



République Algérienne démocratique et populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen

Faculté des Sciences de la nature et de la vie et des Sciences de la terre et de l'Univers

Département de Biologie et Environnement

Laboratoire des produits naturels

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Option : «Sciences des aliments»

Thème

**Contribution à l'étude phytochimique de quelques métabolites secondaires
(tanins, flavonoïdes et alcaloïdes) de la racine de *Carlina acaulis L.* de la
région de Tlemcen**

Présenté par :

Mr KHENAFOU KHALIL

Devant le jury, composé de :

Président :	Mr BENAMMAR C.H.	Maitre de conférences A
Encadreur :	Mr BEGHADAD M.C.	Maitre de conférences A
Examinatrice :	Mme SOUALEM Z.	Maitre de conférences B

Année universitaire 2016-2017

Remerciements

Mes remerciements les plus vifs s'adressent à mon encadreur le Dr. BEGHADAD Mohammed Choukri : Maître de Conférence classe A (M.C.A.) à la faculté des sciences de l'Université de Tlemcen, qui a bien voulu diriger ce travail, je lui exprime mes sentiments de reconnaissance les plus sincères pour sa précieuse aide, sa patience, sa disponibilité et ses conseils.

Je tiens également à remercier les membres du jury pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'évaluer et de juger ce travail, tout particulièrement le Dr. BENAMMAR Chahid El-Hocine : Maître de Conférence classe A (M.C.A.) en sa qualité de Président, ainsi qu'à Mme SOUALEM Zoubida : Maître de Conférence, examinatrice du jury.

Comme j'exprime aussi ma profonde reconnaissance et ma gratitude à Mme MOTAS Fatima : Doctorante, pour son aide tout au long de mes travaux ainsi qu'à tout le personnel du Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA) de l'université de Tlemcen, notamment l'ingénieur Mme Fatima.

Je ne saurais oublier enfin de remercier toutes les personnes que je n'ai pas pu citer leurs noms ici, et qui ont participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail. Ainsi que l'ensemble des enseignants qui ont contribué à ma formation.

Dédicaces

A,

Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien moral, tous ces sacrifices consentis et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mon père, pour ses précieux conseils, pour son assistance et pour ces longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie, puisse dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venus de toi.

Mon frère Nadjib, ma tante Zohra, mes cousins Othmane, Mohamed, Mourad et à toute ma famille qui n'ont cessé d'être pour moi un soutien indéfectible durant la préparation de ce mémoire.

Mes amis, en particulier Nasro, Mehdi et Riad pour leurs encouragements permanents.

Résumé

Carlina acaulis L. connue par le nom vernaculaire « Tafgha » est une plante médicinale de la famille des astéracées qu'on trouve au sein de la riche flore de la région de Tlemcen. Les résultats des tests phytochimiques révèlent la richesse des alcaloïdes dans les racines, par contre les flavonoïdes et les tanins présentent une quantité moins importante que les premiers. Le rendement de l'extrait brut de la partie racine de *Carlina acaulis L.* déterminé au moyen de deux solvants qui sont le méthanol/eau et l'acétone/eau révèle des taux de 15,49% et 7,52% respectivement. Les rendements des alcaloïdes, des flavonoïdes et des tanins sont estimés respectivement à 10,48%, 1,20% et 1,18%. Les résultats obtenus par le dosage affichent une teneur de 18,2 mg /g MS pour les polyphénols totaux suivie par la teneur des tanins hydrolysables avec 0,72 mg /g MS, puis celle des flavonoïdes avec 0,22 mg /g MS et à la fin une teneur faible en tanins condensés de l'ordre de 0,028 mg /g MS.

Mots clés : *Carlina acaulis L.*, région de Tlemcen, métabolites secondaires, polyphénols, alcaloïdes, étude phytochimique.

Abstract

Carlina acaulis L. known by the vernacular name "Tafgha" is a medicinal plant of the Asteraceae family found within the rich flora of the Tlemcen region. The results of the phytochemical tests reveal the richness of the alkaloids in the roots, whereas the flavonoids and the tannins present a smaller quantity than the first. The yield of the crude extract of the root portion of *Carlina acaulis* L. determined using two solvents, methanol / water and acetone / water, was 15.49% and 7.52%, respectively. The yields of alkaloids, flavonoids and tannins are estimated at 10.48%, 1.20% and 1.18% respectively. The results obtained by the assay show a content of 18.2 mg /g MS for total polyphenols followed by the content of hydrolyzable tannins with 0.72 mg /g MS and then that of flavonoids with 0.22 mg /g MS and At the end, a low content of condensed tannins of the order of 0.028 mg /g MS.

Key words: *Carlina acaulis* L., Tlemcen region, secondary metabolites, polyphenols, alkaloids, phytochemical study.

Liste des figures

Figure 1 : Oxyde de carline	p 4
Figure 2 : Structure de quelques composés phénoliques	p 8
Figure 3 : Structure de l'acide gallique	p 8
Figure 4 : Biosynthèse des polyphénols par la voie shikimate	p 9
Figure 5 : Structure de la chalcone	p 9
Figure 6 : Biosynthèse des polyphénols par la voie d'acétate	p 10
Figure 7 : Structure de base des flavonoïdes	p 11
Figure 8 : Schéma de la biosynthèse des flavonoïdes illustrant les voies de l'acétyl CoA et de la phénylalanine	p 13
Figure 9 : Structure chimique des tanins hydrolysables	p 14
Figure 10 : Structure chimique des tanins condensés	p 15
Figure 11 : Structure de quelques alcaloïdes	p 17
Figure 12 : Organigramme des tests phytochimiques	p 22
Figure 13 : Teneur en eau des racines de <i>Carlina acaulis</i> L.	p 30
Figure 14 : Rendement des extrait bruts de méthanol et de l'acétone	p 32
Figure 15 : Rendement massique des polyphénols de <i>Carlina acaulis</i> L.....	p 33
Figure 16 : Comparaison du rendement des tanins.....	p 34
Figure 17 : Comparaison du rendement des flavonoïdes	p 35
Figure 18 : Comparaison du rendement des alcaloïdes	p 35
Figure 19 : Comparaison des phénols totaux de <i>Carlina acaulis</i> L.....	p 37
Figure 20 : Comparaison des teneurs des flavonoïdes de <i>Carlina acaulis</i> L.....	p 38
Figure 21 : Comparaison des teneurs des tanins condensés et hydrolysables de <i>Carlina acaulis</i> L.....	p 39

Liste des photos

Photo 1 : La région de récolte de <i>Carlina acaulis</i> L. (Terni).....	p 19
Photo 2 : <i>Carlina acaulis</i> L. au champ de la récolte	p 19
Photo 3 : Racines de <i>Carlina acaulis</i> L. après le séchage	p 20
Photo 4 : L'agitation	p 24
Photo 5 : Filtration de l'extrait brut.....	p 24
Photo 6 : Evaporation	p 24
Photo 7 : Filtration des tanins	p 25
Photo 8 : Décantation des tanins.....	p 25
Photo 9 : Ebullition à reflux des flavonoïdes	p 26
Photo 10 : Décantation des alcaloïdes.....	p 27

Liste des abréviations

HCl: Acide chlorhydrique
AcOEt : Acétate d'éthyle
CaCO₃: Carbonate de calcium
NH₄OH : Hydroxyde d'ammonium
MgSO₄ : Sulfate de magnésium
Na₂CO₃ : Le carbonate de sodium
FeCl₃ : Chlorure ferrique
AlCl₃ : Trichlorure d'aluminium
H₂SO₄ : Acide sulfurique
Rd : Rendement
DO : Densité optique
H % : Taux d'humidité
MS : Matière sèche

Liste des unités

ml: Millilitre
l : Litre
mg: Milligramme
g: Gramme
Min: Minute
%: Pourcentage
H: Heure
V: Volume
T⁰: Température
C: Concentration
M : Masse
P : Poids

Table des matières

Introduction générale	p 1
-----------------------------	-----

1^{ère} PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : PRESENTATION DE *Carlina acaulis* L.

I- Origine et répartition géographique	p 3
II- Description botanique	p 4
III- Composition chimique.....	p 4
IV- Ecologie	p 4
V- Propriétés thérapeutiques et médicinales	p 5
VI-Travaux antérieurs.....	p 6

Chapitre 2 : METABOLITES SECONDAIRES

I- Les composés phénoliques	p 7
I.1- Biosynthèse des polyphénols	p 8
I.1.1- Voie de l'acide shikimique	p 8
I.1.2- Voie de l'acide d'acétate	p 9
I.2- Propriétés biologiques	p 10
II- Les flavonoïdes	p 11
II.1- Définition	p 11
II.2- Structure	p 11
II.3- Localisation et distribution	p 12
II.4- Rôles	p 12
II.5- Biosynthèse	p 12
III- les tanins	p 13
III.1- Les tanins hydrolysables	p 14
III.2- Les tanins condensés	p 14
III.3- Rôles	p 15
III.4- Biosynthèse	p 15
III.5- Métabolisme et toxicité	p 16
III.5.1- Propriétés chimiques	p 16
III.5.2- Inhibiteurs de la digestion	p 16
IV- Les alcaloïdes	p 16
IV.1- Définition	p 16
IV.2- Rôles	p 16
IV.3- Propriétés physico-chimiques.....	p 17
IV.4- Biosynthèse.....	p 18

2^{ème} PARTIE : MATERIEL ET METHODES

I- Collecte du matériel végétal.....	p 19
II- Détermination de la teneur en eau.....	p 20
II.1- Principe.....	p 20
II.2- Mode opératoire.....	p 20
II.3- Expression des résultats.....	p 21
III- Tests phytochimiques.....	p 21
III.1- Principe.....	p 21
III.2- Mode opératoire.....	p 21
IV- Alcaloïdes.....	p 23
V- Flavonoïdes.....	p 23
VI- Tanins.....	p 23
VII- Extractions.....	p 23
VII.1- L'extrait brut (méthanol / eau).....	p 23
VII.2- L'extrait brut (Acétone / eau).....	p 24
VIII- Extractions sélectives.....	p 25
VIII.1- Extraction des tanins.....	p 25
VIII.1.1- Principe.....	p 25
VIII.1.2- Mode opératoire.....	p 25
VIII.1.3- Expression des résultats.....	p 25
VIII.2- Extraction des flavonoïdes.....	p 26
VIII.2.1- Mode opératoire.....	p 26
VIII.2.2- Expression des résultats.....	p 26
VIII.3- Extraction des alcaloïdes.....	p 27
VIII.3.1- Principe.....	p 27
VIII.3.2- Mode opératoire.....	p 27
VIII.3.3- Expression des résultats.....	p 27
IX- Dosage.....	p 28
IX.1- Extraction des phénols totaux.....	p 28
IX.2- Dosage des phénols totaux (réactif de Folin Ciocalteu).....	p 28
IX.2.1- Principe.....	p 28
IX.2.2- Mode opératoire.....	p 28
IX.3- Dosage des tanins condensés.....	p 28
IX.3.1- Principe.....	p 28
IX.3.2- Mode opératoire.....	p 29
IX.3.3- Expression des résultats.....	p 29
IX.4- Dosage des tanins hydrolysables.....	p 29
IX.4.1- Principe.....	p 29
IX.4.2- Mode opératoire.....	p 29
IX.5- Dosage des flavonoïdes.....	p 29
IX.5.1- Principe.....	p 29
IX.5.2- Mode opératoire.....	p 29
IX.5.3- Expression des résultats.....	p 29

3^{ème} PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION

I- Détermination du taux de matière sèche.....	p 30
II- Tests phytochimiques.....	p 31
III- Extractions sélectives.....	p 32
III.1- Rendement de l'extrait brut.....	p 32
III.2- Rendement des tanins.....	p 33
III.3- Rendement des flavonoïdes.....	p 34
III.4- Rendement en alcaloïdes	p 35
IV- Dosage.....	p 36
IV.1- Dosage des polyphénols totaux.....	p 36
IV.2- Dosage des flavonoïdes.....	p 37
IV.3- Dosage des tanins.....	p 38
V- Synthèse.....	p 40
Conclusion générale	p 41
Références bibliographiques	p 42
Annexe	p 47

INTRODUCTION

Depuis l'antiquité, les humains apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes. A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales. Si certaines pratiques médicales qui y sont liées, paraissent étranges et relèvent de la magie, d'autres au contraire semblent plus fondées et plus efficaces. Pourtant, toutes ont pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des humains. [\[Verdrager, 1978\]](#)

Actuellement l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime environ 80% des habitants de la planète ont recours aux médecines traditionnelles à base de plante en tant que soins de santé primaire. [\[Bérubé, 2006\]](#)

La phytothérapie, qui propose des remèdes naturels, est bien acceptée par l'organisme et souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques, comme l'asthme ou l'arthrite. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. On estime que 10 à 20% des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques. [\[Verdrager, 1978\]](#)

Une des originalités majeures de plantes médicinales réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides), ils accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais représente une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire. [\[Jeun, 2005\]](#)

Parmi ces composés on retrouve les polyphénols qui font partie de la famille des molécules organiques anti oxydantes, tout comme les caroténoïdes, la vitamine C et la vitamine E, ils sont dotés de multiples vertus thérapeutiques et jouent un rôle très important, principalement, dans la lutte contre les cancers, les maladies cardiovasculaires. Ils interviennent aussi dans la protection des plantes contre les différentes attaques microbiennes (surtout fongiques) risquant de causer la perte d'une grande quantité de végétation. [\[Bruneton, 1999\]](#)

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une plante médicinale qu'on trouve au sein de la riche flore de la région de Tlemcen en l'occurrence *Carlina acaulis L.*, et ce dans un but de la valoriser en quantifiant les teneurs de ses composés phénoliques et autres alcaloïdes et en évaluant le dosage des extraits obtenus.

Notre travail s'articule en quatre parties :

La première partie est réservée à l'étude bibliographique et comprend :

- Des généralités sur *Carlina acaulis* L. notamment sur la classification, la répartition, la composition chimique, l'écologie et les propriétés thérapeutiques (Chapitre 1).
- Un aperçu général sur les métabolites secondaires passant en revue leurs structures, rôles, biosynthèses et autres propriétés (Chapitre 2).

La deuxième partie décrit le protocole expérimental effectué au niveau du laboratoire.

La troisième partie consiste à interpréter et discuter les résultats obtenus.

La quatrième partie clôt notre travail par la conclusion et perspectives.

Chapitre 1: PRESENTATION DE « *Carlina acaulis L.* »

I- ORIGINE ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE

L'aire de répartition de *Carlina acaulis L.* se trouve essentiellement aux massifs montagneux d'Europe occidentale et centrale (Alpes, Pyrénées, Jura, Vosges, Apennins, Balkans). On la trouve aussi en Espagne, en Andorre, en France, en Italie, en Suisse, en Allemagne et en Afrique du nord. [Berger, 2012]

Du latin **Carolus**, Charlemagne aurait employé les racines de cette plante pour guérir ses soldats de la peste. Pour d'autres il s'agirait de Charles-Quint. Selon d'autres, enfin, **Carlina** proviendrait d'une déformation de **Cardina** (et finalement de **Carduus**) et signifierait « petit Chardon » ; **acaulis** de **a** privatif et **caulos** (grec) tige. [Garnier et al, 1961]

Suivant le pays dans lequel on se trouve, *Carlina acaulis L.* prend le nom de :

- Dwarf thistle, silver thistle, stemless carline, stemless carline-thistle. (Anglais)
- Carldistel, großewetterdistel, silberdistel, stengelloseeberwurz. (Allemand)
- Cardo de puertoa, cardo de san Pelegrin. (Espagnol)
- Carlinabianca, carlopinto. (Italien)
- Zilverdistel. (Néerlandais)

[Benoît, 2009].

