

République Algérienne Démocratique et Populaire



Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie

جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة والحياة



DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

BOUFERMA Sara

SOLTANE Ikrame

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : Pharmacotoxicologie

THÈME

**Optimisation de l'extraction des polyphénols
à partir des feuilles d'*Agrimonia eupatoria* L.**

Soutenu le 29 /06/2025

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Président	DJEBLI Nouredine	Pr	U. Mostaganem
Encadrant	CHENINI-BENDIAB Hadjer	MCB	U. Mostaganem
Examineur	DOUCHENE Salima	MCA	U. Mostaganem

Année universitaire 2024/2025

Remerciements

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos remerciements les plus sincères et les plus profonds tout d'abord au Seigneur des Mondes «Allah» le tout puissant, de nous avoir accordé la santé, la force, le courage et surtout patience pour accomplir ce travail.

Nous exprimons nos profonds remerciements aux membres de jury qui vont juger notre recherche :

Monsieur le Pr **DJEBLI Noureddine** professeur au département de biologie à l'université de Mostaganem et directeur de la spécialité pharmacotoxicologie qui nous fait l'honneur de présider ce jury ainsi que de nous avoir ouvert les portes au sein du laboratoire de recherche, «Pharmacognosie et Apy-phytothérapie ».

Nous remercions Madame la Dr **DOUICHENE Salima** pour sa participation à ce jury en tant qu'examinatrice et pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail.

Nous exprimons notre plus profond gratitude à notre encadrante Madame **CHENINI-BENDIAB Hadjer** pour sa disponibilité et pour la confiance qu'elle nous a accordé tout au long de la réalisation de ce mémoire. Nous la remercions pour ses encouragements et ses connaissances dont elle nous a fait bénéficié.

Nous tenons à remercier très chaleureusement Dr **MOSTEFA Nadjjet** pour son aide précieuse.

Nous tenons également à remercier l'ingénieure de laboratoire « Pharmacognosie et Apy-phytothérapie », Mme **MEDJAHED Wahiba** , pour son attention, et pour nous avoir permis de travailler dans de bonnes conditions.

Nous souhaiterons également remercier nos professeurs de la spécialité pharmacotoxicologie

DÉDICACE

À mes très chers parents

À travers tous les chapitres de ma vie, votre amour indéfectible et votre soutien indéfectible ont été mes compagnons constants. Ce mémoire est un hommage à la profonde influence que vous avez eue sur le récit de ma vie. Avec un dévouement sincère, je vous offre ces pages, en reconnaissance du rôle remarquable que vous avez joué dans la formation de la personne que je suis aujourd'hui.

Mes deux frères

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ceux qui m'ont soutenu tout au long de cette aventure.

À mes frères, RAMZI et RIAD (my jannah) pour leur soutien inconditionnel, leurs encouragements constants et leur présence discrète mais précieuse dans les moments de doute. Votre confiance m'a toujours donné la force d'avancer.

mon binôme SARA

Merci pour ton investissement, ta rigueur et ton esprit d'équipe. Ce mémoire est aussi le fruit de notre collaboration et de notre complicité professionnelle. Travailler à tes côtés a été un véritable plaisir.

ma copine IBTISSEM

Un merci tout particulier. Tu as été bien plus qu'un simple soutien moral : ton aide concrète durant mon stage, tes conseils, ta disponibilité et ta capacité à m'écouter ont été d'une valeur inestimable. Merci pour ta patience, ton amour et ton implication à chaque étape. Ce mémoire porte aussi une part de toi.

À vous tous, un grand merci du fond du cœur.

Dédicace

À ceux qui m'ont dit un jour que j'étais la prune de leurs yeux, et qui voyaient dans mes plus simples succès de grandes réalisations.

Mes chers parents, la lumière qui a éclairé mon chemin dans les moments sombres merci pour votre amour inconditionnel, vos sacrifices silencieux, votre patience infinie et votre soutien constant. Vous êtes ma plus grande fierté et ma plus belle force.

À mon frère Mohammed Zakarya Mon pilier, et ma sœur Bouchra mon refuge, merci pour votre soutien tout au long de mes études, votre humour contagieux et votre présence réconfortante. Vous êtes ma source de joie et de bonheur, et je suis fière de vous avoir dans ma vie.

À mon Binôme Ikrame, ma partenaire de confiance. Merci pour ta présence, ta contribution a été essentielle à cette réussite.

Et enfin, merci à tous mes enseignants et aux personnes qui m'ont aidé et encouragé tout au long de mon parcours.

Sara

Résumé

Agrimonia eupatoria L. est une plante reconnue pour ses utilisations traditionnelles en médecine. En effet, grâce à sa richesse en métabolites secondaires, elle possède diverses propriétés pharmacologiques. Sur cette base, l'intérêt de notre étude est l'optimisation de l'extraction des polyphénols à partir des feuilles séchées d'*Agrimonia eupatoria* L. Différents extraits aqueux et éthanoliques de notre plante étudiée ont été obtenus par macération et la technique de Soxhlet (Aq-Mac, Eth-Mac, Hex-Sox, Eth-Sox et Aq-Sox). Des analyses phytochimiques qualitatives basées sur les méthodes colorimétriques ont été réalisées, ainsi que la détermination des teneurs en composés phénoliques tels que les phénols totaux, les flavonoïdes totaux, les flavonols, les tanins condensés et hydrolysables. De plus, une analyse spectroscopique a été également effectuée par FTIR-ATR afin d'identifier les groupements fonctionnels présents dans les extraits obtenus. Les résultats de l'investigation phytochimique quantitative ont mis en évidence une richesse diversifiée en composés phénoliques dans les différents extraits étudiés. En effet, les extraits éthanoliques ont révélé des teneurs élevées des substances phénoliques, en particulier le macérât éthanolique (Eth-Mac) qui a enregistré les valeurs maximales des composés analysés, de l'ordre de 96.3779 mg EAG/gMS pour les polyphénols, 2.3042 mg EQ/gMS pour les flavonoïdes, 0.0150 mg EQ/gMS pour les flavonols, 8.3337 mg EC/g MS pour les tanins condensés et 20.2271 mg EAT/g MS pour les tanins hydrolysables. L'analyse par spectroscopie FTIR-ATR a révélé la présence des groupements fonctionnels caractéristiques des substances actives tels que les composés phénoliques, les alcaloïdes, les composés aromatiques dérivés phénolique, les monoterpènes (pinène) ainsi que des sesquiterpènes. Les données obtenues soulignent l'importance d'*Agrimonia eupatoria* L. comme une source de molécules bioactives tels que les polyphénols, les flavonoïdes, et ouvre la voie pour une valorisation pharmacologique de cette plante.

Mots clé : *Agrimonia eupatoria* L., extraction, analyses phytochimiques, composés phénoliques, FTIR-ATR.

Abstract

Agrimonia eupatoria L. is a plant renowned for its traditional medicinal uses. Indeed, thanks to its rich secondary metabolites, it possesses diverse pharmacological properties. On this basis, the aim of our study is to optimize the extraction of polyphenols from dried *Agrimonia eupatoria* L. leaves. Various aqueous and ethanolic extracts of our study plant were obtained by maceration and the soxhlet technique (Aq-Mac, Eth-Mac, Hex-Sox, Eth-Sox and Aq- Sox). Qualitative phytochemical analyses based on colorimetric methods were carried out, as well as the determination of phenolic compounds such as total phenols, total flavonoids, flavonols, condensed and hydrolyzable tannins. FTIR-ATR spectroscopic analysis was also carried out to identify the functional groups present in the extracts obtained. The results of the quantitative phytochemical investigation revealed a diverse richness of phenolic compounds in the different extracts studied. Indeed, the ethanolic extracts revealed high levels of phenolic substances, in particular the ethanolic macerate (Eth-Mac), which recorded maximum values for the compounds analyzed, in the order 96.3779 mg GAE/gDM for polyphenols, 2.3042 mgQE/gDM for flavonoids, 0.0150 mg QE/ gDM for flavonoles, 8.3337 mg CE/gDM for condensed tannins, and 20.2271 mg TAE/gDM for hydrolysable tannins. Analysis by FTIR-ATR spectroscopy revealed the presence of functional groups characteristic of active substances, such as phenolic compounds, alkaloids, aromatic compounds derived from phenolics, monoterpenes (pinene) and sesquiterpenes. The data obtained underline the importance of *Agrimonia eupatoria* L. as a source of bioactive molecules such as polyphenols, flavonoids, and pave the way for the pharmacological valorization of this plant.

Keywords: *Agrimonia eupatoria* L., extraction, phytochemical analyses, phenolic compound, FTIR-ATR.

الملخص

نبته *Agrimonia eupatoria* L. من النباتات المعروفة باستخداماتها التقليدية في الطب. وذلك بفضل غناها بالمركبات الثانوية، مما يمنحها خصائص دوائية متعددة. بناءً على هذه المعطيات، تهدف دراستنا إلى تحسين استخلاص مركبات البوليفينول من الأوراق المجففة لنبته *Agrimonia eupatoria* L. تم الحصول على مستخلصات مائية وإيثانولية مختلفة للنبته محلّ الدراسة باستخدام طريقتي النقع والسخن المتكرر ، وقد تم تصنيفها كالتالي: Aq-Sox, Eth-Sox, Hex-Sox, Eth-Mac, Aq-Mac. أُجريت تحاليل فيتوكيميائية نوعية بالاعتماد على الطرق اللونية، بالإضافة إلى تحديد كمي لتركيز بعض المركبات الفينولية مثل: الفينولات الكلية، الفلافونويدات الكلية، الفلافونولات، التانينات المكثفة والتانينات القابلة للتحلل. كما تم إجراء تحليل طيفي بالأشعة تحت الحمراء باستخدام تقنية FTIR-ATR لتحديد المجموعات الوظيفية الموجودة في المستخلصات المحضرة.

كشفت النتائج الكمية للتحليل الفيتوكيميائي عن غنى وتنوع كبير في المركبات الفينولية ضمن المستخلصات المدروسة. وقد أظهرت المستخلصات الإيثانولية تركيزاً أعلى من المركبات الفينولية، خاصةً مستخلص النقع الإيثانولي (Eth-Mac)، والذي سجّل القيم الأعلى للعناصر المحلّلة كما يلي: البوليفينولات الكلية: (96.3779 mg EAG/gMS) الفلافونويدات الكلية: (2.3042 mg EQ/ gMS)، الفلافونولات: (0.0150 mg EQ/gMS)، التانينات المكثفة (8.3337 mg EC/gMS) والتانينات القابلة للتحلل: (20.2271 mg EAT/gMS). أما تحليل FTIR-ATR فقد كشف عن وجود مجموعات وظيفية مميزة للمركبات الفعالة، مثل المركبات الفينولية، القلويدات، المركبات العطرية المشتقة من الفينولات، المونوترينينات (مثل البينين)، وكذلك السيزكيتربينات.

تؤكد المعطيات المحصّلة أهمية نبته *Agrimonia eupatoria* L. كمصدر غني بالجزئيات النشطة بيولوجياً كالبوليفينولات ، الفلافونويدات مما يمهد الطريق نحو استغلالها وتأمينها في المجالات الصيدلانية.

الكلمات المفتاحية: *Agrimonia eupatoria* L.، استخلاص، تحاليل فيتوكيميائية، مركبات فينولية، FTIR-ATR.

Liste des figures

Figure 01 : A) Les fruits d'aigremoine B) Les feuilles d'aigremoine C) La plante d'aigremoine.....	04
Figure 02 : Répartition géographique d' <i>Agrimonia eupatoria</i> L.....	05
Figure 03 : Biosynthèse des composés phénoliques.....	11
Figure 04 : Structure du noyau phénolique.....	11
Figure 05 : Structure générale des acides phénoliques.....	12
Figure 06 : Structure chimique de stilbènes.....	12
Figure 07: structure chimique des coumarines.....	13
Figure 08 : Structure chimique des lignines.....	13
Figure 09: Structure chimique des xanthones.....	14
Figure 10: Structure chimique des flavonoïdes.....	14
Figure 11: Structure chimiques des flavonoïdes majeurs.....	15
Figure 12: : Structure chimique des tanins	15
Figure 13: Représentation des tannins hydrolysables(a) et condensés (b).....	16
Figure 14: Schéma récapitulative de classification des polyphénols.....	16
Figure 15 : Extraction par macération.....	20
Figure 16: Décoction d'une plante.....	21
Figure 17: Extraction par l'hydrodistillation	22
Figure 18: Montage d'extraction assistée par micro-onde.....	23
Figure 19: Extraction par ultrasons.....	24
Figure 20: Extraction par soxhlet	25
Figure 21: A) photo du conditionnement scellé d'aigremoine B) Les feuilles séchées d'aigremoine.....	26
Figure 22: Schéma récapitulatif de l'extraction par macération.....	27
Figure 23: Schéma récapitulatif de l'extraction par soxhlet.....	28
Figure 24: Lyophilisateur (Alpha 1_2 Ls Cbasic).....	29
Figure 25 : Spectroscopie infrarouge (FTIR-ATR) Jasco PS-4000.....	33
Figure 26: Analyses phytochimiques qualitatives pour les extraits (A) Ethanolique et Aqueux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) et (B) ceux obtenus par la technique de Soxhlet (Eth-Sox,Aq -Sox respectivement)de la plante <i>A.eupatoria</i> .	

.....	34
Figure 27: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	35
Figure 28: Teneurs en phénols totaux dans les extraits d'hexane, éthanolique et aqueux obtenus par la technique de Soxhlet (Hex-Sox, Eth-Sox,Aq -Sox respectivement) et ceux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) de la plante <i>A.eupatoria</i> . Les $P \leq 0,05$ ont été considérés comme statistiquement significatifs	36
Figure 29: Courbe d'étalonnage de la quercitine.....	37
Figure 30 : Teneurs en flavonoïdes totaux dans les extraits d'hexane, éthanolique et aqueux obtenus par la technique de Soxhlet (Hex-Sox, Eth-Sox,Aq -Sox respectivement) et ceux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) de la plante <i>A.eupatoria</i> . Les $P \leq 0,05$ ont été considérés comme statistiquement significatifs	38
Figure 31 : Courbe d'étalonnage de la Quercétine	38
Figure 32: Teneurs en flavonols totaux dans les extraits d'hexane, éthanolique et aqueux obtenus par la technique de Soxhlet (Hex-Sox, Eth-Sox,Aq -Sox respectivement) et ceux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) de la plante <i>A.eupatoria</i> . Les $P \leq 0,05$ ont été considérés comme statistiquement significatifs	39
Figure 33: Courbe d'étalonnage de la catéchine	40
Figure 35: Teneurs tanins condensés dans les extraits d'hexane, éthanolique et aqueux obtenus par la technique de Soxhlet (Hex-Sox, Eth-Sox,Aq -Sox respectivement) et ceux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) de la plante <i>A.eupatoria</i> . Les $P \leq 0,05$ ont été considérés comme statistiquement significatifs.....	41
Figure 36: Courbe d'étalonnage de l'acide tannique	41
Figure 37: Teneurs tanins hydrolysables dans les extraits d'hexane, éthanolique et aqueux obtenus par la technique de Soxhlet (Hex-Sox, Eth-Sox,Aq -Sox respectivement) et ceux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) de la plante <i>A.eupatoria</i> . Les $P \leq 0,05$ ont été considérés comme statistiquement significatifs	42
Figure 38 : Spectre FTIR-ATR d'extrait aqueux par macération.....	44
Figure 39 : Spectre FTIR-ATR d'extrait éthanolique par macération.....	47
Figure 40 : Spectre FTIR -ATR de l'extrait aqueux par soxhlet.....	49
Figure 41 : Spectre FTIR- ATR d'extrait éthanolique par soxhlet.....	51
Figure 42 : Spectre FTIR- ATR d'extrait hexane par soxhlet.....	53

Liste des tableaux

Tableau 01: Taxonomie de <i>Agrimonia eupatoria</i> L.....	03
Tableau 02: Composés biochimiques d' <i>A.eupatoria</i>	06
Tableau 03: Composés phytochimiques d' <i>A ,eupatoria</i>	07
Tableau 04: Activités biologiques des quelques polyphénols dans l'organisme.....	18
Tableau 05: Résultats des tests d'analyses phytochimiques qualitatives pour les extraits éthanolique et aqueux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) et ceux obtenus par la technique de Soxhlet (Eth-Sox,Aq -Sox respectivement)de la plante <i>A.eupatoria</i>	35
Tableau 06: Teneurs en phénols totaux dans les extraits d'hexane, éthanolique et aqueux obtenus par la technique de Soxhlet (Hex-Sox, Eth-Sox,Aq -Sox respectivement) et ceux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) de la plante <i>A.eupatoria</i>	36
Tableau 07: Teneurs en flavonoïdes totaux dans les extraits d'hexane, éthanolique et aqueux obtenus par la technique de Soxhlet (Hex-Sox, Eth-Sox,Aq -Sox respectivement) et ceux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) de la plante <i>A.eupatoria</i>	37
Tableau 08: Teneurs en flavonols totaux dans les extraits d'hexane, éthanolique et aqueux obtenus par la technique de Soxhlet (Hex-Sox, Eth-Sox,Aq -Sox respectivement) et ceux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) de la plante <i>A.eupatoria</i>	39
Tableau 09: Teneurs en tanins condensés dans les extraits d'hexane, éthanolique et aqueux obtenus par la technique de Soxhlet (Hex-Sox, Eth-Sox,Aq-Sox respectivement) et ceux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) de la plante <i>A.eupatoria</i>	40
Tableau 10: Teneurs en tanins hydrolysables dans les extraits d'hexane, éthanolique et aqueux obtenus par la technique de Soxhlet (Hex-Sox, Eth-Sox,Aq-Sox respectivement) et ceux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) de la plante <i>A.eupatoria</i>	42
Tableau 11 : Résultats des analyses phytochimiques quantitatives dans les extraits d'hexane, éthanolique et aqueux obtenus par la technique de Soxhlet (Hex-Sox, Eth-Sox,Aq-Sox respectivement) et ceux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) de la plante <i>A.eupatoria</i>	43
Tableau 12: Groupements fonctionnels de l'extrait aqueux par macération.....	45
Tableau 13: Structures chimiques trouvées dans l'extrait aqueux par macération.....	45

Tableau 14: Groupements fonctionnels de l'extrait éthanolique par macération.....	47
Tableau 15: Structures chimiques trouvées dans l'extrait éthanolique macération.....	48
Tableau 16: Groupements fonctionnels de l'extrait aqueux par soxhlet.....	49
Tableau 17: Structures chimiques trouvées dans l'extrait aqueux par soxhlet	50
Tableau 18: Groupements fonctionnels de l'extrait éthanolique par soxhlet.....	51
Tableau 19: structures chimiques trouvées dans l'extrait éthanolique par soxhlet.....	52
Tableau 20: Groupements fonctionnels de hexane par soxhlet.....	53
Tableau 21: Structures chimiques trouvées dans l'extrait hexane par soxhlet.....	54
Tableau 22: Récapitulation des résultats obtenus par FTIR- ATR des échantillons étudiés.....	55

Liste d'abréviations

Abs : Absorbance.

ABTS : L'acide 2,2'-azino-bis (3- éthylbenzothiazoline-6-sulphonique).

AlCl₃ : chlorure d'aluminium.

CAT : Catalase

C° : degré Celsius

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ; α , α diphényl- β -picrylhydrazyle.

EAG : Equivalent acide gallique. **EAT** : Acide tannique.

EC : Equivalent catéchine.

FeCl₃ : Chlorure ferrique.

FRAP : Pouvoir antioxydant réducteur ferrique

Ftir : Spectroscopie infrarouge à transformée de fourier avec réflexion totale atténuée

H.pylori : *Hylicobacetr pylori*

HCL : acide chlorhydrique

KIO₃ : l'iodate de potassium

NaOH : hydroxyde de soduim

TFT : Teneur en Flavonoïdes totaux.

TPT : Teneur en polyphénols totaux.

TTC : Teneur en tanins condensés.

TTH : Teneur en tanins hydrolysables.

UV : Rayons Ultraviolets

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste d'abréviations

Table des Matières

Introduction01

1ère Partie : Revue Bibliographique

Chapitre I : *Agrimonia eupatoria* L .

I.1. Généralités03

I.2. Classification.....03

I.3. Description botanique.....04

I.4. Distribution géographique et habitat04

I.5. Composition biochimique05

I.6. Composition phytochimique.....06

I.7. Utilisation traditionnelle.....08

I.8. Effets thérapeutiques.....08

I.8.1. Hépatoprotecteur.....08

I.8.2. Anti-inflammatoire.....08

I.8.3. Cicatrisant.....08

I.8.4. Hypotenseurs.....09

I.8.5. Immunomodulateur.....09

I.8.6. Gastro-intestinale.....09

I.8.7. Neuroprotecteur.....09

I.8.8. Antibactérienne.....09

Chapitre II : Les polyphénols

II.1.

Définition.....10

II.2. Biosynthèse des polyphénols.....10

II.2.1. Voie du shikimate10

II.2.2. Voie acétate/malonate10

II.3. Classification des polyphénols.....11

II.3.1. Non-flavonoïdes.....12

II.3.1.1. Les acides phénoliques.....12

II.3.1.2. Les stilbènes.....12

II.3.1.3. Les coumarines	13
II.3.1.4. Les lignines.....	13
II.3.1.5. Les xanthones.....	14
II.3.2. Les flavonoïdes.....	14
II.3.3. Les tanins.....	15
II.3.3.1. Tanins condensés.....	15
II.3.3.2. Tanins hydrolysables.....	16
II.4. Les activités biologiques des polyphénols.....	17
II.4.1. Neuroprotecteur.....	17
II.4.2. Gastro protectrice	17
II.4.3. Anti inflammatoire.....	17
II.4.4. Anti oxydante.....	17
II.4.5. Anti cancéreux.....	18

Chapitre III : Méthodes d'extractions

III.1. Généralités	19
III.2. Méthodes d'extraction	19
III.2.1. Macération.....	19
III.2.2. Décoction.....	20
III.2.3. Hydrodistillation.....	21
III.2.4. Micro-onde.....	22
III.2.5. Ultrasons (sonication).....	23
III.2.7. Technique de Soxhlet.....	24

2ème Partie : Etude expérimentale

Chapitre IV : Matériel et méthodes

IV.1. Matériel végétal.....	26
IV.2. Méthodes d'extractions	26
IV.2.1. Extraction par macération.....	26
IV.2.1.1. Extraction hydro éthanolique.....	26
IV.2.1.2. Extraction aqueuse.....	26
IV.2.2. Extraction par la technique de soxhlet.....	28
IV.3. Analyses phytochimiques.....	29
IV.3.1 Analyses qualitatives (screening phytochimique).....	29
IV.3.1.1. Polyphénols.....	29

IV.3.1.2.Flavonoïdes.....	29
IV.3.1.3.Flavonols.....	29
IV.3.1.4. Tanins.....	30
IV.3.2. Analyses quantitatives.....	30
IV.3.2.1 Détermination de la teneur en polyphénols.....	30
IV.3.2.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes	31
IV.3.2.3. Détermination de la teneur en flavonols.....	31
IV.3.2.4. Détermination de la teneur en tanins condensés.....	31
IV.3.2.5. Détermination de la teneur en tanins hydrolysables.....	32
IV.4. Analyse spectroscopie à infrarouge (FTIR _ATR).....	32
IV.4.2. Protocole opératoire de la spectroscopie (FTIR _ATR).....	33
I.V.5 .Analyses statistiques.....	33

Chapitre V : Résultat et discussion

V.1. Analyses phytochimiques qualitatif (screening phytochimique).....	34
V.2. Analyses phytochimiques quantitatives.....	35
V.2.1. Détermination de la teneur en phénols totaux	35
V.2.2.Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux.....	37
V.2.3. Détermination de la teneur en flavonols.....	38
V.2.4. Détermination de la teneur en tanins condensés.....	40
V.2.5. Détermination de la teneur en tanins hydrolysables.....	41
V.2.6. Récapitulatif des analyses phytochimiques quantitatives.....	43
V.3. Analyse par spectroscopie infra rouge (FTIR _ATR) des extraits étudiés	44
V.3.1. Analyse de l'extrait aqueux par macération	44
V.3.2. Analyse de l'extrait éthanolique par macération.....	46
V.3.3. Analyse de l'extrait aqueux par soxhlet.....	48
V.3.4. Analyse de l'extrait éthanolique par soxhlet.....	50
V.3.5. Analyse de l'extrait hexane par soxhlet.....	53
V.3.6. Comparaison des résultats obtenus par FTIR-ATR des échantillons étudiés.....	54
Discussion	56
Conclusion et perspective.....	64

Références bibliographie

Annexes

Introduction générale

Depuis des millénaires, l'être humain exploite différentes ressources de son environnement pour traiter et guérir diverses maladies (**Kinghorn et al .,2011**) .Au cours des vingt dernières années, l'étude des composés bioactifs d'origine végétale s'est intensifiée, notamment à travers le développement de la phytochimie, un champ de recherche en plein essor.

La phytochimie se définit comme une discipline scientifique qui s'intéresse à l'identification, l'extraction, la purification et la caractérisation des composés chimiques naturels produits par les plantes, appelés métabolites secondaires (**Harborne, 1998**)

En effet, les plantes médicinales sont connues comme une source très riche en métabolites secondaires, parmi ceux-ci on trouve les composés phénoliques, les terpènes, les stéroïdes et les composés azotés et bien d'autres, chacune de ces classes renferme une très grande diversité de substances qui possèdent une très large gamme d'activités biologiques (**Hamed et al ., 2011**).

Les composés phénoliques, également appelés polyphénols, sont largement répandus dans le règne végétal et constituent la classe la plus abondante des métabolites secondaires chez les plantes (**Nawaz et al ., 2006**). Ils sont reconnus pour leurs nombreux effets thérapeutiques démontrés notamment des effets antibactériens, antioxydants, anti-inflammatoires, anti-cancérogènes et d'autres récemment élucidés (**Shon et al ., 2011**).

C'est dans ce contexte, que nous nous sommes intéressés à la plante *Agrimonia eupatoria* L., qui fait partie de la famille des Rosaceae, traditionnellement utilisée pour ses propriétés thérapeutiques variées (**Ivanova et al., 2005**). Elle est réputée pour ses effets astringents, anti-inflammatoires et antimicrobiens, ce qui justifie son usage dans la pharmacopée (**Mărghitaș et al ., 2013**).

Le but de notre étude est l'optimisation de l'extraction des polyphénols à partir des feuilles séchées d'*Agrimonia eupatoria* L., rapportée de l'université de Petcov Slovaquie ainsi que la détermination des teneurs en composés phénoliques et l'identification de leurs groupements fonctionnels par l'analyse spectroscopique FTIR-ATR (spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier avec Réflexion Totale Atténuée).

Notre travail est divisé en deux parties; dans la première, une étude bibliographique qui regroupe trois chapitres ; le premier a concerné la description et l'origine de la plante *A.eupatoria*. Le second s'est consacré à l'étude des polyphénols, leur voies de biosynthèse, leur classification ainsi que leurs propriétés pharmacologiques. Le dernier a traité les différentes méthodes d'extraction avec leurs avantages et inconvénients. Concernant la deuxième partie expérimentale, des analyses phytochimiques qualitatives par

Introduction générale

colorimètre ont été effectués ainsi que la détermination des teneurs de quelques composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonols, flavonoïdes, tanins condensés et hydrolysables) dans les différents extraits d'Aigremoine étudiés. Des analyses par spectroscopie infrarouge (FTIR-ATR) ont été également réalisées. De plus, les résultats de ces paramètres ont été analysés statistiquement et ficelé par une discussion avec des travaux ultérieurs. Une conclusion générale sur l'ensemble de cette étude ainsi que des perspectives ont été établies au dénouement de notre étude.

Partie bibliographie

Chapitre I

Agrimonia eupatoria L .

I.1. Généralités

Agrimonia eupatoria L. également connue sous le nom de (Aigremoine, Clocher, d'épine-vinette ou d'hépatique, entre autres) est une plante herbacée vivace de la famille des Rosacées, aux petites fleurs jaunes en forme d'étoile, au rhizome court et à la tige dure et velue. Des écrits relatant les effets bénéfiques de l'aigremoine remontent aux 4^e et 5^e siècles ; l'herbe est également mentionnée dans l'herbier du vieil anglais du 10^e siècle (**Watkins et al., 2012; Cameron, 2006 ; Voights,1979**).

Le nom *Agrimonia* pourrait trouver son origine dans le grec (*agremone*), qui fait référence à des plantes censées guérir les cataractes de l'œil. Le nom de l'espèce, *eupatoria*, fait référence à Mithradates Eupator, roi du Pont, à qui l'on attribue l'introduction de nombreux remèdes à base de plantes (**Al-Snafi , 2015**).

En médecine populaire, *A.eupatoria* a été largement utilisée sous forme d'infusion, de décoction ou de teinture à partir des parties aériennes (feuilles et fleurs), principalement pour ses propriétés antioxydants, anti-inflammatoires, astringentes, hypotensives et diurétiques. (**Garcia-Oliveira et al., 2020**).

Egalement utilisée pour traiter la diarrhée aiguë et l'inflammation des muqueuses buccales et pharyngées (**Ivanova et al .,2011**). En outre, elle est appliquée en externe sur les lésions cutanées en tant qu'astringent léger et agent anti-inflammatoire (**Granica et al ., 2013**).

De plus , *A. eupatoria* est un ingrédient important dans de nombreux mélanges de plantes utilisés comme compléments alimentaires pour traiter les problèmes suivants l'augmentation de la production de bile, les calculs dans les voies biliaires et les douleurs de la vésicule biliaire et du foie (**Muruzović et al., 2016**).

I.2. Classification

Agrimonia epatoria L. appartient à la famille des rosacées, elle est classé dans le règne végétal selon le tableau suivant (**Tab 01**).

Tableau 01 : Taxonomie d'*Agrimonia eupatoria* L. (**Pognatti ,1982**)

Règne	Plantes
Division	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Rosales
Famille	Rosaceae
Genre	<i>Agrimonia</i> L
Espèce	<i>Agrimonia eupatoria</i> L.

