

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Blida 1
Faculté des Science de la Nature et de la Vie
Département de Biologie des Populations Organismes



Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de **Master** en Biologie
Option : Phytothérapie et Santé

Thème

Evaluation de l'activité antioxydante, antimicrobienne et
cytotoxicité des extraits du cumin velu
(*Ammodaucus leucotrichus*).

Présenté par :

Melle **Kerarsi Hafsa**
Melle **Soudani Salima**

Devant le jury:

| | | | |
|--------------------------|----------------------------|------|-------------------|
| Mr Bessaad M.A. | Maitre de conférence B/BPO | UB 1 | Président de jury |
| Melle Touaibia M. | Maitre assistante B/BPO | UB 1 | Examinatrice |
| Mme Metidji H. | Maitre assistante A/BPO | UB 1 | Promotrice |

2014/2015

Remerciements

Avant tout nous remercions le Dieu « ALLAH » le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et la patience pour terminer ce travail.

Nos remerciement aux les membres de jury, Mr Bessad amine, de nous avoir honoré de présider notre jury de soutenance et Mme Touaibia meriem, qui a bien voulu examiner ce manuscrit.

Nos remerciement aussi à notre encadreur pour son grand aide durant la réalisation de notre travail, et pour ses conseils et ses encouragements tout on long de notre épreuve, comme elle a été présente à tout moment qu'on a besoin de elle : Mme Metidji hafidha.

Nous tenons à remercier tous les membres de Laboratoire des molécules actives et valorisation de la biomasse (LMAVB) de l'Ecole Normale Supérieure (ENS) à Kouba (Alger) pour leur aide précieuse. Nous remerciment spéciales pour Mme Krimat soumia pour son aide durant notre période du travail et sa gentillesse.

Une partie de notre travail est réalisé à laboratoire de la microbiologie du groupe SAIDAL BIOTIC usine El Harrach (Alger), nous remercions tous les membres de l'équipe de ces laboratoires pour leur accueil et leur sympathie.

Nos remerciement également tous les membres de laboratoire de recherche des plantes médicinales et aromatiques (USDB) pour l'analyse d'HPLC pour nous avoir accueillies au sein de leur laboratoire.

Nous remercions toutes les personnes qui ont contribuées de près ou de loin à la réalisation de ce travail par un soutien moral ou matériel.



Dédicaces

Je dédie ce travail :

A mon cher père

A ma chère mère

A mes sœurs

A mes frères et surtout Zakaria

A mon beau frère

A ma famille

A tous mes collègues et mes amis



Kerarsi Hafsa



Dédicaces

Je dédie ce travail :

A mon cher père

A ma chère mère

A mes sœurs et surtout Aicha

A mes frères

A ma belle sœur

A mes nièce : Anfel et Asmae

A mes neveux : Abdelallah et Abderrahman

A ma famille

A tous mes collègues et mes amies



Soudani Salima

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude quantitative et qualitative des fruits d'une plante saharienne, *Ammodaucus leucotrichus* appartenant à la famille d'Apiacée, et ses effets biologiques (antioxydante, antimicrobienne et cytotoxicité).

Dans la présente étude le rendement de l'extraction hydro-méthanolique de la matière sèche est le plus élevé (17.2%), par rapport à la fraction diéthyl éther (3.88%) et l'acétate d'éthyle (2.20%). Le dosage des polyphénols totaux étaient plus élevés dans l'extrait méthanolique (1,675mg GAE/g). Concernant les flavonoïdes, la teneur la plus élevée est mentionné dans la fraction d'acétate d'éthyle avec un teneur de 2.101 mg EQ/g.

L'analyse par HPLC/DAD à longueurs d'ondes (270nm ; 320nm ; 370nm) sur les trois extraits, a révélé la présence des variétés de composés phénoliques (14 composés).

L'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée par deux méthodes ; la réduction du fer et le piégeage du radical libre DPPH. Et comparé avec des standards BHT-Acide ascorbique, dont la fraction d'acétate d'éthyle (0.38%) présente une capacité intéressante pour réduire le fer par rapport aux autres extraits et pour le DPPH la concentration inhibitrice à 50% (IC50) la plus fréquente est mentionnée dans la fraction diéthyl éther (1.37mg/ml).

L'étude de l'activité antimicrobienne par la diffusion sur le milieu gélosé, sur les trois extraits a manifesté un effet inhibiteur sur toutes les souches microbiennes testées, sauf la souche *Bacillus subtilis* qui manifeste une résistance pour tous les extraits.

La cytotoxicité, a présenté des résultats intéressants. Il apparait que l'extrait méthanolique est toxique vis-à-vis d'*Artémia salina* avec IC50 à 8.5µg / ml.

Mots clés: *Ammodaucus leucotrichus*, polyphénols, activité antimicrobiennes, activité antioxydante, cytotoxicité.

ملخص

يخصص هذا العمل إلى دراسة كمية ونوعية نبات صحراوي، *Ammodaucus leucotrichus* من عائلة

Apiacée، وتأثيرها البيولوجي.

في هذه الدراسة العائدة من استخراج هذا النبات من قبل الميثانول والماء المقطر من المادة الجافة هو أعلى مردود (17.20%)، أما فيما يتعلق بالمذيبات العضوية: الديثيل و اسيتات الايثيل فكان المردود (3.88%) (2.20%) على الترتيب .

تم تحديد المحتوى الفينولي الكلي، بنسبة عالية في مستخلص الميثانول (1.675mg GAE/g). أما بالنسبة للفلافونولات فكان أكبر محتوى في جزء الأسيتات الايثيل

أظهرت تحاليل HPLC/DAD على الموجات (370nm, 270nm, 320nm) للمستخلصات الثلاثة، وجود

أصناف من المركبات الفينولية (14 مركب).

تم تقييم نشاط مضادات الاكسدة في مختلف المستخلصات باستعمال طريقتين مختلفتين: تقنية إرجاع الجذر الحر

DPPH و الحد من الحديد.

دراسة نشاط مضادات الميكروبات بطريقة الأقراص، أظهرت المستخلصات الثلاثة أن لها تأثير كايح بشكل خاص على جميع السلالات الجرثومية المختبرة، فيما عدا *Bacillus subtilis* التي قاومت جميع العينات.

و السمية الخلوية، يبدو أن المستخلص المثلي سام على *Artemia salina* في التركيزين 1000 µg / ml

و 10000µg / ml

كلمات مفاتيح: *Ammodaucus leucotrichus*، بوليفينول، نشاط مضادات الميكروبات، النشاط المضاد للأكسدة،

سمية الخلايا.

Abstract

This work is devoted to the quantitative and qualitative study of the Saharan plant, *Ammodaucus leucotrichus* belonging to the family of Apiacée, and its biological effects.

In this study the yield of the extraction of this plant by methanol and distilled water as dry matter is the highest (17.2%), with respect to the diethyl ether fraction (3.88%) and the acetate of ethyl (2.20%).

The assay results of total polyphenols were higher in the methanol extract (1,675mg GAE / g). Regarding the flavonoids, the most abundant content is mentioned in the ethyl acetate fraction of with a content of 2.101 mg EQ / g.

Analysis by HPLC / DAD wavelengths (270 nm; 320 nm; 370 nm) on the three extracts showed the presence of varieties of phenolic compounds (14 compounds).

The antioxidant activity of different extracts was assessed by two methods; the reduction of iron and DPPH radical scavenging activity and compared with standard ascorbic acid-BHT.

The study of the antimicrobial activity by chromatogram, the three extracts showed an inhibitory effect on all microbial strains tested, except the *Bacillus subtilis* strain which exhibits resistance to all samples.

The cytotoxicity, it appears that the methanolic extract toxic vis-a-vis *Artémia salina* in concentrations of 1000 and 10000µg / ml.

Key words: *Ammodaucus leucotrichus*, polyphenols, antimicrobial activity, antioxidant activity, cytotoxicity.

LISTE DES ABREVIATIONS

ATCC: American type culture collection.

AlCl₃: Acide trichlorure d'aluminium

BHT: Butyl-Hydroxy-Toluène

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.

E.M: Extrait méthanolique

F.Ac: Fraction Acétate d'éthyle

F.De: Fraction Diéthyl éther

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power

FeCl₃: Chlorure ferrique

Germe/ml : Germe par millilitre

G : Gramme

H : Heures

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

HPLC-DAD : chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur a barrettes de diodes

IC 50 : Concentration d'Inhibition de 50 % de croissance.

K₃Fe(CN)₆: Potassium ferricyannate

mg/ml : microgramme par millilitre

mgEAG/g: milligramme équivalent d'acide gallique par gramme

mgEQ/gPS: milligramme équivalent de quercétine par gramme de poids sec

MH: Muller Hinton

min: Minute

mm: Millimètre

ml: Millilitre

NaCl: Chlorure de sodium

Nm: Nanomètre

μl: Microlitre

μg: microgramme

%: pourcentage

°C: Degré Celsius

LISTE DES FIGURES

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1 : aspect générale d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> | 6 |
| Figure 2 : l'inflorescence d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> | 6 |
| Figure 3 : les graines d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> | 6 |
| Figure 4 : Aspect de l' <i>Artémia salina</i> | 11 |
| Figure 5 : Protocole de préparation de l'extrait sec..... | 14 |
| Figure 6 : Les étapes de fractionnement de l'extrait aqueux..... | 15 |
| Figure 7 : Forme libre et réduite du DPPH..... | 19 |
| Figure 8 : Illustration de la méthode d'aromatogramme..... | 21 |
| Figure 9 : les suspensions (Photographie originale)..... | 23 |
| Figure 10 : Ecoulement du milieu de culture (Photographie originale)..... | 23 |
| Figure 11 : Ensemencements (Photographie originale)..... | 23 |
| Figure 12 : pied à coulisse (Photographie originale)..... | 23 |
| Figure 13 : Rendement d'extraction..... | 26 |
| Figure 14 : histogramme de dosage des polyphénols totaux..... | 27 |
| Figure 15 : histogramme de dosage des flavonoïdes..... | 28 |
| Figure 16 : Pourcentage d'inhibition de DPPH par les extraits E.M, F.De et F.Ac et les standards..... | 32 |
| Figure 17 : Pouvoir réducteur des différents extraits par la méthode FRAP..... | 34 |
| Figure 18 : Photographies des zones d'inhibition de la croissance d' <i>E.coli</i> induites par l'extrait méthanolique d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> (A) et par la fraction Diéthyl éther (B), et la fraction Acétate d'éthyle (C)..... | 37 |
| Figure 19 : Photographies des zones d'inhibition de la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> induites par l'extrait méthanolique d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> (A) et par la fraction Diéthyl éther (B), et l'Acétate d'éthyle (C)..... | 37 |
| Figure 20 : Photographies des zones d'inhibition de la croissance de <i>Bacillus subtilis</i> induites par l'extrait méthanolique d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> (A) et par la fraction Diéthyl éther (B), et de l'Acétate d'éthyle (C)..... | 37 |
| Figure 21 : Photographies des zones d'inhibition de la croissance de <i>Candida albicans</i> induites par l'extrait méthanolique d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> (A) et par la fraction Diéthyl éther (B), et de l'Acétate d'éthyle (C)..... | 38 |

Figure 22 : Photographies des zones d'inhibition de la croissance de *Saccharomyces Cereviceae* induites par l'extrait méthanolique d'*Ammodaucus leucotrichus* (A) et par la fraction Diéthyl éther (B), et de l'Acétate d'éthyle (C).....38

Figure 23 : Le taux de mortalité de *l'Artémia* à différentes concentrations d'extrait méthanolique d'*Ammodaucus leucotrichus*.....39

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau 1 : Souches microbiologiques..... | 13 |
| Tableau 2 : Temps de rétention des étalons à différentes longueurs d'ondes..... | 18 |
| Tableau 3 : Interprétation des résultats lors de l'analyse en HPLC-DAD des différents extraits d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> à longueurs d'ondes 270nm, 320nm et 370 nm..... | 29 |
| Tableau 4 : IC50 des extraits E .M, F.De et F.Ac et des références pour l'inhibition du DPPH..... | 33 |
| Tableau 5 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des souches bactériennes provoquées par les extraits d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> | 35 |

Sommaire

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| I. Introduction..... | 1 |
| II. Synthèse bibliographique..... | |
| I. Plantes médicinales et la phytothérapie..... | 3 |
| II. Métabolismes secondaires | 3 |
| III. Généralité sur <i>Ammodaucus leucotrichus</i> | 5 |
| III.1. Description de la famille des Apiacées | 5 |
| III.2. Description botanique d' <i>Ammodaucus leucotrichus</i> | 6 |
| IV. Activités biologiques | 8 |
| IV.1. Activité antioxydante | 8 |
| IV.2. Activité antimicrobienne..... | 9 |
| IV.3. Cytotoxicité | 9 |
| III. Matériel et méthode | |
| I. Matériel | 13 |
| I.1. Matériel végétal | 13 |
| I.2. Matériel animal..... | 13 |
| I.3. Souches microbiologiques | 13 |
| II. Méthode | 14 |
| II.1. Extraction | 14 |
| II.2. Dosage des polyphénols totaux..... | 16 |
| II.3. Dosage des flavonoïdes | 16 |
| II.4. Analyse des extraits par HPLC-DAD | 16 |
| II.5. Évaluation de l'activité antioxydant | 19 |
| II.5.1 Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH | 19 |
| II.5.2 Méthode de la réduction de fer (FRAP) | 20 |
| II.6. Évaluation de l'activité antimicrobienne | 21 |
| II.7. Cytotoxicité | 24 |
| IV. Résultats et discussions | |
| I. Rendement | 26 |
| II. Résultat de l'étude quantitative | 27 |
| II.1. Dosage des polyphénols totaux | 27 |
| II.2. Dosage des flavonoïdes | 28 |
| III. Analyse qualitative par HPLC | 29 |
| IV. Activité antioxydante | 31 |
| IV.1. Résultat de l'activité antioxydante testée par la méthode du DPPH..... | 32 |
| IV.2. Méthode de la réduction de fer(FRAP) | 33 |
| V. Activité antimicrobienne | 34 |
| VI. Cytotoxicité | 39 |
| Conclusion | 42 |

Introduction

Les plantes médicinales sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments et restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments (**Maurice, 1997**).

Une des originalités majeures des plantes médicinales réside dans leur capacité de produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais représente une source importante de molécules bioactives utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (**Boukri, 2014**).

La matière végétale contient un grand nombre des molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie, en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie, Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tanins, les lignines, les terpènes et les flavonoïdes (**Bahorun, 1997**). Ils possèdent potentiellement des activités biologiques, anti-inflammatoires, anti-cancérigènes, antimicrobiennes et anti-oxydantes (**Marfak, 2003**).

