



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCCEN

MEMOIRE

Présenté à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

MASTER EN CHIMIE

Spécialité : Chimie Pharmaceutique

Par :

M^{elle} Samaké Fatoumata

Sur le thème

Etude de la composition chimique et évaluation biologique des extraits de la plante Moringa Oleifera

Soutenu publiquement le 25 juin 2019 à Tlemccen devant le jury composé de :

Mr BOUFELDJA TABTI	Professeur	Université de Tlemccen	Président
Mme KENICHE ASSIA	Maitre de conférences B	Centre Universitaire de Maghnia	Encadreur
Mme AMEL AYACHI	Maitre de conférences B	Université de Tlemccen	Examinatrice

*Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses
COSNA*



UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCCEN

ABSTRACT:

Moringa oleifera is a tree that grows in the tropics, well known for its medicinal and nutritious activities. Our work was done on the evaluation of chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of Moringa oleifera Mali (powder, leaves, seeds) and that of Algeria (leaves). And also to determine the flavonoids and polyphenols contents of each sample (comparative study of Mali and Algeria leaves). The result shows that leaves of MO of Mali has more flavonoids and polyphenols than Algeria so more antioxidant power.

Keywords: Antimicrobial, Evaluation, Moringa oleifera, flavonoids, polyphenols, antimicrobial.

RÉSUMÉ :

Moringa oleifera est un arbre qui pousse sous les tropiques, bien connu pour ses propriétés médicinales et nutritives.

Nos travaux ont porté sur l'étude de la composition chimique, et l'évaluation des activités antioxydante et antimicrobienne du Moringa Oleifera du Mali (poudre, feuilles, graines) et de l'Algérie (feuilles). Et aussi la détermination du contenu en flavonoïdes et en polyphénols de chaque échantillon (étude comparative du Mali et Algérie feuilles). Le résultat montre que les feuilles de MO du Mali ont plus de flavonoïdes et de polyphénols que l'Algérie, donc plus de pouvoir antioxydant.

Mots clés: Antimicrobienne, Evaluation, Moringa oleifera, flavonoïdes, polyphénols, antioxydant.

ملخص:

MORINGA OLEIFERA هي شجرة تنمو في المناطق الاستوائية ، وتشتهر بأنشطتها الطبية والمغذية. تم عملنا على تقييم التركيب الكيميائي ، وأنشطة مضادات الأكسدة ومضادات الميكروبات في MORINGA OLEIFERA MALI (مسحوق والأوراق والبذور (والجزائر) الأوراق). وكذلك لتحديد محتويات الفلافونويد والبوليفينول لكل عينة دراسة مقارنة لمالي والجزائر تغادر. (والنتيجة تظهر أن أوراق MORINGA OLEIFERA MALI تحتوي على فلافونويدات وبوليفينول أكثر من الجزائر أك 1 والجزائر تغادر. (والنتيجة تظهر فلافونويدات وبوليفينول أكثر من الجزائر أكثر قوة مضادة للأكسدة.

كلمات مفتاحية:

الكلمات المفتاحية: مضادات الميكروبات ، التقييم ، المورينجا أوليفيرا ، الفلافونويد ، البوليفينول ، مضادات الميكروبات.

DÉDICACE

Je dédie ce modeste travail ;

*A mes Chers Parents **Mamadou Samaké** et **Mariam Coulibaly** pour leur encouragement et leur patience, aucun dédicace ne peut exprimer ce que je ressens.*

*A mon **Papa**, après m'avoir Inculqué une bonne éducation, tu m'as fait comprendre qu'on a rien sans peine .Tes Soutiens et conseils m'ont Beaucoup Aidée .Trouves ici le Fruit de nombreux efforts et sacrifices consentis à mon égard .Qu'Allah te bénisse, t'accorde longue Vie et santé pour que je puisse te servir autant que possible.*

*A ma **Maman**, ma reine, Femme Courageuse. Ma motivation et mon Ardeur à réussir sont alimentées par tes Prières .Merci Pour l'éducation que tu m'as Inculquée. Qu'Allah te comble de bénédictions, t'accorde longue vie et santé afin que je te serve autant que possible.*

*A mes Tantes **Matou** et **Atou**, pour leur Soutien et Conseil.*

*A mes frères, sœurs, cousins (**Yaya, Amadou, Awa, Koro, Badian, Bouba, Fousseini, Oumar, Ismaël**) ; votre Soutien, vos Prières et m'ont Beaucoup accompagné pour ce Travail. Trouvez ici ma reconnaissance.*

*A mon adorable petit neveu **Papi**.*

*A ma très chère patrie, **MALI**.*

A toutes les personnes que j'aime.

REMERCIEMENTS

Je ne saurai présenter ce travail sans exprimer ma profonde gratitude à tous ceux qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à son aboutissement.

Nos remerciements vont à l'endroit de :

*Mon encadrant Dr **KENICHE ASSIA** pour l'assistance et les critiques constructifs que vous m'avez apportés, pour avoir guidé mes pas tout au long de la réalisation de ce travail .Vos qualités humaines et votre rigueur me marqueront pour toujours. Mes Sincères reconnaissances.*

*Des membres de jury Professeur **JOSEPH KAJIMA MULENGI** et **BENDIABDALLAH AMEL, BOUFELDJA TABTI** qui me font l'honneur de juger ce travail. Un remerciement spéciale au Pr .**SELLES CHAOUKI**, chef de département de chimie de l'université de Tlemcen, pour son aide en continu et l'agréable sortie ; journée scientifique sur l'eau passé sous sa direction au centre universitaire de Maghnia le 8 Mai 2018.*

Tous les professeurs qui m'ont enseignée lors de mon cursus universitaire ;

***MAMY IMENE** et **BENYAMINA SAMIA** pour l'aide qu'elles m'ont apportée lors de la partie expérimentale.*

***YASMINA, SARAH, DOUAA** et **aux trois AMINA** pour leur aide lors de la manipulation ainsi qu'à tous mes camarades de classe, Mme **DRICI** pour leur soutien lors de la partie expérimentale. Mes frères et sœurs **AWA, KORO, YAYA, AMADOU** pour leur encouragement et soutien ; mes amis **DJOULDE, MOHAMED, TOUCHA, OUMOU, ADAMA, SARATA, SARA, OUSSEINA, MAI, MARIETOU** pour leur soutien. A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

LISTE DES ABREVIATIONS

MO : Moringa Oleifera

CCM : chromatographie sur couche mince.

DPPH: 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl.

IC 50 : Concentration Inhibitrice médiane

IR: Spectroscopie infrarouge

MS : Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse)

PH : Potentiel Hydrogène

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.

TEAC: Trolox équivalent antioxidant capacity (capacité antioxydante en équivalent Trolox)

UV : ultraviolet.

HMBC (Heteronuclear multiple Bond Correlation) RMN à deux dimensions

NOESY:(Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) RMN à deux dimensions

AG-MO : Acide Gras du moringa

EAG : équivalent d'acide gallique

ES : extrait sec

EMAG : Extrait du *Moringa Oleifera* des acides gras

EE-MO : Extrait éthanolique du *Moringa*

Eq AG: Equivalent Acide Gallique

FeCl3 : Chlorure ferrique.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau (1) : les différents organes et leurs activités médicinales.

Tableau(2) : Taux en polyphénols, flavanoides et acides ascorbiques des feuilles de MO lyophilisés.

Tableau (3): tableau comparatifs des rendements

Tableau (4) : valeur des λ_{\max} pour chaque EE-MO.

Tableau (5) : Absorbance de l'acide gallique à différentes concentrations :

Tableau (6) : Absorbance des extraits de polyphénols par deux méthodes ultrasons et macération à froid.

Tableau (7) : Quantité des polyphénols.

Tableau (8) : Absorbance des EE-MO

Tableau (9) : Absorbance de la Rutine à différentes concentrations :

Tableau(10) : Quantité des flavonoïdes en équivalent de Rutine dans chaque EE-MO

Tableau (11): IC50 des échantillons.

Tableau(12) : Valeur des Rfs des différents échantillons.

Tableau(13) : valeur des Rfs des différents tubes contenant les produits majoritaires.

Tableau (14) : Absorbance des échantillons DPPH

Tableau(15) : Absorbance des échantillons FRAP

Tableau(16) : zone d'inhibition de bactéries.

Tableau(17) : Absorbance de Trolox à différentes concentrations

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Fleurs, Feuille et graines du <i>Moringa oleifera</i>	1
Figure 2: Carte de répartition de la MO (Trees for life 2013).....	2
Figure 3: Structures de quelques antibiotiques résistants.....	2
Figure 4: Structure chimique des antipaludiques résistants.....	2
Figure 5:feuilles de Moringa.....	2
Figure 6: a)gousses mures de Moringa ; b) soupe avec jeunes gousses duMO;c) eau non purifiée et purifiée avec les graines du MO.....	4
Figure 7 : Filtre à sable fonctionnalisé à l'extrait de graine de Moringa (sable f) pour l'amélioration de l'élimination des agents pathogènes.....	6
Figure 8: Structure des sucres présents dans le MO.....	8
Figure 9 : Structure de: Niazimin A (1) ; 4-(4'-O-acetyl- α -L-rhamnopyranosyloxy) benzyl isothiocyanate (2), 4-(α -L-rhamnopyranosyloxy) benzylisothiocyanate (3), niazimicine (4), 4-(α -L-rhamnopyranosyloxy) benzyl glucosinolate(5), benzyl isothiocyanate (6), aglycone of deoxy-niazimicine (N-benzyl, S-ethylthioformate) (7), pterygospermin (8), niaziminin (9),O-ethyl-4-(α -L-rhamnosyloxy)benzyl carbamate (10), niazirin (11),glycerol-1-(9-octadecanoate) (12), β -sitosterol (13).....	9
Figure 10: Structure de : (14) Le xylose, (15) Le mannose ; (16) Le galactose, (17) Le rhamnose, (18) Le saccharose, (19) Le glucose, (20) L'acide glucuronique.	
Figure11 : (21) kaempferol, (22) quercétine, (23) isoquercitrine, (24) rhamnetine, (25) kaempféritrine.....	10
Figure 12 : Structure de (25) L'acide chlorogénique, (26) l'acide caféique,(27) l'acide gallique.....	11
Figure 13: Structure de : La moringine(28), la moringinine, (29), Le Phenylacétonitrile (30), Le N, alpha-L-rhamnopyranosyl vincosamide(31), La pyrrolemarumine(32).....	11
Figure 14: Kaempféride 3-O-2'', 3''-diacetylglucoside; Kaempferol-3-O-[beta -glucosyl-(1!2)]-[alpha -rhamnosyloxy-(16) -O-beta -glucoside-7-O-alpha rhamnoside; Kaempféride 3-O-(2''-O-galloylrutinoside)-7-O-alpha-rhamnoside.....	13
Figure15:Four à micro-ondes utilisé pour l'extraction de composés bioactifs des gousses à l'aide de méthanol ¹⁸	13
Figure 16 : Matières végétales utilisées : les feuilles, graines et la poudre feuille.....	15

Figure 17 : L'hydrodistillation des feuilles du MO et phase organique avec l'éther diéthylique dans une ampoule à décanter.....	16
Figure 18 : Montage Soxhlet utilisé par deux méthodes d'introduction de la poudre.....	17
Figure 19: Montage d'estérification.....	18
Figure20: Extrait éthanolique des feuilles sèches du Mali.....	18
Figure 21 : Processus de Sonication des différents échantillons.....	18
Figure22: La réaction des flavonoïdes avec $AlCl_3$	19
Figure23: Réaction du DPPH avec les polyphénols.....	20
Figure 24: Histogramme des rendements des extraits éthanoliques des feuilles du MO.....	24
Figure 25 : spectre d'absorption UV des EE MO.....	25
Figure26 : Histogramme comparatif de la quantité des polyphenols des 3 échantillons du MO (première méthode).....	26
Figure27 : Histogramme comparatif de la quantité des polyphenols des 3 échantillons du MO (deuxième méthode).....	26
Figure 28: Histogramme de la quantité comparative de flavonoïdes.....	26
Figure 29: Histogramme comparatif de la quantité de flavonoïdes des 3 échantillons du MO (première méthode).....	27
Figure 30: Histogramme comparatif de la quantité de flavonoïdes des 3 échantillons du MO (deuxième méthode).....	28
Figure 31 :Histogramme de la quantité comparative de flavonoïdes.....	28
Figure32: Histogramme de l'activité antioxydante par DPPH.....	29
Figure 33:Histogramme de l'activité antioxydante par FRAP.....	30
Figure 34: Histogramme de l'activité antimicrobienne.....	31

Liste des figures insérées dans les annexes

Figure (01) : spectre du α -L-Rhamnopyranosyloxy) benzyl glucosinolate.

Figure (02) : spectre du carbamate rhamnoside et glucosinates.

Figure (03) : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.

Figure(04) : courbe d'étalonnage de la Rutine

Figure(05) : Courbe d'étalonnage du Trolox

Figure (06): plaques CCM

Figure(07) : Plaques CCM des tubes

SOMMAIRE :

Partie bibliographique

I.INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
II.Problématique :	2
III.Objectifs :	2
Chapitre 1 : Généralité sur la plante <i>Moringa Oleifera</i>	
Introduction.....	3
1. Historique	4
2. Utilisations en alimentation et industrie	4
3. Propriétés Thérapeutiques	5
3.1. Activité antibactérienne des Feuilles de MO.....	6
3.2 Activité antioxydante des feuilles MO	6
4.Autres méthodes utilisations, conservation et toxicité de la MO	6
4.1.Activité purificatrice d'eau	7
4.2. Méthodes de conservation	7
5.Etude comparative entre la composition chimique provenant de 3 zones climatiques différentes	7
5.1.Teneur totale en composés phénoliques, flavonoïdes et acideascorbique.....	7
6. Travaux sur la <i>Moringa Olifera</i> Algérienne	8
Conclusion Chapitre 1	8
Chapitre 2 : Etude de la composition chimique dela plante <i>Moringa Oleifera</i>	
1.Introduction :.....	9
2. les composés bioactifs présents dans le MO.....	9
2.1. Les sucres	10
2.2. Les polyphénols	10
2.2.1. Les flavonoïdes	11
2.2.2. Les acides phénoliques	11
2.2.3. Tannins	12

2.3. Alcaloïdes.....	12
2.4. Saponines	12
3. les méthodes d'analyses	13
3.1. Spectrométrie de masse (LC-MS)	13
3.2. Caractérisation des composés du MO par RMN	13
4. Méthodes d'extractions	14
4.1. Extraction assistée par micro-onde	14
4.2. Extraction par soxhlet	14
Conclusion Chapitre 2.....	14
<u>Partie expérimentale</u>	
Introduction	15
I. Indications générales	15
1. UV-Visible	15
Les CCM	15
II. Travail effectué	14
.Matériels et méthodes :.....	15
. L'hydrodistillation des feuilles du MO :.....	15
A.Extraction et estérification des acides gras de la MO des graines :.....	16
1.Extraction des acides gras AG-MO :.....	16
.Extraction AG-MO par Soxhlet des graines de la MO :.....	16
2.Estérification des acides gras en présence de BF ₃ :	17
B.Méthodes d'extractions :.....	17
C.Détermination de la quantité totale en polyphénols et flavonoïdes des EE-MO :	18
1.Quantité totale en polyphénols :.....	18
2.Quantité totale en flavonoïdes :.....	19
D.Evaluation de l'activité antioxydante de chaque EE-MO :	19
1.Activité antioxydante DPPH :	19
2. Méthode FRAP (Ferric reducing-antioxidant power) :.....	20
E.Evaluation de l'activité antimicrobienne des EE-MO :	21
1.Préparation des suspensions des germes test :.....	21

2. Protocole de l'activité antimicrobienne par la technique des disques en papier.....	21
.Résultats et discussions :.....	21
A. Discussion des rendements selon les différentes méthodes d'extraction :	21
B. Détermination de la longueur d'onde d'absorption maximale des EE-MO :	22
C. Quantité totale en polyphénols et flavonoïdes.....	23
1. Quantité totale en polyphénols	23
2. Quantité totale en flavonoïdes	26
D . Evaluation de l'activité antioxydante	26
E. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	28
F. Etude comparative des EE-MO avec CCM et isolation de produit :.....	29
Conclusion générale.....	31
Les perspectives.....	32

Partie bibliographique

I. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le *Moringa Oleifera*(MO) communément appelé “arbre miracle “, appartient à une famille mono-générique d’arbres et d’arbustes, les Moringacées¹. Parmi les 13 espèces connues, il est celui qui est le plus facile à planter. IL grandit vite et est résistant à la sécheresse et la chaleur².



