

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SALAH BOUBNIDER CONSTANTINE 3



FACULTE DE GENIE DES PROCEDES

DEPARTEMENT GENIE PHARMACEUTIQUE

N° d'ordre :... ..

Série :... ..

Mémoire de Master

Filière : Génie des Procédés

Spécialité : Génie pharmaceutique

**DEVELOPPEMENT ET OPTIMISATION D'UN PROCEDE
D'EXTRACTION HYDRO-ETHANOLIQUE EN VUE D'UNE
VALORISATION DU POTENTIEL BIOACTIF DES FEUILLES DE
LA PLANTE MEDICINALE *GLOBULARIA ALYPUM***

Dirigé par :

Dr A. BENAÏSSA-KACEM CHAOUCHÉ

Grade : Maître de Conférences classe A

Rédigé par :

IKHLEF Mohamed el Amine

NAHAL Aziza

Année Universitaire 2017/2018

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
Chapitre 1: Aperçu bibliographique	
1.1. Introduction.....	3
1.2. Aire géographique.....	4
1.3. Composition chimique et Activités biologiques.....	4
1.4. Polyphénols.....	5
1.4.1. Généralités.....	5
1.4.2. Classes des polyphénols.....	6
1.4.2.1. Flavonoïdes.....	7
1.4.2.2. Tanins.....	9
1.4.2.2.1. Tanins hydrolysables.....	9
1.4.2.2.2. Tanins condensés ou tanins catéchiques ou proanthocyanidols.....	9
1.4.2.3. Phénols simples et acides phénoliques.....	9
1.4.2.3.1. Acides phénols dérivés de l'acide benzoïque.....	10
1.4.2.3.2. Acide phénols dérivés de l'acide cinnamique.....	10
1.4.2.3.3. Phénols simples.....	10
1.4.2.4. Coumarines.....	10
1.4.2.5. Quinones.....	10
1.4.2.6. Stilbène.....	11
1.5. Les radicaux libres et pouvoir antioxydant.....	11
1.5.1. Généralités.....	11
1.5.2. Différents types des radicaux libres.....	11
1.5.3. Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes in vitro.....	11
1.6. Procédés d'extraction.....	12
1.6.1. Choix de la méthode d'extraction.....	12

1.6.2. Principaux paramètres d'extraction.....	12
1.6.3. Extraction par un solvant.....	13
1.6.3.1. Macération.....	13
1.6.3.2. Infusion.....	13
1.6.3.3. Décoction.....	13
1.6.4. Soxhlet.....	13
1.6.5. Distillation.....	14
1.6.6. Extraction au CO ₂ supercritique.....	15
1.6.7. Extraction aux ultrasons.....	16
1.7. Plans d'expériences.....	17
1.7.1. Définition d'un plan d'expérience.....	17
1.7.2 Plans de surfaces et de réponse (MSR).....	18
1.7.3. Plans de Box-Behnken à 3 facteurs	18
1.7.3.1. Modèle mathématique postulé.....	18
1.8. Techniques d'analyse.....	19
1.8.1 Analyse par spectrophotométrie (UV-visible).....	19
1.8.1.1. Principe.....	20
1.8.1.2. Spectrophotomètre UV-visible.....	20
1.8.1.3. Analyse qualitative et quantitative en spectrophotométrie UV-vis.....	21
1.8.1.3.1. Analyse qualitative.....	21
1.8.1.3.2. Analyse quantitative : Loi de Beer-Lambert.....	21
1.8.2. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	23
1.8.2.1. Principe de la HPLC.....	23
1.8.2.2. Appareillage.....	24
1.8.2.2.1. Réservoir de la phase mobile.....	24
1.8.2.2.2. Pompe.....	24
1.8.2.2.3. Injecteur.....	25
1.8.2.2.4. Colonne.....	25
1.8.2.2.5. Détecteur.....	26