L'Algérie, grâce à son climat diversifié, renferme une flore très riche en plantes médicinales et aromatiques très utilisées en médecine populaire. Les secrets d'utilisation de ces plantes sont transmis de mère en fille et de génération en génération. De nos jours la valorisation des plantes médicinales, demeure un sujet de grande envergure dans notre pays. L'une des valorisations possibles de cette richesse naturelle est l'extraction et l'application des substances actives à partir des plantes médicinales.

Parmi les nombreuses plantes à vertus thérapeutiques et afin de contribuer à une meilleure connaissance de patrimoine naturel en plante médicinale en Algérie, nous avons choisi d'étudier une plante de la famille des Apiacées ; *Ammodaucus leucotrichus*, longtemps utilisée au Maghreb et précisément en Algérie, pour traiter des maladies liées à l'appareil digestif.

Notre problématique a pour objectif de déterminer, la composition chimique d'*Ammodaucus leucotrichus*. Et d'en connaître éventuellement les principes actifs qui lui confèrent ses propriétés thérapeutiques avec l'étude des quelques activités biologiques de cette plante.

Dans ce présent travail, nous avons fixé les étapes suivantes :

- Extraction des produits actifs par le méthanol à partir des graines d'*Ammodaucus leucotrichus*.
- Fractionnement de l'extrait méthanolique par différents solvants.
- Dosage des polyphénols et des flavonoïdes.
- Etude de l'activité antioxydante par 2 techniques : DPPH et pouvoir réducteur.
- Evaluation de l'activité antimicrobienne et la cytotoxicité.
- Analyse qualitative des composés par HPLC.

Synthèse
bibliographique

I. Plantes médicinales et la phytothérapie

On appelle phytothérapie, la thérapie par les plantes (du grec phyto= plante et therapeia= soin). En utilisant soit la plante ou ses dérivées des formes galéniques par extraction des principes actifs (**wolters, 2007**). C'est une médecine alternative de choix, souvent sans effets secondaires indésirables pouvant devenir rapidement indispensable pour se maintenir en bonne santé (**Ronika, 2006**).

Aujourd'hui la plupart des plantes médicinales traditionnelles relevées lors des enquêtes de terrain s'avèrent être dépourvues de toxicité aigüe dans les tests de laboratoire. Elles agissent efficacement, elles n'ont pas d'effets secondaires dangereux et on peut donc les utiliser sous leurs diverses formes pendant très longtemps (**Christian, 2007**).

Pour leurs effets thérapeutiques, les plantes non toxiques, force est de constater qu'il est souvent difficile d'isoler un principe chimique pur responsable de l'activité thérapeutique. En effet, on pense que ce sont plusieurs molécules qui interagissent en synergie en facilitant les passages membranaires ou les transports plasmatiques ou qui sont des pro-drogues nécessitant une biotransformation dans l'intestin ou dans l'organisme pour agir. Pour mettre en évidence les interactions de deux ou trois molécules, le travail à réaliser est considérable et sans garantie de succès. Dans ces conditions il est préférable d'élaborer un extrait standardisé qui sera caractérisé par un marqueur chimique spécifique (**Jacques, 2004**).

Beaucoup de métabolites secondaires sont également important pour notre alimentation (goût, couleur), alors que d'autre parmi alcaloïdes, anthocyanines, flavonoïdes, quinines, lignines, les stéroïdes, et les terpénoïdes ont une application commerciale dans les domaines pharmaceutiques et biomédicaux et font partie des drogues, colorants, arômes, parfums et des insecticides (**Teixeira de silva, 2004**).

II. Métabolismes secondaires

Ce sont des groupes chimiques très variés (alcaloïdes, terpènes, composés phénoliques...) répartis d'une façon inégale chez les végétaux mais dont le niveau d'accumulation peut quelquefois atteindre des valeurs élevées. La notion de « métabolite secondaire » résultait initialement de trois groupes d'observation : d'abord une difficulté à attribuer à ces métabolites une fonction précise dans la physiologie même de la plante, ensuite une répartition très inégale selon les végétaux, quelquefois entre des espèces très voisines ou même entre différentes sous-espèces ou variétés à l'intérieur d'une même espèce. Et enfin une

certaine « inertie biochimique » car ces substances sont rarement remobilisées dans la plante après qu'elles y ont été accumulées (**Mecheix ; Fleuriet ; Jay ; Allemand, 2005**).

II.1. Huiles essentielles

Les HE sont des liquides volatiles, réfringents, optiquement actifs, voisins des huiles, d'odeur tout à fait caractéristique. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire (**Volák et Stdola, 1983**).

II.2. Terpénoïdes

Les terpénoïdes représentent le groupe le plus important des composés secondaires. Ils sont produits via deux voies de synthèse. La voie principale est celle de l'acide mévalonique. Cet acide est un précurseur des terpènes, notamment ceux où il y a une répétition d'unités isoprènes (molécules à cinq atomes de carbone) (**Frédéric, 2013**).

II.3. Alcaloïdes

Les alcaloïdes forment une grande famille très hétérogène des métabolites secondaires qui présentent un intérêt de par leurs propriétés pharmacologiques et leurs applications en médecine. A la différence des composés terpéniques et des polyphénols, les alcaloïdes forment une grande famille des molécules chimiquement hétérogènes. Leurs caractéristiques communes sont leur solubilité dans l'eau, la présence d'au moins un atome d'azote et leur forte activité biologique. Le mot « alcaloïde » est pratiquement synonyme du mot « drogue » ; 10 des 12 drogues qui ont pour origine une plante et qui sont commercialement les plus importantes sont des alcaloïdes (**Balandrin et al, 1985**).

Les alcaloïdes provoquent, chez l'homme, diverses réponses physiologiques et psychologiques parce qu'ils interfèrent avec les neurotransmetteurs. A forte dose la plupart des alcaloïdes sont très toxiques, par contre, à faible dose, ils peuvent avoir une valeur thérapeutique. Bien que quelques alcaloïdes soient répartis dans plusieurs genres voire plusieurs familles, la plupart des espèces végétales possèdent leur propre panoplie d'alcaloïdes qui est déterminée génétiquement (**William, 2003**).

II.4. Composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols forment une grande famille des composés chimiques très divers depuis les simples acides phénoliques jusqu'aux grands polymères complexes (**Frédéric, 2013**).

II.4.1. Lignine

Est un polymère fortement ramifié, formé par trois alcools phénoliques simples. La lignine est localisée dans les parois cellulaires et, plus spécialement, dans les parois secondaires des éléments conducteurs. Elle est un très grand polymère insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques. Et il est donc impossible de l'extraire sans lui faire subir d'importantes dégradations. Bien que la fonction de la lignine soit d'ordre structurel, elle a également été considérée comme agent chimique intervenant dans la défense des plantes (**William, 2003**).

II.4.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes (de *flavus*, « jaune » en latin) sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles ; près de 6500 flavonoïdes repartis en 12 classes sont connus (**Wollgast et al. 2000**).

Les flavonoïdes sont des dérivés du phénylpropane avec une composition de base C6-C3-C6. Le squelette d'origine du groupe est une flavone, dans laquelle la liaison C3 a formé un noyau hétérocyclique pyrane. Il existe environ douze groupes connus des flavonoïdes qui ne diffèrent les uns les autres que par l'état d'oxydation de ce noyau hétérocyclique (**William, 2003**).

II.4.3. Tanins

Le terme tanin provient d'une pratique ancienne qui utilisait des extraits des plantes pour « tanner » les peaux d'animaux autrement dit pour transformer une peau en cuir. Ces extraits contiennent des dérivés phénoliques qui se lient aux protéines et donc les dénaturent. De nos jours, on distingue deux catégories de tanins : les tanins condensés et les tanins hydrolysables (**William, 2003**).

III. Généralité sur *Ammodaucus leucotrichus*

III.1. Description de la famille des Apiacées

La famille des Apiacées, anciennement nommée, Ombellifère en référence à son inflorescence bien caractéristique (**Al-Bayati, 2008**).

Les Apiacées comprennent 300-455 genres et 3.000-3750 espèces, elles se répartissent dans toutes les régions tempérées mais surtout dans l'hémisphère Nord (**Tabanca et al, 2006**). C'est une famille très homogène facile à reconnaître grâce à son inflorescence en ombelles.

Paradoxalement, les espèces de cette famille sont assez difficiles à différencier les unes des autres (Filliat, 2012). Ils ont des saveurs distinctives qui sont en grande partie dues à divers composés volatils dans les fruits et les feuilles. Ils ont, non seulement, une vaste utilisation culinaire, mais aussi de larges applications dans la médecine traditionnelle (Tabanca et al, 2006).

III.2. Description botanique d'*Ammodaucus leucotrichus*

Une petite plante annuelle de 10 à 12 cm de haut, glabre, la tige dressée, rameuse, finement striée. Les feuilles sont finement disséquées et légèrement charnues. Les fleurs sont groupées en ombelles de 2 à 4 branches ; fleurs sont petites, avec cinq pétales libres. Le fruit est une diachaine de 6 à 10 mm de long, et est couverte de longs poils soyeux très denses, crépus, jaune roux à la base, puis blancs (Benhouhou, 2005).

Cette plante est très appréciée et ramassée, ce qui tend à la raréfier. C'est une plante à très forte odeur d'anis (Quezel ; Santa, 1963). Il fleurit habituellement au début du printemps (Février à Avril).



Figure 1 : Photo présente l'aspect générale d'*Ammodaucus leucotrichus*



Figure 2 : l'inflorescence d'*Ammodaucus leucotrichus*



Figure 3 : les graines d'*Ammodaucus leucotrichus*

III.3. Classification

La classification adoptée est basée sur le système APG II (Angiosperm phylogenic Group) établie en 2005 (Asjel ,2012).

| | |
|----------------------|----------------------------------------------|
| ❖ Règne | Plantae |
| ❖ Embranchement | Spermaphytes |
| ❖ Sous-embranchement | Angiospermes |
| ❖ Classe | Dicotylédones |
| ❖ Sous-classe | Astéridae |
| ❖ Ordre | Apiales |
| ❖ Famille | Apiacées |
| ❖ Genre | <i>Ammodaucus</i> |
| ❖ Espèce | <i>Ammodaucus leucotrichus</i> Coss. et Dur. |

III.4. Synonyme et nom vernaculaire

❖ Synonyme

Torilis leucotrichus Coss. et Dur.

❖ Nom vernaculaire

Plusieurs noms sont attribués à *Ammodaucus leucotrichus*, nous citons :

En arabe : Kammûn es-sofi, el massoufa

En targui : akâman

En français : cumin velu, cumin du sahara

III.5. Distribution géographique et écologique

C'est une plante annuelle qui pousse dans les oueds, sur sablo-graveleux sols, dans des conditions arides où la pluviométrie annuelle ne dépasse pas 100 mm.

La distribution entière est basée au nord de l'Afrique : Algérie, Libye, Maroc, Tunisie, elle s'étend jusqu'à l'Egypte et l'Afrique tropicale (Tabanca et al, 2006).

Elle est assez commune dans tout le pâturage désertique (Filliat, 2012) :

- Secteurs du Sahara septentrional et occidental.
- Communément distribué dans toute le Sahara, où il est considéré comme endémique.

III.6. Partie utilisée

Les feuilles et les graines. Les fruits sont récoltés par les nomades pour leur propre usage, habituellement au printemps lorsque les fruits sont mûrs. Il est également vendu aux herboristes dans les marchés locaux, en particulier dans le sud algérien (Sahara: Béchar, Djanet). En Algérie et au Maroc, les fruits sont utilisés soit comme poudre, infusion ou décoction (**Benhouhou, 2005**).

III.7. Utilisation traditionnelle

Les graines d'*Ammodaucus leucotrichus* sont utilisées pour traiter des maladies liées à l'appareil digestif.

Dans le Tassili, en particulier la région de Djanet, elles sont principalement utilisée sous forme de poudre ou infusion pour traiter les symptômes mentionnés ci-dessus. elles sont également utilisés dans les cas d'inappétence et l'indigestion, en mélangeant la poudre des graines avec du lait ou du miel.

Les feuilles dans son état normal, sont utilisées pour aromatiser le thé et en poudre, c'est une épice très appréciée pour la nourriture (**Benhouhou, 2005**).

Au Maroc, les fruits sont utilisés soit sous forme de poudre ou dans une décoction pour traiter les douleurs gastro-intestinale, gastralgies et l'indigestion. Ils sont employés dans le traitement des coups du froid et la fièvre. La plante est utilisée aussi, sous forme de décoction des graines, pour le traitement du diabète (**Benhouhou, 2005**).

Elle a également des propriétés toniques pour les bébés et est pris sous forme de perfusion ou dans le bain (**Asjel, 2012**).

IV. Activités biologiques

IV.1. Activité antioxydante

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation (**Antolovich et al, 2002**).

De nos jours, Il existe un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. Ce n'est pas seulement dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme ou l'ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire (**Guinebert et al., 2005**).

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se réappairer, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique (**Dacosta, 2003 ; Bernardi et al, 2007**).

IV.2. Antimicrobienne

De nombreux travaux antérieurs et actuels, pour la recherche de nouvelles molécules étaient focalisés sur la mise en évidence de pouvoir antimicrobien des plantes médicinales, en raison de l'évolution rapide des bactéries pathogènes vers la multirésistance aux antibiotiques. Ceux dont l'efficacité contre les micro-organismes pathogènes ont été prouvés, trouvent des applications pratiques dans divers domaines.

Les polyphénols et les huiles essentielles constituent les extraits les plus largement exploités. Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement en fonction de leur composition chimique et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs. Les antibiotiques ont montré aussi d'autres inconvénients et des limites d'utilisation: les effets secondaires, toxicité des molécules antimicrobiennes pour l'organisme traité, et les difficultés rencontrées dans le traitement des maladies exigeant la destruction des germes pathogènes indépendamment des facultés de défense du malade (**Siegenthaler et Luthy, 1978**).

IV.3. Cytotoxicité

La cytotoxicité est la propriété qu'a un agent chimique ou biologique d'altérer des cellules, éventuellement jusqu'à les détruire, autrement élimination des cellules cibles comme les cellules étrangères à l'hôte (alloréactivité), cellules altérées, cellules infectées par un virus, cellules tumorales (**Christian, 2002**).

Les médicaments cytotoxiques peuvent empêcher la croissance rapide et la division des cellules Cancéreuses (mitose). Ils peuvent aussi nuire à la croissance d'autre cellules qui se divisent rapidement dans le corps comme les follicules pileux et les revêtements intérieurs de l'appareil digestif de nombreuses cellules normales, qui sont donc endommagée par le traitement qui vise les cellules cancéreuses (**Christian , 2002**).

IV.3.1. Artémia

L'artémie (*Artémia salina*) est une espèce de crustacé qui vit dans les lacs salés, les lagunes et les marais salants, notamment dans le grand lac salé au nord de l'Utah, sur la côte rocheuse au sud de San Francisco, et en mer caspienne (**Hachem et al., 2011**).