I.3. Description botanique

A. eupatoria présente des caractéristiques classiques c'est une plante herbacée vivace et dressée, mesurant entre environ 50 cm et 150 cm de hauteur, avec quelques branches et une tige cylindrique couverte de poils. Les feuilles pennées sont coriaces, dentées et recouvertes de poils doux. Les fleurs, hermaphrodites, possèdent cinq pétales jaunes et sont disposées en épis terminaux fins. La floraison a lieu de juin à septembre. Le fruit se développe vers le bas, entouré de plusieurs rangées de soies souples en forme de crochets. (Santos et al.,2017 ; Muruzović et al.,2016 ;Ivanova et al.,2011) (Fig 01).

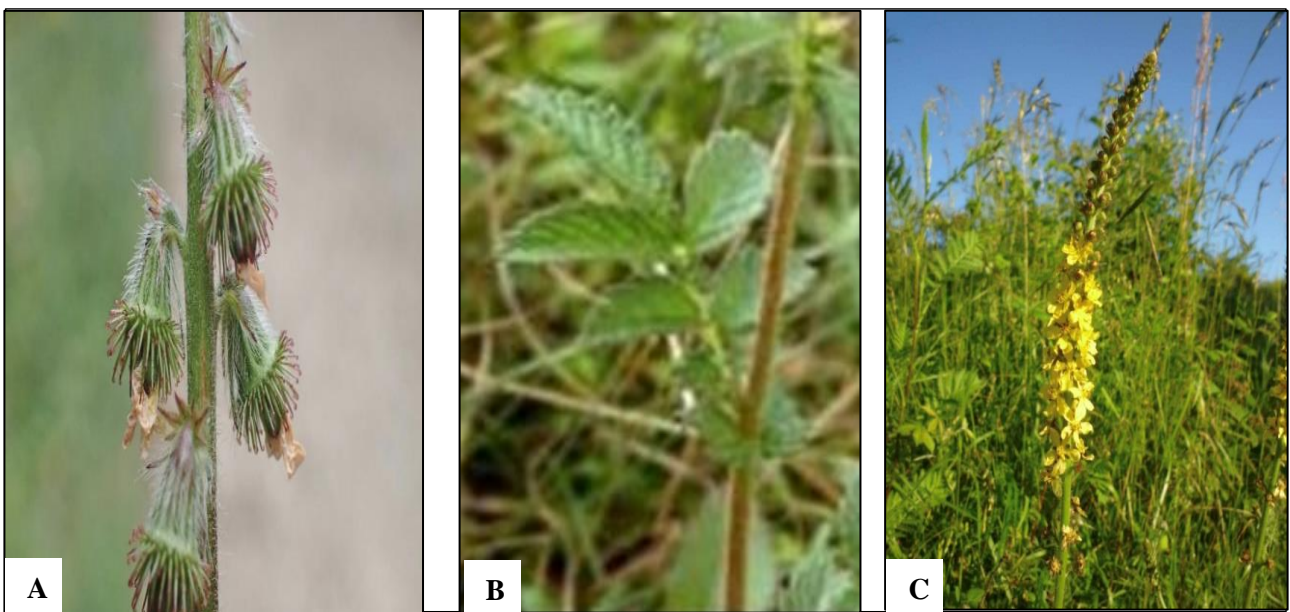


Figure 01 :A) Les fruits d'aigremoine B) Les feuilles d'aigremoine C) La plante aigremoine (Jéssica et al .,2022 ;Tison et al.,2014)

I.4. Distribution géographique et habitat

Agrimonia eupatoria L. est présente principalement en Europe, avec une concentration importante dans les pays d'Europe centrale et de l'Est, notamment en Allemagne, Pologne, Slovaquie, Tchéquie et Ukraine. On la retrouve également dans des pays d'Europe de l'Ouest comme le, la France, l'Espagne et l'Italie, ainsi qu'en Finlande.

En dehors de l'Europe, la plante est aussi signalée dans des régions d'Asie, comme l'Iran, l'Inde, le Japon et le Vietnam, dans l'Amérique du nord les États-Unis, ainsi que l'Australie (Kumar et al.,2011). (Fig02).

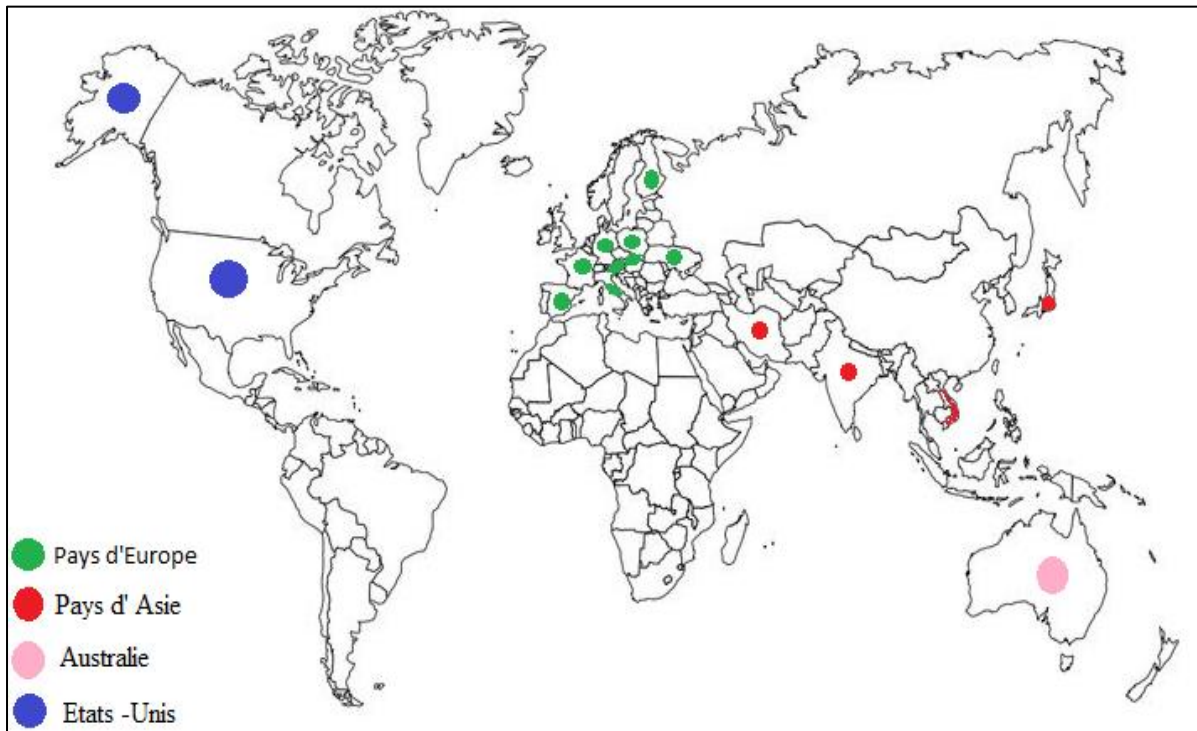


Figure 02 : Répartition géographique d'*Agrimonia eupatoria* L.(kumar et al ., 2011).

L'habitat d '*A. eupatoria* est constitué de prairies, de pâturages et de plaines, ainsi que de montagnes allant jusqu'à 1500 m d'altitude, on la trouve souvent dans tous les types de sol, en particulier dans l'argile. La croissance peut être observée dans des sols humides et modérément secs. Cette espèce peut être observée le long des pentes, des bords de route, et les zones rocheuses. On la trouve également dans les prairies sèches et les forêts arides (Muruzović et al., 2016 ; Ivanova et al., 2011).

I.5. Composition biochimique

I.5.1. Minéraux

L'aigremoine est relativement riche en silice (7,3-7,9 %), en potassium (12,882 µg/g) et en sodium (37,2 µg/g) (Ema,2015 ; Bradley ,1992) (Tab02).

I.5.2. Vitamines

Agrimonia eupatoria L. contient une variété de vitamines: acide ascorbique (vitamine C) (100à300 µg/g),thiamine (2 µg/g), vitamine k (Tab 02).

I.5.3. Huiles essentielles

L'aigremoine contient des huiles volatiles (0,2 %) (Al-Snafi 2015 ; Feng et al., 2013). Les huiles essentielles sont un mélange de terpènes hydrocarbonés, de sesquiterpènes, de polyterpènes et de leurs dérivés oxygénés (Tab 02).

Tableau02 : Composés biochimiques d'*A.eupatoria*

Groupe de composés	Contenu en pourcentage	Exemples	Références
Minéraux	7,3-7,5%	Dioxyde de silicium potassium ,Silice	(Bradely 1992) (Al-Snafi 2015)
Vitamines		Vitamine C Thiamine Vitamine k	(Feng et al.,2013)
Huiles essentielles	0,2%	Cédrol a-Pinène a-Terpinéol Acétate de bornyle	(Al-Snafi 2015)

I.6. Composition phytochimique

I.6.1. Tanins

Agrimonia eupatoria L contient au moins 2 % de tanins. Trois à 21 % des tanins sont des tanins condensés, en particulier des proanthocyanidines (procyanidineB3) Les proanthocyanidines sont présentes principalement sous la forme de leuco-anthocyanines bioconverties par hydrolyse acide en cyanidine (Cos et al.,2012 ;Correia et al., 2006) (Tab 03).

I.6.2. Flavonoïdes

L'aigremoine comprend 1,2-1,4 % de flavonoïdes, qui sont des dérivés du phénylchrome. Parmi ces composés, les plus importants d'un point de vue thérapeutique sont les flavanones les flavones (apigénine, lutéoline), les flavonols (kaempférol, quercétine, myricétine, rutine) et les isoflavanes (Kurkina 2011) (Tab 03).

I.6.3. Acides phénoliques

Les acides phénoliques (2,26 %) sont les composés polyphénoliques non flavonoïdes les plus répandus dans l'agrimoine, structurellement, ils sont divisés en dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (acides benzoïque, gallique, gentisique, , vanillique) et en dérivés de l'acide cinnamique (acides férulique, caféique, coumarique) (**Granica et al ., 2015, Shabana et al ., 2003**) (Tab03).

I.6.4 Triterpénoïdes

Les triterpénoïdes les plus abondants dans l'aigremoine comprennent l'acide urosolique (0,6%) l'acide euscapique , esters 28-β-D glucopyranosyl de l'acide euscapique, acide ursolique (**Le Men et Pourrat ,1955**) (Tab 03).

Tableau03 : Composés phytochimiques de *A.eupatoria*

Groupe de composés	Pourcentage	Exemples	Références
Tanins	2%	Proanthocyanidines (procyanidine Leuco-anthocyane Ellagitanins	(Correia et al.,2006. ; Granica et al., 2015)
Flavonoïdes	1,2- 1,4%	Hyperoside Lutéoline Apigénine Quercétine Kaempférol	(Kurkina,2011 ; Lee et al,2010; Shabana et al., 2003)
Acides phénoliques	2,26%	Acide ellagique Acide-hydroxybenzoïque Vanillique férulique -Acide caféoylquinique Acide cumarique	(Granica et al.,2015 ;Shabana et al.,2003). (Al sanafi ,2015)
Triterpénoïdes	0,6%	28-β-D glucopyranosyle de acide euscapique Acide ursolique	(Le Men et Pourrat ,1955)

I.7. Utilisations traditionnelles

Ses utilisations anciennes comprennent le traitement du catarrhe (inflammation des muqueuses avec écoulement), des hémorragies, de la tuberculose et des maladies de la peau. Il a été signalé comme étant utile dans les troubles de la vésicule biliaire. De nombreux autres usages ont été rapportés, notamment comme colorant, arôme, gargarisme pour les artistes et les orateurs, agent antitumoral, astringent, cardiotonique, coagulant, diurétique, sédatif, antiasthmatique et pour les cors ou les verrues (**Bunney, 1984 ;Al-Sanafi,2015**).

Elle était également utilisée comme anti-inflammatoire, cholagogue, hémostatique léger, antibactérienne, pour les irritations et les infections du tractus intestinaux, les maladies de la vésicule biliaire, l'hyperacidité, les coliques, les troubles urinaires (énurésie, incontinence), le foie paresseux, les inflammations des muqueuses et en usage externe pour les ulcérations (**Khare , 2006 ;Natalia et al.,2021**)

I.8. Effets thérapeutiques

I.8.1. Hépatoprotecteur

L'extrait d'*A. eupatoria* atténue les conséquences de la prise chronique d'alcool sur le taux de Toll-like receptor 4 (TLR4), l'expression du facteur de différenciation myéloïde-88 (MyD88), de la synthase inducible par l'oxyde d'azote, la cyclooxygénase-2, l'expression de l'ARNm, de la translocation nucléaire du Nfκ B (nuclear factor-kappa B). *A.eupatoria* semble donc protéger et améliorer les lésions hépatiques dues à l'alcoolisme chronique en supprimant le stress oxydatif et l'inflammation (**Yoon et al ., 2012**).

I.8.2. Anti-inflammatoire

Un extrait hydro-alcoolique enrichi en polyphénols (flavan-3-ols, flavonols, flavones et acides phénoliques) est testé face aux espèces réactives produites lors d'un phénomène inflammatoire. Il a été démontré une activité de scavenger et une potentielle capacité d'antioxydant. Ceci suggère que les polyphénols extraits de l'aigremoine font partie du mécanisme anti-inflammatoire de cette plante (**Evance , 1996**).

I.8.3. Cicatrisant

Une pommade préparée à partir d'un extrait éthanolique d'aigremoine présente une activité cicatrisante chez le rat comparée à une pommade à base de fucidine et une autre à base d'extrait aqueux de la même plante. La cicatrisation fut complète au bout de 10 jours avec l'extrait éthanolique et après 12 et 14 jours avec respectivement l'extrait aqueux et la fucidine. Avec les rats témoins, la cicatrisation a été obtenue au bout de 16 jours (**Ghaima ,2013**).

I.8.4. Hypotenseurs

Des extraits (10-20 %) de la partie souterraine d'*Agrimonia eupatoria* L. ont été administrés par voie intraveineuse à des chats anesthésiés. Des doses comprises entre 0,25 et 1 ml/kg ont eu un effet hypotenseur avec une diminution de plus de 40 % de la pression artérielle dans les 20 minutes suivant l'administration (**Petkov, 1979 ;paluch et al., 2020**).

I.8.5. Immunomodulateur

L'activité immunomodulatrice d'un extrait hydroéthanolique de la plante a été testée dans les cavités péritonéales de souris. Ils ont produit une activité immunostimulante qui s'est traduite par une augmentation de l'activité phagocytaire et des activités du lysozyme et de la peroxydase (**Bukovsky et Blanirik , 1994 ;kuczmannova et al .,2016**)

I.8.6. Gastro-intestinal

Une préparation d'herbes composées contenant de l'aigremoine a été utilisée pour traiter 35 patients souffrant de gastroduodénite chronique. Après 25 jours de traitement, 75 % des patients ont déclaré ne plus souffrir de douleurs, 95 % de symptômes dyspeptiques et 76 % de douleurs palpitations. La gastroscopie a montré que les érosions et les modifications hémorragiques de la muqueuse avaient disparu (**Chakarski , 1982 ;Tadic et al.,2017**).

I.8.7. Neuroprotecteur

L'extrait méthanolique d'*A.eupatoria* atténue de manière significative le stress oxydatif induit par le glutamate dans les cellules HT22 de l'hippocampe. Cet effet pourrait être dû aux flavonoïdes tels que le kaempférol (E)-p-coumaroyl)-glucopyranoside (2''-acétyltiliroside), qui ont montré une activité neuroprotectrice notable en réduisant la toxicité induite par le glutamate (**Hwang et al ., 2010**). De plus, l'administration orale d'extrait d'*A. eupatoria* dans un modèle de neuropathie induite par le cisplatine chez le rat, a réduit significativement les comportements liés à la douleur, surpassant même l'effet du gabapentine , un médicament de référence. Ces résultats suggèrent un potentiel analgésique et neuroprotecteur de la plante (**Lee et al ., 2016**).

I.8.8. Antibactérienne

Une activité antibactérienne est remarquée contre *Staphylococcus aureus* et le streptocoque alpha-hémolytique (**Barnes et al ., 2007**).Un extrait hydroalcoolique d'*A. eupatoria* montre une inhibition de croissance d'*Helicobacter pylori* à une dilution de 1/25^e. Ceci pourrait entrer dans une alternative thérapeutique au traitement des gastrites à *H. pylori* (**Cwikla, 2010**).

Chapitre II

Polyphénols

.

II.1.Définition

Les composés phénoliques (ou polyphénols) sont des métabolites secondaires naturels ils n'ont été définis qu'au début des années 1980 pour décrire une classe de plusieurs milliers de molécules biologiquement actives présentes dans les plantes, avec des structures très hétérogènes (**Dawn et Deep ,2020**). La structure de base de ces polyphénols est la présence d'au moins un cycle aromatique (phénol) simple ou liés par un ou plusieurs groupes hydroxyles (-OH), libres ou impliqués dans une autre fonction : éther, ester, hétérosid) (**Rasouli et al., 2017 ;Bertin, 2014**).

Il s'agit d'une vaste classe de substances organiques cycliques très diverses, largement répandues dans le règne végétal, retrouvés dans les différents organes de plantes (racines, tiges, feuilles, fruits et graines) (**Dawn et Deep, 2020**).

Les composés phénoliques ont une grande importance physiologique et morphologique chez les plantes, car ils jouent un rôle important dans leur pigmentation, leur croissance, leur reproduction et leurs mécanismes de défense contre les rayons UV auxquels ils sont exposés, ainsi que contre les agents pathogènes (**Hu et Luo, 2016**).

La qualité et la quantité de polyphénols dans les plantes peuvent varier en fonction de nombreux facteurs internes et externes différents, notamment le génotype de la plante, la composition du sol, le niveau de maturité et aussi l'état de la culture (**Faller et Fialho, 2010**).

II.2. Biosynthèse des polyphénols

Les phénols des plantes sont synthétisés par deux voies principales

II.2.1. Voie du shikimate

Cette voie permet de convertir les monosaccharides issus du métabolisme primaires en acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) par désamination. Ces acides aminés conduisent à la formation des acides cinnamiques et de leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques, les lignines et les coumarines (**Bruneton, 1999**) (**Fig 03**).

II.2.2. Voie acétate/malonate

La glycolyse et la β -oxydation conduisent à la formation d'acétyl-CoA, donnant le malonate. C'est par cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes de polycétones, obtenues par condensation répétée des unités « Acétate », via la carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (**Akroum , 2011**) (**Fig 03**).

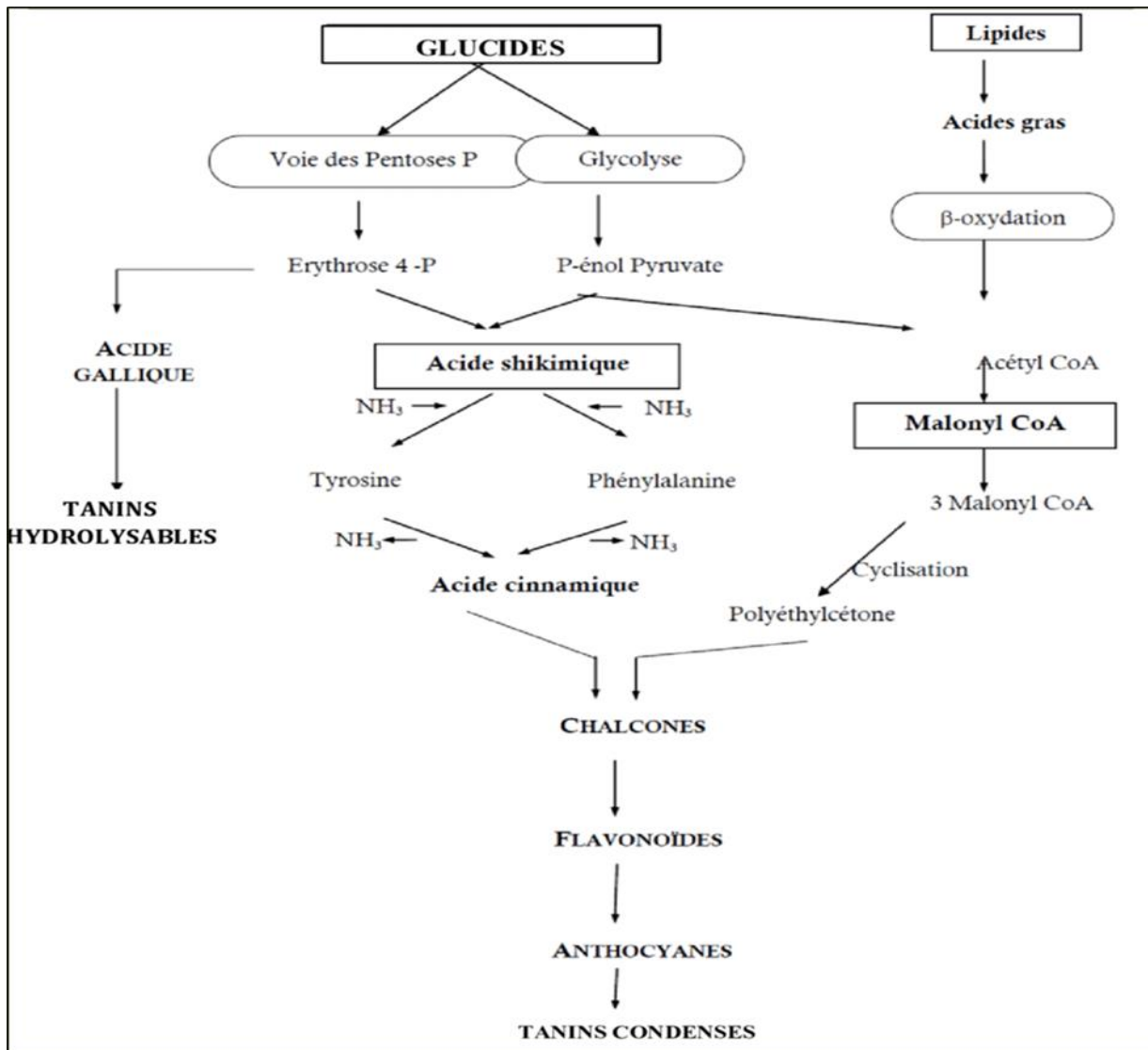


Figure 03: Biosynthèse des composés phénoliques (Akroum, 2011).

II.3. Classification des polyphénols

Les polyphénols sont classés selon le nombre de noyaux phénoliques qu'ils contiennent et les éléments structuraux qui les relient (Kumar et al., 2018) (Fig 04).

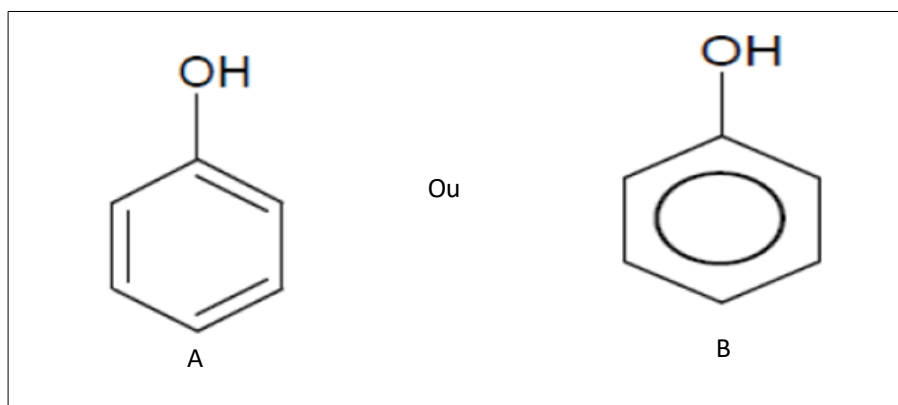


Figure 04 : Structure du noyau phénolique (Albuquerque et al., 2013).

II.3.1. Non-flavonoïdes

Cette classe contient plusieurs composés chimiques, notamment : les acides phénoliques, les stilbènes hydroxylés, les coumarines, les lignines, et les xanthones.

II.3.1.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont parmi les formes les plus simples des composés phénoliques et sont divisés en deux classes au sein de cette sous-famille : les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique. Les acides hydroxybenzoïques sont à la base de structures complexes comme les tanins hydrolysables présents dans les mangues, et les fruits rouges comme les fraises, les framboises ou encore les mûres (**Manach, et al.,2004**).

L'acide hydroxycinnamique représente la classe des acides aromatiques (C6-C3), dérivés de l'acide cinnamique (**Teixeira et al., 2013**), Il sont principalement composé de l'acide caféique, férulique, coumarique, ainsi que l'acide sinapique, (**Singla et al., 2019**) (**Fig 05**).

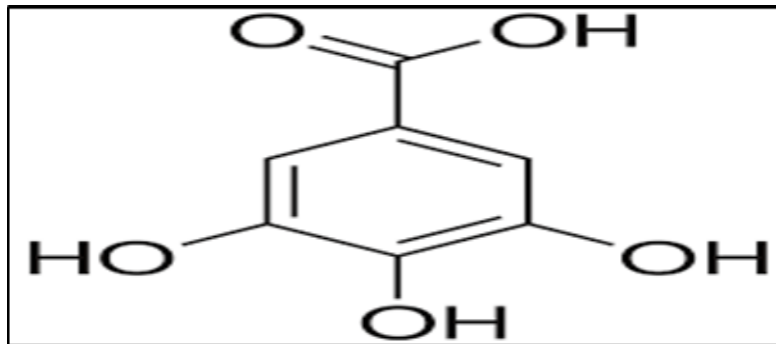


Figure 05 : Structure chimique des acides phénoliques (**shahidi ,2003**)

II.3.1.2. Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés non flavonoïdes présents en faibles quantités dans l'alimentation humaine. Parmi ces composés le resvératrol, qui est un agent anticancéreux présent dans certaines plantes médicinales (**Fleuriet et al ., 2005**) (**Fig 06**).

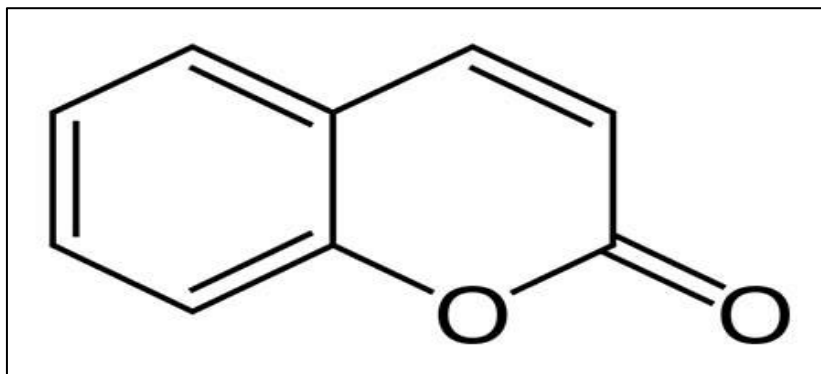


Figure 06 :Structure chimique de stilbènes (**Manach et al.,2004**)

II.3.1.3. Les coumarines

Les coumarines sont des composés produits par la réaction de l'acide orthocoumarique avec le lactose. Après hydroxylation de ces coumarines sur le cycle aromatique, elles deviennent des composés phénoliques de structures diverses, Il est généralement remplacé en C7 par un hydroxyle (**Lobstein , 2010**). Ces composés ont une structure basique : la benzo-2-pyrone. A ce jour, plus de 1 000 composés coumariniques ont été isolés, dont plus de 800 issus de plantes et de micro-organismes. Ils sont capables d'empêcher la peroxydation des lipides membranaires et de capturer les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (**Anderson et al ., 1996**) (**Fig 07**).

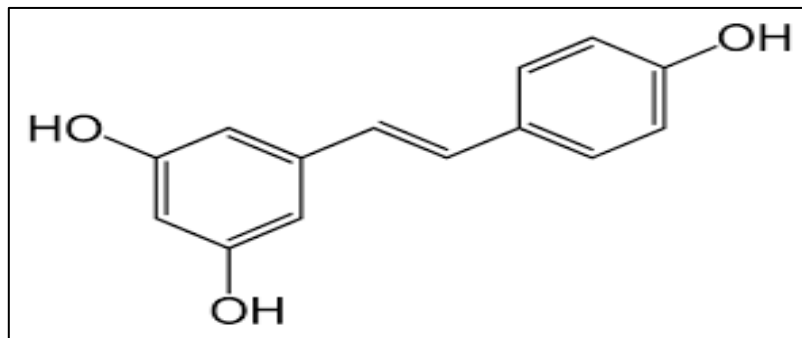


Figure07: Structure chimique des coumarines (**Maky et al .,2021**)

II.3.1.4. Les lignines

Dans de nombreux tissus végétaux, il existe un groupe de composés organiques complexes appelés lignine. Chez les plantes et les arbres, la lignine est particulièrement importante car elle contribue à la formation de la paroi cellulaire (**Popa et al., 2008**).Elles ont été identifiées pour la première fois par un botaniste suisse nommé A P Candolle en 1813.La lignine est un polymère hétérogène qui est obtenu à partir de quelques précurseurs de signaux qui sont réticulés sous différentes formes (**Singla et al., 2019**). Il existe trois types de liaisons croisées, obtenues à partir du phénylpropane et de Ces liaisons sont l'alcool coniférylique, l'alcool sinapique et l'alcool paracoumarylique (**Popa et al., 2008**) (**Fig 08**) .

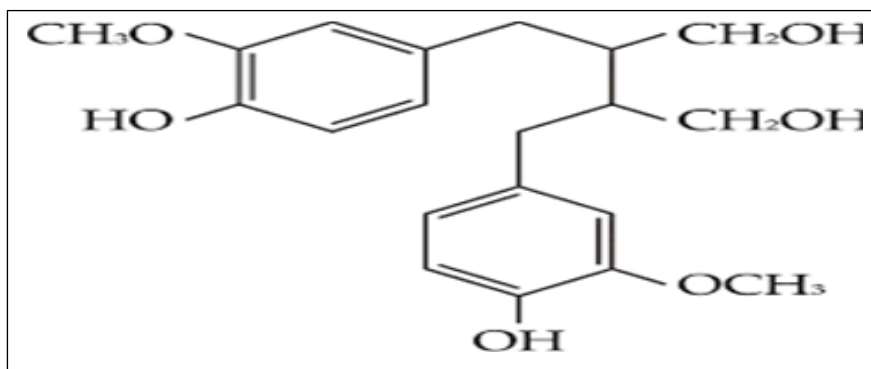


Figure 08 : Structure chimique des lignines (**Ralph et al.,2004**).

