

## Chapitre II : Résultats et discussion

### 2.1. Rendement d'extraction

La préparation des extraits à partir de la partie aérienne de *Matricaria pubescens* a été effectuée par trois méthodes : macération à la température ambiante par deux solvants « l'éthanol 20% et l'acétone 70% » et l'affrontement par la suite des solvants à polarité croissante (EP, DCM, DEE, EAc, BuOH), extraction par Soxhlet par l'utilisation de deux solvants (EP, MeOH), et par l'infusion dans l'eau distillée.

Ces méthodes permis d'obtenir plusieurs extraits dont le rendement calculé selon la relation suivante :  $R = (\text{poids de l'extrait obtenu} / \text{poids de la matière végétale totale}) \times 100$ , les résultats sont résumés dans le tableau 04.

**Tableau 04 : Rendement d'extraction**

Procédé d'extraction	Extraits	Le poids g	Le rendement %
Macération dans l'éthanol 20%	EP	0,048	0,48
	DCM	0,160	1,16
	DEE	0,018	0,18
	EAc	0,243	2,43
	BuOH	0,267	2,67
	Aq	0,299	2,99
Macération dans l'acétone 70%	EP	0,103	1,03
	DCM	0,037	0,37
	DEE	0,040	0,4
	EAc	0,118	1,18
	BuOH	0,243	2,43
	Aq	0,248	2,48
Soxhlet	EP	0,184	0,92
	MeOH	2,384	11,92
Infusion dans l'eau distillée	extrait Aq	1,1	11

L'utilisation de solvants à polarités différentes permet de séparer les composés de l'extrait brut selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction, Tableau 04. Cette méthode d'extraction menée à température ambiante permet d'extraire le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

L'extraction par Soxhlet est une technique très efficace nous permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à épuisement complet du soluté dans la matière première, d'où vient son efficacité élevée (Penchev, 2010).

Les résultats obtenus montrent que parmi les différentes fractions de l'extrait brut, l'extrait méthanolique et aqueux représentent les rendements les plus élevés (11,92 % et 11% respectivement), par rapport au poids total de la plante, alors que l'extrait aqueuse résiduelle représente le rendement le plus élevé (2,99%) pour les extraits obtenus par macération dans l'éthanol suivi par le BuOH (2,67%), EAc (2,43%), DCM(1,16%), EP(0,48%), DEE(0,18%) et pour les extraits obtenus par macération dans l'acétone l'extrait aqueux résiduel représente le rendement le plus élevé (2,48%) suivi par le BuOH (2,43%), EAc (1,18%), EP (1,03%), DEE (0,4%), DCM (0,37%).

Il est difficile de comparer les résultats avec ceux de la bibliographie, le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée.

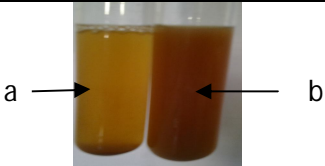
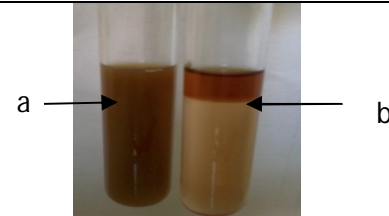
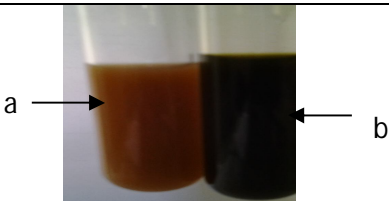
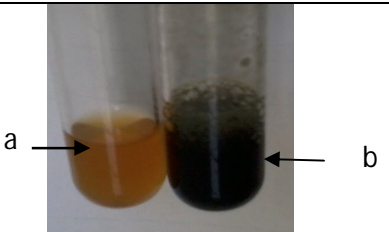
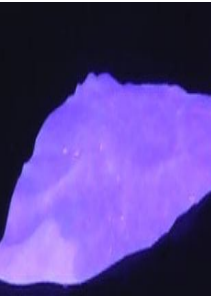
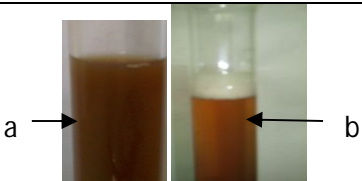
## **2.2. Résultats de l'étude phytochimique**

### **2.2.1. Analyses qualitatives**

#### **2.2.1.1. Les tests phytochimiques**

Les résultats des tests phytochimiques résumés dans le tableau 05 :

Tableau 05 : Résultats des tests phytochimiques

Métabolites secondaires testées	Observation	Résultats
polyphénols		+
Flavonoïdes		+
anthocyane		+
tannins		+
Coumarine		+
Saponosides		+