➤ **Systematique**

| | |
|-----------------|-----------------------|
| • Règne | Animal |
| • Embranchement | Crustace |
| • Classe | Arthropode |
| • Sous classe | Branchiopode |
| • Ordre | Anostrace |
| • Famille | Artemidae |
| • Genre | Artemia |
| • Espèce | <i>Artemia salina</i> |

Lorsque les conditions de vie du milieu ne sont plus favorables, l'artémie est capable de produire des oocystes, qui ont la faculté de pouvoir, après réhydratation, donner naissance à une larve appelée nauplius (nauplii au pluriel), et ce parfois même des années après. La résistance des oocystes aux changements de milieu, en état de cryptobiose, leur permet de survivre à des températures extrêmes (-190 °C), et un petit pourcentage, est capable de résister dans l'eau bouillante (105 °C) pendant plus de deux heures (**Lenz, 1987**).

Mais la facilité de stockage des oocystes et les qualités nutritionnelles des nauplii en ont surtout fait une nourriture de choix pour la plupart des écloseries de poissons et de crustacés dans le monde. Les nauplii sont distribués aux larves dès l'éclosion ou après 24 à 48h d'enrichissement en protéines et lipides (à ce stade ce sont des métonauplii). Les élevages aquacoles sont donc de gros consommateurs d'œufs d'*Artémia* (**Mclaughlin et al., 1991**).

On utilise aussi les *Artémia* en aquariophilie : ce sont alors souvent les individus adultes qui sont utilisés, frais ou congelés.



Figure 4 : Aspect de l'*Artémia salina*

➤ Description

Adulte, *Artémia salina* mesure en moyenne 8 à 10 mm, mais peut atteindre 15 mm en fonction de son environnement. Son corps allongé est généralement divisé en 20 segments, et comporte 10 paires de *pattes*, appendices ressemblant à des feuilles et qui oscillent à un rythme régulier.

Les adultes peuvent être de couleur pâle, blanc, rose, vert ou transparent, et vivent généralement quelques mois. L'*Artémia salina* est de l'ordre *Anostraca*, qui signifie littéralement *sans coquille*. Son appartenance à la classe des branchiopodes indique que ses branchies sont situées sur le côté des pattes (Abatzopolos et al., 1998).

Matériels
et
Méthodes

Notre expérimentation a été réalisée durant 4 mois au niveau de :

- Laboratoire des molécules actives et valorisation de la biomasse (LMAVB) de l'Ecole Normale Supérieure (ENS) à Kouba (Alger) pour les activités biologiques
- Laboratoire de la microbiologie du groupe SAIDAL BIOTIC usine El Harrach (Alger)
- Laboratoire de recherche des plantes médicinales et aromatiques (USDB) pour l'analyse d'HPLC

I. Matériels

I.1 Matériel végétal

Notre étude a été effectuée sur les graines sèches d'une plante appartient à la famille d'Apiacée nommée *Ammodaucus leucotrichus* récolté dans la région de Debdeb de la wilaya d'Illizi pendant le mois de Septembre 2013.

I.2. Matériel animal

Les œufs de crevette de saumure (*Artémia*) fourni par le centre national de la recherche et de développement de la pêche et l'aquaculture (CNRDPA- Bousmail).

I.3. souches microbiologiques

L'activité antimicrobienne a été évaluée sur 3 souches bactériennes et 2 souches levures (tableau 1).

Tableau1 : Souches microbiennes

| Souches microbiologiques | Références ATCC | Gram |
|---------------------------------|------------------------|-------------|
| <i>Escherichia coli</i> | ATTC 4157 | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATTC 6538 | + |
| <i>Bacillus subtilis</i> | ATCC 9372 | + |
| <i>Candida albicans</i> | ATTC 2601 | / |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | ATTC 9763 | / |

II. Méthodes

II.1. Extraction

Cette étape consiste à extraire le maximum de molécules polyphénoliques contenues dans les graines de la plante ; en utilisant des solvants organiques qui accélèrent et augmentent le rendement d'extraction.

II.1.1. Préparation de l'extrait méthanolique

Les graines sont broyées entièrement, puis pesées à 10g. Cette matière végétale obtenue est mise à macération dans un mélange hydro alcoolique (70ml méthanol/30ml l'eau distillée bouillante) pendant 48 heures, à l'ombre et à une température ambiante. Cette opération est répétée 3 fois avec renouvellement de solvant. Les macéras obtenus sont réunis puis filtrés sur un papier Wattman contenant du sulfate de sodium anhydride. Ensuite, les filtrats sont évaporés à 40°C à l'aide d'un rota vapeur (BUCHI R-200). L'extrait sec obtenu a été conservé au congélateur jusqu'à son utilisation (Figure 5).

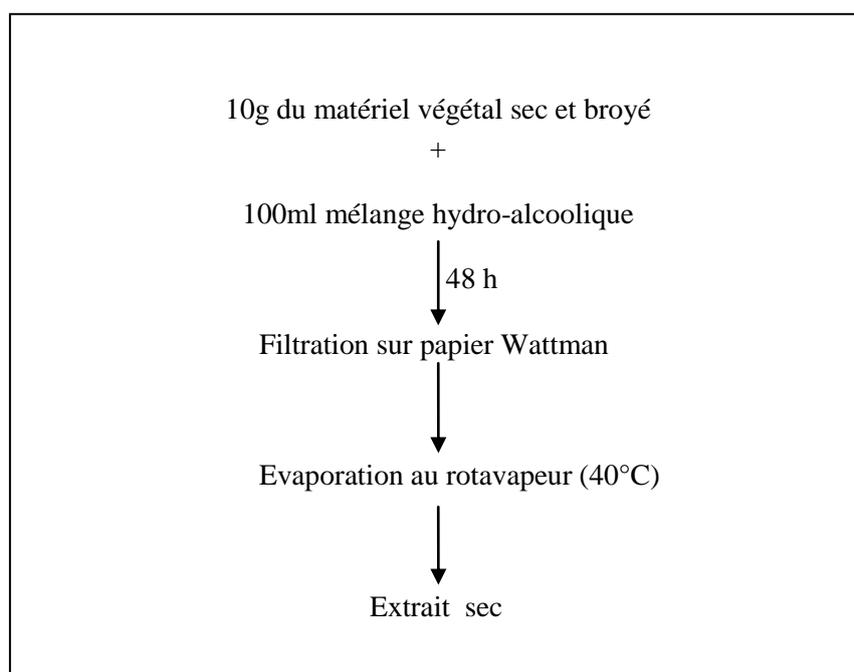


Figure 5 : Protocole de préparation de l'extrait sec.

II.1.2. Fractionnement de l'extrait sec

Le résidu sec est mélangé avec 100ml de l'eau distillée bouillante et laissé à une température ambiante pendant 24 heures.

Dans une ampoule à décanter, l'extrait aqueux est épuisé successivement par 3 solvants (Hexane, Diéthyl éther et l'Acétate d'éthyle). Permettant ainsi de séparer les composés de l'extrait brut selon leur degré de solubilité dans les solvants d'extraction, et donc selon leur degré de glycosylation (**Markham, 1982**). Chaque extraction est répétée trois fois avec l'addition de 50ml de solvant organique.

Les extraits obtenus ont été filtrés sur papier filtre Wattman, en ajoutant le sodium sulfate anhydrous, et évaporés à sec dans un rota vapeur (BUCHI rotavapor R-200) à 40°C.

Les résidus sont repris dans un volume de méthanol après avoir fixé la concentration (10 mg/ml). La Figure 6, résume les étapes de fractionnement de l'extrait aqueux.

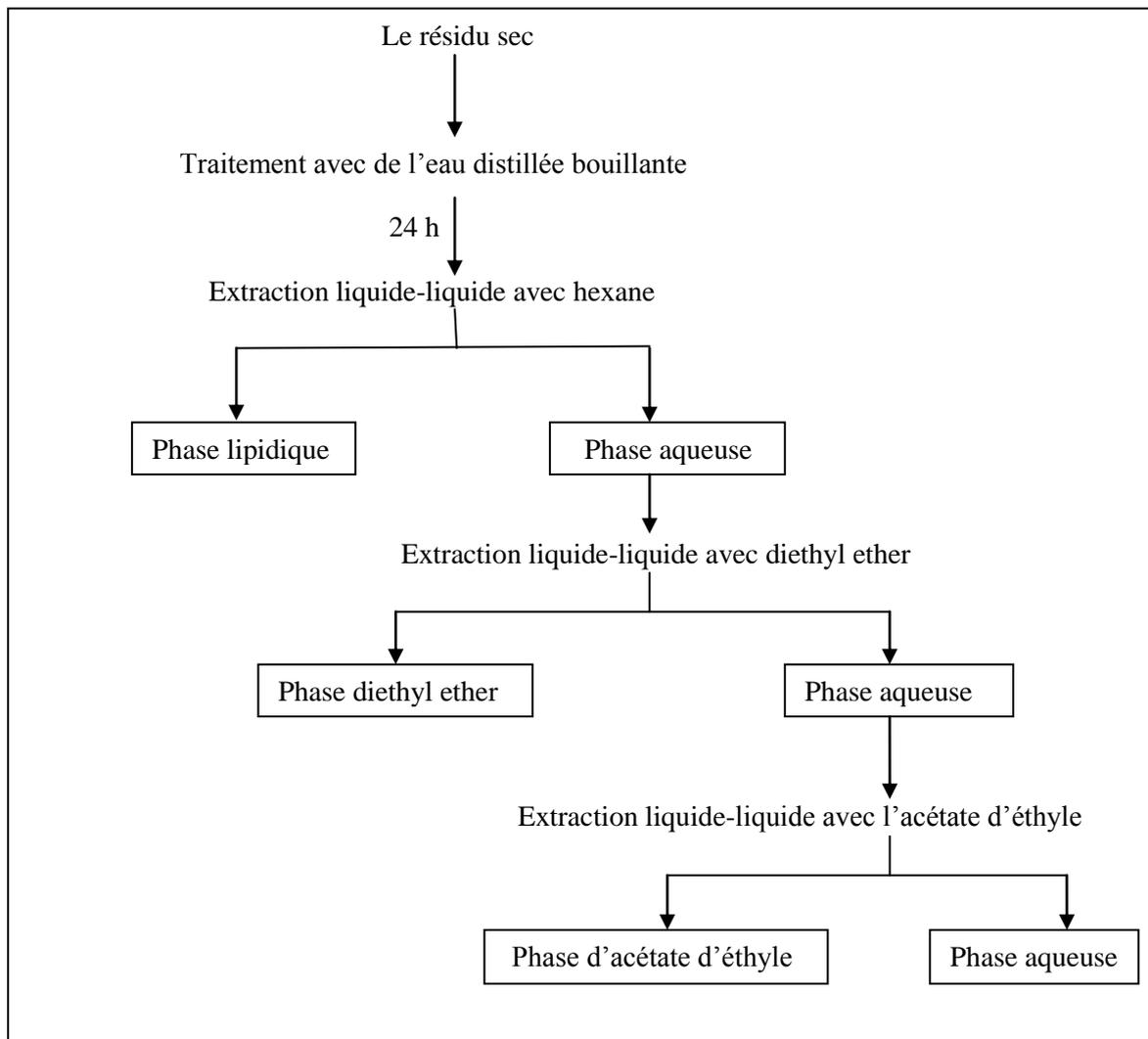


Figure 6 : Les étapes de fractionnement de l'extrait aqueux.

II.1.3. Calcul du rendement

Le rendement de la plante en extraits est le rapport entre le poids de l'extrait et le poids de la plante à traiter (Carré, 1953). Le rendement qui est exprimé en pourcentage a été calculé par la formule suivante:

$$R = \text{PE/PA} \times 100.$$

R= Rendement de l'extrait en pourcentage.

PE= Poids de l'extrait en gramme.

PA= Poids de la plante en gramme.

II.2. Dosage des polyphénols

Le contenu en polyphénols totaux des extraits testés *d'Ammodaucus leucotrichus* est estimé selon la méthode de (Singleton et Rossi 1965 in D.Ramful 2010).

➤ Mode opératoire

Dans un tube à essai, on introduit un volume de 4 ml d'extrait dilué (0,1ml d'extrait + 0,39ml d'eau distillée) à concentration de 10mg/ml avec 0,25ml de réactif folin ciocalteu. Après 3min, on rajoute 0,75ml de carbonate de sodium à 20%. Les tubes ont été mélangés au vortex puis mis au bain marie à 40°C pendant 40min.

La lecture de la coloration bleue a été faite à 765nm contre un blanc contenant tous les mélange sauf l'extrait testé. Toutes les manipulations sont répétées trois fois.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique. Elle est exprimée en milligramme d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g).

II.3. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes est effectué selon la méthode de trichlorure d'aluminium; (AlCl₃) (Bahorum et al., 1996).

➤ Mode opératoire

Dans un tube à essai on prélève 1,5 ml de chaque extrait (préparés avec des dilutions convenables dans le méthanol) et on ajoute 1,5 ml d'AlCl₃·6H₂O à 2% dans le méthanol. Le mélange est vigoureusement agité, puis l'ensemble est incubé à l'ombre à une température ambiante pendant 10 minutes. L'absorbance est lue à 440 nm. Toutes les manipulations sont répétées 3 fois.

La quantification des flavonoïdes se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un flavonoïde standard, la quercétine. La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de poids sec de la plante (mg EQ/g Ps).

II.4. Analyse des extraits par HPLC-DAD

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) est une technique très populaire, et performante pour l'analyse des composés phénoliques que ce soit à des fins qualitatifs ou quantitatifs (Macheix J.J., et al., 2006).

HPLC-DAD est une HPLC couplée à un détecteur à barrette de diodes (DAD, Diode Array Detector) qui permettent de suivre une analyse à plusieurs longueurs d'ondes simultanément, et d'enregistrer les spectres d'absorption de chaque composé élué par la phase mobile (Merghem R., 2004 ; Misan A.C. et al., 2011). Il fournit en plus du chromatogramme, des renseignements spectraux pour identifier les composés. Le détecteur est donc composé d'une barrette contenant plusieurs centaines de diodes, chacune recevant le rayonnement contenu dans un petit domaine spectral, indiquant ainsi l'absorbance moyenne sur un intervalle très étroit de longueurs d'ondes. Ce système permet la caractérisation des composés au travers de l'acquisition du spectre en temps réel ainsi qu'une représentation en trois dimensions :

- Temps de rétention
- Absorbance
- Longueur d'onde

II.4.1. Composition de l'appareil

- Chromatographie Liquide : HPLC agilent technologies 1260 infinity
- Quatre pompe= 1311B (numéro de série =DEAB 703650)
- Injecteur automatique : G1329B (numéro de série =DEAAC09042)
- Détecteur DAD= G1315D (numéro de série =DEAAX02521)
- Thermostat= G1330B (numéro de série =DEBAK06348)

II.4.2. Conditions expérimentales

- Phase stationnaire une colonne C18 (G1316A (numéro de série =DEACN10111)
Avec les dimensions suivantes longueur 250mm* largeur 4.6mm *épaisseur 5µm)
- Phase mobile (éluant) :
Solvant A : eau +0.2% acide acétique
Solvant B : Acétonitrille
- Temps : 0 min = 95% A+ 5%B
30 min = 5% A+ 95%B
- Débit : 1 mL/min
- Longueurs d'onde : 270, 320 et 370 nm
- Température : 22± 0.8°C
- Le volume d'injection d'extrait : 5µL

II.4.3. Expression des résultats

Le logiciel utilisé pour la lecture des résultats est celui de ChemStation. Les polyphénols contenus dans chaque extrait analysé ont été identifiés par la comparaison des temps de rétention obtenus par ceux des témoins.

