



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la
vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Biochimie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :
Chaima LAKHDARI et Imene GUERNI
Le : 10 /10/2020

Thème

Impact d'extraction et de fractionnement sur l'activité antioxydante d'*Equisetum arvense* L.

Jury :

Mme.	Hafid BELKHARCHOICHE	MCB	Université de Biskra	Président
Dr.	Hayat TRABSA	MCB	Université de Biskra	Rapporteur
Mme.	Ismahane LABBOUZ	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2019 - 2020

Remerciements

On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement du Dr. Trabsa Hayat, on le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire, malgré les conditions de santé que nous avons traversées

Aux membres de jury pour avoir sacrifié de leur temps, accepter d'examiner cette mémoire.

Je remercie toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail

Dédicace

*C'est avec grande gratitude et des mots sincères que je dédie ce
modeste travail de fin d'étude à mes chers parents qui ont sacrifié
leur vie pour ma réussite*

*A mon père pour avoir toujours cru en moi et pour ses nombreux
sacrifices*

*À ma mère, pour ses encouragements, son soutien et sa confiance en
mes capacités*

*J'espéré qu'un jour je pourrai leurs rendre un peu de ce qu'ils ont
fait pour moi, que dieu leur prête bonheur et longue vie*

*Je dédie aussi ce travail à mes sœurs et mon frère Pour me tenir à
côté de moi et me soutenir moralement*

A tous ceux que j'aime

Imene

Dédicace

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur : mamans que j'adore.

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, qui dieu te garde dans son vaste paradis, a toi mon père.

Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour, a mes frères Zouzou et Mohamed et Karim et mes sœurs : Samia Selma, Imene et Hadil, et mes nièces et neveux, je dédie ce travail dont le grand plaisir leur revient en premier lieu pour leurs conseils, aides, et encouragements.

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours a mes côtés, et qui m'ont accompagné durant mon chemin d'études, mes aimables amis, collègues d'études, et sœurs de cœur Fatiha, Hanane et Djoumana.

Chaima

Table des matières

Liste des Tableaux.....	I
Liste des Figures.....	II
Liste des abréviations	III
Introduction.....	1
Partie 1 Synthèse bibliographique	1
1. Stress oxydant	3
1.1. Généralité.....	3
1.2. Radicaux libres.....	3
1.3. Formes des radicaux libres	3
1.3.1. Espèces réactives de l’oxygène (ERO).....	3
1.3.2. Espèces réactives de l’azote (ERN).....	4
1.4. Sources des radicaux libres.....	4
1.4.1. Sources exogènes.....	4
1.4.2. Sources endogènes.....	5
1.5. Rôles physiologique et pathologique des radicaux libres.....	5
1.6. Antioxydants	6
1.6.1. Antioxydants enzymatiques	6
1.6.2. Antioxydants non enzymatiques.....	7
1.6.2.1. Vitamine C (acide ascorbique).....	7
1.6.2.2. Vitamine E	7
1.6.2.3. Polyphénols.....	7
1.7. Flavonoïde	7
2. Propriété biologique d’ <i>Equisetum arvense</i> L.....	8
2.1. Description.....	8
2.1. Utilisations traditionnelles	8
2.2. Classification taxonomique	9
Partie 2 Partie expérimentale	3
Chapitre 1 Matériel et Méthodes	3
2. Matériel	11
2.1. Matériel biologique	11
2.1. Produits chimiques	11
2.1. Appareillage.....	11

