



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Larbi Tebessi
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie



MEMOIRE DE MASTER

Domain : Science de la matière

Filière : Chimie

Option : Chimie des produits Naturelles

Thème :

*Etude comparative de différentes
méthodes d'extraction de medicago
sativa-L*

Présentés par :

djouad chadia

goussmi ahlem

Devant les jury:

Chrait zin alabidine	MCA	U.TEBESSA	Président
Tebboub Omar	MCB	U.TEBESSA	Rapporteur
Salami Seif Eddine	MCB	U.TEBESSA	Examineur

Année Universitaire 2021/2022

Dédicace

A ma chère et adorable père 'Mohammed' en témoignage de ma grande affection.

A ma chère et adorable mère "Aldjia" en témoignage de ma grande affection.

A ma sœur Fatma, pour leurs soutiens moraux,

A mon frère : Hichem, Omar, Taher

A tous les membres de ma famille surtout Mon oncle Saleh,

*A tous mes amis surtout : Habiba, fulla, ihssen, Aya, maissa, Achouk,
Nesrin*

A mon amie est aussi binôme « Ahlem »

Mes camarades de la promotion 2021-2022

A tous les personnes que j'aime.

Je dédie ce travail.



Chadia

Dédicace

A ma chère et adorable père 'laabidi' en témoignage de ma grande affection. A ma chère et adorable mère "leila" en témoignage de ma grande affection.

A mes sœur dalanda "dieu repose son âme" et ritej, pour leurs soutiens moraux,

A mon frère : iskander, mouhamed, nidhel

A tous les membres de ma famille surtout Mon fiancé bilel,

A tous mes amis surtout : ichraf, rania, abir, bouthayna,

A mon amie est aussi binôme « chadia»

Mes camarades de la promotion 2021-2022

A tous les personnes que j'aime.

Je dédie ce travail.



Ahlem

Remerciement

*Avant tout, nous remercions ALLAH le tout-puissant pour nous avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail. Nous remercions sincèrement notre encadreur : monsieur Omar Tebboub qu'il trouve ici L'expression de notre profonde reconnaissance tout pour nous avoir accordé sa confiance que pour nous avoir guidé dans notre travail tout au long de ce semestre, pour ses conseils et ses commentaires ainsi que pour son bienveillance. Un grand merci à tous nos enseignants, nos professeurs qui nous ont formés, et pour toute la sollicitude qu'elle nous a manifestée, nous lui exprimons toute notre reconnaissance. Nous voudrions exprimer notre gratitude aux professeurs : **Dr Salami Seif Eddine et Dr Chrait Zin alabidine** pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

Un grand merci aux membres de Laboratoire chimie de Tébessa, ainsi que toutes nos amies de la promotion, pour leur aide, leur amitié, leur gentillesse et leur soutien moral.

*Nous tenons également à remercier monsieur **Hazmoune Fichem** pour leur gentillesse et pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.*

Nous remercions le directeur de l'unité de recherche de valorisation de la molécule Constantine (VARENBIOMOL), Qu'il nous permet de finir ce travail. Nous remercions également toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Un grand merci à toutes et à tou

Introduction générale.....	1
<i>Chapitre I : synthèse bibliographique</i>	
I.1. Historique.....	3
I.2. Répartition et origine de <i>Medicago sativa</i> L :.....	4
I.3-Généralités sur la <i>medicago sativa</i> L :.....	5
I.4. Nom scientifique :.....	5
I.5. Description taxonomique :.....	6
I.6. Description botanique :.....	6
I.7. Utilisations de la <i>Medicago sativa</i> L :.....	7
I.8. Les Métabolites secondaire et les méthodes d'extraction :.....	8
I.8.1. Généralité :.....	8
I.8.2. Métabolites primaires :.....	8
I.8.3. Métabolites secondaires :.....	8
I.9. Les poly phénols :.....	9
I.9.1. Définition des poly phénols :.....	9
I.9.2. Classification des poly phénols :.....	10
I.9.2.a Les acides phénoliques :.....	10
I.9.2.b Flavonoïdes :.....	10
I.9.3. Effets biologiques des poly phénols :.....	13
I.9.4. Facteurs de variabilité de la teneur en poly phénols :.....	14
I.9.5. Propriétés biologiques et thérapeutiques des poly phénols :.....	14
I.10. Les tanins :.....	15
I.11. Les terpènes et terpenoïdes :.....	15
I.12. Les Alcaloïdes :.....	16
I.13. Aperçu bibliographique sur les méthodes d'extraction :.....	16
I.13.1. Définition :.....	16
I.13.2. Intérêt de l'extraction :.....	16
I.13.3. Types d'extraction :.....	16
I.14. Méthodes d'extraction classiques :.....	17
I.14.1. Infusion :.....	17
I.14.2. Les avantage :.....	17
I.15. Macération :.....	17
I.15.1. Les avantage :.....	18
I.15.2. Les inconvénients :.....	19
I.16. Extraction par hydrodistillation :.....	19
I.16.1. Avantages et inconvénients :.....	20
I.17. Extraction par Soxhlet :.....	21
I.17.1. Les avantage :.....	22

I.17.2. Les inconvénients :	22
I.17.3. Effet des paramètres opératoires :	22
I.18. Méthodes alternatives :	24
I.19. Extraction assistée aux ultrasons :	24
I.19.1 Les avantage:	25
I.19.2 Les inconvénients :	26

Chapitre II: Matériels & Méthodes

II.1. Matériels et méthodes :	29
II.2. Matière végétal	29
II.3. Extraction de <i>Medicago sativa</i> L :	29
II.3.1. Extraction par macération :	29
II.3.1.a. Matière fraîche :	30
II.3.1.b. Matière sèche :	30
II.3.2.Extraction par infusion :	31
II.3.2.a. Extraction par infusion dans le solvant eau :	31
II.3.2.b. Extraction par infusion dans le solvant éthanol :	31
II.3.3. Extraction par soxhlet :	31
II.3.3.a. Matière sèche :	31
II.3.4. Extraction par ultrason :	32
II.3.4.a. Extraction par ultrason dans le solvant eau :	32
II.3.4.b. Extraction par ultrason dans le solvant éthanol :	32
II.3.5. Extraction par hydro distillation :	33
II.3.5.a. Matière sèche :	34
II.4. Détermination du rendement	34
II.5. Dosage des poly phénols.....	34
II.6. Dosage des flavonoïdes :	36
II.7. Méthode de dosage des composés phénoliques :	38
II.8. Dosage des polyphénols totaux :	39
II.9. Dosage des flavonoïdes totaux :	41
II.10. Détermination de la teneur en cendre et la matière organique :	42
II.11. Calcul le rendement :	43
Conclusions :	43

Chapitre III : Résultats & discussion

III .1 Résultats de l'extraction par les méthodes classiques :	45
III .1 .1 Aspect des extraits obtenus :	45
III .1 .2 Calcul de rendement :	45
III .1 .3 Résultats de l'analyse quantitative :	46

III .1 .3.1 Résultats de dosage des polyphénols :.....	47
III .1 .3 .2 Résultat du dosage des flavonoïdes :.....	48
III .1 .3 .3 Méthode d'extraction infusion :	50
III .2 Résultats de l'extraction par Ultrason :	52
III .2 .1 Rendement de la méthode d'extraction par Ultrason :	52
III .2 .2 Variation du solvant et de la durée d'extraction :.....	52
III .2 .3 Résultats de l'analyse quantitative :	53
III .2.4. Détermination de la teneur en cendre est la matière organique :.....	55
III .2.5. Calcul le rendement :.....	55
Conclusion :.....	56
Conclusion générale	57
ملخص.....	58
Résumé	59
Abstract.....	60
Référence bibliographique.....	61

Abréviations & symboles

Symboles	Symboles Signification
G	Gramme
ml	Millilitre
H	Heure
EtOH	Ethanol
UV	Ultraviolet
FCR	Folin-Ciocalteu reagent
Na₂CO₃	Le carbonate de sodium
min	Minute
Al⁺³	Cation d'aluminium
AlCl₃	Trichlorure d'aluminium
°C	Degré CELSUIS
EtOHt10	extraits obtenue avec de l'éthanol pur EtOH comme solvant pendant 10min
EtOHt30.	extraits obtenue avec de l'éthanol pur EtOH comme solvant pendant 30min
H₂O	Eau
E1, E2, E3	Extrait 1 et extrait 2 et extrait 3
g/mol	Masse molaire
AG	Acide gallique
QE	Etalon de la quercétine
V	Volume

Abréviations & symboles

%	Pourcentage
MS	Macération sèche
MF	macération fraîche
R%	Rendement
M	Masse en gramme du matériel végétal à traité
M₀	Masse en gramme de l'extrait sec résultant
Mg EAG	mg Equivalent Acide Gallique
Mg EQ	Mg équivalent quercétine
MeOH	Méthanol
µg	Micro gramme

Liste du tableaux

N	<i>Liste du tableaux</i>	Page
Tableau III.1	Tableau montrant les rendements d'extraction (sèche et fraiche) par trois méthodes	61
Tableau III.2.	Présent le résultat de l'absorbons de l'acide gallique avec la concentration	63
Tableau III.3.	Présent l'absorbance la Quercétine avec la concentration	64
Tableau III.4	Taux de polyphénols et de flavonoïdes totaux des extraits (MS, MF, SSetHS) obtenus par trois méthodes	65
Tableau III.5	Tableau montrant les rendements d'extraction par infusion (Solvant EtOH et eau)	66
Tableau III.6	Taux de polyphénols et de flavonoïdes totaux des extraits obtenus par Infusion	67
Tableau III 7.	Tableau montrant les rendements d'extraction par Ultrason à une durée de (10mn-30mn) et une température comprise entre 32-35°C.	68
Tableau III.8	Taux de polyphénols et de flavonoïdes totaux des extraits obtenus par Ultrason	69
Tableau III.9	Tableau montrant les rendements de la matière (végétal, organique, cendre)	71

Liste des figures

N	<i>Liste des figures</i>	Page
Figure I.1	l'origine et la diffusion de <i>Medicago sativa</i> L	19
Figure I.2	la luzerne (<i>Medicago sativa</i>L)	21
Figure I.3	Structure des acides phénoliques	25
Figure I.4	Propriétés biologiques et thérapeutiques des poly phénols.	27
Figure I.5	Structure de base d'un flavonoïde.	28
Figure I.6	Structures chimiques des sous-groupes des flavonoïdes.	28
Figure I.7	Structures chimiques des flavonols	29
Figure I.8	Structures chimiques des flavones	29
Figure I.9	Structure chimique des flavanones.	30
Figure I.10	Structures chimiques des isoflavones.	30
Figure I.11	Schéma montrant l'expérience de macération des plantes à froid	34
Figure I.12	Montage d'hydro distillation	36
Figure I.13	Extracteur de Soxhlet	37
Figure I.14	Représentation schématique du phénomène de Cavitation acoustique	41
Figure II.1	Carte géographique de <i>Medicago sativa</i> L	45
Figure II.2	Les étapes dans macération	46
Figure II.3	Organigramme d'extraction par ultrason	49
Figure II.4	Extraction par hydro distillation	50
Figure II.5	Appareille spectrophotomètres	54

Liste des figures

Figure II.6	Préparation de polyphénole	56
Figure II.7	Préparation de polyphénol	56
Figure II.8	Structure de l'acide gallique	57
Figure II.9	Organigramme décrivant les étapes d'élaboration de la courbe d'étalonnage de la quercétine	58
Figure II.10	Structure de la quercétine.	58
Figure II.11	Les étapes de carbonisation de plante	59
Figure III.1	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	63
Figure III.2	Courbe d'étalonnage de la Quercétine	64
Figure III.3	Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes dans les 4 extraits <i>Medicago sativa</i> L	65
Figure III.4	Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes dans les extraits de <i>Medicago sativa</i> L (EtOH sèche et fraiche et H₂O sèche).	67
Figure III.5	Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes dans les 4 extraits de <i>Medicago sativa</i> L (EtOH sèche et fraiche et H₂O sèche et fraiche).	70
Figure III.6	Le poids de plante sèche	71
Figure III.7	Le poids en cendre	71
Figure III.8	Teneur en matière organique et minéral du plant <i>Médicago sativa</i> L	72-

Introduction générale

La flore d'Algérie est particulièrement riche en espèces, la diversité de l'Algérie en Climats et sols lui donne une place privilégiée pour la culture et l'exploitation des Plantes. Un très grand nombre de ces espèces pousses à l'état naturel et endémique.

Certaines se révèlent d'une grande valeur agronomique, car elles sont utilisées comme Fourrage pour bétail ou sous forme de plantes alimentaires, d'autres ont une application Médicinale [1].

Le genre *Medicago* renferme 34 espèces annuelles et 21 espèces pérennes qui présentent Un intérêt agro-économique du fait de leur excellente qualité fourragère et de l'enrichissement de la fertilité du sol qu'elles assurent. En Algérie, ces plantes [2]. Assurent L'amélioration de la flore des jachères pâturées, entrent facilement dans la rotation avec les Céréales se régénèrent par auto-semis et constituent une bonne réserve de semences dans le sol [3].

C'est dans le cadre de la valorisation de notre patrimoine naturel que s'inscrit notre étude. L'espèce que nous avons étudiée est : *luzerne* de la famille Fabaceae (*Medicago sativa* L), légumineuse vivace, Cette plante utilisée comme l'alimentation animale.

La démarche poursuivie dans la réalisation de ce mémoire consiste à faire un travail comportant :

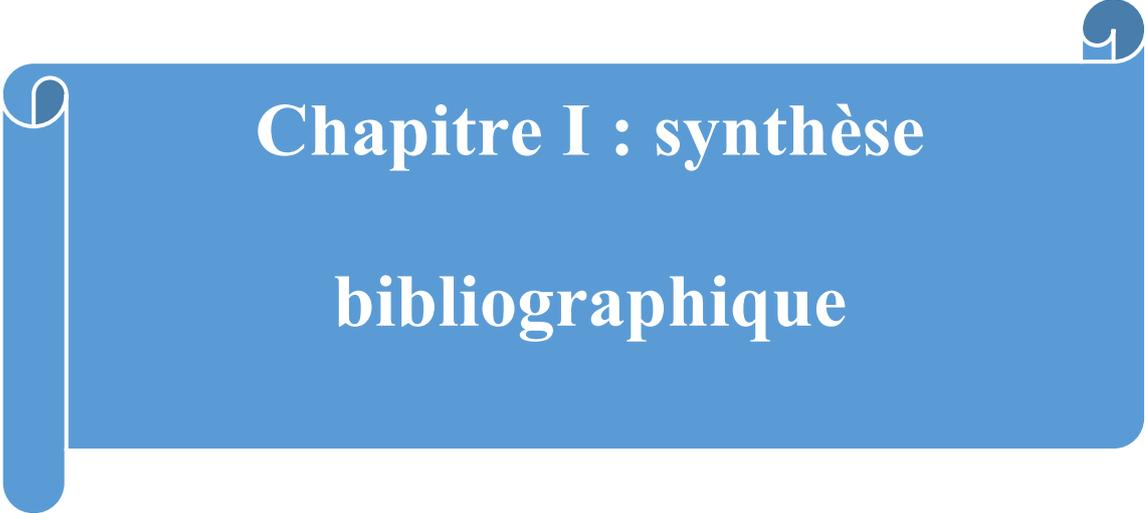
1- dans Le première chapitre : Qu'est-ce que la *Medicago sativa* L ? Ses usages et son importance, les métabolites premier et secondaire Nous avons fait mention les flavonoïdes et les polyphénols, les méthodes d'extraction utilise (macération, infusion, chauffage à reflux ultrason ...etc.

2-Dans le deuxième chapitre : La partie expérimentale avec la description du matériel végétal et les méthodes utilisées. Et le dosage des flavonoïdes et des poly phénols.

3- le troisième chapitre Résultats et discussion qui comporte une analyse de quelques paramètres physico-chimiques plus l'optimisation des facteurs d'extraction des métabolites de la plante, etc.

Et enfin, nous terminerons par une conclusion.





Chapitre I : synthèse

bibliographique

I.1. Historique

Au Moyen –Orient, 2000 ans avant J-C, les tablettes hittites notaient les mérites de cette Légumineuse pour l'alimentation animale et sa capacité à résister au déficit hydrique. En outre, avec l'évolution des connaissances, les bienfaits de cette plante pour le sol ont été compris et évalués. La systématique et la phylogénèse du genre *Medicago* sont le résultat d'une longue suite de recherches marquant les étapes des diverses hypothèses successivement formées à l'égard de ce groupe de plantes. Linné (1753), Urban (1873), Taubert (1891), Ascherson et

Graebner (1911), Trabut (1917), Hegi (1924), Fryer (1930) et enfin Sinskaja et ses collaborateurs (1935, 1940, 1950) cités par [1]. Ont apportés des données de valeurs à ce sujet. Nous dirons seulement, d'après Sinskaja, que l'espèce ancestrale (primitive $n=8$) aurait été munie des caractères des genres *Medicago* et *Trigonelle*. De cette espèce ancestrale, les espèces hypothétiques *Medicago* hémicycle et *Medicago*. *Glutinosa* auraient tiré leurs origines ($n=8$ et 16). Les Luzernes cultivées proviendraient de ces espèces anciennes.

Le Medicago sativa L est une espèce pérenne tétraploïde, à côté des espèces pérennes, une place particulière doit être faite à l'ensemble des espèces annuelles diploïdes qui représentent les 2/3 des espèces du genre *Medicago* (elles sont regroupées sous le vocable de Médicis). Originaires de la zone méditerranéenne, les médicis sont particulièrement adaptés aux conditions de sécheresse : Australie, Chili, Californie.

Le Medicago sativa L pérenne est originaire d'Asie occidentale (Asie mineure, Arménie, Mésopotamie, Perse.). Dans cette vaste région, on peut trouver la plus grande richesse de forme. Il semble que l'on puisse localiser sa véritable origine dans la partie septentrionale de la Perse. La luzerne s'est répandue dans toutes les directions, perdant une partie de ses gènes, et continuant à en perdre suivant les milieux divers qu'elle traversait. Toutefois, il est probable que la luzerne se serait répandue tout d'abord en Grèce, plus précisément en Médie (d'où son nom grec: *Medica*) à l'époque des guerres médiques (environ 470 avant J-C elle est propagée en Italie puis en Europe occidentale avec l'expansion de l'empire Romain. On retrouve encore aujourd'hui ces mêmes types dans les oasis [1]. Pendant l'extension de son aire, elle a subi des hybridations qui ont été à l'origine de nombreux types.

Le Medicago sativa L, est une des plantes les plus répandues sur tous les continents ; on la retrouve à peu près sous toutes les latitudes, depuis les régions équatoriales jusqu'aux abords du cercle arctique. Elle trouve, cependant, son plus grand développement dans les zones

tempérées chaudes : Etats-Unis, Europe, Amérique du Sud, Asie, Australie, Japon, Nouvelle-Zélande et l'Afrique [2].

Dans le monde, les superficies consacrées à la culture de luzerne, sont à peu près de 25 millions d'hectares. Les Australiens utilisent ces *Medicago sativa L* diploïdes dans un système de culture spécifique basé sur une rotation céréales – medics: grâce à l'accumulation de graines dures, la prairie de medics se régénère entre deux cultures de céréales, même après plusieurs années. Ce système est applicable en diverses zones céréalières sèches: Maghreb, Moyen Orient, Espagne. Hormis cette utilisation peu répandue aujourd'hui, les medics jouent un grand rôle dans les espaces pastoraux méditerranéens de l'Europe du Sud et du Maghreb où les ressources fourragères proviennent essentiellement de la végétation spontanée dans laquelle les medics ont une part importante [2].

