

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
UNIVERSITE ABDERRAHMANE MIRA BEJAIA  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Physico-chimique

## *Mémoire*

*Présenté par* : M<sup>elle</sup> **FRISSOU Samia**

M<sup>elle</sup> **HANI Dalila**

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie

Option : Biochimie Appliquée

## *Thème*

*Etude des teneurs en alcaloïdes d'une plante  
médicinale «*Matricaria pubescens*» et la  
détermination de leurs activités antioxydantes.*

**Devant le jury :**

|                        |                              |     |
|------------------------|------------------------------|-----|
| <b>Présidente :</b>    | M <sup>elle</sup> TAHIRI O   | MAA |
| <b>Promotrice :</b>    | M <sup>me</sup> AMIR H.      | MAA |
| <b>Examinatrices :</b> | M <sup>me</sup> KHEMTACHE S. | MAA |
|                        | M <sup>me</sup> ZEMOURI S.   | MAB |

2013-2014

# Remerciements

*Nous remercions Dieu, le tous puissant de nous avoir accordé santé et courage pour accomplir ce modeste travail.*

*Nous exprimons notre gratitude et remerciement à notre promotrice M<sup>me</sup> AMIR H. de nous avoir encadré, pour ces orientations, ses conseils qu'elle nous a prodigué et sa disponibilité tout au long de ce travail.*

*Nous tenons à remercier profondément M<sup>me</sup> BEDJOU F. de nous accueillir au sein de son labo.*

*Nous remercions chaleureusement les membres de jury : M<sup>me</sup> KHEMTACHE S., M<sup>elle</sup> TAHIRI O. et M<sup>me</sup> ZEMOURI S. pour l'intérêt qu'ils ont manifesté envers notre travail en acceptant de l'évaluer.*

*Nous tenons à remercier aussi les Techniciennes de labo Saida et Habiba.*

*A toutes personnes ayant participé de près ou de loin à notre formation et à tous ceux qui nous ont apportés leur soutien et leurs encouragements durant la réalisation de ce travail.*

*Merci également à tous ceux qui, un jour ou l'autre, nous ont offert leur amitié et des moments inoubliables tout au long de notre cursus universitaire.*

*Dalila et Samia*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail en signe de respect et de remerciement :*

*À mon cher père, à ma chère mère qui ont toujours été présents pour me soutenir.*

*Mes dédicaces s'adressent aussi à mes adorables petites sœurs ainsi qu'à mon  
unique et cher frère.*

*À mes chers oncles et tantes*

*À mes chers cousins et cousines*

*À mes chers amis*

*À toute la promotion de Biochimie appliquée 2014 sans exception*

*À tous ceux qui me sont chers*

*Merci à vous tous.*

*SAMIA*

# *Dédicace*

*Avec ma gratitude et tous mon amour, je dédie ce travail à :*

*Mes très chers parents, qui ont consacré leur vie pour bâtir la mienne, qui ont toujours été là pour mes joies ainsi que pour mes peines.*

*C'est avec émotion que je leurs exprime toute mon affection, mon admiration et mon profond respect.*

*J'espère que par ce modeste travail, je vous rends un peu de ce sentiment de fierté que j'éprouve d'être votre fille.*

*A mes très chères sœurs et frères*

*A ma chère copine Samia qui a partagé le travaille avec moi*

*A mes amies Kahina et Lydia*

*A la promotion Biochimie Appliqué 2014*

*Et*

*A tous ceux que j'aime*

*Dalila H.*

## *Liste des abréviations*

ABTS : Acide 2,2- azino-bis-3-éthyl-Benzo Thiazoline Sulfonique

ABTS<sup>·+</sup> : Le radical ABTS

ADN : Acide désoxyribonucléique

A. gallique : Acide gallique

A. ascorbique : Acide ascorbique

BHA : Hydroxyanisole Butylé

CAT : Catalase

CAT : capacité antioxydante totale (*Total antioxidant capacity*)

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

ERO : Espèce Réactive de l'Oxygène

FeCl<sub>3</sub> : Chlorure ferrique

Fe<sub>2+</sub> : Fer ferreux

Fe<sub>3+</sub> : Fer férrique

GABA: Gamma aminobutiric acid

GSH: glutathion

GSHP<sub>x</sub> : glutathion peroxydase

Hcl : Acide Chlorhydrique

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : acide sulfurique

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée)

K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> : ferricyanure de potassium

M : molaire

mM : Millimolaire.

MDA : malonaldéhyde

$\text{MoO}_4^{2-}$  : ions molybdate

$\text{MoO}_2^+$  : molybdène

$\text{NH}_4\text{OH}$  : ammoniacque

NADPH : Nicotine Amide Adénine Di nucléotide Phosphate

$\text{O}_2$  : Oxygène

$\text{O}_2^-$  : Anion superoxide

$\text{OH}^\cdot$  : Radical hydroxyle

$\text{OH}$  : groupe hydroxyle

pH : Potentiel d'Hydrogène

RL : Radicaux Libres

SNC : Système nerveux central.

TBA : Thiobarbutiric acid

Trolox : un analogue de vitamine E (Acide 6-hydroxy-2, 5, 7, amidinopropane)

## *Liste des figures*

| <b>N° de figure</b> | <b>Titre</b>   | <b>Page</b> |
|---------------------|--|-------------|
| <b>1</b>            | Photographie de <i>Matricaria pubescens</i> (Région de Béchar).  | <b>4</b>    |
| <b>2</b>            | Principales cibles des espèces réactives de l'oxygène.   | <b>12</b>   |
| <b>3</b>            | Réactions enzymatiques de piégeage des espèces réactives de l'oxygène.   | <b>14</b>   |
| <b>4</b>            | Effet de la méthode d'extraction, du pH et de la polarité de solvant utilisé sur le taux d'extraction en alcaloïdes de <i>Matricaria pubescens</i> .               | <b>24</b>   |
| <b>5</b>            | Test dragendorff des extraits d'alcaloïdes totaux de <i>Matricaria pubescens</i>   | <b>25</b>   |
| <b>6</b>            | Pouvoir réducteur en fonction des solvants testés et des concentrations en alcaloïdes de <i>Matricaria pubescens</i> .   | <b>26</b>   |
| <b>7</b>            | Activité scavenger du radical DPPH en fonction des solvants testés et des concentrations en alcaloïdes de <i>Matricaria pubescens</i> .                            | <b>27</b>   |
| <b>8</b>            | Activité scavenger de radical ABTS en fonction des solvants testés et des concentrations en alcaloïdes de <i>Matricaria pubescens</i> .                            | <b>28</b>   |
| <b>9</b>            | Pourcentages d'inhibition de l'oxydation du $\beta$ -carotène en fonction des solvants testés et des concentrations en alcaloïdes de <i>Matricaria pubescens</i> . | <b>30</b>   |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| <b>10</b> | La capacité antioxydante totale (TAC) en fonction des solvants testés et des concentrations en alcaloïdes de <i>Matricaria pubescens</i>     | <b>31</b> |
| <b>11</b> | Activité scavenger du radical hydroxyle en fonction des solvants testés et des concentrations en alcaloïdes de <i>Matricaria pubescens</i> . | <b>33</b> |

## *Liste des tableaux*

| <b>N°de tableau</b> | <b>Titre</b>   | <b>Page</b> |
|---------------------|--|-------------|
| <b>I</b>            | Utilisations de <i>Matricaria pubescens</i> selon quelques régions sahariennes.    | <b>5</b>    |
| <b>II</b>           | Types d'alcaloïdes et leurs précurseurs de synthèse en acides aminés               | <b>8</b>    |
| <b>III</b>          | Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques | <b>10</b>   |

## Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

### Chapitre 1 : synthèse bibliographique

|  |    |
|--|----|
| Introduction .....   | 1  |
| I. Généralités sur <i>Matricaria pubescens</i> .....             | 3  |
| I.1. Les asteraceae .....  | 3  |
| I.2. Présentation de la plante <i>Matricaria pubescens</i> ..... | 3  |
| I.3. Position systématique .....                                 | 3  |
| I.4. Description botanique de <i>Matricaria pubescens</i> .....  | 4  |
| I.5. Utilisations de <i>Matricaria pubescens</i> .....           | 4  |
| II. Les alcaloïdes .....   | 5  |
| II.1. Généralités .....  | 5  |
| II.2. Propriétés physicochimique des alcaloïdes .....            | 6  |
| II.3. Classification des alcaloïdes .....                        | 7  |
| II.4. Propriétés pharmacologiques des alcaloïdes .....           | 9  |
| III. Activité antioxydante .....                                 | 9  |
| III.1. Les radicaux libres dans le système biologique .....      | 9  |
| III.2. Stress oxydant .....                                      | 11 |
| III.3. Conséquences du stress oxydant .....                      | 11 |
| III.4. Les antioxydants .....                                    | 13 |
| III.4.1. Les antioxydants endogènes .....                        | 14 |
| III.4.2. Les antioxydants exogènes .....                         | 15 |

## Chapitre 2 : Matériel et méthodes

|   |    |
|---|----|
| I. Préparation du matériel végétal .....                              | 16 |
| II. Préparation des extraits .....                                    | 16 |
| II. 1. Extraction dans un milieu alcalin .....                        | 16 |
| II.2. Extraction dans un milieu acide .....                           | 17 |
| II.3. Extraction dans un milieu alcoolique .....                      | 17 |
| II.3.1. Extraction avec l'éthanol et le méthanol par le soxhlet ..... | 17 |
| II.3.2. Extraction avec l'éthanol par macération.....                 | 18 |
| III. Détermination du taux d'extraction .....                         | 18 |
| IV. Test phytochimique .....  | 19 |
| V. Détermination de l'activité antioxydante.....                      | 19 |
| V.1. Le pouvoir réducteur.....  | 19 |
| V.2. Activité scavenger du radical DPPH .....                         | 19 |
| V.3. Activité scavenger du radical ABTS.....                          | 20 |
| V.4. Evaluation de l'activité antioxydante totale .....               | 20 |
| V.5. Test de blanchiment de $\beta$ -carotène .....                   | 21 |
| V.6. Activité scavenger du radical hydroxyle.....                     | 21 |
| IV. Etude statistique.....  | 22 |

## Chapitre 3 : résultats et discussions

|   |    |
|---|----|
| I. Le rendement d'extraction des alcaloïdes ..... | 23 |
| II. Test phytochimique .....                      | 24 |
| III. Activité antioxydante .....                  | 25 |
| III.1. Pouvoir réducteur .....                    | 25 |

|   |    |
|---|----|
| III.2. Activité scavenger du radical DPPH .....           | 26 |
| III.3. Activité scavenger du radical ABTS .....           | 28 |
| III.4. Test de blanchiment du $\beta$ -carotène .....     | 29 |
| III.5. Evaluation de l'activité antioxydante totale ..... | 31 |
| III.6. Activité scavenger du radical hydroxyle .....      | 32 |
| Conclusion .....  | 34 |
| Références bibliographiques.....                          | 36 |

## **Annexes**

## **Glossaire**

# *Introduction*

## *Introduction*

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations (Schauenberg et Paris ,2006), en effet, depuis la nuit des temps l'Homme utilisent les plantes pour se soigner contre différentes maladies.

Aujourd'hui encore, une large tranche de la population mondiale a recours aux propriétés curatives des plantes car l'efficacité des médicaments décroît vue leurs effets secondaires sur la santé.

Les plantes sont utilisées non seulement en médecine, mais également en parfumerie, en cosmétique et pour l'aromatisation culinaire. Elles constituent une source naturelle potentielle de molécules bioactives, faisant l'objet d'études scientifiques rigoureuses pour leur éventuelle utilisation comme alternative aux médicaments.

Les effets thérapeutiques de ces plantes dépendent de la présence d'agents bioactifs variés et appartenant à différentes classes chimiques (Bouzouita et *al.*, 2008). Les alcaloïdes figurent parmi les principes actifs les plus importants en pharmacologie et en médecine (Guignard, 2000). Ce sont des substances organiques azotées, à propriétés basiques et amers et ayant des propriétés thérapeutiques.

Actuellement, les scientifiques, mettent en évidence le rôle tragique du processus oxydatif incontrôlable induit par les espèces réactives oxygénées. Ces oxydants sont à l'origine directe de différents états pathologiques tels que le vieillissement et le cancer et indirecte sur la peroxydation des lipides des denrées alimentaires.

De nos jours environs 60 à 80 % de la population utilisent la médecine traditionnelle comme approche thérapeutique et préventive contre éventuelles maladies (Libman *et al.*, 2005). Pour cela, les progrès dans le domaine des antioxydants sont accentués d'où le nombre de plantes médicinales disponibles commercialement est de l'ordre de 3000 espèces et 1000 genres pour la flore algérienne (Hanifi, 1991), et rien

que le sahara possède environ 500 espèces (Maiza *et al.*, 1993). Certaines possèdent des propriétés pharmacologiques qui leur confèrent un intérêt médicinal.

*Matricaria pubescens* est une plante médicinale très utilisée en médecine traditionnelle en Algérie et notamment par les populations du Sahara central et septentrional (maiza *et al.*, 2011).

Dans le présent travail, il a été procédé à l'extraction des alcaloïdes totaux de *Matricaria pubescens* en utilisant plusieurs protocoles d'extraction ainsi qu'à la détermination de l'activité antioxydante des extraits obtenus en utilisant six méthodes différentes. Aucun travail similaire sur l'extraction des alcaloïdes à partir de la matricaire et l'évaluation de l'activité antioxydante n'est rapporté dans la bibliographie.