2. Méthodes.....	11
2. 1. Préparation de matériel biologique	11
2. 2. Préparation des extraits bruts d' <i>Equisetum arvense</i> L.	11
2.2.1. Préparation des extraits bruts aqueux	11
2.2.1.1. Infusion.....	11
2.2.1.2. Décoction.....	12
2.2.2. Préparation des extraits bruts organiques.....	12
2.2.2.1. Macération	12
2.2.2.2. Soxhlet	13
2.2.2.3. Préparation des fractions bruts des solvants organiques	14
2.2.3. Fractionnement des biomolécules d' <i>Equisetum arvense</i> L.	14
2.2.3.1. Fractionnement par macération successive du broyat	14
2.2.3.2. Fractionnement du broyat par le soxhlet	15
2.2.3.3. Fractionnement par lavage liquide-liquide	16
2.3. Dosage des flavonoïdes des EBrS et des Fractions d' <i>Equisetum arvense</i> L.....	16
2.4. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH) d' <i>Equisetum arvense</i> L.	16
2.4. Analyses statistiques	17
Chapitre 2 Résultats et Discussion	11
3.1. Rendement des extractions	19
3.1.1. Rendement des EBrS d' <i>Equisetum arvense</i> L.	19
3.1.1.1. Rendement des extraits bruts aqueux	20
3.1.1.2. Rendement des extraits bruts organiques	21
3.1.1.3. Rendement des fractions bruts des solvants organiques.....	22
3.1.2. Rendement du fractionnement des biomolécules d' <i>Equisetum arvense</i> L.	23
3.1.2.1. Rendement de fractionnement par macération successives du broyat	24
3.1.2.2. Fractionnement par le soxhlet du broyat	25
3.1.2.3. Rendement de fractionnement liquide-liquide d'EBr-HA.....	26
3.2. Dosage des flavonoïdes	27
3.2.1. Dosage des flavonoïdes des EBrS d' <i>Equisetum arvense</i> L.	27
3.2.1.1. Dosage des flavonoïdes des EBrS aqueux	27
3.2.1.2. Dosage des flavonoïdes des extraits bruts organiques	28
3.2.1.3. Dosage des flavonoïdes des fractions bruts des solvants organiques	29
3.2.2. Dosage des flavonoïdes des fractionnements.....	30
3.3. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH).....	31
3.3.1. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH) des EBrS d' <i>Equisetum arvense</i> L.	31

3.3.1.1. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH) des EBrS aqueux	31
3.3.1.2. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH) des EBrS organique	33
3.3.1.3. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH) des fractions brut des solvants organique	35
3.3.2. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH) des fractions	36
3.3.2.1. Fractionnement par macération et soxhlet	36
3.3.2.2. Fractionnement par lavage liquide-liquide	36
Conclusion	40
Bibliographie	40
Annexes	48

Liste des Tableaux

Tableau 1. Principale source des ERO.....	3
Tableau 2. Principale source des ERN.....	4
Tableau 3. Facteurs exogènes de production des radicaux libres.	4
Tableau 4. Rôle physiologique et pathologique des radicaux libres.	6
Tableau 5. Déférénte antioxydants enzymatiques.	6
Tableau 6. Classification taxonomique d' <i>Equisetum arvense</i> L.....	9
Tableau 7. Préparation des extraits bruts aqueux.....	12
Tableau 8. Préparation des extraits bruts d' <i>Equisetum arvense</i> L.....	19
Tableau 9. Rendement des extraits bruts aqueux.....	20
Tableau 10. Rendement des extrais bruts aqueux de quelque plante médicinale.	20
Tableau 11. Rendements des extraits bruts organiques.....	21
Tableau 12. Propriétés physico-chimiques d'éthanol et méthanol.	21
Tableau 13. Préparation des fractions.	24
Tableau 14. Rendement des fractions issues de macération.....	25
Tableau 15. Rendement de fractionnement par soxhlet.	25
Tableau 16. Rendement des fractions issues de lavage liquide-liquide.	26
Tableau 17. Dosage des flavonoïdes des extraits aqueux.....	28
Tableau 18. Dosage des flavonoïdes des extrais organiques.....	28
Tableau 19. Taux des flavonoïdes d'une plante médicinale.	29
Tableau 21. IC ₅₀ d'activité anti-radicalaire <i>vis-à-vis</i> le DPPH des extraits des plantes.....	33
Tableau 22. IC ₅₀ des extrais organique de quelque plante médicinale.	35

Liste des Figures

Figure 1. Origine extracellulaire et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène.....	5
Figure 2. Structure générale do noyaus des flavonoides.	8
Figure 3. Aspect morphologique d <i>Equisetum arvense</i> L.....	8
Figure 4. Appareil d'extraction Soxhlet.	13
Figure 5. Schéma de fractionnement par macération.	15
Figure 6. Rendement des EBr des solvants à polarité croissante.....	23
Figure 7. Courbe d'étalonnage d'interaction de la quercétine avec l'AlCl ₃	27
Figure 8. Dosage des flavonoïdes des EBr des solvants a polarité croissante.....	29
Figure 9. Dosage des flavonoïdes deux types de fractionnement	30
Figure 10. Teneur en flavonoïdes des fractions d'EBr-HA par lavage liquide-liquide.....	31
Figure11. Effet de piégeage des radicaux DPPH par un antioxydant(AH).....	32
Figure 12. Courbes d'activité anti-radicalaire des quatre extraits aqueux d' <i>Equisetum arvense</i> L.....	32
Figure 13. IC ₅₀ du radical DPPH par les EBr aqueux.....	33
Figure 14. Courbes d'activité anti-radicalaire des Cinq extraits organique d' <i>Equisetum arvense</i>	34
Figure 15. IC ₅₀ du radical DPPH par les EBr organiques.	34
Figure 16. IC ₅₀ du radical DPPH par les EBr du solvant à polarité croissante.	35
Figure 17. IC ₅₀ du radical DPPH par les fractions obtenir par macération successive et soxhlet successive.....	36
Figure 18. IC ₅₀ du radical DPPH par les EBr-HA et ces fractions par lavage liquide-liquide	37