(+) présence de métabolite secondaire testé

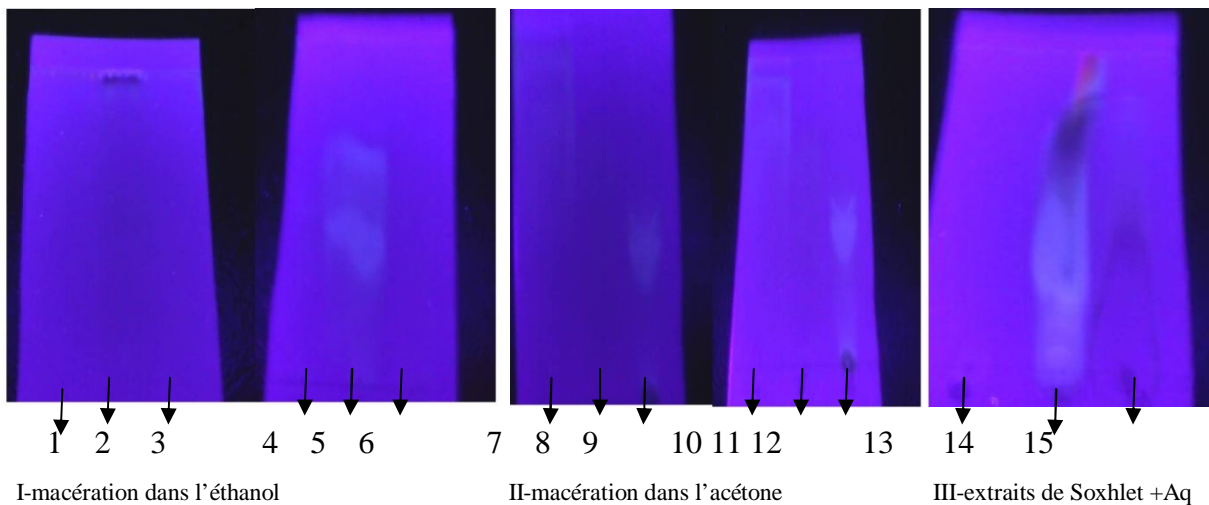
a- L'extrait témoin    b- l'extrait testé

L'extrait de *Matricaria pubescens* est soumis à une analyse phytochimique qui permet de déterminer qualitativement les composés non nutritifs mais biologiquement actifs qui confèrent la saveur, la couleur et d'autres caractéristiques à la plante « polyphénols, flavonoïdes, anthocyanes, tannins, caumarines, saponines », La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques des plantes leur sont attribués, et selon la disponibilité de réaliser ces tests.

Ces tests confirment la richesse de la plante *Matricaria pubescens* en substances bioactifs « polyphénols, flavonoïdes, anthocyanes, tannins, caumarines ». Ces résultats est similaires à celles obtenus par (Makhloufi et ses collaborateur (2012).

### 2.2.1.2. Chromatographie sur couche mince

Pour une caractérisation partielle des différents extraits de *Matricaria pubescens*, une chromatographie sur couches minces (CCM) a été réalisée avec le système solvant : Acétate d'éthyle/méthanol/eau (7,5/1,5/1) qui permis d'avoir une bonne séparation et une visibilité acceptable des spots (la figure 09).



**Figure 09 : Photos des chromatogrammes résultant de l'analyse des extraits par CCM sous lampe UV à 366nm**

1- EP	7- EP	13- EP
2- DCM	8- DCM	14- MeOH
3- DEE	9- DEE	15- extrait aq
4- EAc	10-EAC	
5- BuOH	11-BuOH	
6- Aq	12-Aq	

Les résultats de la chromatographie sur couche mince de tous nos extraits sont résumés dans le tableau 06. Il s'agit des informations sur les rapports frontaux des constituants chimiques, et les couleurs observés à la lumière UV (366 nm).

**Tableau 06 : Résultats de la séparation par CCM des extraits**

Procédé d'extraction	Extraits	Nombre de spots	$R_f$ (cm)	Fluorescence à 366 nm
Macération dans l'éthanol 20%	EP	02	0,941 0,835	Rouge vert
	DCM	04	0,929 0,894 0,588 0,423	Violet brun Bleu Vert-jaune
	DEE	02	0,917 0,177	Bleu jaune
	EAc	04	0,941 0,917 0,564 0,164	Bleu Vert Vert vert
	Bu-OH	03	0,929 0,588 0,188	Bleu Jaune Vert
	Aq	02	0,905 0,188	Bleu jaune
Macération dans l'acétone 70%	EP	02	0,964 0,941	Rose Rouge
	DCM	02	0,964 0,941	Rose Rouge
	DEE	04	0,964 0,941 0,411 0,352	jaune jaune vert vert
	EAc	02	0,952 0,882	violet jaune
	n-BOH	01	0,929	bleu
	Aq	03	0,952 0,458 0,4	Bleu jaune
Soxhlet	EP	01	0,894	Bleu
	MéOH	05	0,894 0,870 0,517 0,2 0,094	Rouge Bleu brun Bleu Bleu
Infusion dans l'eau distillée	extrait Aq	03	0,929 0,741 0,223	Bleu jaune

Le CCM visualiser sous UV 366 nm représente des taches de couleur rouge, verte, violette, brune, bleue, vert-jaune, Jaune, rose qui peuvent correspondre à plusieurs classes des métabolites secondaires.

