

CHAPITRE 4

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cette partie présente l'ensemble des réactifs, du matériel et des méthodes analytiques utilisés au cours de notre étude.

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de biochimie (Département de microbiologie et de biochimie, Université de M'sila).

4.1 Matériels

4.1.1 Matériel végétal

Les feuilles de dix variétés de figuier (*Ficus carica* L.) ont été récoltées au mois de septembre 2013 à la région de Lakhdaria (Wilaya de Bouira). Les variétés étudiées sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 4.1: Variétés et types de figuiers étudiés

Variétés	Types
Onk Elhamam	Unifère
Elhamra	Unifère
Zarrouk	Unifère
Boughandjo	Unifère
Elsafra	Unifère
Elbaidha	Unifère
Elchatwi	Unifère
Elbithar	Bifère
Elbakor	Bifère
Eldhokar	Caprifiguiers

Les feuilles de figuier sont séchées à température ambiante dans l'obscurité et dans un endroit aéré pour mieux conserver les molécules sensibles à la chaleur et à la lumière pour une durée de vingt jours. Après séchage, les feuilles sont broyées jusqu'à l'obtention d'une poudre fine homogène. La poudre fine est ensuite conservée à l'abri de l'humidité. La granulométrie fine de la poudre permet d'augmenter la surface de contact entre l'échantillon et le solvant.

4.1.2 Réactifs

Tous les produits chimiques utilisés sont de qualité analytique. Le réactif de Folin-Ciocalteu, BHT, DPPH, Quercétine et acide gallique proviennent de Sigma Aldrich ; les autres réactifs et solvants utilisés à savoir Bicarbonate de sodium (Na_2CO_3), Acide chlorhydrique (HCl), Alcool isoamylique, Magnésium, FeCl_3 , NaOH, Ammoniaque, AlCl_3) proviennent de Biochem, GPR, Rectapur, VWR, Organics, Cheminova et Fluka, MeOH, Acétate de sodium, KOH, H_2O_2 , L'acide acétique, Benzène, NH_4OH .

4.2 Méthodes

Notre étude a été surtout guidée par deux idées majeures :

- Un test phytochimique suivi par l'extraction des polyphénols des feuilles de dix variétés de figuier et la détermination du rendement d'extraction, de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes.
- Les extraits méthanoliques obtenus ont fait l'objet d'une étude de leurs activités antioxydantes par la méthode de DPPH en utilisant deux étalons l'acide gallique et le BHT (Butylatedhydroxytolylène). Dans l'objectif de découvrir de nouveaux effets thérapeutiques possibles. La figure 4.1 illustre la démarche suivie pour la réalisation de cette étude.