Liste des abréviations

AC	Absorbance en absence de l'inhibiteur
AE	Absorbance en présence de l'inhibiteur
ALCL₃	Trichlorure d'aluminium
CAT	Catalase
DPPH	Diphenylpicrylhydrazyl
EBr	Extrait brut
EBr- Ae	Extrait brut acétate d'éthyle
EBr- Eth	Extrait brut éthanol
EBr- Ch,	Extrait brut chloroforme
EBr-D₁	Extrait brut infusion
EBr-D₂	Extrait brut décoction 2min
EBr-D₃	Extrait brut décoction 10 min
EBr-D₄	Extrait brut décoction 30 min
EBr-HA	Extrait brut hydro-alcoolique
EBr-Meth	Extrait brut méthanol
E-SMé	Extrait brut méthanol soxhlet
F-ElI –Ae	Fraction par macération par lavage liquide liquide acétate d'éthyle
F-ElI –Aq	Fraction par macération par lavage liquide liquide aqueux
F-ElI –Ch	Fraction par lavage liquide liquide chloroforme
F-ElI –Hx	Fraction par lavage liquide liquide hexane
F-Mc-Ae	Fraction par macération acétate d'éthyle
F-Mc-Ch,	Fraction par macération chloroforme
F-Mc-HA	Fraction par macération hydro-alcoolique
F-Mc-Hx	Fraction par macération hexane
F-SAe	Fraction par soxhlet acétate d'éthyle
F-SCh	Fraction par soxhlet chloroforme
F-SHA	Fraction par soxhlet hydro-alcoolique
F-SHx	Fraction par soxhlet hexane
GPX	Glutathion peroxydase
IC₅₀	Concentration inhibitrice de 50 %
N₂O₃	Anhydride nitreux
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NO[·]	Monoxyde d'azote
ONOO[·]	Ion peroxydinitrite
ERN	Espèces réactives d'azotes
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
SOD	Superoxyde dismutase
%	Pourcentage
% I	Pourcentage d'inhibition

Introduction

Depuis quelques années, le marché des thérapeutiques dites naturelles progresse, révélant un intérêt de plus en plus fort des patients à l'égard de la médication à base de plantes. Les plantes médicinales constituent des ressources précieuses pour la majorité des populations rurale et urbaine en Afrique et représentent le principal moyen par lequel les individus se soignent. Malgré les progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement (Hamel *et al.*, 2018). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, plus de 80 % de la population mondiale a recours à la médecine dite traditionnelle pour faire face à ses problèmes de santé (Bohui *et al.*, 2018).

Le stress oxydant est une circonstance anormale que traversent parfois nos cellules ou un de nos tissus lorsqu'ils sont soumis à une production, endogène ou exogène, de radicaux libres oxygénés qui outrepassent leurs capacités antioxydantes. L'excès de radicaux libres non neutralisés par les moyens de défense est très dommageable pour les macro biomolécules essentielles, entraînant anomalies d'expression des gènes et des récepteurs membranaires, prolifération ou mort cellulaire, troubles immunitaires, mutagenèse, dépôts de protéines ou de lipofuscine dans les tissus (Favier, 2006).

Le stress oxydant est lié à de nombreuses pathologies, par exemple l'athérosclérose, les cancers, le diabète de type 2, les maladies neurodégénératives et rhumatismales. C'est pour cela que la recherche sur les antioxydants dans les plantes s'est beaucoup développée ces dernières années, afin de permettre de trouver les meilleurs antioxydants possibles dans l'espoir de protéger notre santé et même guérir ces différentes maladies (Guillouty, 2016).