On comparant notre résultats avec celle de (N'Guessan et *al.*, 2011).Tableau 06, on peut déduire la présence des Triterpènes, Stérols, Génines triterpéniques, Anthracènes, Saponines, Flavonoïdes, Coumarines dans notre plante, ce qui confirme les résultats des tests préliminaires réalisés.

### 2.2.2. L'analyse quantitative

#### ➤ Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

L'étude quantitative des extraits bruts, préparés à partir de la partie aérienne de *Matricaria pubescens* au moyen des dosages spectrophotométriques avaient pour objectif la détermination de la teneur des polyphénols totaux et des flavonoïdes. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques des plantes leur sont attribués. Deux droites d'étalonnages (figure 10, 12) ont été tracées pour cet objectif qui sont réalisées avec des solutions d'étalons à différentes concentrations.

Les quantités des polyphénols et des flavonoïdes correspondantes ont été rapportées en microgramme d'équivalents de l'étalon utilisé par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EE/mg d'extrait}$ ) et déterminés par l'équation de type :  $y = a x + b$

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode au réactif de Folin Ciocalteu (Singleton et *al.*, 1999). L'acide gallique a été utilisé comme étalon (figure 09). Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (Yi et *al.*, 2007) et l'étalon été la quercétine (Figure 12). Les résultats sont représentés dans le tableau 07.

**Tableau 07:** Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extrais

Procédé d'extraction	Extraits	Teneur en polyphénols ( $\mu\text{gEq AG/mg d'extract}$ )	Teneur en Flavonoïdes ( $\mu\text{gEqQ/mg d'extract}$ )
Macération dans l'éthanol 20%	EP	13,801	2,365
	DCM	14,002	11,317
	DEE	155 ,510	33,707
	EAc	77,303	13,219
	BuOH	136 ,310	30,585
	Aq	16,203	1,609
Macération dans l'acétone 70%	EP	11,210	8,121
	DCM	44,120	18,390
	DEE	234,801	49,804
	EAc	131,742	38,780
	BuOH	220,731	18,121
	Aq	100,562	20,926
Soxhlet	EP	15,615	1,414
	MeOH	70,105	27,926
Infusion dans l'eau distillée	extrait Aq	225,730	9,219

Les résultats du dosage des polyphénols montrent que l'extrait aqueux représente une teneur très élevée en polyphénols (225,730  $\mu\text{g EqAG/mg d'extract}$ ), et les extraits bruts obtenus par l'extracteur Soxhlet (l'extrait MeOH et EP) contient respectivement (70,105 et 15,616  $\mu\text{g EqAG/mg d'extract}$ ).

Cependant, la fraction DEE obtenue après la macération dans l'éthanol constitue dans les extraits de *Matricaria pubescens* la fraction phénolique la mieux représentée (155,510  $\mu\text{g EqAG/mg d'extract}$ ) suivi par l'extrait de BuOH (136,310  $\mu\text{g EAG/mg d'extract}$ ), puis l'extrait EAc avec (77,303  $\mu\text{g EqAG/mg d'extract}$ ), l'extrait aq résiduel renferme (16,203  $\mu\text{g EqAG/mg d'extract}$ ), alors que les extraits de DCM et de EP ne contient que ( 14,002 et 13,801  $\mu\text{g EqAG/mg d'extract}$ ) respectivement .

Pour les extraits obtenus après la macération dans l'acétone l'extrait de DEE représente aussi la teneur la plus élevée en polyphénols (234,801  $\mu\text{g EqAG/mg}$  d'extrait) suivi par l'extrait de BuOH (220,731  $\mu\text{g EqAG/mg}$  d'extrait) et par la suite EAc et l'extraits aq résiduelle (131,742 et 100,562  $\mu\text{g EqAG/mg}$  d'extrait) respectivement, alors que les extraits de DCM et EP ne contiennent que (44,120 et 11,210  $\mu\text{g EqAG/mg}$  d'extrait) respectivement. Si on compare nos résultats on remarque le même ordre décroissant des extraits obtenus par la macération dans l'éthanol ou bien par l'acétone « DEE > BuOH > EAc > aq résiduel > DCM > EP ».