Carlina acaulis L. est connue sous diverses appellations entre autres :

- Carline
- Carline à tige courte carline sans tige,
- Carline des alpes
- Chardon doré
- Chardonette
- Chardousse
- Baromètre
- Caméléon blanc
- Artichaut sauvage
- Gardabelle, [Bernard Kuballa, 2001]

La classification de *Carlina acaulis L.* est réalisée selon la classification de John (2000) :

Embranchement : Spermatophytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Eudicotylédones

Ordre : Asterales

Famille : Asteraceae

Genre : *Carlina*

Genre espèce : *Carlina acaulis L.*

II- DESCRIPTION BOTANIQUE

Carlina acaulis L. est une plante herbacée vivace sans tige, plutôt coriace, qui mesure entre 10 et 30 centimètres de hauteur. Elle présente une racine assez importante, son feuillage disposé en rosette basilaire avec des feuilles plus ou moins épineuses et divisées, la plante développe à l'extrémité d'une tige courte de 20 à 40 cm un capitule par rosette, de 8 à 10 cm de diamètre, son inflorescence est faite de capitule simple avec des fleurs argentées, blanches ou vertes et visibles surtout durant la période allant d'août à septembre. La plante a une durée de vie limitée et sa floraison se déroule de mai- juin à août- septembre. [Bernard, 2001]

La plante a une tige nulle ou à peu près. Les fleurs sont disposées en capitules, ces derniers, sont gros, larges de 6 à 12 cm. L'involucre est hémisphérique, les bractées extérieures sont très inégales, divisées, épineuses, assez semblables aux feuilles ordinaires de la plante, les bractées inférieures sont membraneuses, d'un blanc argenté, souvent violacées en dessous, très visibles, étalées en rayonnant. Le calice est constitué de poils, la corolle est formée de cinq pétales soudés en tube. Les étamines sont insérées sur la corolle à filets libres entre eux, mais à anthères introrsées soudées entre elles et portant à leur base deux filaments plumeux. Le style est bifurqué en deux branches stigmatiques, épaissi et velu vers le haut en dessous de la bifurcation. L'ovaire est uniloculaire à carpelles à placentation pariétale. Les akènes sont soyeux, l'aigrette se détache à la maturité. Les feuilles de la plante sont sans stipules, toutes pétiolées, profondément divisées, généralement sans poils ou rarement aranéuses.

[Garnier et al, 1961]

III- COMPOSITION CHIMIQUE

Dans la racine, on découvre une huile essentielle d'odeur agréable, de la résine, de l'inuline et une substance antibiotique, le carlinoxyde (une furylbenzylacétylène), une cire, des tanins.

[Schauenberg, 1977]

L'huile essentielle contient 12 à 15 % d'un sesquiterpène monocyclique, le carlinène $C_{15}H_{24}$ et un dérivé du furane $C_{13}H_{10}O$ (Figure n° 1). L'huile essentielle contient également de l'acide palmitique, des traces de phénols. [Garnier et al, 1961]

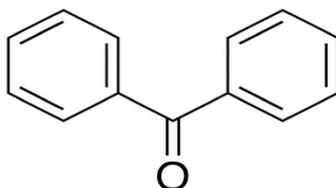


Figure n° 1 : Oxyde de carline [Garnier et al, 1961]

IV-L'ÉCOLOGIE

Carlina acaulis L. apprécie les sols calcaires et croît le plus souvent au bord des chemins, à l'orée des forêts, dans les bois clairs de feuillus, de conifères ou mixtes, dans les pâturages, dans les prairies sèches et dans les landes caillouteuses, et pousse naturellement jusqu'à près de 2 000 mètres d'altitude. [Berger, 2012]

Par ailleurs voici quelques caractéristiques climatiques relatives au milieu d'évolution de la plante. (Tableau n° 1)

Tableau n° 1 : Caractéristiques climatiques et du sol de *Carlina acaulis L.*

a- Climatiques

Lumière	Ombre+.....XLumière
Humidité atmosphérique	SecX..... Humide
Température	FroidX..... Chaud
Continentalité	MarinX.....Continental

b- Caractéristiques du sol

Ph	Acide+.....XBasique
Humidité	SecX.....Humide
Texture	ArgileX.....Rochers
Nutriments	PauvreX.....Riche
Salinité	Non tolérantX.....+.....Très tolérant
Matière organique	PauvreX.....Riche

[\[www.perso.wanadoo.fr/philippe.julve/catminat.htm\]](http://www.perso.wanadoo.fr/philippe.julve/catminat.htm)

V- PROPRIETES THERAPEUTIQUES ET MEDICINALES

Carlina acaulis L. fait partie de la famille des astéracées réputés pour leurs vertus médicinales. Cette plante est largement utilisée dans la médecine traditionnelle pour le traitement de diverses pathologies notamment :

- Traitement en externe des inflammations de la peau et contre les maux de dents

[\[Schauenberg, 1977\]](#)

- Diurétique, diaphorétique, cholagogue, tonique des voies digestives, antibiotique et antirhumatismal. [\[Garnier et al, 1961\]](#)

En effet, *Carlina acaulis L.* en usage externe possède une grande activité antibactérienne surtout contre le staphylocoque et la salmonelle, et antiseptique surtout dans les maladies de la peau, comme l'eczéma et l'urticaire ou l'acné. Il est même rapporté qu'elle pouvait aider à faire disparaître les cicatrices. Elle est aussi un traitement des troubles du spasme digestif et hépatique, elle soigne la rétention d'urine, elle combat le manque d'appétit et l'atonie digestive. [\[Schauenberg, 1977\]](#)

Des propriétés antibiotiques ont été mis en évidence pour l'oxyde de carline vis avis du staphylocoque doré et de nombreuses bactéries à gram positif, mais ce composé est trop toxique pour un emploi thérapeutique. [\[Schauenberg, 1977\]](#)

Comme toutes les plantes médicinales, la prise de *Carlina acaulis L.* peut engendrer quelques effets indésirables. Il est à préciser de respecter scrupuleusement, la posologie, puisque cette plante peut entraîner, à fortes doses, des irritations de la muqueuse intestinale et de provoquer des effets assez déplaisants de type nausées et vomissements puisqu'elle est purgative et émétique. [Schauenberg, 1977]

VI- TRAVAUX ANTERIEURS

Herrmann, (2011) : A mis en évidence le pouvoir antimicrobien sur la racine de *Carlina acaulis L.* et a prouvé que la forte activité de l'oxyde de Carlina révèle une forte activité contre Trypanosomabrucei avec une $C_{15}O$ de 1,0 mg / ml et un SI de 446 par rapport aux cellules humaines qui ont été enregistrées. D'autres auteurs ont montré pour la même activité le grand effet de cette espèce contre les bactéries Gram positif, les bactéries Gram négatif et contre les champignons.

Schauenberg (1977) : La racine de *Carlina acaulis L.* contient une huile essentielle, la résine, l'inuline, une substance antibiotique, le carlinoxyde, une cire et le tanin.

Chalchat (1996) : Les principaux composés de *Carlina acaulis L.* sont l'inuline (18-20%), les flavonoïdes et l'huile essentielle (2%) avec 80% d'oxyde Carlina.

Meusuel , Kastner (1990) a trouvé que plusieurs composés ont été isolés à partir de la technique chromatographie par HPLC d'extraits *Carlina* feuille qui a révélé la présence de glycoside, flavones et plusieurs acides phénoliques principalement des dérivés de l'acide caféique. L'extrait montre aussi des composants très similaires homo orientin, apégnine et l'acide chlorogénique ont été déterminés à la fois en quantité similaire. Vitexine et apigénine 7-O-glucoside ont été détectés seulement dans l'extrait de *Carlina acaulis L.* et les osides dans l'extrait de *acanthifolia*, ceci est le premier rapport sur 1217 présences d'apigénine et acide chlorogénique dans les feuilles de ces deux espèces de *Carlina*.

D'après **Semmeler (1889)** le principal composé de l'huile essentielle est carlinoxyde qui a été isolé pour la première fois en 1889.

Dordevicet et ses collaborateurs (1961) ont suspecté des pouvoirs à cette huile essentielle, elle est utilisée comme composés majeurs qui ont un pouvoir antimicrobien, antiulcéreux, anti inflammatoire et antioxydant.

Par contre **Garnier et ses collaborateurs (1961)** montrent que *Carlina acaulis L.* contient une huile essentielle de 12 à 15%, la carlinene $C_{15}H_{24}$ est un dérivé du furane $C_{13}H_{10}O$, elle contient également de l'acide palmitique et des traces de phénols.

Chapitre 2: METABOLITES SECONDAIRES

Les métabolites secondaires sont des molécules qui ne sont pas directement impliquées dans les processus de croissance des organismes vivants, contrairement aux métabolites primaires. Ils sont plus spécifiques aux plantes, bactéries et champignons, mais on les découvre également chez certains groupes animaux. *[Gravot, 2009]*

Ils sont de structure chimique souvent complexe dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente, mais qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire. *[Macheix et al., 2005]*

On distingue classiquement trois grandes catégories de métabolites secondaires chez les végétaux :

- Les alcaloïdes et composés azotés
- Les composés phénoliques
- Les composés terpéniques

I- LES COMPOSES PHENOLIQUES

Les composés phénoliques constituent un ensemble de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits.

Les polyphénols naturels sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance ou la reproduction. Ce sont notamment des pigments, des arômes, des tanins astringents, voire des composés sans couleur, sans odeur et sans saveur. On sait aujourd'hui qu'ils ne sont pas si secondaires que cela et qu'ils contribuent à protéger la plante contre les pathogènes, champignons de pourriture, rayonnement UV... Ces composés de structures chimiques extrêmement variées, sont souvent propres à une espèce ou à un groupe d'espèces et participe à l'identité chimique de la plante. *[Scalbert et Williamson, 2000]*

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des substances qui constituent une vaste famille, difficile à définir, et sont caractérisées par la présence d'au moins un noyau benzénique lié directement par un groupe hydroxyle libre ou engagé dans une fonction: éther, ester, hétéroside. Ils peuvent se combiner avec des protéines en formant des complexes (Figure n° 2). *[Harborne., 1988]*

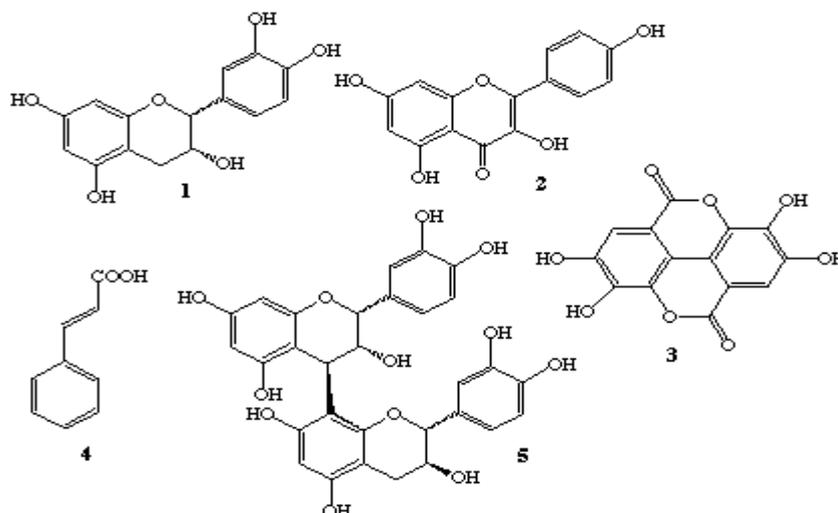


Figure n° 2 : Structure de quelques composés phénoliques. [Lugasi et al., 2003]

Parmi ces composés, on distingue l'acide gallique qui constitue la structure la plus simple (Figure n° 3).

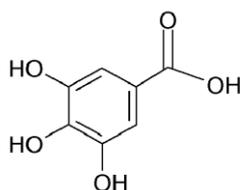


Figure n° 3 : Structure de l'acide gallique. [Lugasi et al., 2003]

I.1- Biosynthèse des polyphénols

Les composés phénoliques constituent un groupe important de métabolites secondaires. La plupart des molécules phénoliques sont formées à partir de deux acides aminés aromatiques, tyrosine et phénylalanine. Ces acides aminés sont formés de façons variables suivant les végétaux, à partir de la voie de l'acide shikimique. [Macheix et al., 2005]. La biosynthèse des polyphénols se fait par deux voies principales qui sont:

I.1.1- Voie de l'acide shikimique

Dans cette voie, l'érythrose 4-phosphate et le phosphoénol pyruvate sont respectivement produits par les hydrates de carbones lors de leur dégradation par la voie des pentoses phosphate et la glycolyse (Figure n° 4). Ces derniers sont à l'origine des composés phénoliques (C6-C1) formant les tanins hydrolysables et de la chalcone (Figure n° 5) qui est la molécule de base de tous les flavonoïdes et tanins condensés. Aussi, il est intéressant de préciser que la tyrosine et la phénylalanine dérivent de cette voie métabolique. Ce sont des intermédiaires métaboliques entre l'acide shikimique et l'acide cinnamique. [Dewick, 1995]

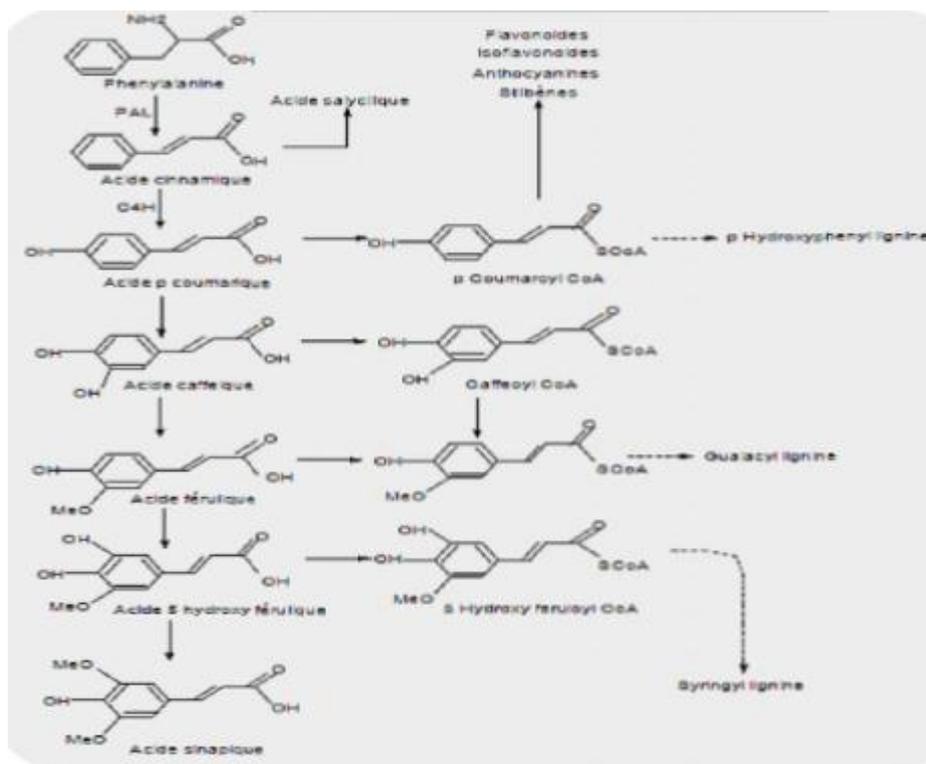


Figure n°6 : Biosynthèse des polyphénols par la voie d'acétate. [Bruneton, 1999]

I.2- Propriétés biologiques

Les fonctions des polyphénols au sein des plantes et de leur environnement sont multiples et pas toujours bien connues. Ils sont assimilés plutôt aux tanins, composés phénoliques de haut poids moléculaire utilisés dans l'industrie du cuir, également responsables de l'astringence de certains aliments. [Haslam, 1966]

Les polyphénols végétaux ont d'abord été étudiés pour leurs effets protecteurs contre les pathogènes ou le rayonnement UV. Souvent présents en grande quantité dans les plantes consommées par les herbivores, ils limitent leur appétence et digestibilité. Ils ont donc été pendant longtemps considérés comme des facteurs antinutritionnels. C'est un regard tout à fait différent qu'on leur porte aujourd'hui, après la reconnaissance de leurs propriétés anti oxydantes et de leurs effets présumés sur la santé. Les recherches sur les effets santé des polyphénols a cependant débuté beaucoup plus tardivement que pour les autres antioxydants. Ceci est largement expliqué par la très grande diversité de leurs structures chimiques. Plusieurs centaines de molécules ont été identifiées dans les aliments répartis en plusieurs classes : on peut citer parmi les plus importantes les anthocyanes responsables de la couleur des fruits rouges (cerise, cassis, fraise, etc.), les tanins responsables de l'astringence de divers fruits (pellicule et pépins du raisin, chair du kaki...), les flavanones responsables de l'amertume du pamplemousse et également abondants dans l'orange. Pour les légumes, on peut citer l'oignon riche en flavonols (quercétine). [Scalbert et Williamson, 2000]

Comme la majorité des composés secondaires, les polyphénols sont produits par les plantes afin d'accomplir des fonctions précises, les plus notoires sont :