Tableau 2 : Temps de rétention des étalons à différentes longueurs d'ondes.

| Etalons |
|----------------------|
| Acide galique |
| Apigenin |
| Caffeique |
| Chlorogénique |
| Vanillique |
| Luteolin 4 glucoside |
| Apigin 7glucoside |
| Ferritique |
| Vanilline |
| Luteolin 7 glucoside |
| Quercitine |
| Rutin |
| Hesperindin |
| Ellargique |
| Coumarique |
| Catichine |

| |
|-------------------|
| Acide salicilique |
| Rosmarinique |

II.5. Évaluation de l'activité antioxydante

De nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques purs ou des extraits. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Dans notre étude nous avons utilisé deux techniques : le pouvoir du piégeage du radical DPPH et le test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).

II.5.1. Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH

- Principe

Le pouvoir antioxydant de nos extraits qui s'exprime par la donation d'un électron ou d'un atome d'hydrogène a été mesuré par une méthode spectrophotométrique (**Burits et Bucar, 2000**). En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH instable possède une coloration violette foncée, lorsqu'il est réduit, la coloration devient jaune pâle (figure 7).

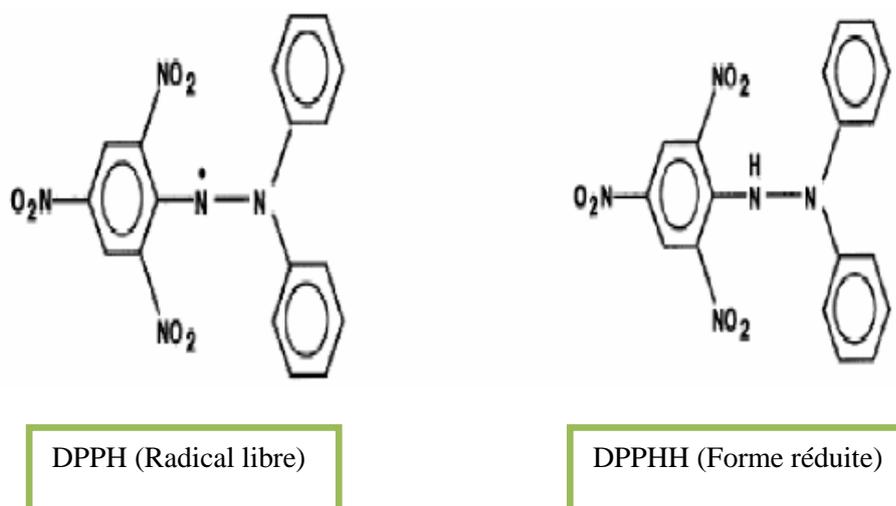


Figure 7: Forme libre et réduite du DPPH (**Mohammedi, 2006**).

Nb: Le DPPH[•] (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH[•], qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon. (**Parejo et al, 2002**).

- **Mode opératoire**

L'Activité antioxydante du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par **(Lopes-Lutz et al, 2008)**. Dans des tubes secs et stériles, on met 1 ml de chaque extrait testé à différente concentration (de 0.1 à 1mg/ml). Puis, on ajoute 1 ml de solution méthanolique de DPPH à 0.004%. Après agitation par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité, à une température ambiante pendant 30 minutes. Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm par un spectrophotomètre. Le blanc est constitué d'une solution méthanolique de DPPH.

NB : Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique et le BHT.

L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation suivante :

- **Calcul des pourcentages d'inhibitions**

- le pourcentage d'activité antioxydante (AA %) est donné par la formule suivante :

$$AA \% = (A \text{ blanc} - A \text{ ech}) / A \text{ blanc} \cdot 100$$

A blanc : absorbance du témoin (représente l'absorbance du DPPH au temps 0 avant addition de la solution testée.

A ech : absorbance de l'échantillon testé.

- **Calcul des IC50**

IC50 est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Les IC50 sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées et les standards.

II.5.2. Méthode de la réduction de fer (FRAP)

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en fer ferreux (Fe²⁺). En effet, le Fe³⁺ participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm **(Oyaizu, 1986)**.

- **Mode opératoire**

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode préconisée par **Oyaizu (1986)**. Dans des tubes secs, 1 ml de l'extrait à différentes concentrations (de 0,05 à 1mg/ml) est mélangé avec 2,5 ml de la solution tampon phosphate (0,2M ; pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium (K₃Fe(CN)₆) à 1%. Les tubes sont incubés au bain-marie à 50°C pendant 20 min. Puis, 2,5 ml de l'acide trichloracétique à 10% est additionné. Les tubes sont centrifugés à 3000 tours pendant 10 min. Enfin, 2,5 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution aqueuse de FeCl₃ à 0,1%.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700nm contre un blanc (Tampon phosphate), en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre). Le contrôle positif est représenté par deux solutions des antioxydants standards ; l'acide ascorbique et le BHT dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Hubert, 2006**).

II.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé (Aromatogramme), Dans cette partie nous avons testé trois bactéries et deux levures.

II.6.1. Principe

Le principe de l'aromatogramme se fait de la même manière qu'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des essences aromatiques, préalablement sélectionnées et reconnues.

L'aromatogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode de disques est une technique qualitative permettant de déterminer la sensibilité des microorganismes vis-à-vis d'une substance réputée antimicrobienne. L'apparition et l'importance du diamètre de la zone d'inhibition reflète l'impact des extraits sur les souches microbiennes. Ainsi, ces dernières seront qualifiées de sensibles ou très sensibles, ou résistantes (figure 8).

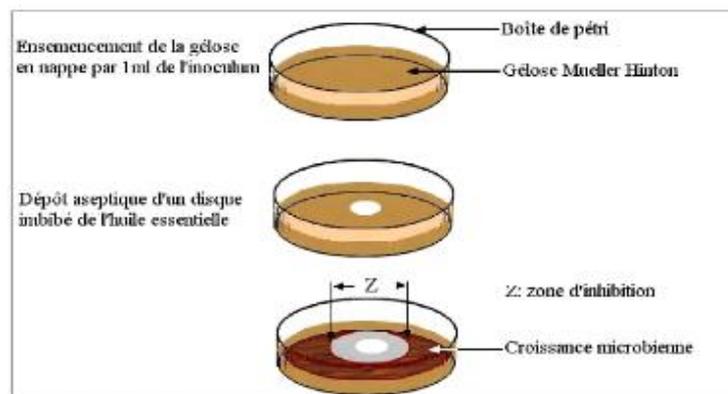


Figure 8: Illustration de la méthode d'aromatogramme.

II.6.2. Mode opératoire

II.6.2.1. Préparation de l'inoculum

➤ Préparation de la culture jeune (repiquage)

L'activité antimicrobienne doit être réalisée sur des souches jeunes en phase de croissance exponentielle. La réactivation des cultures est effectuée par repiquage à la surface de la gélose nutritive pré-coulée dans des tubes. Ensuite incubée pendant 24h à 37C° pour les bactéries et 48h à 23 C° pour les levures.

➤ Préparation de la suspension

A partir d'une culture jeune de 24 heures pour les bactéries et 48 heures pour les levures, nous préparons des suspensions, en prélevant 2 à 3 colonies bien isolées et identiques, que nous mettons dans 10ml d'eau physiologique stérile, puis nous agitions au vortex ; nous faisons une première lecture de la transmission (%) avec le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620nm qui doit être entre 22% et 32% pour les bactéries et les levures. Cette valeur correspond à une concentration optimale de 10^7 à 10^8 germes/ml (Figure 9).

II.6.2.2. Ecoulement du milieu de culture

Nous faisons fondre les milieux Muller Hinton (M H) et Sabouraud au bain-marie à 95 C° ; ensuite nous versons aseptiquement devant le bec bunsen une couche de 15ml des deux milieux dans des boîtes de Pétri de 90mm de diamètre, nous laissons refroidir sur la paillasse (figure 10).

II.6.2.3. Ensemencements

Après solidification des milieux, on introduit 10 μ l de l'inoculum, à l'aide d'un râteau, on étale toute la suspension sur la gélose en stries serrées (on obtient un étalement uniforme en nappe) figure 11.

II.6.2.4. Dépôt de disque

A l'aide d'une pince stérile, nous prélevons un disque absorbant stérile de 6mm de diamètre et nous l'imbibons avec les extraits, celle-ci va absorber progressivement jusqu'à imprégnation totale. Puis, on dépose les disques à la surface (on a déposé 3 disques dans chaque boîte de pétri).

II.6.2.5. Incubation

Nous incubons les boîtes de pétri à 37 C° pendant 24h pour les bactéries et à 23C° pendant 48h pour les levures.

II.6.2.6. Expression des résultats

L'activité antimicrobienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance microbienne autour des disques imprégnés de la substance inhibitrice. Le résultat de cette activité est exprimé par le diamètre de la zone d'inhibition.

Les diamètres des zones d'inhibition lorsqu'elles existent ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse (figure12).



Figure 9: les suspensions microbiennes (Photographie originale).



Figure 10: Ecoulement du milieu de culture (Photographie originale).



Figure 11: Ensemencements (Photographie originale).



Figure 12: pied à coulisse (Photographie originale).

II.7. Cytotoxicité

II.7.1. Protocole Expérimental

Le test Saumure de crevettes (*Artémia*) est un très simple dosage de paillasse utilisé pour mesurer la cytotoxicité des extraits de plantes, ainsi que des composés de synthèse. Les œufs d'artémias sont utilisés pour l'alimentation des poissons. Evaluation des produits naturels et composés synthétiques à l'aide de test crevette de saumure décrit non seulement la cytotoxicité mais aussi les activités anticancéreux, antiviraux, insecticide et pesticide potentiel (**Sheikh et al ., 2004**).

On utilise les œufs de crevette de saumure dans l'eau de mer préalablement préparé, en dissolvant le sel NaCl (36 g) dans 1l d'eau distillée. On ajoute une source d'oxygène dans bac expérimental, ainsi que une lampe de 60 W proche comme source de lumière et de chaleur (27-28°). Environ 1g des œufs de crevette sont placées dans un litre de l'eau de mer. Après 10-12h, l'éclosion des œufs commence. Deux jours après, sont accordés pour que les crevettes sont dites mures (larve-nauplii) et peuvent être employées (48 à 72h) (**McLaughlin et al., 1991**).

Après 72h, les larves sont récoltées, en arrêtant l'aération et laissant la culture s'arranger pendant 10 min. Les œufs vides flottent sur la surface et les œufs non éclore descendent au fond. L'artémia nouvellement éclore sont concentrées juste au-dessus des œufs du fond. Grâce à son caractère phototopique (attirer à la lumière), lorsqu'on expose une lumière au milieu de récipient d'une façon directe, les larves vivantes se réunissent au tour de la lumière ce qui facilite sa récupération par siphonage (**Hoff et Snell, 1987**).

Ensuite, on met 2.5 ml de l'eau de mer préalablement préparé dans des tubes a essais en verre avec les trois extraits à différentes concentrations (10 000 µg, 1000µg, 100µg, 10µg, 1µg). Chaque essai est répété trois fois. 10 artémia sont additionnées à chaque tube et incubées pendant 24 h à une température ambiante et à l'obscurité. La même solution est utilisée sans extrait pour le contrôle négatif. Après 24 h d'incubation, le nombre des artémia mortes et vivantes est compté sous une loupe.

Résultats
et
Discussions

I. Rendement

La masse de l'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein qui utilisée dans l'évaporation de l'extrait, et le poids du ballon vide.

Les rendements d'extractions ont été déterminés par la formule suivante :

$$R\% = \frac{\text{poids de l'extrait en gramme}}{\text{poids de la plante en gramme}} \times 100$$

Les résultats ont été exprimés en pourcentage (p/p) et présenté dans la figure 13.

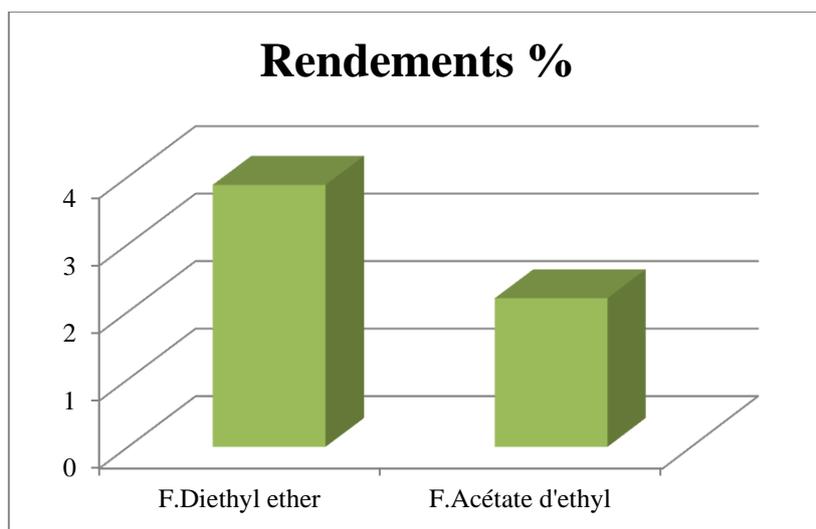


Figure 13 : Rendement des fractions.

Le rendement d'extrait méthanolique obtenu est calculé par rapport au poids de la poudre utilisée (10g), et pour les fractions diéthylique et d'Acétate, le rendement est calculé par rapport au poids de l'extrait sec brut obtenu dans la première phase.

Le rendement de l'extrait méthanolique a montré un pourcentage de 17.2% par rapport au poids de la poudre.