Figure 1 : Fleurs, Feuille et graines du *Moringa oleifera*^{2,3,4}.

Le MO est un arbre présent dans les zones tropicales et subtropicales. On en trouve en Amérique latine, en Asie, les Antilles, en Afrique occidentale australe et orientale².



Figure 2: Carte de répartition du Mo(Trees for life 2013)⁵.

¹Anwar ,F.; Latif, S.;Ashraf M.; Gilani A.,H.;Moringa oleifera: A Food Plant with Multiple Medicinal Uses ; *Review articleinterscience*,**2007**,*21*,17-25.

²Singh, A.; Navneet ;Ethnomedicinal Pharmacological and Antimicrobial Aspects of Moringa oleifera Lam.; *Review the journal of pharmacology* ;**2018**; *7*,45-50.

³Manzo, M., L. ; Halidou, D., M. ; Hallarou, M., A. ; Rabani, A. ; Donnen, P. ; Dramaix, M.; Composition de la poudre des feuilles sèches de Moringa Oleifera dans 3 régions du Niger ; *African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development* ; **2016** ; *16*, 11342-11442.

⁴BOURAI E. & GUELMANI-ZIANI F. « Activité antioxydante d’extraits de graines d’intérêt nutritionnel et médicinaal : Moringa oleifera » Université A. MIRA – Bejaia ; mémoire de Master **2015** page16.

II. Problématique :

La résistance médicamenteuse est de plus en plus prononcée dans notre monde d'aujourd'hui. De plus l'apparition de nouvelles épidémies dues à la mutation des virus et des bactéries, est une urgence pour nous les chimistes à développer et trouver de nouvelles molécules actives. Jusqu'à nos jours, aucune étude n'a été menée sur le *Moringa oleifera* d'origine malienne ou algérienne, c'est l'une des raisons d'investiguer dans ce travail cette plante. Elle est connue pour son utilisation traditionnelle contre le paludisme et les différentes infections bactériennes. On note ci-après, les structures des antibiotiques et antipaludiques qui présentent des résistances⁶.

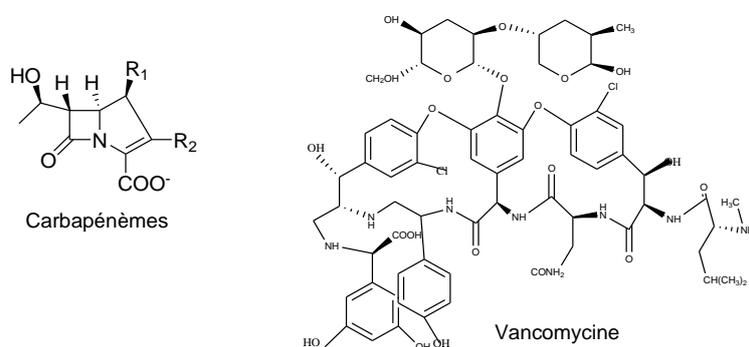


Figure 3: Structures de quelques antibiotiques résistants⁷.

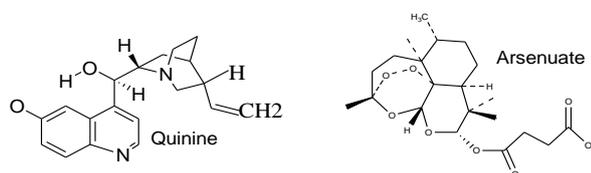


Figure 4: Structure chimique des antipaludiques résistants⁸.

III. Objectifs :

Afin de palier aux problèmes de résistances aux médicaments, et afin de trouver de nouvelles molécules bioactives, nous avons choisi la plante MO d'origine malienne et algérienne. Car à notre connaissance aucune étude n'a été réalisée dans la littérature sur la composition chimique et l'évaluation biologique pour la partie des feuilles.

⁵Vonimihaingo Ramarason Rakotosamimanana« Etude des pratiques et croyances alimentaires pour comprendre la malnutrition à Madagascar. Intérêt de l'introduction de feuilles de *Moringa oleifera*» Thèse de doctorat ; Université de Bourgogne **2014** page40.

⁶ Nordmann, P.; Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif ; *Review médecine science*, **2010**, 26, 950-959.

⁷M. Wolff, M., L.; Joly-Guilloub, M., L.; Pajotc, O.; Les carbapénèmes, Comparative ; *Réanimation*, **2009**, 18, 199-208

⁸Dembélé K. D., Fréquence de prescription des antipaludiques dans les centre de référence de Kati« de Décembre 2006 à Février 2007 »; thèse de doctorat; Université de Bamako ,**2008**.



Figure 5:feuilles de Moringa⁴.

Le plan de ce mémoire s'articule autour de deux grandes parties, dont la première est une synthèse bibliographique, tandis que la deuxième nommée «Travail effectué » qui détaillera nos résultats obtenus au sein du laboratoire ainsi que les données expérimentales relatives à l'étude de la composition chimique et l'évaluation biologique.

Pour la première partie ; la synthèse bibliographique s'étendra sur deux chapitres :

Lors du premier chapitre, regroupera les généralités sur la plante MO de plusieurs régions du monde.

Le second chapitre, quant à lui, contient l'étude détaillée sur la composition chimique de la plante du MO de plusieurs régions du monde et discussion de leur analyse par différentes méthodes d'analyse (RMN, SM...).

Chapitre 1 : Généralité sur la plante *Moringa Oleifera*

Introduction

Le (MO) est une plante dotée d'une richesse nutritionnelle et médicinale très importante qui couvre un large spectre d'activités. Dans ce chapitre, nous allons regrouper l'essentiel des informations sur le MO de plusieurs régions du monde.

1. Historique :

Le (MO) est mentionné dans un écrit indien datant du début du premier siècle avant JC, sous le nom de «Shigon»⁹. Depuis 150 ans avant Jésus Christ, les feuilles et les fruits du MO étaient utilisés par les rois et les reines dans leur régime alimentaire¹⁰.

2. Utilisations en alimentation et industrie :

Le MO est couramment utilisé en médecine populaire et en alimentation humaine et animale dans les sociétés africaines et asiatiques¹¹. Les graines sont également utilisées pour la purification d'eau⁴.



Figure6: a) gousses mures de Moringa⁴ ; b) soupe avec jeunes gousses de Moringa¹⁰ ;c) eau non purifiée et purifiée avec les graines de Moringa⁴.

Concernant les feuilles, elles peuvent être consommées fraîches, cuites ou conservées sous forme de poudre séchées pendant des mois⁵.

3. Propriétés Thérapeutiques :

Le MO a également de nombreuses utilisations médicinales¹. Les différentes préparations issues du MO (Crèmes, huiles, émoullients, pommade, poudres) ont de nombreuses activités⁵. Dans le tableau ci-dessous regroupe les propriétés médicinales présentes dans les différentes parties de la plante. (voir annexe tableau 1)

⁹Foidl N., Makkar H.P.S. et Becker K ; Potentiel de Moringa Oleifera en agriculture dans l'industrie ; **2001** ; 1-20

¹⁰Djermoune Sadika & Henoune N. ; «Composition chimique et teneur en composés phénoliques des graines de Moringa oleifera » ; Mémoire de master ; **2015** ; Université de Bejaia; page 4.

¹¹Ralezo, M., A.; Antanarivo (Madagascar), le Moringa oleifera; **2006**, 1-16.

3.1. Activité antibactérienne des Feuilles du MO:

D'après une étude réalisée en Inde, le distillat du MO indien réduit fortement la prolifération des bactéries testées telles qu'*Escherichia coli*, suivis de *Staphylococcus aureus*, de *Klebsiella pneumoniae*, de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Bacillus subtilis*. Cette étude montre également que la poudre du jus de feuilles fraîches et l'extrait à l'eau froide de feuilles fraîches présentaient une activité antibactérienne potentielle pour *Shigella shinga*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Sh. sonnei* et *Pseudomonas sp*¹⁴.

Selon une étude faite au Nigeria, les extraits (aqueux, éthanolique et méthanolique) des feuilles montre peu d'effet inhibiteur sur les entéropathogènes (*Escherichia coli*, *Salmonellatyphi*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus sp*, *Pseudomonas aeruginosa*), alors que les solutions aqueuses et méthanoliques d'extraits ont des effets inhibiteurs appréciables sur les bactéries des plaies de l'orthopédiste à 30 mg / ml ont été observés¹². Quant à l'extrait éthanolique, il ne montre aucune zone d'inhibition de la croissance sur les bactéries de la plaie. Tous les organismes fongiques sauf *Aspergillus flavus* étaient résistant en même temps aux extraits aqueux et méthanoliques de la feuille, tandis que l'extrait éthanolique avait un effet inhibiteur appréciable sur *Trichophyton mentagrophyte*, *Pullarium sp*, *Aspergillus flavus* et *Penicillium sp*¹².

3.2. Activité antioxydante des feuilles MO

L'activité antioxydante du MO est particulièrement forte dans les extraits de feuilles, de gousses et de graines. Le taux de flavonoïdes et de polyphénols est élevé dans différentes parties de la plante, en particulier les feuilles¹³.

Les gousses du MO contiennent d'importants composés bioactifs, notamment des glucosinolates, des isothiocyanates, des thiocarbamates et des flavonoïdes¹³. L'extrait aqueux du MO a un puissant effet de piégeage sur le radical libre du 2, 2-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH), le superoxyde¹³.

4. Autres méthodes utilisations, conservation et toxicité de la MO :

¹²Oluduro, A., O.; Evaluation of Antimicrobial properties and nutritional potentials of Moringa oleifera leaf in south western Nigeria; *Malaysian Journal of Microbiology*, **2012**, 2, 59-67.

¹³Vergara, J.M.; Almatrafi, M.M. ; Fernandez ,M. L. ; Bioactive Components in Moringa Oleifera Leaves Protect against Chronic Disease, *Review antioxidants MDPI*, **2017**, 6, 1-13.

4.1. Activité purificatrice d'eau :

Selon une étude effectuée par l'OMS (Organisation mondiale de la santé) en 2016, 2,2 millions de décès sont liés aux maladies d'origine hydrique¹⁴.

Les graines du MO contiennent des protéines cationiques et antimicrobiennes dont 1,2 % de cette protéine est facilement soluble dans l'eau. Ces protéines peuvent être facilement dissoutes et adsorbées sur une surface de sable, inversant ainsi la charge des particules de sable. La capacité antimicrobienne et floculante n'est comparable à celle des graines. L'application du sable à la purification reste limitée à cause du manque d'optimisation, du dosage des graines et des procédures de préparation¹⁴.



Figure7 : Filtre à sable fonctionnalisé à l'extrait de graine de Moringa (sable f) pour amélioration de l'élimination des agents pathogènes¹⁴.

4.2. Méthodes de conservation :

Le MO peut être conservé longtemps sans perte de nutriments. Les feuilles peuvent être stockées sous forme sèches ou congelées. D'après Yang *et Col.*, les feuilles déshydratées dans un four à basse température retenant plus les éléments nutritifs que les feuilles congelées. 70g comme dose quotidienne du MO serait idéale. Erreur ! Signet non défini..

5. Etude comparative entre la composition chimique provenant de 3 zones climatiques différentes :

5.1. Teneur totale en composés phénoliques, flavonoïdes et acide ascorbique :

1. Echantillons de feuilles lyophilisées : Teneur totale en composés phénoliques, flavonoïdes et acide ascorbique d'échantillons de feuilles lyophilisées et de divers extraits issus de

¹⁴Xiong, B.; Piechowicz, B, B, B.; Wang, B; Marinaro, R. ; Clement, E. ; Carlin, T. ; Uliana, A ; Kumar, M. ; Butler Velegol B.S. ; Moringa oleifera f-sand Filters for Sustainable Water Purification ; *Review environmental science and technology letters* , 2017, 10 , 1021, 1-5.

solvants du M.Ode différentes zones agroclimatiques (1 grammes par 100 g, de matière sèche)¹⁵ regroupés dans le tableau suivant :

Parmi les échantillons prélevés dans les pays, ceux des feuilles prélevés au **Nicaragua** contient plus de composés phénoliques totaux (**4,25%**) que les échantillons provenant d'**Inde** (**2,94%**) et du **Niger**(**3,66%**)¹⁵.(voir annexe tableau 2)

6. Travaux sur la *Moringa Olifeira* Algérienne :

On ne peut travailler sur une plante aussi riche d'origine malienne, sans vérifier sa présence en Algérie. On a trouvé, un travail basé sur l'activité insecticide de l'extrait aqueux des feuilles du MO sur une sorte de chenille qui attaque la culture de tomate.L'étude a été réalisée sur leMO de Bainem(Alger).Elle avait pour but de vérifier l'efficacité de l'extrait aqueux sur les chenilles des feuilles de tomate.Ces chenilles dégradaient la culture de tomate de 80% à 100 %¹⁶.

Conclusion Chapitre 1 :

Le MO est une palnte qu'on trouve dans les pays tropicaux.Toutes les parties de cette plante en commençant ; par les feuilles passant les tiges, les gousses, les ecorces et les racines sont importantes car elles ont tous des grands potentiels nutritifs et surtout thérapeutiques.

Tous ces potentiels ont mis aux chercheurs de le nommer « arbre miracle ».

Les compositions chimiques de MO diffèrent selon les zones agroclimatiques , selon la partie concernée et selon la caractéristique de la feuille(une feuilles sèches a des composants différents de celles fraîches).

De plus, le choix du solvant d'extractions, est primordial car il gouverne la nature des composés bioactifs solubilisés ce qui implique l'activité thérapeutique par la suite.

¹⁵Siddhuraju, P.; Becker, K.; Antioxidant Properties of Various Solvent Extracts of Total Phenolics Constituents from Three Different Agroclimatic Origins of Drumstick Tree (*Moringa oleifera* Lam.) Leaves; *Journal Agriculture. Food Chemistry*, **2003**, *51*, 2144-2155.

¹⁶3ieme exposition d'ethnobotanique et 4ieme atelier d'initiation à la phytothérapie, Recueils des résumés et expositions «Ethnobota 2016 », Ed .L.N.Madani, M.Toumi, A.Benkhalifa.