II.3.1.5. Les xanthones

Sont une famille de composés polyphénoliques isolés à partir des plantes supérieures et de micro-organismes qui répondent à la structure de base (C6-C1-C6) (Muanda ,2010) (Fig 09).

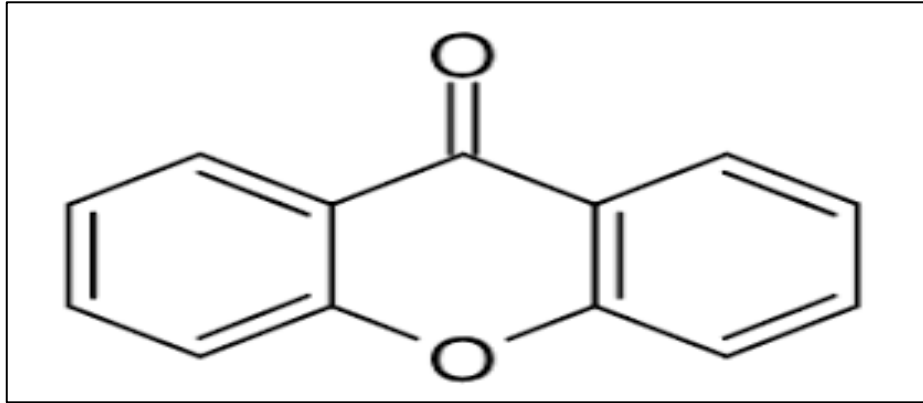


Figure 09: Structure chimique des xanthones (Machmudah et al., 2015).

II.3.2. Les flavonoïdes

Constituent la plus grande classe des composés phénoliques. Maintenant plus de 4000 composés ont été identifiés, dont environ 50 % sont des polyphénols. Ces composés ont une structure de base constituée de deux noyaux benzéniques A et B connectés à un noyau C qui est un hétérocycle pyranique (Lobstein , 2010) (Fig10).

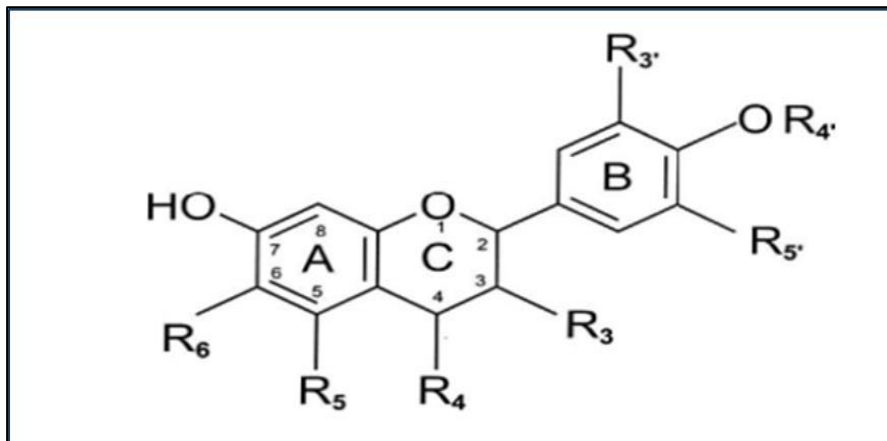


Figure 10: Structure chimique des flavonoïdes (Damian et al., 2016)

Les flavonoïdes sont classés en plusieurs sous-groupes ,dont les flavones (chrysin, apigénine, baicalein), les flavonols (quercétine, kaempférol), les isoflavones (daidzéine, glycitéine), les flavan-3-ols (gallocatechine, catéchine, épicatechine),flavanones hespérétine, naringénine

(hespérétine, naringénine) et anthocyanidines (delphinidine, péonidine, cyanidine)

(Rasouli *et al.*, 2017 ; Singla *et al.*, 2019) (Fig 11).

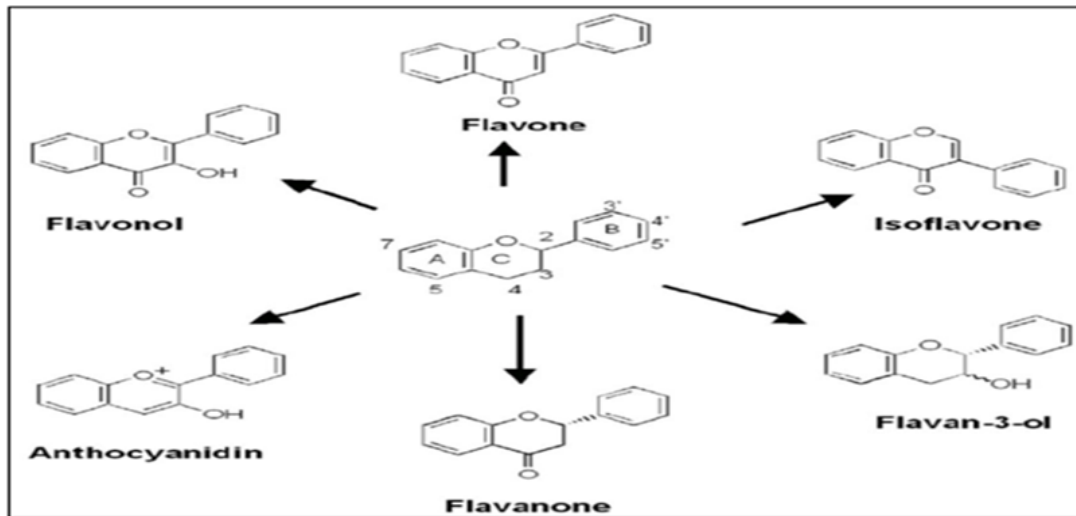


Figure 11 : Structures chimiques des flavonoïdes majeurs (Nishiumi *et al.*, 2011).

II.3.3. Les tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques aux structures diverses. Ils sont largement répandus dans les plantes, en particulier dans les graines, les fruits, les céréales et diverses boissons. Le vin et le thé sont les principales sources de tanins dans l'alimentation humaine (Pénicaud, 2009) (Fig 12).

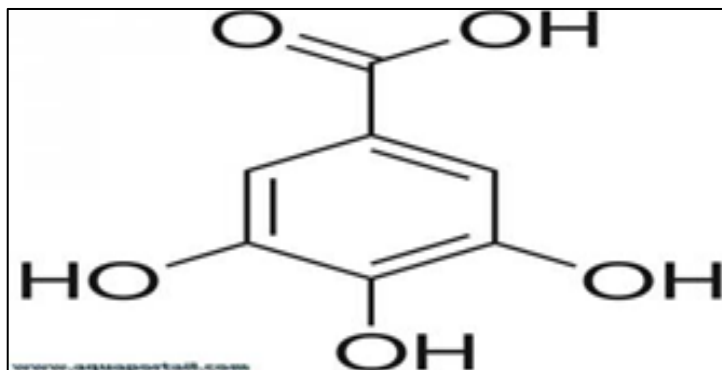


Figure12 : Structure chimique des tanins (Anjum *et al.*, 2014)

En fonction de leur structure, les tanins peuvent être divisés en deux groupes principaux

II.3.3.1. Tanins condensés

Proanthocyanidines sont formées principalement par la condensation d'unités structurales de flavan-3-ol (monomères de catéchine), qui sont liées par des liaisons C-C (4-8 ou 4-6) (Smeriglio *et al.*, 2017) (Fig 13).

II.3.3.2. Tanins hydrolysables

la structure chimique des tanins hydrolysables est composée d'un noyau polyol (D-glucose, acide quinique, etc.), qui est relié à des acides phénoliques, tels que les acides galliques et les acides ellagiques. Les gallotannins et les ellagitannins sont deux types principaux de tanins hydrolysables, caractérisés par l'unité structurale des acides galliques et des acides ellagiques, respectivement (Lang et al., 2024). (Fig 13).

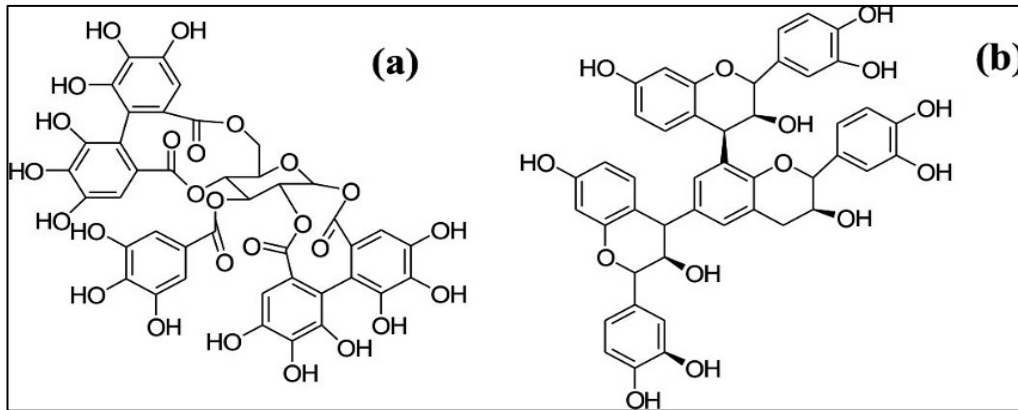


Figure 13: Tanins hydrolysables(a) et condensés (b)(Prabhu et al.,2021)

Les classes des polyphénols sont récapitulées dans la figure suivant (Fig 14)

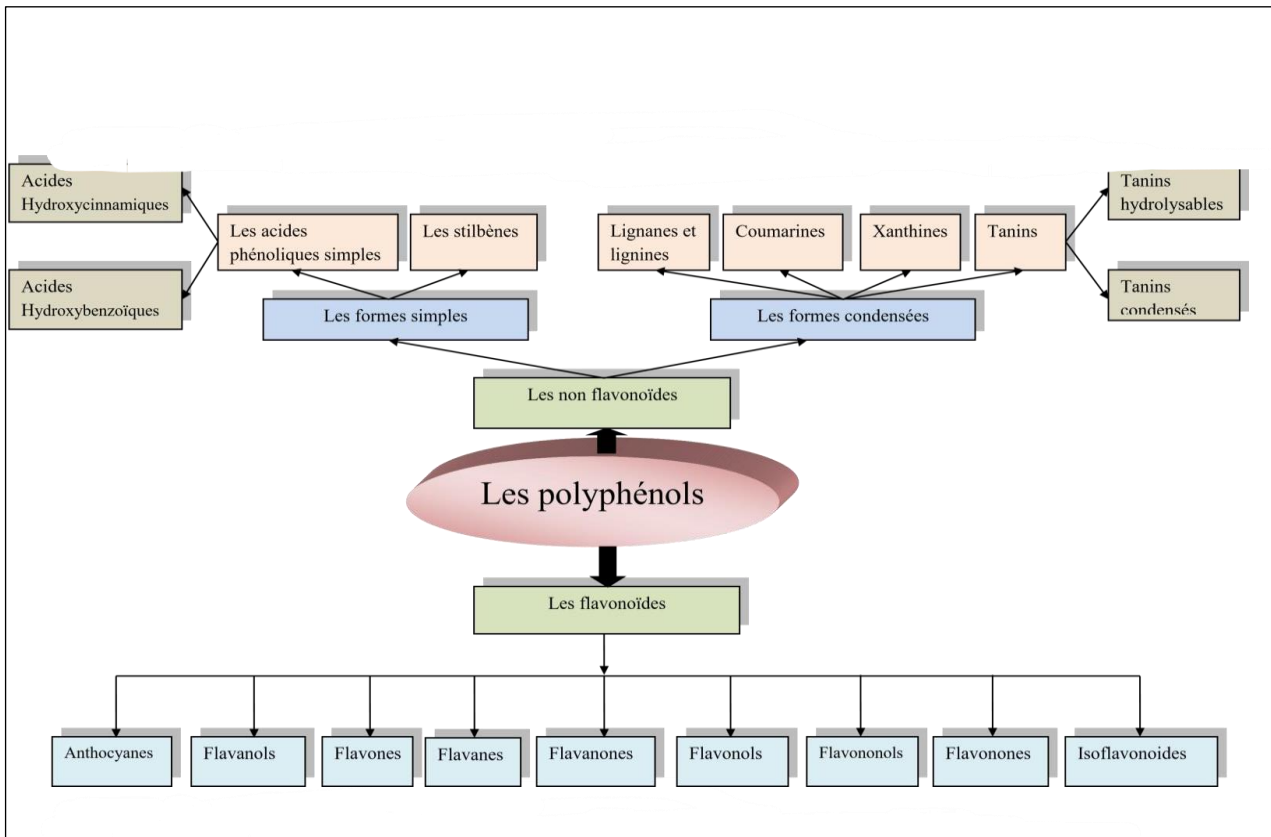


Figure14 : Schéma récapitulatif de classification des polyphénols (Macheix et al., 2005)

II.4. Les activités biologiques des polyphénols

II.4.1. Neuro protectrice

Dans le cas des maladies chroniques héréditaires telles que la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Huntington et la démence, l'inflammation et le stress oxydatif les polyphénols jouent un rôle important dans la modulation des voies de signalisation neuronale (**Di Meo et al ., 2020**). Les polyphénols renforcent l'activité des enzymes de détoxification et d'anti oxydation, ainsi que la régulation de l'activité de l'oxygène réactif. Ils inhibent également l'apoptose induite par le glutamate (**Yang et al.,2020**).

II.4.2. Gastro protectrice

Les polyphénols jouent un rôle important dans la protection du système digestif. Spécialement pour les cancers du système digestif. Leur effet préventif s'explique par un mécanisme très similaire à celui du prébiotique par leur capacité à identifier un type spécifique de microbes intestinaux (**Ozidal et al., 2016**).

Les flavonoïdes ont la propriété de renforcer le système de défense des muqueuses en stimulant la sécrétion de mucus gastrique et piéger les espèces réactives de l'oxygène (anions superoxydes) et les radicaux libres qui jouent un rôle important dans les lésions ulcéreuses et érosives du tractus gastro-intestinal (**Borrelli et Izzo, 2000**).

Les tannins peuvent prévenir le développement d'ulcères grâce à leurs effets précipitants et vasoconstricteurs. Leur action astringente aide à précipiter les protéines sur le site de l'ulcère, formant une couche imperméable sur la muqueuse pour bloquer la sécrétion intestinale et protéger la muqueuse sous-jacente des toxines et autres irritants (**Panda et Khambat , 2014**).

II.4.3. Anti inflammatoire

Plusieurs études montrent que les polyphénols et leurs métabolites fonctionnent également en tant que modulateurs des voies de signalisation inflammatoires ,ils réduisent également les signes d'inflammation et agissent sur plusieurs cibles moléculaires au centre des voies de signalisation inflammatoires (**Lenoir, 2011**).

II.4.4. Anti oxydante

Les polyphénols sont des agents antioxydants très puissants (**Oszmianski et al ., 2007**), ils inhibent la production de radicaux libres, réduisant ainsi le taux d'oxydation en inhibant la formation ou en désactivant les espèces actives et les précurseurs des radicaux libres. Plus fréquemment, ils agissent comme capteurs de radicaux directs dans les réactions en chaîne de la peroxydation lipidique (briseurs de chaîne) (**Pietta,2000**).

II.4.5. Anti cancéreuse

Une cellule cancéreuse est définie comme une unité de vie sujette à la prolifération, motivée par l'histoire génétique de l'individu ou d'autres facteurs habituels ou environnementaux (alimentation, mode de vie, pollution, radiations, et bien d'autres). Dans 35 % des cas de cancer, les causes sont les habitudes et les modèles alimentaires (**Ramos, 2008**).

Étant donné que les substances phytochimiques telles que les polyphénols sont d'excellents agents anticancéreux, après avoir été étudiées pour leurs propriétés, elles pourraient être utilisées comme support pour le traitement du cancer grâce à leur affinité pour les macromolécules protéique (**Valdu et al ., 2022**).

Quelques exemples de composés phénoliques et de leurs activités biologiques sont récapitulés dans le tableau suivant (**Tab.04**).

Tableau04: Activités biologiques des quelques polyphénols et leur bienfaits dans l'organisme

Polyphénols	Activité biologique	Auteurs
Acides phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes, antiulcéreuses, antiparasitaires antifongiques, antioxydants	(Gurbuz I et al.,2009 ; Sannomiya Met al .,2005) (Behl et al., 2020; Rasouli et al., 2017; Shahidi et Yeo, 2018)
Flavonoïdes	Anti tumorales, antiparasitaires, , antibactériennes, anti carcinogènes, anti-inflammatoires, analgésiques, ,antivirales, , antioxydants,	(Shon et al., 2004 ; Wollgast et Anklam ,2000.) (Ballard et Junior, 2019)
Pro anthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène, antioxydants, anti tumorales, antifongiques et anti-inflammatoire	(Masquelier et al., 1979) (Krga et Milenkovic , 2019)
Lignines	Anti-inflammatoires, analgésiques	(Kim et al., 2009)
Coumarines	Protectrices vasculaires, anti- inflammatoires, anti parasitaires analgésiques et anti œdémateuses	(Smyth et al ., 2009)
Anthocyanes	Protectrices capillaire-veineux, anti oxydante	(Bruneton , 1993)

Chapitre III

Méthodes d'extraction

.

III.1 Généralités

L'extraction est une technique de séparation en génie chimique, elle utilise un moyen permettant de séparer sélectivement un ou plusieurs composés d'un mélange sur la base de ses propriétés chimiques et/ou physiques. Le solvant d'extraction doit être non ou peu miscible avec les composants principaux du mélange alors que le composé à extraire doit posséder plus d'affinité avec le solvant d'extraction qu'avec les composants principaux du mélange, suivant la manière et le moyen utilisé.

L'extraction par solvant des produits naturels est la méthode la plus répandue. Elle passe premièrement par la pénétration du solvant dans la matrice solide et la dissolution du soluté dans les solvants, Ensuite la diffusion du soluté hors de la matrice solide, et finalement collecte des solutés extraits (Newman et Cragg, 2012). Tout facteur améliorant la diffusion et la solubilité lors des étapes précédentes facilitera l'extraction. Les propriétés du solvant d'extraction, la granulométrie des matières premières, le rapport solvant/solide, la température et la durée d'extraction influencent l'efficacité de l'extraction. Le choix du solvant est crucial pour l'extraction (Du et al., 2011) ceux dont la polarité est proche de celle du soluté sont susceptibles d'être plus performants et universels, tels que les alcools (EtOH et MeOH).

Parmi Les méthodes d'extraction conventionnelles, on trouve la macération, décoction, l'hydrodistillation extraction par micro onde, par ultrasons et soxhlet (Zhang et al., 2018).

III. 2. Méthodes d'extractions

III.2.1. Macération

C'est une méthode traditionnelle, a été couramment employée. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant avec ou sans agitation, à température ambiante ou à température élevée pour une durée déterminée. Elle est basée sur la solubilité des composés bioactifs dans un solvant d'extraction et elle est influencée par une série de facteurs incluant la nature du matériel végétal Bouchouk. (2016), la concentration en solutés de l'échantillon, la nature du solvant, la durée d'extraction. (Spingo et al., 2007) (Fig 15)

La macération est relativement peu coûteuse et aussi la plus simple, elle est utilisable dans le cas de l'extraction d'un ensemble de molécules fragiles et se déroule à température ambiante ce qui est très positif pour conserver l'intégrité des molécules bioactifs qui sont sensibles aux changements de température. En outre, une matrice peut subir plusieurs extractions successives en utilisant des solvants de plus en plus polaires afin d'obtenir des mélanges enrichis en molécules d'intérêt (AL-bandak et Oreopoulou, 2007).

Cette technique a été optimisée, notamment, pour l'analyse des composés non volatils (polyphénols, sucres) avec l'utilisation d'une quantité considérable de solvant

(**Kok et al., 1987**). Pour être efficace, une macération a des temps d'extraction très longs (environ 4 à 10 jours), ceci peut présenter quelques inconvénients, en termes de fermentation, ou de contamination bactérienne notamment si le solvant utilisé est l'eau

(**Macleo et Troconis,1982**)

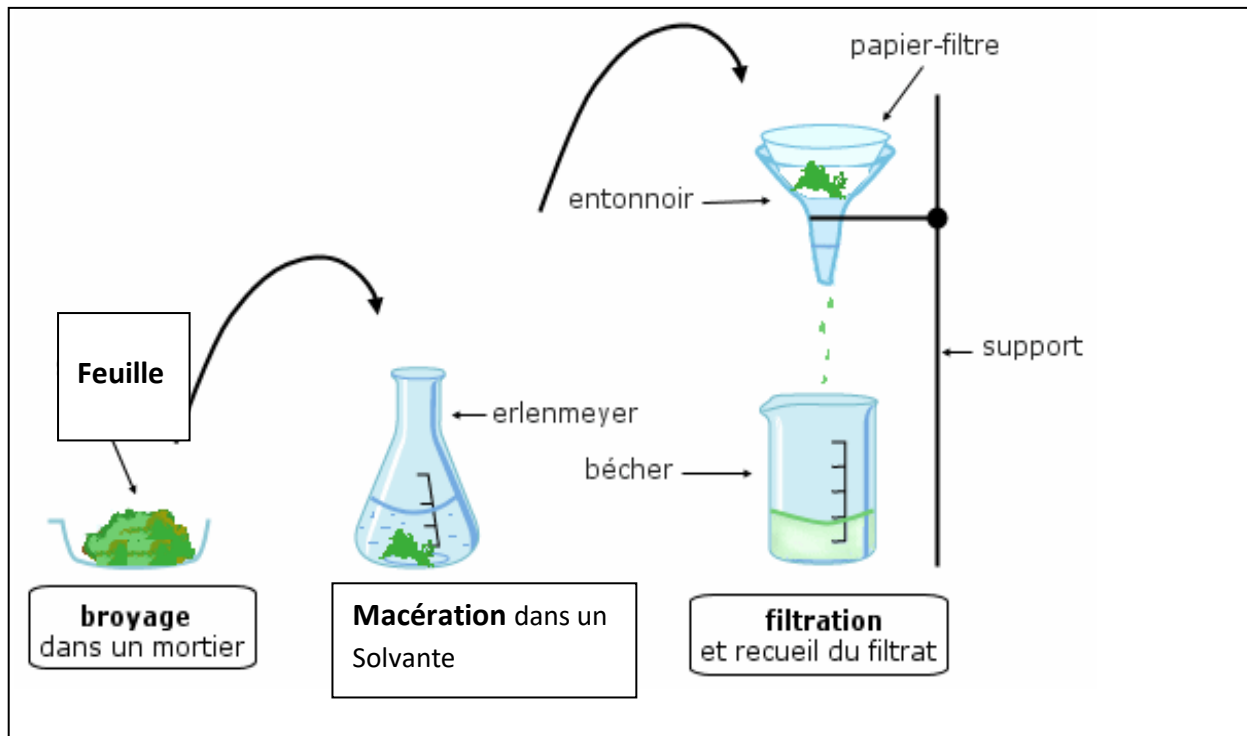


Figure 15: Extraction par macération (**Spingo et al .,2007**)

II.2.2. Décoction

La décoction est une excellente méthode pour extraire des composants hydrosolubles qui ne seront pas endommagés par la chaleur. Cette méthode extrait des substances chimiques actives à l'aide d'eau (**Bohui et al.,2018**) jusqu'à ce que le volume d'eau soit réduit de moitié. Elles se préparent en brisant les parties de la plante en petits morceaux avant de les tremper dans une quantité d'eau donnée dans un récipient en terre cuite . L'eau doit recouvrir les parties de la plante, puis le récipient est recouvert et la préparation est portée à ébullition jusqu'à ce que le volume d'eau soit réduit de moitié. La préparation bouillie est filtrée, refroidie et conservée au réfrigérateur. Elle peut être conservée 2 à 3 jours. (**Nafiu et al.,2017**) (**Fig 16**)

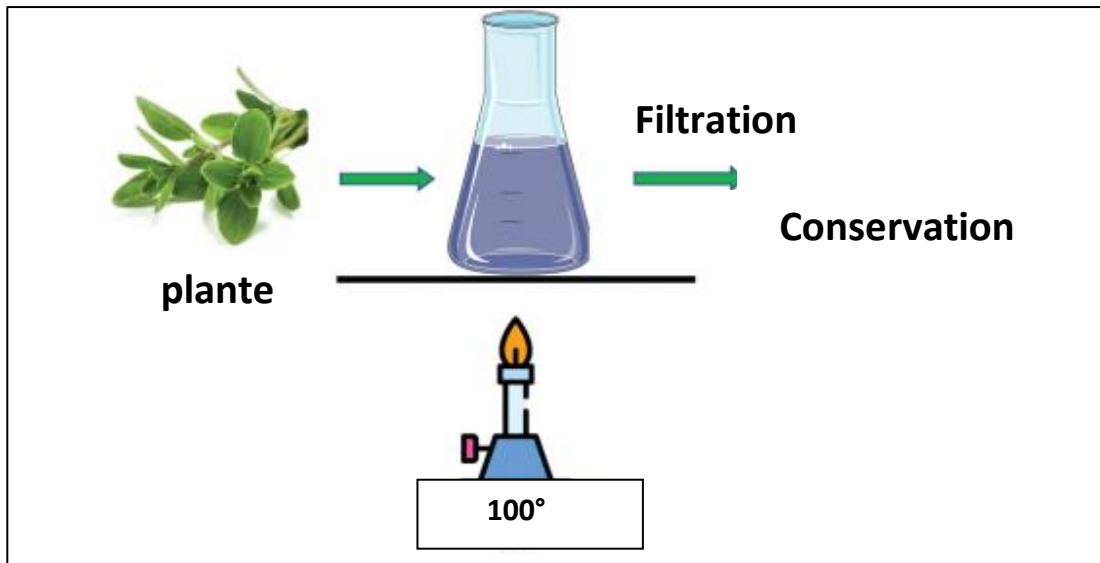


Figure 16: Décoction d'une plante (María et al., 2023)

Cette méthode est assez violente et peut détruire certains composants organiques. elle n'est pas considérée comme une technique sélective, ce qui signifie que l'extrait peut contenir une grande variété de composés et d'impuretés solubles dans l'eau. Un autre inconvénient de la décoction concerne les solvants. Comme la méthode implique l'ébullition, l'extraction est limitée aux solvants non volatils et non toxiques.

III.2.3.L'hydrodistillation

La distillation de l'eau, ou hydrodistillation à pression atmosphérique, est la méthode la plus ancienne, la plus pratique et la plus répandue. L'hydrodistillation elle-même est la méthode standard pour l'extraction des huiles essentielles (Marié, 2005), elle correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière végétale dans un bain-marie. Le tout est ensuite porté à ébullition, généralement à pression atmosphérique. La température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des pressions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation. Il est donc inférieur à chacun des points d'ébullition des substances pures. Ainsi, le mélange « eau + huile essentielle » distille à une température inférieure à 100 °C à pression atmosphérique (Jluicita, 2006) (Fig 18).

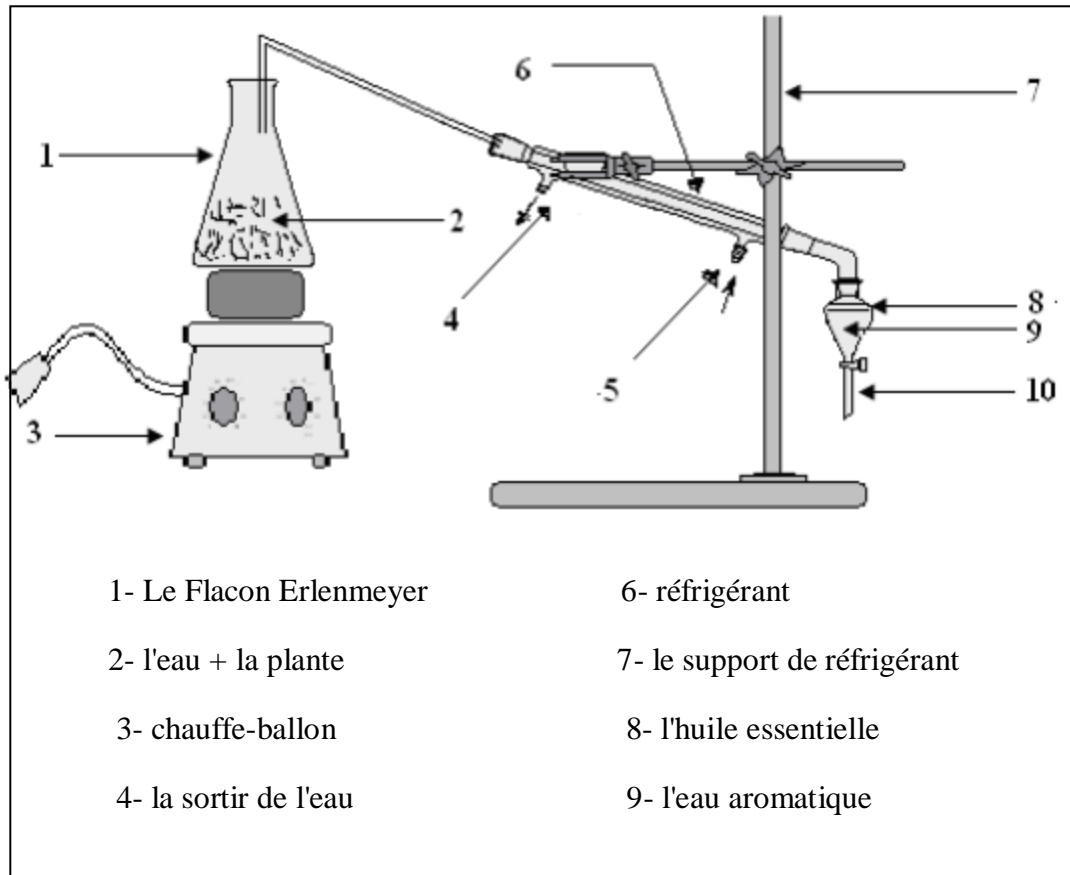


Figure 17: Extraction par l'hydro distillation (Marie ,2005).