Par l'observation des résultats de l'analyse qualitative « tests phytochimiques + CCM » ainsi que ceux du dosage quantitatif des polyphénols et selon (le tableau 02) on peut déduire la richesse de *Matricaria pubescens* par les composés phénoliques simples (les acides phénols et les flavones lipophiles) et les tannins monomériques en premier lieu ces substances qui sont présentes dans les phases DEE, et en les tannins trimériques, oligomériques, flavonoïdes aglycones, les mono-Oglycosides et les di-O-glycosides, les tannins dimériques, et par une teneur plus basse en flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés, coumarines, polyphénols aglycones.

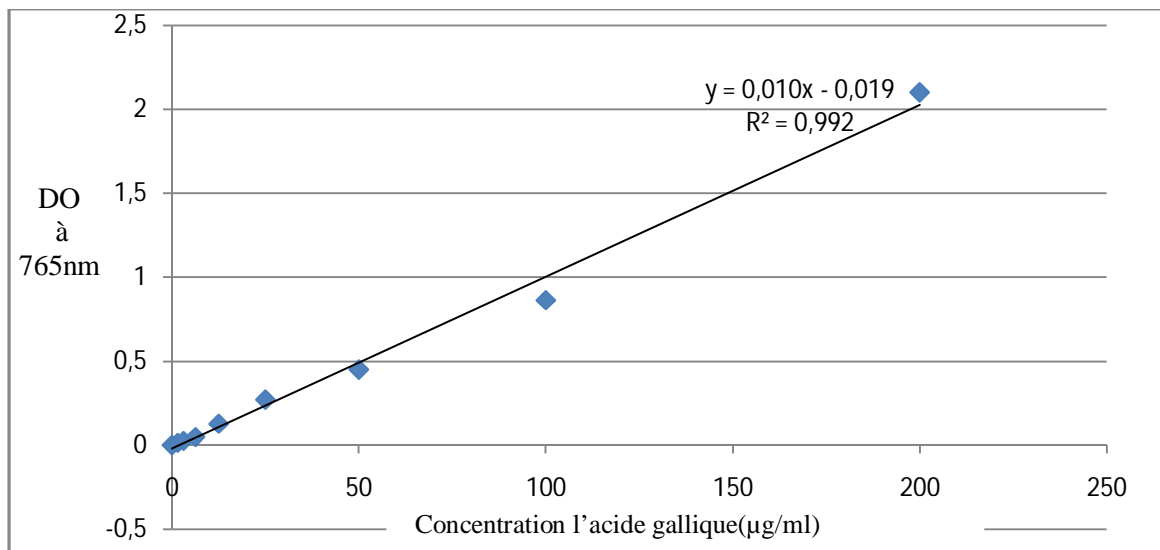


Figure 10 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

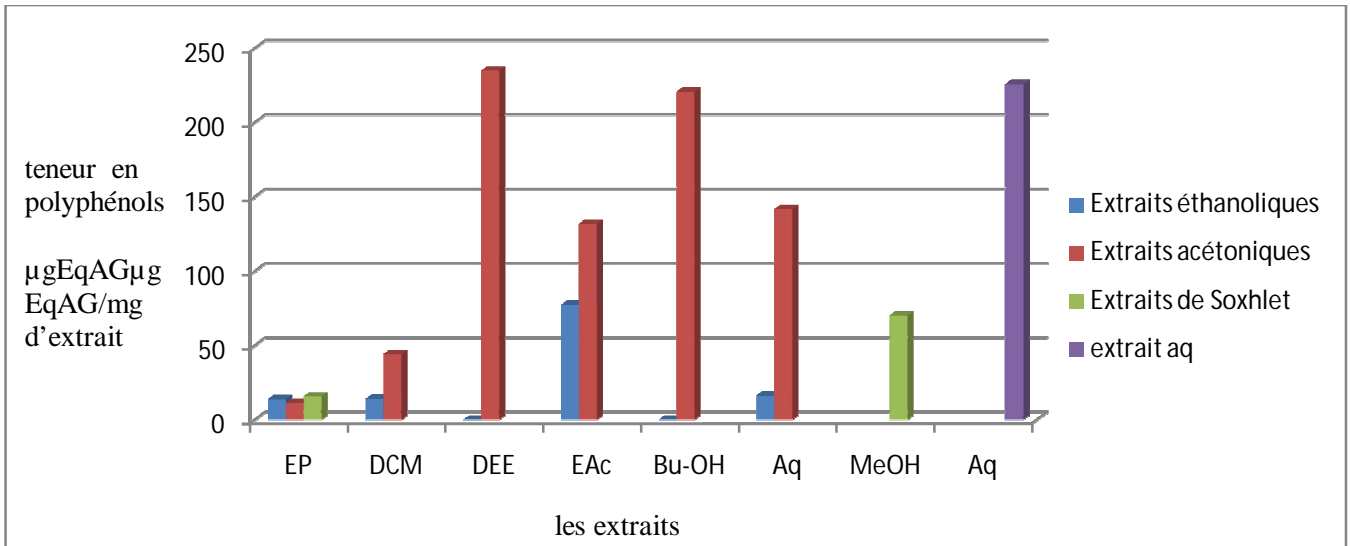


Figure 11 : Teneurs en polyphénols totaux des extraits étudiés

Concernant la teneur en flavonoïdes, les résultats sont exprimés en équivalent de quercétine en µg par mg d'extrait. La courbe d'étalonnage est tracée en utilisant différentes concentrations de la quercétine (figure 12). La teneur en flavonoïdes totaux variable, et diffère d'un extrait à un autre.

Selon la méthode d'extraction les extraits représentent les résultats suivants :

Pour les extraits obtenus après la macération dans l'éthanol l'extrait de DEE représente la teneur la plus élevée avec 33,707 µg EQ/mg d'extrait suivi par BuOH(30,585 µg EqQ/mg d'extrait) puis EAc -DCM- EP -Aq (13,219- 11,317- 2,365 - 1,609 µg EqQ/mg d'extrait) respectivement

Concernant les extraits obtenus après la macération dans l'acétone l'extrait DEE aussi représente la teneur la plus élevée (49,804 µg EQ/mg d'extrait) suivi par EAc , Aq, DCM, BuOH, EP ( 38, 780- 20,926-18, 390- 18 ,121-8,121 µg EQ/mg d'extrait)

L'extrait MeOH obtenus par l'extracteur Soxhlet a une teneur de 27,926 µg EqQ/mg d'extrait) et l'extrait d'EP très basse de 1,414 µg EqQ/mg d'extrait, alors que l'extrait aqueux ayant 9,219 µg EqQ/mg d'extrait