I.2. Répartition et origine de *Medicago sativa L*

C'est une plante originaire de l'Ouest de l'Asie (Afghanistan, Iran, Turquie), cultivée, et présente à l'état spontané, dans tous les continents, dans les régions tempérées, jusqu'à 2000 m d'altitude environ, et débordant largement vers les régions arctiques au nord et équatoriales au sud.

Le Medicago sativa L provient de l'ouest d'Asie où elle a été identifiée, il y a près de 10000 ans. Elle est considérée dès cette époque comme un fourrage facile à cultiver et à stocker ce qui explique sa diffusion rapide en commençant par l'Europe méditerranéenne et l'Afrique de l'Est puis du Nord.

Elle préfère les climats de type méditerranéen. Au total la luzerne représente dans le monde près de 32 millions d'hectares dont 14 millions en Amérique du nord où elle est le mieux représentée pour moins de 600 000 hectares en France [3].



Figure I.1 : l'origine et la diffusion de *Medicago sativa L*.

I.3-Généralités sur la *medicago sativa L*

La luzerne est une légumineuse de la famille des Leguminosae elle existe sous deux espèces *Medicago sativa L* et *Medicago falcata L*, caractérisée par sa capacité de fixer l'azote atmosphérique, grâce à une symbiose existant entre la plante et une bactérie qui se développée dans son système racinaire [4].

En effet, la symbiose avec la bactérie *Rhizobium meliloti* utilise l'énergie provenant de la photosynthèse pour assurer la transformation de l'azote de l'air, qui entre ainsi dans le circuit de la synthèse des protéines végétales. Cette opération se fait grâce à une enzyme, la nitrogénase [5].

En conditions favorables, c'est l'une des plus importantes espèces des légumineuses utilisée dans l'agriculture. Sa haute qualité nutritionnelle et son rendement végétatif fait d'elle un fourrage d'excellence [6].

Elle est très cultivée est pour sa richesse en protéines (allant jusqu'à 55 %) et ses qualités d'amélioration des sols

La luzerne constitue selon [7].

- Une source d'azote pour d'autres cultures d'assolement.
- Une culture propre à améliorer les sols.
- Une source complète d'éléments nutritifs pour la production de viande et de lait.
- Un aliment de haute qualité pour chevaux.

Le Medicago sativa L s'adapte facilement à des milieux divers en termes de climat et de pluviométrie.

Elle a une bonne tolérance aux températures relativement élevées (jusqu'à 30° C). Toutefois elle donne les meilleurs rendements en terres profondes, sans obstacles à son enracinement et saines, dans les sols dont le pH est supérieur à 6,5 (conditions nécessaires au bon fonctionnement de la symbiose avec le *Rhizobium méliolots* [3].

I.4. Nom scientifique

Son nom scientifique dérive de Médéa (*Medicago*) ancienne ville du Nord de l'Afrique, alors que *sativa* signifie cultivée et son nom vulgaire provient du mot arabe alfasfat qui signifie « père de tous les aliments » [7].

I.5. Description taxonomique

Le Medicago sativa L est une plante herbacée vivace, allogame à pollinisation entomophile. La luzerne cultivée est le résultat de l'hybridisme entre deux espèces différentes : la luzerne commune *Medicago sativa L* et la luzerne faucille *Medicago falcata* [7].

❖ **L'espèce est classée comme suit :**

- ❖ Règne : Planta
- ❖ Embranchement : Spermatophytes
- ❖ Sous- embranchement: Angiosperme
- ❖ Classe : Dicotylédones
- ❖ Sous- classe : Rosidées
- ❖ Ordre : Fabales
- ❖ Famille : Fabaceae
- ❖ Sous-famille : Faboideae
- ❖ Tribus : Trifolieae
- ❖ Genre: *Medicago* (L)
- ❖ Espèce: *Medicago sativa L*



Figure I.2 : la luzerne (*Medicago sativa L*).

I.6. Description botanique

C'est une plante herbacée de grande taille (30 à 110 - 180 cm), glabrescente [3], vivace par ses tiges souterraines ramifiées. Les feuilles présentent trois folioles obovales ou oblongues, pétiolées, dentées et mucronées au sommet, ordinairement glabres.

Les fleurs sont le plus souvent violettes, parfois bleuâtres, nombreuses, en grappes oblongues dépassant les feuilles. Les fruits est une gousse non épineuse, recourbée en spirale à 2-3 tours de spire, renfermant plusieurs graines réniformes, luisantes, de couleur jaune verdâtre [3].

Ses racines longuement pivotantes, peuvent descendre jusqu'à 2 mètres de profondeur, ce qui confère à cette espèce une bonne résistance à la sécheresse. Le poids de 1.000 graines est

d'environ 2 g. La faculté germinative dure en moyenne 3 ou 4 ans. Elle doit être considérée comme satisfaisante si elle est supérieure à 89 % pour un essai effectuée en local chauffé.

I.7. Utilisations de la *Medicago sativa L*

Selon, [1] sur le plan nutritif, la luzerne n'est pas assez équilibrée. Si on alimente les animaux exclusivement avec de la luzerne, la proportion des matières azotées dans la ration sera excessivement abondante, tandis qu'il y a insuffisance d'hydrates de carbone ; c'est pourquoi il est indiqué de la mélanger avec d'autres fourrages comme les graminées. Toutefois, *le Medicago sativa L* peut être distribuée aux animaux sous différentes formes :

- ❖ **En vert** : La période d'utilisation du fourrage est nécessairement dépendante de sa période de production. L'évolution saisonnière de la productivité empêche que la globalité de la production soit utilisée sous cette forme (présence d'excédent) par rapport aux besoins pendant la période de pointe et exige la distribution différée, sous forme conservée, pendant les périodes de creux. Pour les ruminants, on fauche la luzerne au début de IA floraison, quelques fois en pleine floraison, et on peut la donner comme fourrage après fanage de 1 à 2 jours, lorsque le danger de météorisation est écarté.
- ❖ **En foin** : Il est souvent indiqué de faner la luzerne, il faut alors la faucher en pleine floraison et la faner, en prenant soin d'éviter les pertes de feuilles ; aussi, c'est toujours le matin de bonne heure ou tard le soir lorsque le foin est un peu humide que l'on retourne les andains, on réduit ainsi au minimum la perte de feuilles. Cette forme d'utilisation est pratiquée pendant les périodes de fortes pénuries en fourrages verts.
- ❖ **En déshydratée** : Le produit rentre dans la catégorie des fourrages concentrés, assurant un complément, essentiellement azoté ; l'astreinte au niveau de la production de la luzerne déshydratée est d'assurer un approvisionnement régulier de l'unité industrielle de déshydratation.
- ❖ **En ensilage** : *Le Medicago sativa L* est naturellement difficile à ensiler. C'est une plante pauvre en sucres. Inversement, sa teneur en azote et minéraux est élevée et explique sa résistance à l'acidification (c'est le pouvoir tampon).

La réussite de l'ensilage est cependant possible si l'on respecte un maximum de précautions (herméticité, tassement) et si l'on modifie les conditions naturelles par un pré fanage plus ou moins poussé. L'augmentation du taux de matière sèche compense le faible rapport sucres/protéines et améliore ainsi l'aptitude de la plante à l'ensilage. C'est aussi l'objectif de la coupe fine qui favorise la libération des sucres.

Parmi les règles classiques conseillées pour l'ensilage on peut noter :

Eviter de retourner les andins et de faner le fourrage afin de limiter l'effeuillage et la souillure par la terre; Préparer le silo pour l'ensilage et ne pas laisser les remorques monter sur le tas afin de réduire l'apport de terre sur le fourrage ; Bien tasser, pour chasser l'air et limiter des échanges ultérieurs. Un bon tassement ne peut s'obtenir qu'en remplissant les silos par couches horizontales de faibles épaisseurs; Utiliser une bâche normalisée et fermer hermétiquement le silo.

➤ **Le pâturage** : Le pâturage semble le mode d'utilisation le plus rentable, les frais mécaniques sont faibles, les pertes par manipulation sont nulles, le gaspillage par les animaux est peu important si l'on utilise un pâturage rationné.

En général, le pâturage est envisagé avec une association de graminées qui permet de corriger l'excès de protéine de la luzerne ; de plus ce pâturage se fait très souvent en été lorsqu'il y a manqué d'herbe. Toutefois, la luzerne est réputée pour le risque de météorisation, pour éviter cela il vaut donc mieux attendre le stade de début floraison car à ce stade le risque est alors faible voir nul. Le pâturage des premiers et seconds cycles est formellement déconseillé autant pour le risque de météorisation que pour le risque de piétinement, par ailleurs, il peut être une solution pour valoriser les dernières coupes au moindre coût.

I.8. Les Métabolites secondaire et les méthodes d'extraction

I.8.1. Généralité

Les plantes contiennent de nombreuses molécules issues de leur métabolisme ou du milieu extérieur. Ces différentes molécules ont des fonctions variées dans la plante et certaines peuvent avoir des applications thérapeutiques. On distinguera les métabolites primaires et les métabolites secondaires [8].

I.8.2. Métabolites primaires

Les métabolites primaires sont des molécules qui existent dans toutes les cellules végétales et sont nécessaires à la vie de la plante. Ce sont les glucides, les lipides et les acides aminés, les protides et les protéines. C'est à partir de ceux-ci que les métabolites secondaires sont formés, par différentes réactions chimiques [8]. Ils jouent aussi un rôle essentiel dans la photosynthèse, la respiration, la croissance et le développement de la plante [9].

I.8.3. Métabolites secondaires

Les plantes produisent divers composés organiques, dont la grande majorité ne semble pas participer directement à leurs croissance et développement. Ces substances,

traditionnellement appelées métabolites secondaires, sont souvent distribuées différemment parmi des groupes taxonomiques limités dans le règne végétal [10].

Ils sont responsable des activités biologiques des plantes médicinales [9] [10] Sur la base de leurs origines biosynthétiques, les métabolites secondaires des plantes peuvent être divisés en trois grands groupes : les composés poly phénoliques, les terpenoïdes et les alcaloïdes [11].

I.9. Les poly phénols

I.9.1. Définition des poly phénols

Les poly phénols sont des métabolites secondaires synthétisés dans les plantes en réponse aux stress écologiques et physiologiques [12] Ils possèdent un ou plusieurs cycles aromatiques avec un ou plusieurs groupes hydroxyles allant de molécules phénoliques simples de 500 Dalton à des composés fortement polymérisés avec des poids moléculaires de plus de 30 000 Dalton [13] Les poly phénols sont des composés phénoliques hydrosolubles ayant la capacité de précipiter certains alcaloïdes, la gélatine et autres protéines de la solution [14] Le terme 'poly phénols' est un terme collectif pour plusieurs sous-groupes de composés phénoliques.

Les polyphénols sont largement distribués dans le règne végétal et sont les métabolites secondaires les plus abondants des plantes, avec plus de 8 000 structures phénoliques connues, allant de simples molécules telles que les acides phénoliques jusqu'à des substances fortement polymérisées telles que les tanins [15] Ils sont présents dans différentes parties des plantes selon l'espèce végétale et le composé phénolique considéré [16] [17].

Les composés phénoliques sont des constituants largement répandus des aliments végétaux (fruits, légumes, céréales, olives, légumineuses, chocolat, etc.) et des boissons (thé, café, bière, vin, etc.) et responsables de plusieurs propriétés organoleptiques des aliments végétaux [15]. Comme la plupart des métabolites secondaires, les poly phénols sont synthétisés par les plantes afin d'accomplir certaines fonctions. Ils sont généralement impliqués dans :

- La croissance et la reproduction des plantes.
- La défense contre les rayonnements ultraviolets.
- La défense contre l'agression par les pathogènes, les parasites et les prédateurs.
- La production des arômes et parfums et la contribution dans la pigmentation.
- La protection des cultures contre la peste et la germination des graines avant la récolte [13] [15].

I.9.2. Classification des poly phénols

Les poly phénols constituent le groupe de produits naturels le plus distribué dans le règne végétal. Cette large distribution a conduit à différentes façons de classer ces composés en se basant sur l'origine, la fonction biologique ou la structure chimique [18]. En utilisant la classification selon la structure chimique, les poly phénols sont divisés en plusieurs classes selon le nombre des anneaux phénoliques qu'ils contiennent et les éléments structuraux qui lient ces anneaux entre eux. Les principaux groupes de poly phénols sont : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les alcools phénoliques, les stilbènes et les lignines [19].

I.9.2.a Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont subdivisés, en se basant sur les squelettes C1-C6 et C3-C6, en deux principaux types : l'acide benzoïque et les dérivés d'acide cinnamique (**Figure I.3**).

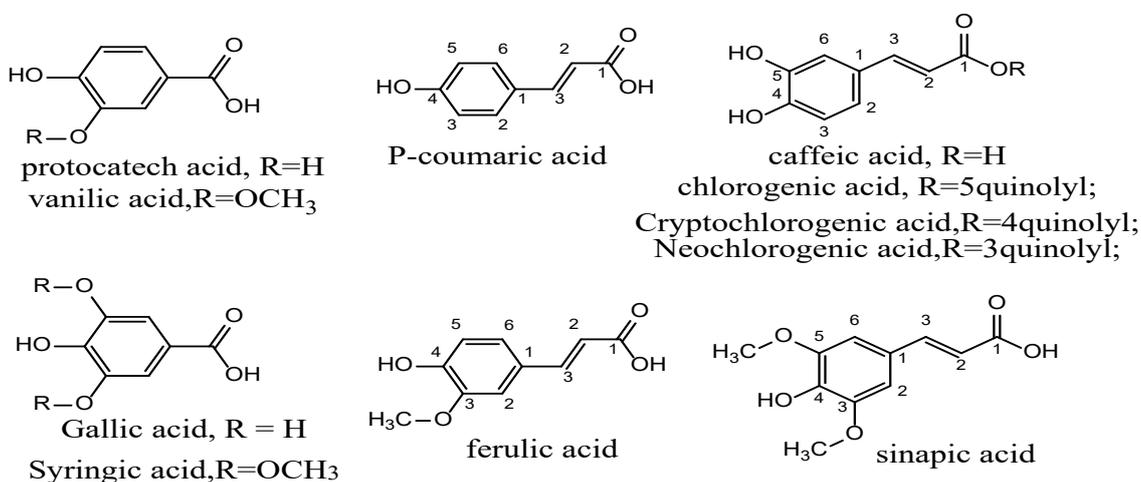


Figure I.3 : Structure des acides phénoliques [18].

I.9.2.b Flavonoïdes

Les flavonoïdes dérivent de la flavone. Les structures des flavonoïdes sont constituées de deux anneaux de benzène séparés par une unité de propane. Ils sont généralement hydrosolubles. On les trouve généralement dans les plantes sous forme glycosilées. Les différentes classes dans le groupe se distinguent par des anneaux hétérocycliques contenant de l'oxygène et des groupes hydroxyles. Il s'agit notamment des chalcones, flavones, flavonols, flavanones, anthocyanines et des isoflavones [25].

Les flavonoïdes représentent la classe la plus répandue des composés phénoliques dans le règne végétal. La structure de base d'un flavonoïde est formée de deux cycles en C6 (A et B)

Reliés par une chaîne en C3 qui peut évoluer en un cycle C (hétérocycle) (**Figure I.5**).

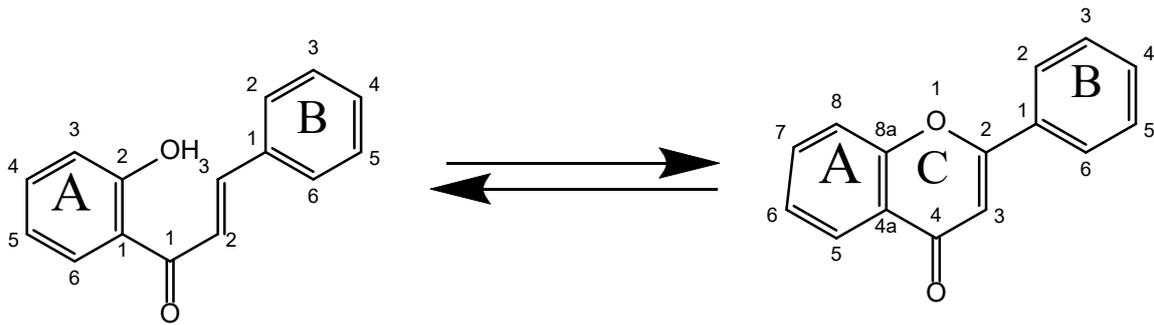


Figure I.5 : Structure de base d'un flavonoïde. [26].

Les principaux sous-groupes des flavonoïdes sont : les flavones, flavonols, anthocyanes, isoflavones flavan-3-ols, et les flavanones. Il y a d'autres flavonoïdes qui se trouvent à faible concentrations dans les aliments tels que les flavane-3,4-diols, les dihydroflavonols, les coumarines, les dihydrochalcones, les chalcones, et les aurones (**Figure I.6**).

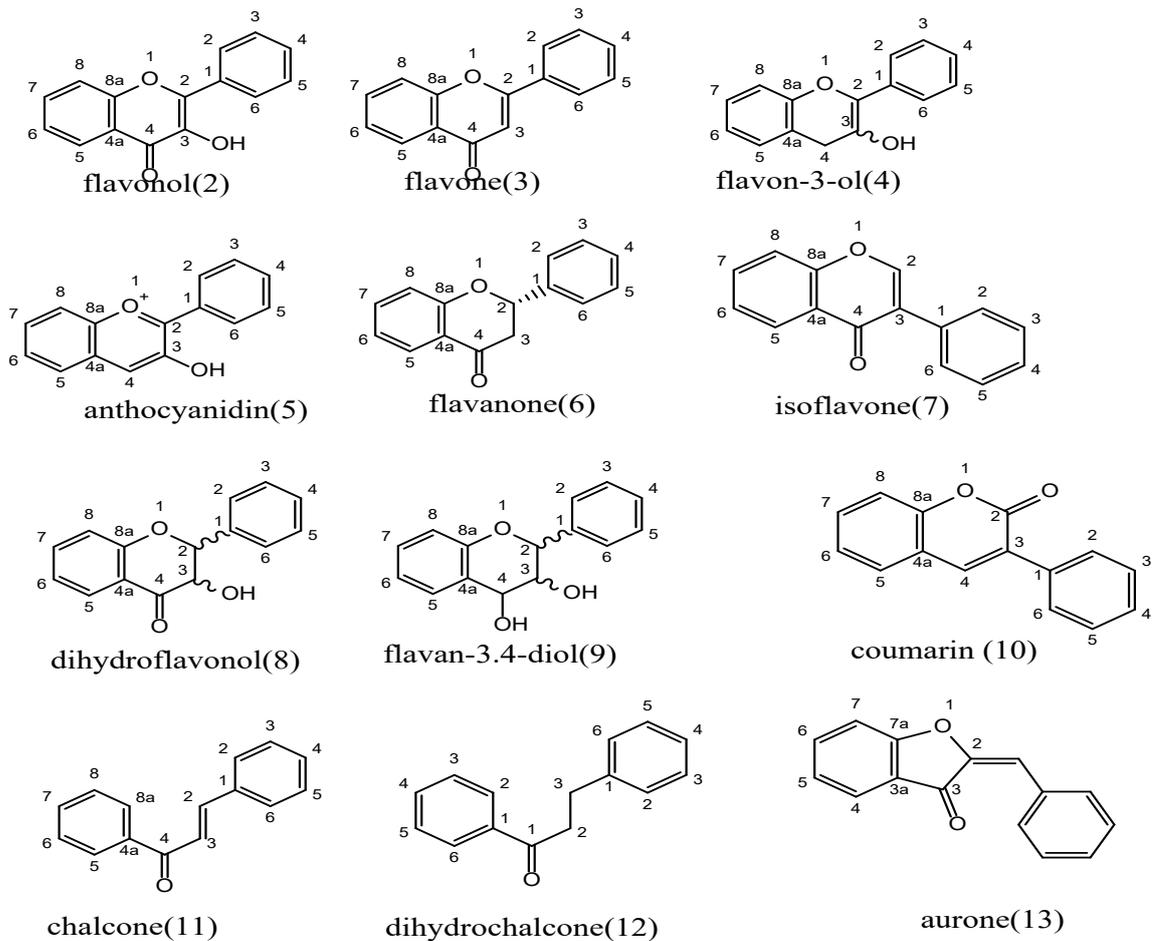


Figure I.6 : Structures chimiques des sous-groupes des flavonoïdes [28].

a) Flavonols

Les flavonols ont une double liaison entre C2 et C3, avec un groupe hydroxyle en position C3 (**Figure I.7**). Ils représentent les flavonoïdes les plus omniprésents dans les aliments avec la quercétine le composé le plus représentatif. Les principales sources de flavonols sont les oignons (jusqu'à 1,2 g/kg de poids frais), le chou frisé, les poireaux et le brocoli. Il est important de noter que la biosynthèse des flavonols est stimulée par la lumière [19].