Les extraits bruts des plantes commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Ils font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses et pour la protection des aliments contre l'oxydation. Et comme des anti-inflammatoires, et des anti-analgésiques. (Yakhlef *et al.*, 2011). La qualité alimentaire ou thérapeutique d'un extrait naturel est liée à l'efficacité et la sélectivité du procédé d'extraction utilisé. Les techniques conventionnelles d'extraction des polyphénols impliquent différents solvants et divers procédés : macération, soxhlet, chauffage conventionnel, infusion...etc. (Nkhili, 2009).

À partir des plusieurs études qui s'intéressent à étudier les différentes méthodes d'extraction, nous avons l'idée d'étudier l'influence de ces méthodes et solvants utilisés sur le

rendement d'extraction, dosage des molécules bioactifs (polyphénols, flavonoïdes et tannins) et plusieurs activités biologiques comme l'activité antibactérienne, antioxydante *in vitro* et d'autre activité *in vivo*, pour cela nous avons fait l'adaptation de 120 souris male et 60 femelle (25 a 30g) pendant 15 jours. En raison de la pandémie mondiale (Corona-virus 2019), un confinement a été imposée, nous sommes obligés d'arrêter nos travaux le 12 mars 2020, à cause de ça nous avons étudié seulement l'influence de ces technique sur le rendement, dosage des flavonoïdes et l'activité antioxydante par un seul teste des déférentes extraits et fractions d'*Equisetum arvense* L .nommé localement de Prêle des champs, qui appartiennent à la famille *Equisetaceae*. Elle est parmi les familles des plantes les plus utilisées traditionnellement comme source mondiale d'extraits à qualité médicale intéressante.

Dans ce contexte, l'objectif principal de cette étude est d'élucider la comparaison entre les extrais bruts d'*Equisetum arvense* L. obtenue par des déférentes technique d'extraction (décoction, infusion chaude, macération et le soxhlet), sous diverses conditions (température, temps d'extraction) et différente solvants (eau, méthanol, éthanol, hydro-alcoolique et par l'utilisation des solvants polarité croissante), et dans l'autre part la comparaison entre les fractions obtenue par plusieurs méthodes de fractionnements (fractionnement par macération successive, soxhlet et lavage liquide-liquide) pour le but d'obtenue une fraction plus actif. Puis l'impact de ces méthodes d'extraction et fractionnements sur le rendement, le dosage des flavonoïdes l'activité antiradicalaire (DPPH) d'*Equisetum arvense* L.

Partie 1

Synthèse bibliographique

1. Stress oxydant

1.1. Généralité

L'oxydation est un processus essentiel pour plusieurs organismes vivants, à la production d'énergie nécessaire aux processus biologiques (Jothy *et al.*, 2011).

Il y'a quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est préoccupé par un nouveau concept, le stress oxydant c'est-à-dire une situation où la cellule ne contrôle pas la présence excessive des radicaux libres toxiques (Favier, 2003).

Le stress oxydant est communément défini comme un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités anti-oxydants d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire (Barouki, 2006).

1.2. Radicaux libres

Un radical libre est une espèce, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Ce déséquilibre n'est que transitoire, et il est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron soit par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule (Cano *et al.*, 2006).

Ces espèces radicalaires très instables et très réactives, sont produites d'une manière continue au sein de notre organisme, dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques (Aurousseau, 2002).

1.3. Formes des radicaux libres

1.3.1. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des radicaux libres issus de l'oxygène moléculaire (Tableau 1). Elles représentent la plus importante classe d'espèces réactives générées dans les organismes vivants, à cause de l'importance du métabolisme aérobie (Valko *et al.*, 2007).

Les ERO sont des médiateurs importants de la signalisation pendant divers processus biologiques, ils sont produits en réponse à des divers stimulus, y compris des facteurs de croissance, des cytokines et des facteurs chimiotactiques (Zhou *et al.*, 2013).

Tableau 1. Principale source des ERO (Valko *et al.*, 2007).

Nom	Symbole
Radical hydroxyle	OH^\cdot
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Anion superoxyde	O_2^\cdot
Oxygène singulet	1O_2

1.3.2. Espèces réactives de l'azote (ERN)

Le monoxyde d'azote (NO^\cdot) molécule gazeuse hautement diffusible, est présent dans tous les types de cellules. De nombreuses fonctions lui ont été découvertes : messager, neurotransmetteur, détecteur d'oxygène, protecteur cellulaire (Massion *et al.*, 2002) (Tableau 2).

Tableau 2. Principale source des ERN (De Marco, 2013).

