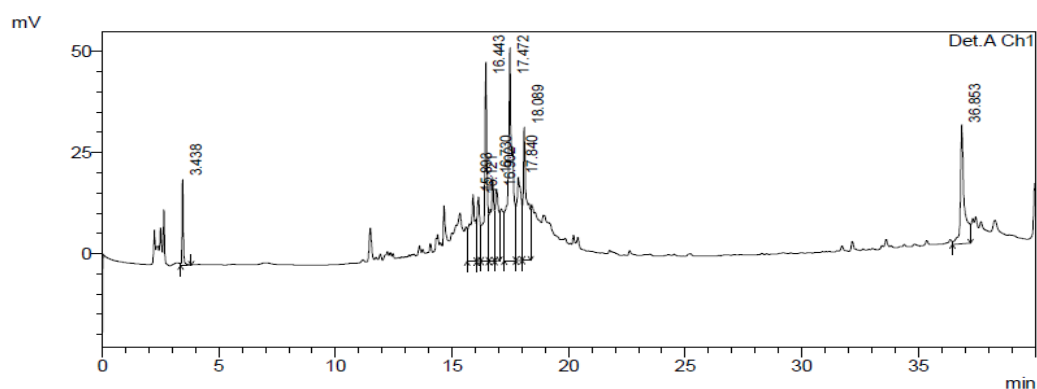


Figure 15- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de tannins obtenus avec les feuilles fraîches d'olivier lavé avec l'eau distillée et récoltées à Boghni.

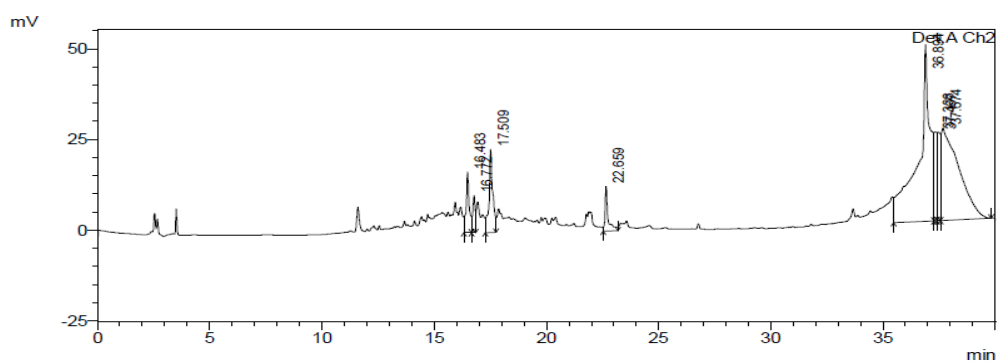


Figure 16- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de tannins obtenus avec les feuilles fraîches d'olivier non lavées avec l'eau distillée et récoltées à Tizirt.

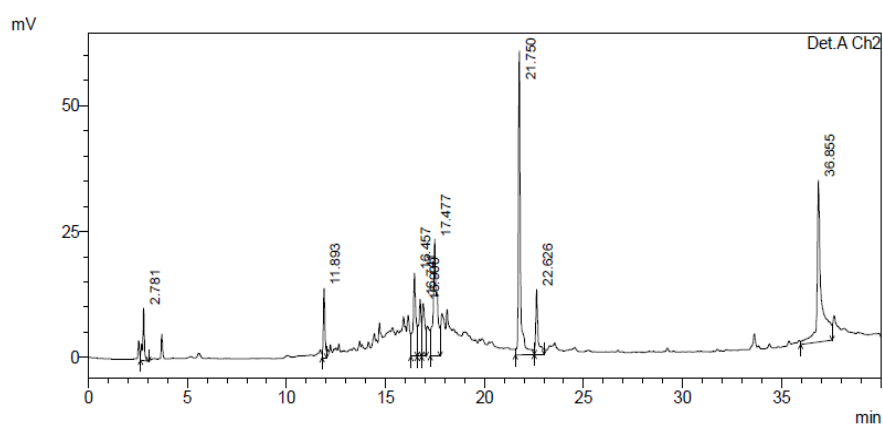


Figure 17- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de tannins obtenus des feuilles fraîches d'olivier lavées avec l'eau distillée et récoltées à Tizirt.