# *Synthèse bibliographique*

## I. Généralités sur *Matricaria pubescens*

### I.1. Les *asteraceae*

Les *asteraceae* est l'une des plus grandes familles des plantes à fleurs avec près de 25 000 espèces réparties en 1 600 genres largement distribués dans le monde entier. Ce sont des plantes herbacées pour la plus part, mais il existe de rares espèces arborescentes qui peuplent principalement les régions tropicales de la planète (Scotti *et al.*, 2012 ; Tähtiharju *et al.*, 2012).

Plusieurs plantes de cette famille sont cultivées pour leurs valeurs alimentaires (le tournesol, le topinambour, la laitue, la chicorée, la camomille...) ou comme plantes décoratives (les dahlias, les asters, les rudbeckies, les gaillardes, etc.). En effet, il a été rapporté que les fleurs et les feuilles de ces plantes possèdent des propriétés antibactériennes, antifongiques, antiviraux et anti-inflammatoires. De ce fait, de nombreuses espèces de cette famille sont utilisées en médecine traditionnelle (Mezache, 2010). Parmi ces espèces on trouve *Matricaria pubescens*, qui est très utilisée par les habitants du Sahara et qui fait l'objet de notre étude.

### I.2. Présentation de la plante *Matricaria pubescens*

Le nom scientifique de la matricaire, *Matricaria pubescens*, dérive du latin *Matricaria* désignant matrice ; *pubescens* signifiant velu.

- 🚩 En arabe : Guertoufa, Ouazouaza ;
- 🚩 En tamasheq : Aynasnis ;
- 🚩 En anglais : Hairy camomille (IUCN Centre for Méditerrananean cooperation, 2005 ; Hammiche et Maiza, 2006).

### I.3. Position systématique

La classification de *Matricaria pubescens* est donnée comme suit : (Judd *et al.*, 2002 ; Ozenda, 2004 ).

Embranchement : Angiospermes ;

Classe : Dicotylédones ;

Sous-classe : Gamopétales ;

Ordre : Astérales ;

Famille : *Asteraceae* (*Compositae*) ;

Genre : *Matricaria* ;

Espèce : *Matricaria pubescens*.

#### I.4. Description botanique de *Matricaria pubescens*

*Matricaria pubescens* (figure 1) est une plante endémique appartenant à la famille des compositae (*Asteraceae*), elle est de 10 à 20 cm de hauteur, caractérisée par de nombreuses tiges vertes minces et très peu ramifiées, par des feuilles découpées et velues d'un vert sombre et des fleurs jaunes tubulaires regroupées en capitules discoïdes hémisphériques dont le diamètre est de 6 à 7 mm (Makhloufi *et al.*, 2012).



**Figure1** : Photographie de *Matricaria pubescens* (Région de Béchar) (Makhloufi, 2009).

#### I.5. Utilisations de *Matricaria pubescens*

*Matricaria pubescens* n'est pas signalée comme toxique par les nomades, est une herbe médicinale utilisée pour soigner certaines maladies, telles que les affections oculaires, démangeaisons, dysménorrhées, inflammations des plaies, rhumatismes, toux, otites, calculs biliaires et affections gastro-intestinales (Makhloufi *et al.*, 2012).

Au Maroc, plus exactement à Tafilalet et Fès, une décoction de *Matricaria pubescens* versée dans l'oreille est recommandée pour l'otite. Un massage à l'oléum

aide pour les rhumatismes, les névralgies et sciatiques. (IUCN Centre for Mediterranean cooperation, 2005).

Selon Maiza et *al.* (1993), son utilisation diffère d'une région saharienne à une autre cela est illustré dans le tableau ci-dessous :

**Tableau I:** utilisations de *Matricaria pubescens* selon quelques régions sahariennes.

| Régions    | Utilisations   |
|------------|--|
| El Goléa   | Rhumatismes, déshydratation, problèmes dentaires, dysménorrhée, affections |
| Béni Abbes | Toux, allergies, affections oculaires.                                     |
| Ouargla    | Toux, dysménorrhée, piqûre de scorpion, allergies.                         |

Réputée pour ses qualités aromatiques, la matricaire est également utilisée afin d'aromatiser et d'améliorer le goût des aliments. Les tiges écrasées et les feuilles sont utilisées comme filtre dans la préparation du beurre de chèvre, donnant un arôme agréable à celui-ci et aide ainsi à le conserver. Elle améliore aussi la saveur de la soupe traditionnelle et donne à la nourriture une odeur très agréable (Makhloufi et *al.*, 2012).

Un grand nombre du genre *Matricaria* ont fait à ce jour l'objet d'études chimiques, et de très nombreux métabolites secondaires ont été isolés. Les alcaloïdes font partie des métabolites secondaires des plantes (Badiaga, 2011). Pour cette étude, nous nous intéressons uniquement aux alcaloïdes qui sont une source de molécules bioactives ayant plusieurs intérêts biologiques.

## II. Les alcaloïdes

### II.1. Généralités

En 1803, DEROSNE a isolé le premier alcaloïde semi-pur du latex sec de l'opium (*Papaver somniferum*), une drogue utilisée depuis des siècles pour des propriétés analgésiques.

Le terme alcaloïde a été introduit par Meisner au début du XIX<sup>ème</sup> siècle ; et la définition admise de celui-ci est celle donnée par Winterstein et Trier en 1910, définissant un alcaloïde comme étant un composé organique naturel (le plus souvent d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose (Hurabielle et Paris, 1980; Facchini, 2001 ; Muniz, 2006 ; Seghiri, 2009 ; Boudjerda, 2011).

On distingue :

- **Les alcaloïdes vrais** qui sont des substances d'origine naturelle et de distribution restreinte, de structure souvent complexe, azotée (atome d'azote inclus dans un hétérocycle) et de caractère basique. Ils existent dans la plante sous forme de sels, ont pour origine biosynthétique un acide aminé et sont dotées d'une activité pharmacologique significative ;
- **Les pseudo-alcaloïdes** qui sont des métabolites présentant les caractéristiques des alcaloïdes vrais excepté leur origine biosynthétique. Dans la majorité des cas connus, ce sont des dérivés d'isoprénoïdes (alcaloïdes terpéniques) et du métabolisme de l'acétate ;
- **Les proto-alcaloïdes** qui sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique, ont une réaction basique et sont élaborés in vivo à partir d'acides aminés (Bruneton, 1999 ; Maldonado, 2012).

## II.2. Propriétés physico-chimiques des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances azotées de masses moléculaires très variables de 100 à 900 g/mol. La plupart des alcaloïdes non oxygénés sont liquides à température ambiante (nicotine, spartéine, coniine) ; ceux contenant l'oxygène dans leur formule sont le plus souvent des solides cristallisables, rarement colorés (berbérine) (Bruneton, 1999).

Les alcaloïdes bases sont insolubles ou très peu solubles dans l'eau, solubles dans les solvants organiques apolaires ou peu polaires et solubles dans les alcools de titre élevé (Paris et Hurabielle, 1980).

La basicité des alcaloïdes est très variable, étroitement fonction de la disponibilité du doublet libre de l'azote. Des groupements électro-attracteurs adjacents à l'atome d'azote diminuent la basicité tandis que des groupements électro-donneurs la renforcent. La basicité est également influencée par des contraintes stériques, elle est un facteur d'instabilité pour ces molécules qui, à l'état de base et en solution, sont sensibles à la chaleur, à la lumière ainsi qu'à l'oxygène (Bruneton, 1999).

Les alcaloïdes ont une basicité plus ou moins marquée, ils peuvent 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 apolaires, sauf rares exceptions. Les sels cristallisés se conservent plutôt bien, ils constituent la forme commerciale habituelle pour ces molécules (Bruneton, 1999).

### **II.3. Classification des alcaloïdes**

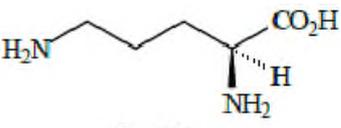
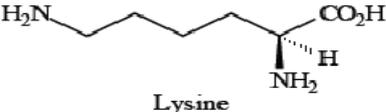
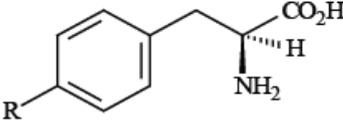
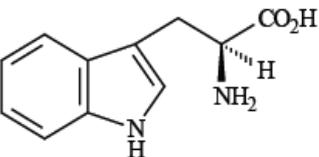
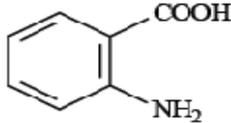
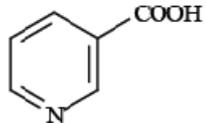
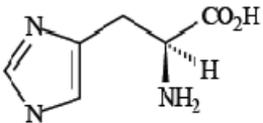
Depuis leur découverte et jusqu'à maintenant il ya plus de 10 000 alcaloïdes ont été isolés ou détectés à partir de sources végétales, animales, ou de micro-organismes. Le nombre de composés d'alcaloïdes connus et leur diversité structurale ont fait de leur classification une tâche difficile à établir et pour cela leur classification est basée sur plusieurs critères : l'origine biologique, la voie de biosynthèse, et la structure (Badiaga, 2011).

La classification la plus adaptée est basée sur l'origine biogénétique, c'est-à-dire de les classer en groupes. Les alcaloïdes ne sont pas tous dérivés des acides aminés, cependant quatre groupes sont reconnus :(Muniz, 2006).

- 1.** Les alcaloïdes dérivés des acides aminés comme l'ornithine/arginine, lysine, histidine, phénylalanine/tyrosine, tryptophane, l'acide anthranilique ou nicotinique ;
- 2.** Les alcaloïdes purines, comme la xanthine, caféine ;
- 3.** Terpènes aminés, ex : diterpène aconitine ou triterpène solanine ;
- 4.** Les alcaloïdes poly-cétoniques où l'azote est inclus dans le squelette poly-cétonique comme la coniine et la coccinelline.

Dans le tableau suivant sont décrits quelques types d'alcaloïdes ainsi que leur précurseur de synthèse en acides aminés :

**Tableau II:** Types d'alcaloïdes et leurs précurseur de synthèse en acides aminés (Muniz, 2006).

| Acides aminés  | Type d'alcaloïde                             |
|--|--|
|  <p>Ornithine</p>                                   | Pyrrolidines, pyrrolizidines, tropanes       |
|  <p>Lysine</p>                                      | Pipéridines, quinolizidines, indolizidines   |
|  <p>R = H , Phénylalanine<br/>R = OH , Tyrosine</p> | Alcaloïdes du type éphédrine, isoquinoléines |
|  <p>Tryptophane</p>                               | Indoles                                      |
|  <p>Acide anthranilique</p>                       | Quinoléines, quinazolines, acridines         |
|  <p>Acide nicotinique</p>                         | Pyridines                                    |
|  <p>Histidine</p>                                 | Imidazoles                                   |
| Via aminations   | Alcaloïdes terpéniques et stéroïdiens        |

## **II.4. Propriétés pharmacologiques des alcaloïdes**

Les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leurs activités pharmacologiques qui s'exercent dans les domaines les plus variés sur les mammifères comme l'Homme. Plusieurs médicaments utilisés sont des alcaloïdes naturels, ils affectent chez l'être humain le système nerveux, particulièrement les transmetteurs chimiques tels l'acétylcholine, épinephrine, norépinephrine, acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), dopamine et la sérotonine. Les alcaloïdes présentent plusieurs activités pharmacologiques : Analgésique (cocaïne), anti-cholinergique (atropine, scopolamine, galanthamine), anti-malaria (quinine), anti-hypertensive (réserpine), antitussive (codéine), détressant cardiaque, stimulant centrale (caféine), diurétique, anesthésiant local (cocaïne), narcotique (morphine), anti-tumeur, sympathomimétique (éphédrine), etc....(Badiaga, 2011).

Plusieurs alcaloïdes jouent également un rôle de curarisants, d'anesthésiques locaux, d'antifibrillants, d'antitumoraux, et d'antipaludiques et servent de model pour la synthèse d'analogues avec des propriétés meilleures (Bruneton, 1999).

## **III. Activité antioxydant**

L'oxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires, il permet de produire de l'énergie en oxydant la matière organique. Mais nos cellules convertissent une partie de cet oxygène en métabolites toxiques : radicaux libres organiques (Attou, 2011).

Un radical libre est une espèce chimique neutre ou chargé contenant un ou plusieurs électrons non apparié, qui occupe une orbitale atomique ou moléculaire par elle-même. Cette propriété lui confère la capacité de réagir avec d'autres molécules plus stables pour récupérer son électron créant d'autres radicaux libres et initiant ainsi une réaction en chaine (Jadot, 1994 ; Passwater, 1997).

### **III.1. les radicaux libre dans le système biologique**

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un

rôle particulier en physiologie, appelés radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Mezouar, 2013).

Ces espèces radicalaires sont produites d'une manière continue au sein de notre organisme. Par exemple lors de la respiration cellulaire, l'oxygène moléculaire se transforme en divers substances oxygénées, communément appelées espèces réactives de l'oxygène. Ces dernières sont présentées dans le tableau 3.

**Tableau III:** Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques (Jadot, 1994 ; Bartosz, 2003).

| Nom                  | Symbole         |
|----------------------|-----------------|
| Anion superoxyde     | $O_2^{\bullet}$ |
| Radical hydroxyle    | $OH^{\bullet}$  |
| Monoxyde d'azote     | $NO^{\bullet}$  |
| Peroxyde d'hydrogène | $H_2O_2$        |
| Acide hypochlorique  | $HOCl$          |
| Oxygène singulier    | $^1O_2$         |
| Peroxynitrite        | $ONOO^-$        |
| Radical alcoxy       | $RO$            |
| Radical peroxy       | $ROO$           |

L'instabilité des espèces oxygénées réactives rend difficile leur mise en évidence au niveau des différents milieux biologiques. Leurs constantes de vitesse réactionnelle varient selon leurs natures (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003). La durée de vie des espèces oxygénées réactives est extrêmement très courte de la nano à la milli seconde (Lehucher-Michel *et al.*, 2001).