Un plus grande valeur du rendement est obtenue par hydrodistillation. Ce processus Principalement présente des inconvénients dû à l'action de la vapeur ou de l'eau bouillante de la vapeur ; Certains organes végétaux, notamment les fleurs, sont très fragiles pour résister à l'action de la vapeur ou de l'eau bouillante. (Marié,2005)

III.2.4. Micro-onde

Cette technique d'extraction consiste à irradier par micro-ondes de la matière végétale broyée en présence d'un solvant absorbant fortement les micro-ondes (le méthanol) pour l'extraction de composés polaires ou bien en présence d'un solvant n'absorbant pas les microondes (hexane) pour l'extraction de composés apolaires. L'ensemble est chauffé sans jamais atteindre l'ébullition durant de courtes périodes entrecoupées par des étapes de refroidissement (EL HAIB ,2011), les ondes électromagnétiques sont constituées de deux champs oscillant perpendiculairement, à savoir : le champ électrique et le champ magnétique. champ magnétique, que l'on peut également appeler micro-ondes. Ces ondes sont utilisées comme vecteurs d'énergie ou vecteurs d'information. Ces ondes sont absorbées par le matériau et converties en énergie thermique.

Il s'agit de l'énergie des micro-ondes. est comprise entre 300 MHz et 300 GHz. Ces ondes sont des rayonnements non ionisables (AnkitGupta et al ., 2019) (Fig 18)

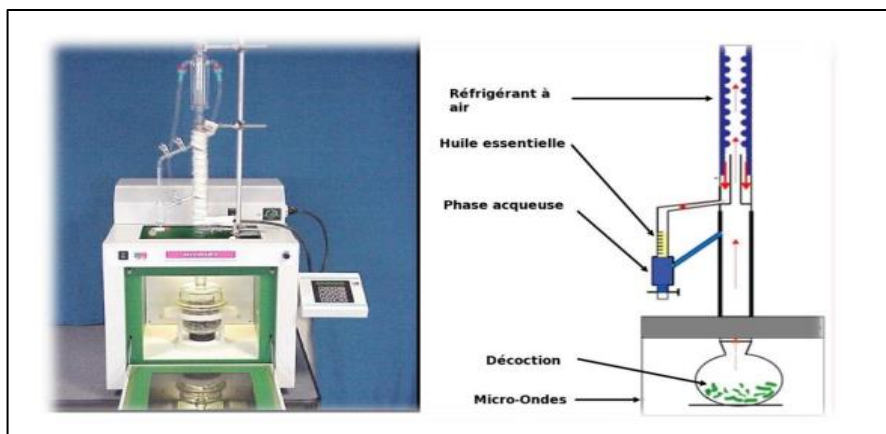


Figure 18: montage d'extraction assistée par micro-onde (Smadja ,2009)

Le principal avantage de l'extraction par micro-ondes est que le temps d'extraction requis pour ce processus est moins, le solvant requis est également moindre, le coût de l'équipement est faible et la récupération du solvant est modérée élevé pour ce processus .

La principale limitation est qu'après le processus, des restes de résidus solides subsistent dans l'extracteur. Donc, un processus supplémentaire de centrifugation et de filtration est nécessaire pour faciliter l'élimination des résidus solides. les solvants non polaires ne peuvent pas être utilisés pour le traitement. De plus, les solvants volatils ne peuvent pas être utilisés pour ce processus car cela réduit l'efficacité du processus d'extraction par micro-ondes (Patel1 et al .,2019).

III.2.5. Ultrasons(sonication)

Les ultrasons sont des ondes électromagnétiques dont les fréquences sont plus élevées que les ondes sonores audibles par l'oreille humaine. La gamme des ultrasons utilisés est de 20 kHz à 2000 kHz (Machado et al ., 2019). Ce processus implique l'utilisation d'ultrasons; ces ultrasons augmentent la perméabilité de la cellule et produisent des cavitations Bien que ce procédé soit utile dans de nombreux cas, comme l'extraction d'anthocyanes et d'antioxydants,

ainsi que dans le domaine de la nanotechnologie, il est également utile dans le domaine de l'agriculture.(Fig 19)

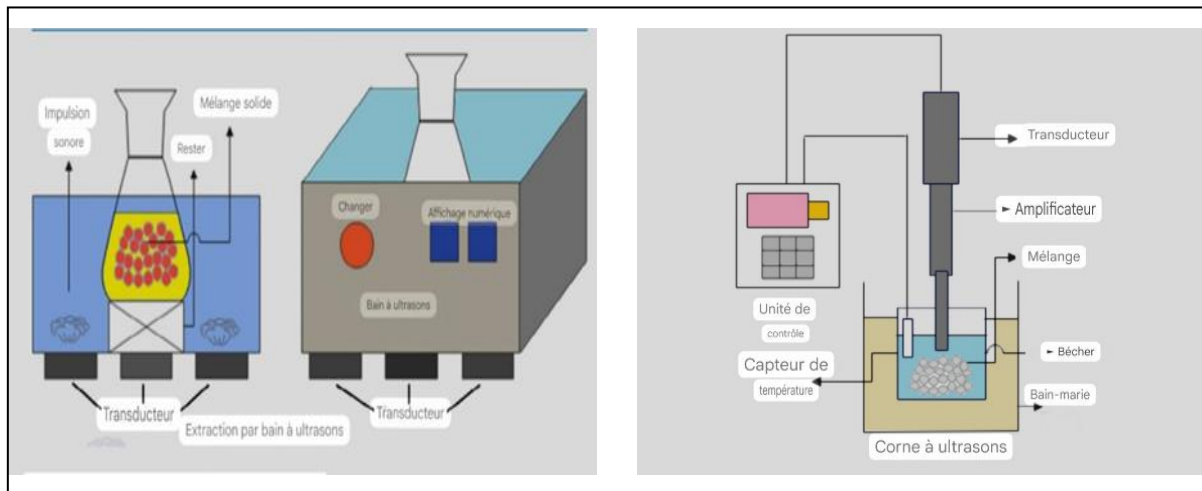


Figure 19:extraction par ultrasons (Yogeshet *al.* ,2024)

Les avantages de l'extraction par ultrasons comprennent l'augmentation du rendement de l'extraction et impliquent également une cinétique plus rapide et réduction de la température de fonctionnement permettant l'extraction de composés. La technique d'extraction par ultrasons est également efficace pour la récupération et la purification des ingrédients actifs .

L'un des inconvénients de cette procédure est l'effet détergent occasionnel mais connu de l'énergie ultrasonore (plus de 20KHz). (Gupta *et al.* ,2019)

III.2.7. Technique de Soxhlet

A été inventé en 1879 par Franz von Soxhlet. Cet appareil a pour principale application en chimie la dissolution d'espèces faiblement solubles dans des matrices solides. Il permet un fonctionnement sans surveillance ni gestion tout en recyclant efficacement une petite quantité de solvant pour dissoudre une plus grande quantité de matière. La méthode Soxhlet est la méthode la plus courante pour l'isolement de composés bioactifs à partir de plantes et la principale référence pour évaluer les performances d'autres méthodes innovantes dans de nombreuses études. Les solvants doivent respecter des propriétés appropriées tel que le coefficient de distribution, la sélectivité (Banobailon et Santos ,2003).

Le schéma dessiné d'un appareil Soxhlet est représenté sur (figure20)est composé d'un corps en verre, dans lequel est placée une cartouche en papier-filtre épais (une matière pénétrable pour le solvant), d'un tube siphon et d'un tube de distillation. Dans le montage, l'extracteur est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction. Le ballon est chauffé afin de pouvoir faire bouillir son contenu(Fig 20).

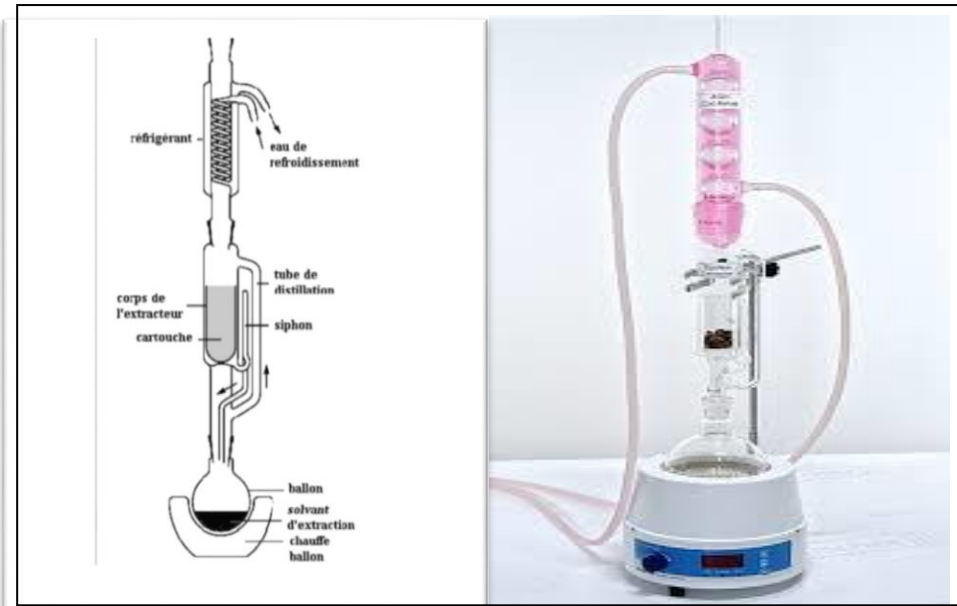


Figure20 : extraction par soxhlet(**Banobailon et Santos .,2003**).

La cartouche contenant le solide à extraire est insérée dans l'extracteur, au dessus duquel est placé un réfrigérant servant à liquéfier les vapeurs du solvant. jusqu'à épuisement complet du soluté dans la matière première, d'où sa grande efficacité. Comme les échantillons sont conservés à haute température pendant une période relativement longue, il y a un risque de destruction de la matière première. Et la destruction de certains composés thermolabiles, avec la consommation d'une grande quantité de solvant. Cette technique est limitée en termes de choix du solvant, avec la difficulté d'utiliser des mélanges de solvants (**Penchev,2010**). On constate que les solvants jouent un rôle très important dans de nombreuses méthodes d'extraction (**Banobailon et Santos., 2003**).

Il existe plusieurs avantages de l'utilisation de l'appareil Soxhlet ; Le déplacement de l'équilibre de transfert en mettant à plusieurs reprises le solvant frais en contact avec la matrice solide. Le maintien d'une température relativement élevée d'extraction avec la chaleur du ballon à distiller. Aucune ne nécessite de filtration après l'extraction. En outre, la méthode de Soxhlet est très simple et bon marché. Parmi ses inconvénients on a : Le temps d'extraction est long et une grande quantité de solvant est nécessaire. **Penchev,2010**. Il est impossible d'accélérer le processus par agitation. La grande quantité de solvant utilisée exige une étape d'évaporation-concentration, La possibilité de dégradation thermique des composés cibles ne peut être ignorée vu que l'extraction s'opère habituellement au point d'ébullition du solvant pendant un temps assez long. La grande quantité de solvant ainsi que la longue durée de l'opération (**Wolff ,1968**).

Partie expérimentale

Chapitre IV

Materiel et Méthodes

L'étude expérimentale a été réalisée au niveau de laboratoire de « **pharmacognosie et Api-phytothérapie** » Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem

IV.1. Matériel végétal

Notre étude a été portée sur les feuilles de la plante *Agrimonia eupatoria* L. de la famille des Rosacées. La plante a été cultivée, sans l'utilisation de pesticide ou d'énergie industriel, sur un terrain de l'université de PRESOV située dans la région de Presov en Slovaquie (**Fig 21**).



Figure 21: a) photo du conditionnement scellé d'aigremoine **B)** Les feuilles séchées d'aigremoine

IV.2. Méthodes d'extraction

IV.2.1. Extraction par macération

L'échantillon a fait objet d'une extraction par macération avec deux solvants (eau distillée et Ethanol 96°) afin d'obtenir deux extraits aqueux et hydro éthanolique.

IV.2.1.1. Extraction hydro éthanolique

Cette méthode consiste à macérer 5g de feuilles d'aigremoine dans 100 ml d'un mélange hydro éthanolique (Éthanol 96°/eau distillée) (70/30 : v/v) ; sous agitation orbitale continue pendant 24 heures à l'abri de la lumière et à température ambiante. Par la suite, les extraits obtenus ont subi une filtration en utilisant un papier filtre (wattman N°04). L'extrait éthanolique a été concentré par évaporation rotative à 40°, Ainsi le filtrat a été conservé dans l'obscurité à -16°C. (**Do et al.,2014**) (**Fig .23**).

IV.2.1.2. Extraction aqueuse

Cinq gramme de l'échantillon végétale étudié sont ajoutés à 100 ml d'eau distillée. Le mélange est agité pendant 24 heures à l'abri de la lumière à température ambiante.

Par la suite, l'extrait obtenu a subi une filtration en utilisant un papier filtre (wattman N°04). Ainsi le filtrat a été conservé dans l'obscurité à -16°C (Azwanida *et al.*, 2015) (Fig 22).

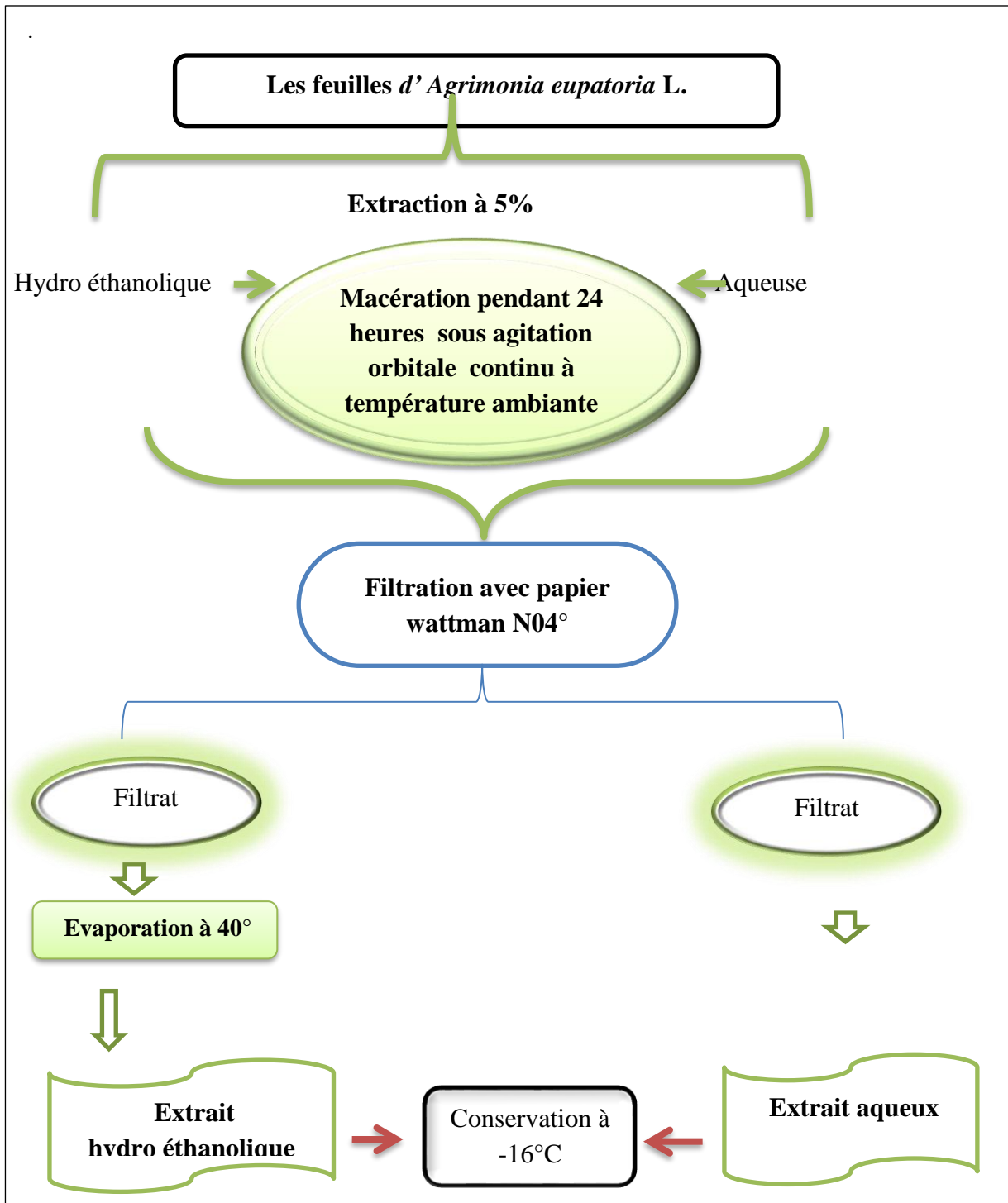


Figure 22: Schéma récapitulatif de l'extraction par macération

IV.2.2.Extraction par la technique de soxhlet

L'échantillon a subi une extraction à 5 % effectuée par un extracteur Soxhlet en utilisant trois solvants à polarité croissante : hexane (Hex), hydroéthanolique 70% (Eth) et eau (Aq). Avec 2 cycles pour chacun. Par la suite, les deux extraits hexane, et éthanolique ont été concentré par évaporation rotative à 40°C (Chaouche et al., 2015) (Fig23).

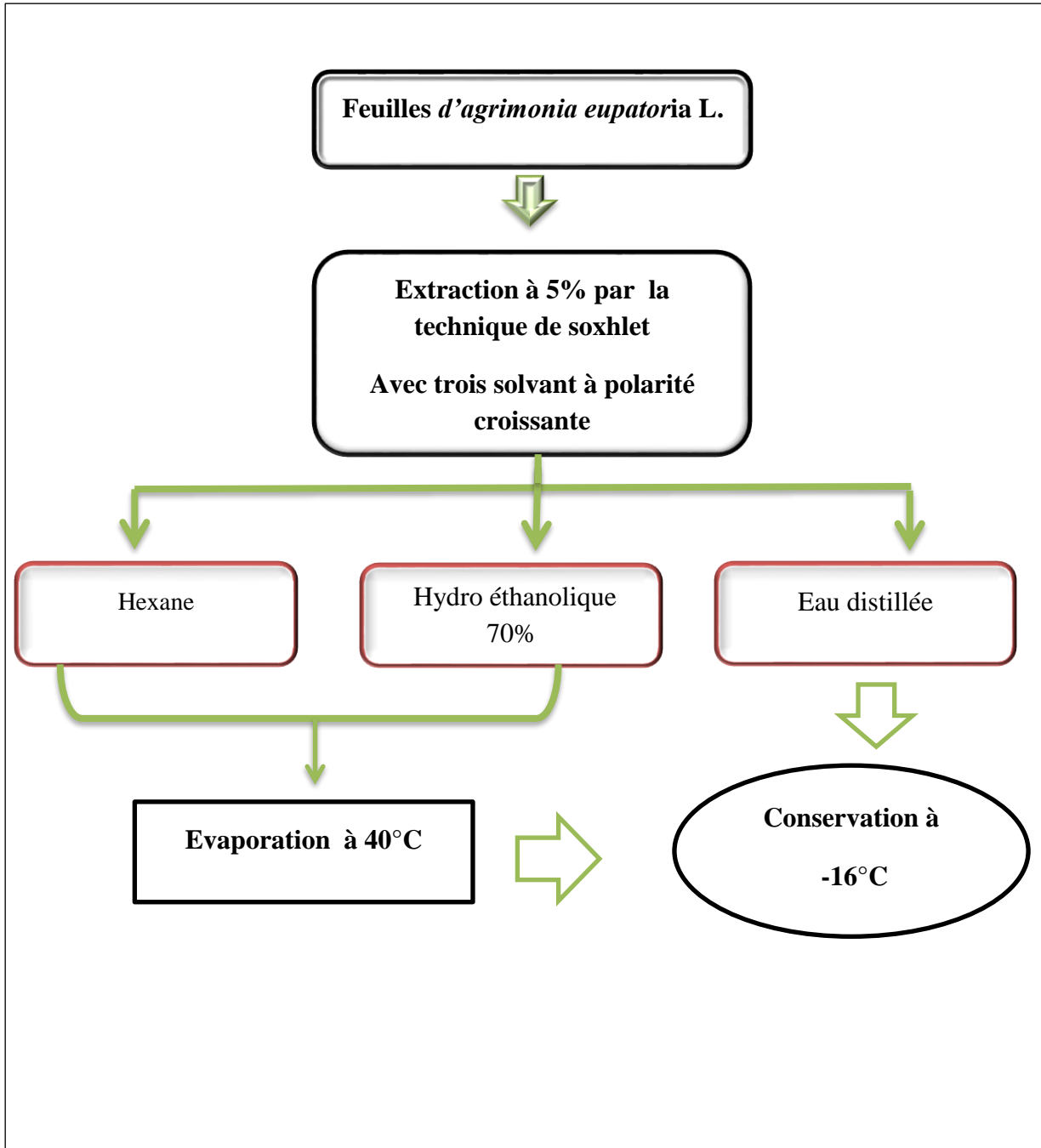


Figure 23: Schéma récapitulatif de l'extraction par soxhlet

Une partie des extraits obtenus a été lyophilisée grâce à un lyophilisateur pour être utilisée dans les analyses spectroscopique par **FTIR -ATR (Fig24)**.

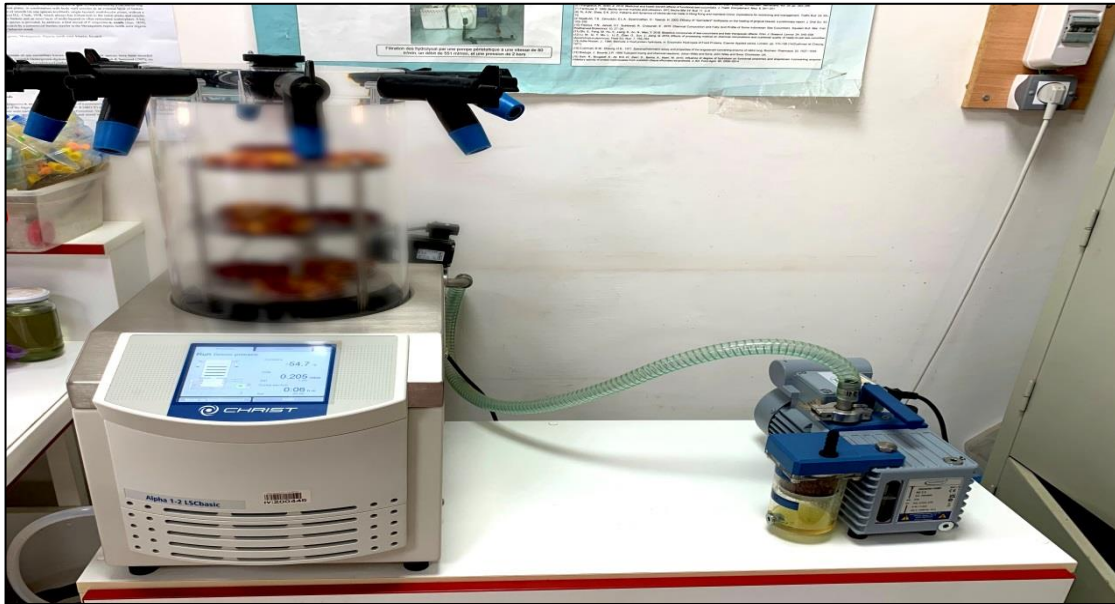


Figure 24 : Lyophilisateur (Alpha 1_2 Ls Cbasic).

IV.3. Analyses phytochimiques

IV.3.1. Analyses qualitatives (screening phytochimique)

IV.3.1.1. Polyphénols

Le teste de chlorure de fer permet la détection des composés phénoliques présents dans l'extrait étudié .Il consiste à mélanger 1 ml d'extrait avec 1 ml d'acide chlorhydrique (HCL) à 2%, puis ajouté quelque gouttes de(Fecl3) à 3%.Une coloration verdâtre indique la présence des polyphénols (**Nguessan et al., 2009**).

IV.3.1.2. Flavonoïdes

Un millilitre d'acétate de plomb à 10% est ajouté à 1 ml d'extrait. Un précipité jaune indique la présence des flavonoïdes (**Bhandary et al., 2012**).

IV.3.1.3. Flavonols

La détection des flavonols a été réalisée selon le test de Shenoda ,dans un tube à essai mélange 1 ml d'extrait avec 5 ml d'éthanol chlorhydrique (2 :1,v/v).Par la suite ajouter 2 à 3 copeaux de magnésium métallique (Mg) ainsi que quelques gouttes d'alcool isoamylique (C5H12O) 0.05% . L'apparition d'une coloration rouge indique la présence des flavones, rose les flavonols et violet les flavanones (**Paul, 2012**).

IV.3.1.4. Tanins

Deux méthodes ont été retenues

a) Mélanger 1 ml de chaque extrait, avec 1 ml de solution de FeCl₃ à (3%). L'apparition d'une coloration verdâtre indique la présence des tanins catéchiques. L'apparition d'une coloration bleue noir indique la présence des tanins gallique (**Diallo, 2005**).

b) Selon le teste de stiasny mélanger 10 ml d'extrait avec 5 ml de réactif de stiasny (10 ml de formol et 5 ml de HCL). suivi d'un chauffage au bain marié à 90°C pendant 15 minutes. La présence d'un précipité rouge indique la présence des tanins catéchiques. Suivie d'une neutralisation du surnageant avec l'hydroxyde de sodium (NaOH) et quelques gouttes de FeCl₃. L'apparition d'une coloration bleu noirâtre confirme la présence des tanins galliques (**Diallo, 2005**).

IV.3.2. Analyses quantitatives

IV.3.2.1. Détermination de la teneur en polyphénols

La teneur en polyphénols totaux des extraits a été réalisée selon la méthode décrite par **Slinkard et Singleton. (1977)**.

Principe

La méthode est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungsyique-phosphomolybdique de réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produit de réduction molybdène-tungstène de couleur bleue qui absorbe la lumière à 760nm dont l'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (**Georgé et al., 2005**).

Mode opératoire

Vingt microlitre de chaque extrait sont introduits dans les tubes à essai, et ajouté 680µl d'eau distillé. Ensuite, 400 µl de réactif Folin-Ciocalteu à 0,5 N (10%) et 400 µl de solution de carbonate de sodium (10%) ont été additionnés au mélange, le tout est agité par un vortex .

Le mélange obtenu est laissé incubée dans l'obscurité à température ambiante pendant 120 minutes. (**Slinkard et Singleton ,1977**).

L'absorbance est mesuré à 760 nm contre le blanc à l'aide d'un spectrophotomètre UV (uv Line 9400) .

Les teneurs en Polyphénols totaux des extraits sont exprimées en milligramme équivalent acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg EAG/g MS).

IV.3.2.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes

Le dosage est réalisé selon la méthode colorimétrique décrite par **Fukumoto et Mazza . (2000)**. 250µl de chaque extrait est mélangé avec 2.15ml de solvant d'extraction puis 100 µl de solution de nitrate d'aluminium à (10%) et 100 ul d'acétate d'ammonium sont ajoutés. Le mélange est agité et incubé 40 min à la température ambiante. L'absorbance est mesurée à 415nm contre un blanc + (pour la réaction), blanc-. (Pour l'extrait). Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent quercétine par cent gramme de la matière végétale sèche (mg EQ/100g MS).

IV.3.2.3. Détermination de la teneur en flavonols

La teneur en flavonols a été déterminée selon la méthode de **Jimoh et al. (2010)** avec quelques modifications mineures.

Mode opératoire

Mélange 1ml d'extrait avec 1mL de trichlorure d'aluminium hydraté ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) à (1 mg/ml) et 1,5 ml (50 g/L) d'acétate de sodium ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$). L'absorbance a été enregistrée à 440 nm après 15 minutes d'incubation à la température ambiante.

La teneur en flavonols a été exprimée en mg d'équivalents de quercétine (QE) par cent gramme d'extrait (mg QE/100g MS).

IV.3.2.4. Détermination de la teneur en tanins condensés

La teneur en tanins condensés a été déterminée par la méthode de vanilline décrite par **Julkunen-Titto . (1985)**.

Principe

Dans cette méthode les tanins condensés se dépolymérisent en présence d'acide concentré (HCL) , et se transforment en anthocyanidols de couleur rouge par réaction avec la vanilline

Mode opératoire

Une prise de 50 µL d'extrait est ajoutée à 750 ul de vanilline à 4% et 375 µl d'acide chlorhydrique concentré (HCL) est additionnés par la suite. Après une homogénéisation, le mélange est mis en incubation à température ambiante pendant 20min. L'absorbance est mesurée contre un blanc à 550 nm.

Le teneur en tanins condensés, déterminées en se référant à une gamme étalon de catéchine sont exprimées en milligramme équivalent catéchine par gramme de la matière sèche (mg EC/ g MS).

1V.3.2.5. Détermination de la teneur en tanins hydrolysables

La teneur en tanin hydrolysable des extraits étudiés a été déterminée selon la méthode de **Bossu et al. (2006)**.

Principe

La réaction entre l'iodate de potassium (KIO_3) et les tanins hydrolysable est un processus d'oxydoréduction. KIO_3 agit comme un oxydant et réagit avec les groupes phénoliques des tanins hydrolysables, la réduction le KIO_3 en I_2 (iode moléculaire), forme un complexe coloré rose visible (**Makkar ., 2003**).

Mode opératoire

Un volume de 1 ml des extraites est ajouté à 5ml d'une solution aqueuse de KIO_3 (2,5%). L'absorbance a été mesurée à 550 nm après une incubation de 4 mn à température ambiante. La concentration des tannins hydrolysables est exprimée en milligramme d'équivalent d'acide Tannique par gramme de matière végétale sèche à partir de la courbe d'étalonnage.

IV.4. Analyse spectroscopie à infrarouge (FTIR -ATR)

IV.4.1.Principe

La spectroscopie FTIR-ATR (Spectroscopie Infrarouge transformé de fourier Réflexion Totale Atténuée) est une technique d'analyse permettant d'identifier les liaisons chimiques présentes dans un échantillon en mesurant l'absorption de la lumière infrarouge. Le faisceau infrarouge traverse un cristal ATR (en diamant) il subit des réflexions internes totales.