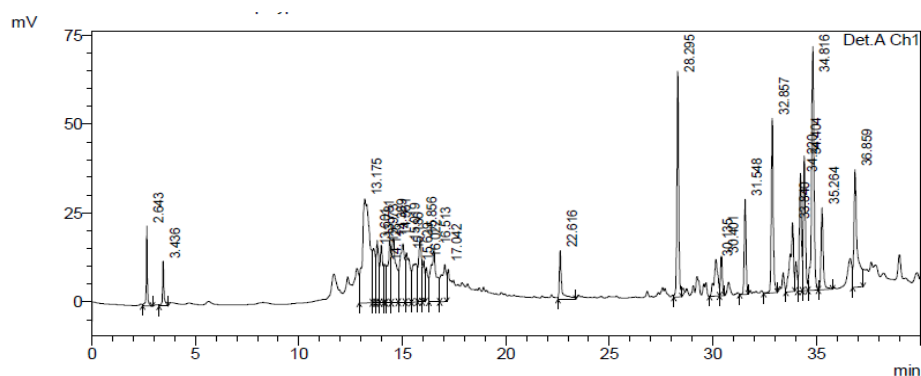


Figure 18- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de tannins obtenus avec les feuilles sèches d'eucalyptus et récoltées à Tizirt.

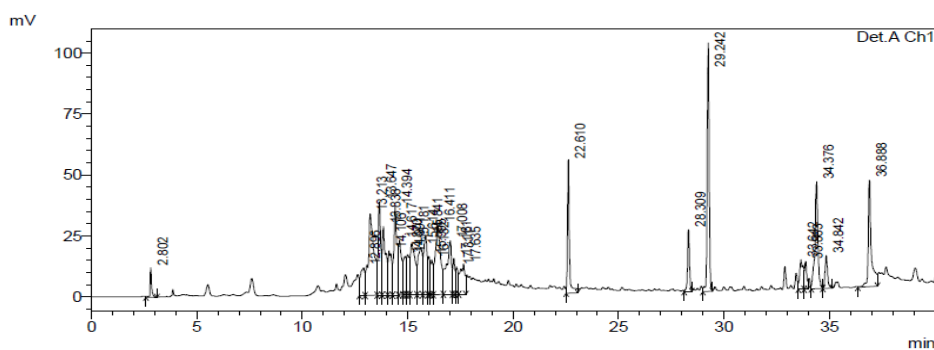


Figure 19- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de tannins obtenus des feuilles sèches d'eucalyptus récoltées à Boghni.

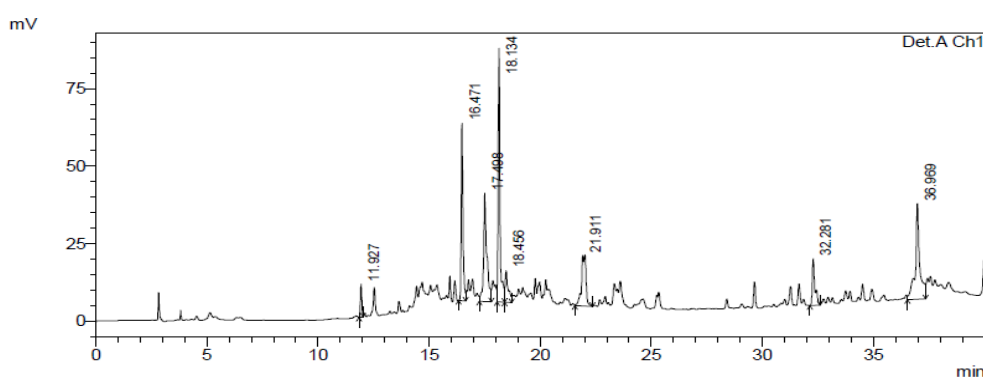


Figure 20- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de tannins obtenus des feuilles sèches d'olivier et récoltées à Boghni.