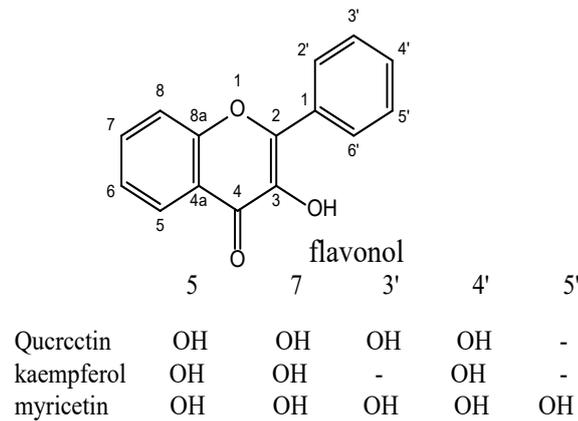


Figure I.7 : Structures chimiques des flavonols [27].

b) Flavones

Les flavones ont une double liaison entre C2 et C3 et sont les flavonoïdes les moins communs (**Figure I.8**). Les flavones se distinguent des flavonols par l'absence d'OH en C3. Les flavones se trouvent essentiellement dans le céleri, le persil et quelques fines herbes [11].

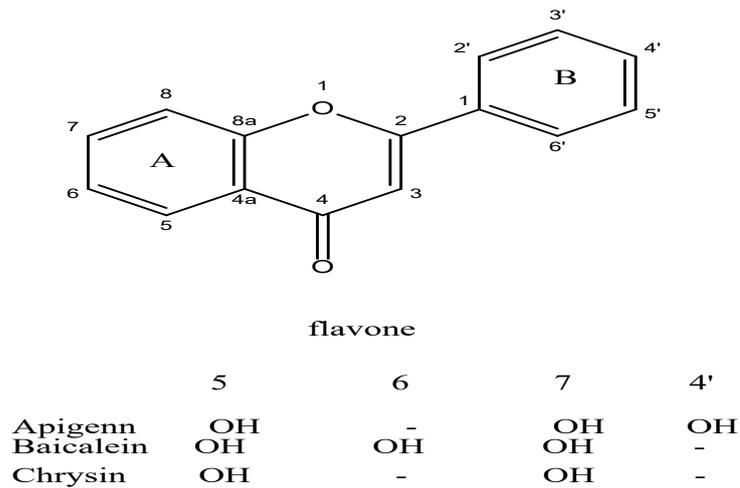


Figure I.8 : Structures chimiques des flavones [27].

c) Flavanones

Les flavanones se caractérisent par la présence d'une chaîne saturée à trois atomes de carbone et d'un atome d'oxygène dans le C4 (**Figure I.9**). Ils sont généralement glycosilés par un disaccharide dans C7. Les flavanones sont présents à haute concentration uniquement dans les agrumes, mais ils sont également trouvés dans les tomates et certaines plantes aromatiques telles que la menthe [19].

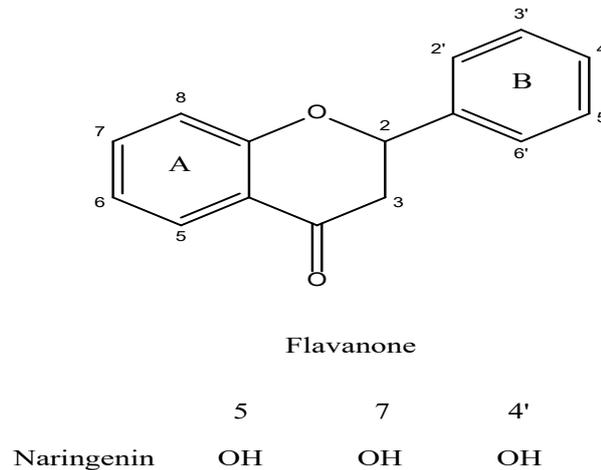


Figure I.9 : Structure chimique des flavanones [27].

d) Isoflavones

Les isoflavones diffèrent des autres flavonoïdes, par la liaison de l'anneau B à l'hétérocycle C3 (**Figure I.10**), et non pas à C2 [28]. Les isoflavones sont contenues presque exclusivement dans les légumineuses [19].

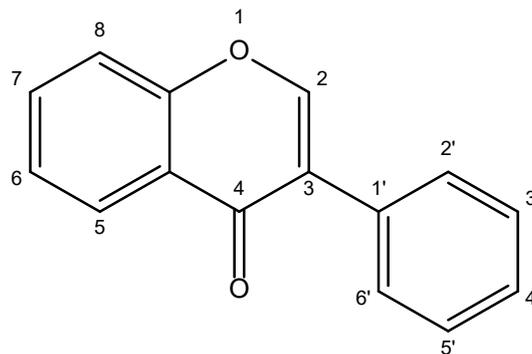


Figure I.10 : Structures chimiques des isoflavones [27].

I.9.3. Effets biologiques des poly phénols

Des travaux plus anciens ont montré que le phénol seraient associés à de nombreux processus physiologique : croissance cellulaire, différenciation, organogénèse, dormance des bourgeons, floraison et tubérisation [20]. Le rôle des composés phénolique est reconnu dans

différents aspect de la vie de la plante et dans l'utilisation que fait l'homme des végétaux .Ils peuvent en effet intervenir dans :

- Certains aspects de physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interaction moléculaire avec certain microorganismes symbiotique ou parasites...)
- l'interaction des plantes avec leur environnement biologique et physique (relation avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV), Soit directement dans la nature soit lors de la conservation après récolte de certains végétaux.
- Les critères de qualité couleur, une qualité nutritionnelle.
- Les variations de certaine caractéristique des végétaux lors des traitements technologiques.
- La protection de l'homme vis a vis de certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et leur propriétés antioxydants (compose phénolique).
- Les composés phénolique possèdent une activité antimicrobienne, par exemple une étude montre que les catéchines des feuilles du thé, inhibent la croissance de micro-organisme en entrant de fonction membranaires des pathogènes [21].

I.9.4. Facteurs de variabilité de la teneur en poly phénols

❖ Facteurs externes

Le métabolisme phénolique est particulièrement sensible à l'action des facteurs externes comme la lumière, la température, les microorganismes pathogènes et les traitements appliqués par l'homme [22].

I.9.5. Propriétés biologiques et thérapeutiques des poly phénols

Les poly phénols attirent de plus en plus l'attention en tant que des agents potentiels pour la prévention et le traitement des maladies liées au stress oxydatif. Au cours des deux dernières décennies, les poly phénols ont été largement étudiés et plusieurs bio activités de ces composés ont été relevées [23] Les poly phénols sont des antioxydants qui ont plusieurs propriétés biologiques : antidiabétique, anticancéreuse, anti-inflammatoire, cardia protectrice, antivirales antiasthmatique, antiseptique, hépato-protecteur, antifongique, antibactériennes, antivirales etc. (**Figure I.4**)[24].

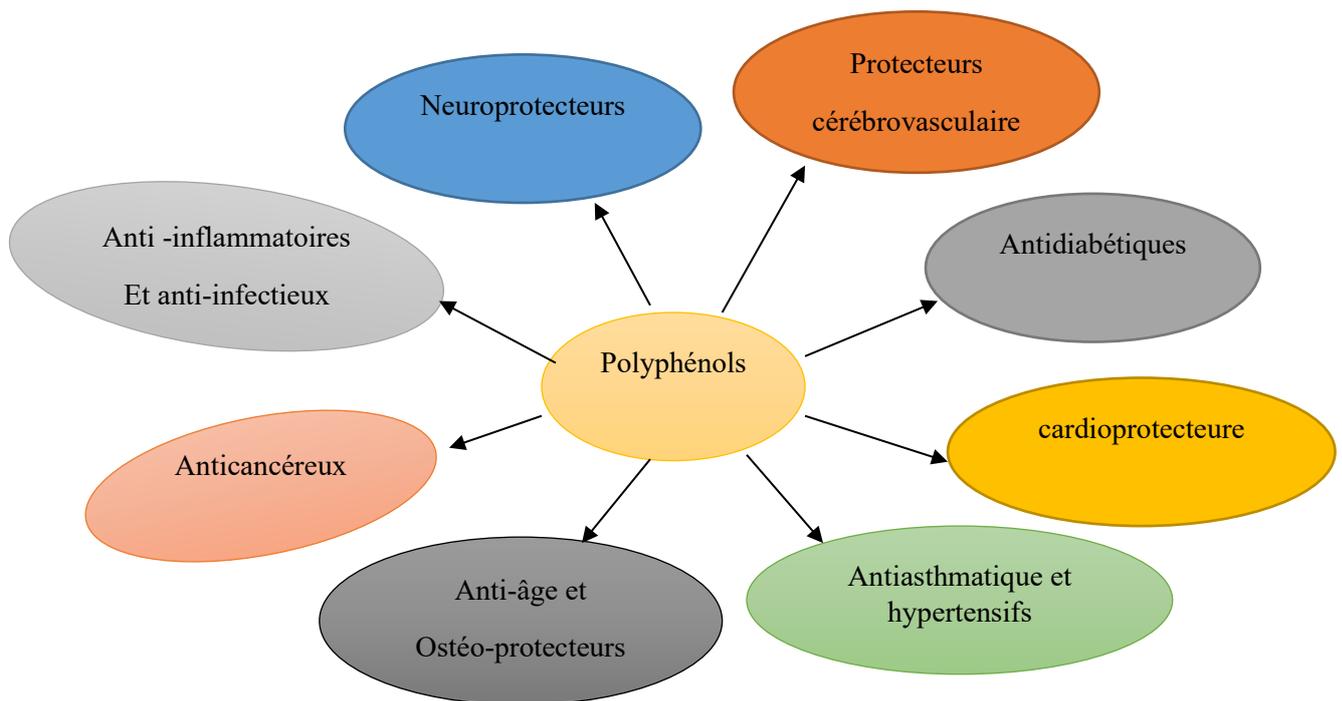


Figure I.4 : Propriétés biologiques et thérapeutiques des poly phénols [24].

I.10. Les tanins

Les acides tanniques sont des composés organiques complexes. Ils sont souvent contenus dans l'écorce ou dans les feuilles. Usagés pour le tannage des peaux d'animaux en cuir [30] Ils sont solubles dans l'eau, avec des poids moléculaires compris entre 500 et 3000 Dalton [31] d'après leurs structures et leurs propriétés, deux types de tanins sont distingués : Les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

I.11. Les terpènes et terpenoïdes

Les terpènes, ou isoprénoides, sont l'une des classes les plus diverses de métabolites secondaires. Leur squelette carboné est constitué d'unités isopréniques reliées, c'est ce que l'on appelle la règle de l'isoprène. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former des cycles. [32] Ils sont des arômes et des parfums, des antibiotiques, des hormones végétales et animales, des lipides membranaires, des attracteurs d'insectes, des antis alimentaires et des médiateurs des processus essentiels de transport d'électrons [11].

I.12. Les Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont un groupe diversifié de composés à faibles poids moléculaires, contenant de l'azote dérivés principalement d'acides aminés et trouvés dans environ 20% des espèces végétales [32].

Les alcaloïdes jouent un rôle défensif dans la plante contre les herbivores et les agents pathogènes. En raison de leurs activités biologiques puissantes, bon nombre d'alcaloïdes connus ont été exploités comme produits pharmaceutiques, stimulants, narcotiques et poisons [33].

I.13. Aperçu bibliographique sur les méthodes d'extraction

I.13.1. Définition

L'extraction consiste à transférer un composé d'une phase à une autre (d'une phase liquide à une autre phase liquide ou bien d'une phase solide à une phase liquide). C'est une opération qui consiste à séparer certains composés d'un organisme (animal ou végétal) selon diverses techniques. L'extraction est utilisée pour extraire sélectivement un ou plusieurs composés d'un mélange initial, sur la base de propriétés chimiques ou physiques.

I.13.2. Intérêt de l'extraction

Le but de l'extraction est d'isoler une ou plusieurs molécules à partir d'un organisme. Ainsi, la découverte de nouveaux médicaments peut passer par l'étude de ces substances naturelles et si une molécule se trouve être performante dans un domaine précis, elle pourra faire l'objet d'une commercialisation sous forme de médicament.

I.13.3. Types d'extraction

Il existe plusieurs méthodes d'extraction dont certaines ont été développées par les artisans parfumeurs bien avant l'essor de la chimie moderne. Les techniques classiques pour l'extraction de molécules actives à partir des matrices végétales, par solvants sont basées sur le choix du solvant lui-même couplé à la température et/ou à l'agitation. Les techniques classiques existantes permettant d'extraire ces principes actifs incluent l'infusion, la macération, l'hydrodistillation et en dernier l'extraction par Soxhlet [34].

Toutes ces méthodes d'extraction solide-liquide sont régies par les lois de transfert et d'échange de matière et cette opération peut être divisée en plusieurs étapes pendant lesquelles

le soluté est transféré de la matrice solide vers le solvant, ces étapes peuvent être résumées dans les points suivants :

- Passage du solvant du milieu environnant vers la surface externe du solide.
- Diffusion du solvant dans la structure du solide.
- Passage du soluté dans le solvant par dissolution.
- Transfert de la solution contenant le soluté vers la surface du solide par diffusion.

Le temps caractéristique de l'extraction est dépendant de la vitesse du phénomène d'extraction des solutés ou vitesse globale de transfert. Cette vitesse est régie par trois processus élémentaires de l'échange de matière est qui sont :

1. la solubilisation plus ou moins importante des molécules d'intérêt dans le solvant.
2. la diffusion du solvant dans le soluté solide (matière végétale).
3. l'homogénéisation du solvant lors de l'extraction par agitation.

I.14. Méthodes d'extraction classiques

I.14.1. Infusion

L'infusion est une opération qui consiste en la mise en suspension de parties de plantes (fleurs, racine, feuilles, baies) dans un solvant chaud, dont la température est proche de la température d'ébullition, puis a laisser reposer le mélange plusieurs minutes. Après cette opération, on filtre le produit pour obtenir un infuse. Cette opération s'oppose à la décoction, dans laquelle le liquide est maintenu bouillant, et à la macération dans laquelle le liquide est froid.

I.14.2. Les avantage

- Une extraction plus courte.
- La petite quantité de solvant consommée.

I.15. Macération

La macération est la méthode d'extraction solide-liquide la plus simple. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant avec ou sans agitation, à température ambiante pour une durée déterminée (24h-72h). Cette technique est basée sur la solubilité de composés dans un solvant d'extraction et elle est influencée par une série de facteurs incluant

la concentration en solutés du matériel végétal, la nature du solvant et la durée de l'opération d'extraction.

La macération commence avec le choix d'un solvant d'extraction adéquat. Après une étape de diffusion du solvant à l'intérieur des cellules végétales le processus continue avec la solubilisation de composés bioactifs qui vont migrer de la matrice végétale vers le solvant environnant jusqu'à ce que l'équilibre de partage soit atteint [35].

La figure (**Figure I.11**) suivante présente un exemple d'extraction de la matière végétale par macération.



Figure I.11 : Schéma montrant l'expérience de macération des plantes à froid.

Comme signalé précédemment, le choix du solvant adéquat est primordial pour l'extraction des composés d'intérêt. Classiquement, la macération dans un mélange hydro-alcoolique à différentes proportions (80 :20 ; 70 :30) est la plus utilisée. Plusieurs études ont montrés que l'extraction par macération à froid possède plusieurs avantages et inconvénients :

I.15.1. Les avantage

- Procédé simple d'application.
- Peut être conçu à petite échelle dans un laboratoire.
- Extraction efficace.

I.15.2. Les inconvénients

- Temps d'extraction plutôt long.
- De grandes quantités de matériel végétal et solvants sont requises.

I.16. Extraction par hydrodistillation

➤ L'hydro distillation et l'entraînement à la vapeur d'eau constituent les procédés d'extraction ou de séparation de certaines substances organiques les plus anciens, apportés par les Arabes au IXème siècle. Cette opération s'accomplit traditionnellement dans un alambic [36].

L'hydro distillation, daterait de plus de 3000 ans, découverte par les Perses qui voulaient fabriquer de l'eau de rose. Les premiers appareils de distillation furent conçus par les Coptes d'Alexandrie (les Chrétiens d'Egypte) puis les arabes les ont améliorés et leur ont donné le nom : d'alambic.

- Les alambics ont sans cesse étaient améliorés mais le principe de distillation reste le même. Cet appareil est composé généralement de quatre parties.
- Le corps (ou cucurbite ou chaudière) où se trouvent le ou les liquides à distiller, il sert de bain-marie ou est chauffé directement (le chauffage permet de former de la vapeur d'eau qui détruit la structure des cellules végétales, libère les molécules contenues et entraîne les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique). Le chapiteau recouvre le corps, il a un tube conique par lequel vont s'élever les vapeurs du mélange chauffé (le mélange est un mélange d'eau et de molécules organiques, il s'agit plus précisément de la formation d'un azéotrope entre l'eau et chacun des constituants du mélange qui permet dans la majorité des cas une volatilisation de ces métabolites secondaires à une température d'ébullition inférieure à celle de chaque composé et à celle de l'eau.
- Le col de cygne, avant conique et en arc de cercle puis maintenant cylindrique et rectiligne sur les appareils plus récents, il amène les vapeurs dans le condenseur.
- Le serpent (ou condenseur), sur ses parois vont se refroidir les vapeurs grâce au système de réfrigération (tube autour du premier où de l'eau froide circule en permanence).
 - L'essencier, c'est ici que l'on retrouve **la vapeur d'eau mélangée au parfum** de la plante distillée. Les parties insolubles dans l'eau de condensation sont décantées et, en raison de sa plus faible densité, l'huile essentielle se place au-dessus de la phase aqueuse. La phase aqueuse contenant les composés hydrosolubles est appelée eau de distillation (ou hydrolat). Dans ce

travail, nous sommes intéressés aux hydrolats qui font l'objet (**Figure I.12**) depuis quelques années d'un intérêt croissant.



Figure I.12 : Montage d'hydro distillation.