- Les molécules qui donnent des arômes et parfums aux plantes. Ce qui sert principalement à repousser les herbivores. Exemple : les polyphénols des pélagoniums. [Scalbert et Williamson, 2000]
- Les propriétés anti-inflammatoires des polyphénols participent à la prévention de divers pathologies impliquant le stress oxydant et vieillissement cellulaire, les maladies cardiovasculaires ou dégénératives, ostéoporose. [Macheix et al, 2005 Sarnimachando et cheynier 2006]

II- LES FLAVONOÏDES

II.1- Définition

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. Ils sont considérés comme les pigments quasiment universels des végétaux. A ce jour, plus de 4000 flavonoïdes naturels ont été décrits. On estime que 2 % environ du carbone organique photo synthétisé par les plantes, soit quelques 10^9 tonnes par an, est converti en flavonoïdes. [Agrawal et Markham, 1989]

II.2- Structure

Les flavonoïdes ont un squelette de base formé par deux cycles en C6 (A et B) reliés entre eux par une chaîne en C3 qui peut évoluer en un hétérocycle (cycle C) (Figure n° 7). Ils donnent des couleurs allant du jaune clair au jaune or. Selon les détails structuraux les flavonoïdes se divisent en 6 groupes : flavones, flavonols, flavonones, isoflavones, chalcones, aurones. Ces composés existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides, c'est-à-dire liée à des oses et autres substances. [Heller et Forkmann, 1993]

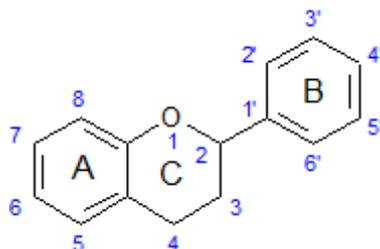


Figure n° 7 : Structure de base des flavonoïdes [Bruneton, 1999]

Les principales catégories de flavonoïdes sont définies par :

- La présence ou l'absence d'une double liaison entre les carbones 2 et 3 du cycle C, qui déterminent la planéité de la molécule. Les flavones, flavonols et dérivés présentent une double liaison et sont des molécules planes, contrairement aux flavanes, flavanones et dérivés.
- La présence de fonctions cétones, alcools et méthoxy. [Gravot, 2009]

II.3- Localisation et distribution

Dans les parties de la plante, les flavonoïdes sont distribués dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs [Medic et al, 2003]. Généralement, ils se concentrent dans l'épiderme des feuilles, et dans les fleurs, ils le sont aussi dans les cellules épidermiques. [Bruneton, 1999]

II.4- Rôles

Ils sont impliqués dans les interactions plantes-microorganismes : dans les pathogénèses comme dans les symbioses (nodules des légumineuses). Ils agissent dans les systèmes de défense des cellules végétales en réponses à certains stress tels que les radiations ultraviolettes. Ce sont également des inhibiteurs d'enzymes, des agents chélatants des métaux nocifs aux plantes. De plus ils sont impliqués dans la photosensibilisation et les transferts d'énergie, la morphogénèse et la détermination sexuelle, la photosynthèse et la régulation des hormones de croissance des plantes. [Di Carlo et al., 1999 ; Pietta, 2000]

De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités antivirales, anti tumorales, anti-inflammatoires, anti allergiques et anticancéreuses. Ainsi que des activités biochimiques et pharmacologiques dues surtout à leur pouvoir anti oxydant. Mais la principale propriété reconnue aux flavonoïdes est d'être vieno-actif c'est-à-dire capable de diminuer la perméabilité des capillaires sanguines et de renforcer leurs résistances. [Bruneton 1999]

Dans le domaine de l'écologie, les flavonoïdes possèdent de multiples rôles, notamment, la coloration donnée aux fleurs et fruits, la combinaison avec les caroténoïdes permet l'apparition des multitudes de couleurs caractéristiques des fleurs. Ils assurent aussi la protection des plantes contre les rayonnements UV. Ces pigments servent également à attirer des insectes pollinisateurs, ou au contraire à dessiner des formes pour éloigner les prédateurs. [Guignard, 2000]

En outre, ils se comportent comme des inhibiteurs enzymatiques et ils sont proposés en ophtalmologie en cas de troubles circulatoires au niveau de la rétine ou de la choroïde et pour l'amélioration de la vision crépusculaire. [Bruneton, 1999]

II.5- Biosynthèse

Les flavonoïdes possèdent tous le même élément structural de base car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune. Le cycle A est formé à partir de trois molécules de malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA), issues du métabolisme du glucose. Les cycles B et C proviennent eux aussi du métabolisme du glucose mais par la voie du shikimate via la phénylalanine qui est convertie en *p*-coumarate puis en *p*-coumaroyl-CoA (Figure n° 8).

Le *p*-coumaroyl-CoA et les 3 malonyls-CoA se condensent en une seule étape enzymatique pour former une chalcone, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone (réaction catalysée par la chalcone synthétase). Le cycle C se forme par cyclisation de la chalcone, réaction catalysée

par la chalcone isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à une seule 2(S)-flavanone : la naringénine. Ce cycle s'hydrate ensuite pour former les différentes classes de flavonoïdes. [Heller et Forkmann, 1993]

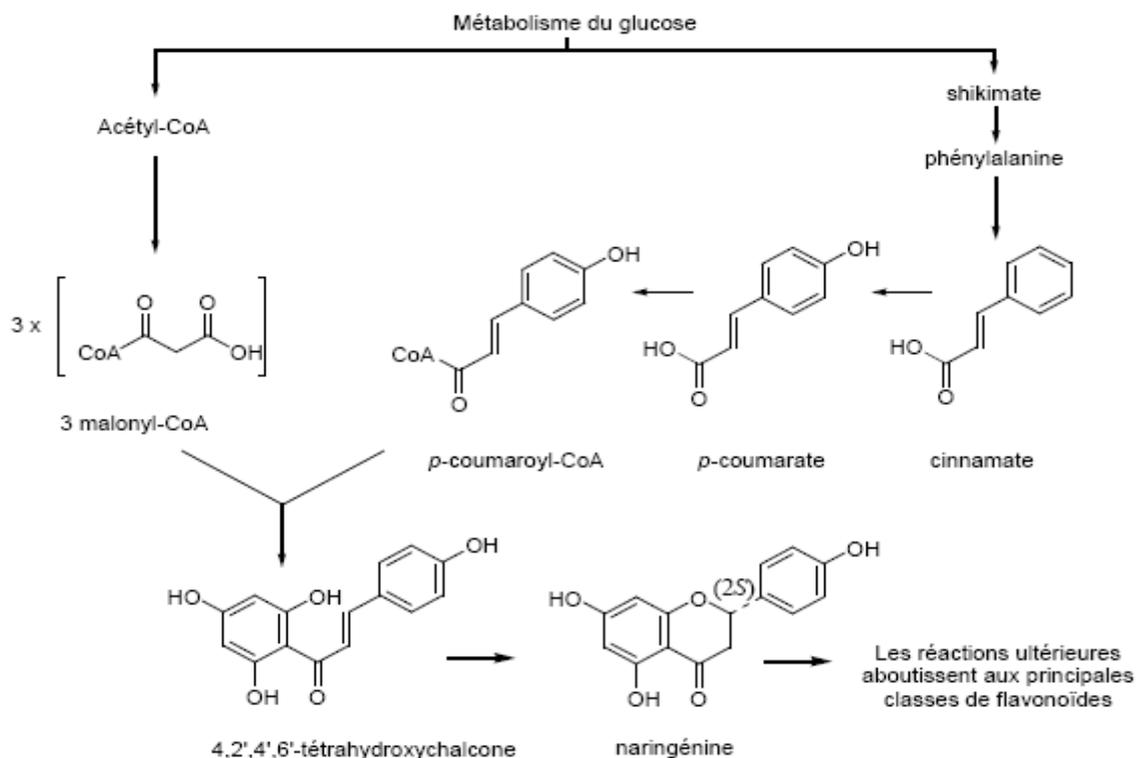


Figure n° 8 : Schéma de la biosynthèse des flavonoïdes illustrant les voies de l'acétyl CoA et de la phénylalanine. [Heller et Forkmann, 1993]

III- LES TANINS

Le procédé du tannage est utilisé pour la production de cuir depuis la préhistoire, alors que la nature des extraits végétaux et les réactions chimiques qui se produisent avec la peau ne sont connues que depuis un peu plus d'un siècle. Le terme *tanin* fut introduit à la fin du dix-huitième siècle pour définir les substances organiques présentes dans les extraits aqueux des feuilles, fleurs, tiges et fruits [Swain, 1979]. Le poids moléculaire des tanins varie entre 500 et 2000 Dalton et 3000 pour les structures les plus complexes. Les tanins sont des composés phénoliques très abondants chez les angiospermes, les gymnospermes et les dicotylédones [Konig et al., 1994]. Ils sont caractérisés par une saveur astringente. [Scalbert, 1991]

Les tanins sont divisés en deux groupes :

- Les tanins condensés, formés de pro anthocyanidines (sous forme d'oligomères).
- Les tanins hydrolysables, esters des acides phénols et de glucose.

III.1- Les tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des esters de glucides ou d'acide phénols, ou de dérivés d'acide phénols, la molécule glucidique est en général du glucose, mais dans certains cas des polysaccharides. Ce groupe de tanins est caractéristique des dicotylédones, on le rencontre notamment chez les rosidaes dans tous les organes: racines, tiges, feuilles ou fruits avant la maturation. Ces tanins en raison de leurs nombreux groupement (-OH) (Figure n° 9) se dissolvent plus ou moins (en fonction de leurs poids moléculaires) dans l'eau, en formant des solutions colloïdales. [Guignard, 1996]

Structure:

Les tanins hydrolysables sont constitués d'un noyau central de glucose et de chaîne latérale (en position 1, 2, 3, 4 ou 6 sur le glucose) comprenant un à n monomères (S) d'acide phénol. Des liaisons carbonées à carbone entre noyaux (liaisons bi-phényles réalisées par couplage oxydatif), conduisent à des molécules ramassées plus rigides de solubilité diminuée dites les tanins ellagiques. [Guignard, 1996]

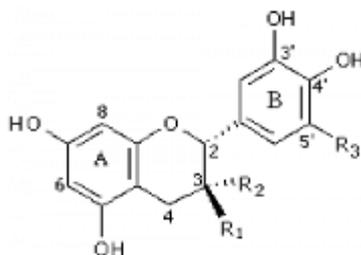


Figure n° 9 : Structure chimique des tanins hydrolysables. [Guignard., 1996]

III.2- Les tanins condensés

Les tanins condensés appelés aussi polyphénols ou proanthocyanidine, sont largement répandus dans l'alimentation humaine (fruits, légumes, thé,...). Ils sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide à chaud par rupture de la liaison inter monomérique. Ils ne s'hydrolysent pas sous l'action des acides minéraux dilués mais forment à l'ébullition des composés insolubles appelés phlobaphènes ou rouge de tanins. [Guignard, 1996]

Structure:

La structure complexe des tanins condensés (Figure n°10) est formée d'unités répétitives monomériques (flavan-3-ols) qui varient par leur centre asymétrique et leur degré d'oxydation. Les formes naturelles des carbones monomériques des flavan-3-ols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétriques C₂ et C₃ et par le niveau d'hydroxylation du noyau B. On distingue ainsi les catéchines (Di-hydroxylées) et les gallo catéchines (Tri-hydroxylées). [Hemingway, 1992]

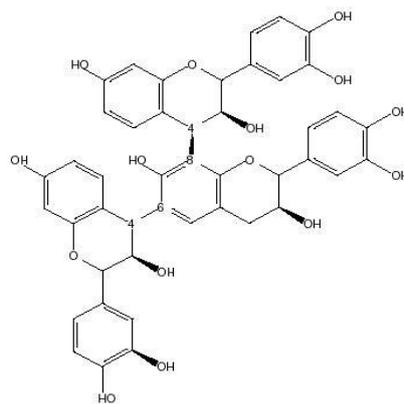


Figure n°10 : Structure chimique des tanins condensés. [Hemingway, 1992]

III.3- Rôles

Les tanins sont d'efficaces moyens de défense contre les herbivores, mais on suppose que leur rôle majeur dans l'évolution a été de protéger les plantes des attaques fongiques et bactériennes. [Swain, 1979]

Leur intérêt médical réside essentiellement dans leur caractère astringent, leur propriété de coaguler les albumines des muqueuses et des tissus, en créant ainsi une couche de coagulation isolante et protectrice, ayant pour effet de réduire l'irritabilité et la douleur et d'arrêter les petits saignements. [Lamnaouar, 2002]

Les tanins ont un effet protecteur sur les reins, on les utilise aussi dans les secours immédiats de maux de gorge, contre les diarrhées, la dysenterie, l'hémorragie, la fatigue, les ulcères cutanés et comme cicatrisant sur les blessures gangréneuses. [Bajaj, 1999]

Certains tanins auraient des propriétés anti-oxydantes. Au cours de ces dernières années, les tanins ont également été étudiés pour leurs potentiels anticancéreux par le biais de différents mécanismes. [Galvi et al., 1995]

III.4- Biosynthèse

Les tanins sont synthétisés à partir de la phénylalanine par la voie dite de l'acide shikimique. [Swain, 1979 ; Haslam, 1966]

La synthèse des tanins hydrolysables à partir d'acide gallique passe tout d'abord par l'ajout de groupements galloyle au noyau d'acide gallique, ce qui mène au pentagalloylglucose. Puis les gallo-tanins seront formés par addition de nouveaux groupements galloyle sur ce noyau pentagalloylglucose, alors que les ellagi-tanins verront des processus d'oxydation créer des liaisons carbone entre différents pentagalloylglucoses, ce qui mènera à des dimères et oligomères dérivés. [Grundhöfer et al., 2001]

III.5- Métabolisme et toxicité

III.5.1-Propriétés chimiques

Les tanins contiennent de nombreux groupements hydroxyle (sur les noyaux phénoliques), ce qui leur permet de former des complexes insolubles avec des hydrates de carbone, des protéines et des ions métalliques. [Bravo, 1998 ; Haslam, 1996]

Ils se lient à la quasi-totalité des protéines solubles, donnant naissance à des polymères insolubles à pH et force ionique normaux. Cette complexation, dépendant du pH, est donc réversible. Cette réaction avec les protéines est à l'origine de nombreux effets biologiques des tanins. Les enzymes complexées de cette façon montrent une réduction marquée de leur activité. [Haslam, 1996]

III.5.2-Inhibiteurs de la digestion

Foley a passé en revue les expériences menées sur l'effet des tanins sur l'alimentation, il montre que les tanins ont des effets toxiques et/ou réduisent (souvent, mais pas toujours) la digestion en réduisant la digestibilité de la matière sèche, de l'azote et des fibres [Foley et al., 1999]. Les tanins hydrolysables peuvent être hydrolysés *in vivo* puis absorbés, l'acide gallique produit est excrété dans les urines. Dans ce cas, ils n'affectent pas la digestibilité des protéines. [Hagerman et al., 1998]

La diminution de la digestibilité des protéines est proportionnelle aux capacités de précipitation des protéines des tanins. Cependant, ce ne sont pas les propriétés d'inhibiteurs de digestion des tanins qui en font un moyen de défense contre les ruminants, mais plutôt leur toxicité. [Robbins et al., 1987]

IV- LES ALCALOÏDES

IV.1- Définition

Initialement défini comme des substances azotées, basiques, d'origine naturelle est de distribution restreinte. Ils ont une structure complexe. Leur atome d'azote est incluse dans un système hétérocyclique. Leur détection consiste dans le cas le plus général à une précipitation qu'est due à la capacité des alcaloïdes de se combiner avec les métaux qui constituent les réactifs spécifiques utilisés. [Bruneton, 1999]

Exemple: La caféine est un alcaloïde présent dans de nombreux aliments comme les grains de café, le thé, le cacao (chocolat),...