Nom	Symbole
L'anhydride nitreux	$\text{N}_2\text{O}_3^\cdot$
L'ion peroxydinitrite	ONOO^\cdot

1.4. Sources des radicaux libres

1.4.1. Sources exogènes

Les facteurs exogènes associés à une production accrue et/ou à une diminution de l'élimination de radicaux libres sont également très variés (Moller *et al.* 1996) (Tableau 3).

Tableau 3. Facteurs exogènes de production des radicaux libres.

Facteurs externes	Références
Le rayonnement ultraviolet (UV)	UV absorbés par des chromophores qui vont alors être excités pour fournir un oxygène singulet. Ils réduisent également l' O_2 en O_2^\cdot qui sera rapidement transformé par l'enzyme superoxyde dismutase en H_2O_2 qui sera réduit à son tour en OH, réagit avec les protéines, les lipides et l'ADN (Guillouty, 2016)
Pollution, ozone (O_3)	O_3 favorise aussi la migration des polynucléaires neutrophiles à la surface de l'épithélium respiratoire par chimio-attraction, cela favorise la production d'ERO, O_3 également à l'origine d'une réponse inflammatoire favorisant le stress oxydant (Baeza et Marano, 2007)
Fumée de tabac	Les radicaux libres provenant de la fumée de cigarette provoquent un stress oxydatif, qui entraîne la séquestration des macrophages et des polynucléaires neutrophiles, la peroxydation lipidique et une activation des cytokines pro-inflammatoires. (Selby et al., 1991)
Herbicides, Pesticides	La toxicité des pesticides est due à la production des radicaux libres, les voies de détoxification enzymatiques sont saturées, alors développement d'un stress oxydatif. (Bus <i>et al.</i> , 1984)

1.4.2. Sources endogènes

La production des ERO dans les cellules des mammifères est essentiellement d'origine enzymatique et résulte de plusieurs sources : la Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase membranaire et le complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire (Phaniendra *et al.*, 2015). D'autres sources, cytosoliques ou présentes au sein de différents organites cellulaires, peuvent également jouer un rôle dans la modulation de la signalisation intracellulaire: xanthine oxydase, enzymes de la voie de l'acide arachidonique (lipoxygénases, cyclo-oxygénases), enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochromes P450) et peroxyosomes. Les NO synthases sont quant à elles, à l'origine de la synthèse du radical NO^\cdot , mais elles peuvent aussi dans certaines conditions (faible concentration en L-arginine ou en cosubstrat réduit, la tétrahydrobioptérine...) produire des O_2^\cdot (Figure 1) (Beaudeau *et al.*, 2006).

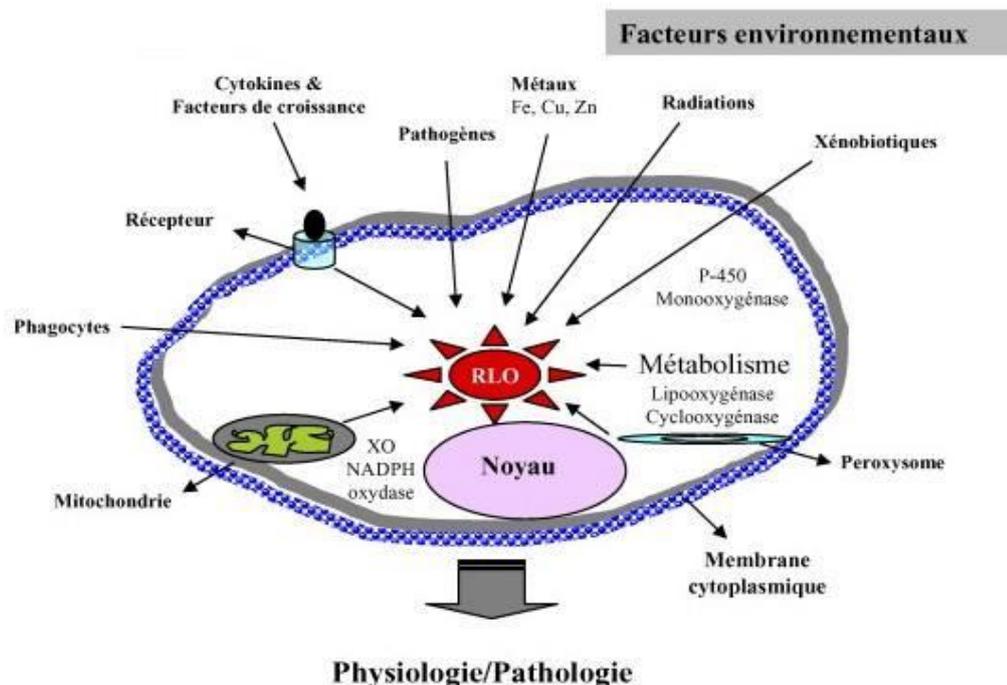


Figure 1. Origine extracellulaire et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène (Afonso *et al.*, 2007).