I.16.1. Avantages et inconvénients

L'hydrodistillation qui est une technique permettant d'extraire, en grande mesure, des espèces chimiques volatiles contenues dans un produit naturel (plantes, feuilles, écorces, etc.) présente comme toutes autres méthodes des avantages et des inconvénients qui peuvent être résumés dans les points suivants :

a) Durée de l'opération : La durée de l'opération d'hydrodistillation est fixée par l'opérateur mais elle est généralement d'une demi-heure jusqu'à 24 heures.

b) Altération de l'huile essentielle : Cependant, plus l'hydrodistillation dure longtemps et plus l'essence originelle est altérée. En effet, le chauffage de la plante détruit les molécules olfactives. On est alors placé devant dilemme quantité/qualité (faire durer l'hydrodistillation jusqu'à extraction complète de l'huile essentielle, ce qui donnera un produit de qualité olfactive moindre, ou privilégier la qualité mais gaspiller la plante en n'en tirant qu'une faible quantité d'huile essentielle).

c) Rendement : Quel que soit le choix du distillateur, on ne peut jamais déterminer la quantité d'huile essentielle que l'on obtiendra à l'arrivée. En effet, le produit dépend de nombreux facteurs tels que la durée, la température, la pression, le morcellement de la plante (manière dont elle a été coupée) et en dernier la composition de la plante elle-même.

d) Réalisation facile ou peu coûteuse : Malgré tous ces défauts, l'hydrodistillation reste la technique d'extraction la plus utilisée. En effet, elle ne requiert qu'une verrerie de base (un chauffe-ballon, un ballon, un réfrigérant et une éprouvette graduée suffisent) et ne coûte

pratiquement rien (un matériel réutilisable indéfiniment) à part, les seuls ingrédients nécessaires sont la plante, dont on veut extraire l'huile essentielle, l'eau qui servira à l'entraîner et les grains de pierre ponce, qui régulent l'ébullition.

I.17. Extraction par Soxhlet

L'extraction par Soxhlet est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première. Le Soxhlet est composé d'un corps en verre, dans lequel est placée une cartouche en papier-filtre épais (une matière pénétrable pour le solvant), d'un tube siphon et d'un tube de distillation. Dans le montage (**Figure I.13**), l'extracteur est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction. Le ballon est chauffé afin de pouvoir faire bouillir son contenu. La cartouche contenant le solide à extraire est insérée dans l'extracteur, au-dessus duquel est placé un réfrigérant servant à liquéfier les vapeurs du solvant. Au fil des cycles, le solvant s'enrichit en substances extraites jusqu'à épuisement de l'échantillon en substances d'intérêt [37].

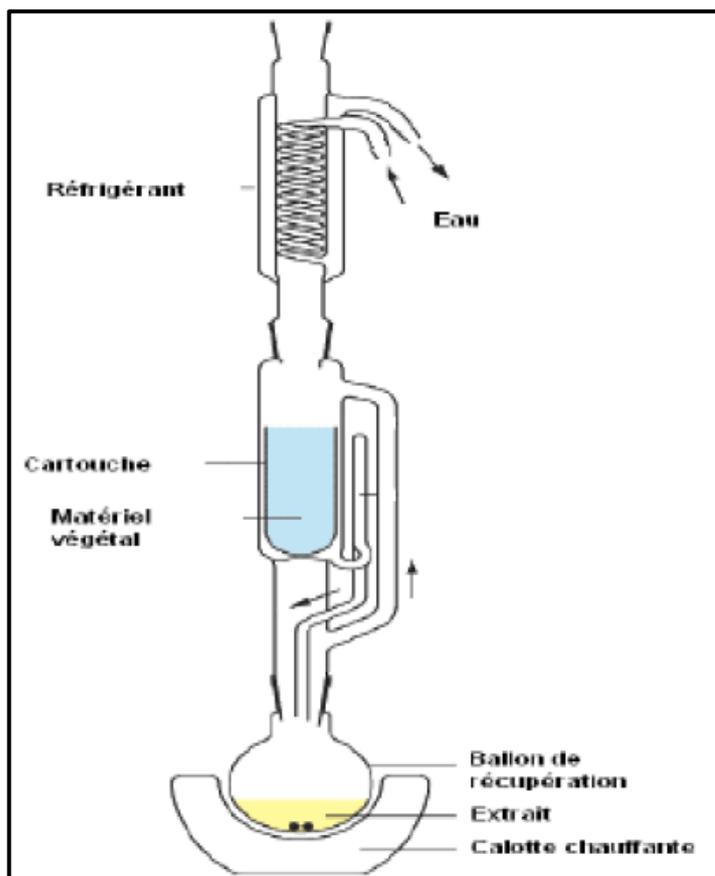


Figure I.13 : Extracteur de Soxhlet [37]

I.17.1. Les avantages :

- De faibles quantités de solvant sont utilisées car il est en recirculation.
- Extraction efficace.
- Temps réduit par rapport à d'autres méthodes.
- Extraction exhaustive presque complète.
- Plusieurs dimensions d'appareils sont disponibles s'adaptant aux diverses échelles de production.

I.17.2. Les inconvénients

- Les composés actifs sensibles à la chaleur ne peuvent pas être récupérés intacts dans l'extrait. Ils sont dégradés, leurs structures moléculaires ayant subi des modifications.
- Absence d'agitation qui permettrait d'accélérer le phénomène d'extraction.
- La quantité totale de certaines substances dans l'extrait peut être supérieure à leur solubilité dans le volume de solvant disponible, ce qui provoque leur précipitation et la nécessité de rajouter une grande quantité de solvant dans le percolât récupéré pour les solubiliser.

I.17.3. Effet des paramètres opératoires

De nombreux facteurs gouvernent l'efficacité de l'extraction et on peut les regrouper en trois grandes catégories :

- a. facteurs liés au solvant tels que sa concentration et sa nature,
- b. facteurs liés à l'échantillon tels que sa granulométrie, son humidité initiale, sa nature et son origine.
- c. facteurs liés aux conditions opératoires comme la température, l'agitation et la durée de l'extraction.

L'étude des paramètres opératoires et leur impact sur l'extraction des polyphénols est nécessaire afin d'obtenir un extrait brut riche.

❖ Nature du solvant

La solubilisation des composés phénoliques dépend de la nature du solvant utilisé. De ce fait, ce facteur conditionne la composition dans l'extrait brut. Afin que l'extraction soit optimale, il est nécessaire de trouver un compromis entre les critères suivants :

1) il doit être sélectif car l'extraction des polyphénols dépend de leur affinité avec le solvant.

2) il doit être capable de traverser la barrière inter particulaire pour atteindre les composés se trouvant à l'intérieur de la matrice poreuse du solide.

3) sa viscosité et sa masse volumique doivent être faibles afin de faciliter sa diffusion dans la matrice solide.

A l'échelle laboratoire, plusieurs solvants ont déjà été testés pour l'extraction des polyphénols l'utilisation de l'eau et d'un solvant alcoolique tel que l'éthanol ou le méthanol reste majoritaire. L'éthanol et le méthanol sont considérés comme des solvants verts et de moindre coût permettant de cibler l'extraction de classes de polyphénols précises telles que les tannins, les stibines et les flavonoïdes à partir des écorces (Fengel and Wegener, 1983)

❖ **Température**

La température est un paramètre important qu'il soit nécessaire d'optimiser car son élévation influence l'extraction solide-liquide de la manière suivante :

- Amélioration de la cinétique de diffusion ;
- Amélioration de la solubilité des composés phénoliques ;
- Réduction de la viscosité du solvant ;
- Amélioration de la perméabilité des membranes cellulaires et de la pénétration du solvant dans les micropores de la matrice de l'échantillon [38].
- Les composés phénoliques peuvent être dégradés à haute température car ce sont des molécules thermosensibles. Cependant, la température seule n'est pas l'unique facteur à prendre en compte pour éviter la dégradation des composés phénoliques. En effet, le couple temps-température doit être optimisé afin d'obtenir un extrait riche en solutés offrant des propriétés bioactives intéressantes. En général, l'extraction se fait à haute température lorsque sa durée est courte et vice versa.

❖ **Temps d'extraction**

Le temps d'extraction optimal est défini comme étant le temps au bout duquel la quantité extraite est constante (Bertucco and Franceshin, 2008) Le couple temps-température peut être considérablement réduit si l'on introduit dans le schéma de l'extraction des prétraitements électriques et/ou mécaniques.

❖ **Agitation**

L'addition d'un système d'agitation lors de l'extraction solide-liquide a un effet favorable sur la teneur en poly phénols extraite. En effet, l'agitation permet de maintenir en suspension les particules solides qui ont tendance à flotter sur la surface du liquide et permet également de

renouveler le film liquide au niveau de la couche limite. De plus, le mouvement du solide permet de réduire l'épaisseur de la couche limite et la résistance au transfert des solutés en augmentant le coefficient de transfert [39].

Tous ces paramètres sont des paramètres importants pour la diffusion solide-liquide Leur combinaison permettra d'obtenir un extrait riche en polyphénols dans un temps minimal pour éviter la dégradation des composés.

I.18. Méthodes alternatives

L'extraction de molécules issues du matériel végétal ou ligneux par les techniques conventionnelles se révèle être une étape souvent délicate et très longue qui nécessite une consommation importante de solvant. Cela a pour conséquence d'engendrer des dégradations des matières traitées (à chaud par exemple) et de diminuer le rendement d'extraction. Ceci a poussé les scientifiques du domaine à chercher de nouvelles techniques d'extraction permettant de réduire à la fois, le temps de l'opération, la consommation de solvant et la quantité d'effluents.

Les techniques modernes telles que l'extraction assistée par micro-ondes ou ultrasons, sont des techniques rapides et efficaces pour extraire des composés chimiques des plantes. Ces techniques peuvent fonctionner à haute température et/ou haute pression améliorant nettement la cinétique d'extraction [40].

I.19. Extraction assistée aux ultrasons

L'ultrason fait référence aux ondes sonores qui génèrent des vibrations mécaniques dans un solide, un liquide ou un gaz. Ces ondes sonores peuvent se propager dans une matière et elles impliquent des cycles d'expansion et de compression lors de la propagation dans le milieu. L'expansion peut créer des bulles qui se forment, se développent et s'effondrent dans un liquide. Près d'une surface solide, l'effondrement de cavité est asymétrique et produit un jet de liquide à grande vitesse, ce phénomène est appelé la cavitation acoustique [41].

L'extraction par ultrasons est une méthode simple, efficace et peu coûteuse. Ses avantages les plus significatifs sont liés à l'augmentation du rendement d'extraction et une accélération de la cinétique par rapport à une extraction classique. Elle permet de travailler à des températures relativement basses et d'éviter la thermodestruction des composés. Cette technique est facile à mettre en œuvre. Comme le Soxhlet, l'extraction par ultrasons permet d'utiliser une large gamme de solvant afin d'obtenir différents composés naturels. Cependant,

l'effet de l'extraction par ultrasons sur le rendement et la cinétique d'extraction est lié à la nature de la matrice végétale [42].

Le principe de cette procédure est illustré dans la figure suivante :

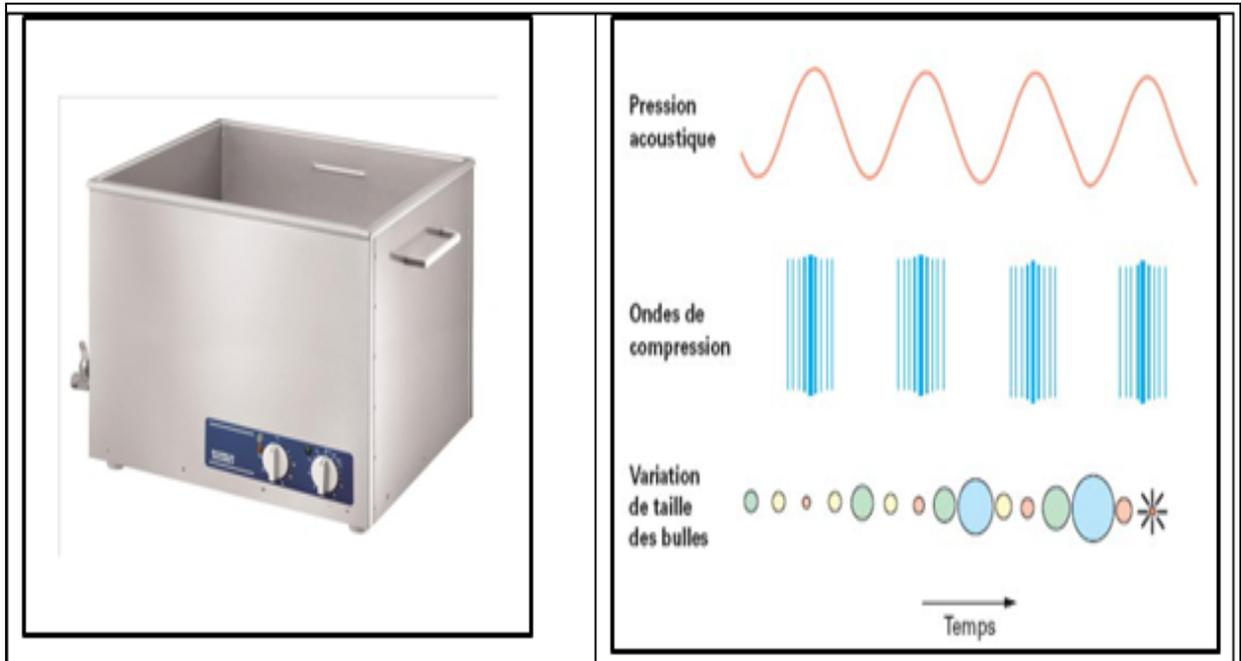


Figure I.14 : Représentation schématique du phénomène de Cavitation acoustique [42].

La procédure implique l'utilisation d'ultrasons avec des fréquences allant de 20 kHz à 2000 kHz; cela augmente la perméabilité de la cellule murs et produit la cavitation. Bien que le processus soit utile dans certains cas, son application à grande échelle est limitée en raison de son coût plus élevé. L'un des inconvénients de la procédure est la présence occasionnelle mais effet nocif connu de l'énergie ultrasonore (plus de 20 kHz) sur les composants actifs des plantes médicinales par la formation de radicaux libres et par conséquent des changements indésirables dans les molécules du médicament [35].

I.19.1 Les avantage

- Alternative aux méthodes conventionnelles qui s'avèrent simple et efficace.
- Fort rendement d'extraction.
- Augmentation de la cinétique d'extraction.
- Réduction du temps d'opération.
- Permet l'extraction de composés thermolabiles sans les dégrader.

- Comparé à d'autres nouvelles méthodes telles que l'extraction assistée par micro-ondes, l'extraction par ultrasons est moins chère et le procédé est plus facile à mettre en œuvre.
- Peut-être utilisée avec différents solvants comme pour les méthodes conventionnelles.

I.19.2 Les inconvénients

- L'effet des ultrasons sur le rendement et la vitesse d'extraction peut être lié à la nature de la matrice de la matière végétale.
- La présence d'une phase dispersée contribue à l'atténuation des ondes ultrasonores dans le milieu et la partie active des ultrasons à l'intérieur de l'extracteur est restreinte à une zone localisée uniquement autour de la source d'émissions des ultrasons. Ces deux facteurs doivent être pris en compte dans le design des extracteurs ultrasoniques.

Plusieurs paramètres gouvernent l'action des ultrasons et leur performance. On peut citer les paramètres liés à l'extraction de manière générale tels que la composition du solvant (rapport liquide/solide), la taille des particules, etc. et les paramètres spécifiques aux ultrasons tels que la fréquence, la température de l'extraction par ultrasons, la puissance, etc. Il est nécessaire d'étudier l'effet de ces paramètres sur l'extraction afin d'optimiser et de maximiser les quantités extraites.

❖ La fréquence

La fréquence des ultrasons a un effet majeur sur le rendement d'extraction indirectement. En effet, à des fréquences sonores élevées, de l'ordre du MHz, la production de bulles de cavitation devient plus difficile que dans les basses fréquences sonores, de l'ordre du kHz (Santos et al. 2008)

❖ Le solvant

La sélection d'un solvant est généralement basée sur l'affinité moléculaire entre le solvant et le soluté. Cependant, le phénomène de cavitation est affecté par la nature et les propriétés physiques du solvant. Généralement, l'extraction est réalisée dans l'eau mais il existe dans la littérature des extractions à l'aide de solvants organiques tels que l'éthanol. De manière générale, la présence et/ou l'intensité de la cavitation décroît si la pression de vapeur et la viscosité du solvant augmentent [43].

❖ La température

La température est un paramètre qui intervient à différents niveaux de l'extraction assistée par ultrasons. En effet, l'augmentation de la température permet d'améliorer la solubilité des molécules et leurs coefficients de diffusion. Cependant, l'abaissement de la température

favorise les réactions sonochimiques car l'intensité de la cavitation est meilleure à des températures faibles (Mason, 1991).

Il est possible de réaliser l'extraction dans un récipient placé dans un bain de glace ou bain glycolé pour stabiliser la température à une valeur faible (**Royer et al. 2010b**)



Chapitre II: Matériels & Méthodes

II.1. Matériels et méthodes :

Ce travail a été réalisé au laboratoire de la chimie, Labo de science exacte, science de la nature et de la vie, Université l'Arbi Tébessa et au sein de l'unité de recherche de valorisation des ressources Naturelles, molécules Bioactives et analyse physicochimique et biologique (VARENBIOMOL).

II.2. Matière végétal

La matière végétal est constitué de 543,07g des parties aériennes de la plante: la luzerne (*Medicago sativa L*); prélevé le mois de Décembre-Fièvre 2022, dans la Wilaya de Constantine.



Figure II.1 : Carte géographique de *Medicago sativa L*

II.3. Extraction de *Medicago sativa L*

Le but de ce modeste travail est de faire une comparaison entre des différentes méthodes d'extraction classiques dites conventionnelles telles que l'infusion, hydro distillation la macération, l'extraction par soxhlet et de nouvelles méthodes dites innovantes telles que l'extraction par ultrason (sonication).

II.3.1. Extraction par macération

C'est une technique d'extraction pour isoler les constituants d'un solide (généralement de la matière végétale). L'extraction par macération est généralement effectuée avec un mélange hydroalcoolique à température ambiante et elle a été réalisée, comme précédemment, sur la matière végétale sous ses deux formes sèche et fraîches selon le protocole suivant.

II.3.1.a. Matière fraîche

Une masse de 120g des parties aériennes de la plante fraîche a été bien nettoyée du sable et d'autres débris végétaux puis mise à macérer directement dans un mélange hydroalcoolique (éthanol/eau; 80/20; V/V) pendant 72 heures. L'extrait récupéré a été filtré puis concentré sous pression réduite à température n'excédant pas 40°C.

II.3.1.b. Matière sèche

Une quantité des parties aériennes de la plante a été séchée dans un endroit sec et aéré, à l'abri des rayons solaires. Les feuilles sèches sont broyées entièrement puis pesées (m=120g). La matière végétale obtenue a été mise à macérer dans un mélange hydroalcoolique (éthanol/eau; 80/20; V/V) pendant 72 heures. L'extrait obtenu a été filtré puis concentré sous pression réduite à température n'excédant pas 40°C. L'extrait brut obtenu est pesé et nommé puis conserver jusqu'à son utilisation.

Les deux extraits obtenus ont été nommés MF et MS respectivement.