A chaque réflexion une onde localisée est produite, puis elle pénètre légèrement dans l'échantillon en contact avec le cristal. Cette onde interagit avec les vibrations moléculaires, entraînant une absorption spécifique à certaines longueurs d'onde. La spectroscopie infrarouge étudie l'absorbance du rayonnement électromagnétique par l'échantillon en mesurant ce qui a été transmis, pour produire un spectre caractéristique de la composition chimique de l'échantillon étudié (**Pavia et al ., 2015**).

La technique FTIR_ ATR présente plusieurs avantages, notamment l'absence de préparation d'échantillon et la possibilité d'analyser directement des solides, des liquides ou des pâtes de manière rapide et non destructive (**Smith et al ., 1998**) (**Fig. 25**)



Figure 25: Spectroscopie infrarouge (FTIR-ATR) Jasco PS-4000.

IV.4.2. Protocole opératoire de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Une fine couche d'échantillon (environ 0,05 mg d'extraits lyophilisés) est déposée sur une surface adaptée, telle qu'une fenêtre en cristal de sel ou en bromure de potassium (KBr), en veillant à un positionnement adéquat. Les paramètres d'acquisition sont ensuite définis (résolution spectrale, plage de longueurs d'onde, nombre de scans, etc.) avant de lancer la mesure. Les spectres d'absorption dans l'infrarouge sont alors enregistrés.

Cette opération est répétée pour chacun des cinq extraits (Aq-Mac, Eth- Mac, Eth Sox , Aq Sox, Hex sox). Après chaque analyse, le cristal ATR est soigneusement nettoyé à l'éthanol, puis essuyé à l'aide d'une lingette non abrasive afin d'éviter toute contamination croisée.

Les données recueillies sont ensuite converties en spectres FTIR ATR par transformation de Fourier. Ces spectres sont analysés pour identifier les bandes d'absorption caractéristiques des vibrations moléculaires des composés présents dans les extraits (**Tan et al ., 2018**).

Par la suite , les spectres obtenus sont comparés à des bases de données spectrales ou à des références connues afin d' identifier les constituants chimiques Présents dans l'échantillon étudié (*Agrimonia eupatoria* L).

Enfin, les données FTIR-ATR sont interprétées à partir des informations connues sur la composition chimique d'Aigremoine. L'étape finale consiste à identifier les groupes fonctionnels caractéristiques.

IV.5. Analyses statistiques

Les résultats obtenus ont été exprimés en moyenne \pm standard de déviation (SD). Les analyses statistiques ont été effectuées par le logiciel SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Les données ont été analysées par comparaison des variances (ANOVA à un facteur). Les $P \leq 0,05$ ont été considérés comme statistiquement significatifs.

Chapitre V

Résultats et discussions

.

V.1. Analyses phytochimiques qualitatives (screening phytochimique)

Afin de mettre en évidence la présence ou l'absence de certains métabolites secondaires, nous avons réalisé des tests physico-chimiques qualitatifs spécifiques fondés sur des réactions de coloration et de précipitation dans les extraits éthanolique et aqueux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) et ceux obtenus par la technique de Soxhlet (Eth-Sox, Aq-Sox respectivement) de la plante *A. eupatoria*.

Les résultats indiqués sur la figure et le tableau ci-dessous (Fig26, Tab05) ont montrés globalement la très forte à forte présence des polyphénols totaux, les flavonoïdes totaux, ainsi que les flavonols dans tous les extraits d'*Agrimonia eupatoria*L. (Eth-Mac, Aq-Mac, Eth-Sox, Aq-Sox).

Concernant les tanins, les deux tests effectués (FeCl_3 et le réactif de Stiasny) ont révélé la très forte présence (+++) des tanins catéchiques qui s'était traduite par une coloration verdâtre avec le FeCl_3 (3%) et un précipité rouge avec les réactif de Stiasny. Quant aux tanins hydrolysables, ils s'étaient manifestés par une forte présence (++) avec le chlorure de fer pour tous les extraits analysés. Alors que la neutralisation par le NaOH du surnageant résultant de la réaction précédente a engendré un résultat positif qu'avec l'extrait éthanolique par macération (Eth-Mac) d'*A eupatoria*.

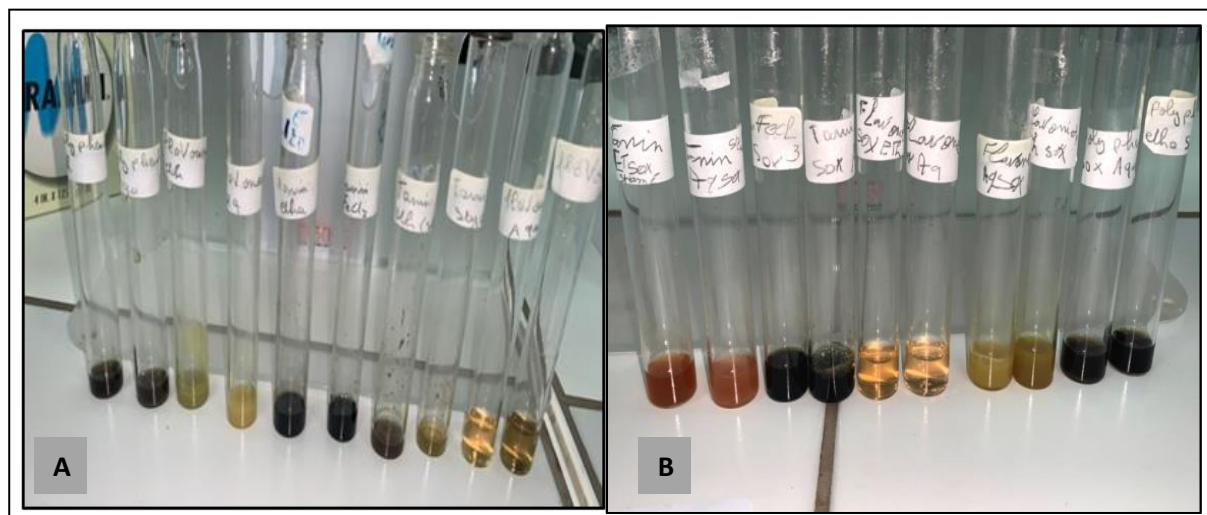


Figure26 : Analyses phytochimiques qualitatives pour les extraits (A) Ethanolique etAqueux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) et (B) ceux obtenus par la technique de Soxhlet (Eth-Sox,Aq -Sox respectivement)de la plante*A. eupatoria*.

Tableau 05: Résultats des tests d'analyses phytochimiques qualitatives pour les extraits éthanolique et aqueux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) et ceux obtenus par la technique de Soxhlet (Eth-Sox, Aq-Sox respectivement) de la plante *A. eupatoria*.

Les extraits	Polyphénols totaux	Flavonoïdes totaux	Flavonols	Tanins (fecl3) catéchiqes	Tanins (fecl3) hydrolysables	Tanins (Stiasny) Catéchiqes	Tanins (stiasny) Hydrolysables
Eth-Mac	+++	+++	+++	+++	++	+++	++
Aq-Mac	+++	+++	+++	+++	++	+++	-
EthSox	+++	+++	+++	+++	++	+++	-
Aq-Sox	+++	++	++	+++	++	+++	-
observation	Couleur Verdâtre	Précipité jaune	Couleur rose	Verdâtre	noirâtre	précipité rouge	Surnageant Bleu-noirâtre

(+++): Très forte présence, (++) : Forte présence, (-) : Absence

V.2. Analyses phytochimiques quantitatives

II.2.1. Détermination de la teneur en phénols totaux

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique obtenue est illustrée sur la figure 27.

L'équation linéaire de régression utilisée est $y = 1,6151x - 0,0103$, avec un coefficient de détermination de $R^2 = 0,995$.

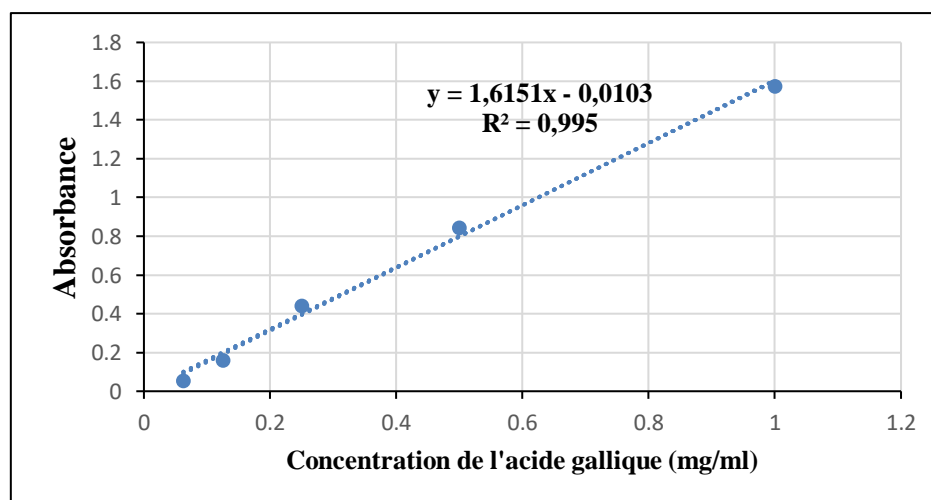


Figure 27: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

La teneur en phénols totaux de l'extrait Eth-Sox a révélé une forte concentration de l'ordre de 105,78±8,464 mgEAG/gMS, suivi par l'extrait Eth-Mac qui a enregistré une teneur de 96,377±1,66mgEAG/gMS, puis l'extrait Aq-Mac avec une teneur de 39,787±0,892mgEAG/gMS. En avant dernier, l'extrait Aq-Soxa indiqué une valeur de 17,906±3,7mgEAG/gMS, et en dernier l'extrait Hex-Soxa affiché la plus faible concentration de l'ordre de 1,716±0,297mg EAG/g MS (**Tab 06**).

Tableau 06: Teneurs en phénols totaux dans les extraits d'hexane, éthanolique et aqueux obtenus par la technique de Soxhlet (Hex-Sox, Eth-Sox, Aq -Sox respectivement) et ceux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) de la plante *A.eupatoria*.

Extraits	Hex-Sox	Eth-Sox	Aq-Sox	Aq-Mac	Eth-Mac
Teneur en phénols totaux					
MgEAG/gMS	1,716±0,297	105,78±8,464	17,906±3,71	39,787±0,892	96,377±1,66

Les valeurs ont été représentées par les moyennes ± SD (n=3).

L'étude statistique a permis de regrouper les extraits éthanoliques d *A.eupatoria* obtenus par macération et par la technique de Soxhlet (Eth-Mac et Eth-Sox respectivement) dans le même sous-ensemble homogène avec les concentrations les plus élevées comparativement aux autres extraits analysés (**Fig28**).

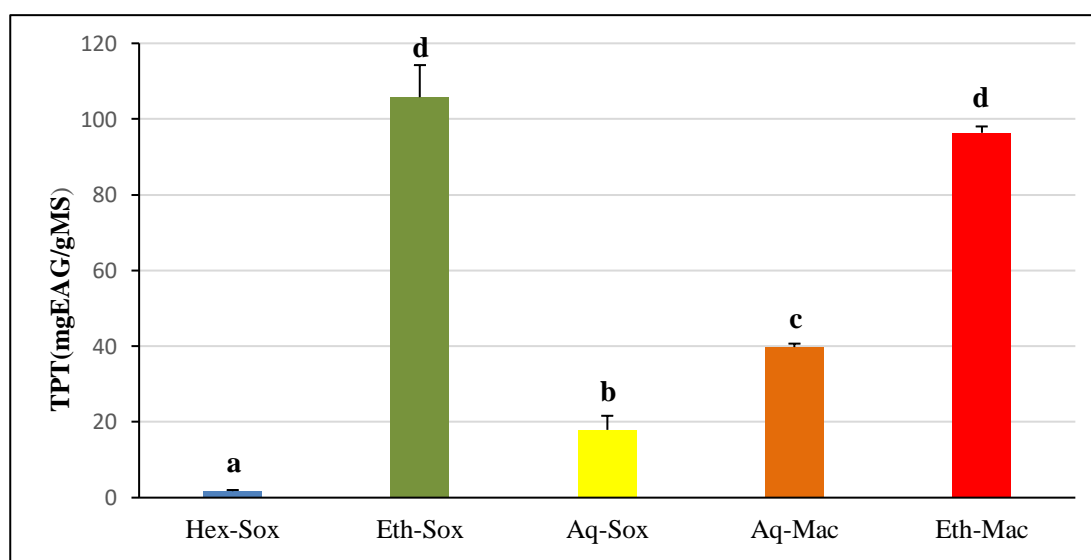


Figure 28: Teneurs en phénols totaux dans les extraits d'hexane, éthanolique et aqueux obtenus par la technique de Soxhlet (Hex-Sox, Eth-Sox, Aq -Sox respectivement) et ceux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) de la plante *A.eupatoria*. Les $P \leq 0,05$ ont été considérés comme statistiquement significatifs

V.2.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux est exprimée en milligramme équivalent de la quercétine par 100 gramme de matière végétale sèche (mgEQU/100gMS). L'équation de la courbe de régression linéaire obtenue est comme suit : $y = 24,246x$, avec un coefficient de détermination $R^2 = 0,9898$ (Fig29).

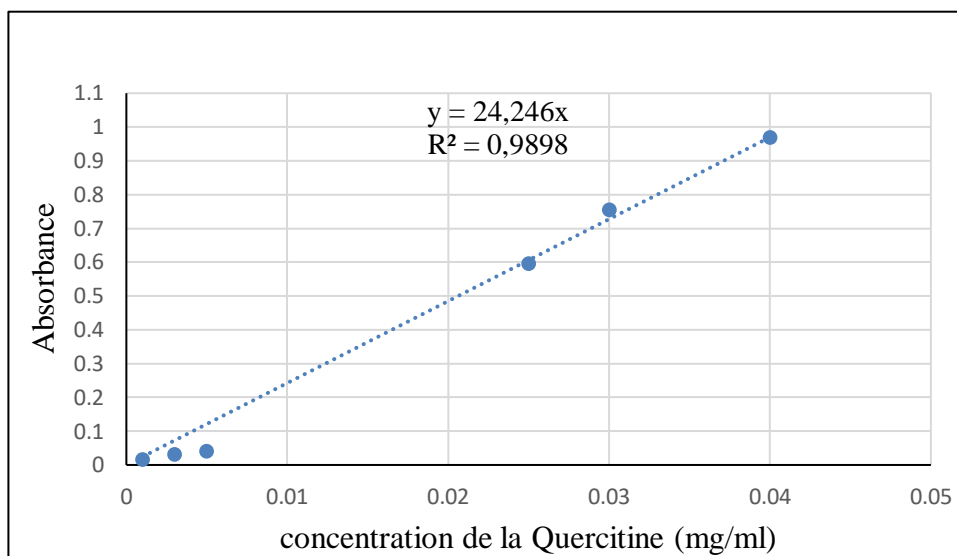


Figure 29: Courbe d'étalonnage de la Quercétine

Le macérât éthanolique d'*A.eupatoria* a enregistré une teneur en flavonoïdes de l'ordre de $230,41 \pm 49,885$ mgEQU/100gMS, considérée comme la valeur la plus élevée de tous les extraits étudiés. Suivi par des concentrations comprises entre 74,73 et 83,47mgEQU/100gMS correspondantes aux extraits aqueux obtenus par macération et technique de Soxhlet (Aq-Mac et Aq-Sox) ainsi que l'extrait éthanolique par Soxhlet (Eth-Sox). La teneur la moins élevée en flavonoïdes a été enregistré dans l'extrait Hex-Sox de l'ordre de $11,35 \pm 0,312$ mgEQU/100gMS (Tab07).

Tableau07 : Teneurs en flavonoïdes totaux dans les extraits d'hexane, éthanolique et aqueux obtenus par la technique de Soxhlet (Hex-Sox, Eth-Sox, Aq -Sox respectivement) et ceux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) de la plante *A.eupatoria*.

Extraits	Hex-Sox	Eth-Sox	Aq-Sox	Aq-Mac	Eth-Mac
Teneur en flavonoïdes totaux mgEQU/100gMS	$11,35 \pm 0,312$	$83,47 \pm 6,075$	$74,73 \pm 0,501$	$83,39 \pm 0,297$	$230,41 \pm 49,885$

Les valeurs ont été représentées par les moyennes \pm SD (n=3).

Les résultats obtenus de la détermination des teneurs en flavonoïdes ont montré une concentration significativement élevée dans le macérât éthanolique d'*A.eupatoria* (Eth-Mac) comparativement aux autres extraits étudiés. Alors que les extraits Eth-Sox, Aq-Sox et Aq-Mac ont affiché des teneurs en flavonoïdes très rapprochées, ce qui les a regroupé dans le même sous ensemble homogène(Fig30).

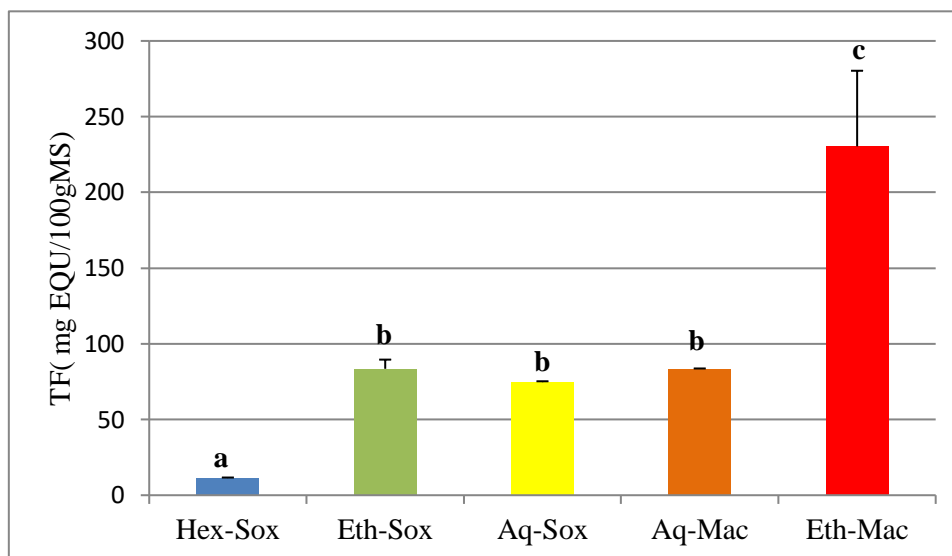


Figure30 : Teneurs en flavonoïdes totaux dans les extraits d’hexane, éthanolique et aqueux obtenus par la technique de Soxhlet (Hex-Sox, Eth-Sox, Aq -Sox respectivement) et ceux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) de la plante *A.eupatoria*. Les $P \leq 0,05$ ont été considérés comme statistiquement significatifs

V.2.3. Détermination de la teneur en flavonols

La teneur en flavonols est exprimée en milligramme équivalent de la quercétine par 100 gramme de matière végétale sèche (mg EQU/100gMS). L’équation de la courbe de régression linéaire est comme suit : $y = 27,14x - 0,0691$, avec $R^2 = 0,9911$ (Fig31).

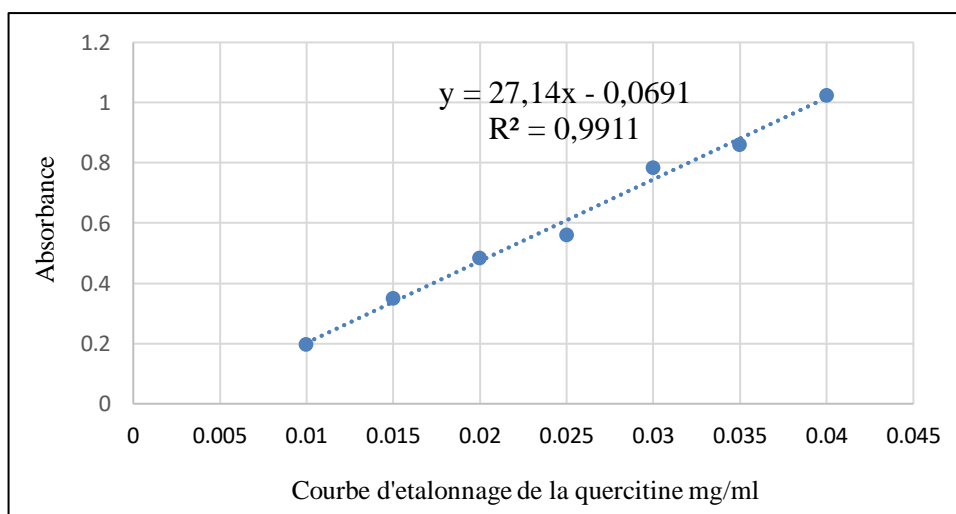


Figure 31: Courbe d’étalonnage de la Quercétine

Un teneur maximale en flavonols a été enregistrée dans les extraits éthanoliques obtenus par macération et par la technique de Soxhlet d'*A.eupatoria* (Eth-Mac et Eth-Sox respectivement), de l'ordre de 1,5mgEQU/100g MS. Alors que l'extraits aqueux (Aq-Sox) a indiqué une valeur moyenne de 0.392 mgEQU/100g MS. Quant aux concentrations minimales, elles ont été affichée dans les extraits Hex-Sox et Aq-Mac (0,032 et 0,022mgEQU/100g MS respectivement) (**Tab08**).

Tableau 08 : Teneurs en flavonols dans les extraits d'hexane, éthanolique et aqueux obtenus par la technique de Soxhlet (Hex-Sox, Eth-Sox, Aq -Sox respectivement) et ceux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) de la plante *A.eupatoria*.

Extraits	Hex-Sox	Eth-Sox	Aq-Sox	Aq-Mac	Eth-Mac
Teneur en flavonols mgEQU/100g MS	0,032±0,0018	1,501±0,0501	0,392±0,003	0,022±0,0003	1,5±0,0424

Les valeurs ont été représentées par les moyennes ± SD (n=3).

Trois sous ensemble homogènes ont été détectés, correspondants aux teneurs maximales des flavonols dans les extraits Eth-Mac et Eth-Sox d'*A.eupatoria*, une valeur intermédiaire de ce composé dans l'extraits Aq-Sox, et des concentrations minimales dans les extraits Aq-Mac et Hex-Sox (Tab08).

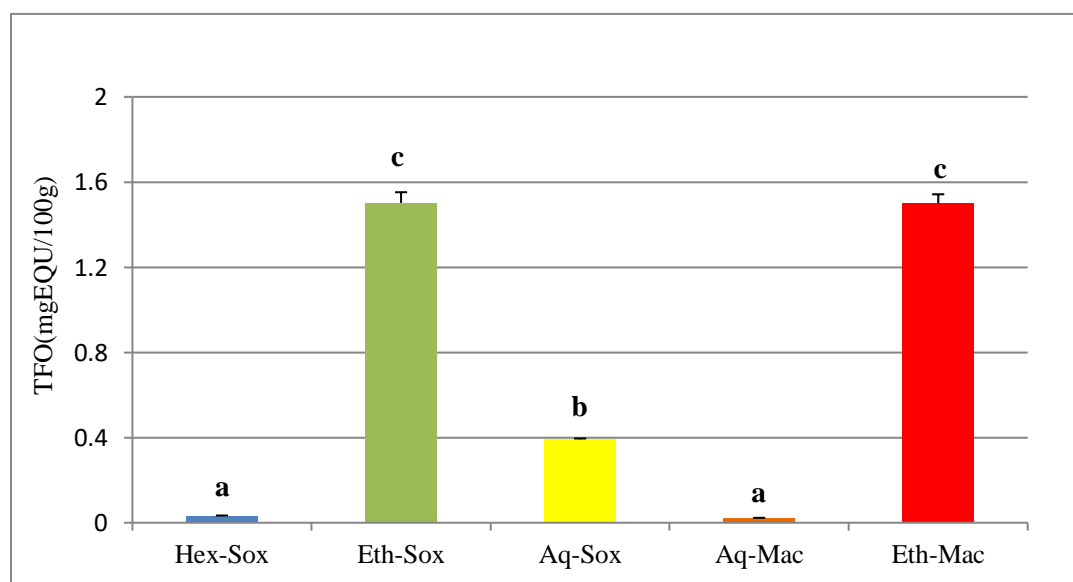


Figure 32 Teneurs en flavonols dans les extraits d'hexane, éthanolique et aqueux obtenus par la technique de Soxhlet (Hex-Sox, Eth-Sox, Aq -Sox respectivement) et ceux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) de la plante *A.eupatoria*. Les $P \leq 0,05$ ont été considérés comme statistiquement significatifs

V.2.4. Détermination de la teneur en tanins condensés

La teneur en tanins condensés est exprimée en milligrammes équivalents catéchine par gramme de la matière sèche (mg EC/gMS). L'équation de la courbe de régression linéaire a été estimée à : $y = 2,5039x$, avec un coefficient de détermination de $R^2 = 0,9908$ (Fig33).

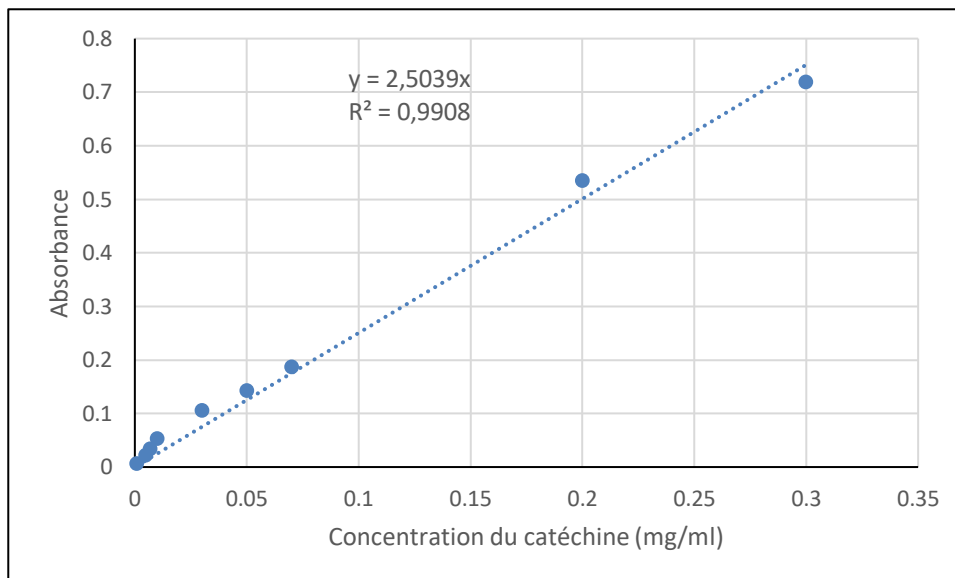


Figure 33: Courbe d'étalonnage de la catéchine

Les teneurs en tanins condensés ont enregistré des valeurs croissantes de 0,62, 2,27, 2,38, 4,79, 8,33mgEC/gMS dans les extraits étudiés d'*A.eupatoria* dans l'ordre suivant : Hex-Sox, Aq-Sox, Aq-Mac, Eth-Sox, Eth-Mac (**Tab 09**).

Tableau09 : Teneurs en tanins condensés dans les extraits d'hexane, éthanolique et aqueux obtenus par la technique de Soxhlet (Hex-Sox, Eth-Sox, Aq-Sox respectivement) et ceux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) de la plante *A.eupatoria*.

Extraits	Hex-Sox	Eth-Sox	Aq-Sox	Aq-Mac	Eth-Mac
Teneur en Tanins condensés mgEQU/gMS	0,62±0,058	4,79±0,225	2,27±0,068	2,38±0,051	8,33±0,383

Les valeurs ont été représentées par les moyennes ± SD (n=3).

Le macérât éthanolique d'*A.eupatoria* (Eth-Mac) a indiqué une concentration des tanins condensés significativement élevée comparativement aux extraits étudiés. Suivie par les teneurs en tanins catéchiques dans l'extrait éthanolique par soxhlet (Eth-Sox). Des valeurs presque identiques ont été enregistrées dans les extraits aqueux obtenus par macération et

techniques de Soxhlet (Aq-Mac et Aq-Sox respectivement), ce qui a permis de les regrouper dans le même sous ensemble homogène. Quant à l'extrait Hex-Sox, il a affiché la concentration la plus faible (Fig34.).

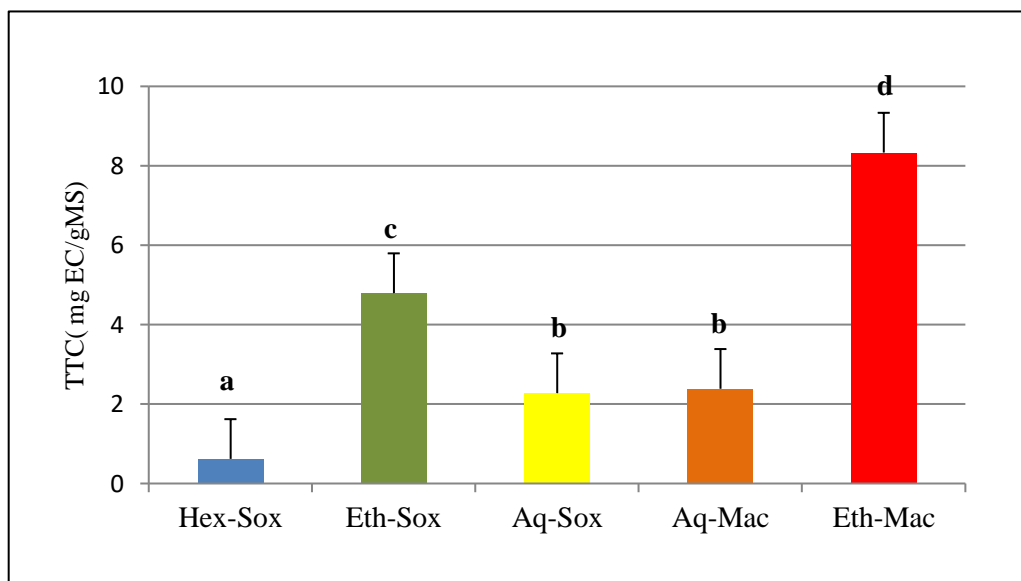


Figure 34: Teneurs tanins condensés dans les extraits d'hexane, éthanolique et aqueux obtenus par la technique de Soxhlet (Hex-Sox, Eth-Sox, Aq -Sox respectivement) et ceux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) de la plante *A. eupatoria*. Les $P \leq 0,05$ ont été considérés comme statistiquement significatifs

V.2.5. Détermination de la teneur en tanins hydrolysables

La teneur en tanins hydrolysable a été exprimée en milligrammes équivalents d'acide tannique par gramme de matière sèche (mgEAT /gMS). L'équation obtenue de la courbe de régression linéaire est comme suite : $y = 0,1673x + 0,0384$, avec un coefficient de détermination $R^2 = 0,9978$ (Fig35).