IV.2- Rôles

Les alcaloïdes présentent généralement une intense activité pharmacologique. La médecine les emploie le plus souvent à l'état pur et ils sont utilisés comme antalgiques majeur (morphine), antipaludéen (quinine), pour combattre l'excès d'acide urique (colchicine),

comme substance paralysante (curane, caféine), comme poisons (strychnine, nicotine), comme stupéfiants (cocaïne, mexaline), comme cholinergique (pilocarpine) ou comme anticancéreux (Taxol, vinblastine et vincristine) (Figure n°11). [Bruneton, 1999]

A coté des bien faits de ces différentes molécules, il ne faut pas oublier que lorsqu'elles sont à un taux élevé, elles sont susceptibles de provoquer des effets indésirables, pour cela, elles sont appelées substances anti nutritionnelles. Leur présence diminue la qualité nutritionnelle des aliments auxquels elles sont associées. [Bruneton, 1999]

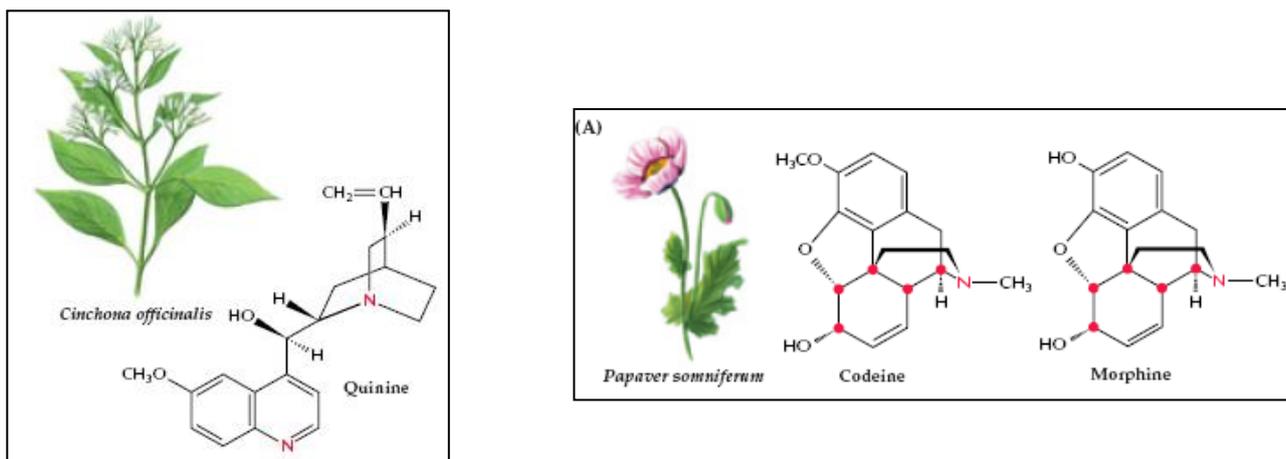


Figure n°11 : Structures et espèces végétales associées aux différents alcaloïdes[Croteau et al, 2000]

Ils jouent également un rôle :

- Sur le système nerveux central, comme dépresseur (morphine et scopolamine), et stimulant (caféine, strychnine).
- Au niveau vasculaire, comme hypertenseurs (éphédrine, hydrastine), et hypotenseurs (yohimbine). La vincamine améliore la circulation cérébrale.
- Autres actions : Ce sont des curarisants et anesthésiques locaux (cocaïne), anti-fibrillants (quinidine), anti-tumoraux (vinblastine, ellipticine), antipaludique (quinine), et amoebicides (émétines). [Bruneton, 1999]

IV.3- Propriétés physico-chimiques

Les alcaloïdes ont des PM variant de 100 à 900 Da. En règle générale, les alcaloïdes bases sont insolubles ou très peu solubles dans l'eau, solubles dans les solvants organiques apolaires ou peu polaires. La basicité des alcaloïdes est très variable, cette propriété étant étroitement fonction de la disponibilité du doublet libre de l'azote. Elle permet de former des sels avec des acides minéraux (chlorhydrates, sulfates, nitrates...) ou organiques (tartrates, sulfamates, maléates...). Les sels d'alcaloïdes sont généralement solubles dans l'eau et les alcools dilués, ils sont insolubles dans les solvants organiques. Les sels cristallisés se conservent plutôt bien, ils constituent la forme commerciale de ces molécules. [Bruneton, 1993]

IV.4- Biosynthèse

La biosynthèse des alcaloïdes est très complexe de part leurs variations structurales justifiées par des oxydations allyliques, des estérifications, des étherifications, des couplages oxydatifs, des oxydations des noyaux aromatiques, et elle ne saurait être traitée en termes généraux.

Notons simplement ici que le précurseur pour la synthèse des alcaloïdes vrais est un acide aminé tel que l'ornithine, la lysine, la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane, l'histidine, l'acide anthranilique... La formation du système hétérocyclique passe généralement par un processus inter- ou intramoléculaire simple : formation d'une base de Schiff ou, fréquemment, réaction de Mannich. On remarquera que la formation d'un alcaloïde peut nécessiter l'intervention d'une seule molécule d'acide aminé (hygrine, cathine), de deux molécules d'un même acide aminé (quinolizidines), plus rarement de deux acides aminés différents (tubulosine) ou de plusieurs molécules du même acide aminé (spartéine). Quand la molécule comporte des carbones supplémentaires, ils sont apportés par des éléments impliqués dans d'autres métabolismes comme l'acétate pour les tropanes ou le diméthylallylpyrophosphate pour les ergolines et furoquinoléines. *[Bruneton., 1993]*

MATERIEL ET METHODES

Le travail qui a fait l'objet de ce mémoire a été réalisé au laboratoire Produits Naturels du département de biologie de l'université de Tlemcen.

Dans cette partie, nous décrivons le matériel et les méthodes utilisées lors des protocoles expérimentaux.

I- Collecte du matériel végétal

Pour les besoins de différentes analyses chimiques, les racines de *Carlina acaulis L.* ont été récoltées dans la région de Terni dans le sud de la wilaya de Tlemcen durant le mois d'avril 2017. (Photo n° 1 et photo n° 2)



Photo n° 1 : Région de récolte de *Carlina acaulis L.* (Terni)



Photo n° 2 : *Carlina acaulis L.* au champ de la récolte

Au laboratoire la partie utilisée de la plante est la racine. Le matériel végétal fraîchement collecté a été lavé à l'eau, séché à une température ambiante et à l'abri de la lumière solaire pendant 15 jours, afin de préserver au maximum l'intégrité de sa composition chimique.

(Photo n° 3)



Photo n° 3 : Racines de *Carlina acaulis* L. après le séchage

Après le séchage, les racines de *Carlina acaulis* L. ont été concassées séparément par un mortier traditionnel et pulvérisées ensuite au broyeur. Ce dernier doit être réalisé juste avant chaque analyse et de préférence par un mortier pour éviter la dégradation des composés chimiques par la chaleur du robot.

La poudre végétale ainsi récupérée, est stockée dans des sacs en papier, pour des analyses ultérieures.

II- Détermination de la teneur en eau

II.1- Principe

On procède à une dessiccation de l'échantillon à analyser dans une étuve à la température de (100 à 105°C) et sous la pression atmosphérique jusqu'à l'obtention d'une masse pratiquement constante. Pour éviter toute reprise d'humidité, il convient d'opérer dans des vases de tare, placés dans un dessiccateur. [[Audigie et al., 1980](#)]

II.2-Mode opératoire

- Sécher à l'étuve, les vases de tare pendant 15min;
- Laisser refroidir dans un dessiccateur durant 10min, puis peser les vases de tare: P1;
- Mettre dans chaque vase 2 g d'échantillon moulu, puis peser: P2;
- Placer les vases qui contiennent l'échantillon dans l'étuve pendant 3h à 103°C;

- Laisser refroidir au dessiccateur pendant 15 min et peser: P3;
 - Remettre les vases dans l'étuve durant 1h et peser comme précédemment.
- La différence entre deux pesées doit être inférieure à 2mg, sinon l'opération est renouvelée jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

II.3- Expression des résultats

La teneur en eau (%) d'un échantillon de matériel végétal est donné par la formule suivante:

$$\text{Teneur en eau} = (P2-P3) / (P2-P1) \times 100$$

Avec:

- P1: Masse en g de la vase de tare vide.
- P2: Masse en g de la prise d'essai avant séchage.
- P3: Masse en g de la prise d'essai après séchage.

A partir de la teneur en eau on peut déterminer le taux de matière sèche qui est donné par la formule suivante :

$$\text{Taux de matière sèche} = 100 - \text{teneur en eau}$$

III-Tests phytochimiques

L'examen phytochimique permet de détecter la présence ou l'absence des constituants chimiques essentiellement les composés phénoliques et les composés azotés en particulier les alcaloïdes, existantes dans une partie quelconque de la plante par des réactions de précipitation ou de coloration en utilisant des réactifs spécifiques à chaque famille de composés.

III.1-Principe

La mise en évidence s'effectue par des tests phytochimiques réalisés, généralement sur des extraits déjà préparés par épuisement à chaud. Ils sont basés sur :

- Les essais de solubilité, des constituants de la plante, vis-à-vis des solvants organiques de polarité différente: l'eau, l'éthanol et l'éther di-éthylique;
- Les réactions de coloration et de précipitation.

III.2- Mode opératoire

Dans un ballon surmonté d'un réfrigérant , 25g d'échantillon séché à l'air sont séquentiellement extraits en utilisant 300ml des solvants suivants: l'eau distillée, l'éthanol et l'éther di-éthylique. Le tout est mis dans un appareil à reflux pendant 1h. Les extraits sont filtrés et stockés à 4°C et utilisés pour les analyses ultérieures. *[Trease et Evans., 1987; FAO/ IAEA, 2000]*

*

TESTS PHYTOCHIMIQUES

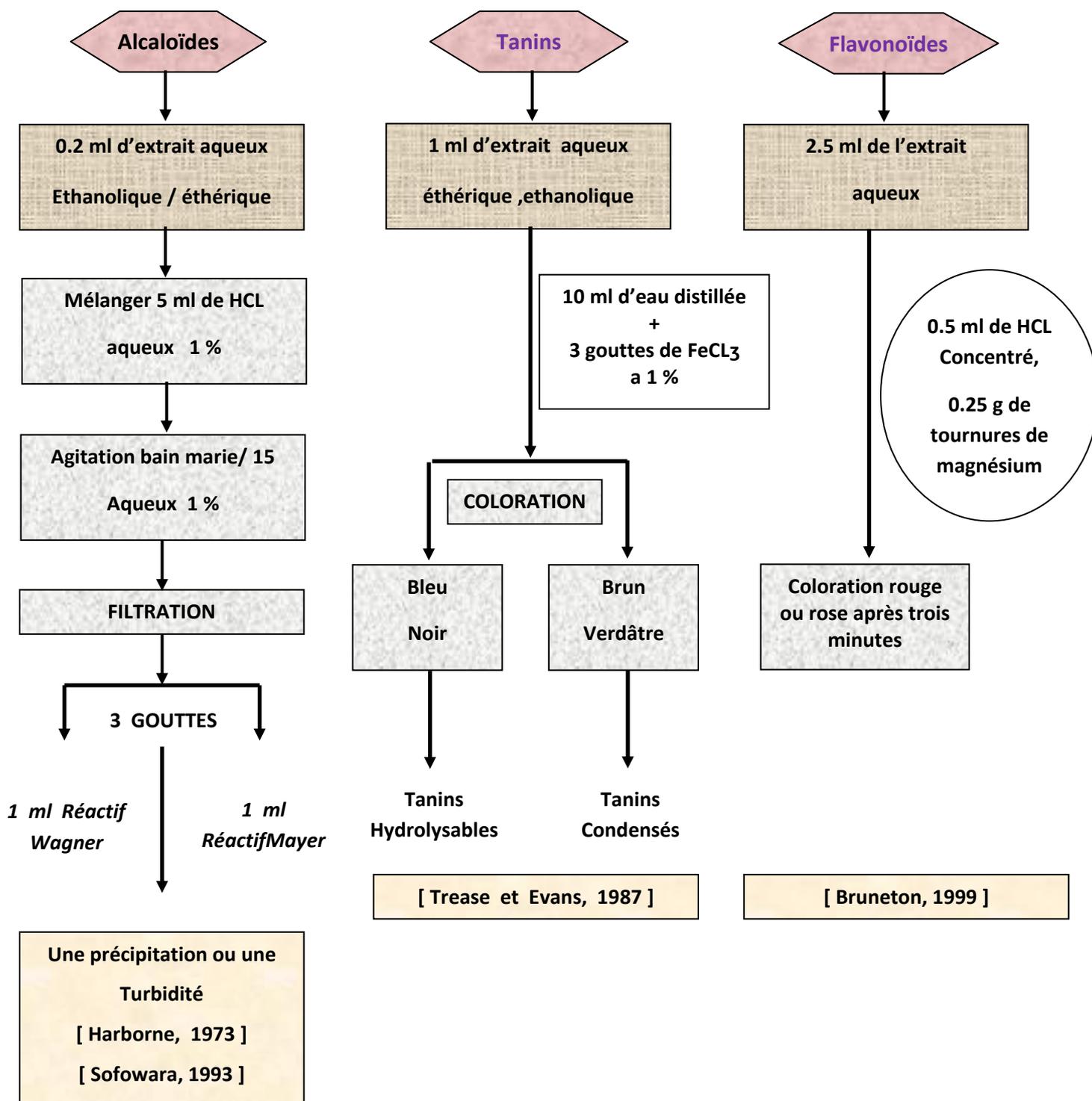


Figure 12 : Organigramme des tests phytochimiques

IV- Alcaloïdes

Prendre 0.2 ml d'extrait aqueux, éthanolique et étherique. Ajouter 5ml de HCl à 1% au résidu puis agiter et chauffer au bain pendant 15 min. Filtrer la première partie avec trois gouttes de réactif de Mayer et la seconde avec le réactif de Wagner (voir annexe). Le test n'est considéré positif que lorsqu'il y a apparition d'une turbidité ou d'une précipitation.

V- Flavonoïdes

Traiter 2,5 ml de l'extrait aqueux avec 0,5 ml de HCl concentré et 0,25g de tournure de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence sur une couleur rose ou rouge.

VI- Tanins

Prendre 1 ml de l'extrait éthanolique, étherique, et aqueux. Ajouter 10 ml d'eau distillée et 2 à 3 gouttes de FeCl₃ à 1 %. Un test positif est révélé par l'apparition d'une couleur bleu noir caractéristique des tanins hydrolysables, ou d'une couleur brun verdâtre caractéristique des tanins condensés. [Trease et Evans, 1987]

VII- Extractions

L'extraction des composés naturels est effectuée par différentes méthodes qui lui sont particulièrement adaptées, dont la macération qui est une technique facile à réaliser.

VII.1- L'extrait brut (méthanol / eau)

Mode opératoire

Une quantité de 10 g de poudre végétale est mise à macérer dans 100 ml d'un mélange méthanol/eau 80/20(v/v), pendant 24 heures sous agitation (**Photo n° 4**).

Après filtration (**Photo n° 5**), les solutions hydro-méthanoliques sont concentrées à sec sous pression réduite et à une température de 60°C, le résidu sec est repris par 3 ml de méthanol puis conservées à 4°C. [Harborne, 1988]



Photo n° 4 : L'agitation



Photo n° 5 : Filtration de l'extrait brut

VII.2- L'extrait brut (Acétone / eau)

Une quantité de 10 g de matériel végétal broyé est macéré dans 100 ml d'un solvant hydro-alcoolique acétone/eau 70/30 (v/v) pendant 24 heures. Après filtration, la solution hydro-alcoolique est évaporée à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif (Photo n° 6), le résidu sec est repris par 3 ml du méthanol. [Blahova *et al.*, 2004]



Photo n° 6 : L'évaporation

VIII- Extractions sélectives

VIII.1- Extraction des tanins

VIII.1.1- Principe

Il consiste à extraire les polyphénols totaux par l'acétone/eau et à utiliser une matrice insoluble, l'acétate d'éthyle est capable de se complexer avec les tanins.

VIII.1.2- Mode opératoire

Prendre 5g de matériel végétal broyé en présence de 90ml d'eau distillée et 55ml d'acétone; l'ensemble est porté à une macération à froid (4°C) pendant 4 jours. Filtrer (Photo n° 7) et extraire la solution deux fois avec 25ml de dichlorométhane afin d'éliminer les pigments et les lipides. Décantent et extraire la phase aqueuse quatre fois avec 25ml d'acétate d'éthyle (AcOEt) (Photo n° 8). Sécher la phase organique avec MgSO₄ ensuite faire évaporer le solvant à sec. [Bruneton, 1999]



Photo n° 7 : Filtration des tanins



Photo n° 8 : Décantation des tanins

VIII.1.3-Expression des résultats

$$Rd = [(P2-P1)/M]\%100$$

- Rd: Rendement (% MS).
- P1: Poids du ballon vide séché avant l'extraction.
- P2: Poids du ballon après extraction.
- M: Masse en gramme d'échantillon.