Le schéma suivant (**Figure II.2**) illustre ces étapes

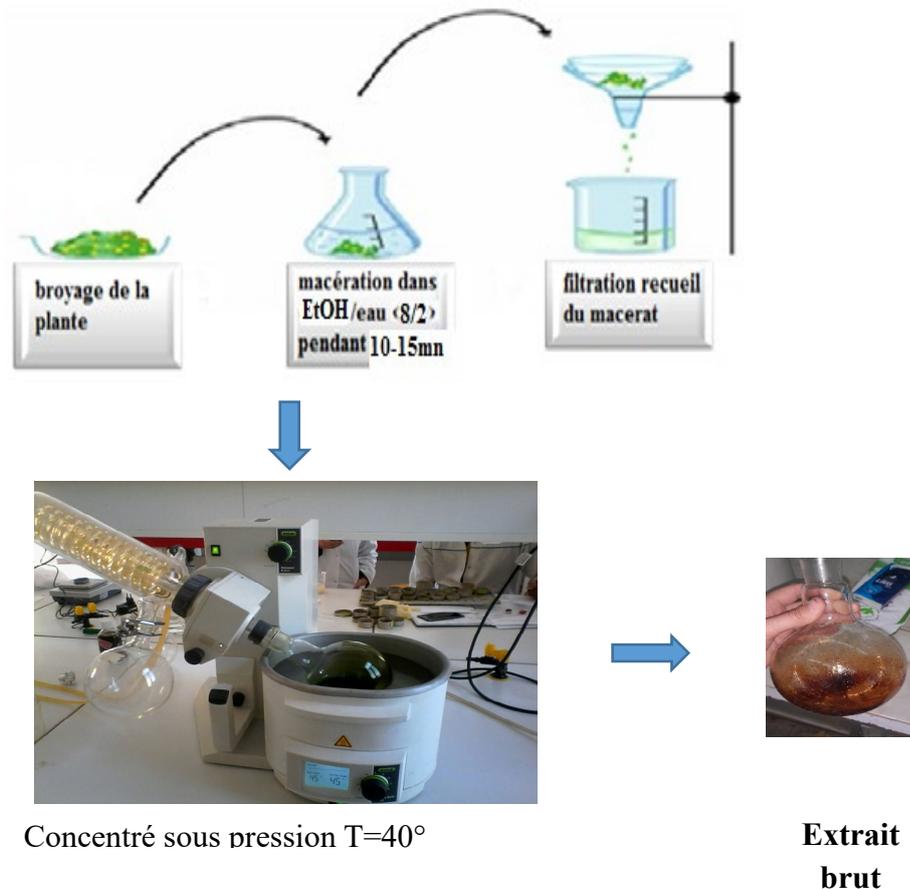


Figure II.2 : les étapes dans macération.

II.3.2.Extraction par infusion

Cette méthode d'extraction est généralement effectuée par de l'eau bouillante comme solvant (préparation d'une tisane) mais dans cette méthode extraction on va utiliser l'eau et éthanol comme solvant ainsi et elle a été effectuée sur la matière sous forme sèche et également sous forme fraîche selon les étapes suivantes :

II.3.2.a. Extraction par infusion dans le solvant eau

- Une masse de 50g de plante sèches a été nettoyée et pesée puis placée dans un erlenmeyer de 250ml.
- Une quantité d'eau distillée bouillante a été versée sur la matière végétale.
- La mixture a été laissée au repos pendant 10 à 15 minutes.
- Filtration du mélange.
- Evaporation du filtrat à sec à l'aide d'un évaporateur à température n'excédant pas 40°C (généralement entre 38°et 40°C).
- Le filtrat obtenu a été pesé puis conserver jusqu'à son utilisation.

La même opération a été effectuée pour 50 g de la plante fraîche après avoir été débarrassée des débris végétaux. Les deux extraits obtenus ont été nommés IF et IS respectivement.

II.3.2.b. Extraction par infusion dans le solvant éthanol

De la même manière, deux autres extraits ont été obtenus avec de l'éthanol pur EtOH comme solvant et ont été nommés IEtF et IEtS respectivement.

II.3.3. Extraction par soxhlet

L'extraction par soxhlet a été faite, également avec un mélange hydro alcoolique et elle a été réalisée sur la matière sèche.

II.3.3.a. Matière sèche

Une masse de 150g de la plante sèche a été placée dans une cartouche en papier-filtre, l'extracteur est placé sur un ballon contenant l'EtOH comme solvant d'extraction. Le ballon est chauffé afin de pouvoir faire bouillir son contenu. La cartouche contenant la plante à extraire est insérée dans l'extracteur, au-dessus duquel est placé un réfrigérant servant à liquéfier les vapeurs du solvant. Au fil des cycles, le solvant s'enrichit en substances extraites jusqu'à épuisement de l'échantillon en substances d'intérêt, cette opération a durée 8 heures.

Ensuite, la solution hydroalcoolique a été récupérée, filtrée puis évaporée à sec sous pression réduite à température n'excédant pas 40°C.

II.3.4. Extraction par ultrason

L'extraction par les ultrasons est une technique de choix, pour les solvants de faible point d'ébullition, à des températures d'extraction inférieures au point d'ébullition. L'avantage essentiel de ce procédé est de réduire considérablement la durée d'extraction, d'augmenter le rendement en extrait et de faciliter l'extraction de molécules thermosensibles [44].

Dans cette méthode d'extraction, la matière fraîche est immergée dans un solvant dont la température est fixée entre 32 et 38°C en faisant varier la fréquence sonore ou la durée de l'extraction. Pour se faire, nous avons procédé à l'extraction des feuilles de *medicago sativa l par* deux solvants à savoir eau et EtOH.

II.3.4.a. Extraction par ultrason dans le solvant eau

Une première extraction a été faite au laboratoire VARENBIOMOL en utilisant un appareil Ultrason non réglable. La température de l'eau du bain marie de l'ultrason a été mesurée à l'aide d'un thermomètre à la fin de l'expérience, cette dernière était de 38°C. Les étapes suivantes ont été effectuées sur la matière végétale fraîche.

- Une quantité de 15g de la matière végétale est mise dans un erlenmeyer contenant un solvant de l'eau Ce dernier est placé dans l'appareil de l'ultrason pendant 30minutes à température n'excédant pas 38°C.
- Après 30 mn, l'erlenmeyer contenant la matière végétale est récupéré puis filtré.
- Le filtrat est concentré sous pression réduite à une température n'excédant pas 40°C.
- L'extrait obtenu est pesé puis conservé jusqu'à son utilisation. Est Nommé Et10.
- La même opération a été effectuée pour 15 g de la plante fraîche pendant 10min. Les extraits obtenus ont été nommé Et30.

II.3.4.b. Extraction par ultrason dans le solvant éthanol

De la même manière, deux autres extraits ont été obtenus avec de l'éthanol pur EtOH comme solvant pendant 30min et 10min dans la même manière. L'extrait obtenu a été nommé EtOHt10 et EtOHt30.

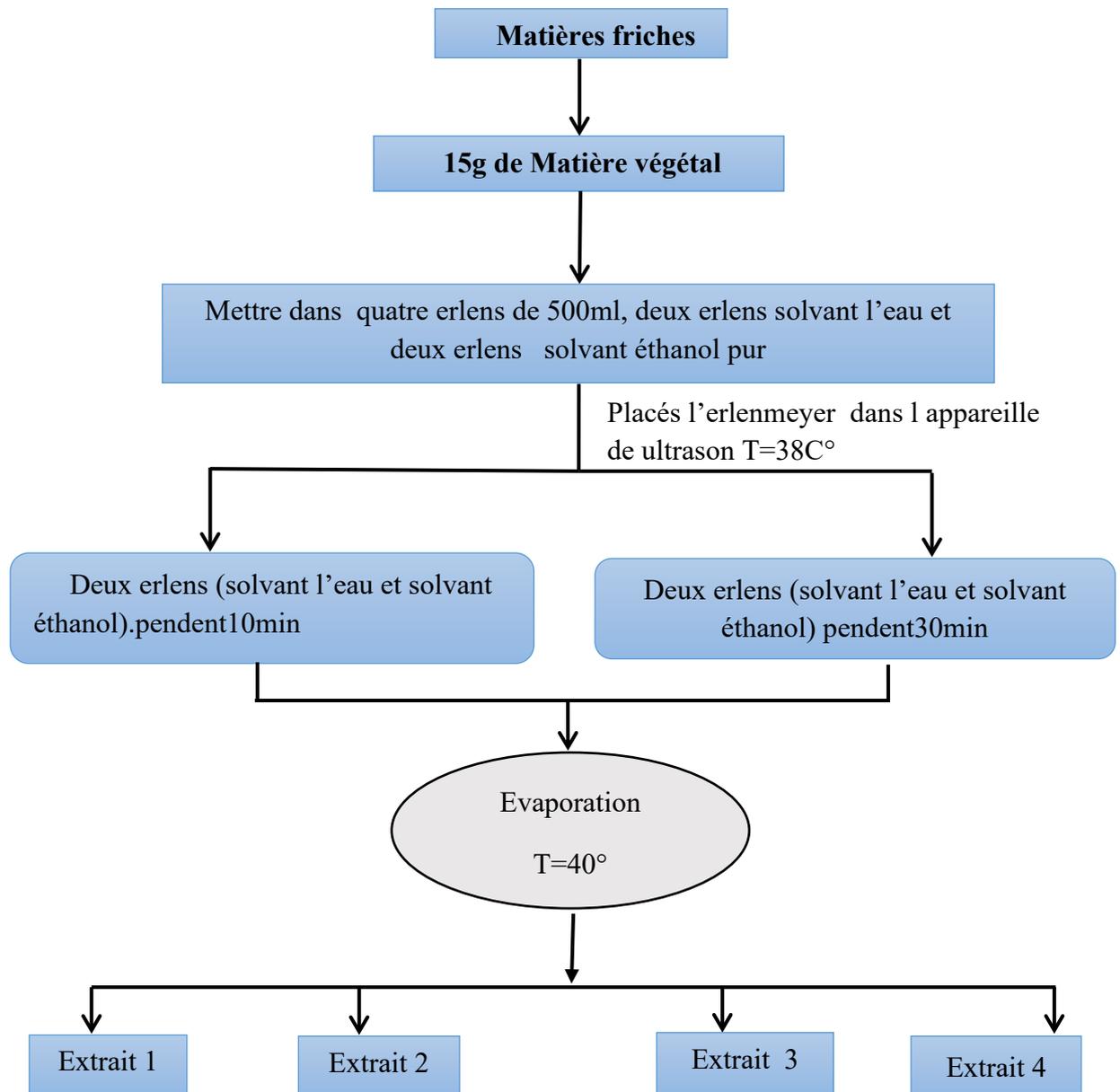


Figure II.3: Organigramme d'extraction par ultrason.

II.3.5. Extraction par hydro distillation : Extraction par hydrodistillation permet la réalisation d'une réaction lente à température constante. Le mélange hydro alcoolique atteint un équilibre thermique lorsqu'il est à ébullition ; les vapeurs dégagées se condensent sur les parois froides du réfrigérant.

Cette méthode a été réalisée, comme précédemment, sur la matière végétale fraîche selon le protocole suivant.

II.3.5.a. Matière sèche

Une masse de 50g de la plante sèche a été bien nettoyée puis mise à macérer directement dans un mélange hydro alcoolique (éthanol/eau; 80/20; V/V) porté à ébullition pendant 8 heures. L'extrait récupéré a été filtré puis concentré sous pression réduite à température n'excédant pas 40°C.

Le extrait obtenu ont été nommé HS.

Le schéma suivant illustre ces étapes :

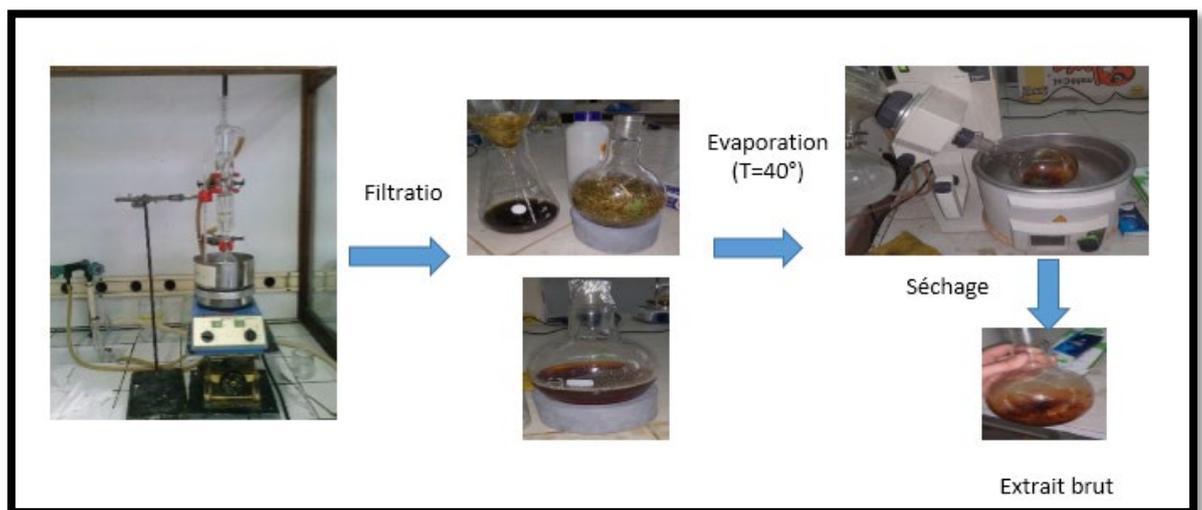


Figure II.4:extraction par hydro distillation.

II.4. Détermination du rendement

Le poids de l'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après Évaporation) et le poids du ballon vide (avant évaporation) [45]

$$R\% = \frac{\text{Masse de l'extrait}(g)}{\text{Masse de la plante } (g)} \times 100$$

II.5. Dosage des poly phénols

Le dosage des poly phénols se fait avec le réactif de Folin Ciocalteu (singleton et Ross en1965).

➤ Réactifs utilisés :

- ❖ Eau distillé.
- ❖ FCR (folin ciocalteu réactif) (0.2N).
- ❖ Na₂CO₃ (75%) (carbonate de sodium).
- ❖ Acide gallique.
- ❖ Extrait de plante.

✧ **Protocol de dosage**

{ 0.25ml (250µl) extrait ou acide gallique +1.25 ml (1250µl) Folin }

- ✧ Incube pendant 5min dans l'obscurité +1ml (1000µl) Na₂CO₃
- ✧ Incube pendant 2h dans l'obscurité à température ambiante.
- ✧ La lecture à 760 nm.

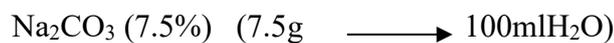
➤ **préparation de la gamme d'étalon de l'acide gallique (les dilutions d'AG)**

On prend (1mg) de l'acide gallique et on le dissout dans (1ml) d'eau distillé pour obtenir la solution S1. (1mg/1ml)(AG/H₂O) \implies S1

➤ **Les dilutions**

- 300 µg/ml \longrightarrow 0.3 ml de S₁+0.7 ml de H₂O \longrightarrow A₁
- 200 µg/ml \longrightarrow 0.2 ml de S₁+0.8 ml de H₂O \longrightarrow A₂
- 150 µg/ml \longrightarrow 0.15 ml de S₁+0.85 ml de H₂O \longrightarrow A₃
- 100 µg/ml \longrightarrow 0.1 ml de S₁+0.9 ml de H₂O \longrightarrow A₄
- 50 µg/ml \longrightarrow 0.05 ml de S₁+0.95 ml de H₂O \longrightarrow A₅
- 25 µg/ml \longrightarrow 0.025 ml de S₁+0.975 ml de H₂O \longrightarrow A₆
- 10 µg/ml \longrightarrow 0.01 ml de S₁+0.99 ml de H₂O \longrightarrow A₇
- 5 µg/ml \longrightarrow 0.005 ml de S₁+0.995 ml de H₂O \longrightarrow A₈

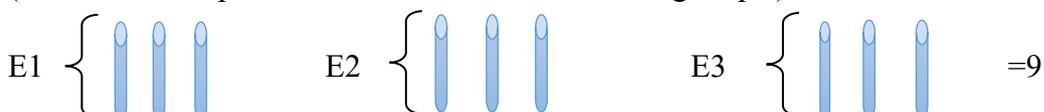
➤ **préparation de carbonate de sodium**



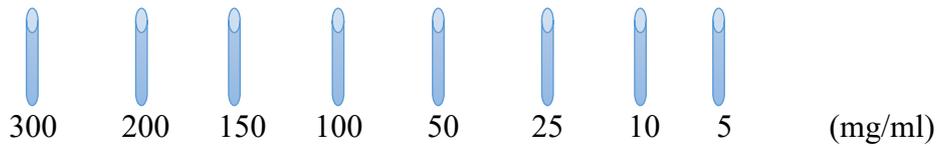
Exemple pour 3 extraits (E1, E2, E3) .

(3 extraits x 3 répétitions =9 + 8 dilution de l'acide gallique) 17 tube

(3 extraits x 3 répétitions =9 + 8 dilution de l'acide gallique) 17 tube



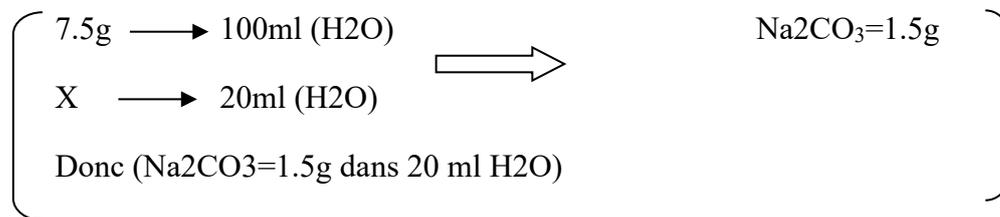
➤ **Acide gallique**



Protocole (1ml de Na₂CO₃) donc :

1ml x 17 tube = 17ml de Na₂CO₃

Remarque il faut préparer une quantité supérieure à 17 ml (ex : 20ml) (20ml > 17ml).



➤ **Préparation de Folin**

Protocole (1.25ml ,0.2N).

Exemple pour 3 extraits (E1 ; E2 ; E3) .

3 extrait x 3répétition + 8dilution = 17 tube

Donc 1.25ml x 17 tube =21.25 ml

Remarque : il faut préparer une quantité supérieure à 21.25 ml (ex : 24 ml) (24 > 21.25)

Remarque : dans le laboratoire le folin disponible c'est le folin de (2N).

Donc C₁V₁=C₂V₂ ⇒ 2.V₁= 0.2 x24

V₁= (0.2x24)/2 ⇒ V₁=2.4 ml de folin

2.4 ml de folin + 21.6 de H₂O = 24 ml solution de folin

II.6. Dosage des flavonoïdes

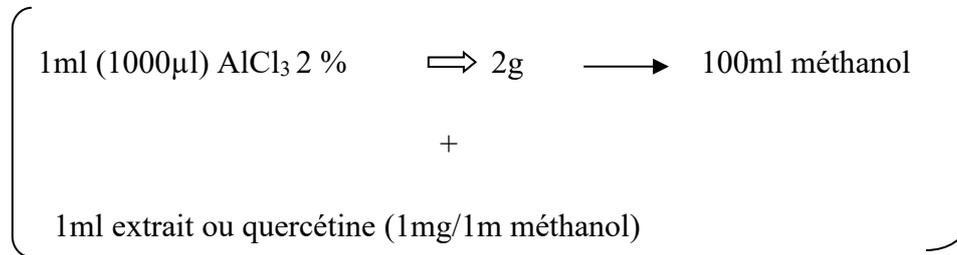
La concentration des flavonoïdes dans les extraits est basée sur la complexations avec Al³⁺ et les résultats sont exprimés en équivalents de quercétine (Aline Meda erale 2004) (Arvouet grand vennat lourrat 1994).

➤ **Réactifs utilisés**

- ✦ Méthanol.

- ✧ Trichlorure d'aluminium AlCl_3 (2 % dans le MeOH).
- ✧ Quercétine.
- ✧ Extrait de plante.

➤ **Protocole de dosage :**



- ✧ Incube pendant 1 h dans l'obscurité.
- ✧ La lecture à 415 nm.

➤ **Préparation de la gamme d'étalon de la quercétine (les dilutions de QE) :**

On prend 1mg de quercétine et on le dissout dans 1ml de méthanol pour obtenir la solution S1.