Chapitre 2 : Etude de la composition chimique de la plante *Moringa Oleifera*

1.Introduction :

Dans ce chapitre, nous focalisons nos recherches sur l'étude de la composition chimique de la plante MO, de plusieurs régions du monde. Ce qui nous servira de référence pour comparer nos résultats par la suite.

2. les composés bioactifs présents dans le MO sont :

2.1. Les sucres :

Les glucosinolates, sont des métabolites secondaires. Les isomères du 4-monoacetyl-4-(alpha-L-rhamnopyranosyloxy)-benzylglucosinolates **5** sont localisés dans les feuilles¹⁷. Le 4-(alpha-L-rhamnosyloxy) benzyl) carbamate **10** est présents dans les feuilles et le 4-(a-L-rhamnosyloxy-benzyl) isothiocyanate **6** sont dans les racines, feuilles et graines. Le 4-alpha-L-rhamnopyranosyloxybenzylglucosinolate **5** se trouvent dans les feuilles, les écorces et racines. Les isothiocyanates et glucosinolates ont d'important potentiel médicinal¹³.

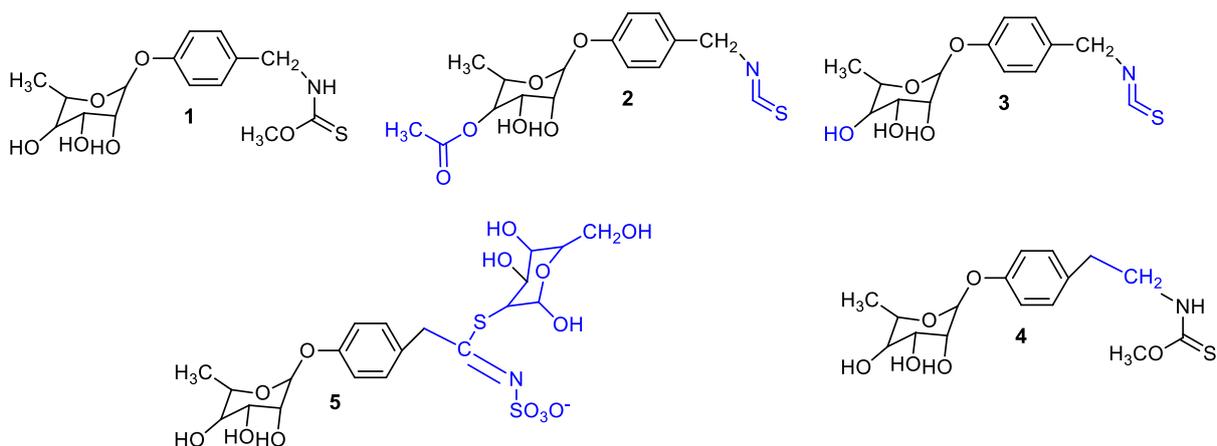


Figure 8: Structure des sucres présents dans la MO.

Les glycosides en font parties aussi ; elles sont les niazirines(**11**), niazimicines(**4**) et niazicines(**8**) qui sont dotées des propriétés anti-tumorales ou anti-inflammatoires¹⁸.

¹⁷Bennett ,R.,N.;Mellon, A.; Foidl, N.;Pratt., H.; Dupont , M.,S.;Perkins, L.;Kroon,P.,A.; Profiling Glucosinolates and Phenolics in Vegetative and Reproductive Tissues of the Multi-Purpose Trees *Moringa oleifera* L. (Horseradish Tree) and *Moringa stenopetala* L. ; *Review Journal of Agricultural . Food and Chemistry* ; **2003**, *51*, 3546-3553.

¹⁸Bishambar D., Vineela R. Y., Ritesh A., Michael A. L.,2 and Athula B. A; Bioactive Compounds in *Moringa oleifera* Isolation, Structure Elucidation, and Their Antiproliferative Properties; **2013**, *1129*, 203–219.

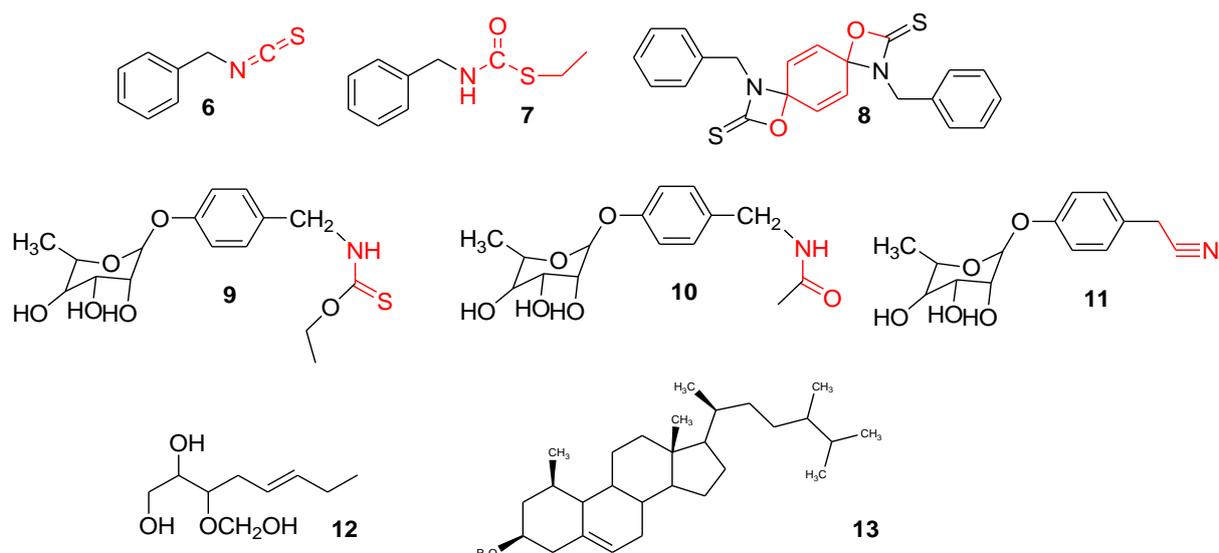


Figure9: Structure de: Niazimin A (**1**) ; 4-(4'-O-acetyl- α -L-rhamnopyranosyloxy) benzyl isothiocyanate (**2**), 4-(α -L-rhamnopyranosyloxy) benzylisothiocyanate (**3**), niazimicine (**4**), 4-(α -L-rhamnopyranosyloxy) benzyl glucosinolate(**5**), benzyl isothiocyanate (**6**), aglycone of deoxy-niazimicine (N-benzyl, S-ethylthioformate) (**7**), pterygospermin (**8**), niaziminin (**9**), O-ethyl-4-(α -L-rhamnosyloxy)benzyl carbamate (**10**), niazirin (**11**), glycerol-1-(9-octadecanoate) (**12**), β -sitosterol (**13**).

L'exsudat de gomme entière purifié du MO contient de l'arabinose, du D-galactose, et le L-rhamnose, le -mannose et le -xylose, tandis qu'un polysaccharide homogène de gomme dégradée constitué du L-galactose, de l'acide glucuronique et du L-mannose a été obtenu par hydrolyse douce de la gomme entière à l'acide. Les fleurs contiennent comme sucres, saccharose, D-glucose¹⁸.

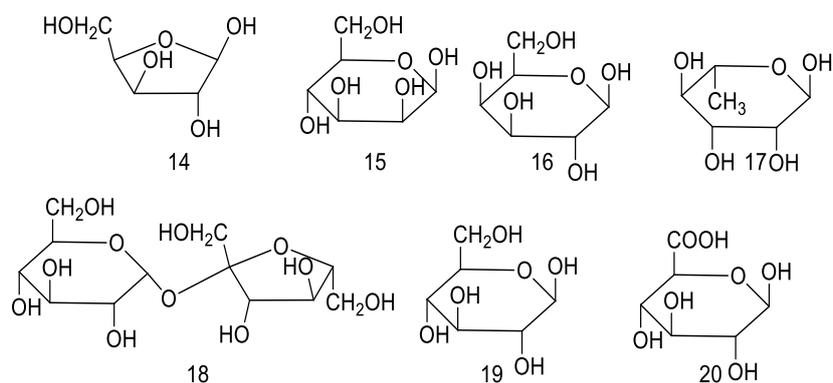


Figure 10 : Structure de : (**14**) Le xylose, (**15**) Le mannose ; (**16**) Le galactose, (**17**) Le rhamnose, (**18**) Le saccharose, (**19**) Le glucose, (**20**) L'acide glucuronique.

2.2. Les polyphénols :

Les Feuilles sèches du MO sont des grandes sources de composés polyphénoliques tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes.

2.2.1. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes, sont synthétisés par la plante en réponse aux infections microbienne. Les feuilles du MO sont une bonne source de flavonoïdes. Ils ont un benzo-pyrone en tant que structure commune .Les principaux flavonoïdes présents dans les feuilles de MO sont **la myrecytine, la quercétine et le kaempferol** à des concentrations de 5,8, 0,207 et 7,57 mg / g, respectivement. La quercétine est présente dans les feuilles séchées de MO, à des concentrations de 100 mg / 100 g, sous forme de **quercétine-3-O-alpha glucoside (iso-quercétine ou isotrifoline)**¹⁷.

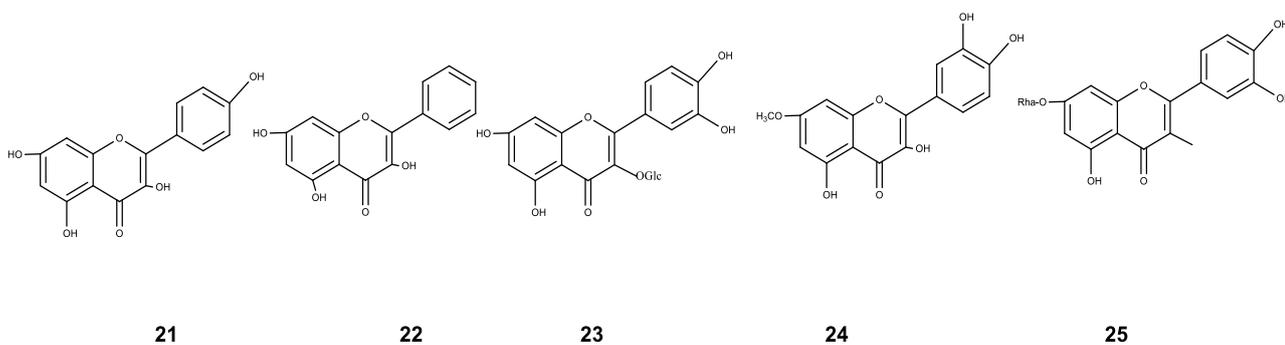


Figure 11 : (21) kaempferol, (22) quercétine, (23) isoquercitrine, (24) rhamnetine, (25) kaempféritrine.

2.2.2. Les acides phénoliques :

Ce sont des dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et l'acide hydroxycinnamique, naturellement présent dans les plantes, ces composés possèdent beaucoup de propriétés telles qu'antioxydants, anti-inflammatoires, antimutagènes et anticancéreuses. Dans les feuilles séchées, l'acide gallique est le plus abondant, avec une concentration de 1,034 mg/g de feuilles sèches et les acides caféiques avec 0.409 mg/g comme concentration. L'acide chlorogénique (CGA) est un ester de l'acide dihydrocinnamique¹⁹.

¹⁹ Cho, A.S.; Jeon, S.M.; Kim, M.J.; Yeo, J.; Seo, K.I.; Choi, M.S.; Lee, M.K. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. ; *Food and Chemical Toxicology*. ; 2010; 48; 937–943.

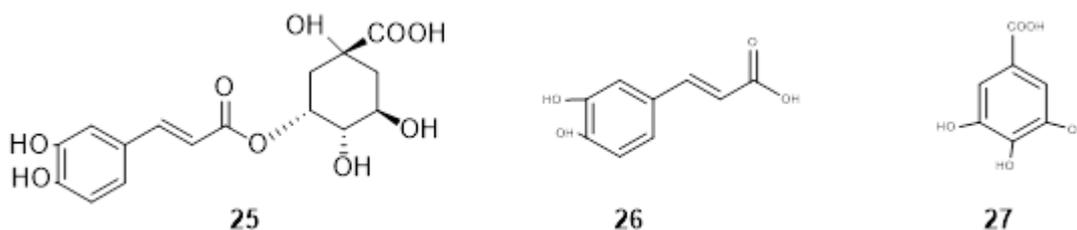


Figure 12 : Structure de (25) L'acide chlorogénique, (26) l'acide caféique, (27) l'acide gallique

2.2.3. Tannins :

On en trouve dans la poudre, les fleurs, les écorces du tronc²¹.

Les tanins sont des polyphénols végétaux capables de former des complexes avec des ions métalliques²⁰.

2.3. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont présents dans la poudre de feuilles et l'écorce du tronc. Ceux dans l'écorce du tronc sont appelés moringine et moringinine^{21,22}.

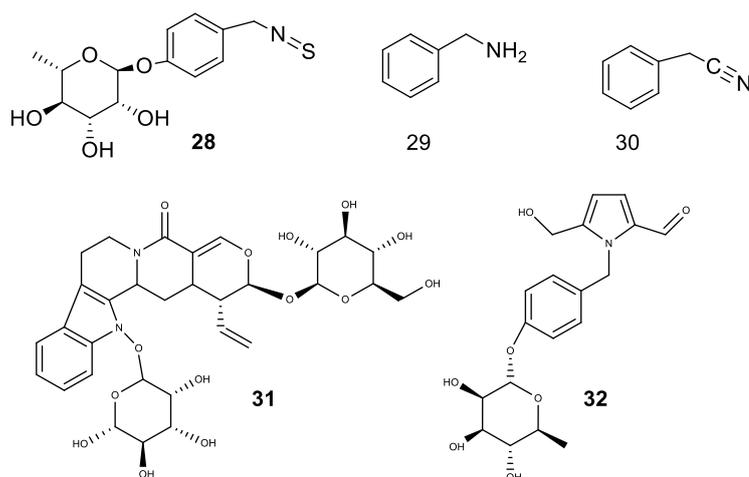


Figure 13: Structure de : La moringine(28), la moringinine, (29), Le Phenylacétonitrile (30), Le N, α -L-rhamnopyranosyl vincosamide(31), La pyrrolemarumine(32).

2.4. Saponines : Elles sont des composés naturels fabriqués à partir d'aglycone dérivé des isoprénoidiens liés de manière covalente à un ou plusieurs fragments sucres. On les trouve au

²⁰De-Bruyne, T. ; Pieters, L. ; Deelstra, H. ; Ulietinck, A. . Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities; *Biochemical Systematics and Ecology*; **1999**; 27; 445-459.

²¹Godinez-Oviedo, A.; Guemes-Vera, N.; Acevedo-Sandoval, O.,A. ; Nutritional and Phytochemical Composition of *Moringa oleifera* Lam and its Potential Use as Nutraceutical Plant ; *Review Pakistan Journal of Nutrition* ; **2016**,15,397-405.

²²Ojjako, E.N.; Phytochemical Analysis and Antimicrobial Screening of *Moringa Oleifera* Leaves Extract ; *the International Journal of Engineering and Science (IJES)*; **2014**, 3, 32-35.

niveau des feuilles. Les saponines sont des glycosides, qui comprennent les saponines stéroïdiennes et les saponines triterpénoïdes²³.