VIII.2- Extraction des flavonoïdes

VIII.2.1- Mode opératoire

Prendre 5g de matériel végétal broyé dans 50ml de méthanol bouillant en présence de 2,5g de CaCO_3 . L'ébullition est maintenue sous réfrigérant à reflux pendant 1h (Photo n° 9). Après filtration, le dépôt est traité de nouveau pendant 1h à l'ébullition dans la même quantité d'alcool. Les deux solutions alcooliques sont réunies, elles sont éliminées par distillation sous pression réduite et le résidu sirupeux est repris par 50ml d'eau distillée bouillante. La solution aqueuse est filtrée à chaud et le filtrat épuisé successivement par l'éther diéthylique, l'AcOEt et le N- butanol (BuOH), tous les composés flavoniques se retrouvent dans l'extrait acétate d'éthyle. [Dauguet et Foucher, 1982]



Photo n° 9 : Ebullition à reflux des flavonoïdes

VIII.2.2- Expression des résultats

$$\text{Rd} = \frac{(\text{P2}-\text{P1})}{\text{M}} \times 100$$

- Rd: Rendement (% MS).
- P1: Poids du ballon séché avant l'extraction.
- P2: Poids du ballon après extraction.
- M: Masse en gramme d'échantillon.

VIII.3- Extraction des alcaloïdes

VIII.3.1-Principe

L'extraction des alcaloïdes est fondée, en règle générale, sur le fait qu'ils existent habituellement dans la plante à l'état des sels et sur leur basicité, c'est-à-dire sur la solubilité différentielle des bases et des sels dans l'eau d'une part, dans les solvants organiques d'autre part. L'extraction consiste à un épuisement des alcaloïdes par une solution alcoolique acidifiée. Pour purifier on procède à une alcalinisation par une base concentrée (NH₄OH) et une filtration. Il reste un résidu sec qui représente les alcaloïdes totaux. [Bruneton, 1999]

VIII.3.2- Mode opératoire

On mélange 5g de matériel végétal avec 125ml d'HCl à 2% et 55ml d'AcOEt. L'ensemble est porté à une macération à froid (4°C) pendant 10h. Filtrer le mélange et basifier la phase aqueuse acide avec NH₄OH. La phase aqueuse basique est ensuite extraite plusieurs fois avec l'AcOEt. L'opération est répétée deux fois avec l'AcOEt, jusqu'à ce que la phase aqueuse ne contienne plus d'alcaloïdes (ce qui vérifie aisément par la négativité de réaction de Mayer effectuée sur la phase aqueuse) (Photo n°10). Le solvant organique contenant les alcaloïdes est décanté, débarrassé des traces d'eau qu'il peut renfermer par déshydratation sur MgSO₄. Faire évaporer le solvant et reste alors un résidu sec des alcaloïdes totaux. [Bruneton, 1999]



Photo 10 : Décantation des alcaloïdes

VIII.3.3- Expression des résultats

$$Rd = [(P2-P1)/M] \times 100$$

- Rd: Rendement (% MS).
- P1: Poids du ballon vide séché avant l'extraction.
- P2: Poids du ballon après extraction.
- M: Masse en gramme d'échantillon.

IX- Dosage

IX.1- Extraction des phénols totaux

10g de matériel végétal broyé en présence de acétone /eau (70/30, V/V), l'ensemble est porté à une macération à froid (4°C) pendant 24 h. Après filtration, la solution obtenue est éliminée par distillation sous pression réduite et le résidu sirupeux est repris par 5ml de méthanol.

IX.2- Dosage des phénols totaux (réactif de Folin-Ciocalteu)

Le dosage des polyphénols a été effectué au centre de mesure de chimie à l'aide d'un spectrophotomètre à UV visible à double faisceaux, la technique à double faisceaux nous a aidé à éliminer l'absorbance du blanc et donner directement la densité optique de l'échantillon. Pour s'assurer que les résultats sont fiables, le dosage de chaque composé phénolique a été réalisé en trois essais, après on a calculé la moyenne des densités optiques mesurées.

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit en 1965 par **Singleton et Rossi**. Depuis, son utilisation s'est largement répandue pour caractériser les extraits végétaux d'origines plus diverses.

IX.2.1- Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et demolybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum à 760nm, est proportionnelle à la quantité de phénols totaux présents dans les extraits végétaux. [*Singleton et al., 1999*]

IX.2.2- Mode opératoire

On prépare trois tubes :

- 1.7 ml d'extrait brut, 1/10 et 1/100 ;

- 300 µl de réactif de Folin-Ciocalteu ;

Après 3 min, on ajoute 0.5 ml de Na_2CO_3 à 20% ;

On laisse les tubes à l'obscurité pendant 30 min, on détermine la densité optique à 760 nm par rapport au témoin. L'indice de Folin-Ciocalteu est exprimé en degré ou en gramme d'acide gallique/l, on peut utiliser une gamme étalon établie dans les mêmes conditions avec de l'acide gallique (0 à 1 g/l). [*Singleton et al., 1999*]

IX.3- Dosage des tanins condensés

IX.3.1- Principe

Ce test est basé sur la condensation des composés polyphénoliques avec la vanilline en milieu acide. [*Price et al., 1978*]

IX.3.2- Mode opératoire

- Prendre 1 ml de l'extrait phénolique ; ajouter 2 ml de la solution A (Vanilline à 1% dans 70% d'acide sulfurique) et mettre les tubes dans un bain marie pendant 15 minutes à 20°
- Lire l'absorbance à 500nm.

IX.3.3- Expression des résultats

$$T (\%) = 5,2 \cdot 10^{-2} \times DO \times V/P$$

- T (%) : Pourcentage du taux des tanins condensés.
- 5,2.10-2 : Constante exprimée en équivalent de cyanidines.
- DO : Densité optique.
- V : Volume de l'extrait phénolique utilisé.
- P : Poids de l'échantillon.

IX.4- Dosage des tanins hydrolysables

IX.4.1- Principe

La méthode de **Mole et Waterman, (1987)** est basée sur une réaction avec le chlorure ferrique. Le mélange extrait phénolique plus réactif (FeCl₃/HCl) donne une coloration rouge violette au complexe d'où la formation des ions (Fe⁺³). [*Bate-Smith, 1973*]

IX.4.2- Mode opératoire

Prendre 1 ml de la solution phénolique déjà préparée et on ajoute 3,5 ml de réactif C (FeCl₃ à 0,01 M dans du HCl à 0,001M.), après 15 secondes de l'addition, on lit l'absorbance à 660nm.

$$T (\%) = 5,2 \cdot 10^{-2} \times DO \times V/P$$

IX.5- Dosage des flavonoïdes

IX.5.1- Principe

Le dosage des flavonoïdes est déterminé par la méthode de **Djeridane et al, (2006)**.

IX.5.2- Mode opératoire

1ml de l'extrait brut (méthanol/eau) est mélangé avec 1 ml d'AlCl₃ (trichlorure d'aluminium) à 20% après incubation pendant 15 min à température ambiante, l'absorbance de l'échantillon est mesuré à 430 nm.

IX.5.3- Expression des résultats

La teneur en flavonoïdes est déterminé à partir d'une équation de la régression linéaire déduite de la courbe d'étalonnage et exprimé en mg équivalent de catéchine par 100 grammes de matière sèche.

RESULTATS ET DISCUSSION

I- Détermination du taux de matière sèche

Il est notoirement connu que la majorité des végétaux sont riches en eau, et l'analyse de la teneur en eau effectuée par nos soins sur *Carlina acaulis L.* confirme cette hypothèse.

Cette analyse est basée sur la détermination de la teneur en eau contenue dans l'échantillon, et par conséquent la teneur en matière sèche est obtenue par complément de la première valeur.

L'analyse de la teneur en eau au niveau de la racine de *Carlina acaulis L.* nous a révélé une proportion élevée, égale à 78,55%, ce qui nous donne une teneur de 21,45% de matière sèche (Figure n°13). De ce fait, on peut dire que plus de la moitié du poids de la plante est constituée par de l'eau.

Cette proportion élevée est à double tranchant puisqu'elle permet de solubiliser tous les constituants hydrophiles, cependant elle favorise le développement des microorganismes et la germination.

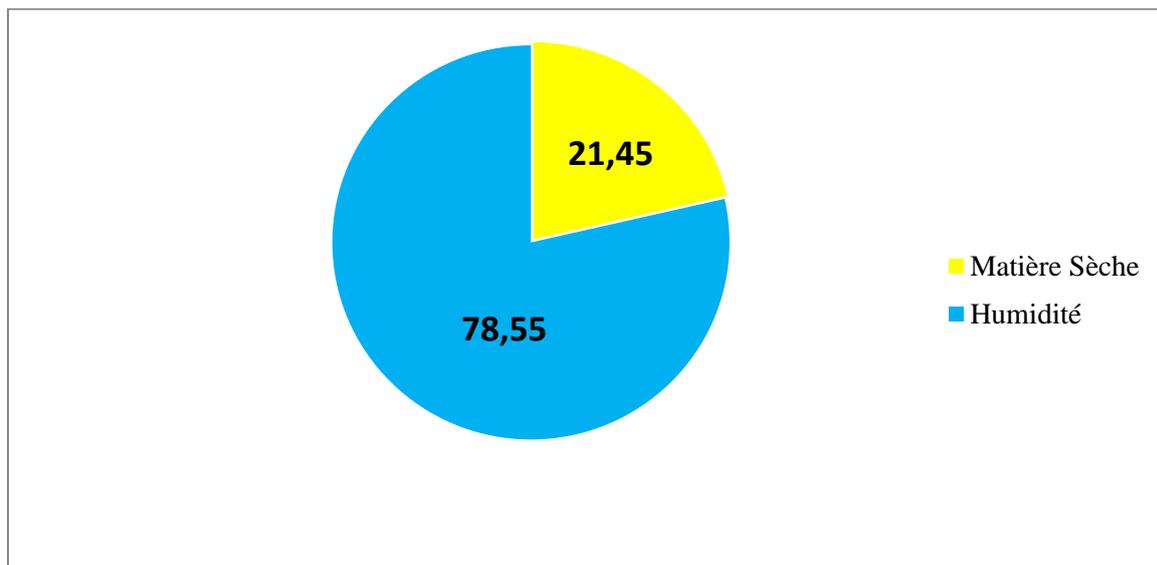


Figure n°13 : Teneur en eau des racines de *Carlina acaulis L.*

A titre de comparaison, les résultats obtenus par l'analyse effectuée sont du même ordre de valeur que ceux mentionnés par **Bouchriha et Habbar (2009)** et confirme ainsi que cette plante a une forte teneur en eau au niveau des racines avec un pourcentage de 78,52%.

Plusieurs facteurs influent sur cette teneur en matière sèche et en eau, comme le climat, la qualité du sol et surtout la période de la récolte. [Bechlaghem, 2016]

II- Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques nous permettent de faire ressortir la présence ou l'absence de différents métabolites secondaires existants dans la partie étudiée de la plante par des réactions qui sont basées sur le phénomène de précipitation ou de coloration au moyen des réactifs spécifiques à chaque famille de composés ainsi que des examens en lumière ultraviolette. [Hagerman et al., 2000]

(+) : est enregistré si le réactif présente une légère opacité (**Présence en faible quantité**)

(++) : est enregistré si le réactif produit une floculation ou un précipité lourd (**Présence en forte quantité**)

(-) : est enregistré en cas d'absence de turbidité de floculation et de précipitation (**Absence**)

Le **tableau n° 2** ci-dessous montre les résultats obtenus des tests phytochimiques effectués sur des racines de *Carlina acaulis L.*.

Tableau n° 2 : Résultats des tests phytochimiques des racines de *Carlina acaulis L.*

	Extrait aqueux	Extrait éthérique	Extrait éthanolique
Alcaloïde	Wagner -	-	-
	Mayer +	+	-
Tanin	Condensés (Marron-noir) ++	-	Hydrolysable (Bleu-noir) +
Flavonoïde	(Orange) +		

Les résultats exprimés dans le **tableau n° 2** appellent aux observations suivantes :

- La présence des tanins en forte quantité alors que les alcaloïdes et les flavonoïdes ne sont présents qu'en faible quantité.
- La présence des alcaloïdes mais avec une quantité faiblement importante dans l'extrait aqueux et éthérique et précisément avec le réactif de Mayer avec l'apparition d'une légère turbidité .
- La présence des flavonoïdes dans l'extrait aqueux est confirmée par l'apparition d'une couleur rose pâle et cela en contact avec le tournure de magnésium.
- La présence des tanins est confirmée dans deux extraits (éthanolique et aqueux) par une réaction positive (++) avec le FeCl₃ en donnant une coloration marron tirant vers le noir pour les tanins condensés et la couleur bleue tirant vers le noir pour les tanins hydrolysables .

Le potentiel d'une plante médicinale est attribué à l'action de ses constituants phytochimiques. [Oyediji et al, 2011]

A partir de ces résultats, il y a lieu de faire le dosage des substances phénoliques qui sont apparues dans les tests phytochimiques et de déterminer par la suite leur rendement.

III- Extractions sélectives

III.1- Rendement des extraits bruts

Les extraits bruts sont récupérés après évaporation à sec et sous pression réduite. Ils ont été pesés pour déterminer leurs poids secs correspondants.

Ces extraits renferment des composés phénoliques comme les flavonoïdes et les tanins, ainsi que des alcaloïdes.

L'extraction des composés phénoliques par les deux solvants (méthanol et acétone) des racines de *Carlina acaulis L.*, nous a permis de déterminer les rendements de leurs extraits bruts (Figure 14) :

- Pour le rendement acétone / eau : 7,52%
- Pour le rendement méthanol / eau : 15,49%

Il s'est avéré que l'extrait brut méthanol/eau est plus efficace que celui de l'acétone/eau. Après l'étude phytochimique de la racine de *Carlina acaulis L.*, une extraction sélective est nécessaire pour calculer le rendement massique de chaque composé présent lors des tests phytochimiques.

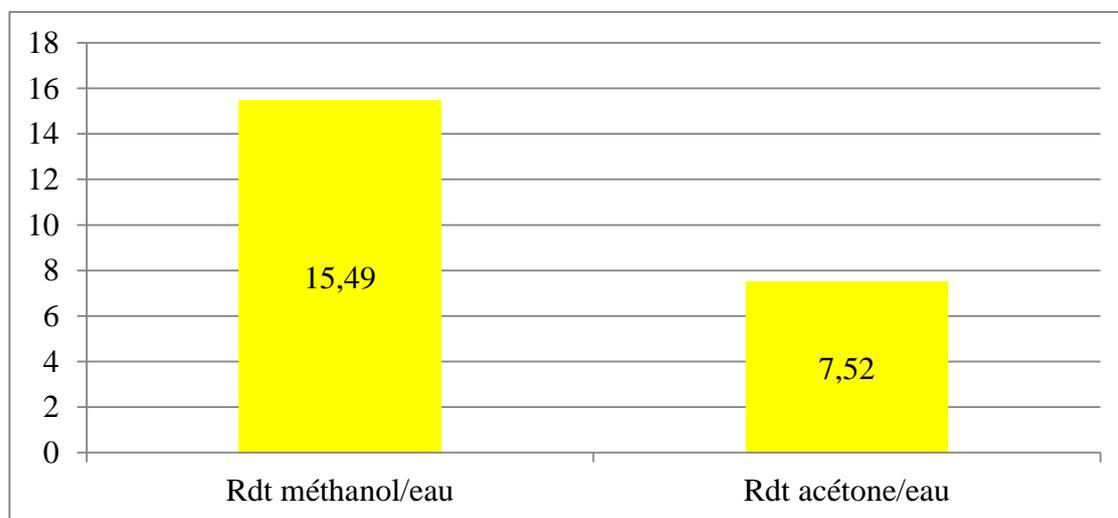


Figure n°14 : Rendements des extraits bruts de méthanol/eau et de l'acétone/eau des racines de *Carlina acaulis L.*

Les résultats obtenus pour le rendement des différents composés par rapport à la matière sèche sont illustrés dans la figure 15.