1.8.2.2.6. Enregistreur.....	26
Chapitre 2: Matériel et Méthodes	
2.1. Matériel utilisé.....	28
2.2. Réactifs et produits chimiques.....	28
2.3. Verrerie utilisée au laboratoire.....	29
2.4. Matériel végétal.....	29
2.5. Procédures expérimentales.....	29
2.5.1. Obtention des extraits par diverses techniques d'extraction : Etude comparative.....	29
2.5.1.1. Macération.....	30
2.5.1.2. Infusion.....	30
2.5.1.3. Décoction.....	31
2.5.2. Evaporation des filtrats obtenus.....	31
2.6. Détermination du rendement de masse extraite	32
2.7. Screening phytochimique.....	32
2.7.1. Introduction.....	32
2.7.2. Détection des polyphénols.....	33
2.7.3. Coumarines.....	33
2.7.4. Flavonoïdes (test de réactif alcalin)	33
2.7.5. Saponines.....	34
2.7.6. Tanins.....	34
2.7.7. Terpènes.....	34
2.8. Méthode de Folin-Ciocalteu.....	34
2.8.1. Principe.....	34
2.8.2. Mode opératoire.....	35
2.8.2.1. Détermination de la courbe d'étalonnage.....	35
2.8.2.2. Mise en œuvre de la réaction avec le Folin-ciocalteu.....	35
2.8.3. Dosage des polyphénols totaux dans les extraits de la plante <i>Globularia alypum</i> issus des quatre procédés d'extraction.....	36
2.9. Dosage des flavonoïdes totaux.....	36
2.10. Dosage des tanins condensés (proanthocyanidines).....	36

2.10.1. Mode opératoire.....	37
2.11. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH.....	37
2.11.1 Généralités.....	37
2.11.2. Principe de la méthode.....	38
2.11.3. Protocole expérimental.....	38
2.11.4. Calcul du taux d'inhibition.....	39
2.12. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	40
2.12.1. Test de diffusion en milieu gélosé.....	40
2.13. Optimisation.....	41
2.13.1. Caractéristiques des facteurs.....	41
2.13.2. Caractéristiques du plan.....	42
2.13.3. Matrice d'expérience.....	42
2.13.4. Optimisation des paramètres pour l'extraction des polyphénols totaux.....	43
2.14. Analyse qualitative par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	44
2.15. Chromatographie en phase liquide sur colonne (CPL).....	45
2.15.1. Principe.....	45
2.15.2. Réalisation d'une colonne CPL.....	46
2.15.3. Fractionnement des différents extraits sur colonne CPL.....	46
2.16. Analyse des extraits par spectrophotométrie UV-visible.....	47
Chapitre 3 : Résultats et discussion	
3.1. Etude comparative entre la macération (éthanolique/méthanolique), la décoction et l'infusion.....	49
3.1.1. Calcul des rendements issus des extraits.....	49
3.1.2. Détection de quelques métabolites secondaires.....	50
3.1.2.1. Screening phytochimique.....	51
3.1.2.1.1. Composés phénoliques.....	51
3.1.2.1.2. Coumarines.....	51
3.1.2.1.3. Flavonoïdes.....	51
3.1.2.1.4. Saponines.....	52
3.1.2.1.5. Tanins.....	52