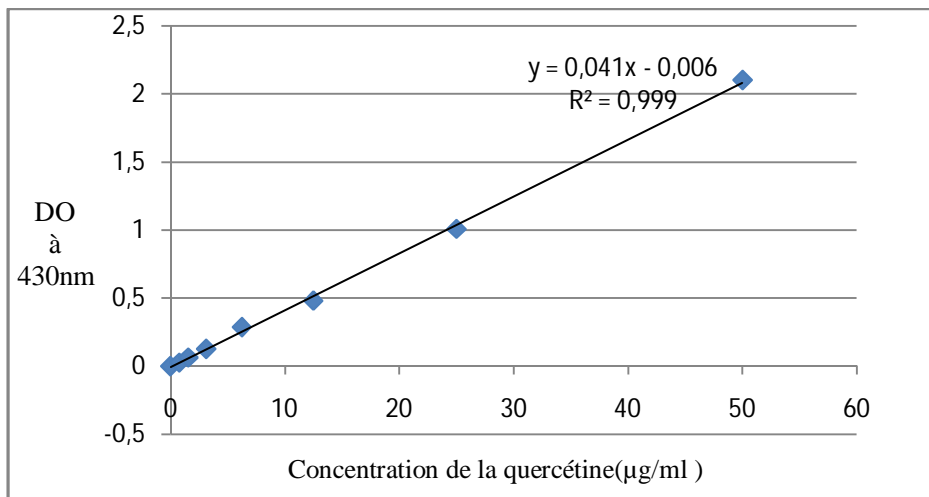


Figure 12 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

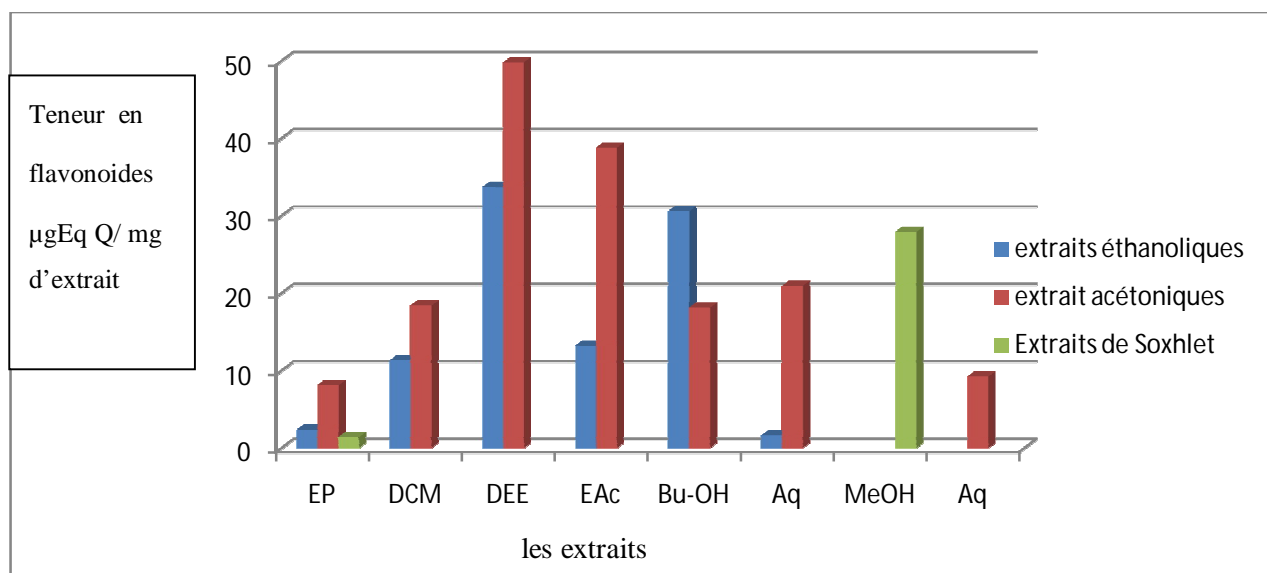


Figure 13 : Teneurs en flavonoïdes dans les extraits étudiés

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

### 2.3. Résultats des tests des effets biologiques

#### 2.3.1. Résultat du test du pouvoir antioxydant

Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron. la forme non radicalaire DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) est formée. L'activité antioxydante de nos extraits est exprimée en IC50 (tableau 08), ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats, il définit la concentration d'extrait de plante responsable de 50% d'inhibition des radicaux DPPH, est déterminée sur le graphique représentant le pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des extraits (Bidie et *al.*, 2011). Plus cette valeur est faible, plus le composé est antioxydant (Belkheiri, 2010).

Tableau 08 : IC<sub>50</sub> des extraits bruts des *Matricaria pubescens*.

Procédé d'extraction	extrait	IC <sub>50</sub>
Macération dans l'éthanol	EP	2,595
	DCM	18,810
	DEE	32,901
	EAc	15,819
	BuOH	17,776
	Aq	171,192
Macération dans l'acétone	EP	20,534
	DCM	28,575
	DEE	6,078
	EAc	8,657
	BuOH	8,048
	Aq	13,731
Extraction par Soxhlet	EP	49,462
	MéOH	7,565
Infusion dans l'eau distillée	extrait aqueux	67,358

Le profil d'activité anti-radicalaire de chaque extrait testé vis-à-vis du radical DPPH est présenté dans les figures ci-dessous (Figures 14, 15 et 16). Le pourcentage du DPPH réduit par les différents antioxydants mesurés à 517 nm, montre une augmentation rapide de ce dernier dans un intervalle très réduit de la dose de l'extrait brut.