3. les méthodes d'analyses :

Cette partie est basée sur les analyses physico-chimiques (LC- MS et RMN) effectuées antérieurement sur des composants des feuilles du MO d'origine nigériane et indienne.

3.1. Spectrométrie de masse (LC-MS) :

L'identification des glucosinolates et de leurs produits d'hydrolyse a été effectuée ci-dessous par spectrométrie de masse par électro spray-ionisation induite par collision. Les composés individuels ont été caractérisés structurellement. Les valeurs m/z et les ions fragments suivants ont été obtenus¹⁸(voir spectre en Annexe figure 01). Le (α -L-Rhamnopyranosyloxy) benzylglucosinolate, est présenté par des pics d'ion moléculaire à $m/z = 570$ (100%), $m/z = 97$ (90%, HSO_4^-), $m/z = 96$ (83%, $[SO_4]^-$) (figure 10). L'autre fragment caractéristique, $m/z = 195$ a été attribué à l'anion 1-thiohexose. Deux pics mineurs à $m/z = 259, 275$ représentent le glucose 1-sulfate anion formé par la perte de phénylthiocyanates et de glucose l'anion 1-thiosulfate respectivement. Par conséquent, l'ion à $m/z = 570$ (intensité de 100% pic de base) a été attribué au glucosinolate de 4- (\pm -L-rhamnopyranosyloxy) benzyle¹⁸(voir spectre en Annexe figure 02).

3.3. Caractérisation des composés du MO par RMN :

La RMN est une méthode d'analyse spectroscopique, très puissante pour l'élucidation des structures organique.

Après analyse par RMN, les positions du groupe méthoxy ainsi que le glucose sur l'aglycone ont été établie à partir d'expériences HMBC qui a indiqué deux ou trois liaisons H, C-corrélations et de cette manière, il a été prouvé que l'unité de glucose était attachée glycosidiquement en C-3 et le groupe méthoxy en C-4. De même, les positions del'attachement des groupes acétyle ont été confirmés par les corrélations HMBC et par le couplage H2'' avec H3 ''²⁴.

²³ Ogbe, A.O. ; John P. A. ; Proximate study mineral and antinutrient composition of Moringa Oleifera leaves harvested from Lafia, Nigeria : Potential benefits in poultry nutrition and health ; *Journal of Microbiology ,Biotechnology and Food Sciences* ;**2012**, 3, 296-308.

²⁴Manguro, L., O., A. ; Lemmen, P. ; Phenolics of Moringa oleifera leaves ;*Natural Product Research* ; **2007** ; 21 ; 56–68.

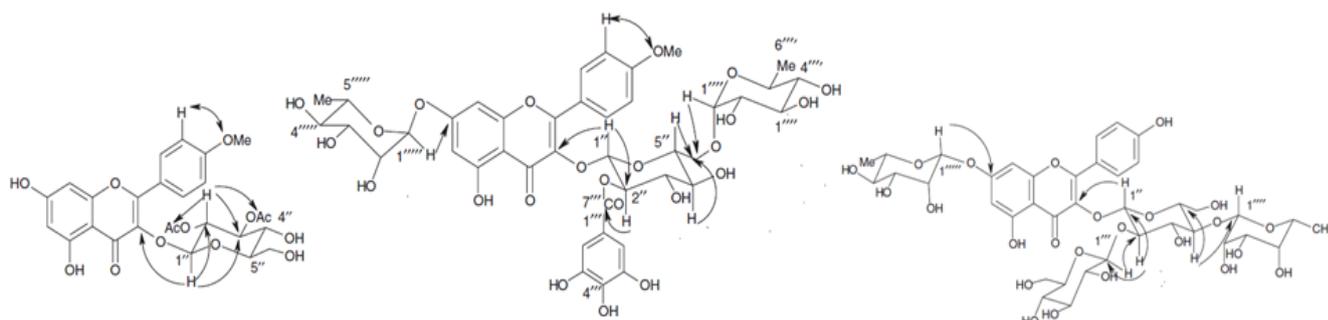


Figure 14 : Kaempféride 3-O-2'', 3''-diacetylglucoside; Kaempferol-3-O-[beta -glucosyl-(1!2)]-[alpha -rhamnosyloxy-(16) -O-beta -glucoside-7-O-alpha rhamnoside; Kaempféride 3-O-(2''-O-galloylrutinoside)-7-O-alpha-rhamnoside.

—————> HMBC correlations
 - - - - -> NOESY correlations

4. Méthodes d'extractions :

4.1. Extraction assistée par micro-onde : Les différents morceaux (gousses) traités au méthanol et passés au micro-onde pour une extraction efficace des composés biologiquement actifs décrits précédemment (Figure 15). Cette procédure aboutit toujours à une récupération de 90% des composés bioactifs¹⁸.

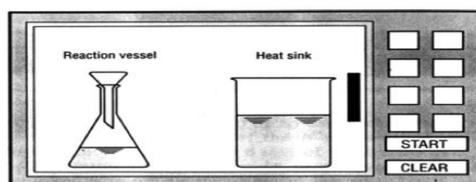


Figure 15: Four à micro-ondes utilisé pour l'extraction de composés bioactifs des gousses à l'aide de méthanol¹⁸.

4.2. Extraction par soxhlet : Le processus dure entre 8 et 9 heures jusqu'à ce que le solvant reflux soit clair. L'extrait est recueilli par évaporation du solvant en utilisant des évaporateurs rotatifs²².

Conclusion Chapitre 2:

Les composés bioactifs présents tels que les polyphénols, les sucres confèrent au MO de nombreuses activités telle antioxydante, anticancéreuse. Les structures de ses différents composés ont été élucidées par les méthodes spectroscopiques (RMN, LC-MS). A cause de sa teneur élevée en acides aminés et autres nutriments, cette plante est consommée comme nourriture et aussi utilisée contre les maladies.

Partie expérimentale :

I. Travail effectué :

Introduction :

Notre partie expérimentale comporte un chapitre nommé Travail effectué est divisé en deux parties **Matériels et méthodes** pour expliquer les protocoles puis **Résultats et discussion** pour les graphes, résultats, courbe d'étalonnage et explications de nos résultats.

I. Indications générales :

1. UV-Visible : Les analyses UV, réalisées lors de cette étude ont été effectuées au laboratoire (COSNA) sur un spectrophotomètre Thermo-Scientific Hélios γ .

2. Les CCM : Chromatographie sur Couche Mince (CCM), réalisée sur des plaques d'Aluminium recouvertes de gel de silice 60 F₂₅₄.

3. Protocoles des expériences :

Notre étude expérimentale tourne autour de quatre matières végétales de la plante *Moringa Oleifera* (MO) à savoir : a.) Graines ; b.) la poudre des feuilles et c) les feuilles sèches. Les feuilles séchées originaire du Mali et un échantillon des feuilles du MO algérien, qui va nous servir comme référence de comparaison.



Figure 16: Matières végétales utilisées : les feuilles, graines et la poudre feuille.

Notre travail va se focaliser sur des étapes suivantes :

- ✓ Macération, et extraction des matières végétales par différentes méthodes (Soxhlet, macération à froid et sous ultrasons Hydrodistillation des huiles essentielles et hydrolat des feuilles MO.

- ✓ Déterminer le λ_{\max} de chaque extrait. La longueur d'onde maximale n'a pas de signification sur le plan caractérisation des différents échantillons du MO mais en mesurant l'absorbance spécifique des EE-MO à cette longueur d'onde on obtient un paramètre physicochimique qui caractérise chaque échantillon du MO et peut nous renseigner sur sa composition chimique.
- ✓ Détermination de la quantité totale en polyphénols et flavonoïdes dans chaque extrait éthanoïque du MO (EE-MO).
- ✓ Extraction et estérification des acides gras des graines du MO (AG-MO).
- ✓ Evaluation de l'activité antioxydante des EE-MO et AG-MO par deux méthodes différentes.
- ✓ Evaluation de l'activité antimicrobienne de chaque EE-MO et AG-MO.
- ✓ Purification et isolations par colonne chromatographique quelques produits.

✓ **Matériels et méthodes :**

III-1- Récolte et origine :

Les graines, les feuilles sèches, la poudre des feuilles du MO utilisées proviennent de Bamako(Mali). Les feuilles du MO ont été récoltées en Octobre au Mali et séchées à température ambiante (à l'ombre) pendant 3jours. Tandis que celle de la wilaya de Béchar, (Sud d'Algérie) été récoltées en Février 2019.

○ **L'hydrodistillation des feuilles du MO :**

63.43g des feuilles du MO sont mises un ballon à laquelle l'eau de robinet est ajoutée jusqu'au milieu du ballon, le tout surmonté du dispositif de Clevenger (**Voir figure 16**). L'hydrodistillation a duré 4jours.



Figure 17:L'hydrodistillation des feuilles du MO et phase organique avec l'éther diéthylique dans une ampoule à décanter.

Le premier jour, l'hydrolat a été recueilli et mis au frigo. Ce même processus a été répété au deuxième, troisième, quatrième jour. Puis une décantation (**figure 16**) de l'hydrolat obtenu a été effectuée avec l'éther diéthylique afin de séparer la phase organique et aqueuse. La phase organique issue de la décantation a été évaporée sous vide.

A. **Extraction et estérification des acides gras des graines du MO :**

1.Extraction des acides gras AG-MO :

.Extraction AG-MO par Soxhlet des graines de la MO :

L'appareillage d'extraction utilisé est le soxhlet (figure 18) dans lequel se trouve 11.13g des graines en poudre mises dans une cartouche avec 210 ml de l'hexane. Le mélange est traité pendant 6 heures. Puis le solvant est évaporé sous vide²⁵.

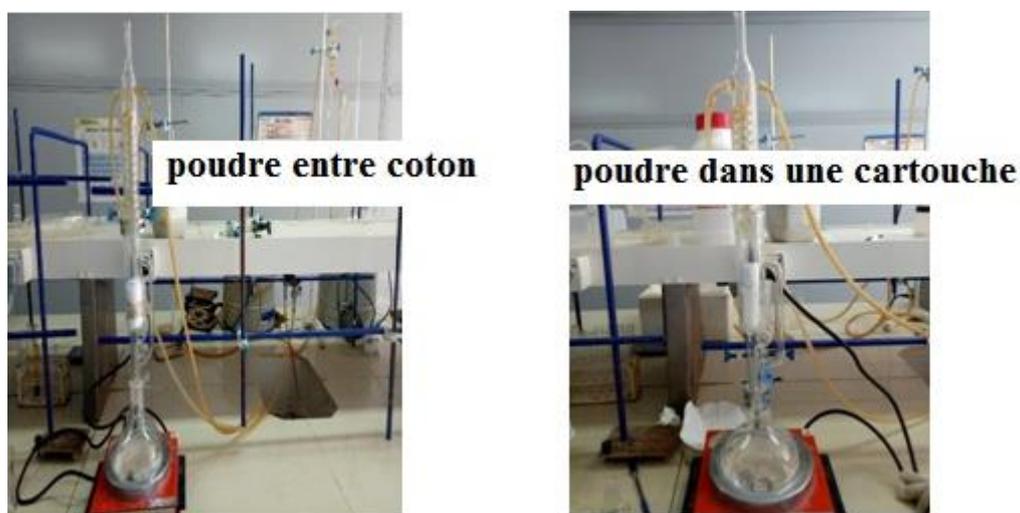


Figure 18 : Montage Soxhlet utilisé par deux méthodes d'introduction de la poudre.

On procède à la séparation des acides gras de l'extrait. Ceci est réalisé par le traitement en premier lieu avec une solution alcoolique basique KOH 2.25% dans l'éthanol. Le mélange est extrait avec de l'eau distillée, et on récupère la phase aqueuse qui est ensuite acidifiée et extraite avec de l'hexane. Ce traitement nous permet d'éliminer les substances non acides qui sont insolubles dans l'eau mais peut entraîner des molécules indésirables comme les polyphénols.

²⁵J., O., Palafox ; A., Navarrete ; J., C., Sacramento-Rivero ; C., Rubio-Atoche ; P., A., Escoffie ; J., A. Rocha-Urbe ; Extraction and Characterization of Oil from Moringa oleifera Using Supercritical CO₂ and Traditional Solvents, *American Journal of Analytical Chemistry*, **2012**, 3, 946-949.

2. Estérification des acides gras en présence de BF_3 :

Dans un ballon de 250ml muni d'un réfrigérant et une garde à CaCl_2 , 0.67g d'acide gras a été ajouté dans un volume de 42ml d'une solution méthanolique à 10% de BF_3 . Après 1h de reflux, le mélange a été refroidi puis un volume égal d'eau au volume de la solution méthanolique de BF_3 a été ajouté. Ensuite, la phase organique obtenue après extraction à l'hexane, est lavée plusieurs fois avec de l'eau distillée, séchée en utilisant du MgSO_4 et évaporé pour récupérer les EMAG. Ce protocole donne des esters méthyliques qui sont analysés par IR.



Figure 19: Montage d'estérification.

B. Méthodes d'extractions :

1. Macération à froid des feuilles sèches (Mali) :

Pour la macération à froid, la masse de 20g de feuilles séchées dans un erlenmeyer 500ml emballé avec du papier aluminium, auxquelles on a ajouté 270ml d'éthanol 96°. Au bout de 3 jours, ce macérât est filtré puis évaporé, et on obtient un liquide d'apparence visqueuse.

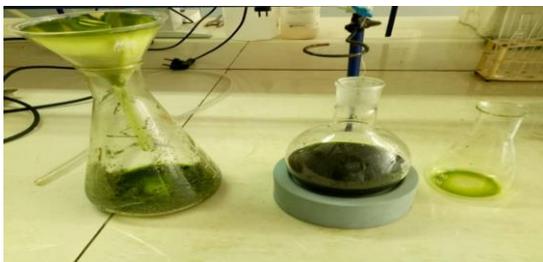


Figure 20: Extrait éthanolique des feuilles sèches du Mali.

1. Macération à froid de la poudre du MO :

Selon le même protocole ; 20g de la poudre des feuilles, sont extraites par l'éthanol.

2. Extraction sous ultrasons :

Selon la méthode de Perumal et Col²⁶, 0.5g des feuilles sèches sont extraites avec un mélange Acétone :eau (80 :20 ml) dans un bain d'ultrason durant 25min .Ensuite la solution est centrifugée à 3800tours durant 10min .



Figure 21 : Processus de sonication des différents échantillons.

Le rendement d'extraction est calculé comme suit :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = \left[\frac{\text{Pf}}{\text{Pi}} \right] * 100$$

Pf : Poids de l'extrait sec (g).

Pi: Poids de l'échantillon initial(g).

C.Détermination de la quantité totale en polyphénols et flavonoïdes des EE-MO :

1.Quantité totale en polyphénols :

La quantité totale en polyphénols est déterminée par la méthode de **Skarset** et *col.* 200 µl d'extrait sont mélangés avec 1 ml du réactif Folin-ciocalteu. Après 5 à 8 minutes, 0.8 ml de carbonate de sodium (75g/l) sont ajoutés. Le mélange est incubé à 50°C pendant 5 minutes ; après refroidissement l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 760 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions.

L'échantillon des extraits MO est évalué à une concentration finale de 0.1µg/ml et la quantité en polyphénols est déterminée en mg/g (équivalent d'acide gallique (voir Annexe figure 16).