En effet, la toxicité des espèces oxygénées réactives n'est pas nécessairement corrélée avec leur réactivité, dans plusieurs cas des espèces peu réactives peuvent être à l'origine d'une grande toxicité en raison de leur demie vie longue qui leur permet de se diffuser et gagner des locations sensibles où elles peuvent interagir et causer des dommages à longue distance de leurs sites de production (Attou, 2011).

La réactivité chimique des radicaux libres de l'oxygène est variable selon la molécule considérée, mais ce sont pour la plupart de puissants oxydants. Les principaux radicaux libres entrant dans les processus physiopathologiques humains sont le radical superoxyde et hydroxyle, mais d'autres dérivés de l'oxygène jouent également un rôle important dans le stress oxydant, en particulier le peroxyde d'hydrogène. C'est pourquoi le terme d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) est préféré à celui de radicaux libres puisque le peroxyde d'hydrogène n'est pas un radical libre (Pincemail *et al.*, 1999).

### **III.2. Stress oxydant**

La perturbation de l'équilibre endogène entre radicaux libres et antioxydants de courte ou longue durée, provoque des effets délétères dus, soit à une défense antioxydante défailante, soit à un état pro-oxydatif accru, nommé stress oxydant (Biesalski *et al.*, 1997).

Cette situation peut résulter d'un dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale, d'une activation de systèmes enzymatiques, d'une oxydation de certaines molécules (glucose, hémoglobine, catécholamine, ...) ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, métaux toxiques) (Attou, 2011).

Enfin, une mauvaise alimentation pauvre en antioxydants contribuera également à l'apparition d'un stress oxydant.

### **III.3. Conséquences du stress oxydant**

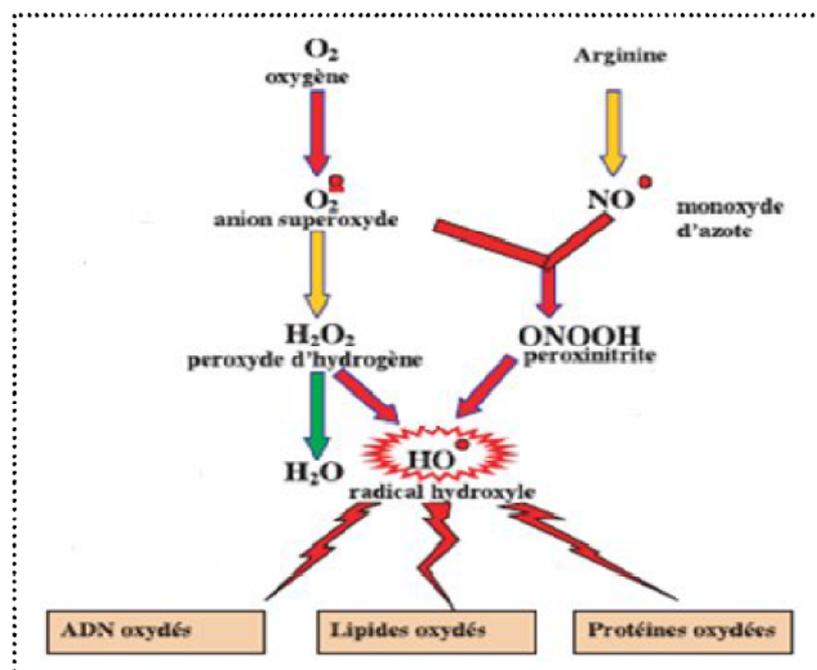
Les conséquences biologiques du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront

l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates (Favier, 2003).

Des concentrations élevées en espèces réactives de l'oxygène peuvent être un important médiateur de dommages des structures cellulaires, des acides nucléiques, des lipides et des protéines (Figure 2) (Valko *et al.*, 2007).

Selon Favier (2003), la plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux.

Le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies comme le cancer, syndrome de détresse respiratoire aigue, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré...etc. Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tel que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires.



**Figure 2 :** Principales cibles des espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003)

### III.4. Les antioxydants

Pour échapper aux conséquences du stress oxydant, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant/antioxydant afin de préserver les performances physiologiques de l'organisme.

Les antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus d'un intérêt certain dans la conservation des denrées comestibles, ils pourraient s'avérer utiles dans la prophylaxie et le traitement des maladies dans lesquelles le stress oxydant est incriminé. Les risques et les effets néfastes des antioxydants synthétiques utilisés comme additifs alimentaires ont été questionnés au cours des dernières années et la nécessité de les substituer par des antioxydants naturels, issus de plantes médicinales, est apparente. Le maintien d'un niveau non cytotoxique des espèces oxygénées réactives est assuré par des systèmes d'antioxydants (Ir Greet, 2004).

Un antioxydant est une substance qui en faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable qui, de manière significative retarde ou empêche l'oxydation de ce substrat (Mezouar, 2013). Il peut agir en supprimant les espèces réactives de l'oxygène ou en empêchant leur formation ou encore en réparant les dommages causés par ceux-ci (Halliwell, 1991).

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène. La nature des antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire (Attou, 2011).

Les antioxydants agissent de plusieurs manières. Les mécanismes les plus fréquents sont l'interruption de la spirale oxydative (vitamines C et E, NADPH, glutathion), la prévention des dégâts par la mise à disposition d'électrons (céruloplasmine, vitamine C, superoxyde dismutase, GSHPx), et la réparation des molécules d'ADN (Zn, acide folique, niacine) (Berger, 2006).

Les défenses antioxydants de l'organisme humain peuvent être exogènes ou endogènes, ils réagissent en synergie afin de protéger les cellules vis-à-vis aux radicaux libres.

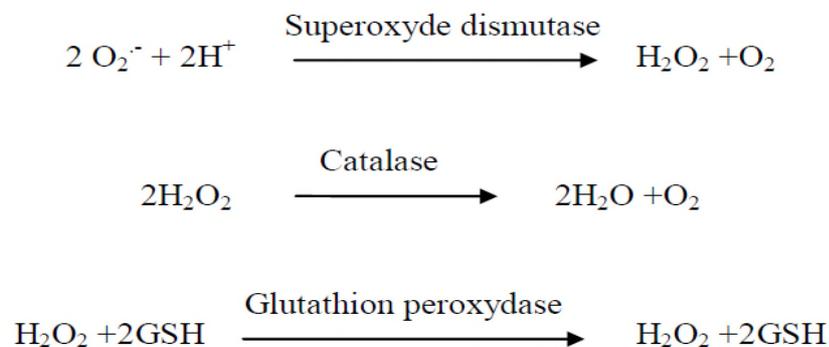
### III.4.1. Les antioxydants endogènes

La production physiologique des espèces réactives de l'oxygène est contrôlée au sein des cellules par les systèmes de défense enzymatiques et non enzymatiques.

#### a. Antioxydants enzymatiques

L'un des systèmes de défense antioxydants enzymatiques est constitué de trois enzymes principaux impliqués dans la neutralisation des ERO: le superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GSH-Px) et la catalase (CAT) (Matés *et al.*, 1999).

Ces enzymes forment un système de protection très efficace puisqu'ils ont la propriété de pouvoir réaliser un travail de façon permanente et permettre l'élimination de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène en catalysant les réactions suivantes (Lehucher-Michel *et al.*, 2001) :



**Figure 3:** Réactions enzymatiques de piégeage des espèces réactives de l'oxygène (Halliwell, 2006).

#### b. Antioxydants non enzymatiques

Ce groupe d'antioxydants est constitué de plusieurs composés capables de réagir directement ou indirectement avec les espèces réactives de l'oxygène (ERO). Le mécanisme indirect implique la chélation des métaux de transition ce qui empêche la production du radical hydroxyle, hautement toxique (Kohen et Nyska, 2002).

Certains composés antioxydants comme les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables. La vitamine piégeuse va devenir un radical, puis sera soit détruite, soit régénérée par un autre système. Ainsi, la vitamine E est régénérée par la vitamine C qui est elle-même régénérée par des enzymes, les ascorbates réductases. Il existe de plus des composés endogènes synthétisés par les cellules et jouant le même rôle ; le plus important est le glutathion réduit qui protège non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou le monoxyde d'azote (NO•) (Favier, 2003 ; Flora, 2009).

#### **III.4.2. Les antioxydants exogènes**

En plus des substances propres à l'organisme, l'alimentation et les plantes sont également d'importantes sources d'antioxydants. L'organisme peut tirer profit de nombreux antioxydants exogènes naturels présents dans son alimentation (Pham-Huy *et al.*, 2008 ; Kalam *et al.*, 2012). Bien que non indispensables à la vie, ces substances jouent un rôle majeur dans la lutte contre le stress oxydant. Les plus importantes parmi eux sont les vitamines (E et C), les caroténoïdes, les alcaloïdes ainsi que des traces des métaux (sélénium, manganèse, et zinc). Contrairement aux antioxydants enzymatiques, ces substances ne permettent l'élimination que d'un seul radical libre à la fois. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, ces antioxydants doivent être donc régénérés par d'autres systèmes (Pham-Huy *et al.*, 2008).

# *Matériel et méthodes*

## Matériel et méthodes

### I. Préparation du matériel végétal

La plante « *Matricaria pubescences* » à été récoltée dans la région de Hassi Massoud willaya de Ouargla durant le moins d'avril 2013, après la récolte, l'échantillon a été séché à température ambiante à l'abri de la lumière. La matière sèche obtenue est réduite en poudre à l'aide d'un broyeur électrique, puis tamisée en utilisant deux tamiseurs de granulométries différentes (500µm et 250µm), les fractions obtenues sont conservées à l'abri de la lumière dans des boîtes en verre et servent ensuite à la préparation des différents extraits.

### II. Préparation des extraits

La présente étude consiste à extraire le maximum des alcaloïdes totaux de *Matricaria pubescens* en utilisant plusieurs protocoles avec différents solvants d'extraction (extraction dans un milieu alcoolique, dans un milieu acide et dans un milieu alcalin).

Tous les protocoles d'extraction sont précédés par une délipidation, en mélangeant 20g de poudre végétale avec 100ml d'hexane. Après 48 heures de macération, le mélange est filtré, le marc obtenu est séché à l'air libre, et le filtrat jeté.

#### II. 1. Extraction dans un milieu alcalin

Le protocole d'extraction des alcaloïdes dans un milieu alcalin est proposé par (STAS, 1850) avec quelques modifications:

- 10g de poudre délipidés sont repris dans 100ml de chloroforme basifiés à un pH= 9 par l'ajout de quelques gouttes d'ammoniac ;
- Après 24 heures de macération afin de libérer les alcaloïdes de leurs combinaisons salines, le mélange est filtré (pour un bon épuisement du marc, la manipulation est répétée trois fois) ;
- Le marc épuisé est jeté et le filtrat est recueilli et concentré partiellement au rotor-vapor. La phase chloroformique concentrée subit une extraction par 100 ml d'une solution d'acide sulfurique (pH= 03);

- La phase acide est alcalinisée par une solution d'ammoniac au pH = 9. Il est procédé à une extraction (liquide-liquide) dans une ampoule à décantation après rajout de 20 ml de chloroforme. L'ensemble est mélangé doucement en agitant de haut en bas ;
- Après environ 30 mn, la phase organique est récupérée puis concentrée à sec, le résidu obtenu (alcaloïdes brute) est récupéré avec le DMSO et conservé à 4°C.

## **II.2. Extraction dans un milieu acide**

L'extraction des alcaloïdes totaux de la matricaire dans un milieu acide a été faite selon le protocole de Makkar et *al.* (2007) dur lequel des modifications ont été apportées.

- 10g de poudre délipidés sont mélangés avec 100ml d'acide acétique à 15% (dans le méthanol) ;
- Après 72 heures de macération une filtration est réalisée, le filtrat récupéré est alcalinisé avec de l'ammoniac jusqu' à PH = 9 ;
- Après filtration, l'extrait est concentré au rotavapeur, puis alcalinisé par l'addition de quelques gouttes d'ammoniac ;
- La solution obtenue est extraite par le chloroforme jusqu'à épuisement total, la phase organique est concentré. Le résidu sec obtenu est récupéré avec le DMSO puis conservé à 4 °C.

## **II.3. Extraction dans un milieu alcoolique**

L'extraction des alcaloïdes dans un milieu alcoolique a été réalisés en utilisant deux solvant de différente polarité (l'éthanol et le méthanol), soit par macération ou à l'aide d'appareil du soxhlet.

### **II.3.1. Extraction avec l'éthanol et le méthanol par le soxhlet**

Les alcaloïdes sont obtenus selon la méthode de Ross et Rain (1977) rapportée par Harborne (1998):

- La poudre délipidée (10g) est extraite au Soxhlet par 300ml d'alcool (éthanol et méthanol) pendant 8h ;

- L'extrait alcoolique obtenu est évaporé à sec puis repris par 50ml de chloroforme acidifié par une solution d'acide chlorhydrique à 5 % au pH=3 ;
- 30 min après, la solution aqueuse acide est alcalinisée par l'ammoniac au PH=9, puis mise pour extraction des alcaloïdes avec 50ml de chloroforme dans une ampoule à décanter. La phase chloroformique récupérée et évaporée à sec, et le résidu obtenu qui représente les alcaloïdes totaux est récupérée par le DMSO puis conservée à 4 °C.