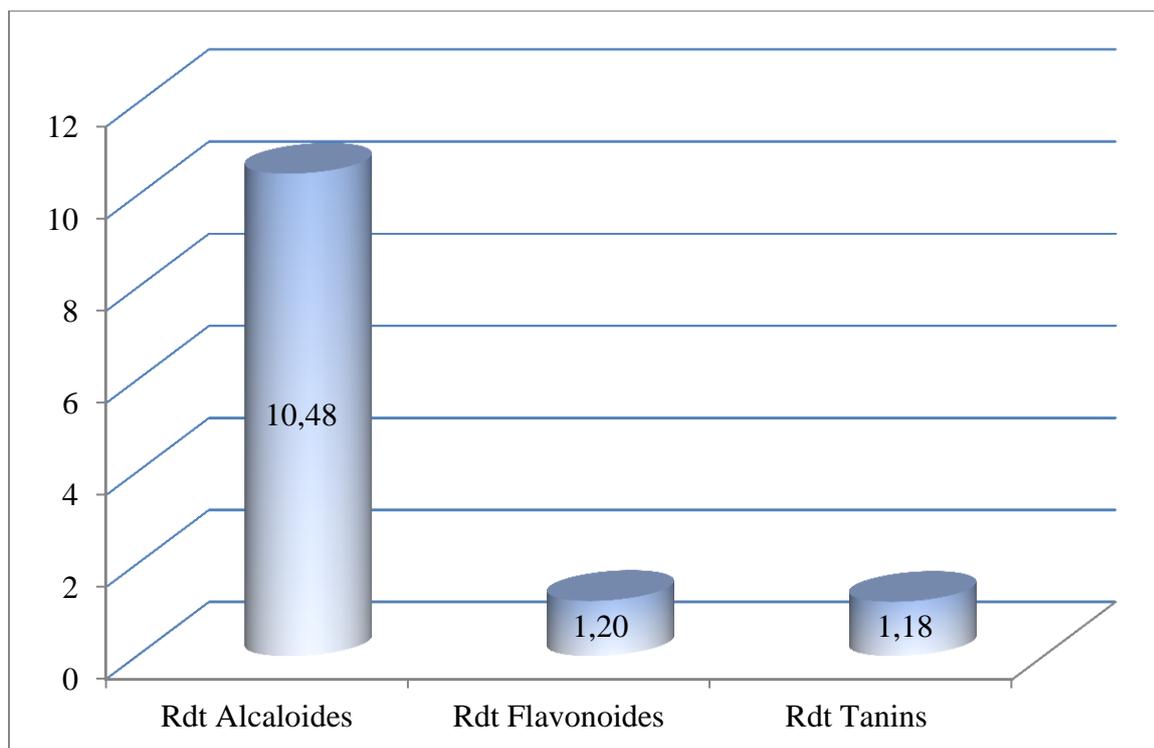


Figure n°15 : Rendement massique des alcaloïdes, flavonoïdes et tanins des racines de *Carlina acaulis L.*

A la lumière de ces résultats nous pouvons constater que le rendement le plus élevé se situe au niveau des alcaloïdes (10,48%) suivi des flavonoïdes (1,20%) et derrière les tanins (1,18%). Ces résultats sont différents avec ceux obtenus par **Bouchriha et Habbar (2009)** qui sont à 15,21% pour les alcaloïdes, 11% pour les tanins, et 0,5% pour les flavonoïdes.

Partant de la relation directe qui existe entre le rendement des tanins et de l'extrait brut de l'acétone/eau [[Bruneton, 2008](#)], et du fait que le rendement de l'extrait brut de l'acétone/eau obtenu par nos résultats est faible donc automatiquement celui des tanins s'est avéré faible aussi. L'extraction des tanins est en règle générale réalisée par un solvant constitué d'un mélange d'eau et d'acétone.

III.2- Rendement des tanins

Les résultats obtenus du rendement des tanins des racines de *Carlina acaulis L.* sont présentés dans la [figure n°16](#) avec la comparaison de ceux de **Bouchriha et Habbar (2009)**.

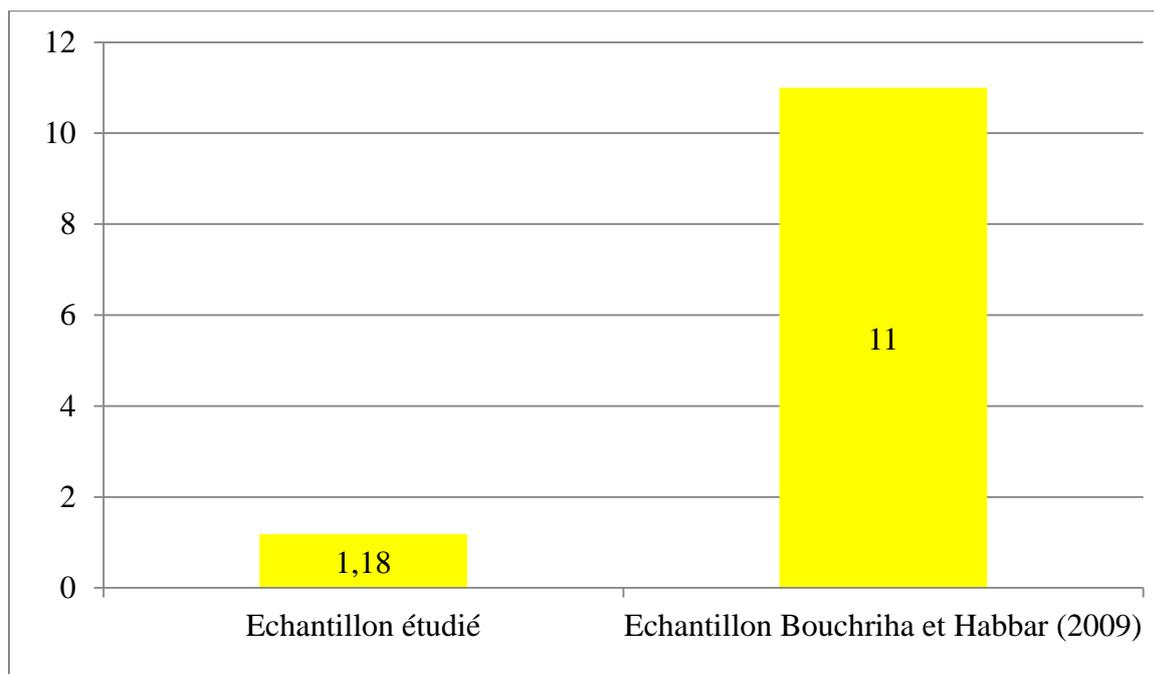


Figure n°16 : Comparaison du rendement des tanins des racines de *Carlina acaulis L.*

On constate à travers ces résultats que *Carlina acaulis L.* possède un rendement bien moins important en tanins qui est de l'ordre de 1,18% par rapport à celui mentionné par **Bouchriha et Habbar (2009)** qui est de l'ordre de 11%. Donc on peut conclure que la plante étudiée n'est pas riche en tanins.

La teneur en tanin varie avec l'espèce végétale et ces variations peuvent être liées d'une part au degré de maturité et d'autre part au site de récolte [Bornner et al., 1974]. L'acétone possède la capacité de solubiliser les tanins qui ne sont pas solubles dans le méthanol. [Milcent et Chau, 2003]

Les tanins ont un pouvoir de fixation aux protéines avec une tendance à l'imperméabilité des couches externes et la protection des couches sous-jacentes ; leurs effets antiseptiques et leurs propriétés de renouvellement des tissus pourraient expliquer l'utilisation traditionnelle des racines de *Carlina acaulis L.* dans le traitement des plaies et des abcès. [Milcent et Chau, 2003]

III.3- Rendement des flavonoïdes

Les résultats obtenus du rendement des flavonoïdes de la racine de *Carlina acaulis L.* sont présentés dans la **figure n°17**, comparés à ceux de **Bouchriha et Habbar (2009)**.

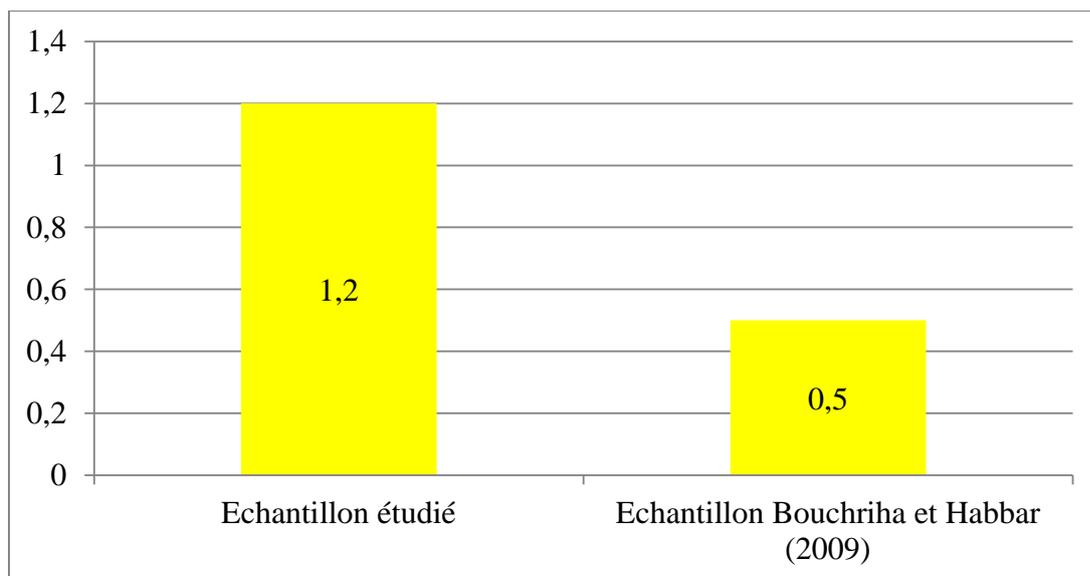


Figure n°17 : Comparaison du rendement des flavonoïdes des racines de *Carlina acaulis L.*

La **figure n°16** montre que les racines de *Carlina acaulis L.* ont un rendement élevé en flavonoïdes de l'ordre de 1,20% en comparaison avec celui de **Bouchriha et Habbar (2009)** qui est de 0,5% .

Plusieurs scientifiques s'accordent à dire que le méthanol reste le solvant le mieux indiqué pour extraire les antioxydants d'une plante, en particulier les flavonoïdes. [Sun et al.,2002]

III.4- Rendement en alcaloïdes

Les résultats obtenus du rendement des alcaloïdes de la racine de *Carlina acaulis L.* sont présentés dans la **figure n°18** ci dessous, comparés à de ceux de **Bouchriha et Habbar (2009)**

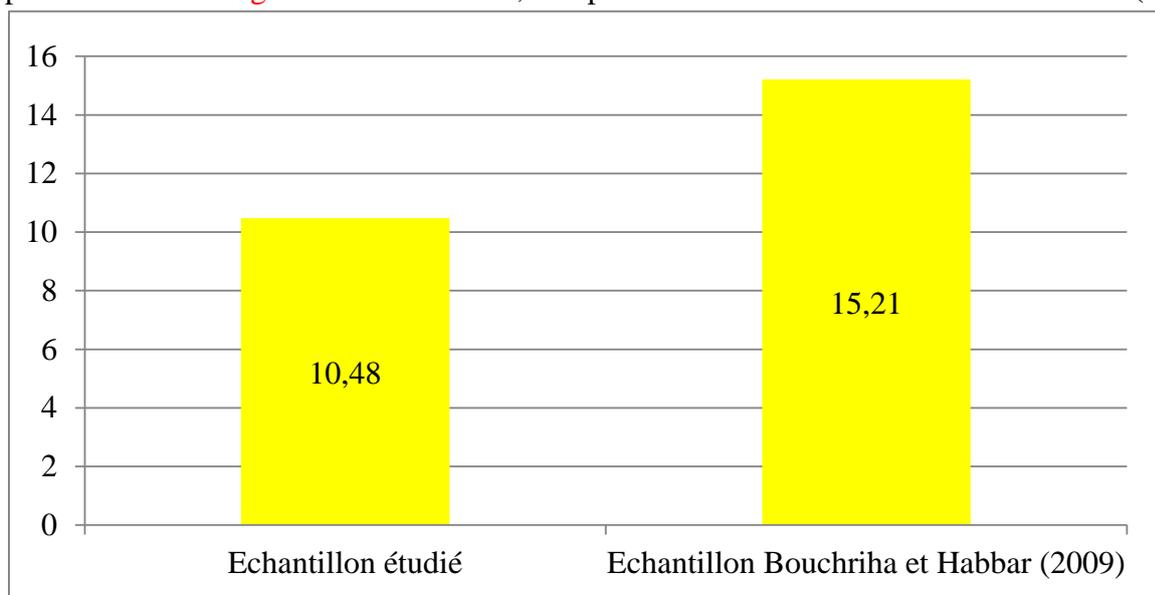


Figure n°18 : Comparaison du rendement des alcaloïdes des racines de *Carlina acaulis L.*

La **figure n°18** montre que les racines de *Carlina acaulis* L. ont un rendement plus faible en alcaloïdes de l'ordre de 10,48% en comparaison avec celui de **Bouchriha et Habbar (2009)** qui est de 15,21%.

La présence des alcaloïdes peut expliquer des activités biologiques diverses [Milcent et Chau, 2003]. Ils jouent à faibles doses, le rôle d'anesthésiques locaux, d'analgésiques, d'antibiotiques, d'antiparasitaires, d'antipaludiques, d'anti-tumoraux. [Chenni, 2010]

Ces résultats obtenus à partir des racines de *Carlina acaulis* L. font ressortir des rendements plus élevés des alcaloïdes par rapport à ceux des tanins et des flavonoïdes. Compte tenu des vertus thérapeutiques reconnues aux alcaloïdes, ces résultats confortent les herboristes dans leur approche qui proposaient les racines de *Carlina acaulis* L. comme remède et traitement de certaines pathologies notamment digestives les affections de la peau.

IV- Dosage

Cette analyse a été réalisée dans le but déterminer la concentration de ces composés phénoliques présents dans la racine de *Carlina acaulis* L. au moyen d'une réaction chimique faisant intervenir un indicateur coloré.

IV.1- Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux nous permet d'avoir une estimation globale de la teneur en différentes classes des composés phénoliques contenus au niveau de l'extrait brut acétone/eau des racines de *Carlina acaulis* L..

Avant de passer à la détermination de la teneur en composés phénoliques nous avons établi une courbe d'étalonnage en utilisant l'acide gallique comme composé de référence. (Voir annexe)

Ensuite, on a comparé le taux des composés phénoliques de la racine de la plante étudiée avec le taux de la racine de la même plante étudiée par **Bouchriha et Habbar (2009)**, et aussi de **Bechlaghem (2016)** dont les valeurs sont mentionnées dans la **figure n°19** ci-dessous :

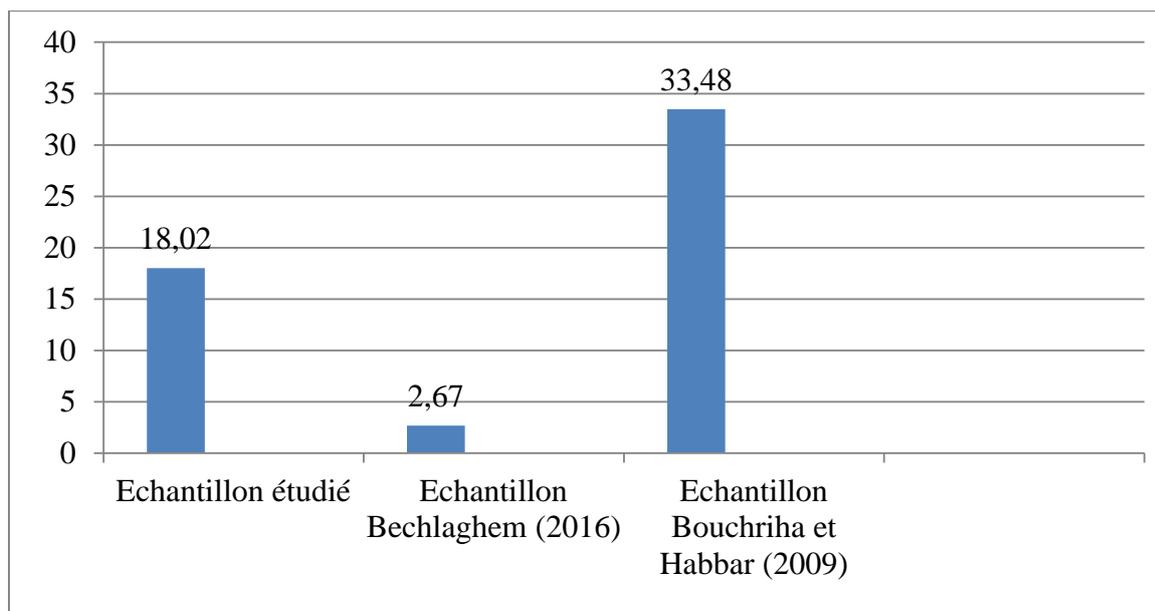


Figure n°19 : Comparaison des phénols totaux des racines de *Carlina acaulis L.*

On relève dans la **figure n°19** ci-dessus une nette différence entre les valeurs enregistrées de la quantité en phénols totaux de l'extrait acétone/eau de *Carlina acaulis L.* dans les trois études concernées.