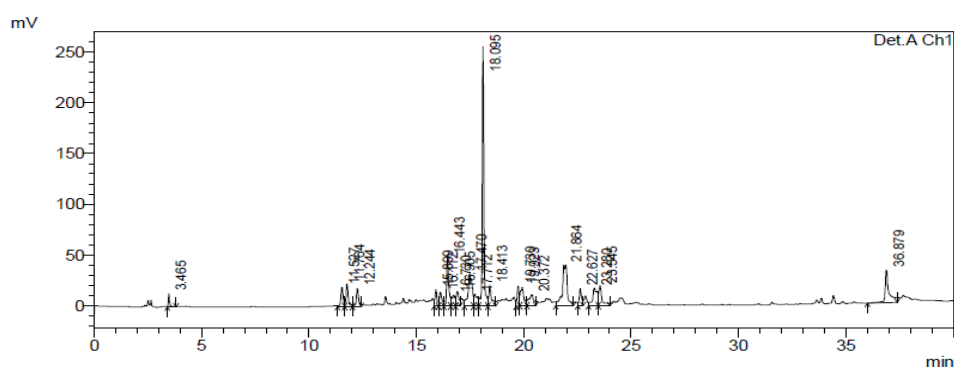


Figure 21- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de tannins obtenus des feuilles sèches d'olivier et récoltées à Tizirt.

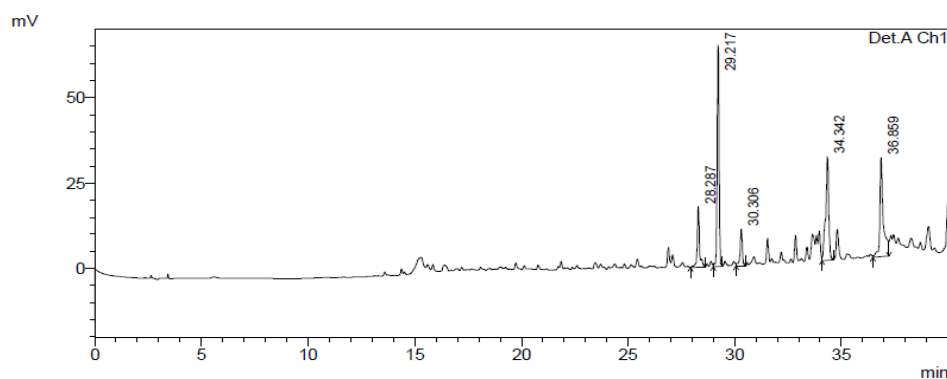


Figure 22- Chromatogramme d'analyse HPLC des extraits de flavonoïdes obtenus des feuilles sèches et récoltés à Boghni.

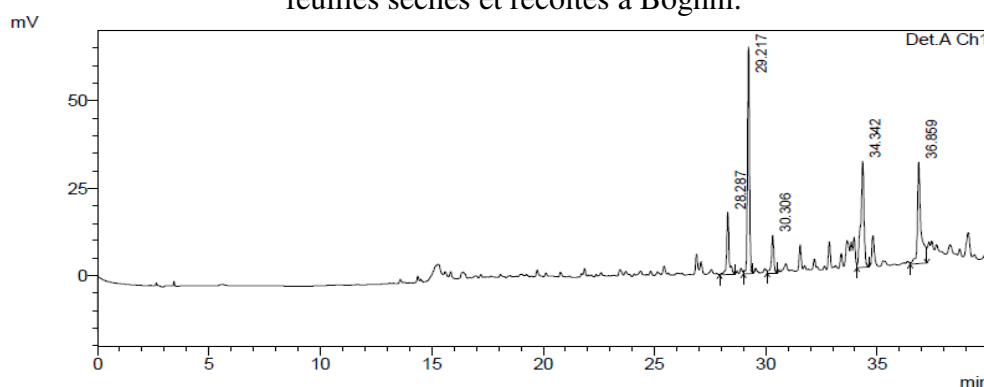


Figure 23- Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de flavonoïdes obtenus avec les feuilles sèches et récoltées à Boghni.

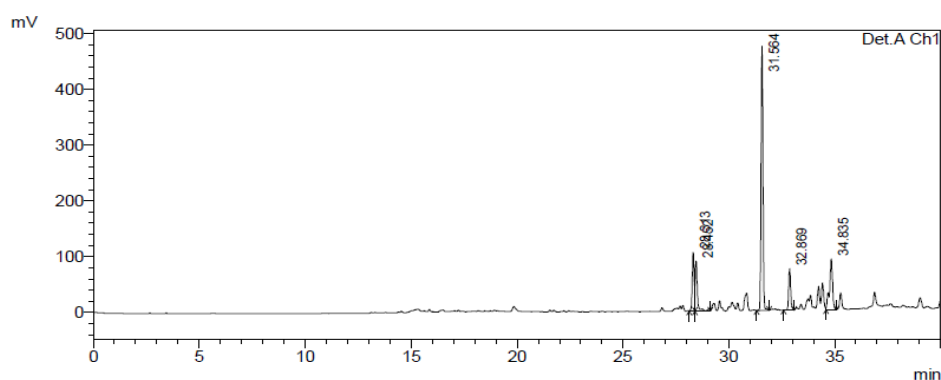


Figure 24: Chromatogramme de l'analyse HPLC des extraits de flavonoïdes obtenus des feuilles sèches et récoltées à Tizirt.