3.1.2.1.6. Terpènes.....	53
3.1.2.1.7. Discussion des résultats du criblage phytochimique.....	53
3.1.2.2. Evaluation de la teneur en polyphénols totaux dans les différents extraits par la méthode de Folin-ciocalteu.....	54
3.1.2.2.1. Courbe d'étalonnage pour l'évaluation des polyphénols totaux	54
3.1.2.2.2. Dosage des polyphénols totaux dans les extraits de <i>Globularia alypum</i>	55
3.1.2.3. Evaluation de la teneur en flavonoïdes des différents extraits.....	57
3.1.2.3.1. Courbe d'étalonnage pour l'évaluation des Flavonoïdes totaux	57
3.1.2.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux des extraits bruts obtenus.....	58
3.1.2.3.3. Evaluation de la teneur en tanins condensés dans les différents extraits.....	59
3.1.3. Activité biologique.....	60
3.1.3.1. Activité anti-oxydante (Test au DPPH)	60
3.1.3.2. Evaluation du pouvoir antioxydant : Calcul de l'IC ₅₀	61
3.1.4. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	64
3.2. Optimisation de l'extraction à l'éthanol-eau.....	66
3.2.1. Plan d'expériences Box-Behnken.....	66
3.2.2. Modèle mathématique.....	67
3.2.3. Analyse de la variance (ANOVA).....	67
3.2.4. Etude des interactions.....	68
3.2.5. Evaluation des paramètres optimaux et leur validation.....	69
3.3. Analyse chromatographique en phase liquide.....	70
3.3.1. Analyse qualitative par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	70
3.3.2. Chromatographie en phase liquide sur colonne (CPL).....	71
3.3.3. Analyse statistique des résultats obtenus.....	72
Conclusion générale et perspectives.....	74

Références bibliographiques

Annexe

RÉSUMÉ

Globularia alypum est une plante très utilisée dans la médecine traditionnelle en Algérie, connues sous le nom « Tasselgha », elle est très efficace dans le traitement de diverses maladies telles que le diabète, les maladies cardio-vasculaires et peut-être indiquée comme cicatrisante et antiseptique en plus de son effet antioxydant et antimicrobien, d'où l'intérêt de mener cette étude.

Dans un premier lieu, nous avons réalisé une étude comparative de trois techniques d'extraction des composés phénoliques contenus dans les feuilles de *Globularia alypum* : extraction par macération (méthanol aqueux, 80 %), (éthanol aqueux, 80%) avec agitation (1300 (tour/min)) pendant 19 minutes, décoction (eau bouillante, 19 min) et infusion (eau chaude, 19 min). La comparaison a été portée sur : le rendement d'extraction des métabolites visés, screening phytochimique (test des colorations), dosage des composés phénoliques (Folin-Ciocalteu), des flavonoïdes (AlCl₃) et des tannins condensés (Butanol-HCl avec FeSO₄), en plus de l'activité antioxydante (par DPPH) et l'efficacité antibactérienne (par diffusion sur disque Agar) des extraits obtenus envers les souches (*E-coli*, *Klebsiella Pneumoniae* à gram négatif et *Bacillus subtilis* à gram positif).

En d'autre part, on a opté pour une étude d'optimisation des paramètres opératoires (masse, agitation, temps) influençant l'extraction des polyphénols totaux par macération hydro-éthanolique (80%) de la poudre des feuilles de *Globularia alypum*, suite à son efficacité qui est très proche de celle du méthanol aqueux (80%), moins chère et plus sûr.

Par ailleurs, une analyse qualitative par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été réalisée pour l'extrait optimal obtenu (éthanolique aqueux 80%), afin de vérifier les conditions opératoires de l'analyse chromatographique, puis, une séparation sur colonne chromatographique phase liquide (CPL) s'ensuive, pour obtenir une séparation des composés présents dans l'extrait, et enfin, une analyse par HPLC a été réalisée pour quelques fractions choisies (12,13), ce qui a mené à avoir un pic majoritaire (la surface du pic de la fraction 13 est largement supérieure à celui de la fraction 12), finalement, la méthode d'analyse de la fraction 13 a été validée par un coefficient de variation inférieur à 5% (excellent), ceci nous permet de conclure que la méthode utilisée est juste et fidèle (pics superposés).

Mots clés : *Globularia alypum*, composés phénoliques, Flavonoïdes, méthode Folin-Ciocalteu, activité antioxydante (DPPH), activité antimicrobienne, optimisation, analyse chromatographique, HPLC, colonne chromatographique, spectrophotomètre UV-Visible.