Une des caractéristiques des composés phénoliques, qu'ils partagent généralement avec l'ensemble des métabolites secondaires, est de montrer une répartition très inégale chez les différentes espèces végétales et, pour une même espèce et ceci selon la variété et le stade d'évolution physiologique. [Macheix et al, 1990; Fleuriet et Macheix, 2003]

Selon **Zapata et collaborateurs (2013)**, la teneur en composés phénoliques totaux est influencée par les saisons de l'année, où ces composés prennent leurs valeurs maximales en été, et minimales en printemps. La température élevée induit l'accumulation des produits phénoliques comme réponse de stress pour la plante.

IV.2- Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a montré qu'avec le trichlorure d'aluminium il y a formation d'un complexe jaune, tandis qu'avec la soude, se forme un complexe de couleur rose. L'absorbance de la solution de la couleur rosâtre est visible à 510 nm. [Djeridane, 2006]

Les flavonoïdes sont omniprésents chez tous les végétaux. Leur activité est exprimée par leur grande affinité biologique avec les polymères, les métaux lourds et surtout pour leur activité antioxydante. Ce sont les plus actifs parmi les antioxydants végétaux alimentaires. Ils ont en outre une action thérapeutique sur certaines pathologies tels que le traitement des inflammations, des infections virales et du cancer. [Morelle, 2006]

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode colorimétrique décrite par **Djeridane (2006)**. La catéchine prise comme contrôle positif a permis de réaliser une courbe d'étalonnage (**Voir annexe**) d'où on a calculé la teneur en flavonoïdes pour les différents

extraits qui est exprimée en mg équivalent de catéchine (EQC) par gramme de matière végétale sèche.

La quantité de flavonoïdes dans notre extrait a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de catéchine et les résultats obtenus sont exprimés en milligrammes par gramme de la matière sèche en équivalent du catéchine. (Figure n°20)

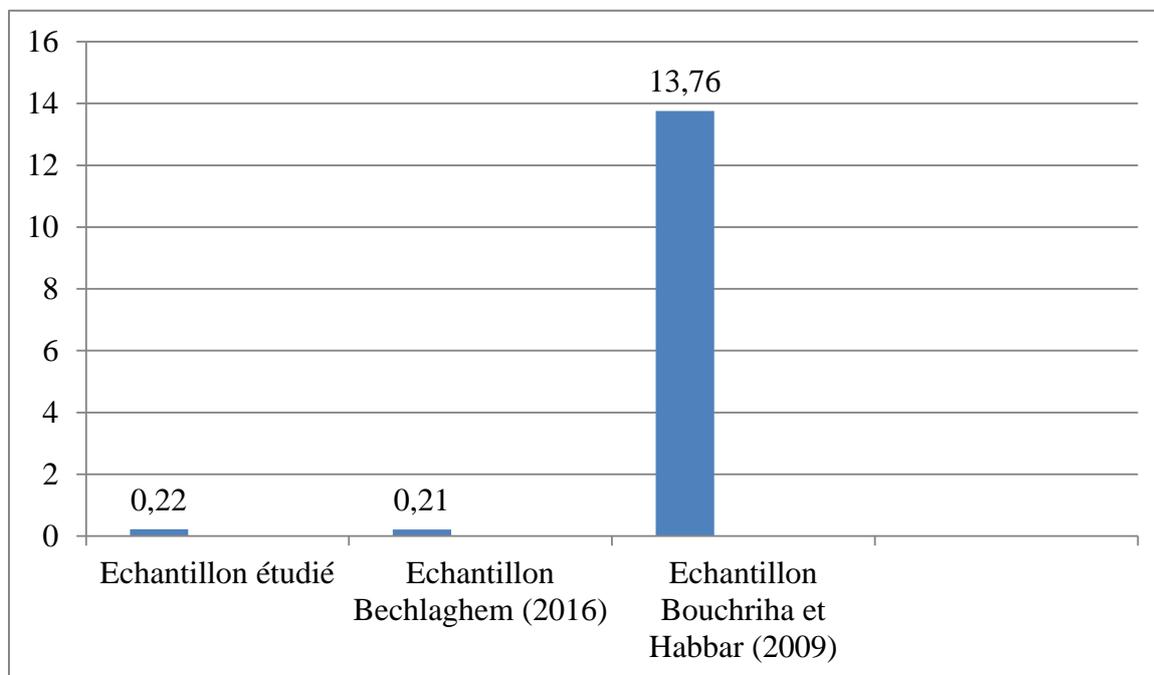


Figure n°20 : Comparaison des teneurs des flavonoïdes des racines de *Carlina acaulis L.*

Les résultats obtenus révèlent que les taux des deux quantités en flavonoïdes des racines de *Carlina acaulis L.* de l'échantillon étudié et celui de **Bechlaghem (2016)** sont sensiblement égaux et sont de l'ordre de 0,22mg/g et de 0,21 mg/g respectivement. Par contre, ils sont nettement inférieurs à celui de **Bouchriha et Habbar (2009)** qui est de 13,76 mg/g.

IV.3- Dosage des tanins

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en milieu acide. Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide, pour produire un complexe coloré mesuré à 500 nm. La réactivité de la vanilline avec les tanins n'implique que la première unité du polymère. Les quantités des tanins sont estimées en utilisant la méthode de vanilline. [Price et al., 1978].

Dans la figure n°21 ci après, est représentée une comparaison des taux de la teneur en tanins (condensés et hydrolysables) de la racine de *Carlina acaulis L.* et celle de **Bouchriha et Habbar (2009)** et aussi de **Bechlaghem (2016)**.

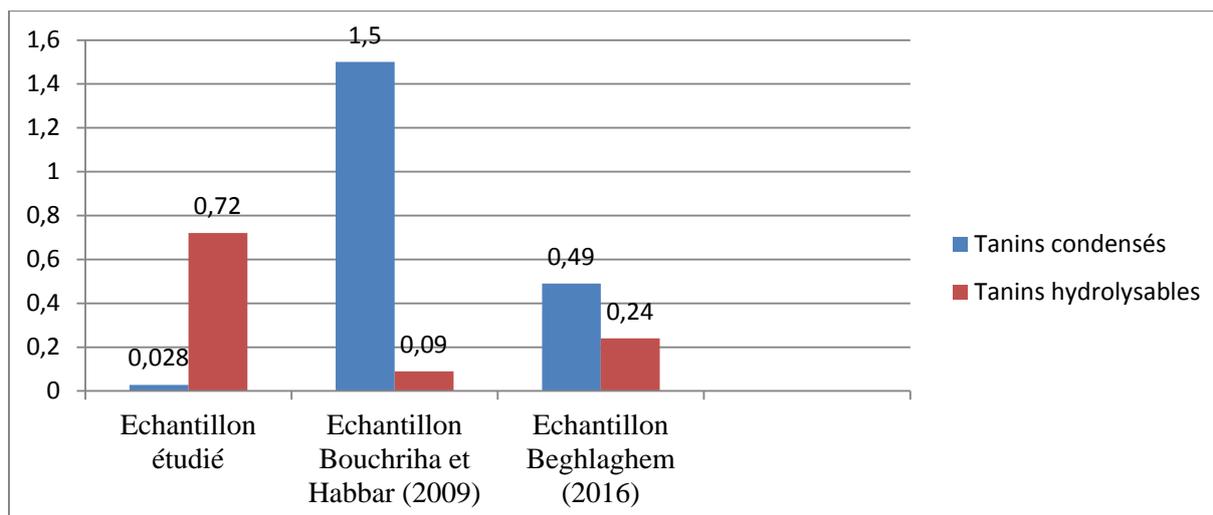


Figure n°21 : Comparaison des teneurs des tanins condensés et hydrolysables des racines de *Carlina acaulis L.*

Nous avons enregistré un taux en tanins condensés de *Carlina acaulis L.* étudié d'une valeur de 0,028 mg/g, suivi de celle de **Bechlaghem (2016)** qui est fortement supérieure et qui est de 0,49 mg/g. La valeur la plus élevée est celle de **Bouchriha et Habbar (2009)** avec 1,5 mg/g.

Par contre on a noté que le taux en tanins hydrolysables de *Carlina acaulis L.* étudié qui est de l'ordre de 0,72 mg/g est supérieur à ceux de **Bouchriha et Habbar (2009)** et aussi de **Bechlaghem (2016)** qui sont estimés respectivement à 0,09mg/g et 0,24 mg/g.

Notons aussi que le taux des tanins hydrolysables de l'échantillon étudié est nettement supérieur à celui des tanins condensés qui sont respectivement de 0,72% et 0,028%.

Il est utile de préciser que plusieurs facteurs rentrent dans cette variabilité de la teneur en tanins chez *Carlina acaulis L.*, tels que la sensibilité des tanins qui a plusieurs voies de dégradation (Oxydation, lumière), et le stade de maturité du végétal, et enfin les conditions culturales.

D'après **Scalbert, (1991)**, la teneur en tanins condensés diminue légèrement au stade de maturation par leur oxydation par voie non enzymatique en polymère coloré par la formation de complexe métal-polyphénols et la conversion des leuco-anthocyanes en anthocyanes.

Les valeurs issues du dosage des tanins nous renseignent sur leur degré de toxicité sachant que les tanins hydrolysables sont principalement responsables des effets toxiques pouvant apparaître lors de la consommation de certaines plantes. Les tanins condensés qui ne traversent pas la barrière intestinale le sont donc beaucoup moins.

Aussi, il est à noter que chez les espèces incluant les astéracées, une famille végétale a d'autant plus de chances de présenter une quantité inversement proportionnelle des tanins par rapport à celle des alcaloïdes, et réciproquement. Dans notre cas, la quantité des alcaloïdes a été la plus importante (10,48% des alcaloïdes contre 1,18% des tanins).

V- Synthèse

A l'issue de notre modeste étude et à travers les résultats obtenus des différentes expériences effectuées, nous pouvons retenir les points ci après :

- *Carlina acaulis L.* est une plante riche en eau avec une teneur de l'ordre de 78.55%, ce qui lui permet de solubiliser les constituants hydrophiles et par voie de conséquence, bénéfique pour la digestion.
- Les tests phytochimiques révèlent l'existence dans la racine de *Carlina acaulis L.* de métabolites secondaires à des proportions plus ou moins importantes et inégales, influencées par les facteurs de climat, qualité des sols et période de récolte et qui sont notamment les tanins, les flavonoïdes ainsi que les alcaloïdes.

Sur les plans rendement et dosage de ces composés, nous enregistrons des taux plus élevés des alcaloïdes par rapport à ceux des flavonoïdes et des tanins avec respectivement 10.48%, 1.20% et 1.18% expliquant ainsi l'utilisation de *Carlina acaulis L.* comme anesthésique, analgésique et antibiotique.

CONCLUSION

Les plantes médicinales sont utilisées pour leurs propriétés particulières bénéfiques pour la santé humaine.

La phytothérapie est une pratique ancienne qui consiste à utiliser les plantes dans un but thérapeutique et qui date de plusieurs millénaires, elle est née d'expériences empiriques des hommes utilisant ce qu'ils avaient à leur disposition pour soulager leur maux.

Parmi ces plantes, nous avons choisi *Carlina acaulis L.* qui est une plante sauvage largement utilisée dans la région de Tlemcen comme plante médicinale, et ceci dans le but de réaliser une étude sur la détermination de la teneur des composants présents dans sa racine et qui sont des métabolites secondaires.

Notre étude a fait ressortir la présence dans la racine de *Carlina acaulis L.*, de certains composés phénoliques (les tanins et les flavonoïdes) qui agissent directement dans le système de défense contre les agressions externes d'une part, et d'autre part des alcaloïdes connus pour leurs effets analgésiques.

Notre étude a montré aussi que l'extraction dans la partie racine de *Carlina acaulis L.* a permis d'obtenir un rendement de 15,49% pour l'extrait brut méthanol/eau, plus élevé que celui de l'extrait brut acétone/eau avec un taux de 7,52% .

Pour le rendement massique des composés phénoliques existants dans la partie racine de *Carlina acaulis L.* , les taux obtenus ont été de 1,20% pour les flavonoïdes, 1,18% pour les tanins et de l'ordre de 10,48% pour les alcaloïdes.

Les résultats des dosages effectués sur la partie racine de *Carlina acaulis L.* ont enregistré un taux de 18,02% pour les polyphénols totaux, suivi de celui des tanins hydrolysables qui est de 0,72%, puis celui des flavonoïdes avec 0,22%, et enfin un taux des tanins condensés avec 0,028%.

Ainsi, nous pouvons confirmer que la racine de *Carlina acaulis L.* étudiée est effectivement riche en polyphénols et en alcaloïdes.

Bien que les résultats présentés dans notre étude apportent des éléments confirmant les possibilités d'utiliser cette plante dans l'industrie pharmaceutique, alimentaire ou cosmétique, il n'en demeure pas moins de s'y intéresser et de l'explorer davantage afin de mieux l'exploiter. Sans oublier de prendre conscience dans son utilisation domestique qui peut aboutir à des erreurs d'applications et de dosage ainsi qu'à des accidents toxiques.

Aussi, il serait souhaitable en perspective d'approfondir les recherches pour compléter les connaissances de cette plante en se penchant notamment sur ses effets secondaires et toxiques, sur les métabolites primaires (glucide, protéines, et lipides) qui y sont contenus, la détermination des huiles essentielles et enfin réaliser des essais biologiques concernant l'activité anti bactérienne.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Agrawal, P.K., Markham, K.R. (1989). *Introduction. In: Carbon-13 NMR of flavonoids.* Agrawal, P.K. Ed. Elsevier. Amsterdam, 1-31.

Audigie, C., Figarelle, J., Zonszain F. (1980). *Manipulation d'analyses biochimiques* Ed. Doin. Paris. pp: 88-97.

Bajaj Y.P.S. (1999). *Biotechnology in agriculture and forestry 45, transgenic medicinal plants.* Ed. Bajaj Y.P.S. Springer. Verlag Berlin Heidelberg. 372p

Bate-Smith, E.C. (1973). *Chemotaxonomy of geranium.* Bot. J. Linn. Vol. 67 pp 347-359

Bechlaghem, W. (2016). *Contribution à l'étude phytochimique des métabolites secondaires (tanins, flavonoïdes et alcaloïdes) des racines de Carlina acaulis L. (Tafgha) de la région de Tlemcen.* Mémoire de master en biologie. Université de Tlemcen

Benoît, Bock (2009). *Base de donnée nomenclaturale de la flore de France.* Nomenclature, taxonomie, synonymie, correspondances.

Bernard, B. (2001). *Plantes médicinales du monde, réalité et croyances.* Estem. pp 105-107,349-350

Bernard, Kuballa (2001). Université de Strasbourg. Faculté de Pharmacie

Bérubé-Gagnon, J. (2006). *Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de Picea mariana.* Mémoire de maîtrise en ressources renouvelables de l'université de Québec.

Blahova, B., Brands, Tererova, E. et Fabulova A. (2004). *Isolation and determination of phenolic compounds in fruit-green tea. Journal of liquid chromatography And Related Technology.* 27(1), 31-48. Diapositive (film:93-photo 9) numérisée en format tif (cd 4 -j.31).

Bonner, D.C. (1974). *Thermodynamic properties of some concentrated polymer solutions.* Vol 12. pp 51-73.

Bouchriha, A. et Habbar, A. (2009). *Evaluation du pouvoir antioxydant des tanins, des flavonoïdes et des alcaloïdes de Carlina acaulis L. (Tafgha) et mesembryanthemum crystallinum (Fravh n'da) de la région de Tlemcen.* Mémoire d'Ingénieur d'état en Biologie. Université de Tlemcen.