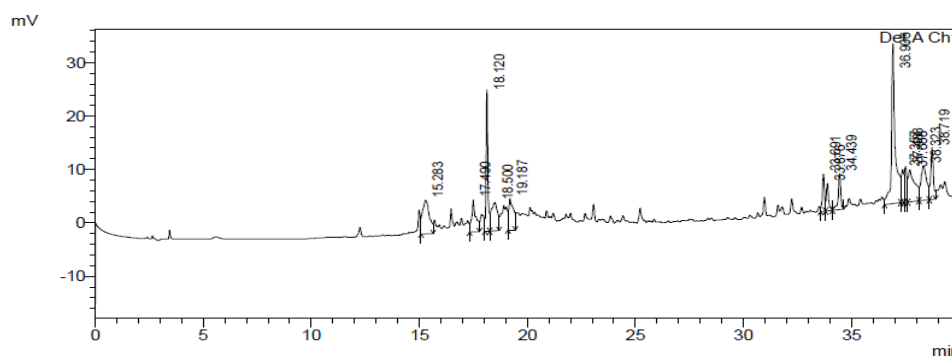


Figure25- Chromatogramme de l'analyse des extraits de flavonoïdes obtenus des feuilles sèches et récoltées à Tizirt.

Annexe 4

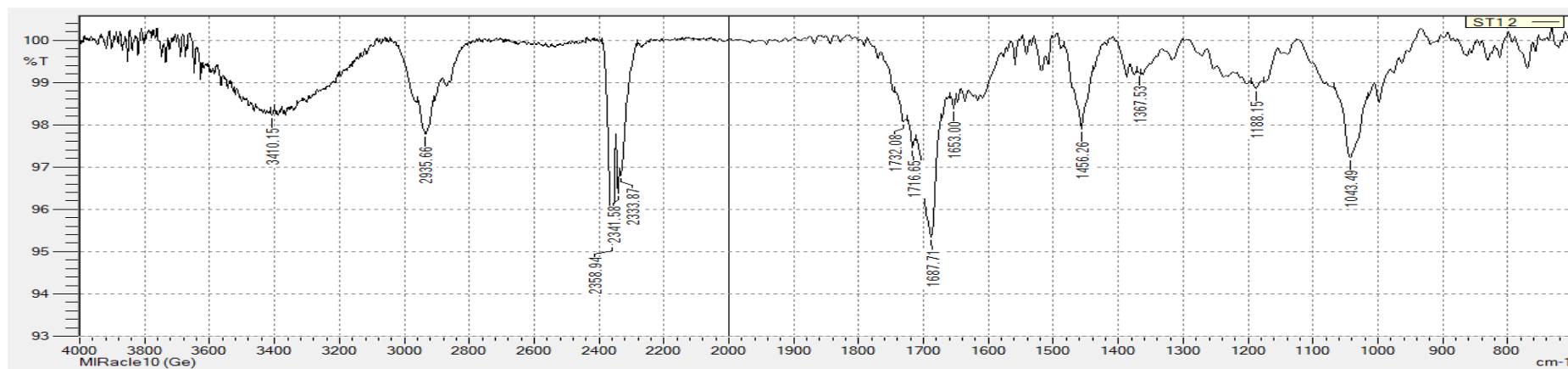


Figure 1 - Spectre infrarouge des extraits des tannins obtenus des feuilles d'eucalyptus séchées.