²⁶ Siddhuraju, P ; Becker, K. ; Antioxidants Properties of Various Solvent Extracts of total Phenolic Constituents from three different agroclimatic Origins of Drumstick Trees (*Moringa oleifera*) ,*Journal .Agricultural .Food Chemistry* ,**2003**,51,2144-2155

2. Quantité totale en flavonoïdes :

Le dosage des flavonoïdes repose sur des réactions colorées parmi lesquelles la réaction au chlorure d'Aluminium (AlCl_3). Les flavonoïdes peuvent former des chélates colorés avec de métaux lourds. Dans ce complexe, les ions Al^{3+} vont réagir avec les fonctions. Cette réaction conduit à un changement de la charge et de la couleur du milieu réactionnel (couleur jaune).

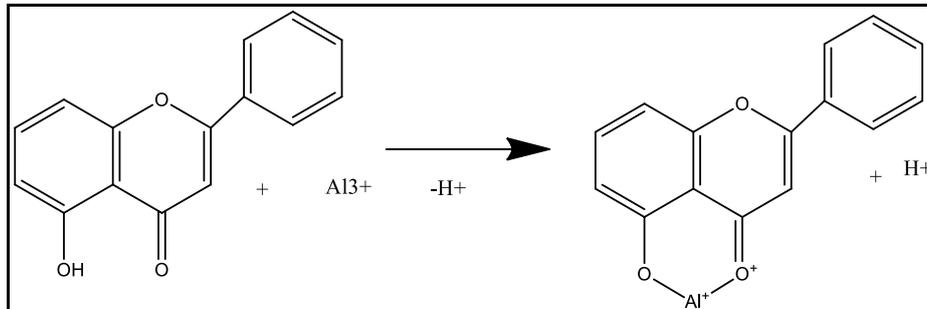


Figure 22 : La réaction des flavonoïdes avec AlCl_3 .

Il est décrit par Lamaison et Carnet²⁷ citée par Bahri-Sahloul (2009)²⁸. 1ml de AlCl_3 à 2% est ajouté à 1mL de l'extrait puis le mélange est bien homogénéisé suivi d'une incubation à température ambiante à l'abri de la lumière durant 10min. L'absorbance de ce mélange est mesurée à 450nm. Les concentrations en flavonoïdes ont été estimées en référant à une courbe d'étalonnage préparée avec la Rutine (voir Annexe figure 02). Les résultats ont été exprimés en mg équivalent de Rutine (mg Eq Q/g ES).

D. Evaluation de l'activité antioxydante de chaque EE-MO :

L'activité antioxydante des **EE-MO** exprimée par deux méthodes différentes : la neutralisation des radicaux libres par la méthode DPPH, la puissance réductrice des ions Fe^{3+} par la méthode FRAP.

1. Activité antioxydante DPPH :

a) Principe de la méthode :

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α, α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques.

²⁷Lamaison J.L.C. ; Carnet A ; Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus lavigata* (Poiret D. C) en fonction de la végétation ; 1990 ; *Pharm Acta Helv*, 65, 315-320

²⁸Bahri-Sahloul ; Ammar S; Fredj RB; Saguem S; Grec S; Trotin Skhiri FH; Polyphenol contents and antioxidant activities of extracts from flowers of two *Crataegus azarolus* L. varieties; 2009 ; *Pak J Biol Sci* 12(9):660-8.

Dans le cas des composés phénoliques (Ar-OH), le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH• alors il se transforme en une molécule stable DPPH.

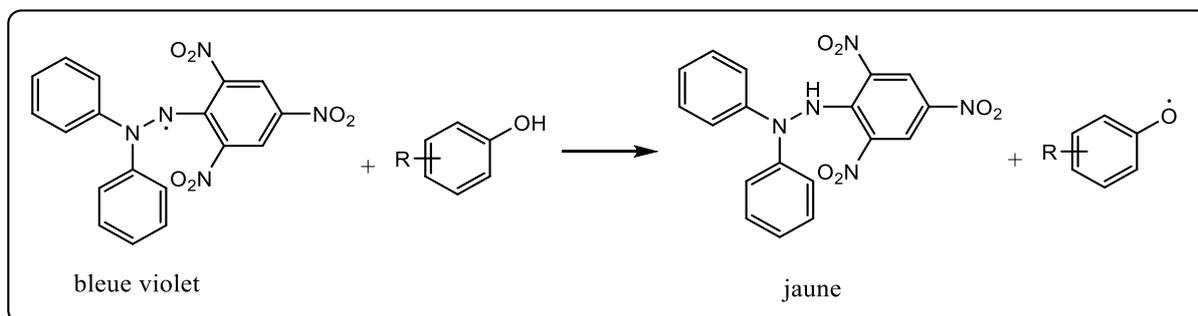


Figure 23: Réaction du DPPH avec les polyphénols.

b)Expérience : Le mélange de réaction contient 2,5 ml de éthanol, 125 μ M DPPH, et les échantillons à tester. Après 45 min d'incubation à l'abri de la lumière, l'absorbance a été enregistré à 517 nm. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de diminution par rapport aux valeurs témoins²⁹.

2. Méthode FRAP (Ferric reducing-antioxidant power) :

La puissance de réduction de la solution éthanolique des extraits de MO a été réalisée selon la méthode de Lugasi³⁰. L'échantillon dilué 1mg/ml (1 ml) a été mélangé avec du tampon phosphate (2,5 ml, 0,2 M, pH=7et 2,5 ml ferricyanure de potassium 1% ; le mélange est incubé à 35°C pendant 20 min. L'acide trichloracétique (2,5 ml, 10 %) a été ajouté au mélange puis centrifugé à 1500 t/min. Après, (2.5 ml) de la solution a été mélangée avec de l'eau distillée (2,5 ml) et une solution fraîchement préparée de FeCl₃ (0,5 ml, 0,1 %). L'absorbance a été lue à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance du mélange réactionnel indique que la puissance de réduction est élevée. La puissance de réduction est donnée en équivalent de Trolox (TEAC. g⁻¹) qui indique la quantité de Trolox exprimé en mg qui a le même pouvoir réducteur que celle de 1 g d'échantillon³¹. (Voir annexe figure 03)

²⁹H. Kikuzaki, M. Hisamoto, K. Hirose, K. Akiyama & H. Taniguchi; "Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2002**; 50; 2161– 2168.

³⁰A. Lugasi "the role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases", *ActaBiologic szegediensis*, **2003**, 47, 119-125.

³¹K. I. Berker and al; "Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents", *Talanta*; **2007**; 72; 1157–1165.

E. Evaluation de l'activité antimicrobienne des EE-MO :

L'activité antimicrobienne de chaque extrait a été évaluée par la technique des disques en papier (Khanna et al. 2011) vis-à-vis 8 germes de références (2 bactéries à Gram positif, 3 bactéries à Gram négatif et 3 levures)³².

1. Préparation des suspensions des germes test :

A partir des cultures de 18 à 24 heures de microorganismes test sur leurs milieux appropriés, des suspensions en eau physiologique stérile sont préparées. La densité optique de chaque suspension est ajustée entre 0,08 et 0,1 à la longueur d'onde $\lambda = 600$ nm pour les bactéries et entre 0,12 et 0,15 à la longueur d'onde $\lambda = 530$ nm pour les levures (turbidité équivalente à 0,5 McFarland³²).

2. Protocole de l'activité antimicrobienne par la technique des disques en papier :

Des disques stériles de papier Wattman N° 3 (6 mm de diamètre) reçoivent 30 μ L de chaque extrait et des disques témoins reçoivent 30 μ L du solvant pure (DMSO) (par des dépôts successifs de 10 μ L tout en évitant les débordements). Après leur séchage, les disques en papier sont déposés sur des boîtes de pétri contenant des milieux gélosés, Muller-Hinton (pour les bactéries) et PDA (pour les levures), préalablement ensemencés par écouvillonnage, selon la technique CLSI (2010), avec les suspensions des micro-organismes test. Les boîtes de pétri sont laissées pendant 2 heures à 4°C (pour une bonne diffusion de l'extrait), puis incubées à 37°C pour les bactéries et à 25°C pour les levures³².

✓ Résultats et discussions :

A. Discussion des rendements selon les différentes méthodes d'extraction :

Le tableau récapitulatif a été fait afin de mieux comparer les différentes méthodes et solvant d'extraction utilisé lors de la manipulation (voir annexe tableau 3)

L'extraction des graines avec cartouche a donné un meilleur rendement par rapport à celle avec du coton ceci peut être expliqué par la perte du produit avec du coton donc la meilleure méthode d'extraction est Soxhlet avec cartouche. L'hexane est le meilleur solvant d'extraction car il a donné un meilleur rendement (24.50%). La poudre du MO entre plus en contact avec l'éthanol raison pour laquelle sa macération à froid a un rendement plus élevé que la macération à froid des feuilles sèches.

³²M .Khanna and al; 'Selective isolation of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compounds'' *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*; **2011**; 2(3); 357-375.

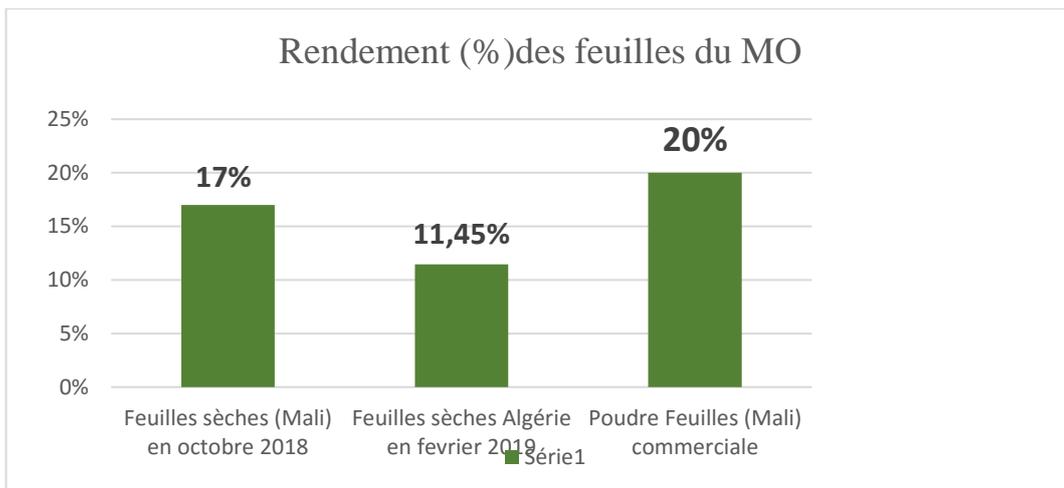


Figure24 : Histogramme des rendements des extraits éthanoliques des feuilles du MO

B.Détermination de la longueur d'onde d'absorption maximale des EE-MO :

On a mesuré l'absorbance des différents échantillons du MO dans le domaine de l'ultraviolet et les résultats sont représentés sous forme des graphes (voir figure25).

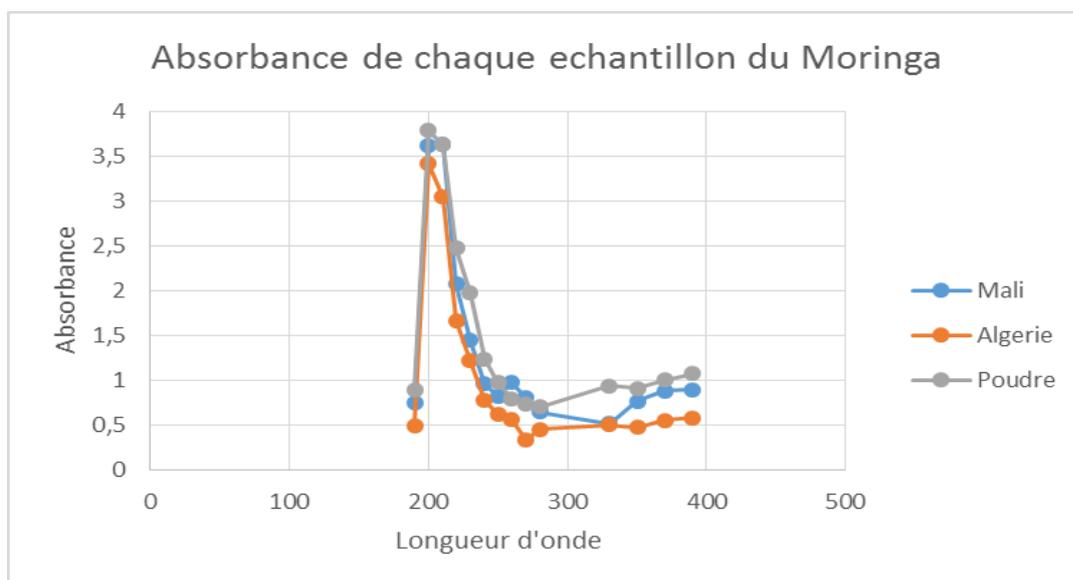


Figure 25 : spectre d'absorption UV des EE MO.

Les longueurs d'ondes de l'absorption maximale pour ces échantillons se trouvent dans le tableau ci-dessous (voir annexe tableau 4)

C. Quantité totale en polyphénols et flavonoïdes

1. Quantité totale en polyphénols :

Les absorbances des EE-MO issus de la macération et l'ultrason obtenues sont regroupées dans un tableau. (Voir annexe tableau 7). Nous avons préparé une série de solution d'acide gallique de différentes concentrations dont les absorbances sont regroupées dans le tableau (voir annexe tableau 4) A partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, on déduit la quantité en polyphénols (Voir annexe figure 03).

Dans la littérature, il y a plusieurs méthodes pour calculer la quantité des polyphénols. Et il est primordiale, pour faire des comparaisons des quantités avec la littérature, il faut utiliser la même méthode.

Dans la première, la quantité par rapport à l'extrait sec est déterminée selon la formule suivante ³³:

$$C = (c \times V) / m.$$

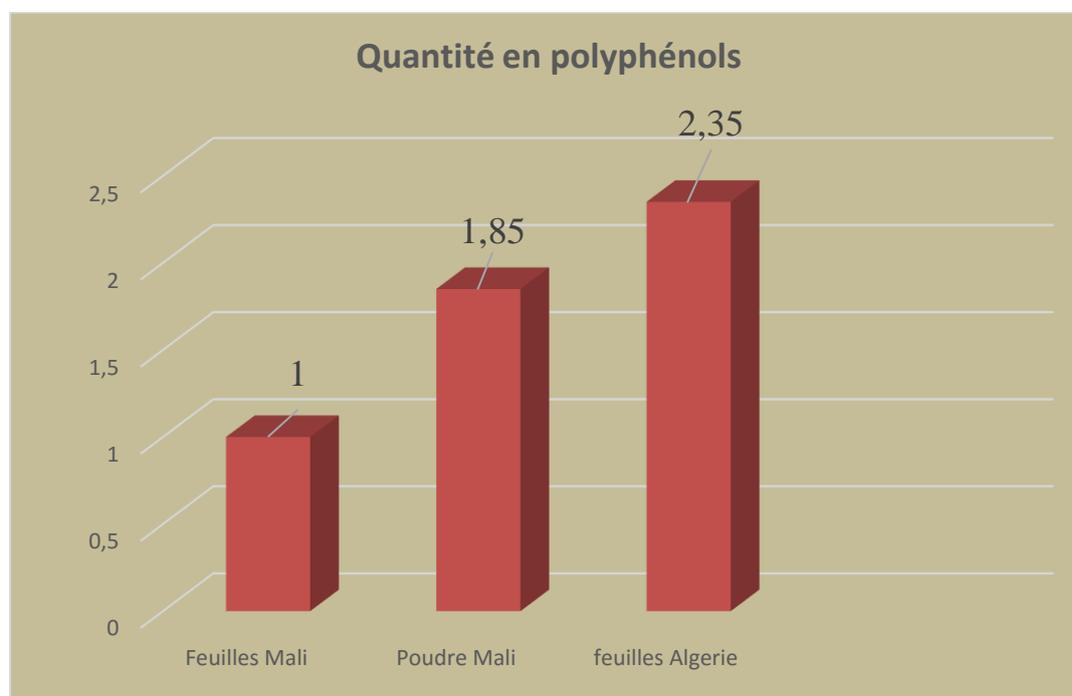
C : La teneur en phénols totaux (mg d'ac. gallique / g de matière sèche).

c : La concentration de l'acide gallique établie à partir de la courbe d'étalonnage (mg/mL).