### II.3.2. Extraction avec l'éthanol par macération

La méthode de Ross et Rain (1977) rapportée par Harborne (1998) avec quelques modifications ;

- 10g de poudre délipidés sont repris dans 250 ml d'éthanol ;
- une filtration est réalisée après 24h de macération, le filtrat récupéré est évaporé à l'aide d'un rotavapeur jusqu'à 0.5ml. L'extrait éthanolique concentré est additionné de 50ml d'eau distillée acidifiée avec l'HCl jusqu'au PH03 ;
- Après 30min de repos le mélange est basifié avec l'ammoniac jusqu'au PH=9 ;
- La solution basique obtenue est épuisée par 50ml de chloroforme dans une ampoule à décanter. La phase organique récupérée est évaporée à sec. Le résidu obtenu est récupéré avec le DMSO puis conservé à 4C°.

### III. Détermination du taux d'extraction

Le rendement de l'extraction en alcaloïdes est déterminé par la différence entre le poids du bécher plein et le poids du bécher vide. Le pourcentage d'extraction est calculé comme suit :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = [(P_1 - P_0)/E] 100$$

**P<sub>0</sub>**: poids du bécher vide (g).

**P<sub>1</sub>**: poids du bécher après évaporation du solvant (g).

**E** : poids de l'échantillon initial (g).

#### IV. Test phytochimique

La présence des alcaloïdes est confirmée par le test phytochimique spécifique. Les extraits récupérés avec le DMSO subissent une dilution de 1/10 dans un tube à essai, et quelques gouttes du réactif de Dragendorff sont ajoutées. L'apparition d'un précipité orangé indique la présence des alcaloïdes dans les extraits.

#### V. Détermination de l'activité antioxydante

Les activités antioxydantes des extraits des alcaloïdes de *Matricaria pubescens* ont été déterminées en utilisant différents tests :

##### III.1. Le pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est estimé par la méthode de Arabshahi-Delouee et Urooj (2007) ; 1ml d'extrait est additionné à 2,5ml de tampon phosphate (0,2M, 6,6) et 2,5ml de ferricyanure de potassium (1%). Après incubation à 50°C pendant 20min, 2,5ml d'acide trichloracétique (10%) sont ajoutés au mélange. Après centrifugation à 3000g pendant 10 min, 2,5ml du surnageant sont mélangés avec 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml du chlorure ferrique (0,1%). L'absorbance est mesurée à 700nm.

Le pouvoir réducteur des extraits de la plante étudiée est comparé à celui des trois antioxydants de référence testés ; BHA, l'acide gallique, et l'acide ascorbique.

##### III.2. Activité scavenger du radical DPPH

L'effet scavenger du DPPH est déterminé par la méthode de Kroyer et Hegedus, (2001) ; 300µl d'extrait sont ajoutés à 2700µl de DPPH (60µM). Trois standards connus pour leur effet anti-radicalaire contre le DPPH ont été testés en parallèle (l'acide ascorbique, l'acide gallique et Trolox).

L'absorbance a été lue à 517nm après 1heure d'incubation à l'obscurité (Kroyer et Hegedus, 2001). Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH est exprimé par la formule suivante :

$$\% = [(A_{\text{témoin}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{témoin}}] \times 100$$

$A_{\text{témoin}}$  : absorbance du témoin (300µl méthanol+ 2700 µl DPPH).

$A_{\text{échantillon}}$  : absorbance de l'extrait (300µl extrait+2700µl DPPH).

### III.3. Activité scavenger du radical ABTS

Le piégeage du radical libre ABTS<sup>•+</sup> est déterminé par la méthode de kim et *al.*, (2003). Un volume de 20 µl d'extrait est additionné à 2 ml de la solution d'ABTS<sup>•+</sup> (2,45mM d'ABTS sont mélangés avec 7mM de persulfate de potassium. La solution d'ABTS a été diluée avec l'éthanol afin d'obtenir une absorbance de 0,7± 0,02 à 734 nm). L'absorbance a été lue à 734 nm après 6 mn d'incubation à l'obscurité.

Le pourcentage de l'activité scavenger du radical ABTS<sup>•+</sup> est exprimé par la formule suivante :

$$\% = [(A_{\text{témoin}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{témoin}}] \times 100$$

$A_{\text{témoin}}$  : absorbance du témoin (ABTS<sup>•+</sup> seul).

$A_{\text{échantillon}}$  : absorbance de l'extrait (Extrait+ ABTS<sup>•+</sup> +Eau distillé).

La diminution de l'absorbance (% d'inhibition) de la solution de radical cation d'ABTS<sup>•+</sup> traduit l'effet de l'échantillon antioxydant par comparaison aux antioxydants de référence (Trolox, BHA et l'acide gallique).

### III.4. Evaluation de l'activité antioxydante totale

La capacité antioxydante totale des extraits est évaluée par la méthode de phosphomolybdène de Prieto et *al.* (1999). Un volume de 0.4 ml de chaque extrait est mélangé avec 4 ml de solution du réactif (0.6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium). Dans le cas du blanc, 0,4 ml de solvant d'extraction a été utilisée à la place de l'échantillon. Les tubes sont incubés à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695nm.

### III.5. Test de blanchiment de $\beta$ -carotène

Le test de blanchiment de  $\beta$ - carotène est estimé par la méthode de Sun et Ho (2005). Une quantité de 2 mg de  $\beta$  -carotène est dissoute dans 10 ml de chloroforme.

1 ml de cette solution est prélevé dans une fiole contenant préalablement 200 mg de Tween 20 et 20  $\mu$ l d'acide linoléique. Cette solution est évaporée au rotavapor jusqu'à disparition de l'odeur du chloroforme. Puis, un volume de 100 ml de l'eau oxygénée diluée est ajouté dans la fiole et le mélange résultant est agité vigoureusement. Dans des tubes à essai, 4 ml de l'émulsion du  $\beta$ - carotène/acide linoléique sont additionnés à 200 $\mu$ l d'extrait. Après incubation dans un bain marie à 50°C pendant 120 min, l'absorbance des extraits est mesurée à 470 nm.

Les antioxydants standards (BHA, Acide Gallique et AcideAscorbique) ont été utilisés comme un contrôle positif alors que le contrôle négatif est réalisé par le solvant de solubilisation des extraits.

L'activité antioxydante (%) des extraits est évaluée en termes de blanchiment de  $\beta$ -carotène en employant la formule suivante :

$$(\%) = [(A_{A(120)} - C_{C(120)}) / (C_{C(0)} - C_{C(120)})] * 100$$

$A_{A(120)}$  : représente l'absorbance en présence de l'extrait à t =120 mn.

$C_{C(120)}$  : représente l'absorbance du contrôle à t = 120 mn.

$C_{C(0)}$  : représente l'absorbance du contrôle a t = 0 mn.

### III.6. Activité scavenger du radical hydroxyle

La méthode de désoxyribose adoptée dans cette étude est celle de Halliwell *et al.* (1987). Le mélange réactionnel contient les réactifs suivants : 0.4 ml de la solution tampon phosphate (50 mmol/ l, pH = 7.4), 0.1 ml de l'extrait, 0.1 ml de l'EDTA (1.04 mmol/l), 0.1 ml de chlorure ferrique (1 mmol/l) et 0.1 ml de 2-désoxyribose (60 mmol/l). La réaction est commencée par l'addition de 0.1 ml de l'acide ascorbique (2 mmol/l) et 0.1 ml de peroxyde d'hydrogène (10 mmol/l).

Après incubation à 37°C pendant 1 heure, 1 ml de l'acide thiobarbutirique (10 g/l) est ajouté dans le milieu réactionnel suivi par 1 ml de l'acide chlorhydrique (25%). Les mélanges sont placés au bain marie à 100°C pendant 15 min. L'absorbance des solutions est mesurée à 532. L'acide gallique, l'acide ascorbique et BHA sont utilisés comme contrôles positifs.

La capacité du piégeage du radical hydroxyle est évaluée avec le pourcentage d'inhibition de l'oxydation de 2-désoxyribose par les radicaux hydroxyles. Le pourcentage du piégeage est calculé en basant sur la formule suivante:

$$(\%) = [A_0 - (A_1 - A_2)] * 100 / A_0$$

A<sub>0</sub>: représente l'absorbance du contrôle sans extrait

A<sub>1</sub>: représente l'absorbance après l'addition de l'extrait et de désoxyribose

A<sub>2</sub>: représente l'absorbance de l'extrait sans désoxyribose.

#### IV. Etude statistique

Toutes les données représentent la moyenne de trois essais. L'analyse statistique des résultats est effectuée avec l'application ANOVA MANOVA (STATISTICA 5.5) et la comparaison des données est prise à la probabilité P<0,05.

# *Résultats et discussions*

## Résultats et discussions

### I. Le rendement d'extraction des alcaloïdes

L'extraction des alcaloïdes repose en règle générale, sur le fait qu'ils existent habituellement dans la plante à l'état de sels et sur leur basicité, c'est-à-dire sur la solubilité différentielle des bases et des sels dans l'eau d'une part et dans les solvants organique d'autre part (Badiaga, 2011).

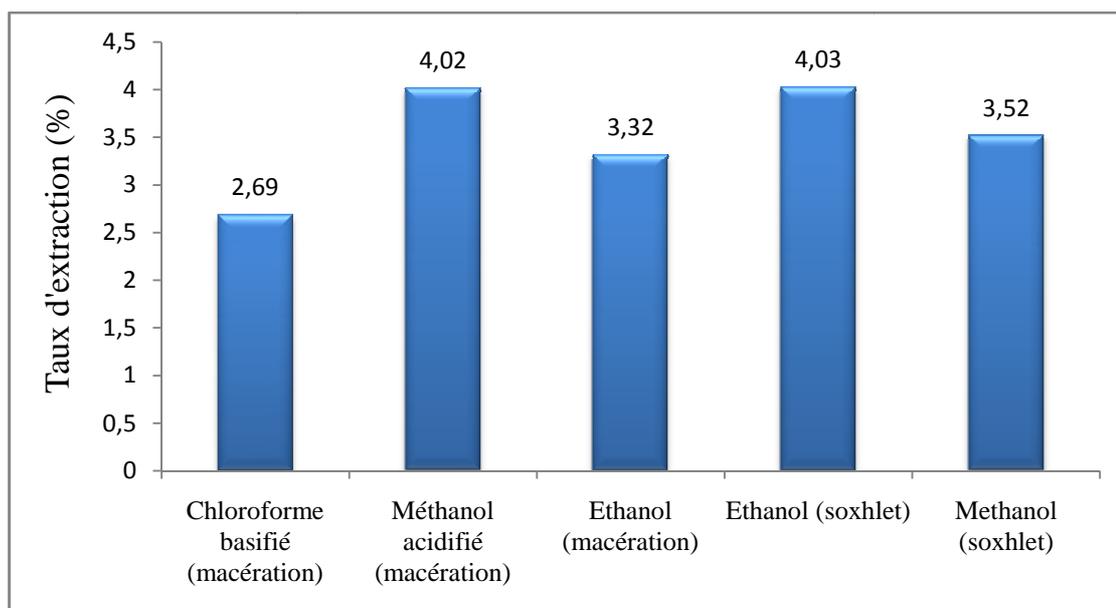
Dans le présent travail deux types d'extractions ont été réalisées, afin d'extraire le maximum d'alcaloïdes à partir de *Matricaria pubescens*, l'extraction par macération et l'extraction par soxhlet, en utilisant différents solvants à différentes polarités et pH (le chloroforme basifié, le méthanol acidifié, le méthanol et l'éthanol).

Les résultats montrent que les taux d'extraction obtenus présentent des différences selon le type d'extraction, le pH et la nature du solvant utilisé (figure 4).

Les résultats montrent clairement que les deux extraits éthanolique (soxhlet) et méthanolique acidifié (macération) possèdent une importante teneur en alcaloïdes avec un pourcentage de 4,03 et 4,02% respectivement comparé à l'extrait méthanolique (soxhlet) qui vient en troisième position avec un rendement de 3,52%, suivi par l'extrait éthanolique obtenu par macération (3,32%) et enfin vient l'extrait chloroformique basifié (macération) en dernière position avec un taux d'extraction de 2,69%.

Le rendement d'extraction trouvé en utilisant l'éthanol comme solvant et le soxhlet pour l'extraction est supérieur à celui obtenu en utilisant le même solvant par macération, de là on peut déduire que la technique d'extraction influence le taux d'extraction des alcaloïdes.

D'après ces résultats il est à noter que les différences constatées entre les teneurs en alcaloïdes obtenues en appliquant plusieurs méthodes d'extraction pourraient être expliquées par la nature et ainsi la solubilité des alcaloïdes de la matricaire dans les solvants.



**Figure 4 :** Effet de la méthode d'extraction, du pH et de la polarité de solvant utilisé sur le taux d'extraction en alcaloïdes de *Matricaria pubescens*.

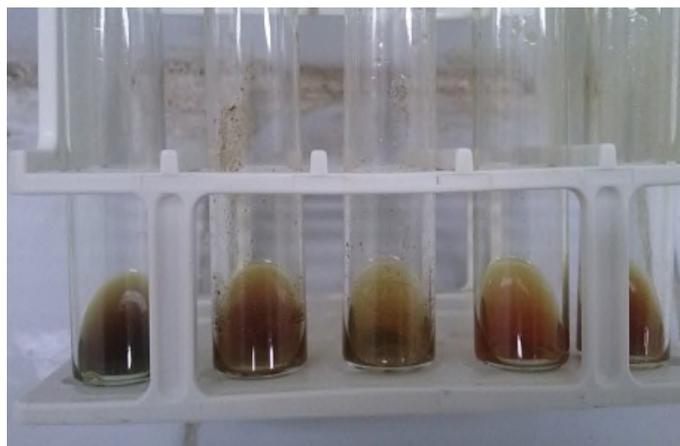
Maiza-Benabdesslam et *al.* (2007) ont obtenus des taux d'extractions de 0,52% et 0,43% pour *Fumaria capriolata* et *Fumaria bastardii* respectivement, ces taux sont largement inférieurs à ceux de *Matricaria pubescens*.