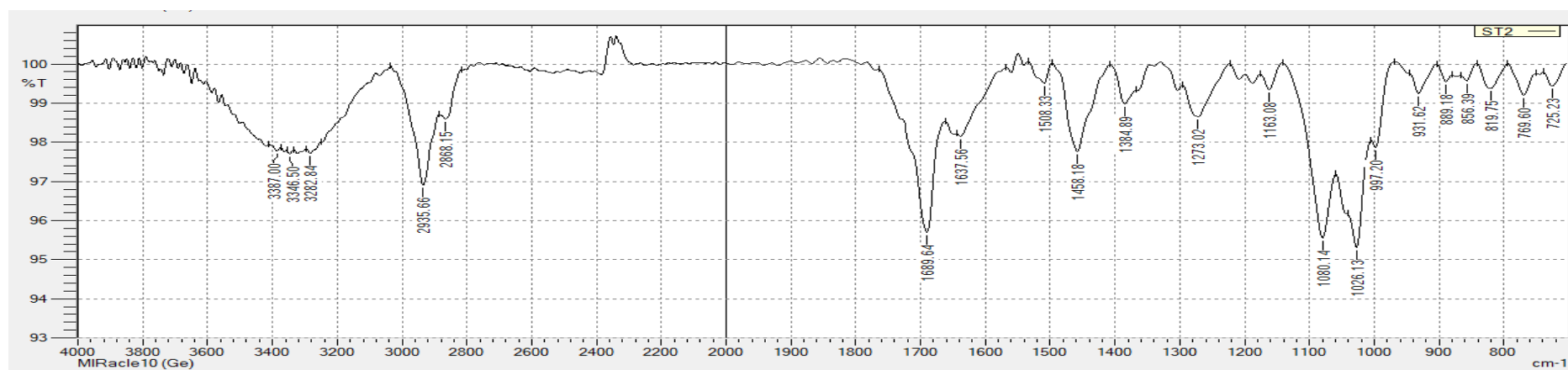


Figure 2- Spectre infrarouge des extraits des tannins obtenus des feuilles d'olivier séchées et récoltées à Tizirt.

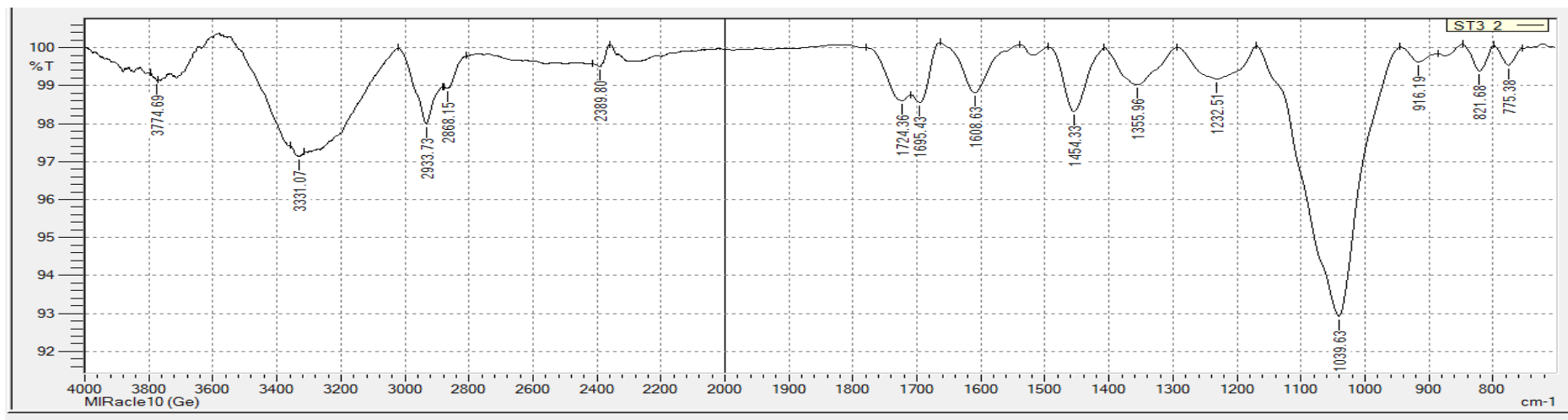


Figure 3 - Spectre infrarouge des extraits des tannins obtenus des feuilles d'eucalyptus séchées et récoltées à Boghni.