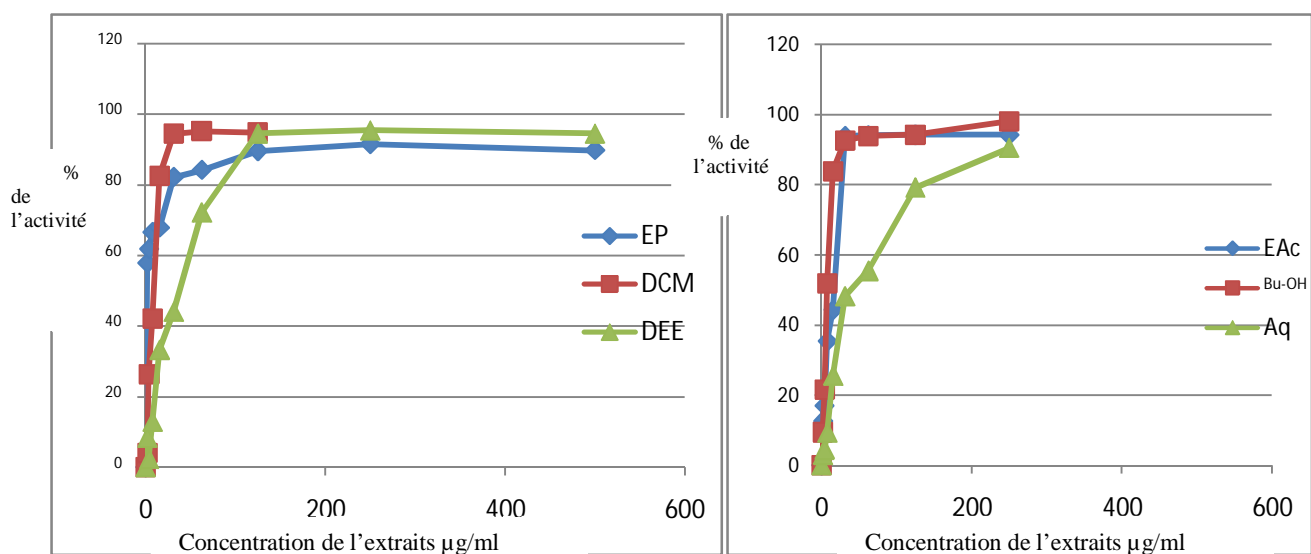
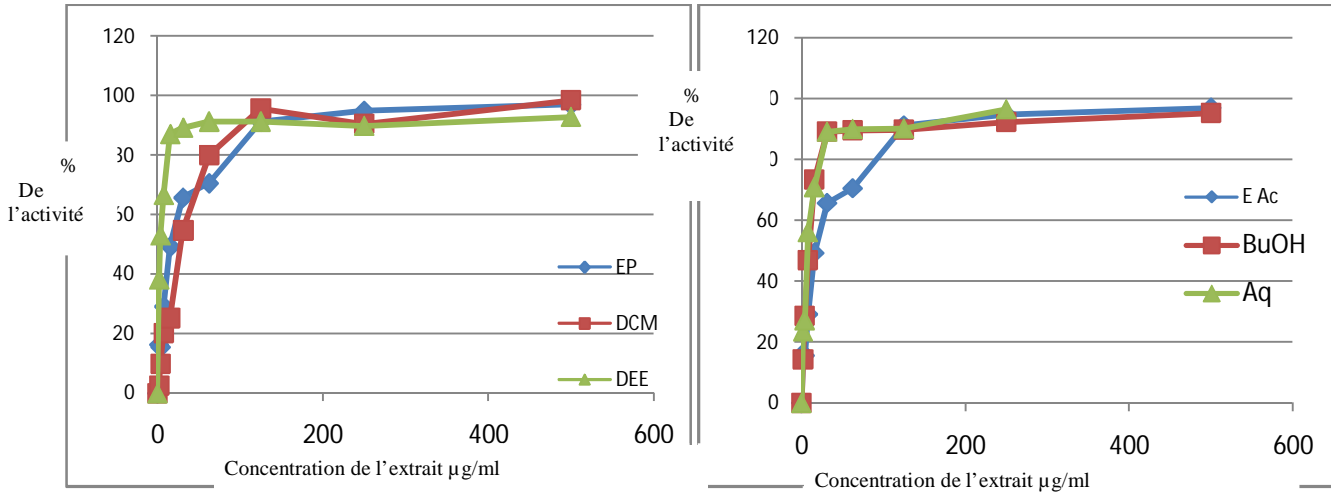
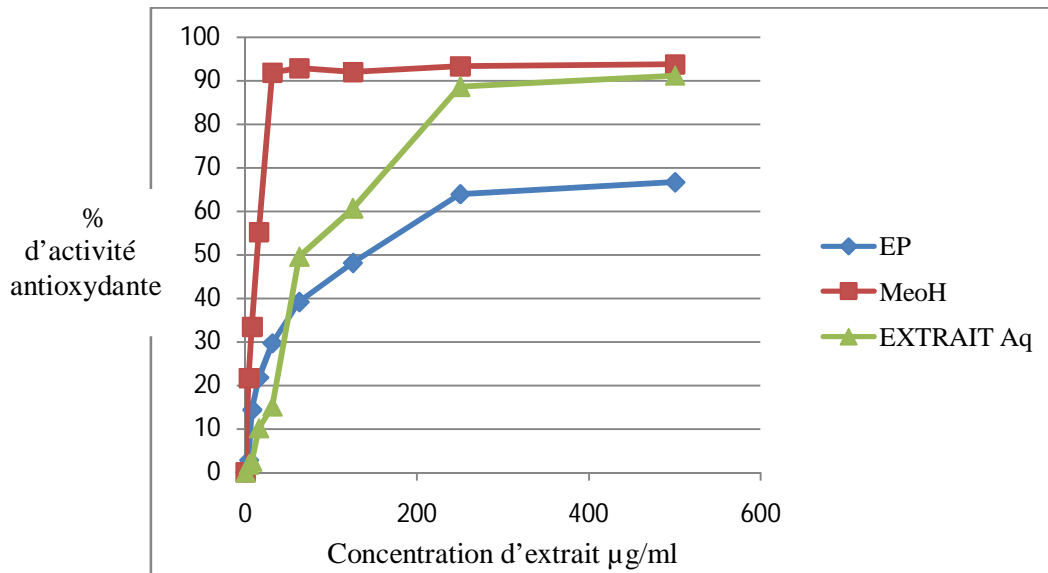


Figure 14 : Activité antioxydante des différents extraits éthanoliques



**Figure 15 :** Activité antioxydante des différents extraits obtenus après une macération dans l'acétone



**Figure 16 :** Activité antioxydante des extraits obtenus par Soxhlet et l'extrait Aqueux

Les profils d'activité antiradicalaire obtenus révèlent que les extraits de *Matricaria pubescens* possèdent une activité antiradicalaire dose dépendante :

Parmi les six extraits obtenus après la macération dans l'éthanol, l'EP représente l'extrait le plus actif avec une IC<sub>50</sub> de l'ordre 2,595µg/ml cette résultat confirme l'activité des huiles essentielles et des flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés présents dans la plante , suivi par le EAc, BuOH, DCM, DEE et Aq avec des IC<sub>50</sub> de 15,819/ 17,776/ 18,810/ 32,901 et 171,192 µg/ml.