V : Volume de l'extrait éthanolique ou aqueux.

m : Le poids de l'extrait sec à doser (g).

Les résultats se trouvent dans le tableau (Voir annexe tableau 6).



³³Bendiabdellah, A. ; « Etudes chimique et biologique des extraits de trois Daucus (D. crinitus, D. muricatus et D. carota ssp hispanicus) de la région de Tlemcen »; Université de Tlemcen ; 2014 ; page 71 et 72.

Figure 26 : Histogramme comparatif de la quantité des polyphénols des 3 échantillons de MO (première méthode)

La deuxième méthode est celle utilisée dans l'article de Perumal et col¹⁵. (Voir annexe tableau 7)

$Y=ax+b$ avec Y est l'absorbance, x est la quantité des polyphénols enmg/g.

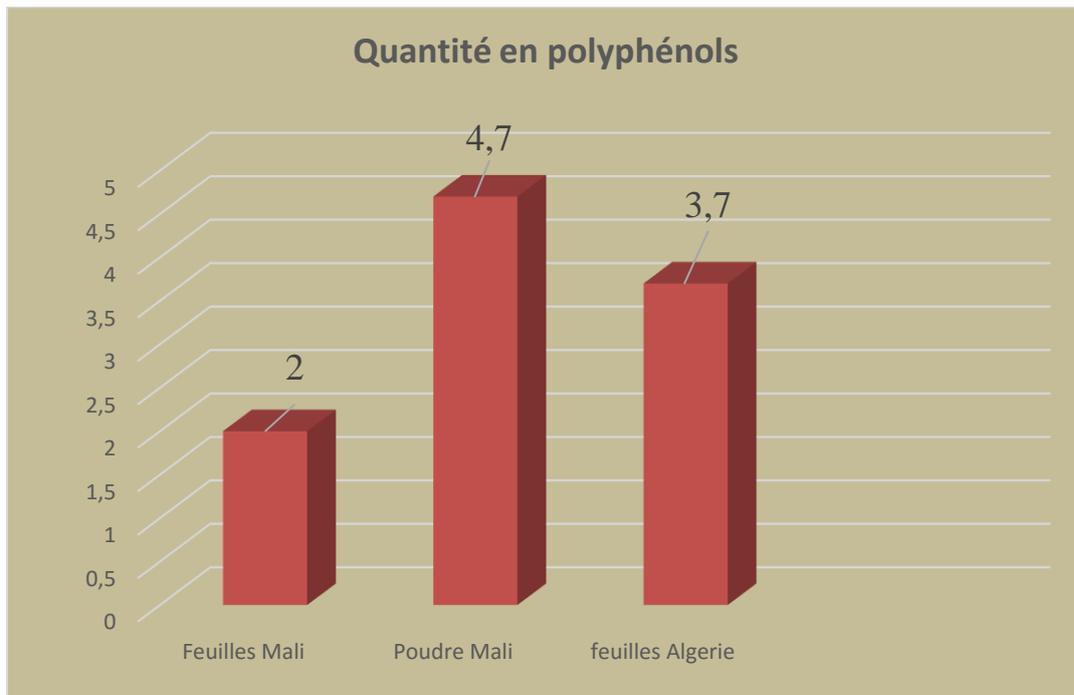


Figure 27 : Histogramme comparatif de la quantité des polyphénols des 3 échantillons du MO(deuxième méthode).

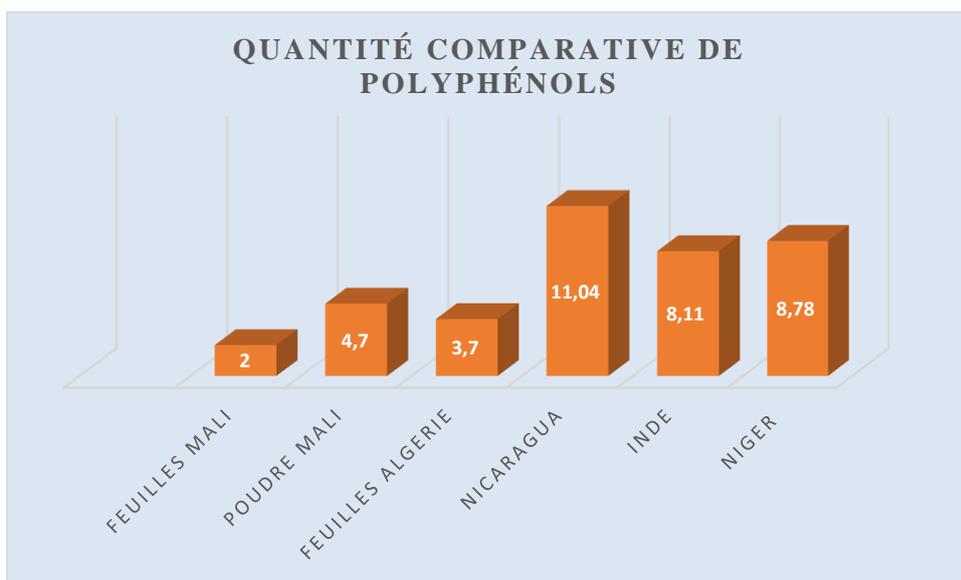


Figure 28 : Histogramme de la quantité comparative des polyphénols¹⁵.

2. Quantité totale en flavonoïdes

Après la mesure de l'absorbance de chaque échantillon, les valeurs suivantes ont été obtenues (voir annexe tableau 9). La solution de rutine à différentes concentrations a été mesurée. Ses absorbances se trouvent (voir annexe tableau 10) La quantité des flavonoïdes dans chaque échantillon du Moringa en équivalent de Rutine a été déduite de la courbe d'étalonnage (voir annexe figure 04). Selon les méthodes de calcul suivantes.

La première méthode est celle de l'article de Becker et col.

$$Y = ax + b$$

Y est l'absorbance, x est la quantité de flavonoïdes en mg/g

La quantité de flavonoïdes et polyphénols obtenue d'après la littérature Beker et col¹⁵ est très élevée par rapport aux quantités trouvées dans mes manipulations, ceci peut s'expliquer par les conditions opératoires, la méthode de séchage et la période de récolte des feuilles.

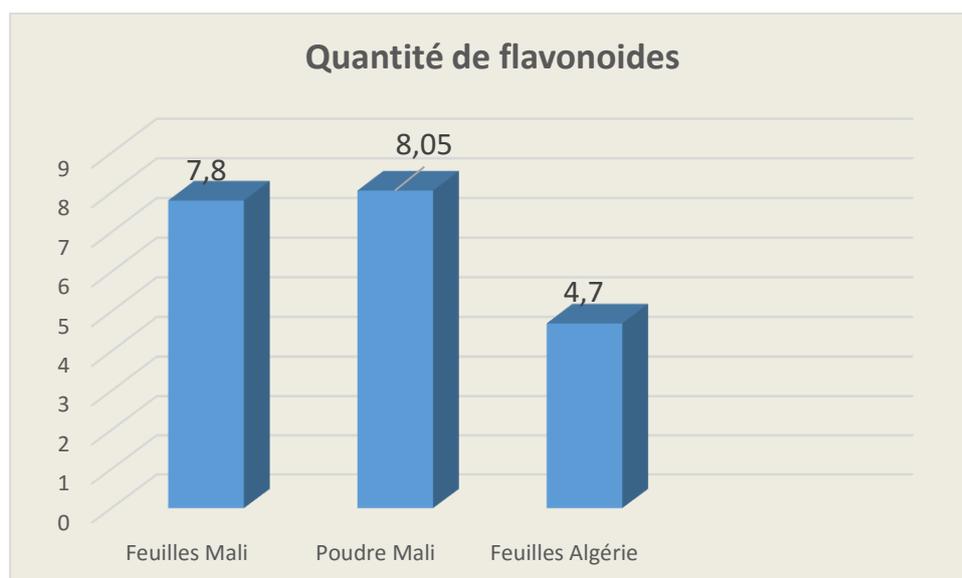


Figure 29 : Histogramme comparatif de la quantité de flavonoïdes des 3 échantillons du MO première méthode.

La deuxième méthode de calcul, est la suivante ; $X = (A \cdot m_0) / (A_0 \cdot m)$

X : la quantité des flavonoïdes (mg équivalent acide gallique /g d'extrait plante).

A : l'absorption de l'extrait.

A₀ : l'absorption de la solution acide gallique.

m : masse de l'extrait de plante (mg).

m₀ : masse de l'acide gallique dans la solution.

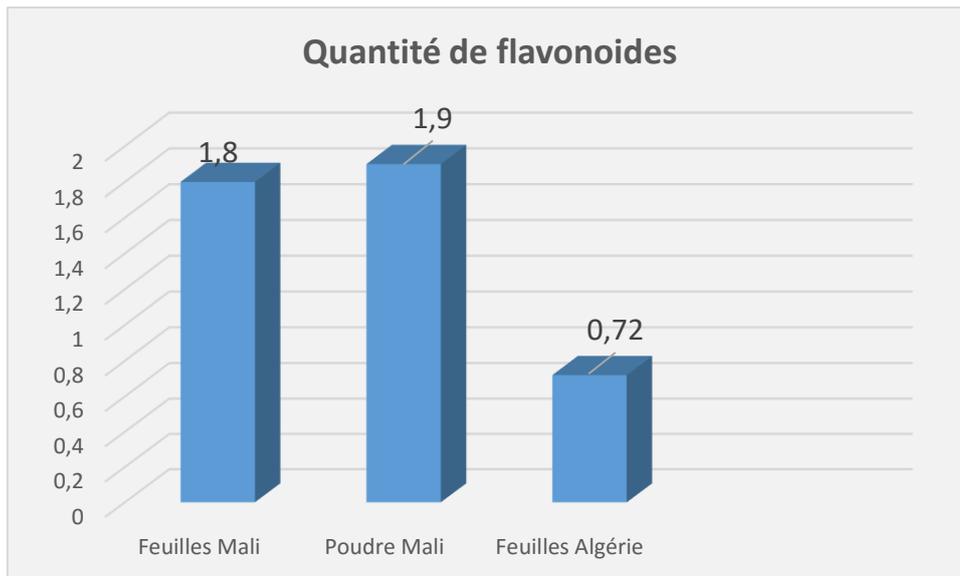


Figure30 : Histogramme comparatif de la quantité de flavonoïdes des 3 échantillons du MO deuxième méthode.

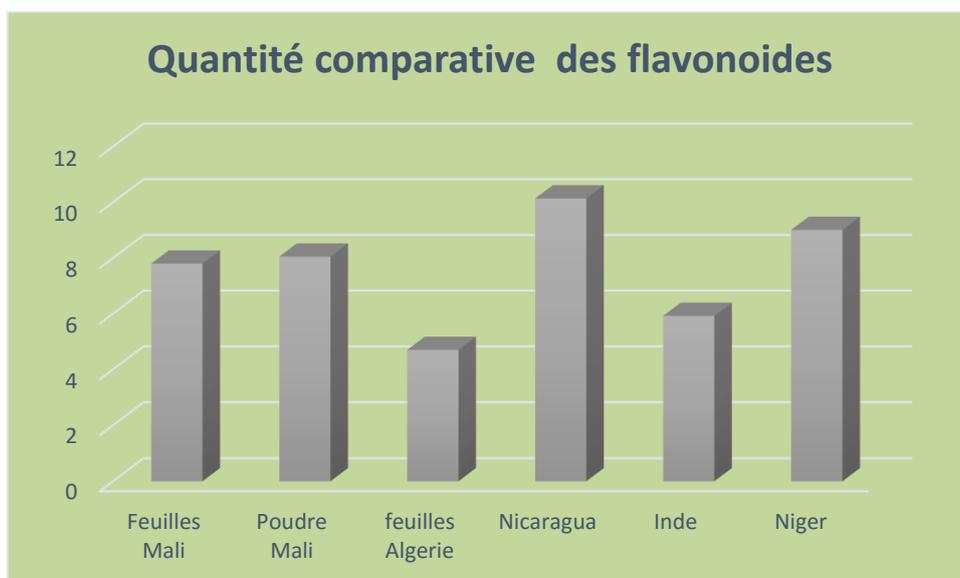


Figure 31 : Histogramme de la quantité comparative des Flavonoïdes¹⁵.

D . Evaluation de l'activité antioxydante :

Dans notre travail, nous avons testé par la méthode de DPPH et FRAP, différents extraits de provenance différente (feuilles), et les résultats obtenus nous ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. On remarque que la capacité de réduction du fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des échantillons.

1. Activité par la méthode de DPPH :

Les absorbances des différents échantillons obtenues après mesure dans le tableau 15 (voir annexe). L'activité antioxydante du MO dépend essentiellement de la quantité totale en flavonoïdes et polyphénols, et les résultats obtenus par notre étude confirment cette relation ; la quantité en polyphénols (dans la deuxième méthode) et des flavonoïdes (première méthode) est proportionnelle à l'activité antioxydante. La quantité de polyphénols et flavonoïdes est en corrélation avec l'activité antioxydante. Ainsi, la poudre du Mali a la meilleure activité antioxydante puis les feuilles de l'Algérie et celles du Mali. Les valeurs des concentrations inhibitrices sont regroupées dans le tableau 12 (voir annexe).