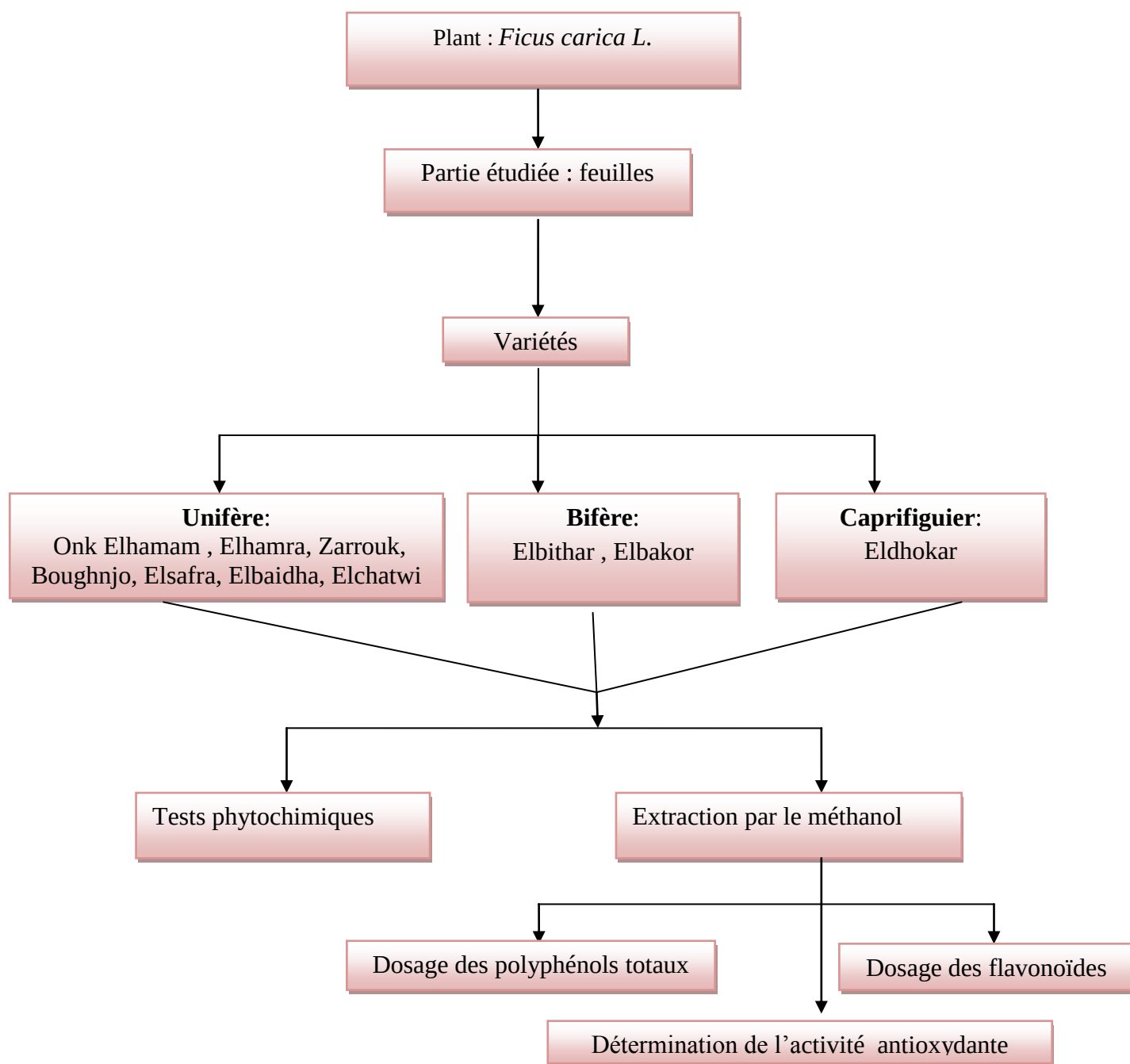


Figure 4.1: Schéma général de l'étude expérimentale

4.2.1 Tests phytochimique

Le test phytochimique ne renseigne pas sur la structure d'une molécule bien déterminée. Il met seulement en évidence la présence de telle ou telle famille chimique pouvant contenir un échantillon. Différentes familles de composés chimiques ont été caractérisées en préparant une infusion de 5 g de la poudre de feuille de figuier dans 50 ml d'eau distillée durant 30 minutes pour chaque variété étudiée.

4.2.1.1 Test des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont été recherchés par la réaction à la cyanidine. A 1 ml d'extrait méthanolique à tester, on ajoute 1 ml d'alcool chlorhydrique, 1 ml d'alcool iso-amylque et 2 à 3 copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rose-orangé à violet ou rouge indique la présence des flavonoïdes (Muanda, 2010).

4.2.1.2 Test des tanins

A 1 ml d'extrait aqueux ou méthanolique, ajouter 200 µl d'une solution de FeCl₃ à 1%. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue-noire ou verdâtre. La différenciation entre les tanins galliques et catéchiques se fait par le réactif de Stiasny (méthanol-acide chlorhydrique concentré 2 : 1 v/ v) (Muanda, 2010).

- **Tanins catéchiques:** A 1 ml de l'infusion, ajouter 0,5 ml de réactif de Stiasny; le mélange obtenu est chauffé au bain-marie à 90 °C pendant 15 minutes. L'apparition d'un précipité montre la présence des tanins catéchiques.
- **Tanins galliques:** Pour révéler les tanins galliques, filtrer le mélange précédemment chauffé et prélever 0,5 ml du filtrat. Le filtrat est ensuite saturé avec de l'acétate de sodium, à ce mélange il est ajouté 100 µl d'une solution de FeCl₃ à 1 % (p/ v). Le développement d'une teinte bleu-noire indique la présence de tanins galliques non précipités par le réactif de Stiasny.