D'après l'histogramme illustré dans la figure 13, Le rendement de différentes fractions des solvants organiques (diéthyl éther, acétate d'éthyle) calculé par rapport au poids de l'extrait brut sont bien inférieurs (3.88%, 2.20% respectivement). Ceci peut être attribué au fait que la grande majorité des composés de cette plante sont solubles dans le méthanol. En plus, le mélange hydro-alcoolique a la tendance d'extraire plus de composés que le solvant seul, cela peut être expliqué par le simple fait que l'eau est un solvant fortement polaire, connu pour extraire une large gamme des molécules dont une quantité importante de composés non phénoliques comme les glucides et les protéines (**Bonnallie et al., 2012**).

En effet, il est difficile de comparer les valeurs de nos rendements avec d'autre études, car le rendement n'est que relative et semble être lié aux propriétés génétiques des plantes ainsi qu'à l'origine géographique, aux conditions et à la durée de stockage de la récolte et aussi des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée (**Lee et al., 2003**).

II. Résultats de l'étude quantitative

Les composés phénoliques comme les acides phénoliques et les flavonoïdes sont considérés comme les contributeurs majeurs à la capacité anti-oxydante des plantes (Li et al., 2007). Ces composés possèdent aussi diverses activités biologiques telles que les activités anti-inflammatoire, antibactérienne, antivirale et antiallergique, qui peuvent être reliées à leur activité anti-oxydante (Gulcin et al., 2010). C'est la raison pour laquelle, les dosages des polyphénols totaux et des flavonoïdes d'*Ammodaucus leucotrichus* ont été effectués dans cette étude.

II.1 Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des phénols totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrique adaptée de Singleton et Ross (1965) avec le réactif de Folin-Ciocalteu.

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait a été alors calculée à partir de la courbe d'étalonnage (exprimée en milligrammes équivalent en acide gallique par gramme de la matière sèche), ayant l'équation :

$$Y = 0,1035x + 0,1046$$

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 14.

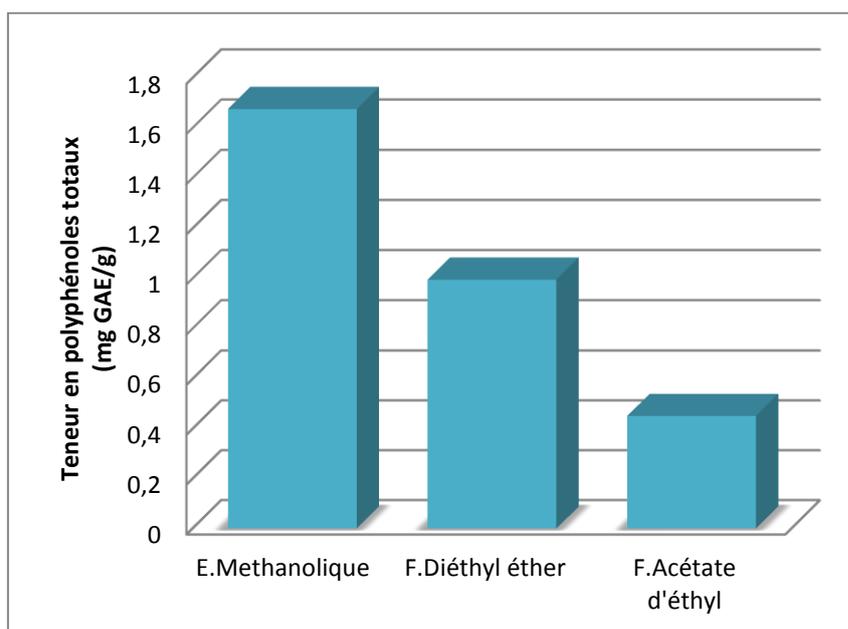


Figure 14: histogramme de dosage des polyphénols totaux.

D'après les résultats, on remarque que la quantité des composés phénoliques varie entre 1,7 et 0,4 mg/g dans les différents extraits. Le taux des composés phénoliques le plus élevé a été détectés dans l'extrait par le méthanol (1,675 mg GAE/g). Cependant, cette teneur est 6 fois supérieur à diéthyle éther (0,995 mg GAE/g)), et 4 fois supérieur à l'acétate d'éthyle (0,451 mg GAE/g).

Toutes les plantes de la famille des Apiacées étudiées par (Wojdylo *et al.*, 2007) présentent une teneur très basse en polyphénols. Ceci est en accord avec les résultats présentés dans la figure 14.

En effet, la distribution des métabolites secondaires peut changer pendant le développement de la plante. Ceci peut être lié aux variations des conditions climatiques (la température, exposition solaire, sécheresse, salinité), qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols (Falleh *et al.*, 2008). La comparaison de nos résultats avec celle de l'étude de Asjel (2012), sur la même plante (*Ammodaucus leucotrichus*) mais de la région de Bechar ; a montré une valeur d'E.M plus élevée (482,28 mgEAG/g).

De plus, l'étude de S.Athamena, (2010) sur le *Cuminum cyminum L.* montre respectivement des valeurs 28,99 et 19,39 mg EAG/g pour la F.M et F.Ac. Ces différences peuvent être provoquées par la faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec ce réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé (Tawaha *et al.*, 2007).

D'autre part, le solvant d'extraction peut emporter des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique (Djeridane *et al.*, 2006).

II.2. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits a été déterminée selon la méthode de trichlorure d'aluminium. Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage, ayant l'équation:

$$Y = 0,2829x - 0,1158$$

La quantité des flavonoïdes a été rapportée en milligramme d'équivalent de la quercétine par gramme de poids sec de l'extrait (mg EQ/g). À partir de la courbe d'étalonnage, la concentration des flavonoïdes est résumée dans la figure 15.

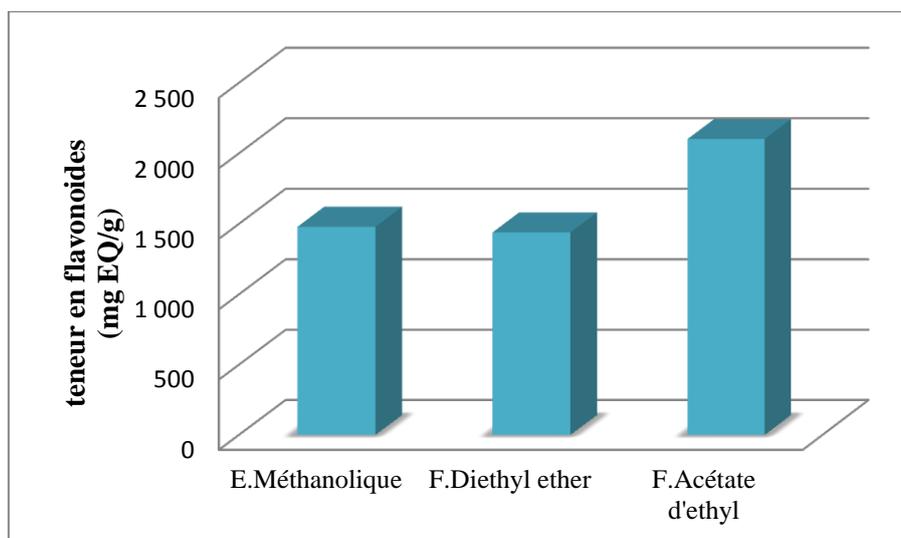


Figure 15 : histogramme de dosage des flavonoïdes.

Nous pouvons remarquer que, la détermination des taux de flavonoïdes *d'Ammodaucus* révèle que la fraction d'acétate d'éthyle est le plus riche en flavonoïdes par rapport aux autres extraits (2.101 mg EQ/mg). En plus, l'extrait méthanolique (1.479mgEQ/mg) et la fraction diéthyl éther (1.439 mg EQ/mg) ont présentés des teneurs rapprochées en flavonoïdes.

La raison principale pour laquelle on a choisi cette classe de polyphénols, réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits (**Gomez-Caravaca et al, 2006**).

Selon (**Bruneton, 1999**), tous les flavonoïdes n'ont pas la même propriété de solubilité car certains flavonoïdes sont solubles dans l'eau et dans l'alcool alors que d'autre ont des propriétés hydrosolubles extrêmement faibles. De ce fait, le principe utilisé pour l'extraction des flavonoïdes est basé sur le degré de solubilité des flavonoïdes dans les solvants organiques. En tenant compte de la sélectivité de ces solvants utilisés pour le fractionnement et ainsi leurs caractères volatiles.

En revanche, **Asjel 2012** a rapporté dans ces études, des résultats complètement différents avec un taux de 61.57 mg EC/mg pour l'extrait méthanolique.

III. Analyse qualitative par HPLC

L'opération de l'HPLC à été effectuée sur les trois extraits de la plante, a duré 30min à différentes longueurs d'ondes (270,320et 370nm), permet l'identification de certains composés phénolique, cette dernière est basée sur la comparaison des temps de rétention des différents constituants des extrais avec ceux des différentes standards analysés dans les mêmes conditions. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Interprétation des résultats lors de l'analyse en HPLC-DAD des différents extraits *d'Ammodaucus leucotrichus* à longueurs d'ondes 270nm, 320nm et 370 nm.

| Etalons | Temps de rétention (min) | Pourcentage % | | |
|----------------------|--------------------------|----------------------|------------------------|----------------------------|
| | | Extrait méthanolique | Fraction diethyl ether | Fraction d'acétate d'éthyl |
| Acide galique | 270nm =2.507 | 0.4670 | 0.0198 | - |
| | 320nm = 2.505 | - | 0.0429 | - |
| | 370nm = | - | - | - |
| Apigenin | 270nm = 11.051 | 0.4139 | - | - |
| | 320nm = 11.051 | 0.6966 | - | - |
| | 370nm = 11.051 | 3.0401 | - | 4.0949 |
| Apigin 7 glucoside | 270nm =15.695 | 0.1193 | 0.3478 | - |
| | 320nm = 15.695 | 0.4056 | 0.4456 | - |
| | 370nm = 15.695 | 0.5326 | 1.4017 | - |
| Vanilline | 270nm = 10.327 | 48.3102 | - | - |
| | 320nm =10.331 | 65.0283 | 0.0810 | - |
| | 370nm = 10.332 | 1.8543 | - | - |
| Luteolin 7 glucoside | 270nm = 10.052 | 0.4312 | 0.0663 | 6.1885 |
| | 320nm = 10.052 | - | 0.0810 | 18.6511 |
| | 370nm = 10.052 | - | 0.6759 | 58.9891 |

| | | | | |
|--------------------|----------------|----------------|--------|---------|
| Quercitine | 270nm = 13.041 | - | 0.1301 | 0.1843 |
| | 320nm = 13.041 | - | 0.3688 | 2.2224 |
| | 370nm = 13.041 | - | - | - |
| Rutin | 270nm = 9.436 | - | - | 0.2486 |
| | 320nm = 9.417 | - | - | - |
| | 370nm = 9.414 | - | - | - |
| Hesperindin | 270nm = 10.955 | 0.0575 | - | 0.6949 |
| | 320nm = 10.955 | - | - | 10.0027 |
| | 370nm = 10.955 | - | 2.6733 | - |
| Ellargique | 270nm = 9.703 | - | 0.0367 | 0.6645 |
| | 320nm = 9.702 | - | - | - |
| | 370nm = 9.705 | - | - | - |
| Catichine | 270nm = 7.262 | - | - | 0.4032 |
| | 320nm = 7.313 | - | - | 0.8941 |
| | 370nm = 7.273 | - | - | - |
| Acide salicilique | 270nm = 13.629 | 0.6568 | 0.0512 | - |
| | 320nm = 13.628 | 2.1241 | 0.1438 | 0.5992 |
| | 370nm = | - | - | - |
| Acide rosmarinique | 270nm = 11.598 | 0.0754 | 0.1621 | - |
| | 320nm = 11.598 | 0.3134 | 0.4762 | - |
| | 370nm = 11.597 | - | 1.6292 | - |
| Coumarique | 270nm = 14.505 | - | - | - |
| | 320nm = 14.490 | - | 1.3563 | 1.7967 |
| | 370nm = 14.502 | - | - | - |
| Ferritique | 270nm = 9.901 | - | - | - |
| | 320nm = 9.902 | - | - | - |
| | 370nm = 9.899 | 15.2978 | - | - |

L'extrait méthanolique d'*Ammodaucus leucotrichus* conduit à l'obtention de 69 pics à une longueur d'onde égale 270nm. Huit (8) composés phénoliques sont identifiés, il s'agit de la vanilline, qui présente le pourcentage le plus élevé (48.3102%), suivi par l'acide salicilique (0.6568%), l'acide galique (0.4670%), luteolin 7 glucoside (0.4312%) et l'apigenin (0.4139%), l'apigin 7 glucoside (0.1193%), l'acide rosmarinique (0.0754%) et la hesperindin (0.0575%). Ainsi à une longue d'onde de 320nm, on a obtenus 52 pics dont également cinq (05) composés phénoliques sont identifiés : Vanilline (65.0283%), l'acide salicilique (2.5752%), l'apigenin (0.6966%), l'apigin 7 glucoside (0.4056%) et acide rosmarinique (0.3134%). Et à une longue d'onde de 370nm, on a obtenus 29 pics dont quatre sont identifié : Ferritique (15.2978%), l'apigenin (3.0401%), la vanilline (1.8543%) et l'apigin 7 glucoside (0.5326%).

Les essais réalisés sur la fraction acétate d'éthyle d'*Ammodaucus leucotrichus* ont conduit à l'obtention de 42 pics (annexe 2) à une longue d'onde de 270nm dont Six (06) composés phénoliques ont été identifiés : Luteolin 7 glucoside avec un pourcentage de 6.1885 , Quercitine (0.1843%), Rutin (0.2486%),Hesperindin(0.6949%), Ellargique (0.6645%) et Catichine (0.4032%). Ainsi à une longue d'onde de 320nm, on a obtenus 28 pics dont également six (06) composés phénoliques ont été identifiés : Luteolin 7 glucoside (18.6511%), Quercitine (2.2224%), Hesperindin (10.0027%), Coumarique (1.7967%), Catichine (0.8941%) et Acide salicilique (0.5992%). Et enfin à une longue d'onde de 370nm, on a obtenus 8 pics dont deux seulement sont identifiés Apigenin (4.0949 %) et Luteolin 7 glucoside (58.9891%).