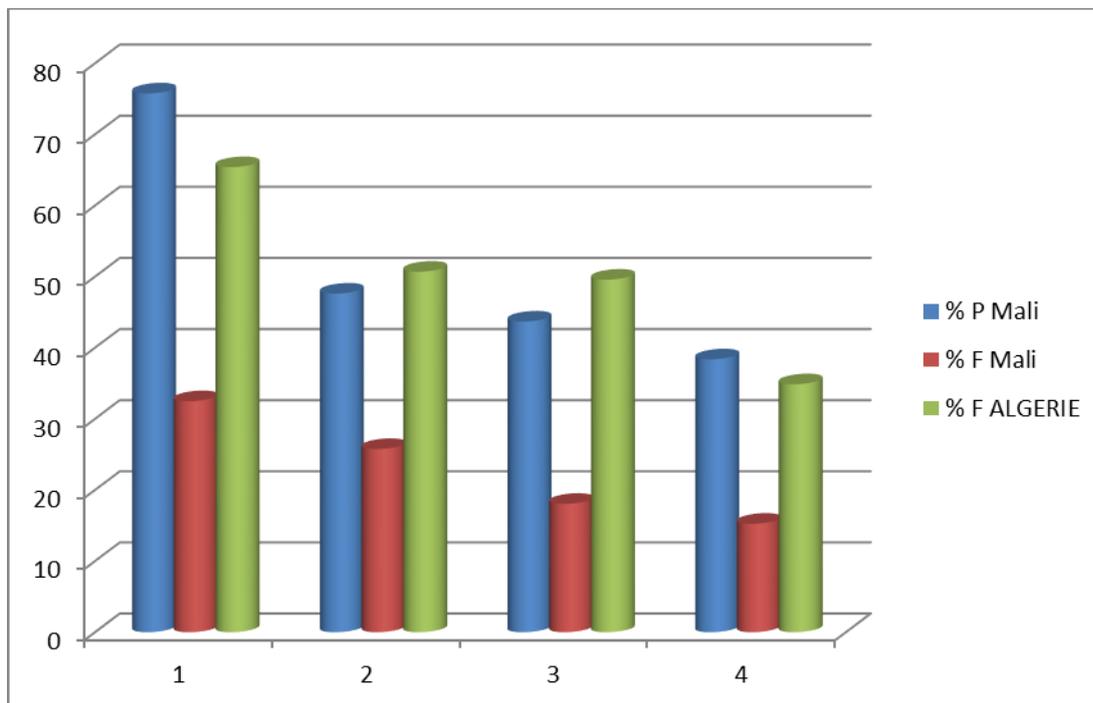


Figure 32: Histogramme de l'activité antioxydante par DPPH

2. Activité par la méthode de FRAP :

Ci-dessous, les résultats obtenus par cette méthode. (Voir annexe tableau 16)

La quantité de polyphénols et flavonoïdes est en relation également avec la méthode de FRAP. La poudre du Mali a une grande activité pour réduire le fer avec une densité optique maximale de 0,396 à une concentration de 0,2 mg/ml par rapport aux feuilles du Mali, d'Algérie et l'huile des graines qui ont présentés une DO respective de 0,389 ; 0,294 ; 0,386 pour la même concentration. Mais l'activité des 4 échantillons est nettement inférieure à celle du Trolox qui a une D.O de 1,36 avec une concentration de 0,5mg/ml.

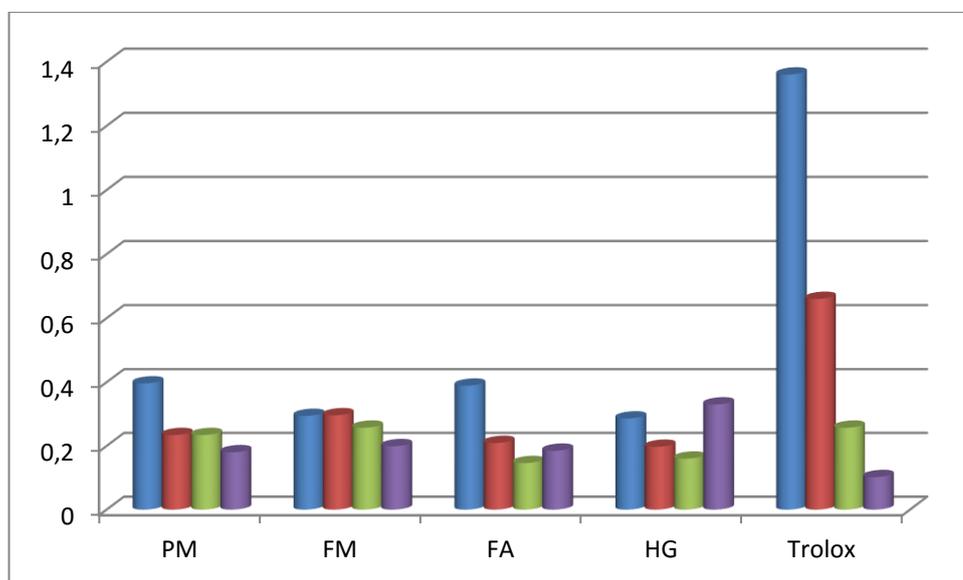


Figure33 :Histogramme de l'activité antioxydante par FRAP.

Selon une étude faite par Kang et Coll., les molécules polaires présentes dans les extraits végétaux contribuent à l'augmentation de l'activité antiradicalaire. D'après diverses études, les capacités des extraits naturels à piéger les radicaux libres dépendent des paramètres suivants : la dose, la structure, les substituants et le degré de polymérisation de la molécule. **Erreur ! Signet non défini..**

E. Evaluation de l'activité antimicrobienne :

D'après Oluduro et col, l'extrait éthanolique ne montre aucune zone d'inhibition de la croissance sur les bactéries de la plaie¹². D'après Ojiako et col, les extraits possédaient une vaste gamme d'activités, d'extrait éthanolique (9 mm) avec staphylocoque (9 mm), E. coli 4 mm. Cela prouve que feuilles du MO pourraient être utilisées dans le traitement de l'infection causée par des agents pathogènes tels que staphylocoque aureus, E. coli²². Le résultat a montré que l'extrait à l'éthanol des feuilles inhibe l'action de la Staphylococcus aureus 9 mm, Escherichia coli 4 mm¹².

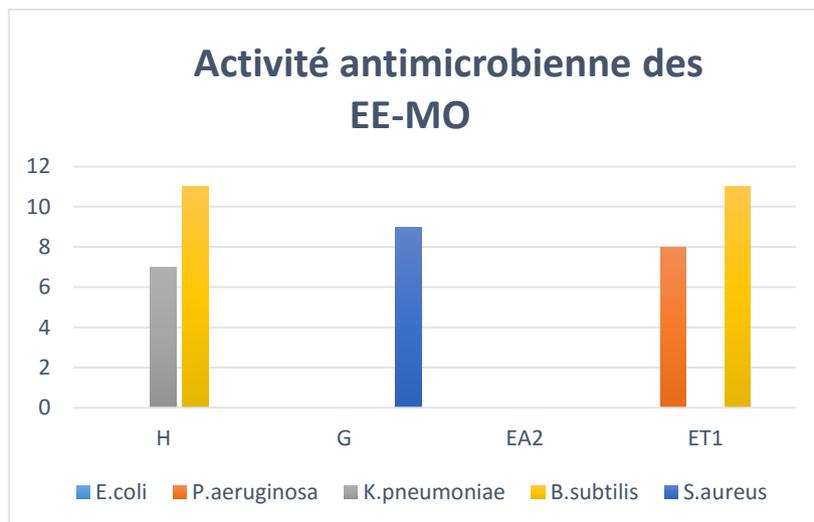


Figure 34: Histogramme de l'activité antimicrobienne.

D'après l'histogramme, les feuilles du Mali a une zone d'inhibition de 11 mm avec *B.subtilis* et 8mm de *P. aeruginosa*. Les feuilles d'Algérie n'a aucune zone d'inhibition sur ces bactéries. L'hydrolat a une zone d'inhibition de 11mm sur *B Subtilis* et 7mm de *K.pneumoniae*. L'huile des graines a une zone d'inhibition de 9mm sur *S.aureus*. Pour *E. coli* n'a pas été inhibé par aucun des 4 échantillons. Donc les feuilles du Mali et l'hydrolat ont la meilleure activité parmi les 4 échantillons.

F.Etude comparative des EE-MO avec CCM et isolation de produit :

L'étude des EE-MO est effectuée par CCM sur le gel de silice en utilisant le système d'élution (hexane : acétate d'éthyle) (8 :2) dans le but de comparer la composition chimique de l'échantillon du MO du Mali et les résultats des Rfs sont regroupés dans le tableau ci-dessous. Les plaques ont été révélées dans le PMA (Acide phosphomolybdique) (pour les EE-O), UV, solution vaniline-H₂SO₄ et l'iode aussi. Les valeurs des Rfs des différents échantillons sont regroupées dans le tableau 13(voir annexe tableau 13).

D'après les Rfs des différents solvants, les feuilles du Mali contiennent plus de composés que les autres. Avec le mélange de solvant (Hexane 8 : acétate d'éthyle 2), on observe la présence d'un produit fluorescent à Rf=0.56.

Faute de temps, la colonne a été effectuée juste sur les feuilles du Mali avec comme solvant (hexane 6 : acétate d'éthyle 4), dont on a pu isoler deux produits majoritaires. (voir annexe figure 06). Pour les Rfs de différents tubes contenant les produits majoritaires. (voir annexe tableau 13). L'éluant utilisé pour ces tubes était l'hexane 6 : méthanol 4.

Le tube **14** contient le composé en grande quantité car il y avait une grande tache. (Voir annexe figure 07).

Conclusion générale :

Toutes parties de cette plante sont consommables. Les feuilles de MO renferment des métabolites secondaires (composés phénoliques, les alcaloïdes, les terpènes ...) qui sont à l'origine de nombreuses activités thérapeutiques.

Des études récentes révèlent que la consommation de feuilles de *M. oleifera* avec des sauces de fruits acidulées améliore la biodisponibilité en fer et en zinc, ce qui représente une solution peu coûteuse pour la carence de ces ions dans le régime de la population socialement négligée.

Le MO peut être utilisé par les pays du tiers monde comme moyen d'éradication de la malnutrition surtout chez les mères allaitantes et les bébés.

Sa capacité purificatrice, sa source en vitamines et nutriments, son potentiel thérapeutique, son adaptation au climat font du MO, une bonne alternative pour les pays sous-développés. Donc, nous devons sensibiliser les gens sur non seulement les bienfaits et leur pousser à cultiver cette plante afin qu'ils en bénéficient.

Le taux des métabolites secondaires est différent entre les 3 EE-MO, et ceci peut être due à plusieurs facteurs tels que : séchage, conservation et l'âge de la plante.

D'après les tests réalisés sur l'activité antioxydante (DPPH, pouvoir réducteur), on remarque que l'extrait de la poudre du Mali révèle une forte activité que les deux autres.

D'après la colonne, les feuilles du Mali ont plus de composés que les 2 autres ceci peut être dues aux facteurs cités en haut.

Les perspectives :

Dans un futur proche, nous aimerons faire une étude détaillée de la composition chimique du MO, en utilisant les différentes méthodes d'analyse plus performantes RMN 1D et 2D.

Pouvoir aussi isoler un ou plusieurs produits afin de faire une hémisynthèse. Faire une formulation du MO à la cyclodextrine pour voir son effet.

Annexes

1. Les tableaux

Tableau (1) : les différents organes et leurs activités médicinales.

Parties de la plante	Propriétés médicinales
Feuilles	Antiscorbutique, complément nutritionnel, fortifiant Anti-inflammatoire Antispasmodique Diurétique Rubéfiante ¹¹ Antibiotique, antipaludique
Racines	Antiscorbutique Tonifiant Bactéricides Fongicides
Fleurs	Un stimulant, aphrodisiaque, cholagogue; utilisée pour soigner inflammations, maladies musculaires, tumeurs, et l'élargissement de la rate ¹ .
Gomme (sève)	Pour caries dentaires, et est astringent and rubéfiant, fièvres, plaintes intestinales, dysenterie, asthmes ¹
Graines	L'extrait de la graine a un effet protecteur en diminuant les peroxydes lipides du foie ¹
Ecorces	Plaies et champignons de la peau ¹¹

Tableau(2) : Taux en polyphénols, flavanoides et acides ascorbiques des feuilles de MO lyophilisés.

Composés	Nicaraguay(Amérique centrale)	Inde(Asie)	Niger(Afrique)
Composés phénoliques totaux	4.25 ± 0.14	2.94 ± 0.17	3.66 ± 0.21
Flavonoides totaux	4.43 ± 0.21	2.10 ± 0.18	3.81 ± 0.25
Acide ascorbique	0.92 ± 0.03	0.84 ± 0.04	0.68+- 0.05

Tableau (3): Tableau comparatifs des rendements

Extraits	Méthode d'extraction	Solvant	Apparence	Rendements
Feuilles sèches (Mali)	Hydrodistillation	Eau	Huiles	0.023%
Feuilles sèches (Mali)	Froid	EtOH	Liquide visqueux vert	17%.
Feuilles sèches Algérie	Froid	EtOH	Liquide visqueux vert	11.45%
Poudre Feuilles (Mali)	Froid	EtOH	Liquide visqueux vert	20%.
Feuilles sèches (Mali)	Sonication	Acétone : Eau	Liquide vert	/
Feuilles sèches Algérie	Sonication	Acétone : Eau	Liquide vert clair	/

Poudre Feuilles (Mali)	Sonication	Acétone : Eau	Liquide vert	/
Graine (Mali)	Soxhlet avec cartouche	Hexane	Huile jaune	24.50%
Graine (Mali)	Soxhlet avec coton	Hexane	Huile jaune	15.23%

Tableau (4) : valeur des λ_{\max} pour chaque EE-MO.

MO	Feuilles (Mali)	Poudre (Mali)	Feuilles (Algérie)
λ_{\max} (nm)	210	200	200

Tableau (5) : Absorbance de l'acide gallique à différentes concentrations :

[a. gallique] mg/ml	0,006	0,01	0,012	0,02	0,05	0,06
A	0,404	0,468	0,503	0,555	0,879	1,01

Tableau (6) : Absorbance des extraits de polyphenols par deux méthodes ultrasons et macération à froid.

MO	Feuilles (Mali)	Feuilles(Algérie)	Poudre Mali
A Macération	0.616	0.934	0.809
A Ultrason	0.681	0.265	0.625

Tableau(7) : Quantité des polyphénols.

Echantillon MO	Feuilles Mali	Poudre Mali	Feuilles Algérie
Quantité en polyphénols mg/100g	2	4.7	3.7
Quantité en polyphénols ES	1	1.85	2.35
X Quantité en EAG mg /ml	0.02	0.047	0.037

Tableau (8) : Absorbance des EE-MO

MO	Feuilles (Mali)	Poudre (Mali)	Feuilles (Algérie)
A	0.652	0.675	0.394

Tableau (9) : Absorbance de la Rutine à différentes concentrations :

C (mg/mL)	0.002	0.004	0.006	0.010	0.012
A	0.224	0.338	0.404	0.468	0.503

Tableau(10) : Quantité des flavonoïdes en équivalent de Rutine dans chaque EE-MO

Echantillon du MO	Feuilles Mali	Poudre Mali	Feuilles Algérie
Quantité des flavonoïdes mg/100g	7.8	8.05	4.7
Quantité de flavonoïdes ES	1.8	1.9	0.72

Tableau (11): IC50 des échantillons.

IC50 feuilles Algérie	IC50 feuilles Mali	IC50 poudre du Mali	IC50 huile des graines
11,26	32,11	9,68	51,52

Tableau(12) : Valeur des Rfs des différents échantillons.

Echantillon	Feuilles MO Mali	Poudre du Mali	Feuilles Algérie
Rfs (hexane8 : acétate d'éthyle2)	0.56 0.92	0.41 0.90	/
Rfs (hexane6 : acétate d'éthyle4)	0.4	/	/
Rfs (dichlorométhane 6 : méthanol 4)	/	0.15 0.475	/
Rfs (Hexane 4 : acétate d'éthyle 6)	0.3 0.475	/	/

Tableau(13) : valeur des Rfs des différents tubes contenant les produits majoritaires.