Ainsi, de manière générale, ces différences de résultats pourraient être expliquées par certains facteurs qui peuvent influencer la teneur en alcaloïdes totaux tels que la variété, la famille ainsi que la méthode d'extraction utilisée.

Une bonne méthode doit permettre l'extraction complète des composés d'intérêt, et éviter leurs modifications chimiques (Turkmen et *al.*, 2005 ; Hayouni et *al.*, 2007 ; Atmani et *al.*, 2009).

## II. Test phytochimique

La révélation de la présence des alcaloïdes dans les extraits obtenus (figure 5) à été réalisée par l'ajout du réactif de Dragendorff, un précipité orangé ainsi formé explique le résultat positif de ce test.



**Figure 5 :** Test dragendorff des extraits d'alcaloïdes totaux de *Matricaria pubescens*

### III. Activité antioxydante

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits d'alcaloïdes totaux de *Matricaria pubescens* a été réalisée par six tests différents à savoir ; le pouvoir réducteur, l'activité scavenger du radical DPPH, l'activité scavenger du radical ABTS, l'évaluation de l'activité antioxydante total, le test de blanchissement de  $\beta$ -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique et l'activité scavenger du radical hydroxyle.

Pour déterminer cette activité les extraits utilisés sont : l'extrait obtenu par l'éthanol au soxhlet et les extraits obtenus par macération avec le méthanol acidifié et le chloroforme basifié à différentes concentrations.

L'acide ascorbique, l'acide gallique, le trolox et la BHA sont des standards utilisés comme antioxydants de référence.

#### III.1. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est la capacité qu'a un extrait à donner un électron et à réduire le fer. De nombreux auteurs considèrent la capacité réductrice d'un composé comme indicateur significatif de son pouvoir antioxydant (Tepe *et al.*, 2005).

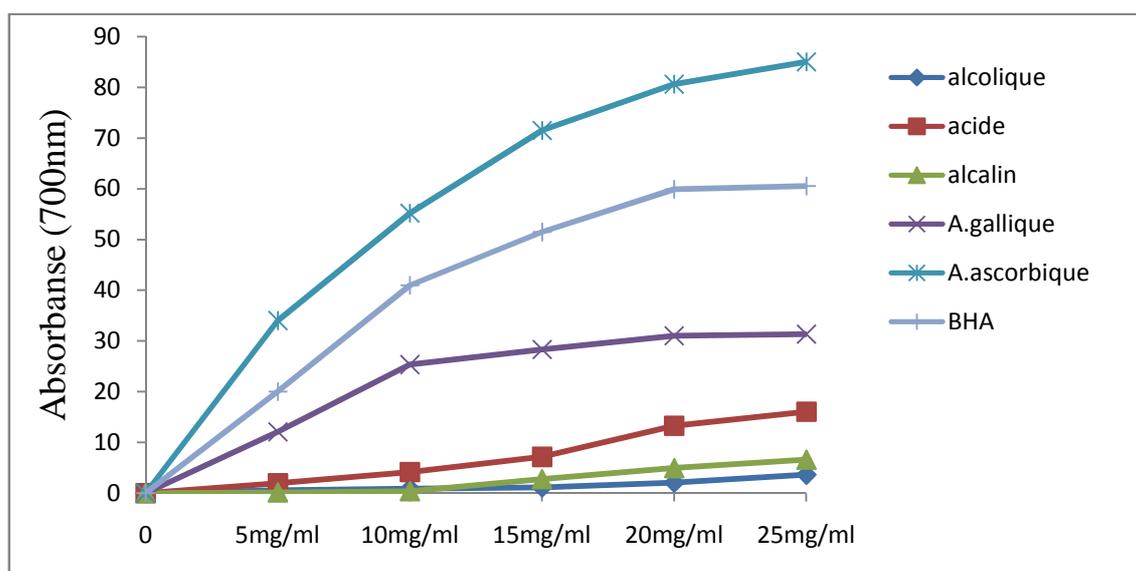
L'acide ascorbique, l'acide gallique et la BHA ont révélés des capacités réductrices plus importantes que les extraits (Figure 6).

L'analyse statistique indique que les pouvoirs réducteurs obtenus présentent des différences significatives selon l'extrait utilisé et la concentration en alcaloïdes dans chaque extrait ( $p < 0,05$ ).

L'extrait méthanolique acidifié présente le meilleur pouvoir réducteur avec une absorbance de 8,49 par rapport aux autres extraits chloroformique basifié et éthanolique qui ne présentent pas une différence significative, avec des absorbances de 2,95 et 1,63 respectivement.

En augmentant la concentration en alcaloïdes la capacité réductrice des extraits testés augmente d'une manière significative ( $p < 0,05$ ).

En testant des concentrations en alcaloïdes allant de 5 à 25mg/ml, des pouvoirs réducteurs varient entre 19,70 et 20,89 pour l'extrait méthanolique acidifié, entre 9,40 et 14,17 pour l'extrait chloroformique basifié et entre 5,62 et 13,13 pour l'extrait éthanolique ont été obtenus.



**Figure 6 :** Pouvoir réducteur en fonction des solvants testés et des concentrations en alcaloïdes de *Matricaria pubescens*.

### III.2. Activité scavenger du radical DPPH

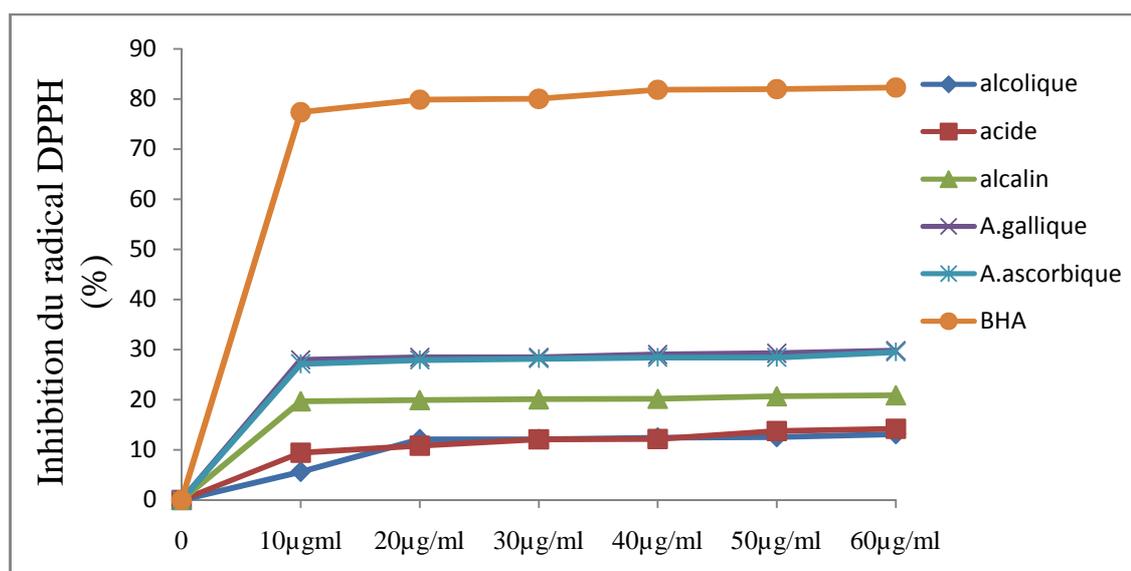
Le test de DPPH est l'un des tests les plus utilisés pour déterminer l'activité antiradicalaire des extraits des plantes (Laguerre *et al.*, 2007).

L'activité antioxydante des différents extraits de *Matricaria pubescens* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm. L'intensité de la couleur jaune reflète la capacité antiradicalaire de la molécule, et dépend de la nature, la concentration et de la puissance de cette molécule.

Les résultats de l'activité scavenger du radical DPPH des standards et des extraits de *Matricaria pubescens* à des concentrations en alcaloïdes de (10, 20, 30, 40, 50 et 60 µg/ml) sont représentés dans la figure 7.

L'analyse des résultats permis de constater que tous les extraits présentent une activité antiradicalaire (DPPH) inférieure à celle exprimée par les standards testés (l'acide gallique, l'acide ascorbique et la BHA).

Les études statistiques montrent que l'activité antiradicalaire (DPPH) des extraits de la matricaire varie significativement selon le solvant utilisé ( $p < 0,05$ ); en effet l'extrait chloroformique basifié présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé (20,26%). Cependant aucune différence significative n'a été observée entre les activités antiradicalaires de l'extrait méthanolique acidifié et de l'extrait éthanolique qui présentent des pourcentages d'inhibitions de 12,06% et 11,33% respectivement.



**Figure 7 :** Activité scavenger du radical DPPH en fonction des solvants testés et des concentrations en alcaloïdes de *Matricaria pubescens*.

L'activité antiradicalaire des extraits augmente en fonction de la concentration en alcaloïdes. Cependant dans une gamme de concentrations allant de 10 $\mu$ g à 60 $\mu$ g/ml, l'activité scavenger du DPPH varie de 19,70% à 20,70% pour l'extrait de chloroforme basifié, de 9,40% à 14,18% pour l'extrait méthanolique acidifié et de 5,37% à 13,13% pour l'extrait éthanolique.

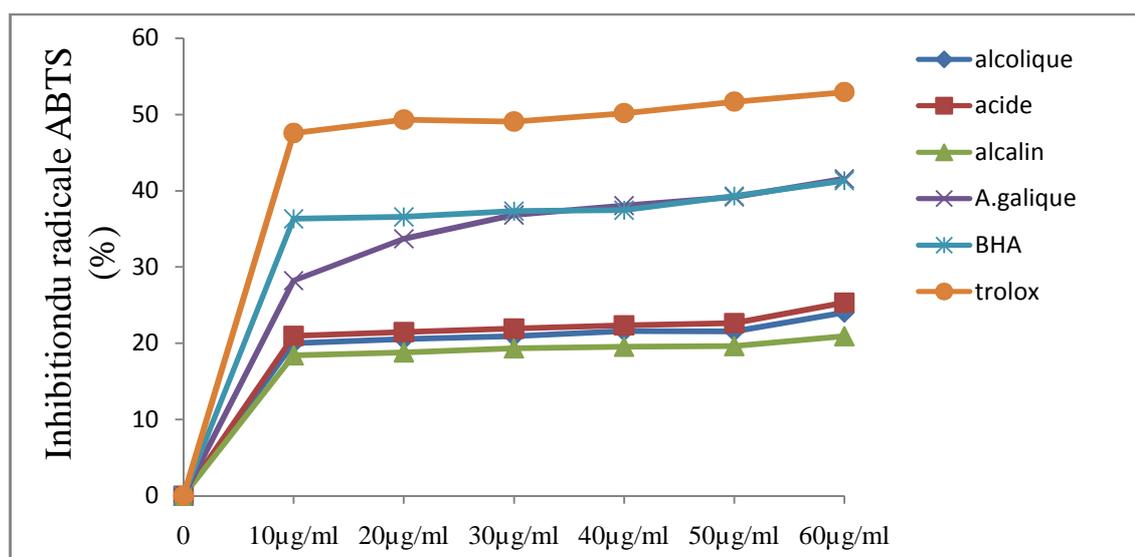
Ces résultats sont inférieurs à ceux de Maiza-Benabdesslam *et al.* (2007) qui ont obtenu un pourcentage d'inhibition de 45.6% pour *Fumaria capréolata* et 86% pour *Fumaria bastardi*.

### III.3. Activité scavenger du radical ABTS

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS<sup>+</sup>, obtenu à partir de l'acide 2,2-azobis-ethylbenzothiazoline-6-sulphonique (ABTS) (Marc *et al.*, 2004). Le radical ABTS<sup>+</sup> se traduit par une coloration bleu-vert en le transformant en ABTS<sup>+</sup> incolore en présence de proton issu d'un antioxydant (Re *et al.*, 1999 ; Diamanti, 2008).

Les résultats de l'activité antioxydante des extraits de *Matricaria pubescens* et des standards vis-à-vis du radical ABTS sont représentés dans la figure 8.

Tous les extraits de la matricaire présentent une activité antiradicalaire (ABTS) inférieure à celle exprimée par le trolox, la BHA et l'acide gallique.



**Figure 8 :** Activité scavenger de radical ABTS en fonction des solvants testés et des concentrations en alcaloïdes de *Matricaria pubescens*.

L'étude statistique montre qu'il existe une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les trois extraits testés, cependant l'extrait méthanolique acidifié présente l'activité antiradicalaire (ABTS) la plus élevée avec un pourcentage d'inhibition de 22,44%, quant aux extraits éthanolique et chloroformique basifié présentent des valeurs moindres, 21,44% et 19,43% respectivement.

Le pourcentage d'inhibition du radical ABTS par les extraits de la matricaria varie proportionnellement avec la concentration des extraits en alcaloïdes.

Les résultats de l'étude statistique montrent que l'extrait méthanolique acidifié, l'extrait éthanolique (soxhlet) et l'extrait chloroformique basifié, à une concentration de 10 $\mu$ g/ml, exercent des activités de 20.96, 20.01 et 18.41 %, respectivement ; cette activité reste stable entre la concentration 10 et 50 $\mu$ g/ml et atteint à 60 $\mu$ g/ml des pourcentages de 25.31, 24.02 20.91% pour l'extrait méthanolique acidifié, l'extrait éthanolique (soxhlet) et pour l'extrait chloroformique basifié, respectivement.