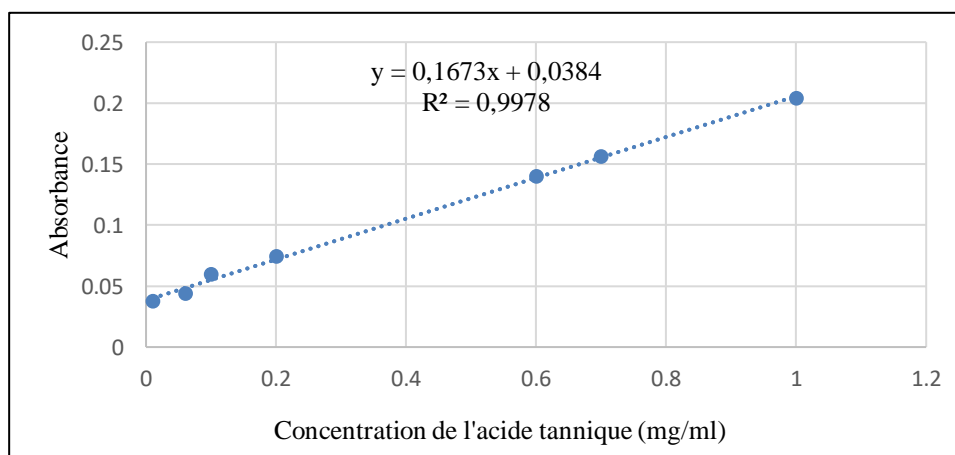


Figure35 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique

Les teneurs en tanins condensés ont enregistré des valeurs croissantes de 1,18, 10,37, 11,62, 11,63, 20,22mgEC/gMS dans les extraits étudiés d'*A.eupatoria* dans l'ordre suivant : Hex-Sox, Aq-Sox, Aq-Mac, Eth-Sox, Eth-Mac. Notons que le macérât éthanologique a affichée la teneur maximale (**Tab10**).

Tableau10 : Teneurs en tanins hydrolysables dans les extraits d'hexane, éthanologique et aqueux obtenus par la technique de Soxhlet (Hex-Sox, Eth-Sox,Aq-Sox respectivement) et ceux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) de la plante *A.eupatoria*.

Extraits	Hex-Sox	Eth-Sox	Aq-Sox	Aq-Mac	Eth-Mac
Teneur en Tanins hydrolysables mgEAT/gMS	1,18±0,045	11,63±0,88	10,37±0,072	11,62±0,043	20,22±2,151

Les valeurs ont été représentées par les moyennes ± SD (n=3).

Les teneurs en tanins hydrolysables obtenus à partir de extraits analysés ont été réparties ont trois sous-ensembles homogènes. En effet le macérât éthanologique (Eth-Mac) a affichée une concentration significativement élevée en comparaison aux autres extraits étudiés. Alors que les teneurs en tanins galliques dans les extraits :Eth-Sox, Aq-Sox, Aq-Mac ont été classé dans le même sous-ensemble indiquant des valeurs intermédiaires. La teneur la plus faible a été enregistrée dans l'extrait Hex-Sox (**Fig36**).

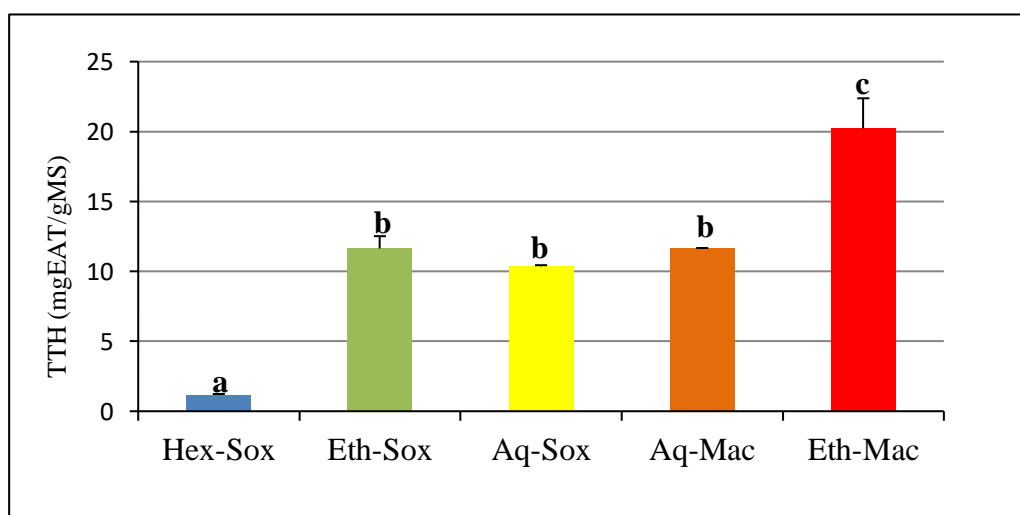


Figure36 : Teneurs tanins hydrolysables dans les extraits d'hexane, éthanologique et aqueux obtenus par la technique de Soxhlet (Hex-Sox, Eth-Sox,Aq -Sox respectivement) et ceux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) de la plante *A.eupatoria*. Les $P \leq 0,05$ ont été considérés comme statistiquement significatifs

V.2. 6 Récapitulatif des analyses phytochimiques quantitatives

Le tableau suivant (Tab11) récapitule les analyses phytochimiques quantitatives des extraits étudiés en comparant le ratio entre les composés phénoliques. Les données enregistrées ont permis d'attribuer les teneurs maximales des substances analysées (polyphénols, flavonoïdes, flavonols, tanins condensés et hydrolysables) à l'extrait éthanolique obtenu par macération (Eth-Mac). Paradoxalement, les proportions TF/TP, TC/TP et TH/TP ont indiquées des valeurs élevées dans l'extrait hexane obtenu par technique de Soxhlet (Hex-Sox).

Tableau 11 : Résultats des analyses phytochimiques quantitatives dans les extraits d'hexane, éthanolique et aqueux obtenus par la technique de Soxhlet (Hex-Sox, Eth-Sox, Aq-Sox respectivement) et ceux obtenus par macération (Eth-Mac, Aq-Mac respectivement) de la plante *A.eupatoria*.

Extraits	TP (mgEAG/gMS)	TF (mgEQ/gMS)	TF/TP	TFO (mgEQ/gMS)	TFO/TF	TC (mgEC/gMS)	TC/TP	TH (mgEAT/gMS)	TH/TP
Hex-Sox	1,7167	0,1136	0,0661	0,0003	0,0028	0,6204	0,3614	1,1867	0,6913
Eth-Sox	105,7891	0,8348	0,0079	0,0150	0,0180	4,7952	0,0453	11,6390	0,1100
Aq-Sox	17,9060	0,7473	0,0417	0,0039	0,0053	2,2764	0,1271	10,3718	0,5792
Aq-Mac	39,7870	0,8340	0,0210	0,0002	0,0003	2,3856	0,0600	11,6270	0,2922
Eth-Mac	96,3779	2,3042	0,0239	0,0150	0,0065	8,3337	0,0865	20,2271	0,2099

V.3. Analyse par spectroscopie infra rouge (FTIR -ATR)

V.3.1. Analyse de l'extrait aqueux par macération

L'analyse spectroscopique FTIR-ATR de l'extrait aqueux par macération nous a permis d'identifier divers groupements fonctionnels présents dans les extraits étudiés, parmi eux on trouve notamment des alcoolés, hydrazines, hydrozones, azines, composé sulfurés et ainsi que les acides carboniques.

Une bande large observée entre $3200-3700\text{ cm}^{-1}$, elle représente la fonction OH typiques des alcools, on distingue des alcoolés simple et tertiaires qui correspondent aux structures HO-R-OH et (R) 3C-OH respectivement, ainsi que la présence des alcoolés contenant un groupe phényle **Ph-OH** et **Ph-CHR-OH**.

D'autre part, l'hydrazine (NH-NH_2) et hydrozones (**CH=N-NH₂**) sont identifiées par leur groupes azotés également détectable via des bandes autour de $3100-3400\text{ cm}^{-1}$. (Liaison N-H), et $1600-1700\text{ cm}^{-1}$. (Liaison C-N) respectivement.

En effet, les composés sulfurés, contenant des groupements thioamides, sont identifiés par des vibrations C=S localisées entre 1000 et 1200 cm^{-1} .

Par ailleurs, vers 1700 cm^{-1} , une bande intense a été remarquée qui réfère a la présence d'une fonction carbonyle C=O, d'acides carboxyliques (R-COO).

Enfin, des azines (RCH=N-N=CHR) qui possèdent des doubles liaisons azotées (C=N-N=C), montrent également des bandes signalées autour de 1597.33 cm^{-1} . (**Fig 38, Tab 12 Tab 13**)

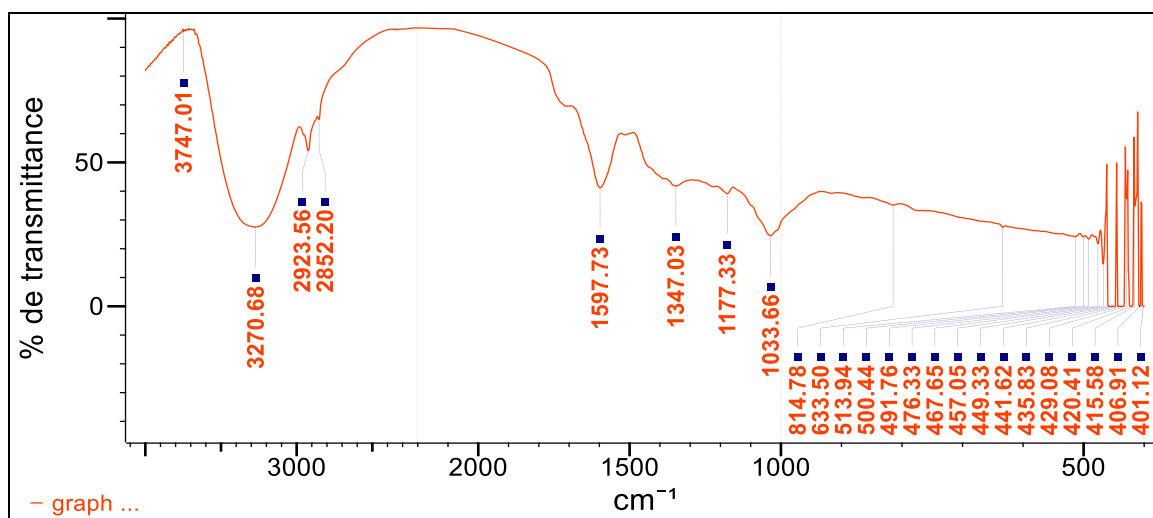
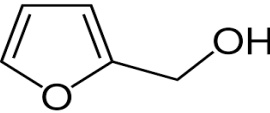
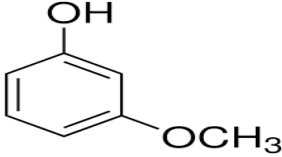
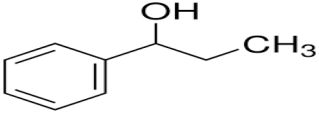


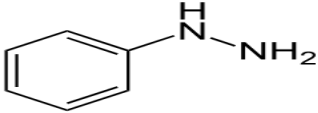
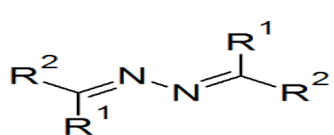
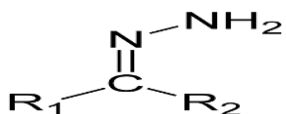
Figure 38: spectre FTIR -ATR d'extrait aqueux par macération

Tableau 12: Groupements fonctionnels de l'extrait aqueux par macération

Classification	Groupes
Alcools	Ph-OH
Alcools	HO-R-OH
Alcools	(R) 3C-OH
Alcools	Ph-CHR-OH
Hydrazines	NH-NH ₂
Composé soufrés	R-(C=S)-NH ₂
Composé soufrés	R-NH-(C=S)-NH ₂
Acide carbonique	RCOO
Azines	RCH=N-N=CHR
Hydrazones	CH=N-NH ₂

Tableau 13 : Structures chimiques trouvées dans l'extrait aqueux par macération

Nom	Structure chimique	Classification dans les métabolites secondaire
Alcool furfurylique		Composé furanique hétérocyclique oxygéné
m-Méthoxyphénole		Composé phénolique simple
Phényl-1-propanol		Alcool phénéthylique dérivé phénolique

Hydrazines		Alcaloïdes
Azines		
Hydrazones		

V.3.2. Analyse de l'extrait éthanolique par macération

L'analyse du spectre infrarouge de l'extrait éthanolique de macération met en évidence la présence de divers groupements fonctionnels dans l'échantillon tels que les azines, les amidines, les dérivés de cétones comme les naphtoquinones, les amides et les composés hydroxamiques .

Les bandes situées à 3600 cm^{-1} , 3346.85 cm^{-1} , et $2979,48\text{ cm}^{-1}$. Correspondent respectivement aux vibrations d'élongation **O-H** et **N-H** des groupes acides hydroxamiques, hydrazones, et les amides.

De plus, plusieurs groupes cétoniques (kitones) présentes dans l'extrait parmi les quels on trouve des cétones simples (**C-(C=O)-C**) , des cétones aromatiques telles que **C-(C=O)-Ph-βOH** à , et des naphtoquinones a une bande situé ainsi que les cétones substituées par des groupes amines, comme **R-(C=O)-C-C-NH₂** ou **C-(C=O)-Ph-βNH₂**.

Ces derniers montrent la coexistence de groupes carbonyles (C=O) qui marque des bandes signalées autour de 1635.34 cm^{-1} (Fig 39, Tab 14, Tab 15).

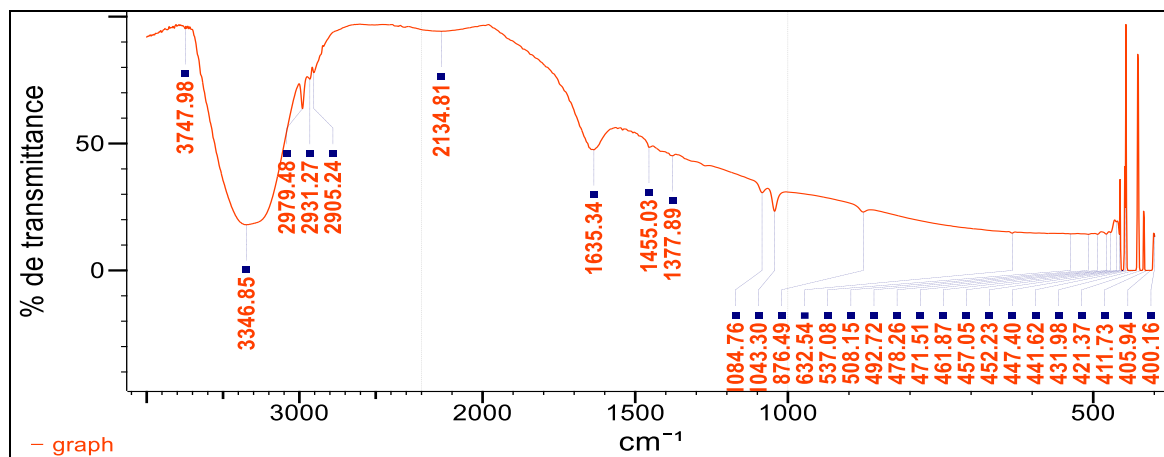
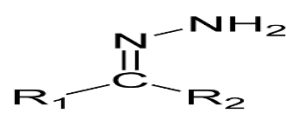
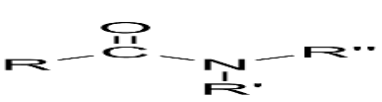
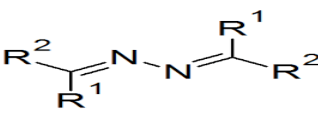
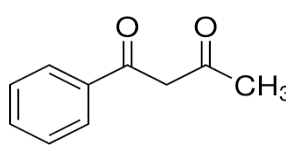
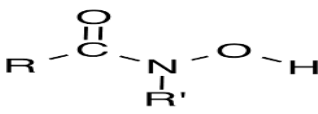
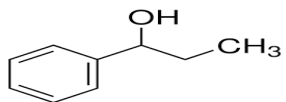


Figure 39 : Spectre FTIR -ATR d'extrait éthanolique par macération

Tableau 14: Groupements fonctionnels de l'extrait éthanolique par macération

Classification	Groupe
Azines	RCH=N-N=CHR
Hydrazones	CH=N-NH₂
Alcools	Ph-CHR-OH
Acide hydroxamique	(C=O)NH-OH
Amidines	N=CH-N
Ketones	C-(C=O)-C=C-OH
Ketones	C-(C=O)-Ph-βOH
Ketones	R-(C=O)-C=C-NH₂
Ketones	C-(C=O)-Ph-βNH₂
Ketones	Naphthoquinones
Amides	R-CO-NR₂

Tableau 15: Structures chimiques trouvées dans l'extrait éthanolique par macération

Nom	Structure Chimique	Classification dans les métabolites secondaire
Hydrazones		Alcaloïdes
Amide		
Azines		
1-Phényl-1,3- Butane dionée		Composé aromatique dérivés phénolique
Acide Hydroxamique		Composé azoté secondaire (Sidérophore)
Phényl-1-propanol		Alcool phénéthylique dérivé phénolique

V.3.3. Analyse de l'extrait aqueux par soxhlet

L'analyse du spectre FTIR de l'extrait aqueux obtenu par la technique soxhlet met en évidence la présence de plusieurs bandes, permettant l'identification de groupements fonctionnels présents dans l'extrait étudié. Les bandes entre 3232 cm^{-1} et 3258 cm^{-1} correspondent à des vibrations des liaisons N-H et O-H. Ces signaux révèlent la présence des alcools de type (HO-R-OH), des hydrazines (NH-NH₂), des hydrazones (CH=N-NH₂), et des acides hydroxamiques ((C=O)NH-OH).

La bande observée à $1596,77\text{ cm}^{-1}$ est attribuée aux vibrations de type C=N, ce qui indique la présence des azines (RCH=N-N=CHR). De plus une bande signalé à $1514,81\text{ cm}^{-1}$ permet la détection et des amidines (N=CH-N).

Enfin, le pic de transmittance à 1000 et 1200 cm^{-1} est compatible avec les vibrations C–N appartenant aux composés sulfurés ((C=S)–NH₂). (Fig 40, Tab 16, Tab 17)

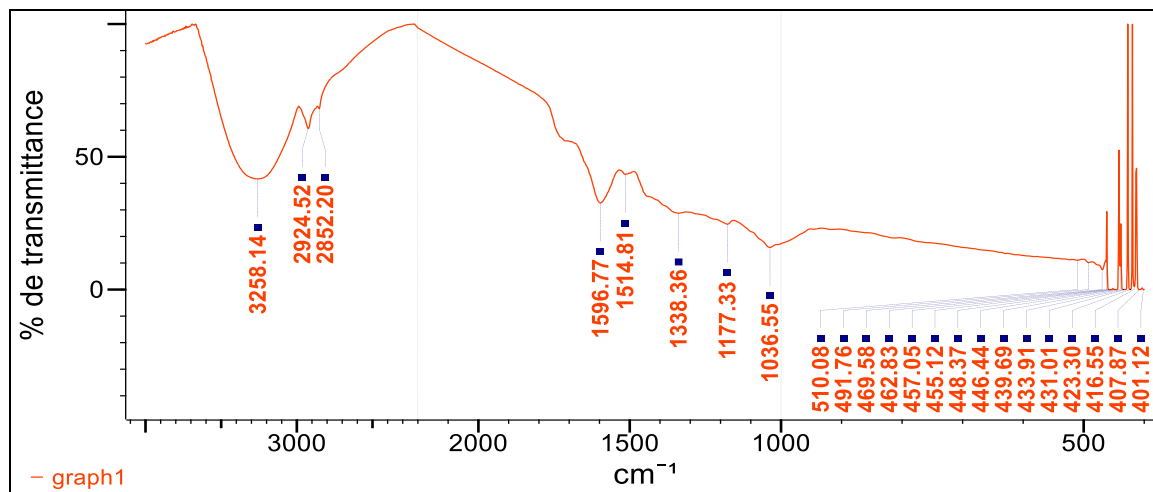
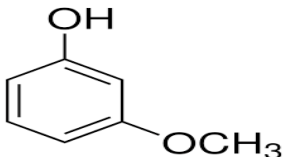
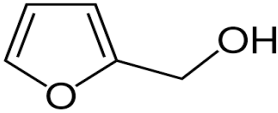
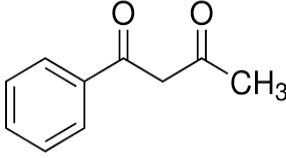
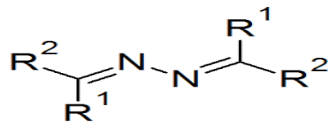


Figure 40 : spectre FTIR- ATR de l'extrait aqueux par soxhlet

Tableau 16 : Groupements fonctionnels de l'extrait aqueux par soxhlet

Classification	Groupes
Composé sulfure	-(C=S)-NH ₂
Composé sulfure	-NH-(C=S)-NH ₂
Alcools	HO-R-OH
Hydrazines	NH-NH ₂
Alcools	Ph-CHR-OH
Acide carbonique	RCOO
Azines	RCH=N-N=CHR
Hydrazones	CH=N-NH ₂
Acide hydroxamique	(C=O)NH-OH
Amadines	N=CH-N

Tableau 17 : Structures chimiques trouvées dans l'extrait aqueux par soxhlet

Composé	Structure chimique	Classification dans les métabolites secondaire
m-Méthoxyphénole		Composé phénolique simple
Alcool furfurylique		Composés furanique hétérocyclique oxygénés
1-Phényl-1,3- Butane dionée		Composé aromatique dérivés phénolique
Azines		Alcaloïdes

V.3.4. Analyse de l'extrait éthanolique par soxhlet

L'analyse du spectre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) de l'extrait éthanolique obtenu par Soxhlet contient une diversité de composés. Parmi eux les hydrazines, hydrazones, amidines, azines, composés soufrés et phosphorés

La bande large observée à $3305,39 \text{ cm}^{-1}$ correspond aux vibrations d'élongation des liaisons N-H ou O-H, indiquant la présence potentielle de groupes hydroxyles, hydrazines (NH-NH₂) ou encore acides hydroxamiques ((C=O)NHOH). Le signal intense à $2932,23 \text{ cm}^{-1}$ est typique des vibrations d'élongation des liaisons C-H.

Par ailleurs, un signal marqué à $1606,41 \text{ cm}^{-1}$ est attribué aux groupements C=O comme dans les acides hydroxamiques, ou aux double liaisons C=C. Présentes dans les azines, amidine,

ou hydrozones En effet, La bande à $1028,84\text{ cm}^{-1}$ peut être liée à des vibrations C–N ou P–O, possiblement présentes dans des composés phosphorés (CP, Cl) ou soufrés. (**Fig 41, Tab 18, Tab 19**).

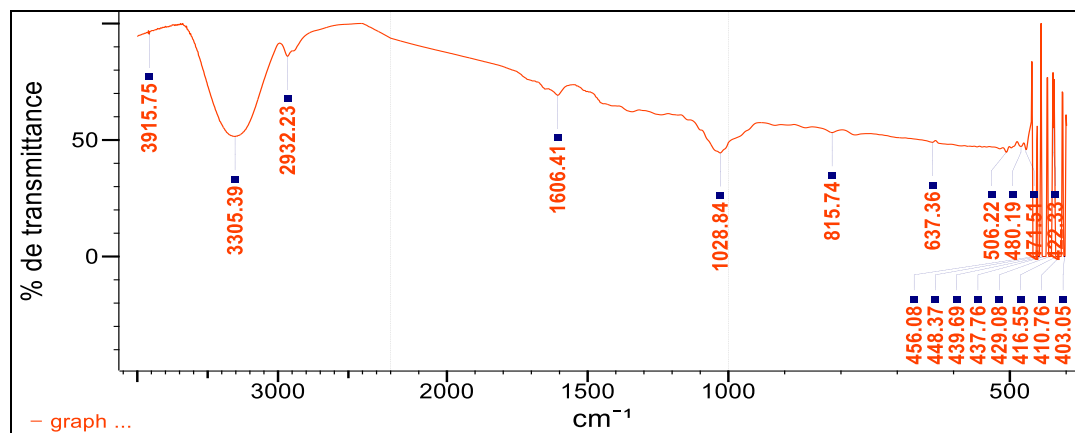
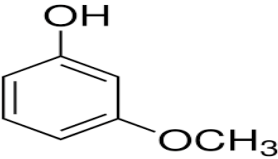
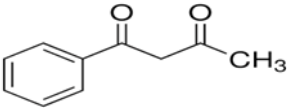
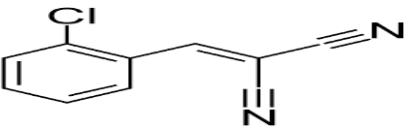
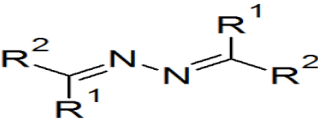
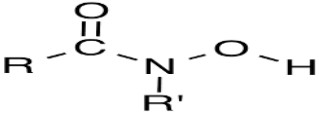


Figure 41: spectre FTIR -ATR d'extrait éthanolique par soxhlet

Tableau 18 : Groupements fonctionnels de l'extrait éthanolique par soxhlet

Classification	Groupes
Composé Soufré	R-(C=S)-NH ₂
Composé soufré	R-NH-(C=S)-NH ₂
Hydrazines	NH-NH ₂
Phosphorés	CP-Cl
Composés soufrés	S -S
Azines	RCH=N-N=CHR
Hydrazones	CH=N-NH ₂
Acide hydroxamique	(C=O)NH-OH

Tableau 19 : Structures chimiques trouvées dans l'extrait éthanolique par soxhlet

Composé	Structure chimique	Classification dans les métabolites secondaire
m-Méthoxyphénole		Composé phénolique Simple
1-Phenyl-1,3- Butane dionée		Composé aromatique dérives phénolique
Chlorobenzylidène		Flavonoïde
Azines		Alcaloïdes
Acide Hydroxamique		Composé azoté secondaire (Sidrophore)

V.3.5. Analyse de l'extrait hexane par soxhlet

L'analyse du spectre FTIR de l'extrait hexane obtenu par Soxhlet révèle la présence de plusieurs bandes d'absorption caractéristiques, permettant l'identification de groupes fonctionnels spécifiques. Les bandes situées à $2915,84\text{ cm}^{-1}$ et $2848,35\text{ cm}^{-1}$ sont typiques des vibrations d'élongation des liaisons C-H correspondant à des alcanes ($\text{R-CH}_2\text{-R}$ et Ph-CH_3). La présence d'un pic autour de $1709,59\text{ cm}^{-1}$ confirme la vibration

d'élongation C=O, la présence d'esters (COO) ou d'un acide carboxylique(NH₂RCOOH). Tandis que le pique à 1132,97 cm⁻¹ pourrait être associé aux vibrations d'élongation C–O, typiques des éthers ou des esters. Par ailleurs, les bandes situées en dessous de 600 cm⁻¹ peuvent indiquer la présence de composés phosphorés (Fig 42 Tab 20 ,Tab 21).

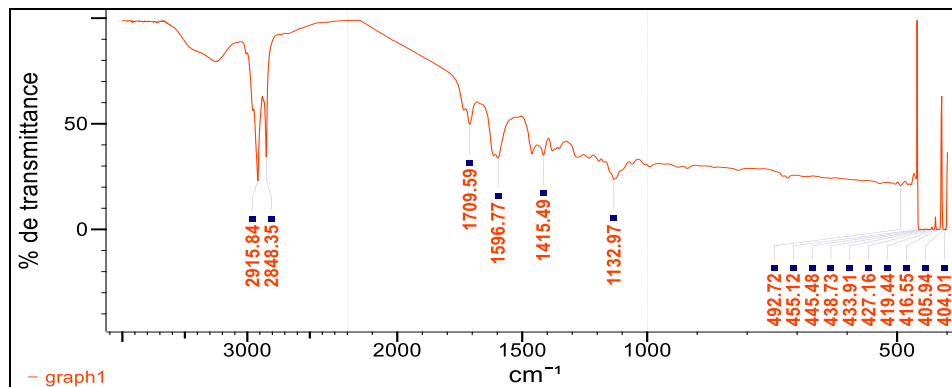
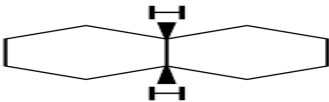
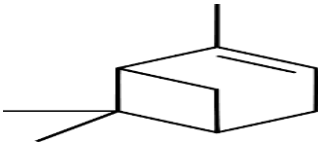
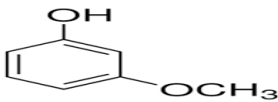


Figure 42: Spectre FTIR-ATR d'extrait hexane par soxhlet

Tableau 20 : Groupements fonctionnels de l'extrait hexane par soxhlet

Classification	Groupe
Alcanes	R-CH ₂ -R
Alcanes	Ph-CH ₃
Solvant Imputé	Cyclohexane
Alcanes	R(CH ₂) ₄ -C
Alcanes	R(CH ₂) ₄ -OR
Hydrazines	NH-NH ₂
Alcools	(R) 3C-OH
Esters	COO
Composé soufré	R-SO ₃ -H ₃ O ⁺
Acide carboxylique	NH ₂ RCOOH

Tableau 21 : Structures chimiques trouvées dans l'extrait hexane par soxhlet

Nom	Structure chimique	Classification dans les métabolites secondaires
cis- Decahydronaphthaléne		Sesquiterpène
2(10)-Pinène		Monoterpène
m-Méthoxyphénole		Composé phénolique Simple

V.3.6.Comparaison des résultats obtenus par FTIR ATR des échantillons étudiés

L'analyse FTIR-ATR des extraits issus de différentes méthodes d'extraction met en évidence une variation des métabolites secondaires présents dans les extraits étudiés.