(1mg quercétine / 1ml de méthanol) \longrightarrow S1

➤ **Les dilutions**

100 $\mu\text{g/ml}$ \longrightarrow 0.1 ml de S1+0.9 ml de méthanol \longrightarrow A1

50 $\mu\text{g/ml}$ \longrightarrow 0.05 ml de S1+0.95 ml de méthanol \longrightarrow A2

25 $\mu\text{g/ml}$ \longrightarrow 0.025 ml de S1+0.975 ml de méthanol \longrightarrow A3

10 $\mu\text{g/ml}$ \longrightarrow 0.01 ml de S1+0.99 ml de méthanol \longrightarrow A4

5 $\mu\text{g/ml}$ \longrightarrow 0.005 ml de S1+0.995 ml de méthanol \longrightarrow A5

➤ **Préparation d' AlCl_3**

AlCl_3 (2%) (2g \longrightarrow 100 ml méthanol)

Exemple pour 3 extraits E1, E2, E3 :

$$\left(\begin{array}{l} 3 \text{ Extraits} \times 3 \text{ répétition} = 9 \\ + \\ 5 \text{ dilutions de la quercétine} \end{array} \right) = 14 \text{ tube}$$

Protocole (1ml de AlCl_3) donc :

$$1 \text{ ml} \times 14 \text{ tube} = 17 \text{ ml } \text{AlCl}_3$$

Il faut préparer une quantité supérieure à 14 ml

$$\text{(Exemple 16 ml)} \quad 16 > 14$$

$$\left(\begin{array}{l} 2 \text{ g} \longrightarrow 100 \text{ ml méthanol} \\ X \longrightarrow 16 \text{ ml} \end{array} \right) \Rightarrow \text{AlCl}_3 = 0.32 \text{ g}$$

Donc ($\text{AlCl}_3 = 0.32 \text{ g}$ dans 16 ml méthanol)

II.7. Méthode de dosage des composés phénoliques

La technique utilisée pour le dosage des composés phénoliques est la Spectrométrie d'absorption moléculaire de l'ultraviolet et du visible, cette dernière repose sur l'absorption des radiations lumineuses par la matière dans la plage spectrale s'étendant du proche ultraviolet au très proche infrarouge, soit entre 180 et 1100 nm. Cette partie du spectre est désignée par l'UV-vis, parce qu'elle englobe les radiations perceptibles par l'œil humain.

D'une manière générale elle apporte peu d'informations structurales, mais elle- a- en- revanche, beaucoup d'applications en analyse quantitative. Les calculs de concentration qui découlent de la- loi- de- Beer Lambert ont donné naissance à la méthode connue sous le terme général de colorimétrie. Celle-ci s'applique non seulement aux composés qui possèdent un spectre d'absorption dans le visible mais aussi à tous ceux qui conduisent au moyen d'un réactif spécifique à un dérivé permettant une mesure d'absorbance [46]. Les mesures d'absorption peuvent se faire avec tout un choix d'appareils qui vont des comparateurs de couleurs et autres colorimètres visuels simples, aux spectrophotomètres automatiques adaptés à l'analyse multi composants comme le montre la (Figur.II.5).



Figur.II.5 : appareille spectrophotomètre Thermo Electron Corporation.

II.8. Dosage des polyphénols totaux

Les composés poly phénoliques forment un très vaste ensemble de substances qu'il est difficile de définir aisément. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est lié au moins un groupe hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction (éther, ester, hétéroside ...) [47].

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par la méthode adaptée par (Singleton et Ross (en 1965)) avec le réactif de Folin-Ciocalteu [48]. Le réactif est formé d'acide phosphotungestique $H_3PW_{12}O_{40}$ et d'acide phosphomolybdique $H_3PMo_{12}O_4$. Elle est basée sur une réaction d'oxydoréduction au cours de laquelle, la fonction OH des phénols est oxydée pendant que le réactif de Folin est réduit en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_3). La réduction du Folin entraîne une diminution de ses propriétés colorimétriques, sa couleur initialement jaune vire au bleu en solution après la réaction avec les composés phénoliques, ce qui permet le dosage des phénols dans le visible à une longueur d'onde de l'ordre 760 nm.

L'opération a été réalisée selon la procédure expérimentale suivante :

- Une solution mère d'acide gallique a été préparée avec une concentration de 1mg/ml (1000 μ g/ml) à partir de laquelle on a préparé 10ml de chaque solution fille de différentes concentrations (5 ; 10; 25; 50 ; 100 ; 150 ; 200 ; 300 μ g/ml). Cette gamme de concentrations filles permet l'obtention d'une courbe d'étalonnage standard.
- 250 μ l de chaque solution ont été introduits à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 1250 μ l du réactif de Folin-Ciocalteu (1N).
- Après agitation puis un repos pendant 5 minutes à température ambiante et à l'obscurité 1ml (1000 μ L) de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 20% a été ajoutés.
- Les solutions sont maintenues à l'obscurité pendant 2 heures à température ambiante et l'absorbance de chaque solution a été déterminée à 760 nm sur un spectrophotomètre Thermo Electron Corporation, Evolution 300.
- Cette procédure est résumée dans (**Figure II.6**).

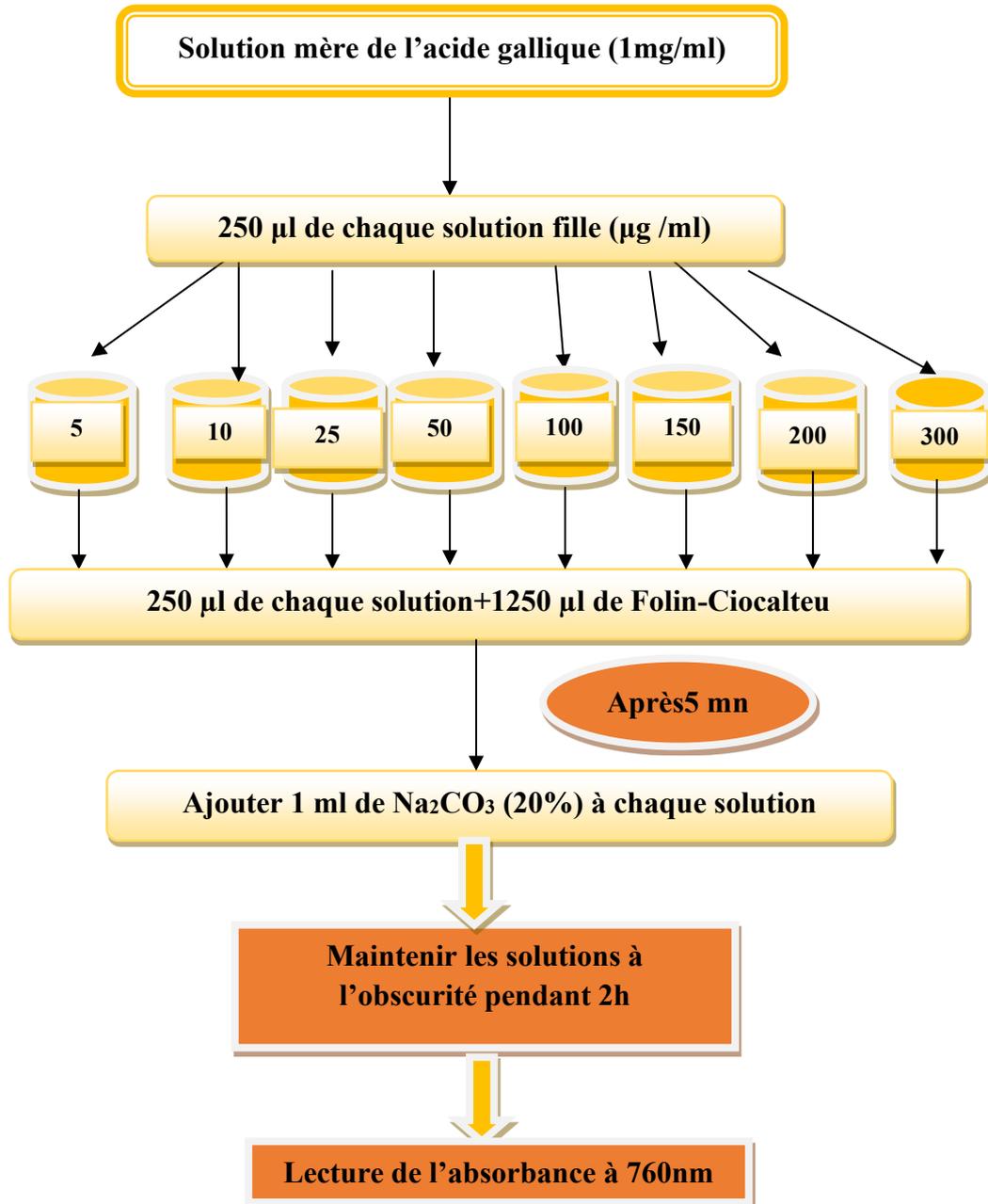


Figure II.6: préparation de polyphénols.



Figure II.7 : préparation de polyphénol.

Cette étape a permis l'obtention de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique présentée dans (Figure II.8).

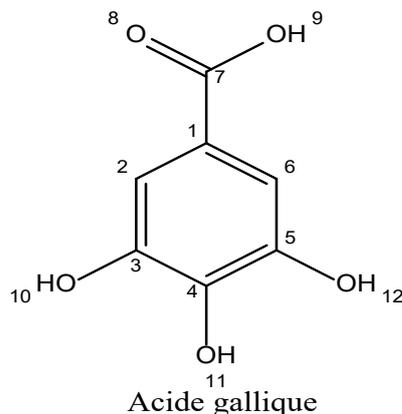


Figure II.8: Structure de l'acide gallique.

II.9. Dosage des flavonoïdes totaux

Les flavonoïdes constituent la classe plus importante des polyphénols. La méthode de trichlorure d'aluminium est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les différents extraits obtenus à 1 ml d'échantillon ou standard (préparé dans le MeOH) est ajouté 1 ml de la solution AlCl_3 (2 % dans le MeOH). Après 1 heure de réaction l'absorbance est lue à 415nm [49].

L'opération a été réalisée selon la Procédure expérimentale suivante :

- Une solution mère de quercétine a été préparée avec une concentration de 1mg/ml (1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) à partir de laquelle on a préparé 10ml de chaque solution fille de différentes concentrations 5 ; 10 ; 25 ; 50; 100 ; 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Cette gamme de concentrations filles permet l'obtention d'une courbe d'étalonnage standard.
- 1 ml de chaque solution a été introduit à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 1 ml du réactif AlCl_3 (2%).

Après agitation puis un repos 1 heure à température ambiante et à l'obscurité et l'absorbance de chaque solution a été déterminé à 415 nm sur un spectrophotomètre Thermo Electron Corporation, Evolution 300. L'organigramme représenté dans (Figure II.9)

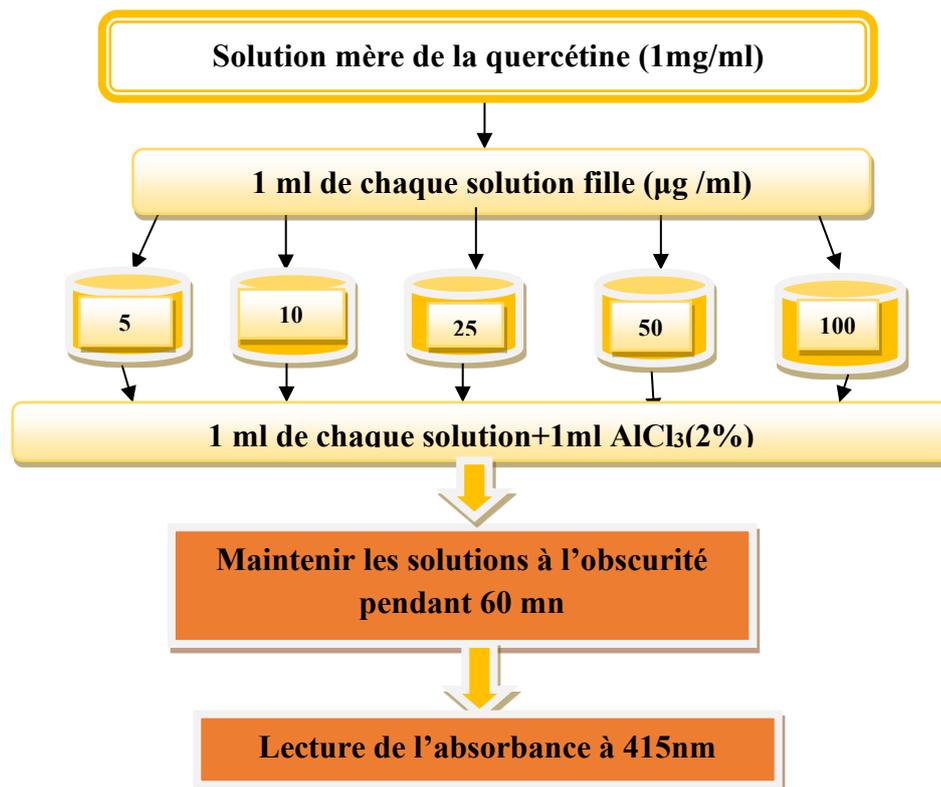


Figure II.9 : organigramme décrivant les étapes d'élaboration de la courbe d'étalonnage de la quercétine.

Cette étape a permis de tracer la courbe d'étalonnage de la quercétine .le structure de quercétine présenté dans la figure II.10.

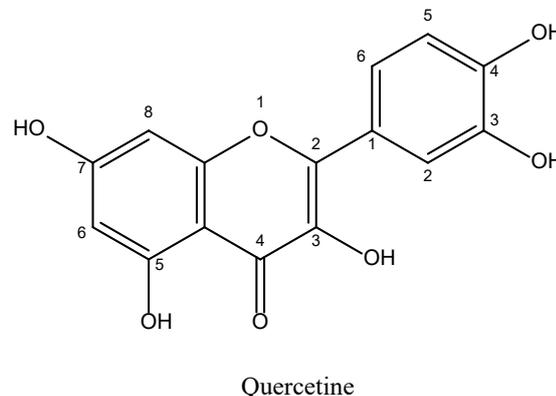


Figure II.10 : Structure de la quercétine.

II.10. Détermination de la teneur en cendre et la matière organique

On me tune masse de 14, 79 g de la plante sèche a été bien nettoyée et coupé dans un creuset et placé dans le four à moufle à 800°C.pendant 10 heures jusque obtention d'une poudre grise.

La (Figure II.1) illustre ces étapes :



Figure II.11 : les étapes de carbonisation de plante.

II.11. Calcul le rendement

Pour calculé Le rendement (R%) de la matière organique(MO) et matière cendre(MCd) a été calculé en utilisant les deux formule suivante :

1_matière organique

$$MO\% = \frac{\text{Matière végétal} - \text{Matière cendre}}{\text{Matière végétal}} \times 100$$

2_matière cendre

$$MCd\% = \frac{\text{Matière cendre}}{\text{Matière végétal}} \times 100$$

Conclusions

Dans ce chapitre on réalise les étapes d'extraction de la plante *Medicago sativa L* par l'utilisation de différents méthodes d'extraction classique (Macération, hydrodistillation, infusion, Soxhlet) et autre méthode alternative dit extraction par ultrason, ensuite nous avons fait le dosage de polyphénol et flavonoïdes et nous déterminons la teneur en cendre et matière organique.

Les résultats de ce travail sont regroupés dans la chapitre III.



Chapitre III : Résultats & discussion

Résultats et discussion

Dans la première partie de cette étude, quatre méthodes classiques d'extraction ont été employés pour extraire des composés phénoliques à partir de l'espèce *Medicago sativa L* (utilisée sous les deux formes fraîche et sèche) à savoir la macération à froid, Hydro distillation, Infusion et l'extraction par soxhlet.

III .1 Résultats de l'extraction par les méthodes classiques

III .1 .1 Aspect des extraits obtenus

Tous les extraits acquis avaient un aspect pâteux et de couleur verte. Cette différence de couleur peut être expliquée par la présence de la chlorophylle dans les extraits hydroalcoolique à cause de sa forte solubilité dans ces derniers.

III .1 .2 Calcul de rendement

Le poids de l'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après évaporation du solvant) et le poids du ballon vide. Le rendement (R%) des extraits a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$R\% = \frac{\text{Masse de l'extrait}(g)}{\text{Masse de la plante } (g)} \times 100$$

Les valeurs des rendements d'extraction par les méthodes classiques dans la plante fraîches et sèches de *Medicago sativa L* sont indiquées dans le **tableau III.1**.

Tableau III.1 : Tableau montrant les rendements d'extraction (sèche et fraîche) par trois méthodes.

Méthode d'extraction	Type de la matière végétale	Masse obtenue(g)	Rendement %
Macération	Fraîche	5,32	4,43
	Sèche	2,94	2,45
hydro distillation	Sèche	11,98	23,96
Soxhlet	Sèche	14,11	9,40

Le rendement d'extraction est le rapport de la quantité de substances naturelles extraites par l'action extractive d'un solvant à la quantité de ces substances contenues dans la matière

végétale. Il dépend de plusieurs paramètres tels que la nature du solvant, la température, le temps d'extraction et la composition de l'échantillon lui-même [50].

Les résultats décrits dans ce tableau révèlent une première différence significative entre les valeurs de rendement de l'extraction de la matière sèche et ce pour les trois méthodes utilisées. En effet, la matière sèche montre un rendement beaucoup plus important que la matière fraîche qui peut s'expliquer par la présence d'une grande quantité d'eau dans la matière végétale fraîche et ceci se répercute sur la quantité des substances présentes.

L'extraction par hydro distillation, semble être la meilleure, donnant ainsi le rendement le plus élevé (23,96%) suivie de l'extraction par Soxhlet (9,40%) et en dernier vient l'extraction par macération (2,45%). Cette différence des valeurs des rendements, qui n'est pas vraiment significative entre ces trois méthodes, est due probablement à la durée de l'extraction d'une part et d'autre part à la chaleur ou la température du solvant extracteur.

En effet, pour le même solvant EtOH/H₂O (80/20), hydro distillation donne le meilleur rendement parce qu'il se base sur le renouvellement du solvant chauffé (température élevée) par un processus de circuit fermé pour une durée de 8 heures d'où vient son efficacité élevée [50]. Par contre, le Soxhlet (9,40%) dont la durée était plus courte par rapport à la macération mais à température beaucoup plus élevée et en dernier vient la macération (2,45%) qui a été faite à froid (température ambiante) avec une durée plus importante (72 heures).

D'après **Quy Diem Do et al.** L'utilisation combinée de l'eau et d'un solvant organique peut faciliter l'extraction des substances chimiques qui sont solubles dans l'eau et / ou dans le solvant organique en faisant varier la température et la durée de l'extraction [51].

En conclusion, il est difficile de comparer les résultats de rendements avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée ainsi que la nature du matériel végétal lui-même.

III .1 .3 Résultats de l'analyse quantitative

Cette première expérience a été réalisée au laboratoire l'unité de recherche de valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyse Physicochimiques et Biologiques (**VARENBIOMOL**).

À l'aide d'un appareil Spectrophotomètre qui conduit un réactif spécifique à un dérivé permettent mesurer l'absorbance de polyphénol totaux et de flavonoïde totaux.

III.1.3.1 Résultats de dosage des polyphénols

La détermination de la teneur en polyphénols dans les extraits de *Medicago sativa L* est estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu. La quantité des polyphénols correspondante a été exprimée par une courbe d'étalonnage linéaire qui a été rapportée en microgramme d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{gEAG}/\text{mg}$) et déterminé par l'équation de type :

$$y = 0,0097x + 0,0737 \text{ avec } R^2 = 0,9961$$

Tableau III.2. Présent le résultat de l'absorbance de l'acide gallique avec la concentration.