#### **III.4. Test de blanchiment du $\beta$ -carotène**

Dans ce test l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, suite à l'abstraction des atomes d'hydrogènes à partir de groupements méthylènes diallyliques de l'acide linoléique. Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le  $\beta$ -carotène hautement insaturé entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie spectrophotométriquement à 470 nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchiment du  $\beta$ -carotène.

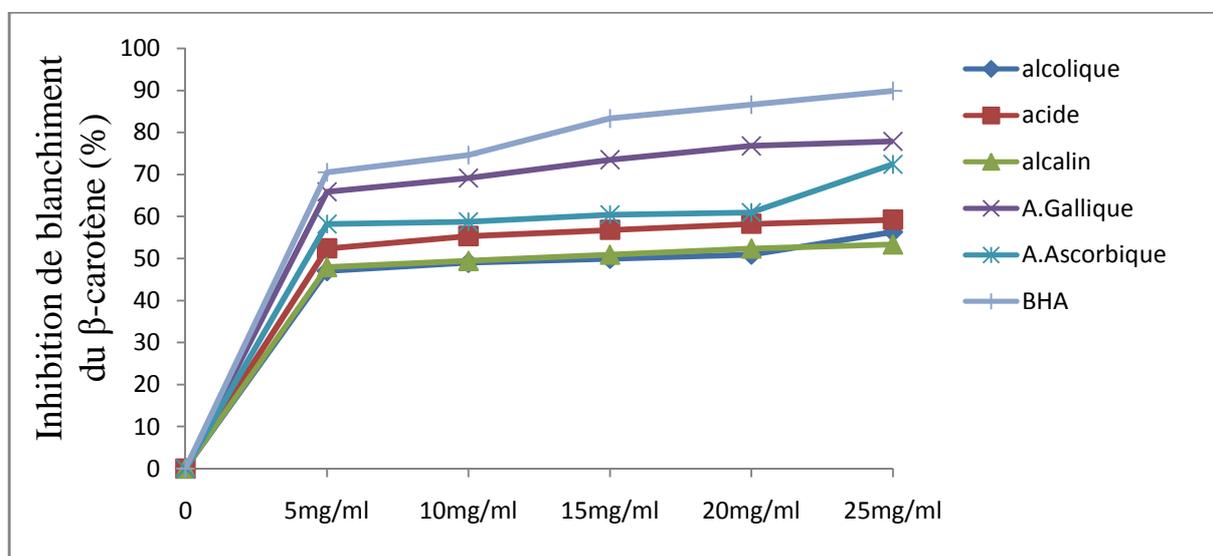
La cinétique de pourcentage d'inhibition de blanchiment du  $\beta$ -carotène en présence des extraits de *Matricaria pubescens*, et des antioxydants standards est représentée dans la figure 9.

L'analyse des résultats indique que tous les standards et les extraits testés inhibent l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du  $\beta$  carotène ; l'extrait méthanolique acidifié montre la plus grande activité inhibitrice avec un pourcentage de 56,38% en comparaison avec les extraits éthanolique (soxhlet) et chloroformique

basifié. Etant donné qu'il n'existe pas une différence significative entre ces deux derniers extraits. Cette activité reste significativement inférieure à celle du BHA, acide gallique et ascorbique qui sont utilisés comme contrôles positifs.

Le pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante par le système  $\beta$ -carotène/ acide linoléique est proportionnel à la concentration des extraits, allant d'un pourcentage de 47,98% pour une concentration de 5mg/ml à un pourcentage de 53,35% pour une concentration de 20mg/ml. Cependant pour les concentrations de 10, 15 et 20mg/ml aucune différence significative n'a été observée entre les activités antioxydantes.

L'ordre des extraits testés et des standards en terme d'activité antioxydante relative est résumé comme suit : BHA > acide gallique > acide ascorbique > extrait méthanolique acidifié > extrait chloroformique basifié = extrait éthanolique. D'après ces résultats c'est l'extrait méthanolique acidifié qui a présenté la meilleure activité inhibitrice, ça pourrait être du à sa teneur la plus élevée en alcaloïdes.



**Figure 9 :** Pourcentages d'inhibition de l'oxydation du  $\beta$ -carotène en fonction des solvants testés et des concentrations en alcaloïdes de *Matricaria pubescens*.

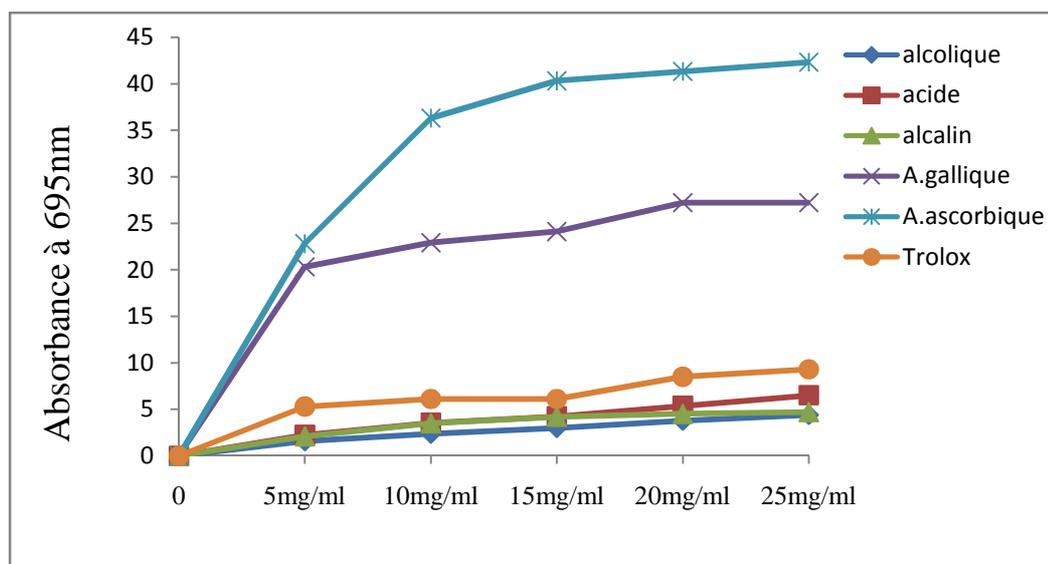
### III.5. Evaluation de l'activité antioxydante totale

Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate  $\text{MoO}_4^{2-}$  à molybdène Mo (V)  $\text{MoO}_2^+$  en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) à pH acide (Belyagoubi, 2012).

La figure 10 montre que tous les extraits de *Matricaria pubescens* présentent une capacité antioxydante très importante, ces extraits s'avèrent moins actifs en comparaison avec les antioxydants standards.

D'après l'analyse statistique, l'extrait méthanolique acidifié possède la meilleure capacité antioxydante totale, suivi par l'extrait chloroformique basifié. Ce dernier est doté d'une faible capacité antioxydante.

Il est aussi à noter que, l'étude statistique a montré que la capacité antioxydante totale des extraits de la matricaire est significativement ( $p < 0,05$ ) proportionnelle à la concentration des extraits ; plus que la concentration augmente plus la capacité antioxydante s'accroît jusqu'à atteindre à une concentration maximale (25mg/ml) une activité de 6.50, 4.70 et 4,40 % pour les extraits méthanolique acidifié, chloroformique basifié et éthanolique (soxhlet), respectivement.



**Figure 10 :** La capacité antioxydante totale (TAC) en fonction des solvants testés et des concentrations en alcaloïdes de *Matricaria pubescens*.

### III.6. Activité scavenger du radical hydroxyle

In vitro, la capacité à piéger le radical hydroxyle par les extraits des plantes est basée sur la réaction de Fenton ; en mesurant la génération du radical OH<sup>•</sup> et son effet sur l'oxydation et la dégradation des molécules biologiques tels que le désoxyribose de l'ADN. Dans cette technique le système implique l'auto-oxydation du complexe Fe<sup>2+</sup>-EDTA dans un milieu aqueux pour former O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, qui est rapidement dismuté en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à pH 7,4. Ce dernier interagit avec Fe<sup>2+</sup> pour former les radicaux OH<sup>•</sup> en présence de l'acide ascorbique comme catalyseur (Belyagoubi, 2012).



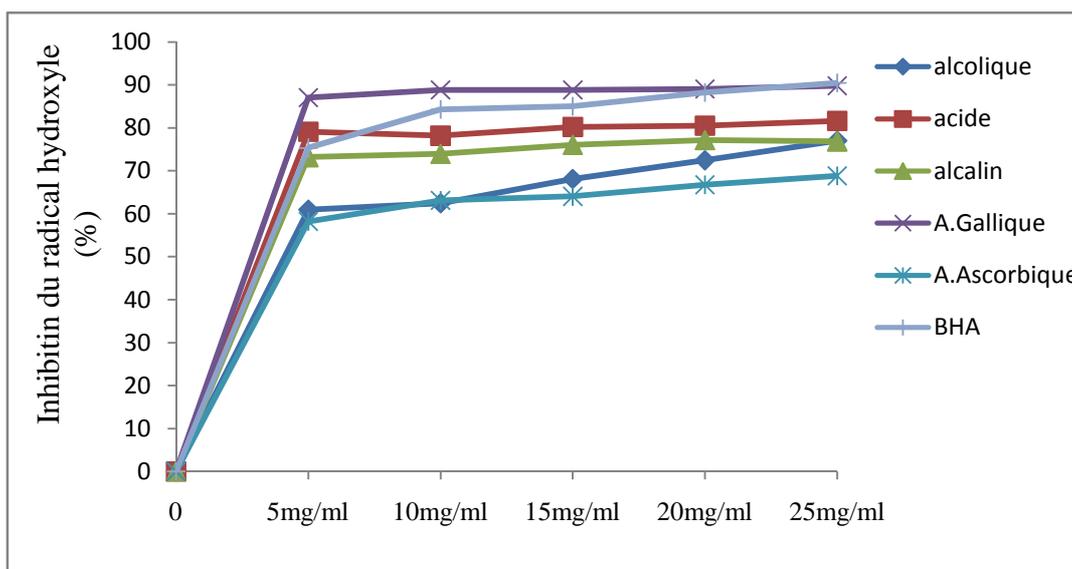
La dégradation du désoxyribose par OH<sup>•</sup> dégage certains produits estimés en malonalaldéhyde (MDA), d'un chromogène rose lors du chauffage avec l'acide thiobarbiturique et dans un milieu acide. La présence des anti-radicaux protège et diminue la production des MDA (Halliwell *et al.*, 1987). Notant que, le rôle d'ascorbate est la réduction du Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup>, cela provoque la réaction de Fenton ;



Les pourcentages d'inhibition de l'oxydation du désoxyribose induits par le radical hydroxyle sont représentés dans la figure 11.

Les extraits de *Matricaria pubescens* possèdent une importante activité à piéger le radical hydroxyle ; l'extrait méthanolique acidifié se trouve en première position avec un pourcentage de 79,92%, suivi par l'extrait chloroformique basifié (75,42%), puis l'extrait éthanolique avec une faible activité (68,16%), cette dernière reste supérieure à celle montrée par l'acide ascorbique qui est connu comme un antioxydant très fort.

L'analyse des résultats montre que, à une concentration de 5mg/ml un pourcentage de piégeage de radicaux hydroxyle est supérieur à 50% pour les trois extraits, cette activité demeure presque constante au fur et à mesure que la concentration augmente.



**Figure 11:** Activité scavenger du radical hydroxyle en fonction des solvants testés et des concentrations en alcaloïdes de *Matricaria pubescens*.

Ces résultats affirment que les extraits des alcaloïdes de la matricaire sont de bons piègeurs des radicaux hydroxyles permettant ainsi la protection de l'ADN, donc une prévention des dommages cellulaires est assurée.

Donc d'après toutes les activités testées et les résultats obtenu, on aurait pu dire que la variation dans l'activité antioxydante pourrait être due à la quantité et /ou à la nature des substances antioxydantes présentes dans les extraits de la matricaire.

## Conclusion

Le présent travail a été consacré à l'étude de la teneur en alcaloïdes d'une plante médicinale de la flore du Sahara algérien « *Matricaria pubescens* » en utilisant plusieurs protocoles avec différents solvants d'extraction, et la détermination de leur activités antioxydantes.

Dans un premier temps, l'analyse phytochimique des extraits de «*Matricaria pubescens*», a mis en évidence la présence des alcaloïdes.

Le rendement en alcaloïdes totaux diffère selon le type d'extraction, le pH et la nature du solvant utilisé. L'extrait méthanolique acidifié est le plus riche en alcaloïdes totaux, en revanche la plus faible teneur est obtenue avec l'extrait chloroformique basifié.

Les résultats du pouvoir réducteur montre que l'extrait méthanolique acidifié est un bon donneur des électrons, il a réduit le maximum du fer ferrique du complexe ferricyanure-Fe<sup>3+</sup> (FeCl<sub>3</sub>) en fer ferreux (FeCl<sub>2</sub>).

L'activité scavenger des extraits de plante déterminée par les tests d'ABTS et de DPPH présente une différence assez importante, dont la meilleure activité anti radicalaire est exprimée par l'extrait chloroformique basifié pour le test de DPPH.

Les résultats de l'activité inhibitrice de l'oxydation de  $\beta$ -carotène, montrent que les extraits de *Matricaria pubescens* sont actifs même à des faibles concentrations.

La meilleure activité antioxydante totale des alcaloïdes de la matricaire a été présentée par l'extrait méthanolique acidifié, cette capacité augment au fur et a mesure que la concentration de l'extrait augmente.

Les extraits méthanolique acidifié, chloroformique basifié, et éthanologique (soxhlet) ont piégé le radical hydroxyle avec des pourcentages élevés.