1.5. Rôles physiologique et pathologique des radicaux libres

Le rôle des radicaux libres est très complexe, car elles peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration (Tableau 4). Dans des conditions normales, elles sont générées en faible quantité et jouent un rôle de messagers

secondaires capables, notamment, de réguler le phénomène de l'apoptose ou d'activer des facteurs de transcription (Haleng *et al.*, 2007).

Tableau 4. Rôle physiologique et pathologique des radicaux libres.

Rôle	Références
Physiologique	Activateurs/régulateurs dans les voies de signalisation (Zhang et Gutterman, 2007)
	La régulation du tonus vasculaire La relaxation du muscle lisse L'adhésion plaquettaire (Migdal et Serres, 2011)
	La régulation des fonctions contrôlées par la concentration en oxygène et l'apoptose (Droge, 2002)
	Défense antimicrobienne (bactéricidie dépendante de l'oxygène) (Stasia, 2007)
	Pathologique
Diabète de type 2 (Valko <i>et al.</i> , 2007)	
Maladies neurodégénératives (Ciasson <i>et al.</i> , 2000)	
Athérosclérose (Migdal et Serres, 2011)	
Vieillessement (Barouki, 2006)	

1.6. Antioxydants

Les antioxydants sont des molécules ayant la capacité de neutraliser des radicaux libres. Ils sont des composés qui inhibent ou retardent le processus d'oxydation en bloquant l'initiation ou la propagation des chaînes de réactions oxydatives (Bourgou, 2016).

1.6.1. Antioxydants enzymatiques

Les antioxydants endogènes sont principalement les enzymes superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase (Tableau 5). Dont les mécanismes sont développés plus haut. La deuxième partie permet d'appréhender les antioxydants exogènes qui sont, par définition, apportés de l'extérieur par exemple par l'alimentation (Guillouty, 2016).

Tableau 5. Différents antioxydants enzymatiques.

Enzyme	Abréviation	Position	Réaction catalysée	Référence
Superoxyde dismutase	SOD	Mitochondrie.	$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \Rightarrow H_2O_2 + O_2$	(Murley <i>et al.</i> , 2001)
Catalase	CAT	Peroxisome	$2 H_2O_2 \Rightarrow 2 H_2O + O_2$	(Jyoti <i>et al.</i> , 2018).
Glutathion peroxydase	GPX	Mitochondries et dans le cytosol	$2 GSH + H_2O_2 \Rightarrow GSSG + 2 H_2O$	(Zerargui, 2015)

1.6.2. Antioxydants non enzymatiques

1.6.2.1. Vitamine C (acide ascorbique)

La vitamine C ou acide ascorbique est hydrosoluble et considérée comme étant l'antioxydant naturel le plus puissant. Les aliments ayant la plus grande teneur en vitamine C sont les agrumes, les kiwis et les légumes (brocolis, chou-fleur). Elle piège les radicaux pyroxylés en phase aqueuse avant qu'ils initient la réaction de peroxydation lipidique protégeant ainsi les membranes et les lipoprotéines (Gulcin, 2012).

1.6.2.2. Vitamine E

Vitamine E est le principal antioxydant dans les membranes des cellules, en particulier celles des mitochondries. Elle agit directement sur une grande variété d'ERO pour former un radical peu réactif. Par la suite la vitamine E oxydée pourra être reconvertie par la vitamine C et également par d'autres composés comme la vitamine A (Kada, 2018).

1.6.2.3. Polyphénols

Les polyphénols ou composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. Se trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits (He *et al.*, 2008). Leurs fonctions ne sont pas strictement indispensables à la vie du végétal, cependant ces substances jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement, contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème. Le terme « phénol » englobe approximativement 10000 composés naturels identifiés. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau phénolique à 6 carbones, auquel est directement lié au moins un groupe OH libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside (Balasundram *et al.*, 2006).

Les polyphénols possèdent des propriétés antioxydants, et sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formes en réponse à des agressions de notre environnement (Edeas, 2007).