4.2.1.3 Test des Saponosides

5 ml d'extrait aqueux sont bien mélangés avec 10 ml d'eau distillée pendant 2 mn. La formation d'une mousse persistante après 15 mn confirme la présence des saponosides (Karumi et al., 2004).

4.2.1.4 Test des Coumarines

Placer 1 g de poudre de feuilles de *Ficus carica* L. humide dans un tube à essai. Couvrir le tube avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et le placer dans un bain Marie pendant quelques minutes. Toute fluorescence jaune indique la présence de coumarines après l'examen sous UV à 366 nm (Rizk, 1982).

4.2.1.5 Test des anthocyanes

Quelques gouttes d'ammoniaque dilué au un demi sont ajoutées à 5 ml d'extrait aqueux des feuilles de *Ficus carica* L. La réaction donne une coloration bleue en présence d'anthocyane (Rizk, 1982).

4.2.1.6 Test des anthraquinones

Bouillir 1 g de la plante poudre pendant quelques minutes en présence de 10 ml de KOH 0,5 N et 1 ml d' H_2O_2 à 5 %. Refroidir le mélange, filtrer puis acidifier le filtrat avec l'acide acétique. Extraire la solution acide obtenue avec 10 ml de benzène. Agiter l'extrait benzénique en présence de 5 ml de NH_4OH . Une réaction positive est révélée par la formation d'une couleur rouge au niveau de la couche alcaline (Benmahdi, 2000).

4.2.2 Extraction des composés phénoliques

- **Principe du Soxhlet**

Il s'agit d'une extraction solide liquide. L'extracteur de Soxhlet permet le traitement de solides de toutes tailles, avec des solvants en phase liquide ou partiellement vaporisés. Le corps de l'extraction (Soxhlet), contenant un support de cartouche qui est remplie de solide, est fixé sur un réservoir de solvant (ballon) et est surmonté d'un réfrigérant. Le solvant est vaporisé puis condensé, et reste en contact avec le solide. La solution est soutirée périodiquement par l'amorçage d'un siphon. La solution du ballon s'enrichit petit à petit en soluté et le solide est toujours mis en contact avec du solvant fraîchement distillé (figure 4.2).

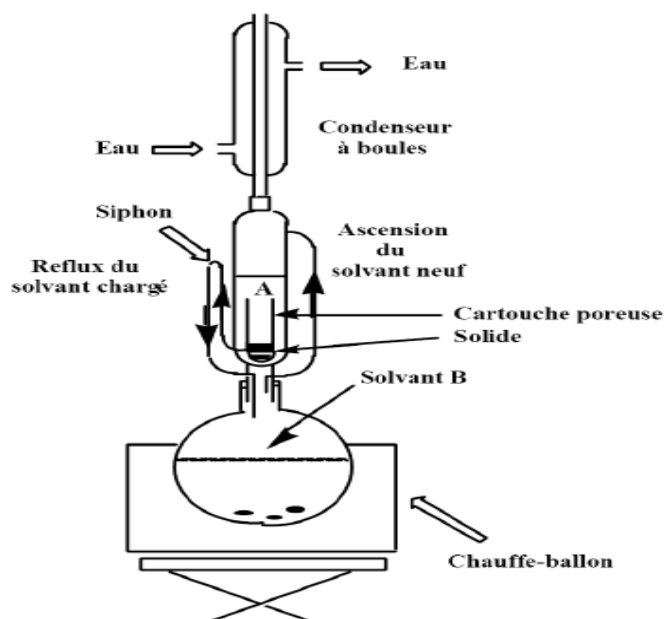


Figure 4.2: Système d'extraction au Soxhlet (Hadj Salem, 2009).