L'étude statistique a révélée que le potentiel antioxydant des extraits de *Matricaria pubescens* est significativement ( $p < 0,05$ ) proportionnel à la concentration en alcaloïdes.

Les résultats de la présente étude montrent que la plante «*Matricaria pubescens*», pourrait être considérée comme une source d'antioxydants naturels pour des fins médicinaux.

En fin, l'ensemble de ces résultats obtenus in vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances biologiquement active. Des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidence. Pour cela nous envisageons d'identifier les alcaloïdes présents dans «*Matricaria pubescens*» et de tester d'autres activités telles que l'activité antibactérienne et anti-inflammatoire des alcaloïdes isolés de «*Matricaria pubescens*» et l'utilisation de ces composés dans des domaines thérapeutiques plus larges.

## Références bibliographiques

- Arabshahi-Delouee S., Urooj A. (2007). Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica L.*) leaves. Food Chemistry .102: 1233–1240.
- Attou A. (2011). Contribution a l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (fidjel) de la région de ain timouchent. Thèse de doctorat. Université Aboubakr Belkaid Tlemcen .70p
- Badiaga M. (2011). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologique de *Nauclea latifolia smith* une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de doctorat. P : 20-22.
- Belyagoubi N. (2012). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse de doctorat. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen.
- Bartosz G. (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems; Comments on Toxicology. 9, p: 5-21.
- Berger M.M. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. Nutrition *Clinique et Métabolisme*. 20; p : 48 – 53.
- Biesalski H.K., Böhles H., Esterbauer H., Fürst P., Gey F., Hundsdörfer G. (1997). Antioxidant vitamins in prevention. Consensus statement. Clinical Nutrition. 16 ; p : 151 – 5.
- Bonnefont-rousselot D. (2003). Radicaux libres et antioxydants ; Ed: Medicine-Sciences. Flammarion (Paris) ; p: 59-81.
- Boudjerda A. (2011). Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires de *Achillea ligustica* (Anthemideae) et *Ranunculus cortusifolius* (Ranunculaceae). Thèse de Doctorat. Université Mentouri- Constantine. P: 9.
- Bouzouita N., Kachouri F., Ben Halima M. & Chaabouni M.M. (2008). Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. Journal de la Société Chimique de Tunisie. 10 : 119-125.

- Bruneton J. (1999). Terpènes et stéroïdes. In pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème Edition : Lavoisier. pp : 484-535.
- Diamante J. (2008). Comparaison of analytical methodologies for the evaluation verifies la refof nutraceutical parameters in strawberries fruits. *STSM*, P: 4.
- Facchini P.J. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, Cell Biology, Molecular Regulation, and Metabolic Engineering Applications, Alberta, Annu. Rev. Plant Physiol. *Plant Mol. Biol*, 52: 29–66.
- Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. 108–115.
- Flora S.J.S. (2009). Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxi Med Cel Long*. 2: (4) 191 – 206.
- Grisvard et chaudin. (1964). *Le bon jardinier*. Éd: la maison rustique. pp : 291-294.
- Guignard J L, Cossen L, Henry M, (1985). *Abrégé de phytochimie*, édition Masson, Paris
- Guiraud J.P.(2003). *Microbiologie alimentaire*. Édition DUNOD Paris France. pp 431,652.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Arnoma O.L. (1987). The deoxyribose method: A simple test tube assay for the determination of rate constant for reaction of hydroxyl radical. *Anal Biochem*.165: 215-219.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. (1991). The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 280: 1 – 8.
- Halliwell B, Gutteridge J.M.C. (2006). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Oxford: Clarendon Press.
- Hanifi N. (1991). Importance des ressources phytogénétiques et leur utilisation en Algérie. In *conservation des ressources végétales*. Publication d'Actes Editions, p47-49.

- Hammiche V., Maiza K. (2006). Traditional medicine in Central Sahara : Pharmacopoeia of tassili N'ajjer. *Journal Ethnopharmacology*. 105.358-367
- Harborne J.B. (1998). *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. (3rd Ed.) London: Chapman & Hall. ISBN: 0-412-57270-2, 302p.
- Hurabielle M., Paris M. (1980). *Abrégé de matière médicale pharmacognosie : Généralités-Monographie (1<sup>ère</sup> partie)*. Edition Masson. Paris. P : 3497 :256.
- Ir greet V. (2004). *Radicaux libres et antioxydants : principes de base*  
Symposium « Antioxydants et alimentation » Institut Danone. Departement nutrition, ku leuven et departement dietetique, uz gasthuisberg. P:1-2.
- IUCN (International Union for Nature and Natural Ressources), Centre for Mediterranean Cooperation). (2005). *A guide to medicinal plants in North Africa*, Ed: IUCN Centre for Mediterranean Cooperation Malaga (Spain). 6:7.
- Jadot G. (1994). *Antioxydants et Vieillessement*; Ed: JOHN LIBBEY EUROTTEXT PARIS; p: 33-36.
- Judd Walter S., Campbell Christopher S., Kellogg Elizabeth A., Stevens Peter. (2002). *Botanique Systématique, une perspective phylogénétique*. Edition De Boeck Université ,84-87 ,396-399
- Kalam S., Singh R., Mani A., Patel J., Naem K.F., Pandey A. (2012). *Antioxidants: elixir of life*. *International Multidisciplinary Research Journal*, 1: 18-34.
- Kim D.O., Seung W. J., Lee C.Y. (2003). *Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums*. *Food Chemistry*. 81.p: 321–326.
- Kohen R., Nyska A. (2002). *Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants redox reactions and methods for their quantification*; *Toxicological Pathology*. 30; p: 620-650.
- Laguerre M., Lopez-Giraldo L., Lecomte J., Pina M., Villeneuve P. (2007). *Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante*. *Oxford College of London*, 14(5) : 278-292.

- Lehucher-michel M.P. (2001). Stress Oxydant et Pathologies Humaines ; La Presse Médicale. 30 ; p: 1076-1081.
- Libman A., Bouamanivong S., Southavong B., Sydara K., Soejarto D. (2005). Medicinal plants: An important asset to healthcaie in a region of central Laos. Journal of Ethropharmacology.4128:1-9.
- Maiza K., Brac de la Perrière E.A., Hammiche V. (1993). Pharmacopée traditionnelle saharienne : Sahara septentrional. Médicaments et Aliments : L'Approche Ethnopharmacologique. Pp : 169-171.
- Maiza K., Hammiche V., Maiza-Benabdesselam F. (2011). Traditional medicine in North Sahara "the Deffi". Life Sciences Leaf lets.16:551-560.
- Maiza-Benabdesselam, F; Khentache, S; Bougoffa, K; Chibane, M; Adach, S; Chapeleur, Y; Max, H et Laurain-Mattar, D. (2007). Antioxidant activities of alkaloid extracts of two Algerian species of Fumaria: *Fumaria capreolata* and *Fumaria bastardii*. Records of Natural Products.1: 2-35.
- Makhloufi A. (2009). Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar(*matricaria pubescens* (desf.) et *rosmarinus officinalis l*) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. thèse de doctorat d'état en biologie, spécialité : microbiologie et sécurité sanitaire des aliments, universite Aboubaker belkaid faculté des sciences laboratoire produits naturels. P 13-14.
- Makhloufi A., Moussaoui A., Lazouni,H. (2012). Anti-bacterial activity of essential oil and crude extracts from *Matricaria pubescens* (desff grouiny wild in Bechar,south west of algeria . journal of medicinal plants research :3124-3128.
- Makkar H., Siddhuraju P., Becker K. (2007). Plant secondary metabolites. New Jersey: Humana Press; 2007.
- Maldonado M. (2012). *Peumus boldus* M. De la botanique à la thérapeutique. thèse présentée pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie diplôme d'état. université joseph fourier, faculté de pharmacie de grenoble. P 16-19.

- Marc F., Davin A., Deglène-Benbrahim L., Ferrand D., Baccaunaud M., Fritsch P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Medecine/Sciences*, **20**: 63-458.
- Matés J.M. (1999). Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry*, 38: 595-603.
- Mezache N. (2010). Détermination structural et évaluation biologique des substances naturelles de quelques espèces de la famille asteraceae : *Senecio giganteus* Desf. et *Chrysanthemum myconis* L. thèse de doctorat en sciences et en chimie organique. Université Mentouri, constantine.P 4.
- Mezouar D. (2013). Recherche d'activités biologiques de *Berberis vulgaris*. Mémoire de magister. Université Abou Bekr Belkaïd –Tlemcen. P : 31-35.
- Muniz M.N. (2006). Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine. Thèse de Doctorat. Université Joseph Fourier, Grenoble I. P: 11-29.
- Ozenda P, 2004. Flore et végétation du Sahara. Troisième édition. CNRS édition.750005 Paris, 92 :438-662.
- Passwater R.A. (1997). The Antioxidant; Ed: Keats good health guide; p: 7-11.
- Pham-Huy L.A., He H., Pham-Huy C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Medecine*, 4; p: 89-96.
- Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J.O. (1999). Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer Vaisseaux, Cœur, Poumons. Vol 4 - N°4.
- Priet P., Pineda M., Aguilar M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*. 269; p: 337–341.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggebnate, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999).Antioxydant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Science Inc*, 26:1231-1237.
- Scotti M.T., Emerenciano V., Ferrena MJP., Scotti L., Stefani R., Dasilva M.S., Mendoça junior F.J.B. (2012). Self organizing maps of molecular descriptors for

sesquiterpene lactones and their application to the chemotaxonomy of the asteraceae family. *Molecules*: 17: 4684-4702.

- Seghiri, R. (2009). Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires du Genre *Centaurea* : *C africana*, *C nicaensis*. Thèse de Doctorat. Université de Mentouri – Constantine. P : 17.
- Shakil, A. (1998). Isolation and structural elucidation of chemical constituents from *Fumaria indica*, *Ferula oopoda* and *Withania somnifera*. These de doctorat. Université de Karachi. P: 10-40.
- Sun T., Ho C.H. (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry*. 90 ; p : 743-749.
- Tähtiharju S., Rijpkema A.S., Vetterli A., Albert V.A., Teeri T.H., Elomaa, P. (2012). Evolution and Diversification of the CYC/TB1 Gene Family in Asteraceae. A Comparative Study in *Gerbera* (Mutisieae) and *Sunflower* (Heliantheae). *The Journal of Molecular Biology*. vol(4):1155-1166.
- Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M. Et Polissiou M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*. 90 :333–340.
- Touafek, O. (2010). Etude Phytochimique De Plantes Médicinales Du Nord Et Du Sud Algériens. Thèse de Doctorat. Université de Mentouri-Constantine. P : 23.
- Valko M., Leibfritz D., Moncola J., Cronin M.T.D., Mazura M. Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39. 44 - 84.

# *Annexes*

# *Annexes*

## **Annexe n° 1 : Produits et matériel utilisés**

### **❖ Appareillage**

- Agitateur
- Bain Marie
- Balance de précision
- Balance analytique
- Barreaux magnétiques
- Broyeur électrique
- Etuve
- Micropipette
- pH mètre
- Spectrophotomètre UV visible
- Tamiseur
- Verrerie de laboratoire (bêcher, éprouvette, pipette à graduations,...)
- Vortex

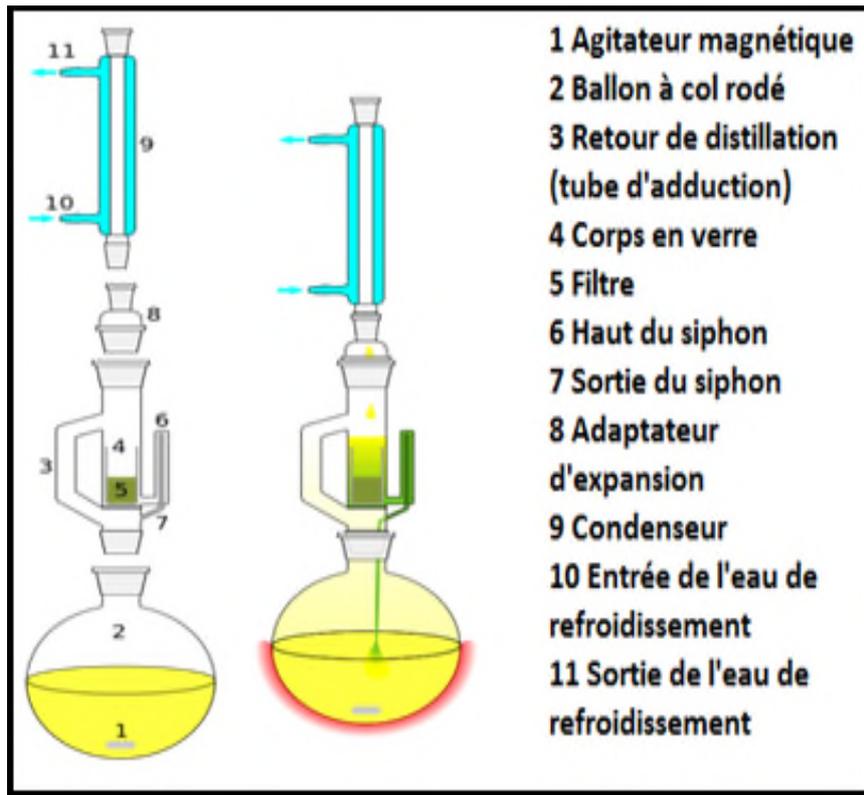
### **❖ Produits Chimiques**

- Acide ascorbique
- Acide acétique
- Acide Chlorhydrique
- Acide Gallique
- Acide linoléique
- Acide sulfurique
- Acide thiobarbutirique
- Acide trichloracétique
- ABTS
- Ammoniac
- BHA

- Chloroforme
- Chlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub>)
- Désoxyribose
- Dichlorométhane
- DMSO
- DPPH
- Eau distillée
- Eau oxygéné
- EDTA
- Ethanol à 96%
- Ether de pétrole
- Ferricyanure de potassium
- Hexane
- Méthanol
- Molybdate d'ammonium
- Persulfate de potasium
- phosphate de sodium
- Trolox
- Tween 20
- $\beta$ -carotène

## **Annexe n°2 : Fonctionnement d'un appareillage soxhlet**

Un ensemble soxhlet (figure1) est constitué d'un ballon monocle, d'un réfrigérant et d'un extracteur. Ce dernier présente un système de tube permettant la vidange du réservoir dont le volume varie d'un modèle à l'autre. Le système doit être complété à l'aide d'une cartouche en cellulose, placée dans le réservoir, destinée à recevoir le composé à extraire.