1.7. Flavonoïde

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6 000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires (Ghedira, 2005). Sont définis par leur squelette chimique composé de 15 atomes de carbones, constitué de deux noyaux benzéniques A et B reliés par un cycle pyranique central C. Ils diffèrent les uns des autres par la position des substitutions sur les noyaux A et B, et la nature de C. Les flavonoïdes sont répartis en différentes catégories (Annexe 1) dont les plus importantes sont les flavonols, les flavones, les flavanols, les isoflavones, les flavanones, et les anthocyanes (Saffidine, 2015).

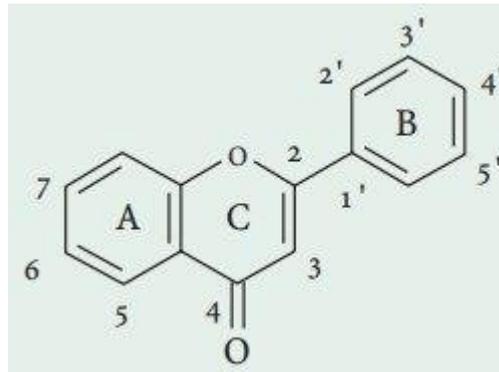


Figure 2. Structure générale du noyau des flavonoïdes (Ghedira, 2005).

2. Propriété biologique d'*Equisetum arvense* L.

2.1. Description

Equisetum arvense L. est une plante médicinale originaire d'Europe et qui se trouve couramment dans les Amériques, l'Afrique du Nord et l'Asie (Carneiro, 2013). Considéré comme une plante herbacée vivace (Bordbar, 2017). Comporte des tiges fertiles terminées par un épi sporangifère roux, ovale et des tiges stériles creuses, cannelées, articulées. Aux nœuds, sont insérées des feuilles verticillées, de taille réduite, en forme de dents soudées à noire, ces feuilles forment une gaine autour de la tige (Ghedira, 2010) (Figure 3).



Figure 3. Aspect morphologique d'*Equisetum arvense* L. (Asgarpanah, 2012).

2.1. Utilisations traditionnelles

L'*Equisetum arvense* L. était utilisé traditionnellement pour la tuberculose, comme catarrhe dans les régions des reins et de la vessie, les hémorragies nasales, pulmonaires et gastriques, pour les ongles cassants et la perte de cheveux (Esmail, 2017). Comme un

diurétique doux, antioedémateux (Carneiro, 2013). A également une capacité antioxydant élevée ainsi que des effets antimicrobiens, (Milovanović *et al.*, 2007).

2.2. Classification taxonomique

La compréhension des systèmes de classement permet à la fois de distinguer les différents taxons mais aussi de faire des rapprochements parmi ceux qui se ressemblent ou sont apparentés. Permet aussi de faciliter l'identification de la plante recherchée, et du même coup avoir un éclairage sur les propriétés et caractéristiques morphologiques des différentes plante (Richard, 2005) (Tableau 6).

Tableau 6. Classification taxonomique de l'*Equisetum arvense* L. (Ali Esmail, 2017).

Royaume	Plantae
Sous-royaume	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Equisetophyta</i>
Classe	<i>Equisetopsida</i>
Ordre	<i>Equisetales</i>
Famille	<i>Equisetaceae</i>
Genre	<i>Equisetum</i>
Espèce	<i>Equisetum arvense</i>

Partie 2

Partie expérimentale

Chapitre 1

Matériel et Méthodes

2. Matériel

2.1. Matériel biologique

La partie aérienne de l'*Equisetum arvense* L. a été collecté au mois de juillet 2019 (Jijel), et récupérée à l'abri de la lumière. Un voucher a été préparé et identifié par le Prof. Oudjih Bachir (Département d'agronomie, université de Batna).

2.1. Produits chimiques

Les produits utilisés dans la préparation de ce travail : chloroforme a été obtenues de LOBA CHEMIE PVT.LTD (CHCL₃), Acétate d'éthyle (C₄H₈O₂), Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH), hexane(C₆H₁₄), quercitrine ont été obtenues de SIGMA-ALDRICH, méthanol (CH₃OH), éthanol(CH₃CH₂OH) ont été obtenues de EMSURE.

2.1. Appareillage

Balance numérique (SCOUT SE-OHAUS), balance analytique (KERN-ABJ), rotavapeur (HEIDOLPH), spectrophotomètre UV-Visible (JENWAY6300, UV-2005 J.P. SELECTA). Vortex (VELP SCIENTIFICA), plaque chauffante (ISOLABO), agitateur (HANNA).