Et concernant les extraits obtenus après la macération dans l'acétone le DEE représente l'extrait le plus actif 6,078 µg/ml suivi par la BuOH 8,048 µg/ml, puis EAC, Aq, EP et DCM avec des IC<sub>50</sub> de 8,657/ 13,731/20,534 µg /ml

Pour les extraits de l'extracteur Soxhlet extrait de MeOH et la plus actif avec 7,565 µg/ml et l'EP représente une activité faible avec 49,472 µg/ml. L'extrait aqueux aussi représente une activité moins importante 67,358 µg/ml.

À partir de cette étude on peut déduire qu'il y a une corrélation entre la présence de polyphénols et flavonoïdes et l'activité antioxydante des plantes médicinales.

### 2.3.2. Résultats de l'activité antibactérienne

#### ➤ Test de sensibilité aux extraits bruts de *Matricaria pubescens*

Les résultats du test de sensibilité microbienne aux extraits sont regroupés dans le tableau 09. Les valeurs indiquées sont les moyennes de deux mesures. L'action bactériostatique se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier imprégné d'extrait brut étudié. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre.

**Tableau 09 :** Diamètre des zones d'inhibition de la croissance bactérienne par les différents extraits bruts étudiés (en mm)

Extraits	Volumes (µl)	<i>E .coli</i>	<i>S. aureus</i>
Extrait Aq	50	20,5	21
	10	12,5	13
Extrait MeOH	50	12,5	12 ,5
	10	5,5	10

On observe que les deux extraits ont réagi positivement sur les deux souches microbiennes testées. Le pouvoir antimicrobien le plus élevé est observé chez l'extrait aqueux contre *S. aureus* avec une zone d'inhibition de 21 mm.

L'activité antimicrobienne des extraits bruts( aqueux et éthanolique) et huiles essentiels de *Matricaria pubescens* a été testé par Makhloufi et ses collaborateurs(2012), par la technique de diffusion à partir d'un disque de papier et la méthode des microdilutions en milieu solide ,cette étude montre que l'activité des huiles essentiels des *Matricaria pubescens* est moins importante en comparaison avec l'activité des extraits brutes contre les micro-organismes testés ,avec les zones d'inhibitions résumé dans le tableau 11.

**Tableau 10** : Résultats de l'activité antibactérienne obtenus par (Makhloufi et al., 2012).

Extrait	<i>E .coli</i>	<i>S. aureus</i>
Aq	30	18
EtOH	19	15

L'activité antimicrobienne des extraits de plantes est due aux différents agents chimiques présents dans ces extraits. On remarque aussi que la plante *Matricaria pubescens* est douée de propriétés antimicrobiennes très appréciées et cela justifie son utilisation dans le traitement traditionnelle comme un remède antibactérien



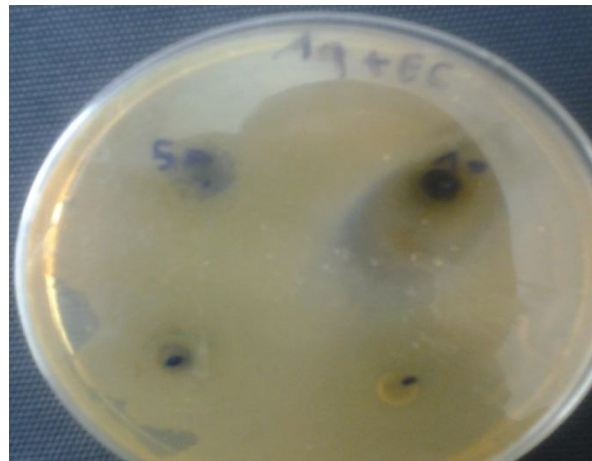
L'effet de l'extrait MeOH sur la croissance de *S. aureus*



L'effet de l'extrait MeOH sur la croissance de *E .coli*



L'effet de l'extrait aq sur la croissance de *S. aureus*



L'effet de l'extrait aq sur la croissance de *E .coli*

**Figure.17.** résultats de l'essai de l'activité antimicrobienne des extraits de *Matricaria pubescens*