Tubes	5	9	11	12	14	16	17
Rfs	0.38	0.32 0.90	0.37 0.72	0.45 0.73	0.20	0.15	0.18

***Activité antioxydante DPPH**

Tableau (14) : Absorbance des échantillons

Feuilles Algérie

C (ug/ml)	0.2	0.1	0.06	0.05	0.03
A	0.242	0.352	0.360	0.465	0.547

Poudre du Mali

C (ug/ml)	25	12.5	10	5	2.5
A	0.211	0.241	0.225	0.202	0.284

Huile des graines

C (ug/ml)	25	12.5	10	5	2.5
A	0,302	0,313	0,323	0,338	0,358

***Activité antioxydante FRAP**

Tableau(15) : Absorbance des échantillons

-la poudre du Mali

C (mg/mL)	0.2	0.1	0.06	0.05	0.03
A	0.396	0.234	0.205	0.180	0.170

-les feuilles du Mali

C (mg/mL)	0.2	0.1	0.06	0.05	0.03
A	0.294	0.296	0.257	0.199	0.193

-Les feuilles d'Algérie

C (mg/mL)	0.2	0.1	0.06	0.05	0.03
A	0.389	0.209	0.146	0.184	0.176

-Huiles des graines

C (mg/mL)	0.2	0.1	0.06	0.03
A	0.386	0.197	0.160	0.330

*Activité antimicrobienne

Tableau(16) : Zone d'inhibition des différents échantillons

	H	G	EA2	ET1
	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	8
<i>K.pneumoniae</i>	7	0	0	0
<i>B.subtilis</i>	11	0	0	11
<i>S.aureus</i>	0	9	0	0

Tableau(17) : Absorbance de Trolox à différentes concentrations

[Trolox] mg/ml	0,5	0,25	0,1	0,04	0,02
Absorbance	1,36	0,66	0,257	0,102	0,06

B.Les spectres

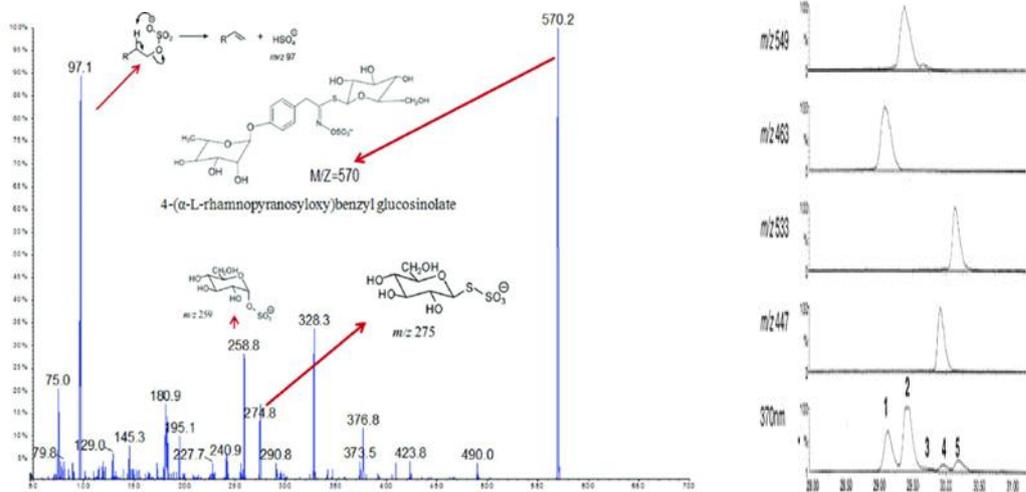


Figure (01) : spectre du α -L-Rhamnopyranosyloxy) benzyl glucosinolate.

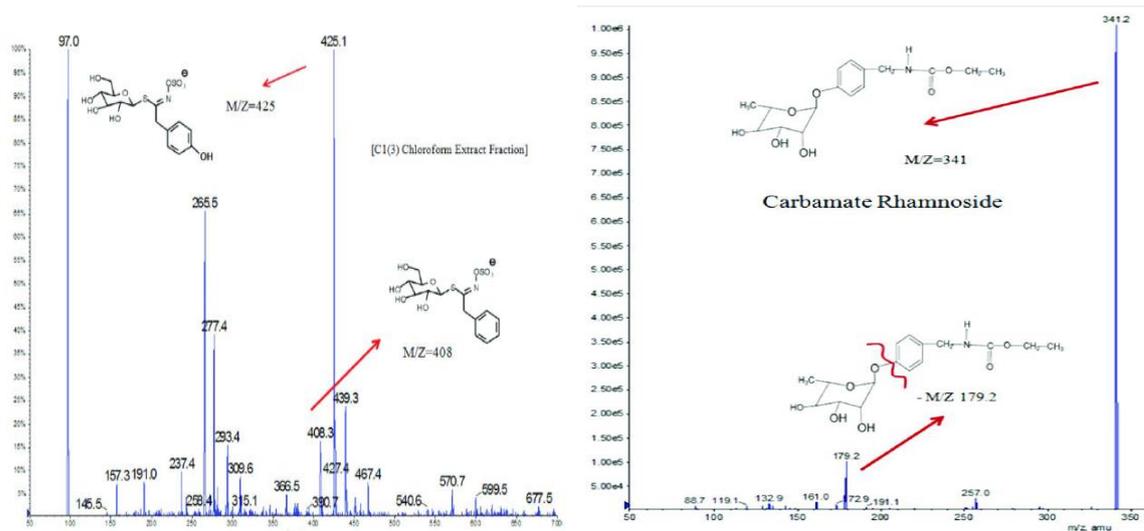


Figure (02) : spectre du carbamate rhamnoside et glucosinates.

C.Courbes

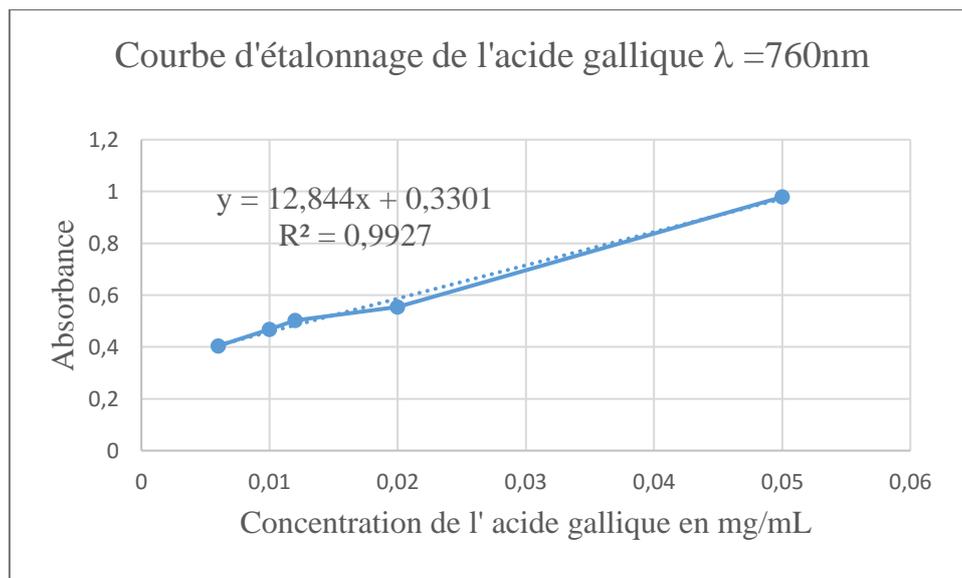
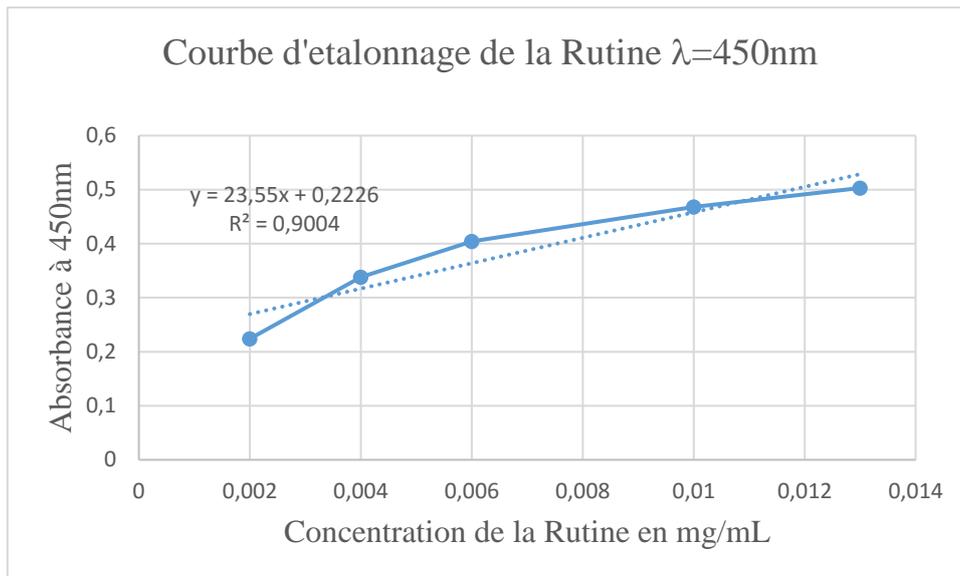
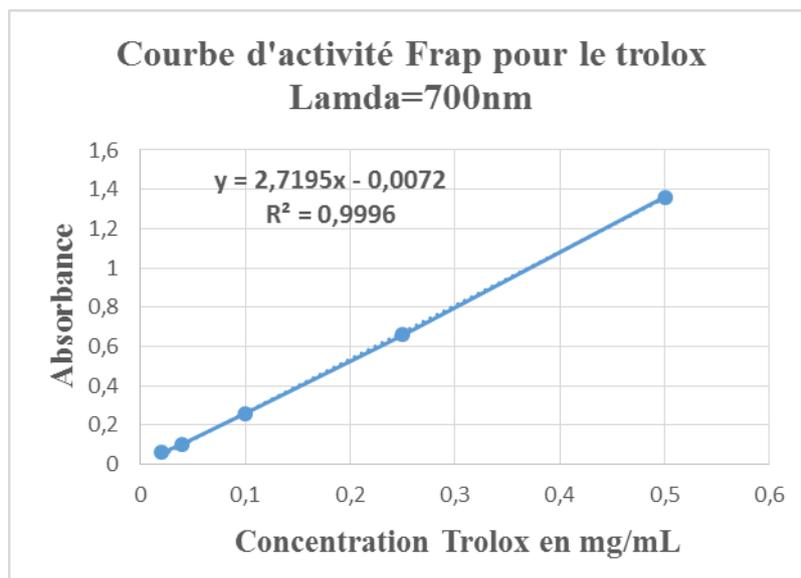


Figure (03) : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.



Figure(04) : courbe d'étalonnage de la Rutine



Figure(05) : Courbe d'étalonnage du Trolox

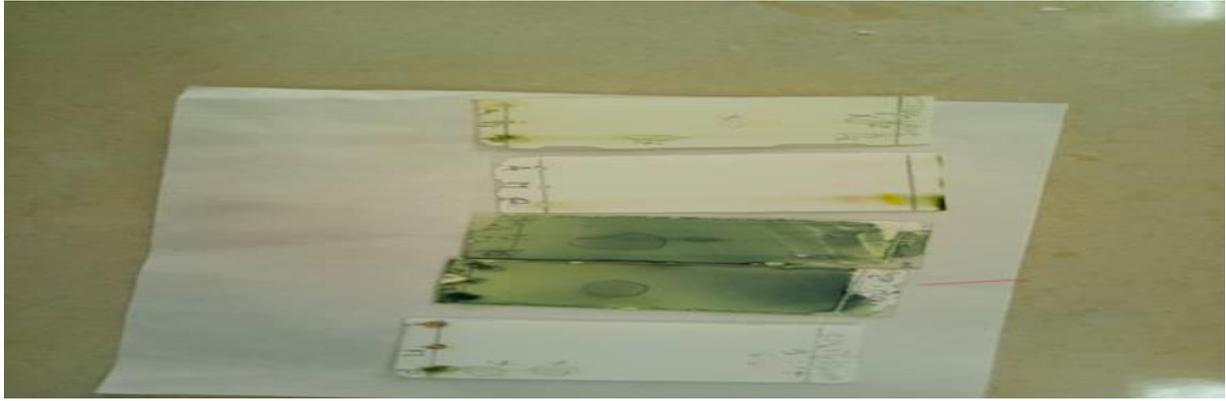
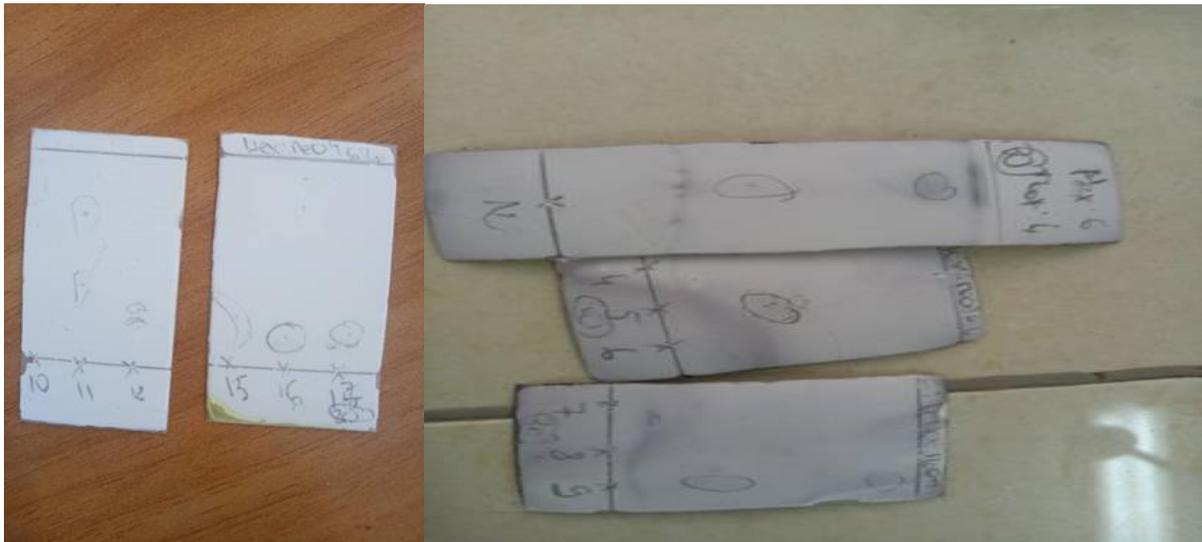


Figure (06): plaques CCM



Figure(07) : Plaques CCM des tubes

Préparation des solutions

Solutions	Réactifs
Solution methanolique de BF ₃ à 10%	4,2mL de BF ₃ dans 42mL de MeOH
Solution de Folin Ciocalteu (0,1N)	10 mL de Folin Ciocalteu ajuster jusqu'à 100mL avec l'eau distillée
Solution de carbonate de sodium (7,5%) Na ₂ CO ₃	7,5g de la poudre de Na ₂ CO ₃ dissout dans 100mL l'eau distillée
Solution de chlorure d'aluminium hydrate à 2%(AlCl ₃ 6H ₂ O)	21,87g de la poudre d'AlCl ₃ hydrate dissout dans 250mL de l'eau distillée.
HCl (0,01M)	0,085Ml d'HCl 36% est ajuste à 1 litre l'eau distillée.
FeCl ₃ (0,01M dans HCl 0,001M)	Dissoudre 1,62 g de FeCl ₃ dans un litre de HCl 0,01M
Acide trichloracétique 10%	10g de l'acide dans 100mL d'eau distillée