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
C ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	5	10	25	50	100	150	200
A	0,0753	0,1248	0,2951	0,5855	1,0809	1,6032	2,0929

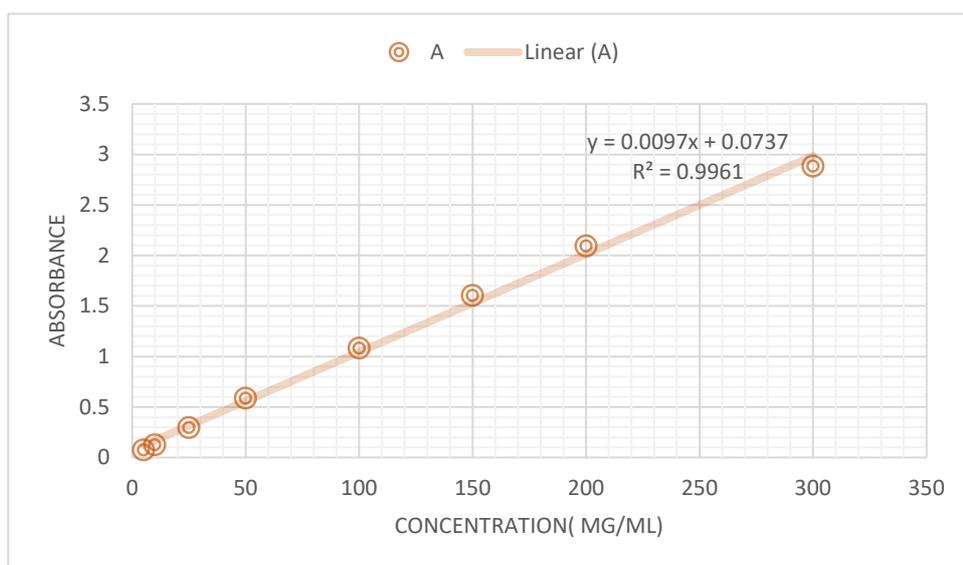


Figure III.1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage (**Figure III.1**) et est exprimée en μg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG}/\text{mg}$ d'extrait). Chaque valeur est la moyenne de deux lectures.

III .1 .3 .2 Résultat du dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes a été déterminée par la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl₃) pour l'extrait et a été rapportée en µg d'équivalent de quercétine /mg d'extrait. Les résultats sont exprimés en fonction de la courbe d'étalonnage qui suit une équation de type :

$$y = 0,0206 x + 0,0472 \text{ sachant que } R^2 = 0,9963.$$

Le tableau III.3. Présent l'absorbance la Quercétine avec la concentration.

	S1	S2	S3	S4	S5	S6
C (µg/ml)	5	10	25	50	100	150
A	0,1168	0,2273	0,5785	1,0814	2,239	3,057

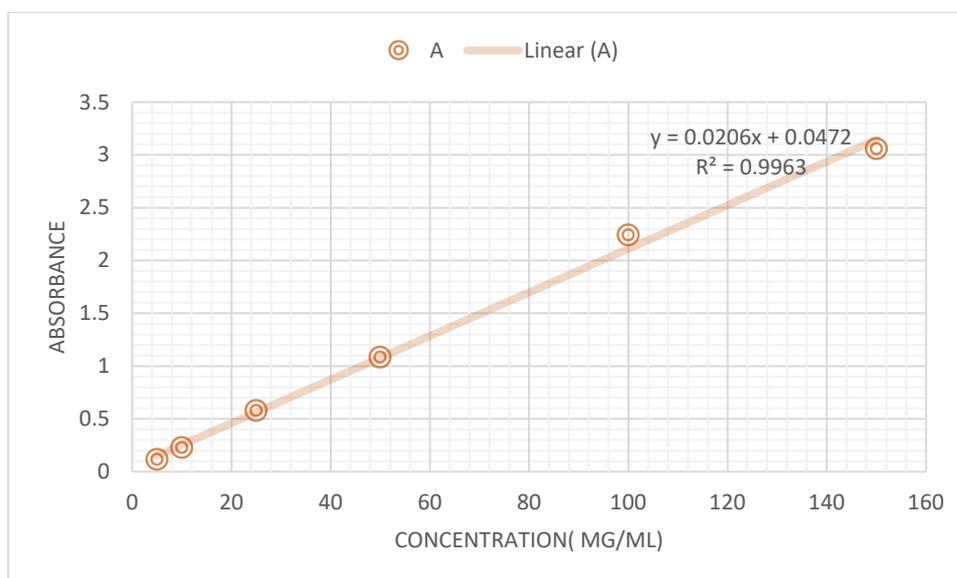


Figure III.2 : courbe d'étalonnage de la Quercétine.

Pour les échantillons, chaque concentration est répétée deux fois. De même, la lecture a été faite au moyen du spectrophotomètre à 415 nm. Chaque valeur est la moyenne de deux lectures. La quantité des flavonoïdes des extraits MS, MF, SS et HS de l'espèce *Medicago sativa L* est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait).

Le tableau III.2 présente Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits MS, MF, SS et HS l'espèce *Medicago sativa L* sont reportés sous forme d'historgramme dans la figure ci-dessous (Figure III.2).

Tableau III.4 : Taux de polyphénols et de flavonoïdes totaux des extraits (MS, MF, SSetHS) obtenus par trois méthodes.

Extrait	Taux de Polyphénols totaux ($\mu\text{g EAG/ mg d'extract}$)	Taux de flavonoïdes totaux ($\mu\text{g QE/ mg d'extract}$)
MS	14,401 \pm 0,074	4,676 \pm 0,031
MF	89,95 \pm 0,044	25,042 \pm 0,10
SS	39,71 \pm 0,057	34,09 \pm 0,025
HS	55,52 \pm 0,043	15,2 \pm 0,072

- MS : Macération sèche
- MF : macération fraîche
- SS : soxhlet sèche
- HS : Hydrodistillation

Les valeurs sont exprimées en moy \pm DS

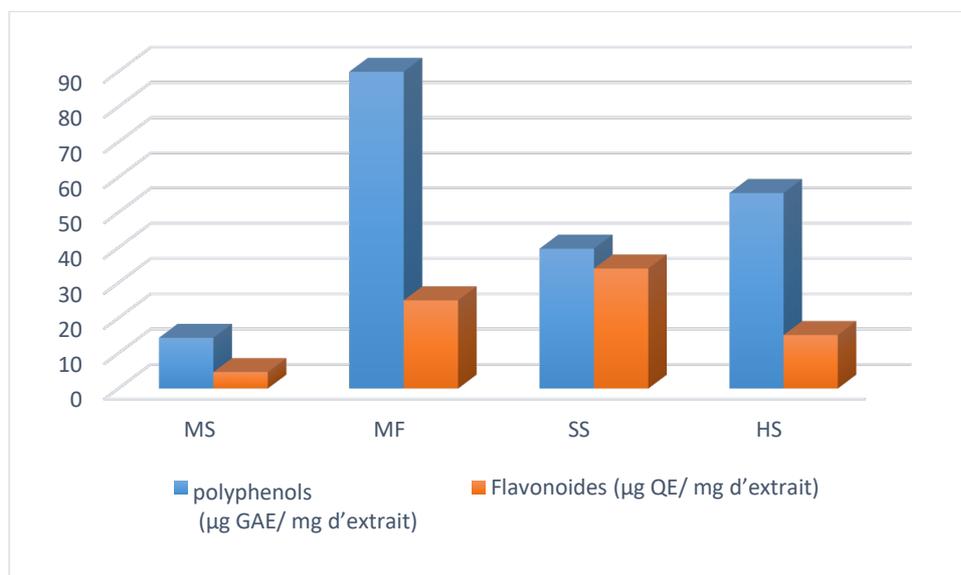


Figure III.3 : Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes dans les 4 extraits *Medicago sativa L.*

D'après les histogrammes de la figure III.3, les teneurs en polyphénols enregistrés, en équivalent d'acide gallique, sont plus importants dans tous les extraits comparativement à ceux des flavonoïdes enregistrés en équivalent de quercétine. Les teneurs en polyphénols varient de

55,52 et 39,09 $\mu\text{gEAG}/\text{mg}$ d'extrait pour la matière sèche pour les extraits HS et SS et une seule valeur 89,95 $\mu\text{gEAG}/\text{mg}$ d'extrait pour la matière fraîche pour l'extrait MF. Ces variations restent faibles et comparables pour la méthode d'extraction (soxhlet, hydrodistillation, Macération). Cependant pour les flavonoïdes, ces teneurs varient de 34,09 et 15,2 $\mu\text{gE AQ}/\text{mg}$ d'extrait pour la matière sèche et de 25,04 $\mu\text{gEQ}/\text{mg}$ d'extrait pour la matière fraîche. Par contre l'extraction par macération sèche montre une différence significative notamment la teneur en flavonoïdes qui reste très faible comparativement aux polyphénols.

En comparant les teneurs en flavonoïdes à celles des polyphénols dans tous les extraits, nous remarquons qu'elles sont toutes plus faibles, ce qui indique que les extraits contiennent d'autres composés phénoliques possédant d'autres structures chimiques que celles des flavonoïdes (acides phénoliques, coumarines, tanins...).

Ces résultats sont en accord avec ceux de plusieurs auteurs qui ont révélé que les solvants mixtes sont très efficaces pour extraire les polyphénols. Selon [52]. L'utilisation de solvants hydroalcoolique aboutit à un fort enrichissement des extraits en polyphénols. La supériorité de ces solvants serait due à l'augmentation de la solubilité des composés phénoliques dans les extraits obtenus par des solvants mixtes comparés à ceux obtenus par des solvants purs [53]. De même et selon plusieurs études, les facteurs climatiques tels que : la température, la durée du jour (soleil) et la nature du sol, la période de floraison influencent fortement sur la biosynthèse et l'accumulation des métabolites secondaires dans la plante [54].

III.1.3.3 Méthode d'extraction infusion

Tableau III.5: Tableau montrant les rendements d'extraction par infusion

(Solvant EtOH et eau).

Solvant utilisé	Type de la matière végétale	Masse obtenue(g)	Rendement %
H ₂ O (100%)	Sèche	12,25	24,5
EtOH (100%)	Sèche	11,98	23,96
	Fraîche	9,04	18,08

Les résultats décrits dans ce tableau révèlent une première différence significative entre les valeurs de rendement de l'extraction de la matière sèche et de la matière fraîche, et ce, pour méthode utilisée infusion. En effet, la matière sèche montre un rendement beaucoup plus

important que la matière fraîche qui peut s'expliquer par la présence d'une grande quantité d'eau dans la matière végétale fraîche et ceci se répercute sur la quantité des substances présentes.

Le tableau III.5 présente Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits MS, MF, SS et HS l'espèce *Medicago sativa L* sont reportés sous forme d'histogramme dans la figure ci-dessous (Fig. III.4).

Tableau III.6: Taux de polyphénols et de flavonoïdes totaux des extraits obtenus par Infusion.

Extrait	Taux de Polyphénols totaux ($\mu\text{g EAG/ mg d'extract}$)	Taux de flavonoïdes totaux ($\mu\text{g QE/ mg d'extract}$)
ETOHS	93,693 \pm 0,151	25,243 \pm 0,055
ES	28,133 \pm 0,053	6,559 \pm 0,031
ETOHF	59,915 \pm 0,010	18,528 \pm 0,014

Les valeurs sont exprimées en moy \pm DS

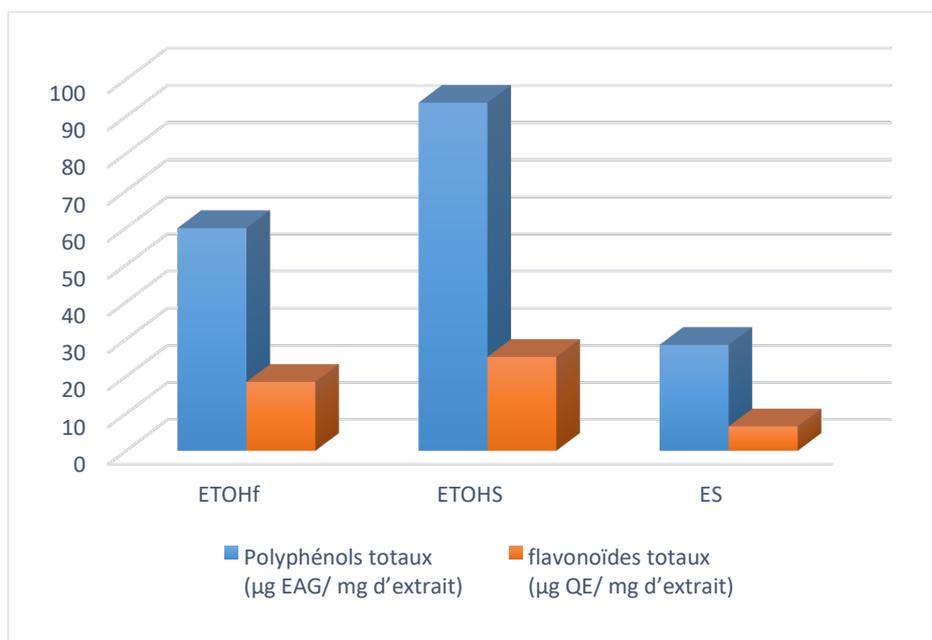


Figure. III.4 : Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes dans les extraits de *Medicago sativa L* (EtOH sèche et fraîche et H₂O sèche).

D'après le tableau, on note clairement des taux en polyphénols plus élevés pour la matière sèche et pour la matière fraîche dans le solvant éthanol pur (EtOH) par rapport des taux

flavonoïdes faible Par contre, l'extraction par utilisé solvant eau montre une différence significative notamment la teneur en polyphénols aux flavonoïdes qui reste très faible.

Ceci peut être expliqué par la déstructuration des membranes plasmiques (vers 50°C) puis des structures pariétales (à haute température), et la dégradation des phytoconstituants sous l'effet des enzymes libérées ou de réactions purement chimiques [55].

Ces résultats sont en accord avec ceux de plusieurs auteurs qui ont révélé que les solvants pur sont très efficaces pour extraire les polyphénols [52].

III .2 Résultats de l'extraction par Ultrason

III .2 .1 Rendement de la méthode d'extraction par Ultrason

Comme signalé dans la chapitre II, l'extraction par Ultrason a été répétée deux fois en faisant varier les paramètres solvant, durée de l'extraction.

III .2 .2 Variation du solvant et de la durée d'extraction

Cette deuxième expérience a été réalisée au laboratoire de l'unité de recherche de valorisation des molécules, Constantine (VARENBIOMOL) à l'aide d'un appareil Ultrason très simple en utilisant un seul formes de la matière végétale (fraiche) et comme solvant EtOH et H₂O. Le solvant, la température entre 32 et 35°C. Comme précédemment, la matière végétale fraiche a été soumise à 4 extractions pendant (10mn, 30mn) E_tOH, (10mn et 30mn) H₂O. Les résultats sont reportés dans le tableau III 5.

Tableau III 7. : Tableau montrant les rendements d'extraction par Ultrason à une durée de (10mn-30mn) et une température comprise entre 32-35°C.

Solvant utilisé	Type de la matière végétale	Temps	Masse obtenue (g)	Rendement %
EtOH (100%)	Fraiche	10 min	6.96	46.4
		30 min	7.27	48.46
H ₂ O (100%)	Fraiche	10 min	4.66	31.06
		30 min	7.22	48.13

Ce tableau montre, d'une part un rendement meilleur pour l'extraction de la matière végétale fraiche dans un duré 30 mn en utilisant soit le solvant d'eau soit de l'éthanol pur

comparativement à celui de la matière végétal un duré 10 mn et d'autre part, ce rendement est beaucoup plus important avec l'éthanol comme solvant (48,46%) ce qui est en harmonie avec les résultats des rendements de la première partie (extraction par les méthodes classiques).

Ce résultat, reste aussi en bon accord avec les données de la littérature qui montre que l'extraction par l'éthanol donne toujours un meilleur rendement parce que ce mélange permet une bonne solubilisation d'un nombre important de substances chimiques [53] . De même, il est à noter que l'extraction par Ultrason donne le meilleur rendement comparativement aux méthodes dites classiques à savoir la macération, hydro distillation, soxhlet et l'extraction par infusion, selon les conditions opératoires (temps de l'extraction, température, agitation).

III .2 .3 Résultats de l'analyse quantitative

Le tableau III.6 présente les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux des extraits EtOHt30, Et30, EtOHt10 et Et10, de l'espèce *Medicago sativa L* et sont reportés sous forme d'histogramme dans la figure III.5.

Tableau III.8: Taux de polyphénols et de flavonoïdes totaux des extraits obtenus par Ultrason.

Extrait	Taux de Polyphénols totaux ($\mu\text{g EAG/ mg d'extract}$)	Taux de flavonoïdes totaux ($\mu\text{g QE/ mg d'extract}$)
EtOH t30	26,38 \pm 0,004	13,09 \pm 0,044
H₂O t30	51,52 \pm 0,018	9,15 \pm 0,010
EtOH t10	14,6 \pm 0,218	2,38 \pm 0,218
H₂O t10	21,28 \pm 0,057	11,19 \pm 0,030

Les valeurs sont exprimées en moy \pm DS

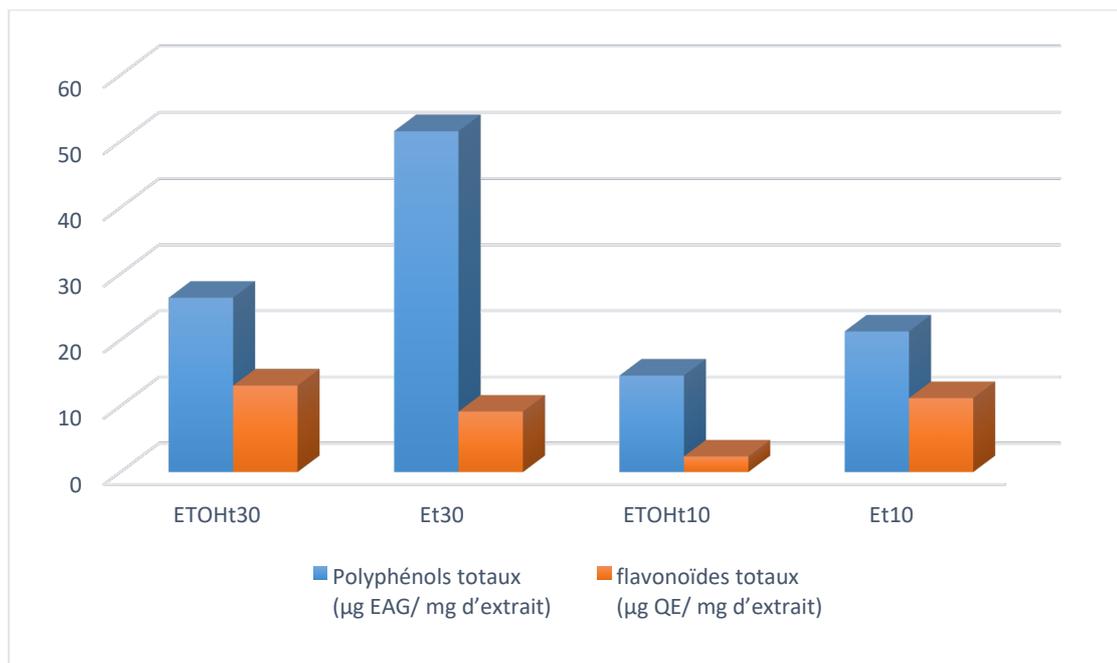


Figure III.5 : Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes dans les 4 extraits de *Medicago sativa L* (EtOH sèche et fraîche et H₂O sèche et fraîche).

D'après le tableau, on note clairement que le teneur en polyphénols plus élevés pour que des flavonoïdes dans la matière végétal fraîche par utilisant un solvant organique éthanol soit l'eau. Ce qu'est en harmonie avec les résultats des polyphénols et flavonoïdes de la première partie (extraction par les méthodes classiques). Ce qui confirme les résultats précédents puisque les flavonoïdes constituent une classe des polyphénols.

Dans un premier temps, la figure montre l'impact du temps sur l'extraction polyphénols et les flavonoïdes. Ces taux sont importants pour la durée 30 minutes pour extraction des polyphénols les flavonoïdes soit par utilisation l'eau ou par l'éthanol cette résultat confirmé que les extraits de solvant polaire riche en polyphénols par rapport aux taux da flavonoïde lorsque la durée de l'opération est diminué à 10 min on remarque la grand chute de concentration des poly phénols et les flavonoïdes soit pour l'utilisé de l'eau ou bien l'éthanol ceci peut être explique par l'importance de facteur de temps de temps de vibration ultrason pour la solubilité de produit naturelles dans le solvant.