Les résultats des analyses effectuées sur la fraction diéthyl éther par HPLC indiquent que cet extrait comporte des métabolites secondaires signalés par le chromatogramme, comprenant 61 pics, dont 7 ont été identifiés à une longue d'onde de 270nm (annexe 2). Il y a une prépondérance de la présence de plusieurs composés phénolique et de leurs dérivés. Le composé qui présente le pourcentage le plus élevé est l'apigin 7 glucoside avec un pourcentage égale à 0.3478%, suivie de l'acide rosmarinique (0.1621%), Quercitine (0.1301%), Luteolin 7 glucoside (0.0663%), Acide salicilique (0.0512%), Ellargique (0.0367%) et l'acide galique avec un pourcentage de 0.0198 % qui est le plus bas. Ainsi à une longue d'onde de 320nm, le chromatogramme obtenu montre la présence de 49 Pics, dont sept (7) composés ont été identifiés. Le Coumarique qui présente un pourcentage égale à 1.3563%, suivie par l'acide rosmarinique(0.4762%), l'apigin 7 glucoside(0.4456%), Quercitine(0.3688%), acide salicilique (0.1438%), Luteolin 7 glucoside (0.0810%) et l'acide galique qui présente le pourcentage le plus bas égale à 0.0423%. le chromatogramme obtenu avec une longue d'onde de 370nm, nous a permis d'obtenir 25 pics dont également quatre (04) sont identifiés : Hesperindin (2.6733 %) qui est le plus élevé, suivie par l'acide rosmarinique(1.6292%) et l'apigin 7 glucoside (1.4017%), luteolin 7 glucoside (0.6759%).

La comparaison des temps de rétention (Tableau 2) des standards avec ceux enregistrés dans les différents chromatogrammes (Tableau 3), permet l'identification probable de certains flavonoïdes dans nos extraits (**Merken et al., 2000**).

Proestos et al. (2006) ont mentionné que le méthanol utilisé pour l'extraction a un rôle protecteur. Il peut empêcher les composés phénoliques d'être oxydée par des enzymes, telles que des phénoloxydases. La colonne utilisée pour séparer les composés phénoliques est exclusivement à phase inverse. En plus, ce système est une haute technique de résolution chromatographique largement répandue, pour la séparation et la quantification simultanée des substances phénoliques.

Tous les composés phénoliques ont été identifiés en fonction de leur temps de rétention et des caractéristiques spectrales contre ceux des standards. Les résultats confirment une variation de contenu phénolique des extraits des plantes. En effet, la présence de **Luteolin 7 glucoside** dans nos différents extraits analysés à 270nm, mais à 320nm et à 370nm il est présent dans F.De et F.Ac.

Acide salicilique signalé dans les trois extraits à longueur d'onde égale 320 nm.

La présence de la **quercétine** (flavonol) dans F.De et F.Ac lors d'une analyse par les longueurs d'ondes de 270nm et 370nm.

D'après nos résultats et celle de **Bettaieb et al., (2010)** ont montré que les graines de *Cuminum cyminum* (Apiaceae), contiennent de nombreux composés phénoliques tels que l'acide gallique, la coumarine, Quercétine, l'acide Vanilic. Et à la suite de **Nadeem et Asad (2012)** qui ont démontré que l'analyse quantitative a montré la présence de quercétine dans les graines du *Cuminum cyminum*.

IV. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits végétaux traduit leur aptitude à piéger les radicaux libres de l'organisme. Deux méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des extraits : la méthode de DPPH et la réduction de fer (FRAP).

IV.1. Résultat de l'activité antioxydante testée par la méthode du DPPH

Le radical DPPH est l'un des substrats les plus utilisés généralement pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse (Bozin *et al.*, 2008).

Dans la détermination de l'activité antioxydante, on a effectué un test d'inhibition du radical DPPH. Les résultats sont exprimés en termes d'IC50. Les valeurs obtenues ont permis de tracer la courbe (figure 16), qui représente la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des extraits.

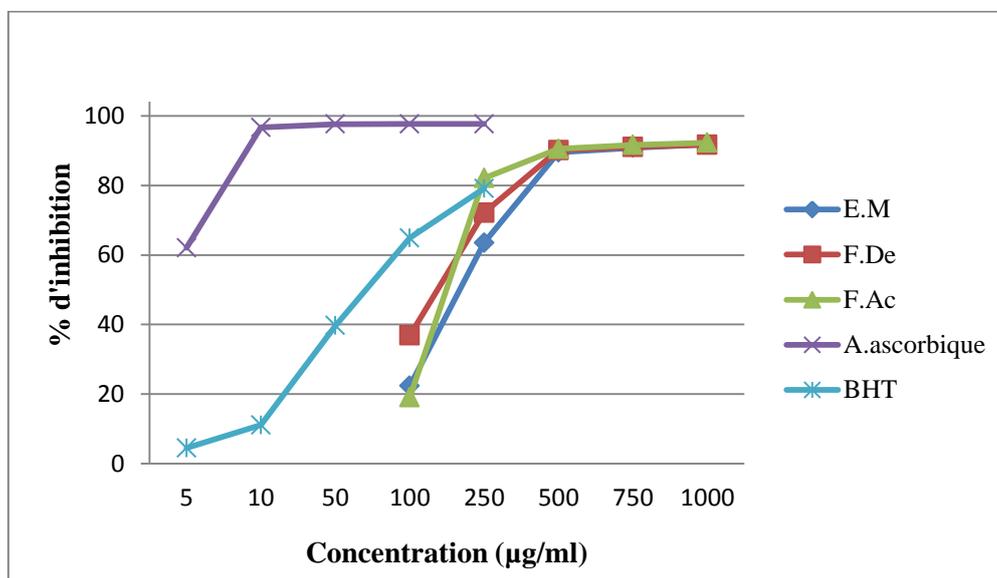


Figure 16 : Pourcentage d'inhibition de DPPH par E.M, F.De et F.Ac et les standards.

D'une manière générale, tous les extraits testés ont provoqués une diminution plus ou moins importante ; réduction de DPPH selon leur concentration.

D'après nos résultats, nous remarquons que, pour les trois extraits testés, le pourcentage d'inhibition est rapproché.

Les extraits de notre plante présentent des activités antioxydantes nettement inférieures que celle de la référence (A.ascorbique). A une concentration de 5 µg/ml, il atteint un pourcentage d'inhibition égale à 62,07 %, alors que pour les extraits méthanolique, diéthylique et acétique, à une concentration de 250 µg/ml où ils atteignent un pourcentage d'inhibition égale à 63,52%, 72,16% et 82,13% respectivement.

La réduction du DPPH est presque totale à partir d'une concentration de 10µg/ml pour l'acide ascorbique, et d'une concentration de 500µg/ml pour les trois extraits de l'*Ammodaucus*.

A partir des résultats obtenus et pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant, nous avons introduit le paramètre IC50 (tableau 4).

Tableau 4 : IC50 des extraits E.M, F.De et F.Ac et des références pour l'inhibition du DPPH.

| Extraits | IC50 (mg/ml) |
|------------------|--------------|
| E.M | 1.67 |
| F.De | 1.37 |
| F.Ac | 1.48 |
| Acide ascorbique | 0.65 |
| BHT | 1.40 |

Les valeurs des IC50, présentées dans le tableau1, nous permettent d'évaluer et de comparer l'efficacité des extraits. Nous rappelons que plus la valeur de la IC50 est faible plus l'extrait est puissant vis-à-vis des radicaux libres.

En comparant les résultats de nos extraits de l'activité antioxydante à ceux des composés de référence (A. ascorbique et le BHT), on constate que :

L'acide ascorbique a montré une activité antiradicalaire puissante avec IC50 de l'ordre 0.65mg/ml, par rapport aux extraits testés qui s'avèrent moins actifs.

L'activité de l'extrait d'acétate d'éthyle (1.48mg/ml) est presque identique à celle du BHT (1.40mg/ml) et la capacité antioxydante des trois extraits est dans l'ordre :

Fraction diethyl éther > fraction d'acétate d'éthyle > extrait méthanolique

Plusieurs études ont révélées que la présence des composés phénoliques dans les plantes est associée à leurs activités antioxydantes, cela est probablement due à leurs propriétés réductrices qui les rendent des agents réducteurs ou des donneurs d'hydrogène (**Chang et al. 2001 ; Ismail et al., 2010**).

L'évaluation de l'activité antiradicalaire doit être interprétée avec précaution du fait que l'absorbance du DPPH à 517nm diminue sous l'action de la lumière, de l'oxygène, en fonction du pH et le type du solvant additionne à l'antioxydant. La structure chimique et la polarité de l'antioxydant sont déterminantes pour sa capacité à piéger les radicaux libres. Des effets synergiques mais aussi antagonistes ont été observés dans des solutions modèles qui contiennent plusieurs composés fonctionnels (mélange complexe ou poly moléculaires) (**Popovici et al. , 2009**).

IV.2. Méthode de la réduction de fer (FRAP)

Cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} . La puissance de réduction est l'un des mécanismes antioxydants (**Karagozler et al., 2008**).

Dans notre travail nous avons opté pour tester les différents extraits de la plante étudiée. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait à différentes concentrations en fonction de leur absorbance. Les résultats représentés dans la figure 17.

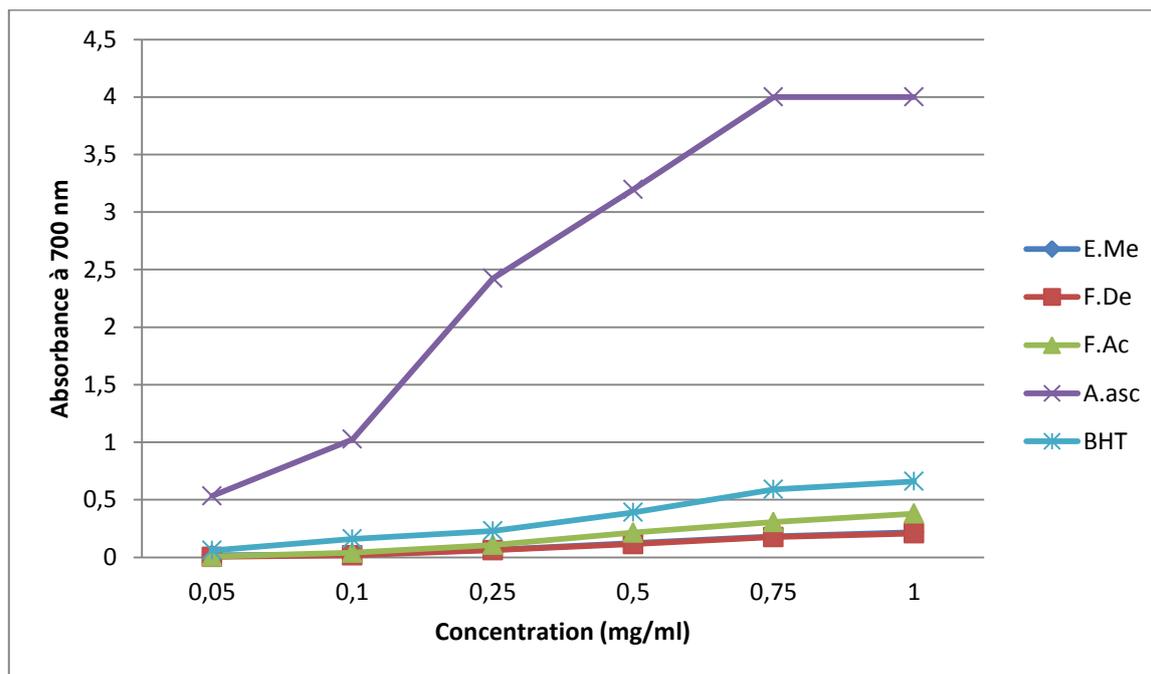


Figure 17 : Absorbance de réduction des différents extraits par la méthode FRAP.

D'après les résultats obtenus, une augmentation de la réduction du fer est proportionnelle aux concentrations utilisées.

Tous les extraits présentent des activités antioxydantes largement inférieures à celle de l'acide ascorbique (la réduction est totale à partir d'une concentration de 0.75 mg/ml).

La capacité à réduire le fer est presque la même pour l'extrait méthanolique et la fraction Diéthyl éther. Elle est moins élevée par rapport à la fraction d'Acétate d'éthyle qui a présenté une activité à réduire le fer la plus élevée.

Le test du pouvoir réducteur consiste à évaluer l'aptitude d'échantillon à donner un électron convertissant le fer de la forme Fe^{3+} /ferricyanide de potassium à la forme Fe^{2+} qui peut être quantifiée par la mesure de la formation de la couleur bleu à 700nm. Dans une absorbance élevée indique que l'échantillon possède un grand pouvoir réducteur (**Barros et al., 2007**).

L'aptitude d'un échantillon de donner un électron reflète leur pouvoir antioxydant et la réduction de Fe^{3+} est un indicateur de la capacité de l'échantillon de donner un électron (**Gholivand et al., 2010**).

V. Activité antimicrobienne

Nous avons étudié in vitro le pouvoir antimicrobien des extraits isolés d'*Ammodaucus leucotrichus* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide, Mueller-Hinton pour les bactéries, et Saboureau pour les levures.

L'activité antimicrobienne des extraits est estimée en terme de diamètre de la zone d'inhibition, autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis des quatre germes pathogènes d'origine ATTC et une d'origine ATCC, dont trois bactéries Gram + et Gram - et deux levures. La sensibilité des micro-organismes testés à l'encontre d'*Ammodaucus leucotrichus* est représentée dans le tableau 5 et les figures (18, 19, 20, 21, 22).

Tableau 5: Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des souches bactériennes provoquées par les extraits d'*Ammodaucus leucotrichus*.

| Extraits Souches | Méthanolique (mm) | Diéthyl éther (mm) | Acétate d'éthyle (mm) |
|----------------------------------------------|----------------------|-----------------------|--------------------------|
| <i>Esherichia coli</i> ATTC 4157 | 8.90 ± 0.26 | 14.02 ± 0.66 | 9,56 ± 0.63 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 6538 | 11,95 ± 1.05 | 14,29 ± 0.73 | 14,6 ± 0.80 |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372 | - | - | - |
| <i>Candida albicans</i> ATTC 2601 | 13,01 ± 2.06 | 14,61 ± 0.81 | 9,77 ± 0.28 |
| <i>Saccharomyces Cereviceae</i> ATTC 9763 | - | 12,34 ± 1.01 | 15,68 ± 1.13 |

D'après les résultats obtenus, on peut constater que les extraits d'*Ammodaucus leucotrichus* se sont probablement actifs envers les souches microbiennes testées mais avec des degrés différents ce qui s'est traduit par la différence de diamètre de la zone d'inhibition. Toutefois la souche *Bacillus subtilis* n'a montré aucune sensibilité pour ces extraits.

On remarque que la fraction diéthyl éther sur l'*E.coli* cinq fois plus que l'E.Me et l'F.Ac. Alors que les trois extraits sont actifs sur les *Staphylococcus aureus*, avec des zones d'inhibition rapprochées. Par contre ces extraits n'ont aucune activité sur les *Bacillus subtilis*. En plus, concernant les levures, les trois extraits sont avérés actifs sur les *Candidas albicans* avec une préférence de F.De, par contre l'E.Me n'est pas actif sur *Saccharomyces cereviceae*.

Les plantes contiennent de nombreux composés doués d'une action antimicrobienne, ces constituants comprennent les composés phénoliques, les flavonoïdes, les huiles essentielles et les triterpénoïdes (**Rojas et al., 1992**), le pouvoir antimicrobien des extraits de plantes est tributaire de leurs compositions chimiques.