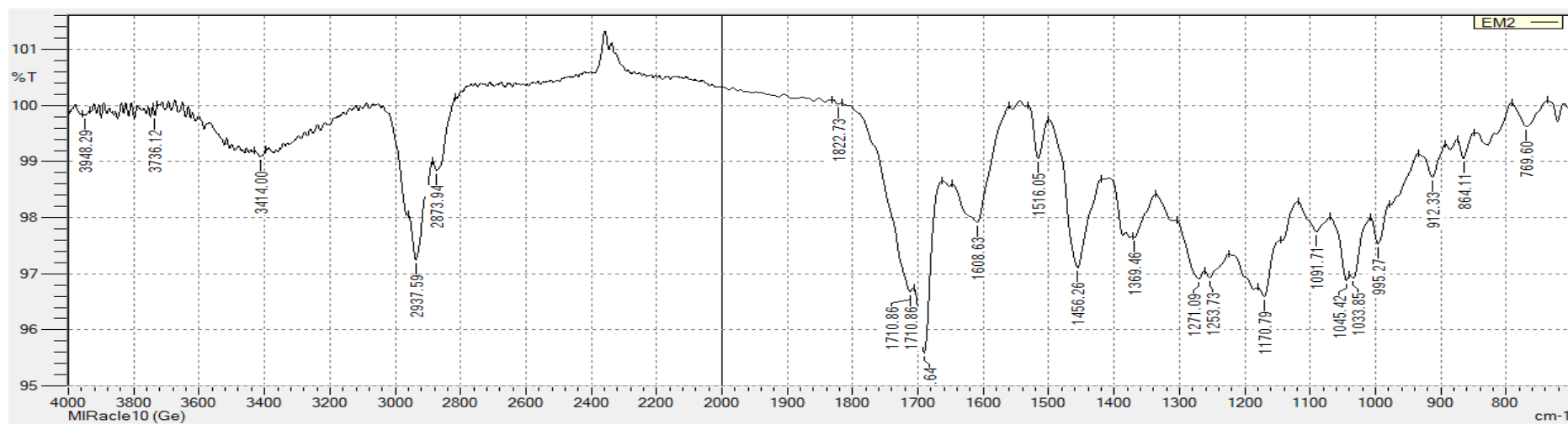


Figure 4- Spectre infrarouge des extraits de flavonoïdes obtenus des feuilles d'eucalyptus sèches et récoltées à Tizirt.

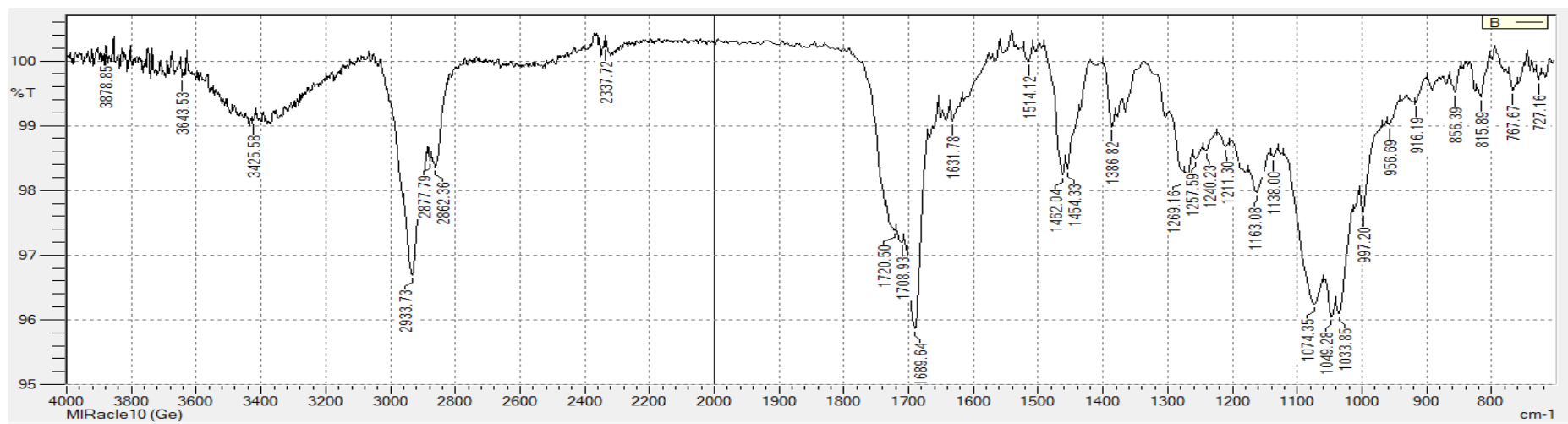


Figure 5- Spectre infrarouge des extraits de flavonoïdes obtenus des feuilles d'olivier lavé et récoltées à Boghni.