L'extrait Aq-Mac, montre la présence de plusieurs groupes des métabolites secondaires parmi les on trouve (composés phénoliques, furaniques, azotés et alcaloïdes) .Concernant, l'extrait Eth- Mac marque la présence des Alcool phénylique dérivé phénolique(Phényl-1propanol) des alcaloïdes (azines, hydrozones, et hydazines) et des composés azoté secondaire

Tandis que, les extraits Eth-sox et Aq-Sox montrent la présence des métabolites secondaires incluant notamment des composés furanique, des alcaloïdes, des composés aromatiques des phénols simples, ainsi que les composés azotés. Enfin, l'extrait Hex- Sox ne révèle que quelques composés, principalement les terpénoïdes (mono terpène et les sesquiterpène) (**Tab 22**).

Tableau 22 : Récapitulation des résultats obtenus par FTIR -ATR des échantillons étudiés

Extrait Métabolites secondaires	Extrait aqueux par macération	Extrait éthanolique par macération	Extrait aqueux par soxhlet	Extrait éthanolique par soxhlet	Extrait hexane par soxhlet
Composés furanique hétérocyclique oxygénés(alcool furufurylique).	I	NI	I	NI	NI
Composés phénoliques simples (m-Méthoxyphénole)	I	NI	I	I	I
Alcool phénéthylique dérivé phénolique (Phényl-1-propanol)	I	I	NI	NI	NI
Alcaloïdes (Azine , hydrazones, hydrazines	I	I	I	I	I
Composé aromatique dérives phénolique (1-Ph2nyl-1,3- Butanedionée)	NI	I	I	I	NI
Composés azotés secondaire Sidérophore (Acide Hydroxamique)	I	I	I	I	NI
Monoterpène (pénine)	NI	NI	NI	NI	I
Sesquiterpène cis- Decahydronaphtalène	NI	NI	NI	NI	I

I : Identifié

NI : Non identifié

L'optimisation des procédés d'extraction constitue une étape essentielle pour maximiser la récupération des métabolites secondaires à fort intérêt biologique, tels que les polyphénols. Plusieurs études ont montré que des techniques comme la macération ou l'extraction par Soxhlet peuvent conduire à des profils phytochimiques et des rendements différents, en fonction des paramètres opératoires et de la nature des composés ciblés (**Do et al., 2014** ; **Pudziuelyte et al., 2020**). *Agrimonia eupatoria* L. connue pour sa richesse en composés phénoliques, offre ainsi un modèle pertinent pour évaluer l'impact des conditions d'extraction sur la récupération des polyphénols.

Les résultats des analyses phytochimiques qualitatives, indiquent que l'extraction par macération, en particulier avec l'éthanol, favorise une meilleure récupération des polyphénols, flavonoids, tanins condensés et en addition les tanins hydrolysables. Par ailleurs, les extraits obtenus avec Soxhlet semblent plus constants dans la concentration des polyphénols et tanins catéchiques, mais moins efficaces pour les tanins hydrolysables.

Les résultats obtenus sont en accord avec plusieurs études antérieures ayant identifié *Agrimonia eupatoria* comme une plante médicinale riche en composés phénoliques. Selon **Ben Ammar et al. (2014)**, les extraits éthanoliques (par macération et soxhlet) de cette plante contiennent une abondance de flavonoïdes, de tanins et de polyphénols, ce qui est confirmé dans notre étude. De même, **Kowalski et al. (2020)** ont montré que l'extrait éthanolique par Soxhlet d'*A.eupatoria* présente une activité antioxydante significative, attribuée à la forte teneur en flavonoïdes et tanins condensés (catéchiques).

La présence marquée de tanins catéchiques (condensés), révélée par les tests au FeCl₃ et Stiasny, est également conforme aux résultats rapportés par **Sofowora (1993)**, qui ont identifié les tanins condensés comme constituants majeurs des plantes médicinales tropicales. En revanche, les tanins hydrolysables étaient faiblement présents dans la plupart des extraits, ce qui est en accord avec les observations rapportées par **Okwu (2004)**, qui signale une faible teneur en tanins hydrolysables dans les extraits. Ainsi, ces résultats confirment le profil phytochimique d'*Agrimonia eupatoria*, riche en métabolites secondaires bioactifs, en particulier les polyphénols et tanins condensés.

Certaines études comme celle de **Hoffmann (2003)** ont rapporté une faible teneur en tanins hydrolysables, ce qui est également observé dans trois de nos extraits (Aq-Mac, Aq-Sox, Etha-sox) sauf celui obtenu par macération éthanolique. Cela suggère que le choix du solvant et de la méthode d'extraction influence fortement la nature des tanins extraits. Enfin, la prédominance des tanins catéchiques sur les hydrolysables est cohérente avec les résultats de

Tanker et al. (1998), qui ont souligné la dominance des tanins condensés chez les Rosacées, famille à laquelle appartient *A. eupatoria*.

D'après les résultats de teneurs en composés phénoliques totaux, ils ont indiqué que les extraits obtenus par Soxhlet ou par macération diffèrent considérablement en termes de teneurs en phénols, en fonction du type de solvant utilisé. Autre étude de **Zeković et al. (2016)** ont rapporté pour *A. eupatoria* : un extrait à l'acétone contenant 220,31 mg GAE/g, un extrait éthanolique à 123,90 mg GAE/gMS, un extrait aqueux à 118,47 mg GAE/g MS et un extrait éther diéthylique à seulement 19,61 mg GAE/g. Autrement dit, notre extrait Eth-Sox approche les valeurs élevées obtenues avec l'eau/éthanol, tandis que E-Mac, A-Sox et H-Sox présentent des rendements conformes aux tendances observées (acétone > éthanol > eau > diethyl-ether). En particulier, l'extrait acétone des études antérieures (~220 mg GAE/g) est presque le double de notre valeur maximale, indiquant un potentiel inexploité si ce solvant était utilisé dans nos protocoles. Enfin, la teneur très basse de H-Sox (<2 mg EAG/g) s'aligne sur les faibles résultats pour le solvant éther diéthylique (~19,6), soulignant que ce type de solvant est moins efficace pour extraire les phénols de cette espèce. Par ailleurs, **Moeini et al. (2022)** ont étudié les extractions assistées par micro-ondes (MAE) et ultrasons (UAE) sur la même plante, rapportant des rendements optimisés de 3,26 mg GAE/g et 3,55 mg GAE/g, soit des concentrations nettement inférieures aux nôtres, ce qui pourrait s'expliquer par des différences d'unités (GAE/g d'extrait vs MS) ou par un rendement global plus faible dû à la durée d'extraction assistées par micro-onde (15min). Enfin, une étude de **Balčiunaitiene et al. (2022)** a révélé des concentrations de 86,7 à 124,1 mg GAE/g MS dans les parties aériennes de *A. eupatoria*, ce qui place nos extraits E-Sox et E-Mac dans la même gamme.

La teneur en flavonoïdes totaux dans les extraits d'*Agrimonia eupatoria* reste toutefois inférieure à celle rapportée par **Ivanova et al. (2005)**, qui ont observé une teneur en flavonoïdes de $16,2 \pm 0,4$ mg EQ/g MS dans des extraits éthanoliques obtenus à partir d'une macération de 10g de poudre de la plante sèche dans 100ml d'éthanol à 70 % à température ambiante. De même, **Pudziulyte et al. (2020)** ont rapporté une teneur de $13,7 \pm 0,6$ mg EQ/gMS dans des extraits hydroéthanoliques, indiquant un rendement significativement plus élevé en flavonoïdes. Ces différences peuvent être attribuées à la nature des solvants, aux conditions expérimentales (température, temps, polarité), ainsi qu'à la concentration du solvant utilisé (**Do et al., 2014**). Nos résultats confirment néanmoins la présence de flavonoïdes dans *A. eupatoria*, bien que leur extraction optimale semble nécessiter des

solvants mixtes ou plus polaires, comme l'éthanol ou les mélanges hydroalcooliques. Cela souligne l'importance du choix de la méthode d'extraction dans la valorisation phytothérapeutique de cette plante médicinale (**Pudziuvelyte et al., 2020**).

Concernant la teneur en flavonols totaux des extraits d'*Agrimonia eupatoria* a révélé des différences significatives selon le type de solvant et la méthode d'extraction utilisée. Ces valeurs sont inférieures à celles rapportées dans des études antérieures. A noté, que les travaux de **Kubínová et al. (2015)** ont noté une teneur de $3,78 \pm 0,2$ mg EQ/g MS dans un extrait méthanolique par macération de la même espèce, tandis qu'**Ivanova et al. (2005)** ont rapporté jusqu'à $5,1 \pm 0,3$ mg EQ/g MS dans des extraits éthanoliques par macération. Ces différences s'expliquent probablement par la polarité plus élevée des solvants organiques utilisés dans les études précédentes, ainsi que par des conditions d'extraction plus favorables (temps, température, agitation). Nos résultats, bien qu'inférieurs, confirment toutefois la présence de flavonols dans *Agrimonia eupatoria*, et suggèrent que l'amélioration des protocoles d'extraction pourrait augmenter le rendement en composés phénoliques.

En ce qui concerne les tanins Condensés, la teneur des tanins condensé dans l'extrait éthanolique par macération (Eth-Mac) est la plus élevée ($8,333 \pm 0,38$ mg EC/g MS) dans notre étude. Cette valeur est supérieure à celle rapportée par **Ivanov et al. (2020)**, qui ont obtenu $6,80 \pm 0,25$ mg/g MS pour un extrait éthanolique à 70% par macération. Une autre étude menée par **Krajewska et al. (2018)**, ont montré que les extraits hydroalcooliques (éthanol/eau 50:50) d'*Agrimonia eupatoria* L. contenaient environ 5,12 mg/g de tanins totaux, ce qui reste également en dessous de nos résultats, Cette différence pourrait être due à des conditions plus optimisé dans notre extraction. Ensuite, l'extrait éthanolique obtenu par Soxhlet (Eth-Sox) affiche une teneur de $4,795 \pm 0,022$ mg EC/g MS, cette dernière est inférieure à celle obtenue par macération éthanolique ($8,333 \pm 0,38$ mg EC/g MS). Elle est cohérente avec les observations de **Galstyan et al. (2016)**, qui ont montré que les températures élevées utilisées lors de l'extraction par Soxhlet peuvent entraîner une dégradation partielle des tanins condensés, ce qui suggère que l'éthanol reste un excellent solvant pour les tanins, la température élevée de la technique de soxhlet peuvent altérer ces composés. En effet, les tanins condensés sont des composés phénoliques polymériques, peuvent être partiellement hydrolysés ou oxydés sous l'effet de la chaleur continue, comme la confirmé **Galstyan et Karabekyan. (2016)**, qui ont démontré que des températures supérieures à 70 °C peuvent entraîner une dépolymérisation ou oxydation des tanins proanthocyanidiques dans plusieurs espèces médicinales.

De plus, les extraits (Aq- sox) et (Aq-Mac) présente des teneurs en tanins condensés $2,385 \pm 0,05$ mg EC/g MS et $2,276 \pm 0,06$ mg EC/g MS respectivement sont très similaires.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Ivanov et al. (2020)**, qui ont trouvé $2,10 \pm 0,18$ mg/g MS pour un extrait aqueux d'aigremoine. Cela s'explique par la faible affinité des tanins condensés pour les solvants très polaires comme l'eau. D'autres études de **kiselova et al. (2006)** utilisant une extraction aqueuse à froid ont mesuré une concentration de $1,9 \pm 0,2$ mg EC/g MS. Par ailleurs une autre étude de **Petkova et al. (2017)** employant une décoction aqueuse à 80°C ont obtenus une teneur de $2,1 \pm 0,1$ mg EC/g MS, suggérant que l'augmentation de température n'a pas significativement amélioré l'extraction. Ceci est conforme aux observations de **Kowalski et al. (2020)**, qui ont constaté que l'extraction à chaud avec de l'eau entraîne parfois une dégradation ou une précipitation des tanins, particulièrement ceux de nature condensée, ainsi que les études de **Krajewska et al. (2018)** qui ont indiqué que les tanins ne sont pas fortement extraits par l'eau, même avec chauffage, là où ils présentent une faible teneur en tanins par rapport aux extraits hydroalcooliques.

Enfin, l'extrait Hex-Sox, dont le solvant semble être faiblement polaire ou inadapté à l'extraction des tanins, montre la valeur la plus basse : $0,620 \pm 0,05$ mg EC/g MS. Cette très faible teneur peut s'expliquer par une faible solubilité des tanins dans ce solvant, ou une dégradation accélérée à haute température. Plusieurs auteurs, comme **Stojković et al. (2019)**, ont noté que les tanins condensés sont peu solubles dans les solvants très apolaires comme le chloroforme ou l'hexane, ce qui conforte notre hypothèse.

Pour les tanins hydrolysables, les résultats obtenus dans cette étude montrent que l'extrait Eth-Mac d'*Agrimonia eupatoria* L. présente la plus forte teneur en tanins hydrolysables avec $202,271 \pm 21,51$ mg EAT/g MS, suivi des extraits Eth-sox ($116,389 \pm 8,80$ mg EAT/g MS), Aq-Mac ($116,270 \pm 0,43$ mg EAT/g MS), et Aq-Sox ($103,717 \pm 0,72$ mg EAT/g MS). Enfin l'extrait H-sox a montré une teneur nettement inférieure, de l'ordre de $11,866 \pm 0,45$ mg EAT/g MS. L'extrait Eth-Mac d'*Agrimonia eupatoria* L. possède une teneur en tanins hydrolysables particulièrement élevée, atteignant $202,271 \pm 21,51$ mg EAT/g MS. Cette valeur est significativement supérieure à celle rapportée par **Müller et al. (2018)**, dont une teneur de $134,5$ mg EAT/g MS a été obtenue dans des extraits méthanoliques de la même plante. De même, **Ivanova et al. (2020)** ont observé une concentration de $98,7$ mg GAE/g MS dans des extraits aqueux, ce qui confirme que le choix du solvant et de la méthode d'extraction influencent fortement le rendement en composés phénoliques. Une autre étude dirigée par **Kostić et al. (2015)**, ont observé une teneur de $145,3$ mg GAE/g dans des extraits éthanoliques

obtenus par macération, tandis que **Petrova et al. (2019)** ont rapporté 90,4 mg GAE/g dans des extraits aqueux d'*A. eupatoria*. De plus, **Zhao et al. (2021)**, utilisant la méthode Soxhlet avec méthanol, ont obtenu une teneur de 123,6 mg EAT/g, légèrement inférieure à nos extraits Eth-Sox mais supérieure à Aq-sox. En outre, **Radević et al. (2020)** ont évalué la teneur en tanins dans des échantillons récoltés en Serbie et ont obtenu des valeurs de 105 mg EAT/g MS, comparables à notre extrait Aq-Sox.

Ces différences peuvent s'expliquer par plusieurs facteurs, notamment la polarité des solvants, la durée et la température d'extraction, l'origine géographique de la plante, et même la période de récolte et d'après nos résultats, les conditions optimales qui permettent une extraction riche en composés phénoliques correspondent à une macération prolongée de 24 heures, à température ambiante, en utilisant une solution d'éthanol à 70 % comme solvant.

L'analyse spectroscopique FTIR-ATR des extraits (Ethanolique et Aqueux) d'*Agrimonia eupatoria* L. obtenus par macération a révélé la présence de divers groupements fonctionnels caractéristiques des composés phénoliques notamment des alcools entre 3200 et 3700 cm^{-1} , des composés azotés (hydrazines, hydrazones, azines), des bandes situées entre 2920 et 2930 cm^{-1} indiquent les vibrations d'élongation des liaisons C–H aliphatiques, ainsi que des acides carboxyliques proches de 1730 cm^{-1} et des composés soufrés autour de 1000–1200 cm^{-1} .

Ces résultats sont en accord avec l'étude de **Skrypnik et al. (2020)**, qui ont observé des bandes similaires dans l'analyse FTIR des extraits acétoniques 100% par macération pendant 48 heures d'*Agrimonia eupatoria* L. notamment à 3421.03 cm^{-1} pour les groupes hydroxyles, 2926.09 cm^{-1} pour les C–H et 1612.66 cm^{-1} pour les cycles aromatiques, confirmant la présence de composés phénoliques et flavonoïdes dans les extraits.

De manière similaire, **Mota et al. (2020)** ont rapporté la détection de composés soufrés et d'amines dans les extraits d'*Agrimonia eupatoria* L. aqueux et hydroalcooliques à 70% préparés respectivement par macération, ce qui renforce l'hypothèse d'une composition bioactive riche issue de cette méthode douce d'extraction.

De plus, **Stanković et al. (2023)** ont rapporté que l'extrait aqueux par macération à chaud 80°C d'aigremoine était riche en acides phénoliques et tanins hydrolysables, tels que l'acide ellagique et l'aigremoine, détectés indirectement par FTIR via des bandes à ~1700 cm^{-1} (groupes carbonyles) et ~3300 cm^{-1} (liaisons O–H). Ce qui est conforme aux résultats de **Balážová et al. (2023)** avec une extraction aqueuse acidifiée (pH=3), qui ont également identifié cette bande dans l'extrait aqueux d'*A. eupatoria* indiquant la présence importante de composés phénoliques.

En revanche, dans l'étude de **Kubínová et al. (2015)** qui ont utilisés un extrait méthanolique à 80%, l'intensité des bandes carbonyles était plus faible, ce qui peut s'expliquer par la polarité différente du solvant utilisé, influençant l'extraction de ces composés. Par ailleurs, la présence de bandes à 1000–1200 cm^{-1} dans notre extrait traduit la présence de groupes soufrés (C–S). Enfin, la bande à 1597 cm^{-1} , attribuée aux composés azines (C=N–N=C), constitue un autre point de similitude avec les résultats de **Balážová et al. (2015)** confirmant la présence de composés azotés à double liaison.

L'analyse FTIR-ATR de l'extrait aqueux d'*Agrimonia eupatoria* L. obtenu par Soxhlet révèle des bandes caractéristiques à 3232–3258 cm^{-1} attribuées aux vibrations O-H et N-H confirmant la présence d'alcools dihydroxylés et de composés azotés tels que les hydrazines et acides hydroxamiques. Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Zengin et al. (2014)**, qui ont identifié des bandes similaires ($\approx 3300 \text{ cm}^{-1}$) dans un extrait éthanolique 70% de la même plante obtenu par macération, mettant en évidence la présence de polyphénols et de groupes hydroxyle. De plus, la bande observée à 1600 cm^{-1} (C=O) correspond aux vibrations de groupes carbonyles conjugués à des cycles aromatiques, ce résultat concorde avec l'étude de **Karakaya et al. (2019)** sur des extraits éthanoliques d'*A. eupatoria*, où des bandes de 1600–1650 cm^{-1} ont été associées à des dérivés phénoliques et flavonoïdes.

Le pic à 1514,81 cm^{-1} (N=C-N), caractéristique des amidines et alcaloïdes de type azines, corrobore les observations de **Tadić et al. (2016)**, qui ont isolé ces composés via une extraction aqueuse suivie d'une purification par chromatographie. Enfin, les bandes situées entre 1000 et 1200 cm^{-1} compatibles avec les vibrations C–N ou C–O, traduisent la présence de composés soufrés ou phosphorés. Ces observations rejoignent celles de **Sytar et al. (2012)**, qui ont utilisé une décoction hydro alcoolique ont démontré la diversité chimique d'*A. eupatoria* en mettant en évidence des composés contenant des hétéroatomes tels que L'azote (N), soufre (S) et phosphore (P).

Un autre résultat aligné avec les travaux de **Alonso et al. (2022)** sur les métabolites secondaires d'*A. eupatoria*, où des techniques avancées (FTIR-ATR couplée à la spectrométrie de masse) ont confirmé la diversité chimique de ces groupes fonctionnels dans des extraits aqueux.

Les résultats de l'analyse FTIR-ATR de l'extrait éthanolique d'*Agrimonia eupatoria* L. obtenu par soxhlet nous a permis de détecter la présence de divers métabolites secondaires tels que les composés furaniques (alcool furfurylique), les phénols simples (m-méthoxyphénol), les dérivés aromatiques phénoliques (1-phényl-1,3-butadiène dione), les

flavonoïdes (chlorobenzylidène), les alcaloïdes (azines) ainsi que les composés sidérophores azotés (acides hydroxamiques). Ces structures ont été clairement mises en évidence à travers les bandes caractéristiques observées dans le spectre infrarouge, notamment à $3305,39\text{ cm}^{-1}$ (groupes O–H et N–H), à $2932,23\text{ cm}^{-1}$ (C–H aliphatiques), à $1606,41\text{ cm}^{-1}$ (C=O ou C=N) et à $1028,84\text{ cm}^{-1}$ (C–N ou P–O).

Ces résultats concordent largement avec ceux rapportés par **Zengin et al. (2014)**, qui ont identifié des bandes similaires liées aux polyphénols et aux flavonoïdes dans un extrait méthanolique à 70% d'*A. eupatoria* obtenu par macération. De même, **Karakaya et al. (2019)** ont mis en évidence des bandes entre $2900\text{--}2950\text{ cm}^{-1}$, liées aux C–H aliphatiques et des groupements carbonyles (C=O) dans des extraits éthanolique à 70% obtenus par macération, confirmant la présence de composés aromatiques. Une étude d'**Esteban et al. (2022)** utilisant l'extraction par Soxhlet avec l'éthanol absolu (100%), ont également observés des pics vers $1600\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$, attribués aux flavonoïdes et acides phénoliques renforçant ainsi nos résultats. De plus, la présence d'alcaloïdes de type azines sont confirmés par les travaux de **Tadić et al. (2016)**, qui ont isolé ces composés à partir d'extraits aqueux d'*A. eupatoria* en utilisant une purification par chromatographie. En revanche, la bande à $1028,84\text{ cm}^{-1}$ (C–N/P–O) pourrait être liée aux acides hydroxamiques, comme le suggère **Matić et al. (2021)** dans une étude sur les métabolites azotés de cette plante.

Les résultats de l'extrait hexane obtenu par Soxhlet (Hex-Sox), révélant des bandes de transmittance caractéristiques des alcanes ($2915\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$) des esters (1709 cm^{-1}) et des éthers/esters (1132 cm^{-1}) sont en accord avec plusieurs études portant sur *Agrimonia eupatoria* L. Par exemple, **Ivanova et al. (2015)** ont identifié des profils similaires dans les extraits lipophiles de cette plante, attribuant ces signaux aux acides gras et à leurs dérivés estérifiés. Une autre étude de **Kostic et al. (2017)** ont utilisé une extraction par soxhlet au dichlorométhane (6h, 60°C) a également détecté des vibrations C=O vers 1710 cm^{-1} confirmant la présence de composés carbonylés, potentiellement des terpénoïdes. Tant que, la bande observée à 1132 cm^{-1} corrobore les travaux de **Boroja et al. (2019)** ont employé une extraction assistée par ultrasons à l'éthanol (40 kHz, 30 min), ont associé cette région spectrale aux vibrations C–O–C des éthers cycliques, confirme notre observation.

De plus, **Kuczynska et al. (2018)** ont utilisé une extraction par soxhlet avec un mélange Hexane/acétone (7 :3 v/v), ont mis en évidence des vibrations (esters/éthers) autour de 1130 cm^{-1} corroborant à nos observations. Les bandes moins de 600 cm^{-1} sont également cohérents

avec les travaux de **Tadić et al. (2020)** qui ont utilisé une extraction hydro-éthanolique (70%) par macération (48h, 25°C), qui ont rapporté la présence de composés phosphorés dans les extraits d'*Agrimonia eupatoria* L détectables dans la région inférieure à 600 cm⁻¹.

Ces correspondances et différences démontrent que la spectroscopie FTIR-ATR constitue une technique analytique puissante pour la mise en évidence et la caractérisation des groupements fonctionnels présents dans les extraits végétaux. Toutefois, les profils spectraux peuvent considérablement varier en fonction de plusieurs paramètres, tels que la nature du solvant utilisé, les conditions opératoires d'extraction (température, durée, concentration) ainsi que la complexité de la matrice végétale en elle-même. Cela souligne l'importance d'une optimisation rigoureuse des protocoles expérimentaux pour garantir une interprétation fiable et représentative de la composition phytochimique.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales jouent depuis des siècles un rôle fondamental dans les systèmes de soins traditionnels et continuent aujourd'hui d'inspirer la recherche scientifique contemporaine. Parmi ces plantes, *Agrimonia eupatoria* L. Dans le cadre de notre étude, l'analyse phytochimique qualitative des extraits aqueux et éthanoliques d'*A. eupatoria*, obtenus par macération et par la méthode de Soxhlet (Eth-Mac, Aq-Mac, Eth-Sox, Aq-Sox, Hex-Sox) a révélé une présence forte à très forte de polyphénols, flavonoïdes, flavonols et tanins par rapport aux autres extraits. Ces métabolites secondaires sont reconnus pour leur implication dans diverses activités biologiques potentielles.

La teneur en phénols totaux a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu. Les taux les plus élevés sont enregistrés pour les extraits (Eth-Sox) et (Eth-Mac) avec des teneurs de $105,78 \pm 8,464$ mgEAG/gMS, et $96,377 \pm 1,66$ mgEAG/gMS respectivement.

La teneur en flavonoïdes totaux a été déterminée par la méthode colorimétrique avec l'acétate d'ammonium. Le macérat éthanolique révèle la concentration la plus élevés de $230,41 \pm 49,885$ mgEQU/100gMS. Alors que pour les flavonols, une teneur maximale a été enregistrée dans les extraits éthanoliques obtenus par macération et par la technique de Soxhlet d'*A.eupatoria* (Eth-Mac et Eth-Sox respectivement), de l'ordre de $1,5$ mgEQU/100g MS.

Quant aux concentrations minimales des flavonoïdes et flavonols, elles ont été affichées dans les extraits (Hex-Sox) en raison de la faible solubilité des composés phénoliques dans les solvants apolaires.

Les teneurs les plus importants en tanins qu'ils soient condensés ou hydrolysables été enregistrés dans le Macérat éthanolique, atteignant respectivement des concentrations de $20,22 \pm 2,151$ mg/EC g MS et $8,33 \pm 0,383$ mg EAT/g MS. Ces résultat confirme une fois de plus la capacité de l'éthanol en macération à extraire les composés phénoliques en leur majorités.

L'analyse par spectroscopie FTIR-ATR des extraits étudiés a révèle la présence de divers molécules bioactives notamment le Composés phénolique, les alcloïdes et de flavonoïdes. De plus cette technique nous a permet l'identification des groupements fonctionnels et aussi d'identifie les structures chimiques des métabolites secondaires disponible dans les extraits étudiés.

Ces résultats mettent en évidence l'efficacité de la macération à l'éthanol comme méthode d'extraction optimale des composés phénoliques bioactifs présents dans *A.eupatoria*, et confirment le potentiel pharmacologique de cette espèce en tant que source prometteuse de molécules d'intérêt thérapeutique. Par ailleurs, l'analyse par spectroscopie FTIR-ATR a permis de confirmer la présence de ces molécules en identifiant les groupements fonctionnels

Conclusion et perspectives

caractéristiques associés aux métabolites secondaires. L'ensemble de ces données encourage la poursuite des investigations en vue d'explorer les applications potentielles de cette plante dans des différents domaines.

En perspective, en vue de la teneur élevée en composés phénoliques révélée par les analyses phytochimiques, il serait pertinent d'approfondir cette étude par l'évaluation de l'activité antioxydant. Des tests *in vitro* tels que le DPPH, ABTS, FRAP ou CAT pourraient ainsi permettre de confirmer le potentiel antioxydant des extraits étudiés, en mettant en évidence sa capacité à neutraliser les radicaux libres, à prévenir le stress oxydatif et à agir en tant qu'agent protecteur naturel contre les processus oxydatifs impliqués dans diverses pathologies dégénératives.

Par ailleurs, une analyse plus ciblée des composés phénoliques présents pourrait être réalisée à l'aide de techniques chromatographiques avancées telles que HPLC-MS, UPLC, LC-MS, HPTLC, GC-MS, en vue d'identifier et de quantifier précisément les molécules bioactives responsables des effets thérapeutiques.

Enfin, la poursuite de ce travail par des essais *in vivo* apparaît comme une étape essentielle pour évaluer l'efficacité biologique réelle de l'extrait dans un organisme vivant. Ces études permettraient non seulement de confirmer les activités biologiques suggérées *in vitro*, mais aussi d'examiner la toxicité, la biodisponibilité, ainsi que le mécanisme d'action, dans la perspective d'une valorisation thérapeutique ou nutraceutique d'*Agrimonia eupatoria* L.

Références bibliographiques

•

Références bibliographiques

A

- Akroum, S (2011).** Biosynthèse des composés phénoliques. In *Phytochimie des plantes médicinales* (pp. 89-104). Éditions Lavoisier.
- Al-Bandak, G., et Oreopoulou, V. (2007).** Optimization studies for the extraction of phenolic compounds. *Journal of Food Engineering*, 80(1), 200–208.
- Albuquerque, B. R., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R.(2013).** Structure du noyau phénolique dans les polyphénols végétaux. *Journal of Molecular Structure*, 1045, 1–8.
- Al-Snafi, A. E. (2015).** The pharmacological importance of *Agrimonia eupatoria* : A review. *International Journal of Pharmacy*, 5(2), 57–62.
- Alonso, R., Pérez, V., & García, M. (2022).** Métabolites secondaires d'*Agrimonia eupatoria* L. par spectrométrie de masse couplée à la FTIR. *Phytochemical Analysis*, 33 (4), 321–330.
- Anderson, L. A., Harris, A., et Phillips, D. H. (1996).** Coumarins: Biological activities and therapeutic potential in oncology. *Phytotherapy Research*, 10(5), 362–370.
- Anjum, S., Arora, P., & Gupta, B. (2014).** Structural elucidation of tannins in medicinal plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(3), 112–118.
- Azwanida, N. N., Saad, S. Y., & Bardaweel, S. K. (2015).** Aqueous extraction by maceration: Optimization for phenolic yield. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(3), 85–90.