Cowan (1999) a rapporté que les différentes classes de polyphénols essentiellement les tanins et les flavonoïdes peuvent augmenter la toxicité des extraits envers les microorganismes. Cette toxicité est en fonction du site et du nombre de groupements hydroxyles présents sur le composé phénolique. L'effet antimicrobien de ces phénols peut être expliqué par l'inhibition de la croissance bactérienne suite à leur adsorption sur les membranes cellulaires, l'interaction avec les enzymes et les effecteurs (**Dhaouadi et al., 2010**).

L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif majoritaire, mais plutôt à l'action combinée (synergie) de différents composés (**Essawi et Srour, 2000**). Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique, l'altération des fonctions de la membrane cytoplasmique, la séquestration de substrats nécessaires à la croissance microbienne et l'inhibition du métabolisme énergétique microbien (**Jungkind, 1995**).

Plusieurs classes de polyphénols telles que les acides phénoliques, flavonoïdes et les tanins servent de mécanisme de défense des plantes contre les micro-organismes, les insectes, et les herbivores pathogènes (**Falleh et al., 2008**).

Les résultats d'HPLC de l'*Ammodaucus leucotrichus* sur les différents extraits montrent la présence de la catéchine, la quercétine et lutéoline 7 glucoside.

Les Polyphénols, tels que les tanins et les flavonoïdes comme la catéchine, la myricétine, la quercétine, (**Shan et al., 2007**) et lutéoline (**Askun et al., 2009**) sont des substances antibactériennes importantes.

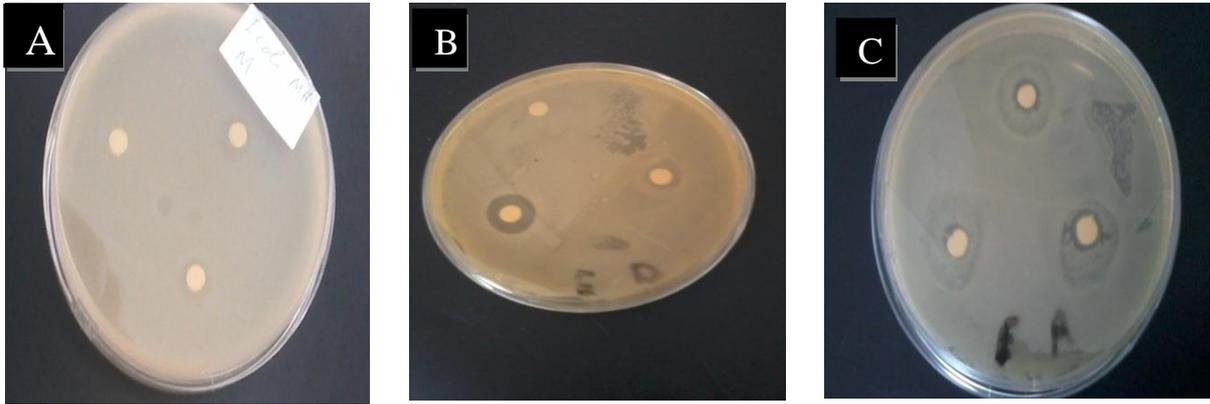


Figure 18 : Photographies des zones d'inhibition de la croissance d'*E.coli* induites par l'extrait méthanolique d'*Ammodaucus leucotrichus* (A) et par la fraction Diéthyl éther (B), et de l'Acétate d'éthyle (C).

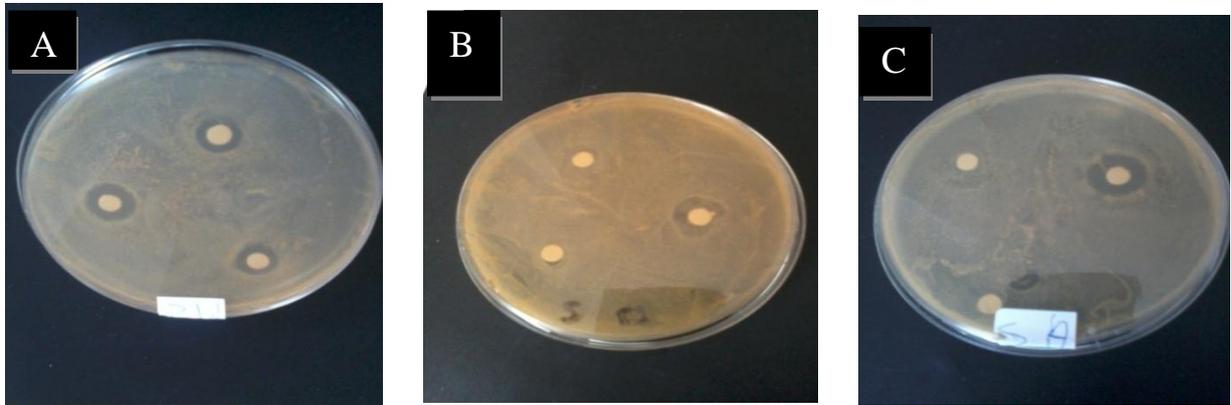


Figure 19 : Photographies des zones d'inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus* induites par l'extrait méthanolique d'*Ammodaucus leucotrichus* (A) et par la fraction Diéthyl éther (B), et de l'Acétate d'éthyle (C).

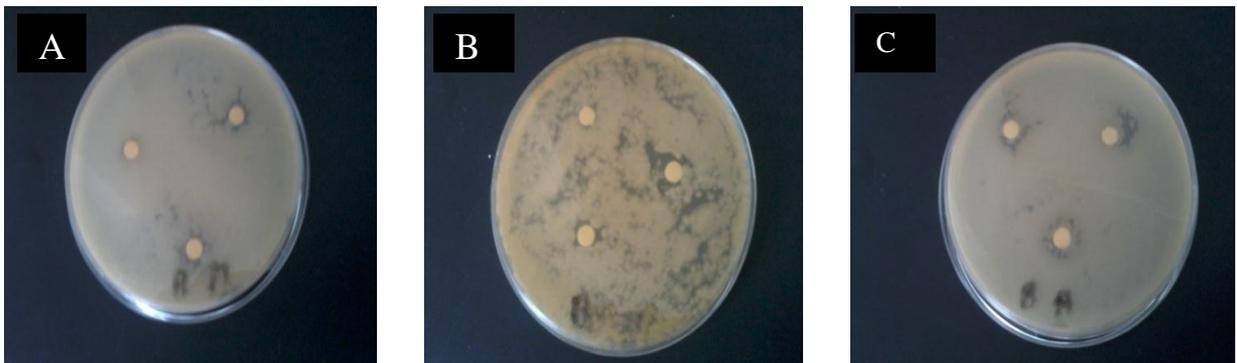


Figure 20 : Photographies des zones d'inhibition de la croissance de *Bacillus subtilis* induites par l'extrait méthanolique d'*Ammodaucus leucotrichus* (A) et par la fraction Diéthyl éther (B), et de l'Acétate d'éthyle (C).

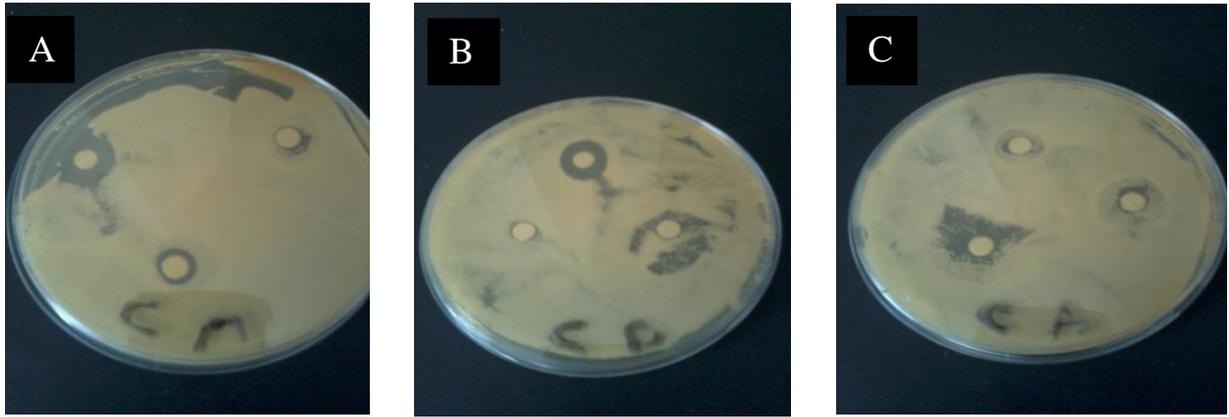


Figure 21 : Photographies des zones d'inhibition de la croissance de *Candida albicans* induites par l'extrait méthanolique d'*Ammodaucus leucotrichus* (A) et par la fraction Diéthyl éther (B), et de l'Acétate d'éthyle (C).



Figure 22 : Photographies des zones d'inhibition de la croissance de *Saccharomyces Cereviceae* induites par l'extrait méthanolique d'*Ammodaucus leucotrichus* (A) et par la fraction Diéthyl éther (B), et de l'Acétate d'éthyle (C).

VI. Cytotoxicité

Les cytotoxiques sont des médicaments utilisés en thérapies anticancéreuses, rhumatologiques et immunologiques. Ils comprennent : des inhibiteurs de la mitose des antimétabolites, des substances alkylantes, des antibiotiques et d'autres cytotoxiques telle l'enzyme asparaginase. Les cytotoxiques n'agissent pas uniquement sur le métabolisme des cellules tumorales mais ils influencent aussi celui des cellules saines. Divers cytotoxiques ont un effet mutagène, tératogène et cancérigène.

Les résultats obtenus sont présents dans la figure 23 :

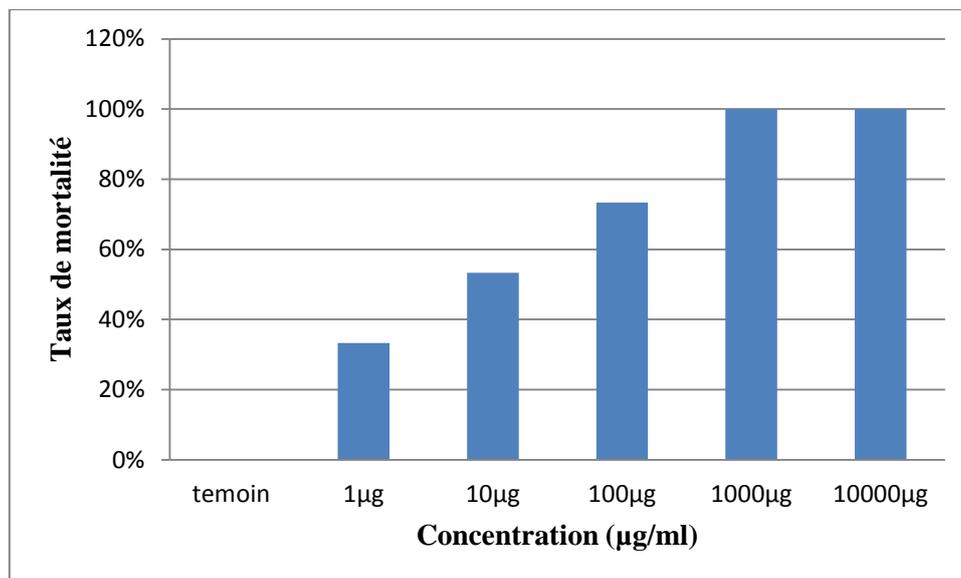


Figure 23 : Le taux de mortalité de *l'Artémia salina* à différentes concentrations d'extrait méthanolique d'*Ammodaucus leucotrichus*.

D'après les résultats mentionnés dans la figure 23, on remarque que le taux de mortalité augmente en fonction de concentration :

Le taux de la mortalité de *l'Artémia* augmente et t'atteindre 100% en concentration 1000 et 10000µg / ml, et de taux convergent entre (53,3% - 73,3%) pour des concentrations de 10µg/ml et 100µg/ml respectivement.

Le calcul d'IC50 a montré que la concentration d'extrait doit être entre 1µg/ml et 10 µg/ml, selon l'équation : $Y = 2.222 x + 31.108$ on obtient 8,5 µg.

D'après **Meyer et al. (1982)**, l'extrait d'une plante est dite toxique (active) lorsque la valeur de LC50 est inférieur à 1000 µg/ml et non toxique (inactive) si la concentration est supérieur à 1000 µg/ml.

L'analyse de létalité de crevette de saumure est un indicateur de la toxicité générale et peut être un facteur prédictif des effets sur cellules cancéreuses (**Laughlin et al., 1991**). On trouve une corrélation positive entre la cytotoxicité de *l'Artémia* et le carcinome nasopharyngien humain. Aussi, elle a été considérée comme analyse de pré-examen pour des activités antimicrobiennes, antifongiques, insecticides, antitumorales et antimalariques (**Meyer et al., 1982**).

Un certain nombre d'études indique que la cytotoxicité est plus efficace dans les extraits méthanoliques de plusieurs espèces comme montre les travaux de **Kanegusuku et al., 2001** sur les espèces de Rubus (Rosaceae). Dans une autre étude du Brésil, 60 espèces de plantes médicinales ont été évaluées pour leurs cytotoxicités à la crevette de saumure ; seulement 10 % des espèces ont présentés une IC50 < 1000µg/ml (**Maria et al., 2000**). **Jacques et al., 2003** a démontré que le criblage de 226 extraits de méthanol et d'eau pour la létalité vers les larves à pu identifier plusieurs espèces cytotoxiques comme un test préliminaire.

Conclusion

Dans le présent travail, différents aspects d'*Ammodaucus leucotrichus* ont été étudiés: quelques propriétés phytochimique et activités antioxydantes, antimicrobiennes et la cytotoxicité des extraits.

Les extractions des différents composés phénoliques les plus abondant dans notre plante, nous a permis de calculer le rendement de chaque extrait, notamment l'extrait méthanolique, la fraction diéthyl éther et acétate d'éthyle, dont le rendement le plus remarquable est celui de l'extrait méthanolique.

Le dosage quantitatif des phénols totaux et des flavonoïdes est variable entre les différents extraits d'*Ammodaucus leucotrichus*. La teneur la plus élevée des polyphénols est constatée dans l'extrait méthanolique suivie par la fraction diéthyl éther puis la fraction acétate d'éthyle avec une teneur de 0,451 mg GAE/g. Concernant les flavonoïdes, la teneur la plus élevée est mentionné dans la fraction d'acétate d'éthyle et des teneurs rapprochées dans la fraction diéthyl éther et l'extrait méthanolique de la plante.