- **Mode opératoire**

Dans un siphon de 250 ml d'un montage Soxhlet, introduire la cartouche qui comporte 30 g de poudre des feuilles de différentes variétés de figuier puis introduire 300 ml du méthanol pure dans un ballon de 500 ml. Le ballon est chauffé à 50 °C; l'extraction se poursuit au moyenne durant 08 cycles d'extraction pour extraire le maximum de polyphénols pour une durée de 08 heures, le mélange méthanol-plante est filtré puis évaporé sous vide (rota vapeur BÜCHI) à 40 °C jusqu'à l'obtention d'un résidu sec. L'extrait est conservé au congélateur jusqu'à son utilisation.

4.2.3 Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est calculé selon la formule ci-dessus. Il est exprimé en fonction de la matière sèche (% MS) :

$$R (\% \text{ MS}) = \frac{Mex}{Mmv} \times 100$$

Où:

R: le rendement en % ;

Mex: la masse de l'extrait sec;

Mmv: la masse de la matière végétale sèche.

4.2.4 Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols a été effectué selon la méthode décrite par Boizot et Charpentier (2006).

- **Principe**

Le dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit dès 1965 par Singleton et Rossi. Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 760 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Boizot et Charpentier, 2006).

- **Mode opératoire**

- **Préparation de la gamme étalon d'acide gallique**

Une gamme de sept concentrations d'acide gallique allant de 0 à 100 µg/ml a été préparée à partir d'une solution mère de 200 µg/ml de concentration (p/v).

Tableau 4.2 : Tableau de dosage des polyphénols totaux

Concentration (µg/ml) de l'acide gallique	0	10	20	40	60	80	100
Volume de l'extrait (µl)	0	200	200	200	200	200	200
Volume de Folin-Ciocalteu (µl)	0	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Volume de Na_2CO_3 (µl)	0	800	800	800	800	800	800

- **Analyse du standard et des extraits**

Introduire 200 µl de la solution d'acide gallique à différentes concentrations dans les tubes à essai de la première série et 200µl de chaque extrait à analyser dans les tubes de la

deuxième série puis ajouter 1000 μl du réactif Folin-Ciocalteu. 800 μl de solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5 % sont ajoutés au mélange (favoriser un milieu alcalin pour déclencher la réaction d'oxydoréduction). Après agitation, le mélange est incubé à l'obscurité au bain Marie à 40 °C pendant dix minutes. Le blanc est préparé de la même façon en remplaçant l'acide gallique par l'eau distillée. La densité optique de mélange préparé est lue à 760 nm avec un spectrophotomètre UV-Visible (Schimadzu-UV-2401PC).

➤ Expression des résultats

La concentration en composés phénoliques totaux est exprimée en milligramme équivalent acide gallique par gramme d'extrait.

4.2.5 Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes totaux a été effectué par la méthode du trichlorure d'Aluminium (AlCl_3) décrite par Bahorum et *al.* (1996) en utilisant le quercétine comme étalon.

• Principe

Le chlorure d'aluminium forme des complexes acides stables avec le groupe cétonique C-4 et avec le groupe d'hydroxyle de carbone C-3 ou C-5 de flavones et de flavonols. En outre, le chlorure d'aluminium forme des complexes acides labiles avec les groupes orthodihydroxyl dans le cycle A ou B de flavonoïdes (Chang et *al.*, 2002) (figure 4.3).

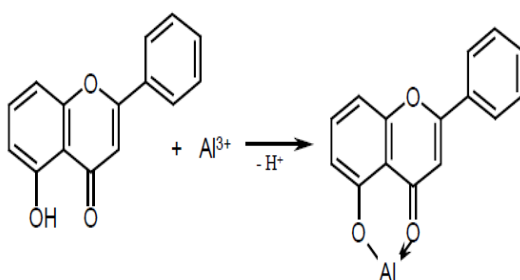


Figure 4.3 : Principe de réaction entre les flavonoïdes et AlCl_3 (Lagnika, 2005)

➤ Mode opératoire

• Préparation de la gamme d'étalonnage

Une gamme de 10 concentrations de quercétine ($\text{C}_{15} \text{H}_{10} \text{O}_7$) allant de 0 à 8 $\mu\text{g} / \text{ml}$ a été préparée à partir d'une solution mère de 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$ de concentration (tableau 4.3).