Le temps de contact entre la matière végétale et le solvant est donc un paramètre important pour l'extraction des polyphénols et la maîtrise de ce paramètre permet non seulement de augmenter le temps de l'extraction, mais aussi les polyphénols besoin une longue tempe pour solubilisé [56].

III .2.4. Détermination de la teneur en cendre est la matière organique

Le poids de plante sèche est déterminé par la différence entre le poids du creuset plein et le poids du creuset vide.



Figure III.6 : Le poids de plante sèche



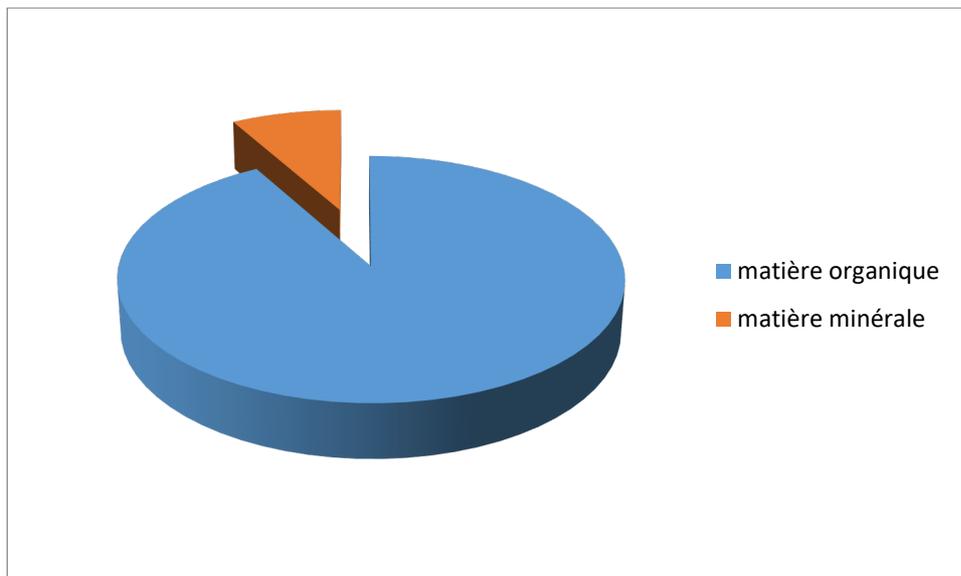
Figure III.7 : Le poids en cendre

III .2.5. Calcul le rendement :

Medicago sativa le présente une teneur élevée en matière organique (91,84%) et une teneur faible en matière minérale (8,16%) les valeurs des rendements des matières organique et minérale de la plante Medicago sativa L sont indiquées dans le tableau III.7 et sont reportées sous forme de cercle relatif dans la Figure III.8.

Tableau III.9 : Tableau montrant les rendements de la matière (végétal, organique, cendre).

La matière	La masse(g)	Le rendement(%)
Matier organique	4,47	91,84
Matier cendre	0,38	8,16



Figureur III.8 : Teneur en matière organique et minéral du plant *Medicago sativa* L.

Conclusion

D'après les résultats obtenus, on remarque une amélioration nette dans les teneurs des polyphénols et des flavonoïdes totaux par l'extraction par ultrasons en faisant augmenter les polyphénols pour une durée de 30mn alors qu'on assiste à une baisse dans ces teneurs lors de l'augmentation de la durée de l'extraction. En effet, l'extraction assistée par ultrasons est considérée comme étant la méthode alternative d'extraction des polyphénols totaux. Les résultats sont en accord avec [57] qui a révélé que les extraits de la plante *medicago sativa* l obtenus par l'extraction assistée par ultrasons sont plus riches en composés phénoliques, ce qui conduit à une augmentation de rendement d'extraction comparés à ceux obtenus par les autres méthodes. Cet effet peut être expliqué par le processus produit par cavitation, lequel est induit par l'irradiation des ultrasons, provoquant le gonflement des cellules, l'élargissement des pores, et donc une augmentation du coefficient de diffusion des composés phénoliques à travers les parois cellulaires. Les ultrasons ont l'avantage de réduire considérablement le temps et d'augmenter le rendement d'extraction, Ceci est en accord avec les résultats obtenus dans ce modeste travail.

Conclusion générale

L'objectif principale de notre travail est une analyse comparative de cinq méthodes classiques d'extraction ont été employés pour extraire des composés phénoliques à partir de l'espèce *Medicago sativa* L (utilisée sous les deux formes fraîche et sèche et différents solutions) à savoir la macération ,Hydrodistillation, extraction par infusion, l'extraction par soxhlet et l'extraction par ultrason,

Le meilleur rendement obtenu est le rendement d'extraction par ultrason de la matière végétale fraîche dans le durée de 30 mn en utilisant soit l'eau comme solvant (48,13%) ou bien l'éthanol pur (48,46%).et alors que le rendement le plus faible Vient de l'extraction par macération de la matière végétale séché (2.45%).

Dans le dosage les teneurs en polyphénols enregistré en équivalent d'acide gallique, son plus important dans tous les extrait comparativement à ceux des flavonoïdes enregistré en équivalent de quercétine, on note clairement que les teneurs en polyphénols plus élevés pour l'extrait (infusion de la matière sèche dans l'éthanol pur) par une valeur de $93,693 \pm 0,151$ (μg EAG/mg d'extrait) et les teneurs en flavonoïdes le plus important pour l'extrait(SS) par une valeur de 34.09 ± 0.025 (μg EQ/mg d'extrait)

La plante *medicago sativa l* est très riche en composés phénolique (métabolite secondaire) cela en fait une plante distinctive en particulier pour les agriculteurs qui l'utilisant comme aliment de base pour les vache et le bétail, et l'étude sur cette plante reste en vigueur découvrant plus de propriétés.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة مقارنة بين خمس تقنيات لاستخلاص المركبات الفينولية والفلافونويدات الموجودة في نبات الفصة الاستخلاص بواسطة النقع (الميثانول الماء 70 %): الاستخلاص بواسطة التقطير بالبخار بجهاز السوكسلي الاستخلاص عن طريق التسريب (سواء باستخدام الماء أو الإيثانول) وآخر تقنية وتعتبر حديثة وهي تقنية الموجات فوق الصوتية.

وترتكز المقارنة على مردود استخلاص للمواد الفعالة لنبنة وكذا مردود استخلاص المركبات الأيضية.

في الجزء الأول من هذه الدراسة تم استخلاص مركبات الأيض الثانوي لنبنة الفصفصة في الحالة الجافة والطازجة.

في الجزء الثاني أظهرت دراسة المقارنة بان مردود الاستخلاص الأعلى قد تم الحصول عليه بواسطة طريقة الموجات

فوق لصوتية يليه الاستخلاص بواسطة التقطير بالبخار ثم الاستخلاص بالنقع.

وقد أكدت طريقة الاستخلاص باستخدام طريقة الموجات فوق الصوتية مدى نجاعتها وذلك من خلال تغيير الوقت

الذي كل ما زاد زاد معه مردود الاستخلاص وطبيعة المحلول المستخدم.

وفي الختام تظهر هذه الدراسة تفوق مؤكد لطريقة الاستخلاص بالموجات فوق الصوتية وذلك من حيث مردود

استخلاص المركبات الفينولية و الفلافونيدات والوقت القياسي ومدى نجاح الإيثانول في استخلاص المركبات الأيضية.

الكلمة المفتاحية: الاستخلاص, فينول, فلافونويد, الأيضية

Résumé

Le but de ce travail est d'étudier une comparaison entre cinq techniques d'extraction de composés phénoliques et de flavonoïdes trouvés dans la plante *Medicago sativa* L, Extraction par macération (méthanol et eau 70 %): Extraction par hydrodistillation, extraction par Soxhlet, extraction par infusion (que ce soit en utilisant de l'eau ou de l'éthanol) et la dernière technique est considérée comme technique alternative, c'est l'extraction par ultrason.

La comparaison est fondée sur les rendements d'extraction des substances actives de plante ainsi que des composés métaboliques.

Dans la première partie de l'étude, les composés métaboliques secondaires ont été extraits à partir de la plante *Medicago sativa* L à l'état sec et frais.

Dans la deuxième partie, l'étude comparative a montré que le rendement d'extraction le plus élevé a été obtenu par la méthode par ultrasons suivie par la hydrodistillation puis l'extraction par infusion.

La méthode d'extraction par Ultrason a confirmé son efficacité en changeant le temps que chaque fois qu'on fait augmenter le temps le rendement d'extraction augmente et même chose pour le changement de solvant utilisée.

Cette étude montre que la méthode d'extraction par ultrasons est plus certaine en termes de réapprovisionnement et d'extraction des composés phénoliques et flavonoïdes, du temps standard et du succès de l'éthanol dans l'extraction des composés métaboliques.

Mot clés: Extraction, phénoliques, flavonoïdes, métaboliques

Abstract

The purpose of this work is to study a comparison between five techniques of extraction of phenolic compounds and flavonoids from the plant *Medicago sativa L*, Extraction by maceration (methanol and water 70 %): Extraction by hydrodistillation, extraction by Soxhlet, extraction by infusion (water or/and ethanol) and the latest technique is considered as an alternative technique, which is ultrasonic extraction.

The comparison is based on the extraction yields of plant active substances as well as metabolic compounds.

In the first part of the study, the secondary metabolic compounds were extracted from the dry, fresh *Medicago sativa L* plant.

In the second part, the comparative study showed that the highest extraction efficiency was obtained by the ultrasonic method followed by hydrodistillation and then infusion extraction.

The Ultrasonic extraction method has confirmed its effectiveness by changing the time that each time one increases the time the extraction efficiency increases and the same for the change of solvent used.

This study shows that the ultrasonic extraction method is more certain in terms of replenishment and extraction of phenolic and flavonoid compounds, standard time and the success of ethanol in the extraction of metabolic compounds.

Keywords: extraction, phenolic, flavonoid, metabolic.

Référence bibliographique

- [1] VILLAX E.J., Les cultures fourragères méditerranéennes occidentales. I.N.R.A. Rabat. (1963). 375p
- [2] BOUABOUB-MOSSAB, Karima. Comportement de variétés et populations de luzerne pérenne *Medicago sativa* L. 2001. PhD Thesis. INA.
- [3] OUARGLA, U. K. M. et CO-ENCADREUR, Mr CHAABENA A. MA A. Effet du stress salin sur quelques paramètres biochimiques de la luzerne cultivée (*Medicago sativa* L.)
- [4] DOYLE, Jeff J. et LUCKOW, Melissa A. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant physiology*, 2003, vol. 131, no 3, p. 900-910.
- [5] THIÉBEAU, Pascal, PARNAUDEAU, Virginie, et GUY, Pierre. Quel avenir pour la luzerne en France et en Europe?. *Le Courrier de l'environnement de l'INRA*, 2003, vol. 49, no 49, p. 29-46.
- [6] BOUDOUR, Khadidja. *Contribution à l'étude de la valeur alimentaire de quelques variétés de luzerne pérenne cultivée dans le bas Chélif*. 2011. Thèse de doctorat. Université de Chlef-Hassiba Benbouali.
- [7] AICHA, BENKHADOUDJA. Les adventices des cultures fauchées: cas de La luzerne pérenne (Hassi Ben Abdallah Ouargla). *Memoire d'ingenieur d'etat en Agronomie, phytotechnie, universite kasdi merdah-ouargla*. P, 2010, vol. 4.
- [8] Bruneton J. *Pharmacognosie et Phytochimie, Plantes médicinales*, 3^e édition Lavoisier 1999.
- [9] CROTEAU, Rodney, KUTCHAN, Toni M., LEWIS, Norman G., *et al.* Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 2000, vol. 24, p. 1250-1319.
- [10] HANSON, James Ralph. *Natural products: the secondary metabolites*. Royal Society of Chemistry, 2003.
- [11] CROZIER, Alan, CLIFFORD, Mike N., et ASHIHARA, Hiroshi (ed.). *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. John Wiley & Sons, 2008.
- [12] KHODDAMI, Ali, WILKES, Meredith A., et ROBERTS, Thomas H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 2013, vol. 18, no 2, p. 2328-2375.
- [13] BRAVO, Laura. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 1998, vol. 56, no 11, p. 317-333.
- [14] HASLAM, Edwin et CAI, Y. Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Natural product reports*, 1994, vol. 11, p. 41-66.
- [15] DAI, Jin et MUMPER, Russell J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 2010, vol. 15, no 10, p. 7313-7352.
- [16] DI FERDINANDO, Martina, BRUNETTI, Cecilia, AGATI, Giovanni, *et al.* Multiple functions of polyphenols in plants inhabiting unfavorable Mediterranean areas. *Environmental and experimental botany*, 2014, vol. 103, p. 107-116.
- [17] AGATI, Giovanni, AZZARELLO, Elisa, POLLASTRI, Susanna, *et al.* Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant science*, 2012, vol. 196, p. 67-76.
- [18] TSAO, Rong. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2010, vol. 2, no 12, p. 1231-1246.

-
- [19] D ARCHIVIO, Massimo, FILESI, Carmela, DI BENEDETTO, Roberta, *et al.* Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-Istituto Superiore di Sanita*, 2007, vol. 43, no 4, p. 348..
- [20] ZOHRA, Mohamed. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la Région de Tlemcen. *Mémoire de magistère, Faculté des sciences, Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen, Algérie*, 2006.
- [21] SAMIA BOUCHERIT, Hana GUETTAF TEMAM. Effet phytohormones sur l'accumulation des substances bioactives chez la plante médicinale (Medicago Sativa L).
- [22] DINELLI, Giovanni, BONETTI, Alessandra, MINELLI, Maurizio, *et al.* Content of flavonols in Italian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ecotypes. *Food chemistry*, 2006, vol. 99, no 1, p. 105-114.
- [23] LI, An-Na, LI, Sha, ZHANG, Yu-Jie, *et al.* Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 2014, vol. 6, no 12, p. 6020-6047.
- [24] KUMAR, Shashank et PANDEY, Abhay K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The scientific world journal*, 2013, vol. 2013.
- [25] WILLIAMS, Christine A. et GRAYER, Renée J. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural product reports*, 2004, vol. 21, no 4, p. 539-573.
- [26] HELLER, W., FORKMANN, G., *et al.* The flavonoids: advances in research since 1986. *Secondary plant products. Encyclopedia of plant physiology*, ed. by JB Harborne (*Chapman & Hall, London, 1993*), 1994, vol. 399..
- [27] DI CARLO, Giulia, MASCOLO, Nicola, IZZO, Angelo A., *et al.* Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life sciences*, 1999, vol. 65, no 4, p. 337-353.
- [28] CROZIER, Alan, JAGANATH, Indu B., et CLIFFORD, Michael N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural product reports*, 2009, vol. 26, no 8, p. 1001-1043.
- [29] SAMANTA, Amalesh, DAS, Gouranga, et DAS, Sanjoy Kumar. Roles of flavonoids in plants. *Carbon*, 2011, vol. 100, no 6, p. 12-35.
- [30] DANGLES, O., STOECKEL, C., WIGAND, M. C., *et al.* Two very distinct types of anthocyanin complexation: Copigmentation and inclusion. *Tetrahedron letters*, 1992, vol. 33, no 36, p. 5227-5230.
- [31] BRIELMANN, H. L., SETZER, W. N., KAUFMAN, P. B., *et al.* Phytochemicals: the chemical components of plants. *Natural products from plants*, 2006, no Ed. 2, p. 1-49.
- [32] ROBERTS, Margaret F. (ed.). *Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications*. Springer Science & Business Media, 2013..
- [33] WINK, Michael. Chemical ecology of alkaloids. In : *Alkaloids*. Springer, Boston, MA, 1998. p. 265-300.
- [34] DE CASTRO, MD Luque et GARCIA-AYUSO, L. E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica chimica acta*, 1998, vol. 369, no 1-2, p. 1-10.
- [35] UNITED NATIONS INDUSTRIAL DEVELOPMENT ORGANIZATION, HANDA, Suckdev Swami, KHANUJA, Suman Preet Singh, *et al.* *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*. Earth, Environmental and Marine Sciences and Technologies, 2008.
- [36] BRUNETON, Jean. *Pharmacognosie: phytochimie plantes médicinales*. 1993.

-
- [37] GRIGONIS, D., VENSKUTONIS, P. R., SIVIK, Björn, *et al.* Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloe odorata*). *The Journal of supercritical fluids*, 2005, vol. 33, no 3, p. 223-233.
- [38] URBANOVA, Zuzana, PICEK, Tomáš, HÁJEK, Tomáš, *et al.* Vegetation and carbon gas dynamics under a changed hydrological regime in central European peatlands. *Plant Ecology & Diversity*, 2012, vol. 5, no 1, p. 89-103.
- [39] LEYBROS, Jean et FRÉMEAUX, Pierre. Extraction solide-liquide. I. Aspects théoriques. *Techniques de l'ingénieur. Génie des procédés*, 1990, vol. 2, p. J2780. 1-J2780. 21.
- [40] WANG, Lijun et WELLER, Curtis L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 2006, vol. 17, no 6, p. 300-312.
- [41] BEN AMOR, Bouthaina. *Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs: texturation par détente instantanée contrôlée (DIC)*. 2008. Thèse de doctorat. La Rochelle.
- [42] DRAYE, Micheline, MALACRIA, Max, ESTAGER, Julien, *et al.* *Sonochimie organique*. Ed. Techniques Ingénieur, 2009.
- [43] PÉTRIER, Christian, GONDREXON, Nicolas, et BOLDO, Primus. Ultrasons et sonochimie. 2008.
- [44] LAGUNEZ RIVERA, Luicita. *Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe*. 2006. Thèse de doctorat.
- [45] Mohammedi Z. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles eflavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de Magistère (2005). Université Abou Bakr Belkaïd, Tlemcen.
- [46] WILLIAMS, Christine A. et GRAYER, Renée J. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural product reports*, 2004, vol. 21, no 4, p. 539-573.
- [47] ZERBO, Patrice, RASOLODIMBY, Jeanne Millogo, OUEDRAOGO, Odile Nacoulma, *et al.* Plantes médicinales et pratiques médicales au Burkina Faso: cas des Sanan. *Bois & Forêts Des Tropiques*, 2011, vol. 307, p. 41-53.
- [48] SINGLETON, Vernon L. et ROSSI, Joseph A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 1965, vol. 16, no 3, p. 144-158.
- [50] PENCHEV, Petko Ivanov. *Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions*. 2010. Thèse de doctorat.
- [51] Quy Diem Do, Artik Elisa Angkawijaya, Phuong Lan Tran-Nguyen, Lien Huong Huynh, Felycia Edi Soetaredjo, Suryadi Ismadji, Yi-Hsu Ju. 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total

flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22 (3), 296-302.

[52] ATIK, FAWZIA et MOHAMMEDI, ZOHRA. Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) Karst. *Int J Pharma Bio Sci*, 2011, vol. 2, no 1, p. 609-15.

[53] TRABELSI, Najla, MEGDICHE, Wided, KSOURI, Riadh, et al. Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT-Food Science and Technology*, 2010, vol. 43, no 4, p. 632-639.

[54] CLOSE, Dugald C., MCARTHUR, Clare, PIETRZYKOWSKI, Elizabeth, et al. Evaluating effects of nursery and post-planting nutrient regimes on leaf chemistry and browsing of eucalypt seedlings in plantations. *Forest Ecology and management*, 2004, vol. 200, no 1-3, p. 101-112.

[56] Nacz M., Shahidi F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in Food. In *Journal of Chromatography A* 1054 (1-2 29oct. 2004), p. 95-111.

[57] BOURGOU, S., BEJI, R. Serairi, MEDINI, F., et al. Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of New Sciences*, 2016, vol. 28.