Qualitativement, les analyses effectuées par l'HPLC montrent la présence d'une multitude de variétés de ces composés dans les 3 extraits, dont 09 ont été identifiés dans l'extrait méthanolique et acétatique. Plus dix dans l'extrait diéthylique.

L'étude du pouvoir antioxydant par la méthode FRAP, que tous les extraits de la plante étudiés, ont la capacité de réduire le fer qui augmente en fonction de la concentration. Comme nous avons remarqué que la fraction d'acétate d'éthyle présente une capacité intéressante pour réduire le fer par rapport aux autres extraits, mais cette capacité est très faible à celle de l'acide ascorbique et rapproché à celle de BHT.

Cependant, l'étude de l'activité antioxydante par deux techniques le piégeage du radical libre DPPH et la méthode FRAP à nous permet de dire que notre plante est une source prometteuse d'antioxydants naturels et justifie son utilisation traditionnelle.

Dans l'autre volet abordé, l'activité antimicrobienne montre une activité plus ou moins faible.

Au vu des résultats de la cytotoxicité, il apparait que l'extrait méthanolique toxique vis-à-vis d'*Artémia salina* ce qui peut ouvrir des axes de recherches orientés vers l'étude de l'activité anticancéreuse.

Au terme de cette étude, nous pouvons dire que l'*Ammodaucus leucotrichus* est une plante à haut potentiel thérapeutique puisqu'elle contient de nombreuses molécules bioactives. Il n'en demeure pas moins qu'elle n'agit pas grâce à un seul principe actif isolé mais à la synergie de ses différents composés. Elle mériterait, à notre sens, qu'une étude approfondie, voire des analyses moléculaires et cliniques, lui soient consacrées dans les futures recherches.

*Références
bibliographiques*

Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S. Robards K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127,183-198.

Athamena s., Chalghem I. , Kassah-Laouar A., S. Laroui et S. Khebri . (2010). Activite anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *cuminum cyminum* l. Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Batna, Algérie *Lebanese Science Journal*, Vol. 11, No. 1 mémoire

Bahorum, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., Pinkas, M., Luycky, M., Gazin, M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneimittel-Forsch*, 46, 1086- 1089.

Bahorun, T. (1997). Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Food and agricultural resarch council, Réduit, Mauritius. 83-94.

Barros L, Ferreira MJ, Queiros B, Ferreira I.C.F.R , Baptista P. Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese Wild edible mushrooms and their antioxidant activities. (2007). *Food chemistry* , 103 , 413-419.

Benhouhou, S. (2005). A guide to medicinal plants in North Africa, p31-32.

Bernardi A. P. M., López–Alarcón C., Aspee A., Rech S., Von Poser G. L., Bride R. et Lissp E. (2007). Antioxidant activity of flavonoids isolated from *Hypericum ternum*. *Journal of the chilean chemical Society*, 52 (4) : 1326-1329.

BOUKRI N. E. H. (2014). “Contribution à l'étude phytochimique des extraits bruts des épices contenus dans le mélange Ras-el-hanout,” université Kasdi Merbah Ouargla, Algérie.

Bruneton, J. (1999), « Pharmacognosie : phytochimie des plantes médicinales » 3^{ème} Ed ; Tec et Doc, Paris, p1120.

Burits, M., Bucar, F., 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, 14, 323-328.

Bozin, B; Mimica-Duric, N; Samojlik, I; Goran, A; Igic, R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L. Alliaceae), *Food Chemistry*, 111, 925-929

Christian, D. (2002). *Reaction de cytotoxicité à médiation cellulaire*, Paris .235.

Christian, T. (2007), *Délivrez-vous de vos rhumatismes*, Edition lanore, p.24.

Dacosta, Y. (2003). *Les phytonutriments bioactifs : 669 références bibliographiques*. Ed. Yves Dacosta, Paris, p. 317

Djeridane, A., Yous, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem*, 97, 654-660.

Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities . *C. R. Biologies*, 331, 372-379.

Filliat, P. (2012). "les plantes de la famille des apiacees dans les trouble digestifs," thèse, Université Joseph Fourier Faculté de Pharmacie de GRENOBLE.

Frédéric, M. (2013). *Intractions insectes- plantes*, P.221.

Jacques , Pohlit A.M., SM de Nunomura S.M., Silva S.V. (2003). Criblage des usines dans l'état d'Amazone pour la létalité vers la crevette de saumure. 2003. *Acta Amaz*, 33:93 – 104

Hoff, F.H., Snell, T.W. (1987), *Manuel de culture de plancton*. Florida Aqua Farms, Inc, P.94-99.

Hubert, A.J. (2006). Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaine, Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse, école doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries, spécialité : qualité et sécurité des aliments, p 174.

Gholivand B.M., Rahimi-Nasrabadi M., Batooli H.E., Abadi A.H. .Chemical composition and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of *Psammogeton canescens*. *Food and chemical toxicology* 201 ;48 :24-28.

Guinebert E., Durand P., Prost M., Grinand R. and Bernigault R. (2005). Mesure de la résistance aux radicaux libres. *Sixièmes Journées de la Recherche Avicole*; 554-558

Gulcin I, Huyut Z, Elmastas M and Aboul-Enein H Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3, 43-53.

Kanegusuku M, Benassi JC, Pedrosa RC, RA de Yunes, Filho VC, Maia aa, Marcia M., Monache FD. (2001). Niero R. Activité cytotoxique et hypoglycémique et analyse phytochimique des *imperialis* de Rubuceaa, , Einhellig.

Karagozler, A; Erdag, B; Calmaz Emek, Y. (2008). Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*, *Food Chemistry*, 111, 400-407.

LEE; A.T., PROENC, C., FERREIRA, A.R., SERRALHEIRO, M.L.M., NOGUEIRA, J.M.F., ARAUJO, M.E.M. (2003). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chem*, 103, 778-786.

- Lenz, P.H. (1987). Population studies on artemia in mono lake, california PH D .thèse, university of california , santa barbara , pp 130.
- Li, H B, Cheng K W, Wong C C, Fan K W, Chen F and Jiang Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102, 771-776.
- Lopes-Lutz, D., S. Alviano, D., S. Alviano, C., P. Kolodziejczyk, P. (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils *Phytochemistry*, 69 ,1732-1738.
- Marfak, A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de Leur reactivite avec les radicaux issus des Alcools: formation de depsides. Thèse de doctorat. Limoges
- Maria T., Silva A.F., Brandao M., Zan C.L. (2000). Criblage biologique des plantes médicinales brésiliennes. *Installation Oswaldo Cruz*, 95, 367-373.
- Maurice, N. (1997). L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIe siècle. Ed. Lavoisier, Paris, p. 12-14.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L. (1982). Crevette de saumure : un essai biologique général commode pour les constituants actifs d'usine. *Planta Medica*, 45, 31-34.
- McLaughlin, J.L. (1991). Tumeurs d'écorchure de couronne sur la létalité de crevette de disques et de saumure de pomme de terre : deux essais biologiques simples pour le criblage et la fraction d'usine.. Dans : Hostetsmann, K, ed., méthodes en biochimie d'usine. Édition académique, Londres, Pp. 1-31.
- Mireille , M ., Test de toxicité sur larves d'artémia salina .Entretien d'un élevage de blanes , 1995, département sante UR des substances naturelles d'intérêt thérapeutique. laboratoire des biotechnologies
- Mohammedi, Z. (2006). Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de magister.Tlemcen.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307–315.
- Parejo I; Viladomat F; Bastida J; Rosas-Romero A; Flerlage N; Burillo J; Codina C. (2002). Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J Agric Food Chem*, 50, 6882–90.
- Popovici, C.; Saykova, I.; Tylkowski, B. (2009). *Revue de génie industriel*, 4 , 25-39.

Quezet,P., Santa,S. (1963). Nouvelle flore de l'Algerie et des regions désertiques méridionale, Tome II, edition Centre national de la recherché scientifique, Paris, P 659.

Rojas A., Hernandez L., Pereda-Miranda R., and Mata R. (1992). Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. J. Ethnopharmacol , 35, 275-283.

Ronika Winckle. (2006). Astor plantes, Edition Alpen, p.86.

Sheikh C, Hossain MS, Easmin MS, Islam MS, Hossain MA, Rashid M. (2004). New Coordination complexes of Chromium as cytotoxic and antimicrobial agents. 2004. Pakistan J Biol Sci, 7(3): 335-339

Siegenthaler, W., Luthy, R. Current chemotherapy. Proceeding 10th international congress of chemotherapy. II. Washington DC. Am. Soc. Microbial., 1978.

Tabanca N., B. Demirci, T. Ozek, N. Kirimer, K. H. C. Baser, E. Bedir, I. a. Khan, and D. E. Wedge. (2006). "Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of essential oils from Pimpinella species gathered from Central and Northern Turkey," J. Chromatogr. A, vol. 1117, no. 2, pp. 194–205.

Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. Food Chem., (in press).

Ullah H., A. Mahmood, M. Ijaz, B. Tadesse, and B. Honermeier. (2013). "Evaluation of anise (Pimpinella anisum L .) accessions with regard to morphological characteristics , fruit yield , oil contents and composition," J. Med. Plants Res., vol. 7, no. 29, pp. 2177–2186.

Volák, J., et Stdola, J., « *Plantes médicinales* ». (1983). GRÜND, Paris.

William G-Hopkins, 2003, physiologie végétal, 2eme édition américaine universite des sciences et technologie de Lille, p. 76.83.102.

Wojdylo, A., Oszmianski, J., Czemerzys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chem, 105, 940-949.

Wolters kluwer,2007, Botanique pharmacognosie phytothérapie, 3 eme édition, p.112

Annexe I

Les produits chimiques et les réactifs

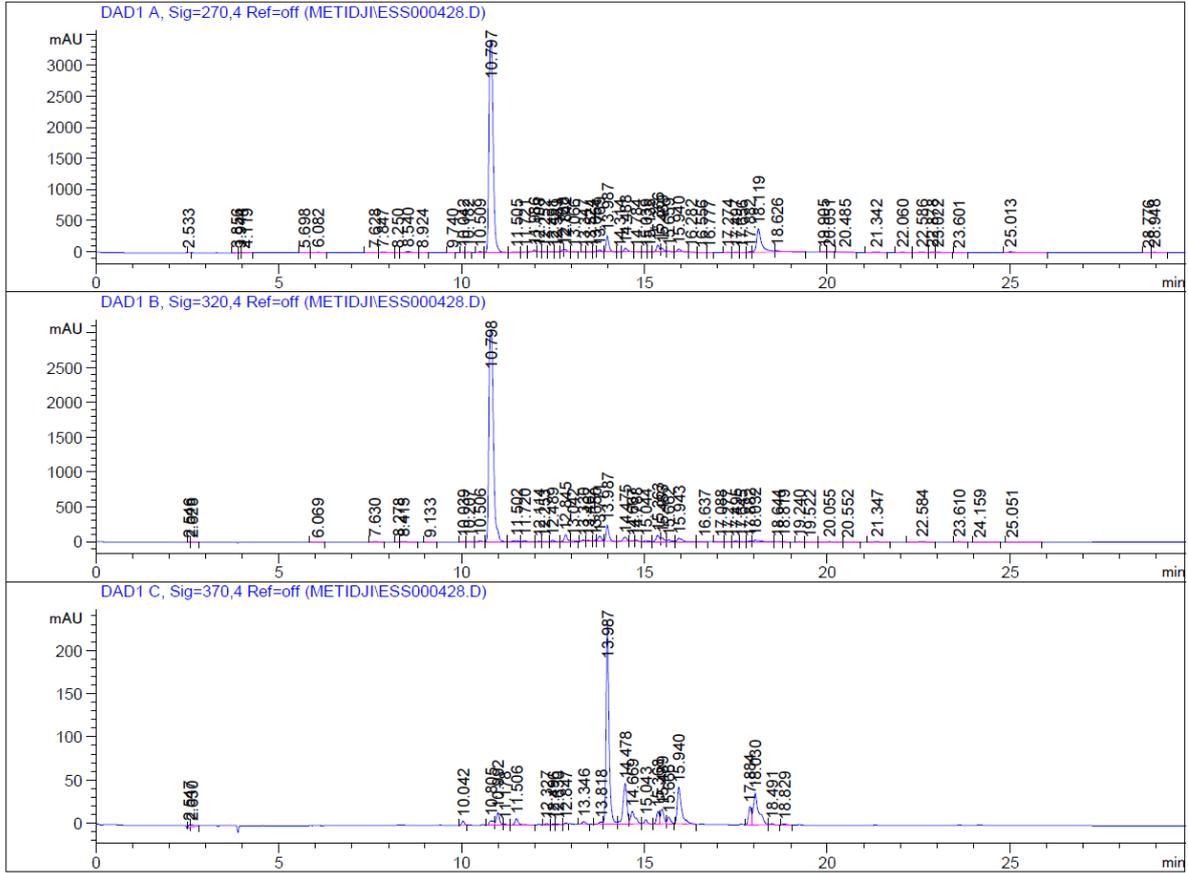
- Methanol: MeOH, M=32,04. g/mol
- D'éthyle éther : C₄H₁₀O, M=74,12 g/mol
- Acétate d'éthyle : C₄H₈O₂, M=88,1 g/mol
- Hexane
- Acide Trichloro acitic: HC₂Cl₃O₂, M=163,39 g/mol
- Potassium ferricyannate : K₃Fe(CN)₆ M=329 g/mol
- Sulfate de sodium anhydride: Na₂SO₄, M=142,04 g/mol.
- Chlorure ferrique : FeCl₃, M=162,21 g/mol.
- folin –Ciocalteu
- Carbonates de sodium : Na₂CO₃, M=105,99 g/mol.
- Sodium phosphate monobasic hydrogen: (H₂NaO₄P,12H₂O), M=358,18 g/mol
- Tampon phosphate

Appareils et matériels

- Ampoule à décanter
- Balance électrique
- Ballons pour le rota vapeur
- Broyeur
- Etuve : T 23C° et 37C°
- Micropipette
- Papier filtre Wattman
- Pipette pasteur
- Rota vapeur (BUCHI R-200)
- Spectrophotomètre UV-VIS
- Vortex

Annexe II

Acq. Operator : Labo **Dietyl éther**
 Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 23
 Injection Date : 7/1/2015 11:33:45 AM
 Inj Volume : 5.000 µl
 Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\SEDER.M
 Last changed : 6/21/2015 2:30:35 PM by Labo
 Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\ACETO1.M
 Last changed : 7/1/2015 10:41:28 AM by Labo
 (modified after loading)



Acq. Operator : Labo **Acétate diethyl**
 Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 22
 Injection Date : 7/1/2015 10:51:56 AM
 Inj Volume : 5.000 µl

Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\SEDER.M
 Last changed : 6/21/2015 2:30:35 PM by Labo
 Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\ACETO1.M
 Last changed : 7/1/2015 10:41:28 AM by Labo
 (modified after loading)