Tableau 4.3 : Tableau de dosage des flavonoïdes

Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8
Volume de l'extrait (μl)	0	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Volume d' AlCl_3 (μl)	0	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

• Analyse du standard et des extraits

Un volume de 1 ml de la solution de Quercétine de chaque concentration a été introduit dans la première série de tube à essai, et 1 ml de chaque extrait de feuilles de figuier a été introduit dans la deuxième série de tube à essai, 1ml de la solution méthanolique de chlorure d'aluminium

(AlCl₃) à 2 % (p/v) y a été ajouté. La solution est bien agitée et l'absorbance est lue à 430 nm avec spectrophotomètre UV-Visible (Schimadzu-UV-2401PC).

Le blanc est préparé de la même manière précédente en remplaçant l'extrait par 1 ml du méthanol absolu.

➤ Expression des résultats

La concentration en flavonoïdes est exprimée en milligramme équivalent quercétine par gramme de matière sèche.

4.2.6 Etude de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH

La détermination de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) des extraits de différentes variétés de feuilles de figuier a été réalisée selon le protocole décrit par Koh et *al.* (2012) en apportant quelques modifications.

• Principe

La méthode du DPPH• est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire stable DPPH• en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH), qui aboutit à la formation d'une forme non-radicalaire, le DPPH-H (figure 4.4).

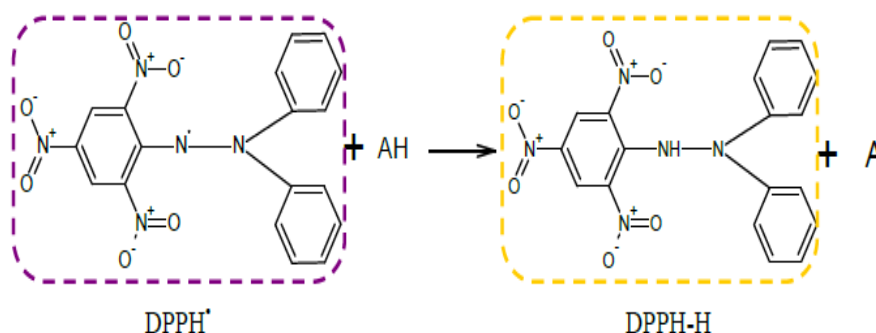


Figure 4.4 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH) (Michel, 2011).

La réduction du DPPH• en DPPH-H induit une perte de sa couleur violette qui peut être suivie à 517 nm (Michel, 2011).

• Mode opératoire

Préparer une solution fraîche du DPPH• (6×10^{-5} mol/l) en solubilisant 2,4 mg du DPPH• dans 100 ml du méthanol absolu. 0,3 ml de chaque extrait, à différentes concentrations, est ajouté à 2,7 ml de la solution de DPPH•. Le mélange réactionnel est agité et incubé 30 min à l'obscurité. Effectuer un blanc avec du méthanol et un contrôle avec 2,7 ml du DPPH• et 0,3 ml du méthanol. Effectuer un test de comparaison avec l'acide gallique et avec le BHT à différentes concentrations. Lire l'absorbance à 517 nm avec spectrophotomètre UV-Visible (Schimadzu-UV-2401PC).

Les CI50 des extraits de feuilles de figuier et des standards ont été estimés à partir de l'équation de la courbe de tendance de chacun (IC50 de l'échantillon correspond à la concentration permettant d'inhibition 50% du DPPH•).

➤ **Expression des résultats**

L'activité antioxydante est calculée en utilisant la formule suivante :

$$A_{antiox}(\%) = 100 \times \frac{A_o - A_s}{A_o}$$

Où :

A_{antiox} : activité antioxydante (%).

A_o : densité optique du contrôle (nm).

A_s : densité optique de l'échantillon (nm).

4.2.7 Analyses statistiques

Les résultats de différentes expériences sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. Les droites d'étalonnage sont calculées par la méthode de la régression linéaire. La différence significative entre les différents extraits d'une part et entre l'extrait et les différents standards d'autre part est déterminée par l'analyse de variance à un facteur (ANOVA) suivie par le test de Tukey pour les comparaisons multiples avec un risque d'erreur α fixé à 5 %.