Bravo, L. (1998). *Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance.* Nutrition Reviews, 56(11), 317-333.

Bruneton, J. (1993). *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales.* 2^{ème} édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.

- Bruneton, J. (1999).** *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales*. 3^{ème} édition, Techniques & Documentation, Paris.
- Bruneton, J. (2008).** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 4^{ème} ed. Paris : Tec et Doc Lavoisier
- Chalchat, J.C. (1996).** *Study of anti-dermatophyte effect of ten herbal methanolic extract J* Kerman Med Univ Sci, 3 (3) (1996), pp. 115–122
- Chenni, M. (2010).** *Contribution à l'étude chimique et biologique de la racine d'une plante médicinale : Bryoniadioica Jacq.* Mémoire présenté pour l'obtention du Diplôme de magister. Université d'Oran – Es-Senia 2010. pp 2-50.
- Croteau, R., Kutchan, T.M. and Lewis, N.G. (2000).** *Natural products (secondary metabolites*. In: B.B. Buchanan, W. Gruissem and R.L. Jones (Eds), *Biochemistry and Molecular Biology Plant*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, 11D, pp. 10-1318.crySTALLinum. Australian National Herbarium
- Dauguet, J.C., Foucher, J.P. (1982).** *Les flavonoïdes de arbutus unedo L.* (Erlcacées). *Plantes médicinales et phytothérapie*, 16 (3) : pp 185-191.
- Di Carlo, G., Mascolo N., Izzo A.A., Capasso, F. (1999).** *Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs*. *Life Science*, 65(4), pp 337-353.
- Djeridane, B., Nadjemi, S., Maamri, F., Djireb, P., Stocker (2006).** *Phenolic extracts from various Algerian plants as strong inhibitors of porcine livercarboxylesterase*. *J Enzyme Inhib Med Chem*. Volume 21, No 6, pp 719-726.
- DordevićS, PetrovićS, DobrićS, MilenkovićM, VucićevićD, ZizićS, KukićJ (2007).** *Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidantactivities of Carlina acanthifolia root essential oil*. *Journal of Ethnopharmacology*. 109, 458-463.
- Foley, W.J., Iason, G.R., McArthur, C. (1999).** *Role of plant secondary metabolites in the nutritional ecology of mammalian herbivores: how far have we come in 25 years?* *Nutritional Ecology of Herbivores* (Ed. par Jung H.J.G. et Fahey G.S.), 130-209. Savoy, Illinois, USA: American Society of Animal Science.
- Galvi L., Mwalogo G.J., Wingira B.A.M., Reedl B., Shilds J.A. (1995).** *Characterization of wattle- Tannin- Based adhesives for Tanzania*. 49 (2).
- Garnier, G., Bézanger-Beauquesne, L. ,And Debraux, G. (1961) .** *Ressources médicinales de la flore Française*. Tome 1, Paris VIème, Vigot Frères, Editeurs,1961.
- Gravot, (2009) .** Support de cours sur le métabolisme secondaire (Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV) Université de Rennes 1 – L2 UE PHR .
- Grundhöfer, P. Niemetz, R., Schilling, G., Gross, G.G. (2001).** *Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolysable tannins*. *Phytochemistry*, 57, 915-927.
- Guignard, J.L. (1996).** *Biochimie végétale*. Lavoisier, Paris. pp 175-192

Guignard, J.L. (2000). *Biochimie végétale*. 2ème édition; Paris. pp 171-174.

Hagerman, A.E., Riedl, K.M., Jones, G.A., Sovik K.N., Ritchard, N.T., Hartzfeld, P.W., Riechel, T.L. (1998). *High molecular weight plant phenolics (tannins) as biological antioxidants*. J. of Agric. and Food Chem., **46**, 1887-1892.

Harborne, J.B. (1988). *The flavonoids, Advances in research since 1980*. Chapman & Hall. London.

Haslam, E. (1996). *Natural polyphenols (vegetable tannin) as drugs: possible modes of action*. Journal of Natural Products, **59**, 205-215.

Haslam, E. (1996); Cowan, (1999). *Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action*. J. Nat Pro, 59:205 215. medicinal plants. Food Chem, 112: 303–309.

Heller W., Forkmann, G. (1993). *Biosynthesis of flavonoids*. In: The flavonoids, Advances in research since 1980. Harborne J.B. Ed. Chapman & Hall. London, 499.

Hemingway, R.W. (1992). *Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives*. In: Lpant polyphenols : synthesis, propieties, significan de. Laks P.E, Hemingway R W New York

Hermann, F. (2011). *TCM plants : DNA barcoding, cytotoxic and trypanocidal properties of drugs and their active constituents*. Thèse de Doctorat de Sciences Naturelles. Université de Heidelberg, Allemagne. 299 p

Jeun, J. M., Annie. F., Chistyán. J. L. (2005). Les composés phénoliques des végétaux, p203-204

John Kartesz, (2000). Biota of North America Project (BONAP), University of North Carolina. Journal of Biomedicine and Biotechnology, Volume 2010, Article ID 142486, 5

King, A. et Young G. (1999). *Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals*. J Am Diet Assoc 99(2) : 213-8.

Konig, S., Schellenberg, A., Neef, H. et Schneider G. (1994). *Specifity of coenzyme binding in thiamin diphosphate-dependent enzymes*. Crystal structures of yeast transketolase in complex with analogs of thiamin diphosphate. J Biol Chem 269(14): 10879-10882.

Lugasi, A., Hovari, J., Sagi, K.V., Biro, L. (2003). *The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases*. Acta Biologica Szegediensis, **47**(1-4), 119-125.

Macheix J. J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. 1ere Edition, Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne. Bio ed. 54-65.

Macheix J.J., Fleuriet A., Sarni-Manchado P. (2005). *Les composés phénoliques dans la plante : Structure, biosynthèse, répartition et rôles*. In: Les polyphénols en agroalimentaire. Cheynier V., Sarni-Manchado P. Ed. Tec. & Doc. Lavoisier, Paris.

- Medic-Saric, M., Jasprica, I., SmolcicBubaloA., and Momar, A. (2003).** *Optimization of chromatographic conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids.* Croatica ChemicaActa .77 (1-2):361-366. (cited in Mohammedi Z).
- Milcent R., Chau F., (2003).** *Structure fondamentale, chimie et biochimie des principaux composés naturels.* Chimie organique hétérocyclique. Ed.Francois chau EDP. Paris. France. 846p.
- Meusel, H. , Kästner, A. (1990).** *Lebensgeschichte der Gold-undSilberdisteln,* Monographie dermediterranean-mittel europäischen Compositen-Gattung Carlina, Band I, Springer-Verlag, Wien,New York, 1990
- Morelle, L.E. (2006).** *L'alimentation, le stress oxydatif : sources de lipopéroxydation, comment s'en protéger.* Phytothérapie. 5 : 234-240.
- Oyedeji, O., Olutiola, P.O., Owolabi, K., Adejo, KA. (2011).** *Multiresistant faecal indicator bacteria in stream and well waters of Ile -Ife city, Southwestern Nigeria: Public health implications.* J.Public Health Epidemiol.3(8):371-381.
- Price, M., Van-scoyoc, S., Butter, L. (1978).** *A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain.* J. Agric. Food Chem, 26: 1214-1218.
- Robbins, C.T., Hanley, T.A., Hagerman, A.E., Hjeljord, O., Baker, D.L., Schawrtz, C.C., Mautz, W.W. (1987).** *Role of tannins in defending plants against ruminants: reduction in protein availability.* Ecology, 68(1), 98-107.
- Sarni-Manchado, P., Cheynier, V. Les polyphénols en agroalimentaire.** Ed Tec et Doc, Paris, 2006, p. 2-10.
- Scalbert, A., Williamson, G. (2000).** *Dietary intake and bioavailability of polyphenols.* J. Nutr., 130, 2073-2085.
- Schauenberg, (1977).** *Guide des plantes médicinales.* Schauenberg, P. And Paris, F., Milan,Et Niestlé.
- Semeler, FW, (1889).** *Vincent Van Gogh's A Cornfield, with Cypresses,* John Leighton, Anthony Reeve, Ashok Roy and Raymond White, National Gallery Technical Bulletin, 1989, Volume 11, pp 42–59
- Singleton, V.L., Orthofer R., et Lamuela-Raventos R. M. (1999) :** *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteu reagent.* Method.Enzymol. 299: 152-178.
- Sofowora, A. (1993).** *Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa.* Spectrum Books Ltd., Ibadan, Nigeria, pp. 191-289.
- Sun, J. (2002).** *Antioxydant and antiproliferative activities of common vegetables.* J Agric Food Sci. Nutr, 55 (3), 191-199.

Swain, T. (1979): *Tannins and lignins. Herbivorts, their interaction with secondary plant metabolites.* (éd. par Rosenthal G.A et jansen D.H).New York :Academic Press,pp.637-682.

Verdrager, J. (1978). *Les médicaments qui nous viennent des plantes* (Ed.). Maloine.SA.
pp :12

www.perso.wanadoo.fr/philippe.julve/catminat.htm

ANNEXE

Préparation des réactifs :

1-Réactifs de Mayer :

Dissoudre 1,358g de HgCl₂ dans 60ml d'eau distillée ;

Dissoudre 5g de KI dans 10 ml d'eau distillée ;

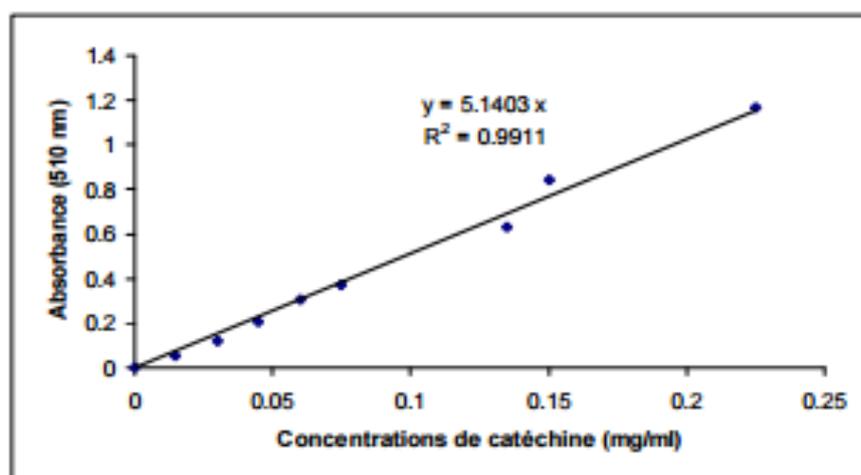
Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100ml d'eau distillée.

2-Réactifs de wagner :

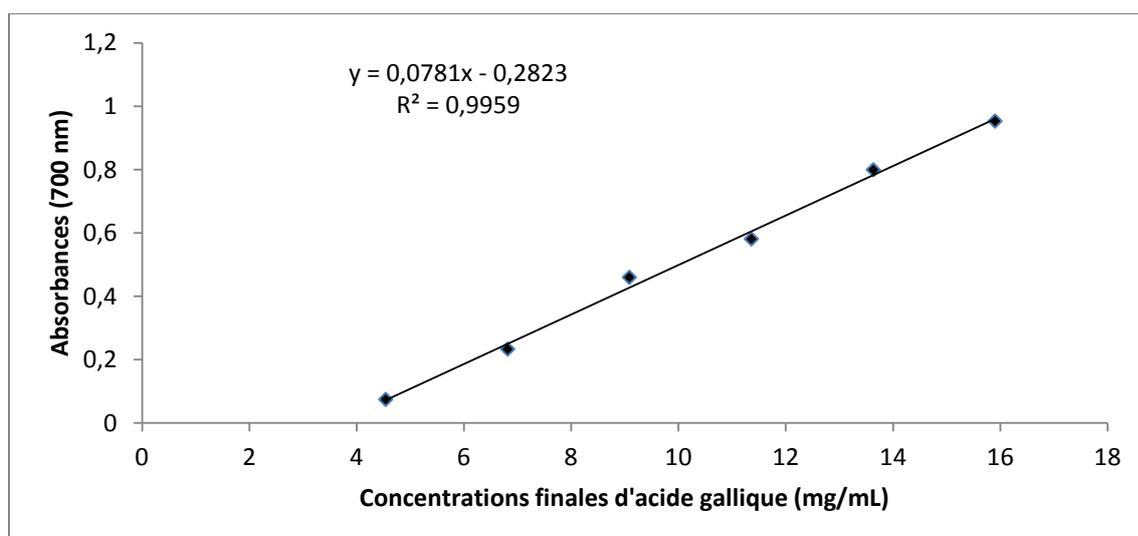
Dissoudre 2g de KI et 1,27 g de I₂ dans 75 ml d'eau distillée ;

Ajuster le volume total à 100 ml d'eau distillée.

Courbes d'étalonnage



Courbe d'étalonnage de la catéchine des flavonoïdes



Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

ملخص

"كارلينا أكوليس ل." معروفة من قبل الاسم الشائع "تافغة" هي من النباتات الطبية للأسرة استراسيا والتي نجدها في منطقة تلمسان الغنية بالأعشاب. نتائج الاختبارات الكيميائية النباتية تكشف عن ثروة من القلويدات في الجذور، و عكس ذلك مركبات الفلافونويد والعفص تحتوي على كمية أقل من السابق. مردود المستخرج الخام من الجزء الجذر من كارلينا أكوليس محدد باستخدام اثنين من المذيبات وهما الميثانول / الماء والأسيتون / الماء يكشف نسبة 15.49% و 7.52% على التوالي. ويقدر مردود قلويدات، الفلافونويد والعفص، على التوالي ب 10.48%، 1.20% و 1.18%. النتائج التي تم الحصول عليها عن طريق الجرعة أفرزت نسبة البوليفينول الإجمالي قدرها 18.2 مغ / غ م.ج تليها نسب العفص القابل للتحلل ب 0.72 مغ / غ م.ج ، ثم مركبات الفلافونويد ب 0.22 مغ / غ م.ج و في النهاية، بنسبة منخفضة من العفص المكثف بحوالي 0.028 مغ / غ م.ج.

كلمات البحث: كارلينا أكوليس ل.، منطقة تلمسان، المركبات الثانوية، بوليفينول، قلويدات، الدراسة الكيميائية النباتية.

Résumé

Carlina acaulis L. connue par le nom vernaculaire «Tafgha» est une plante médicinale de la famille des astéracées qu'on trouve au sein de la riche flore de la région de Tlemcen. Les résultats des tests phytochimiques révèlent la richesse des alcaloïdes dans les racines, par contre les flavonoïdes et les tanins présentent une quantité moins importante que les premiers. Le rendement de l'extrait brut de la partie racine de *Carlina acaulis L. L.* déterminé au moyen de deux solvants qui sont le méthanol/eau et l'acétone/eau révèle des taux de 15,49% et 7,52% respectivement. Les rendements des alcaloïdes, des flavonoïdes et des tanins sont estimés respectivement à 10,48%, 1,20% et 1,18%. Les résultats obtenus par le dosage affichent une teneur de 18,2 mg /g MS pour les polyphénols totaux suivie par la teneur des tanins hydrolysables avec 0,72 mg /g MS, puis celle des flavonoïdes avec 0,22 mg /g MS et à la fin une teneur faible en tanins condensés de l'ordre de 0,028 mg /g MS .

Mots clés : *Carlina acaulis L.*, région de Tlemcen , métabolites secondaires , polyphénols , alcaloïdes , étude phytochimique .

Abstract

Carlina acaulis L. L. known by the vernacular name "Tafgha" is a medicinal plant of the Asteraceae family found within the rich flora of the Tlemcen region. The results of the phytochemical tests reveal the richness of the alkaloids in the roots, whereas the flavonoids and the tannins present a smaller quantity than the first. The yield of the crude extract of the root portion of *Carlina acaulis L. L.* determined using two solvents, methanol / water and acetone / water, was 15.49% and 7.52%, respectively. The yields of alkaloids, flavonoids and tannins are estimated at 10.48%, 1.20% and 1.18% respectively. The results obtained by the assay show a content of 18.2 mg /g MS for total polyphenols followed by the content of hydrolyzable tannins with 0.72 mg /g MS and then that of flavonoids with 0.22 mg /g MS and At the end, a low content of condensed tannins of the order of 0.028 mg /g MS.

Key words: *Carlina acaulis L.*, Tlemcen region, secondary metabolites, polyphenols, alkaloids, phytochemical study.