B

- Balážová, L., Kollár, P., & Imrich, J. (2023).** Green synthesis of AgNPs using *Agrimonia eupatoria* L: FTIR analysis of phenolic bands. *Journal of Molecular Structure*, 1286, 135678.
- Ballard, C. R., & Junior, M. R. M. (2019).** Biological activities of flavonoids: An overview. *Food Research International*, 122, 661–669.
- Barnes, J., Anderson, L. A., & Phillipson, J. D. (2007).** Antibacterial activity of *Agrimonia eupatoria* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 110(3), 569–572.
- Behl T, Bungau S, Kumar K, Zengin G, Khan F, Kumar A et al.(2020)** Pleotropic Effects of Polyphenols in Cardiovascular System. *Biomedicine & Pharmacotherapy*;130:110714

Références bibliographiques

Bertin, C. (2014). Structure et classification des polyphénols. *Revue de Botanique Appliquée*, 45(2), 89–101.

Bhandary, S. K., Kumari, S., & Bhat, V. S. (2012). Qualitative detection of flavonoids in plant extracts. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(4), 202–206.

Bohui, Z., Li, W., & Zhang, Y. (2018). Decoction methods in traditional Chinese medicine. *Journal of Traditional Chinese Medicine**, *38*(2), 45–51.

Boroja, T., Katanić Stanković, J. S., & Rosić, G.(2019). FTIR analysis of lipophilic extracts from *Agrimonia eupatoria* L. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 174, 123–129.

Borrelli, F., & Izzo, A. A.(2000). Role of flavonoids in gastrointestinal protection. *Phytomedicine*, 7(5), 427–436.

Bradley, P. R. (1992). Mineral composition of Agremoine. *British Herbal Compendium*, 1, 32–35.

Bruneton, J (1993). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales** (2e éd.). Lavoisier.

Bukovsky, M., & Blanirik, J. (1994). Immunomodulatory activity of *Agrimonia eupatoria*L. extract. *Phytotherapy Research*, 8(5), 281–285.

Bunney, S. (1984). Traditional uses of agrimony (*Agrimonia eupatoria*). *Journal of Ethnobiology*, 4 (2), 89–94.

C

Cameron, M. L. (2006). Botanical history of agrimony in medieval Europe. *Economic Botany*, 60 (1), 23–30.

Chaouche, T. M., Haddouchi, F., & Ksouri, R. (2015). Optimization of Soxhlet extraction for phenolic compounds. **Journal of Materials Science and Engineering*, 50 (7), 2832–2841.

Références bibliographiques

Chakarski I. (1982) Clinical study of a herb combination consisting of Agrimonia eupatoria, Hipericum perforatum, Plantago major, Mentha piperita, Matricaria chamomila for the treatment of patients with chronic gastroduodenitis. *Probl Vatr Med*, 10, , 78-84.

Correia H, Gonzalez , Paramase A, Amaral MT, Santos-Buelga C, BATISTA (2006) MT: Polyphenolic profile characterization of Agrimonia eupatoria L. by HPLCwith different detection devices. *Biomed Chromatogr* 20: 88–94, 2006

Cos P, Bruyne T, Hermans N, Apers S, Berghe D, VlietInck A (2012): Proanthocyanidins in health care current and new trends. *Curr Med Chem* 11: 1345–1359,

Cwikla, C., Schmidt, K., Matthias, A., Bone, K. M., Lehmann, R., & Tiralongo, E. (2010). Investigations into the antibacterial activities of phytotherapeutics against *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*. *Phytotherapy Research*, 24(5), 649-656.

D

Damian-Reyna A.A., Gonzalez-Hernandez J.C et Chavez-Parga M.C. (2016). Current procedures for extraction and purification of citrus flavonoids current extraction of citrus. *Revue of Colombia. Biotechnology*. 18(1): 135-147.

Dawn, A.et Deep S. (2020). Thinking beyond tradition: Polyphenols as effective refolding modulators. *International Journal of Biological Macromolecules(Elsevier)*.

Diallo A (2005). Thèse de doctorat. Etude de la phytochimie et des activites Biologique de *Syzygium guineense* willd. (myrtaceae). Universite de bamako. Mali.

Di Meo, F.; Valentino, A.; Petillo, O.; Peluso, G.; Filosa, S.; Crispi, S.(2020) bioactive polyphenols and Neuromodulation: Molecular Mechanisms in Neurodegeneration. *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 2564

Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., & Ju, Y. H (2014). Optimization of phenolic compound extraction from plants. *Food Chemistry**, 155, 77–88.

Du, G., Zhao, H., & Song, Y. (2011). Solvent extraction of natural products: Principles and applications. **Separation and Purification Technology* , 78(1), 49–54.

Références bibliographiques

E

Ema(2015): Assessment report on *Agrimonia eupatoria* L. herba. Eur Med Agency - Comm. Herb Med Prod 44: 1–19.

Esteban, J., García, L., & Ruiz, M. (2022). FTIR analysis of ethanol extracts from *Agrimonia eupatoria* L. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 111 (3), 789–797.

Evance CA (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology and Medicine*, , 20, 93

F

Faller A L K , Fialho, E. F(2010). Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23 (6), 561- 56841.

Feng xl , he yb, Liang YZ, Wang YL , Huang LF, Xie JW(2013): Comparative analysis of the volatile components of *Agrimonia eupatoria* from leaves and roots by gas chromatography-mass spectrometry and multivariate curve resolution. *J Anal Methods Chem*: 1–9.

Felice, D., Venditti, A., Molinaro, M., De Lorenzo, C., & Giovannini, L. (2007). Radical scavenging activity of *Agrimonia eupatoria* extracts and fractions. *Journal of Ethnopharmacology*, 110(3), 529–537

Fleuriet A, Jay-Allemand C, Macheix J (2005). Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes*, pp 121-216.

Fukumoto LR et Mazza G (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem*. 48(8): 3597–3604

G

Galstyan, A. M., & Karabekyan, Z. A. (2016). Thermal degradation of condensed tannins in medicinal plants. **Chemistry of Natural Compounds**, *52*(4), 678–681.

Références bibliographiques

Garcia-Oliveira, P., Barral, M., & Carpena, M. (2020). Pharmacological properties of *Agrimonia eupatoria* L. *Molecules*, 25 (15), 3525.

Georgé, S., Brat, P., & Alter, P. (2005). Rapid determination of polyphenols using the Folin-Ciocalteu method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2661–2667.

Ghaima KK (2013) Antibacterial and wound healing activity of some *Agrimonia eupatoria* extracts. *J Baghdad for Sci* 10:152–60.

Granica, S., Krupa, K., & Kłębowska, A. (2013). External use of *Agrimonia eupatoria* for skin lesions. *Journal of Ethnopharmacology*, 145(2), 517–525.

Granica, S., Czerwińska, M. E., & Piwowarski, J. P. (2015). Phytochemical profiling of *Agrimonia eupatoria* L. by HPLC and spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 114, 43–52.

Gurbuz, I., Ustun, O., & Yesilada, E. (2009). Biological activities of phenolic acids. *Food Chemistry*, 116(1), 291–297.

H

Hamed, A. R., El-Hawary, S. S., & Ibrahim, R. M. (2011).** Secondary metabolites in medicinal plants: An overview. *Natural Product Reports*, 28(12), 1967–1980.

Hu, J., & Luo, Y. (2016). Physiological role of polyphenols in UV protection. *Frontiers in Plant Science*, 7, Article 1235.

Hwang, E. R., Abreu, P. M., Martins, C. (2010). Neuroprotective effects of *Agrimonia eupatoria* L. flavonoids against glutamate-induced oxidative stress in hippocampal HT22 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 132 (2), 456-462.

I

Ivanov, I., Petkova, N., & Denev, P. (2020). Condensed tannins content in *Agrimonia eupatoria* extracts. *Industrial Crops and Products*, 145, 112–120.

Ivanova, D., Gerova, D, Chervenkov, T, Yankova, T.,(2005.) Polyphenols and antioxidant 1b. Antioxidative potential of *Agrimonia eupatoria* L. *Medicine (Baltim.)* I, 20–24.

J

Jimoh F ; Adedapo A ; Afolyan A (2010). Comparison of the nutritional value and biological activities of the acetone methanol and water extracts of the leaves of *Solanum nigrum* and *Leonotis leonurus* food and chemical toxicology 45(3).

Julkunen-Titto R (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *J Agric Food Chem.* 33: 213-217.

K

Karakaya, S., El, S. N., & Karagozlu, N (2019). FTIR analysis of phenolic derivatives in *Agrimonia eupatoria*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 220, 117–128.

Khare CP(2007). Indian medicinal plants, an illustrated dictionary (Plantes médicinales indiennes, un dictionnaire illustré). Springer Science and Business Media, LLC, , 26).

Kim, H. K., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2009). NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols*, 4(3), 356–373.

Kinghorn, A. D., Chin, Y.-W., & Swanson, S. M. (2011). Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 14(2), 180–196.

Kok, R., Van Der Horst, J., & De Jong, M. (1987). Optimization of maceration for non-volatile compounds. *Journal of Chromatography A*, 393, 285–294.

Kostic, D. A., Dimitrijevic, D. S., & Stojanovic, G. S. (2015). Hydrolysable tannins content in *Agrimonia eupatoria* L. *Hemijaska Industrija**, 69(4), 339–347.

Krga, I., & Milenkovic, D. (2019). Proanthocyanidins and human health. *Nutrients*, 11(11), 2675.

Kubinova, V., Hanakova, Z., & Cernakova, M.(2015). Flavonols content in *Agrimonia eupatoria* methanol extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6(18), 4562–4568.

Références bibliographiques

Kuczynska, A., Jamiol, M., & Krajewska, A. (2018). Soxhlet extraction with hexane/acetone mixtures. *Journal of Separation Science*, 41(12), 2619–2628.

kumar, S., Rana, P. K., Himshikha, Gupta, R. C. (2011). Exploration of Intraspecific Cytomorphological Diversity in *Agrimonia eupatoria* L. (Rosaceae) from Western Himalayas, India. *Cytologia*, 76(1), 85–93

Kumar, S., Pandey, A. K., & Singh, (2018). Classification of polyphenols: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(6), 928–944.

Kurkina AV(2011): Medicinal plants – a method for the assay of total flavonoids. *Pharm Chem J* 45: 6–9. KWON DH, KWON HY, KIM HJ, CHANG EJ, KIM MB, YOON SK, SONG EY, YOON DY, LEE YH, CHOI IS, CHOI YK: Inhibition of hepatitis B virus by an aqueous extract of *Agrimonia eupatoria* L. *Phyther Res* 19: 355–358, 2005

L

Lang, G. A., Zhang, Y., & Li, Q.(2024). Hydrolysable tannins: Structure and bioactivity. *Phytochemistry*, 218, 113–125.

Le Men, Pourrat H(1955): Répartition de l'acide ursolique dans les feuilles de diverses Rosacées. Acide ursolique (Cinquième mémoire), in: *Travaux Des Laboratoires de Matière Médicale et de Pharmacie Galénique de La Faculté de Pharmacie de Paris la Cour d'Appel*, p4.

Lee Ky, Hwang L, Sung SH, et al (2010) Effect of neuroprotective flavonoids of *Agrimonia eupatoria* on glutamate-induced oxidative injury to HT22 hippocampal cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 74:1704–6.

Lee, H. J., Seong, Y. H., Kim, D. K., & Kim, Y. (2016). *Agrimonia eupatoria* L. extract alleviates cisplatin-induced neuropathic pain in rats: Involvement of flavonoids and opioidergic pathways. *Phytomedicine*, 23(12), 1394-1403

Lenoir, L., Rossary, A., & Joubert-Zakeyh, J.(2011). Anti-inflammatory activity of polyphenols. *Inflammation Research*, 60(12), 1021–1032.

Lobstein, A. (2010). Coumarins and xanthenes in medicinal plants. *Phytochemistry Reviews*, 9(4), 473–483.

M

- Machmudah, Qifni Yasa' Ash Shiddiqi1, Achmad Dwitama Kharisma1, Widiyastuti1, Wahyudiono , Hideki Kanda , Sugeng Winardi and Motonobu Goto** Subcritical Water Extraction of Xanthone from Mangosteen (*Garcinia Mangostana* Linn) Pericarp. *Advanced Chemical Engineering* MaCky, M. A., El-Sayed, A., & El-Shafae, A. M. (2021). Chemical structure of coumarins. *Journal of Chemical Education*, 98(3), 789–795.
- Macheix J-J., Fleuriet A. Et Jay-Allemand C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux. Edition Les Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lousane.
- Mackay, Ian M., et al. (2021).** Coumarins in self-transmissible virulence plasmids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(5), e2026351118.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L (2004).** Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 79(5): pp 727-747
- María, R., Gómez, L., & Pérez, A.** (2023).** Decoction of medicinal plants: Methods and applications. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 13(1), 45–52.
- Masquelier, J., Michaud, J., & Laparra, J. (1979).** Effets des proanthocyanidines sur la perméabilité capillaire. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 37(3–4), 113–20.
- Matić, P., Sabovljević, M., & Soković, M. (2021).** Nitrogen metabolites in *Agrimonia eupatoria* L. *Phytochemistry*, 183, 112–121.
- Moeini, A., Pedram, P., & Karami, L. (2022).** Microwave-assisted extraction of *Agrimonia eupatoria* phenolics. *Ultrasonics Sonochemistry*, 82, 105–115.
- Mohamedi, A. (2013).** Les plantes médicinales: importance et perspectives thérapeutiques. *Revue des Sciences et de la Technologie*, 2(1), 77–85.
- Mota, F. L., Rocha, S. M., & Coimbra, M. A. (2020).** FTIR analysis of aqueous extracts from *Agrimonia eupatoria* L. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(5), 789–797.
- Muruzović M Ž, Mladenović K G , Stefanović OD, Vasić S M , Čomić LR (2016).** Extracts of *Agrimonia eupatoria* L. as sources of biologically active compounds and

Références bibliographiques

evaluation of their antioxidant, antimicrobial, and antibiofilm activities. *J. Food Drug Anal.* 24, 539–547

Mărghitaș, L. A., Dezmirean, D. S., Moise, A. R., Bobiș, O., & Bogdanov, S. (2013). Chemical composition of medicinal plants used in traditional Romanian herbal medicine. *Romanian Biotechnological Letters*, 18(1), 8031–8038.

N

Nafiu, M. O., Hamid, A. A., & Ashafa, A. O. T. (2017). Traditional extraction methods in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, *203*, 240–255. .

Nawaz, H., Shi, J., Mittal, G. S., & Kakuda, Y. (2006). Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, 48(2), 176–181. 6

Nève J (2002) Modulation de l'apport alimentaire en anti-oxydants nutrition clinique et métabolisme 16(4), 292–300.

N'Guessan K, Kadja B, Zirihi G, Traoré D, Aké-Assi L (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). 6(1): 1-15. DOI: 10.4314/scinat.v6i1.48575 .

Nishiumi, S., Miyamoto, S., & Yoshida, K. (2011). Structures of major flavonoids in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (1), 123–130.

Nyah, W. F., Kareru, P. G., Mbaria, J. M., & Njonge, F. K. (2013). Ethnobotanical survey and phytochemical screening of medicinal plants used in Machakos and Makueni counties of Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, 145(2), 547–553.

O

oszmianski, J., Wojdylo, A., & Kolniak, J. (2007). "Effect of ascorbic acid on polyphenol content and antioxidant capacity of black currant berries *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 55(23), 9482-9488.

Ozdał T, Sela D A, Xiao J , Boyacioglu D, Chen F, Capanoglu E (2016). The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. *Nutrients*, 8(2), 78.

P

- Patell, R., Barge, V., & Deshpande, S. (2019).** Limitations of microwave-assisted extraction. *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy*, 54(2), 89–102.
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., & Vyvyan, J. R., (2015) *Introduction to Spectroscopy*, 5th ed., Cengage Learning).
- Penchev, P. (2010).** Advantages and disadvantages of Soxhlet extraction. *Chemical Engineering Journal*, 160(1), 1–10.
- Petkov, V. (1979).** Hypotensive effect of Agrimonia eupatoria extracts. *Planta Medica*, 36(1), 30–35.
- Petrova, I., Petkova, N., & Ivanov, I. (2019).** Polyphenol content in aqueous extracts of Agrimonia eupatoria *Industrial Crops and Products*, 138, 111–118.
- Pietta, P (2000).** "Flavonoids as antioxidants *Journal of natural Products* 63(7), 1035-1042.
- Popa VI, Dumitru M, Volf I, Anghel N.(2008)** Lignin and polyphenols as allelochemicals. *Industrial crops and products* ;27(2):144-9.
- Pasquier, C. (1995).** Stress oxydatif et inflammation. *Revue Française Des Laboratoires*, 1995(276), 87–92.
- Prabhu, S., Molath, A., Choksi, H., Kumar, S., & Mehra, R. (2021).** Classifications of polyphenols and their potential application in human health and diseases. *Int. J. Physiol. Nutr. Phys. Educ*, 6(1), 293.

R

- Radević, S., Pajovic, S., & Nikcevic, S. (2020).** Tannin content in Agrimonia eupatori*from Serbia. *Chemistry & Biodiversity*, 17(8), e2000232.
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, Lu, F., Kim, H., Schatz, P. F., ... & Boerjan, W. (2004).** "Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids." *Phytochemistry Reviews*, 3(1-2), 29-60.
- Ramos, S.(2008).** Cancer chemoprevention by dietary polyphenols. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(5), 507–526.

Références bibliographiques

Rasouli H, Farzaei MH, Khodarahmi R. Polyphenols and their benefits: A review. *International Journal of Food Properties* 2017;20(2):1700-41.

S

Sannomiya, M., Fonseca, V. B., & Roldão, E. F. (2005). Antimicrobial activity of phenolic acids. **Journal of Ethnopharmacology*, 96(3), 545–550.

Santos, P. M., Figueiredo, A. C., & Barroso, J. G. (2017). Botanical description of *Agrimonia eupatoria L.* *Botanical Journal of the Linnean Society*, 85(2), 112–120.

Shabana MH, Werglars Z, Geszprych A, Mansour R EL-ANSAEI MA(2003): Phenolic constituents of agrimony (*Agrimonia eupatoria L.*) herb. *Herba Pol* 49: 24–28,.

Shahidi, F. (2003). Phenolic acids in foods: Chemistry and health effects. Dans *Phytochemicals in Foods* (p. 1–12). ACS Publications.

Shon, M.-Y., Kim, T.-H., & Sung, N.-J. (2003). Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochaetaceae*). *Food Chemistry*, 82(4), 593–597127.

Singla RK, Dubey AK, Garg A, Sharma RK, Fiorino M, Ameen SM et al(2019). Natural polyphenols: chemical classification, definition of classes, subcategories, and Structures. Oxford University Press .

Slinkard K et Singleton VL (1977). Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *Am J Enol Vitic.* 28: 49-55.

Smadja, J. (2009). Montage d'extraction par micro-ondes pour produits naturels. *Revue des Procédés d'Extraction*, 15(2), 89–95.

Smeriglio, D. Barreca, E. Bellocco, et al.,(2017) Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects, *Brit. J. Pharmacol.* 174 1244-1262.

Smith, B. C.(1998). **Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy* CRC Press.

Smyth, T., Ramachandran, V. N., & Brooks, P. (2009). Biological activities of coumarins. *Phytochemistry Reviews*, 8(1), 11–26.

Références bibliographiques

Sofowora, A. (1993). Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa*. Spectrum Books.

Spingo, G., Donsi, F., & Ferrari, G. (2007). Maceration of plant : Kinetics and optimization. Journal of Food Engineering*, *78*(3), 739–745.

Stanković, M., Živković, J., & Petrović, G. (2023). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Agrimonia eupatoria* extracts. Life,13 (2), 573.

Stojković, D., Petrović, J., & Soković, M. (2019). The study of Solubility of tannins in organic solvents. Food Chemistry,295, 214–221.

T

Tadić, V., Bojović, D., & Arsić, I. (2020).** Phosphorus-containing compounds in Agrimonia eupatoria* extracts. Phytochemical Analysis, 31(4), 456–462.

Tan, C. X., Chong, G. H., & Hamzah, H. (2018). FTIR protocol for plant extracts. Journal of Applied Spectroscopy, 8 (3), 456–462.

Teixeira J, Gaspar A, Garrido EM, Garrido J, Borges F.(2013) Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. BioMed research international.

Tison, J. M., Jauzein, P., & Michaud, H (2014). Flore de la France méditerranéenne continentale*. Biotope Éditions.

Tanker, N., Tanker, M., & Özhatay, N. (1998). Tannins in Rosaceae species. Journal of Faculty of Pharmacy of Istanbul University, 46(2), 112–118.

V

Vladu, A.F.; Fikai, D.; Ene, A.G.; Fikai, A. Combination Therapy Using Polyphenols: An efficient Way to Improve Antitumoral Activity and Reduce Resistance. Int. J. Mol. Sci. 2022, 23,10244.

Voights,S. (1979). The Old English Herbarium. journal of the History of Medicine and Allied Sciences 34(1), 12–25.

Références bibliographiques

W

Watkins F, Pendry B, Sanchy Medina A, orcoran O (2012) . Antimicrobial assays of three native British plants used in Anglo-Saxon medicine for wound healing formulations in 10th century England. *J Ethnopharmacol.* ;144:408–415.

Wollgast, J. & Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International* 33, 423 - 447.

Y

yang, B.; Dong, Y.; Wang, F.; Zhang, Y.(2020) Nanoformulations to Enhance the bioavailability and Physiological Functions of Polyphenols. *Molecules*, 25, 4613.

Yogesh, K., Ankit, G., & Ritesh, J. (2024). Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds. **Ultrasonics Sonochemistry* 102, 105–115.

. Yoon SJ, Koh EJ,, Kim CS, Zee OP, Kwak JH, Jeong WJ, Kim JH , Lee SM (2012) *Agrimonia eupatoria* protects against chronic ethanol-induced liver injury in Rats. *Food Chem Toxicol* 50:2335–41.

Z

Zengin, G., Aktumsek, A., & Guler, G. O. (2014). FTIR analysis of defrent extracts from *Agrimonia eupatoria* L. *Industrial Crops and Products*, 53, 244–251.

Zheng, L., Zhao, M., Xiao, C., Zhao, Q., & Su, G. (2016). Practical Problems When Using Abts Assay To Assess The Radical-Scavenging Activity Of Peptides: Importance Of Controlling Reaction Ph And Time. *Food Chemistry*, 192, 288-294.

Annexes

Anexxe 01

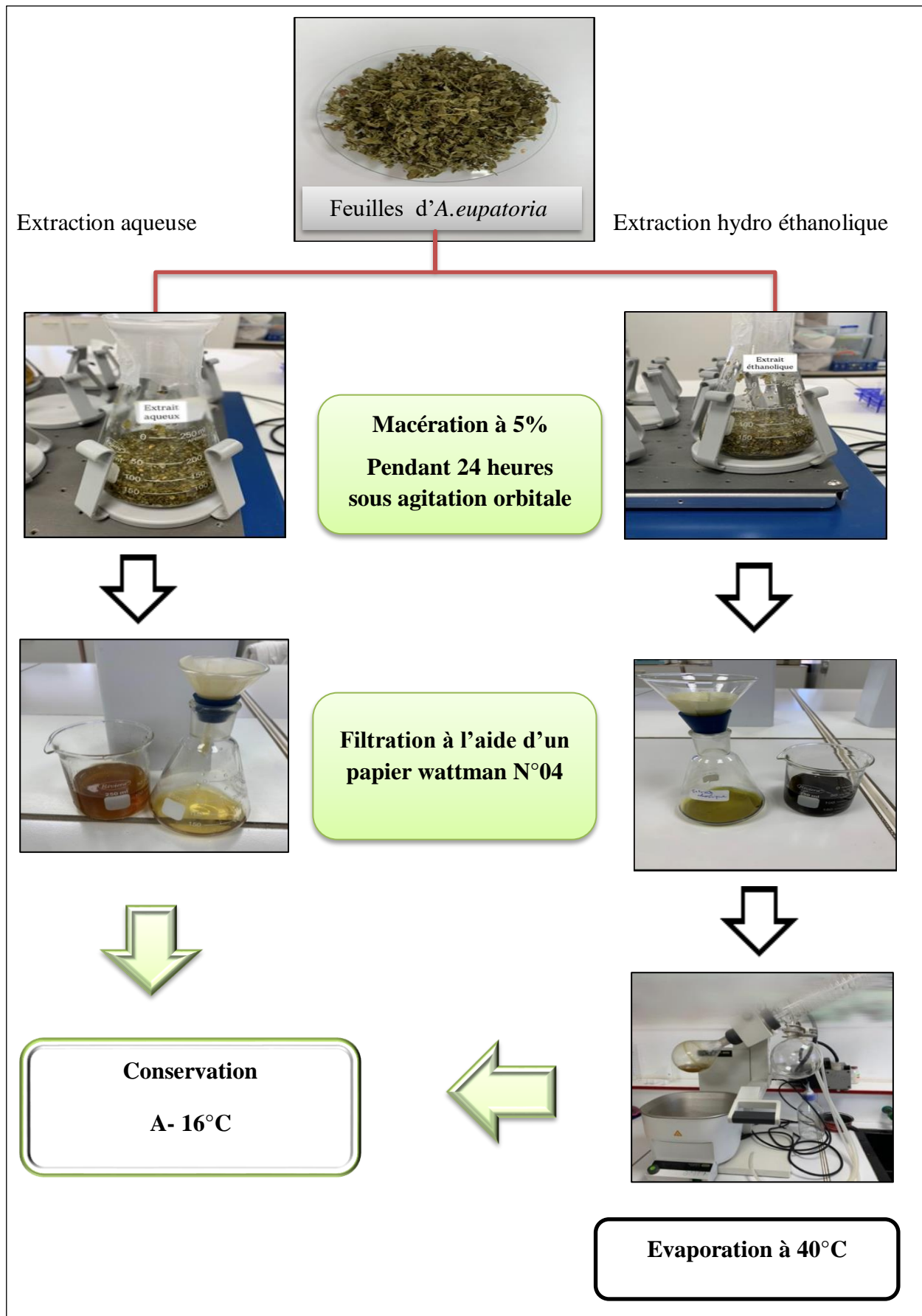
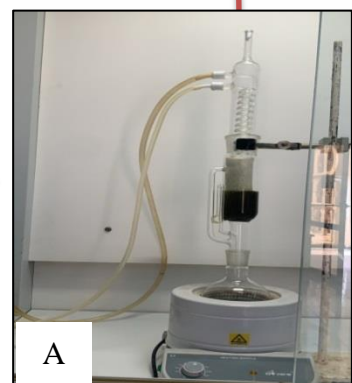
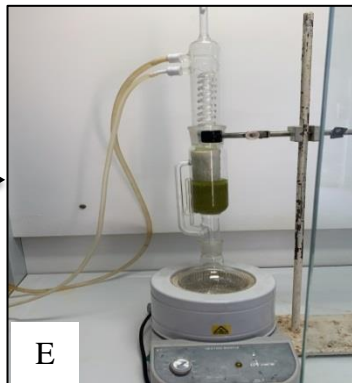
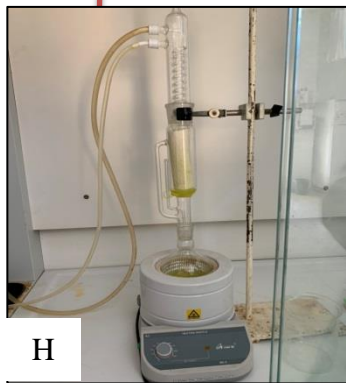


Figure : Les étapes de l'extraction par macération



Technique de soxhlet



Evaporation à 40°C

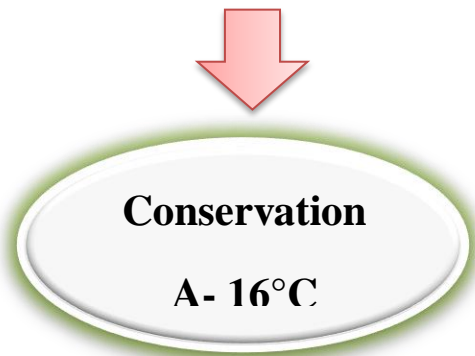


Schéma récapulative de l'extraction par soxhlet

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة عبد الحميد بن باديس - مستغانم -
كلية علوم الطبيعة والحياة

تصریح شرقي خاص بالالتزام بقواعد النزاهة العلمية
لإنجاز البحث

أنا الممضي أدناه،

الطالب(ة): سلطان الكسران رقم التسجيل الجامعي: 20237028279
الحامل لبطاقة التعريف الوطنية رقم: 11.9.14.85.165 والصادرة بتاريخ: 2021/01/23
عن: الثورة مستغانم

المسجل بكلية علوم الطبيعة والحياة / قسم البيولوجيا

شعبة علوم بيولوجية / التخصص علوم الصيدلة والسموم

والمكلف بإنجاز مذكرة ماستر بعنوان:

Optimisation de l'extraction des polyphenols à partir des feuilles
d'Agavea eupatoria L.

أصرح بشرقي أنني ألتزم بمراعاة المعايير العلمية والمنهجية ومعايير الأخلاقيات العلمية والنزاهة الأكاديمية
المطلوبة في إنجاز البحث ، وأتحمل المسؤولية الشخصية عن كل المحتوى المتضمن في البحث المذكور أعلاه .

التاريخ:

إمضاء المعني

* ملحق القرار الوزاري رقم 933 المؤرخ في 28 جويلية 2016 الذي يحدد القواعد المتعلقة بالوقاية من السرقة العلمية ومكافحتها.