**Figure1** : Présentation schématique d'un appareillage soxhlet

# Glossaire

## A

- ✚ **Acides nucléiques** : Terme désignant une substance constituée d'un enchainement linéaire de nucléotides. Il existe deux grandes catégories à l'état naturel, les acides désoxyribonucléiques (ADN) et les acides ribonucléiques (ARN).
- ✚ **Analgésiques** : Substance qui supprime ou atténue la douleur.
- ✚ **Angiospermes** : Plante dont les graines sont enfermées dans un ovaire clos et portent généralement des fleurs typiques. Elles forment un sous-branchement, s'opposant aux gymnospermes.).
- ✚ **Antibactériennes** : Substance active contre les bactéries.
- ✚ **Antifibrillants** : Se dit d'un médicament qui s'oppose à la fibrillation du myocarde.
- ✚ **Antifongiques** : Tirent leur nom du latin *fungus* qui signifie champignons. Ce sont donc des médicaments capables de traiter les mycoses, c'est-à-dire les infections provoquées par des champignons microscopiques.
- ✚ **Anti-inflammatoires** : Médicament utilisé dans le traitement local de l'inflammation ou le traitement général des maladies inflammatoires.
- ✚ **Antipaludiques** : Fait référence à un médicament, un traitement, une méthode ou tout autre moyen utilisé dans la lutte, la limitation et l'éradication du paludisme.
- ✚ **Antitussive** : Un médicament ou préparations qui calme la toux.
- ✚ **Antiviraux** : Médicament destiné à agir contre la multiplication d'un virus. Il est donc administré en cas d'infection virale.
- ✚ **Apoptose** : Correspond à un suicide cellulaire, ou mort cellulaire programmée (selon un programme génétique établi).
- ✚ **Ascorbates réductases** : Enzyme catalysant des actions d'oxydoréduction.
- ✚ **Asters** : Forme étoilée des fleurs.

## C

- ✚ **Calculs biliaires** : Sont de petit cailloux qui se forment dans les voies biliaires à partir de pigments biliaires cristallisés et de sels de calcul. Ils peuvent provoquer

une jaunisse, des douleurs abdominales droites et une obstruction/inflammation de la vésicule biliaire.

- ✚ **Camomille** : La camomille romaine est une plante herbacée vivace de la famille des Astéracées. On la trouve partout en Europe occidentale dans les sols secs et sablonneux riches en silice la plante est employée en usage culinaire, médicinal (particulièrement en tisane), et cosmétique.
- ✚ **Capitule** : Le capitule est un type d'inflorescence. Cette inflorescence caractérise la famille des Asteraceae
- ✚ **Céruloplasmine** : Une protéine de transport du cuivre dans le sang, d'origine hépatique (fabriquée par le foie) et appartenant à un groupe de protéines appelées alpha 2 globulines et elle favorise l'oxydation.
- ✚ **Chélation** : La chélation est un processus physico-chimique au cours duquel est formé un complexe, le chélate, entre un ligand, dit chélateur (ou chélatant), et un cation métallique, alors complexé, dit chélaté.
- ✚ **Chicorée** : Les Chicorées sont des plantes de la famille des Astéracées (composées) appartenant au genre *Cichorium*, cultivées soit pour leurs feuilles (salades, endives), soit pour leurs racines (succédané de café)
- ✚ **Contraintes stériques** : En chimie, on parle d'encombrement stérique lorsque le volume occupé par une partie d'une molécule gêne l'approche d'un réactif ou d'une autre partie de la molécule.
- ✚ **Curarisants** : Se dit d'une substance naturelle ou de synthèse dont l'effet est semblable à celui du curare et qui est employée au cours des anesthésies pour relâcher les muscles.

## D

- ✚ **Dahlia** : Le genre *Dahlia* regroupe des plantes tubéreuses de la famille des Astéracées elle est originaire des régions des régions chaudes du Mexique, d'Amérique centrale ainsi que de la Colombie.
- ✚ **Décoction** : La décoction est une méthode d'extraction des principes actifs et/ou des arômes d'une préparation généralement végétale par dissolution dans l'eau bouillante.
- ✚ **Dicotylédones** : Plante angiosperme dont la graine possède deux cotylédons, généralement égaux.
- ✚ **Diurétique** : Une substance diurétique est une molécule qui augmente la production d'urine. Les diurétiques sont utilisés en médecine pour augmenter l'excrétion de l'eau par le rein. Ils sont préconisés essentiellement en cas d'hypertension artérielle, d'insuffisance cardiaque ou de pathologies rénales.

- ✚ **Dysménorrhée** : Terme utilisé pour parler de règles douloureuses. Elle s'accompagne parfois d'autres symptômes (mal de tête, vomissement, diarrhée...).

## E

- ✚ **Endémique** : Se dit des espèces vivantes propres à un territoire bien délimité.
- ✚ **Extraction** : L'extraction est une technique de séparation.

## G

- ✚ **Gaillardes** : Se dit des plantes vivaces décoratives.

## H

- ✚ **Herbacées** : Se dit d'une plante non ligneuse, dont le cycle de vie dure généralement un an.
- ✚ **Hétéroatome** : Un hétéroatome est un atome d'une molécule organique possédant au moins un doublet d'électrons, mais qui n'est ni du carbone, ni de l'hydrogène et non métallique. Les plus fréquents sont l'oxygène, l'azote, le soufre, le phosphore ou encore les halogènes.
- ✚ **Hétérocyclique** : Les hétérocycles forment une classe de composés organiques comportant un cycle constitué d'atomes d'au moins deux éléments différents. Il s'agit généralement de carbone et d'un hétéroatome comme l'oxygène, l'azote, le phosphore, le soufre.

## I

- ✚ **In vivo** : Se dit des réactions chimiques, physiques ou des interventions pratiquées sur l'être vivant, soit à titre d'expérimentation ou de recherche, soit dans un dessein diagnostique ou thérapeutique.

## L

- ✚ **Latex** : Liquide laiteux ou sève exsudé par les tiges, les feuilles ou d'autres organes coupés.
- ✚ **Lyses** : Destruction d'un élément organique.

## M

- ✚ **Maladies plurifactorielles** : Une maladie est dite multifactorielle quand son apparition renvoie à divers facteurs génétiques et environnementaux.
- ✚ **Maléate** : Ester de l'acide maléique.

- ✚ **Métabolites secondaires** : Un métabolite secondaire est une molécule qui, par exclusion, n'appartient pas au métabolisme primaire. Ce dernier est indispensable à la nutrition, il assure la croissance, le développement d'un organisme. Les métabolites primaires rassemblent les acides aminés, les lipides, les sucres ou les acides nucléiques, par exemple.
- ✚ **Molécules bioactives** : Molécules qui possèdent des propriétés biologiques ou des substances biologiquement actives dans un but curatif ou préventif.

## N

- ✚ **Narcotique** : Un narcotique est une substance chimique capable d'induire, chez l'homme et chez l'animal, un état proche du sommeil. C'est un groupe de dépresseurs, dérivés de l'opium ou chimiquement apparentés à ses composants, ils sont parfois désignés sous le terme de morphinique.
- ✚ **Nécrose** : La nécrose est une forme de dégât cellulaire qui mène à la mort prématurée et non programmée des cellules dans le tissu vivant.
- ✚ **Névralgie** : Douleur vive sur le chemin d'un nerf, synonyme de sciatique.
- ✚ **Nitrates** : Les nitrates sont les sels de l'acide nitrique. La formule chimique de l'ion nitrate est  $\text{NO}_3^-$
- ✚ **Nomades** : Se dit des peuples, des sociétés dont le mode de vie comporte des déplacements continuels.

## O

- ✚ **Oléum** : Acide sulfurique fumant, résulte de l'addition de trioxyde de soufre  $\text{SO}_3$  dans de l'acide sulfurique  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Le mélange qui en résulte présente un aspect huileux, d'où son nom directement issu du latin *oleum*. On décrit généralement les oléums par les formules  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- ✚ **Opium** : Une préparation obtenue à partir du latex du pavot somnifère. Ses effets provoquent notamment une somnolence chez le consommateur.
- ✚ **Otites** : Sont des inflammations de peau ou de muqueuse de l'oreille.
- ✚ **Oxydation** : Réaction chimique, souvent provoquée par l'oxygène, par laquelle on retire des électrons à un atome ou à une molécule. (L'opération opposée est la réduction.).

## P

- ✚ **Phanérogames** : Plante qui se reproduit par des fleurs ou des graines.

✚ **pro-oxydatif** : Un pro-oxydant est une substance qui déclenche un stress oxydatif par l'augmentation des radicaux libres, des molécules réactives connues pour endommager les cellules.

✚ **Prophylaxie** : Mesures à prendre pour prévenir une maladie.

## R

✚ **Rudbeckies** : Les Rudbeckies (*Rudbeckia*) sont un genre de plantes herbacées de la famille des Astéracées, appartenant au genre *Rudbeckia*.

## S

✚ **Soluble** : Qui peut être dissous dans un solvant donné.

✚ **Sulfate** : Sel de l'acide sulfurique.

✚ **Sympathomimétique** : Substance chimique, médicamenteuse ou non, qui stimule le système nerveux sympathique.

## T

✚ **Tamasheq** : Langue berbère parlée par les touaregs.

✚ **Tartrates** :

Catégorie des sels issus de la combinaison de l'acide tartrique avec une base

✚ **Tige** : Partie allongée des végétaux qui porte les feuilles, les branches, les bourgeons et les fleurs.

✚ **Topinambour** : Le topinambour (*Helianthus tuberosus* L.), aussi appelé artichaut de Jérusalem, truffe du Canada ou soleil vivace, est une plante vivace de la famille des Astéracées, cultivée comme légume pour ses tubercules riches en inuline. C'est une espèce voisine du tournesol (*Helianthus annuus*) qui appartient au même genre

✚ **Tubulaire** : Qui a la forme d'un tube.



## Résumé

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales de la flore algérienne, on s'est intéressé à l'étude d'une espèce endémique, *Matricaria pubescens*. Le but de cette étude est d'évaluer l'activité antioxydante des alcaloïdes totaux extraits à partir de *Matricaria pubescens*, par six tests différents. L'extraction par solvants a permis l'obtention de cinq extraits, trois seulement ont servi pour l'accomplissement de cette étude, soit l'extrait éthanolique obtenu par le soxhlet avec un rendement de 4,03% estimé être le meilleur, suivi par l'extrait de méthanol acidifié (4,02%), et enfin vient celui de chloroforme basifié (2,69%). Les résultats de l'activité antioxydante des extraits de la matricaire indiquent que l'extrait méthanolique acidifié présente le pouvoir réducteur le plus élevé avec une valeur de 8,49. L'évaluation de l'activité antioxydante par le test de DPPH, a révélée un meilleur pouvoir antioxydant de l'ordre de 20,26% pour l'extrait de chloroforme basifié, cependant la meilleure activité anti radical ABTS a été de l'ordre de 22,44% pour l'extrait de méthanol acidifié; le test de blanchiment de  $\beta$ -carotène révèle que l'extrait méthanolique acidifié montre la plus grande activité inhibitrice avec une valeur de 56,38%, Les extraits de *Matricaria pubescens* possèdent une importante activité à piéger le radical hydroxyle; observée avec l'extrait méthanolique acidifié avec un pourcentage de 79,92%. En augmentant la concentration des extraits le pourcentage d'inhibition augmente et cela pour les six tests de l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits.

**Mots clés:** Alcaloïdes totaux, *Matricaria pubescens*, activité antiradicalaire.

## Summary

As part of the promotion of medicinal plants of the Algerian flora, we became interested in the study of endemic species *Matricaria pubescens*. The purpose of this study is to evaluate the antioxidant activity of total alkaloids extracted from *Matricaria pubescens* by six different tests. Solvent extraction has obtained five extracts, only three were used for the accomplishment of this study, the ethanol extract is obtained by soxhlet with a yield of 4.03% estimated to be the best, followed by extract acidified methanol (4.02%), and finally comes the chloroform basified (2.69%). The results of the antioxidant activity of extracts of *Matricaria pubescens* indicate that the acidified methanol extract has the highest reducing power with a value of 8.49. Evaluation of antioxidant activity by the DPPH test, revealed a better antioxidant of about 20.26% power for chloroform extract basified, however the best anti radical ABTS activity was of the order 22.44% for the extract of acidified methanol; testing of  $\beta$ -carotene bleaching reveals that the acidified methanol extract showed the highest inhibitory activity with a value of 56.38%, Extracts of *Matricaria pubescens* have an important activity to scavenge the hydroxyl radical; observed with the methanol acidified extract with a percentage of 79.92%. By increasing the concentration of the extracts, the percentage inhibition increased and it is the same for the six tests for the evaluation of the antioxidant activity of the extracts.

**Key words:** Total alkaloids, *Matricaria pubescens*, radical scavenging activity.