2. Méthodes

2. 1. Préparation de matériel biologique

La parties aériennes de l'*Equisetum arvense* L. a été nettoyé et séché à température ambiante et à l'ombre, en suite broyé à l'aide d'un mortier. Pour obtenir le broyat de plante.

2. 2. Préparation des extraits bruts d'*Equisetum arvense* L.

2.2.1. Préparation des extraits bruts aqueux

2.2.1. 1. Infusion

Le broyat (10 g) a été infusé dans 150 ml d'eau distillé chaude (100°C), chauffé par une plaque chauffante. Le mélange a été laissé refroidir, ensuite filtrer à l'aide de papier filtre et le marca été jeté.

Le filtrat obtenu mis à l'évaporation à 55°C pour éliminer le maximum du solvant, ensuite séché dans des boites pétries en verre par utilisation de l'étuve à 55 °C et conservé à 4°C. Cette expérience a été effectué à l'abri de la lumière et répéter 2 fois (Cheufa *et al.*, 2015).

2.2.1.2. Décoction

Le broyat (10 g) a été mis avec 150 ml d'eau distillée chaude (100°C), le mélange a été chauffé par une plaque chauffante jusqu'à ébullition pendant 2 min, 10 min et 30 min (200ml) pour éviter l'évaporation total d'eau. Les mélanges laissés refroidis, et filtrés à l'aide des papiers filtre le marc a été jeté ensuite l'extrait a été évaporé à 55°C (rotavapor) et séché à 45°C (étuve), et finalement conservé à 4°C. Chaque expérience a été répéter 2 fois (Bourgoui, 2016 ; Zahoui *et al.*, 2010). Les extraits bruts aqueux de cette plante ont été résumés dans le tableau 7.

Tableau 7. Préparation des extraits bruts aqueux.

Type d'extraction	Code	Conditions
Infusion chaude	EBr-D ₁	10 g de plante. V _{H₂O} =150 ml (100 °C), Laisse refroidir pendant 20 min
	EBr-D ₂	10 g de plante. V _{H₂O} =150 ml (100 °C). Ebullition pendant 2 min
Décoction	EBr-D ₃	10 g de plante. V _{H₂O} =150 ml (100 °C) Ebullition pendant 10 min
	EBr-D ₄	10 g de plante. V _{H₂O} =200 ml (100 °C) Ebullition pendant 30 min

2.2.2. Préparation des extraits bruts organiques

Dans cette étude l'extraction de la majorité des molécules solubles dans les solvants organique a été réalisée par deux techniques, la macération (en utilisant l'éthanol, le méthanol et un mélange d'éthanol/H₂O distillé) et le Soxhlet (en utilisant le méthanol).

2.2.2.1. Macération

Deux extraction alcooliques (éthanolique et méthanolique) ont été utilisé, le broyat (10 g) a été macérés avec 150 ml d'éthanol, le mélange a été laissé macérer pendant 12h sous agitation à 4°C à l'abri de la lumière. Ensuite le mélange a été filtré à l'aide d'un papier filtre, le filtrat obtenu a été conservé à 4°C tandis que le marc a été soumis à une deuxième extraction éthanolique (150 ml), le deuxième filtrat a été mélangé avec le premier et le deuxième marc a été jeté. Les deux filtrats obtenus ont été mis à une évaporation rotative à 40°C pour éliminer le maximum de l'éthanol (Trabsa *et al.*, 2015). L'extrait obtenu (EBr-Eth) a été séché et conservé à 4°C jusqu'à son utilisation. De la même manière, l'extraction a été effectuée par utilisation de méthanol et l'extrait obtenu a été codé comme l'EBr-Meth, (chaque extraction a été répétée deux fois).

Une autre extraction hydro-alcoolique a été réalisée, 10 g de broyat a été macéré avec 150 ml éthanol/eau (80/20 %). Le mélange a été laissé macérer pendant 12 h sous agitation à 4°C à l'abri de la lumière. Ensuite filtré à l'aide d'un papier filtre. Le filtrat obtenu a été conservé à 4°C tandis que le marc a soumis à une deuxième extraction avec 150 ml de éthanol/eau (50/50 %), ensuite filtré à l'aide d'un papier filtre, le deuxième filtrat a été

mélangé avec le premier et le deuxième marc a été jeté. Les deux filtrats obtenus ont été mis à l'évaporation à 40°C par le rotavapeur. L'extrait obtenu est considéré comme étant l'extrait brut hydro-alcoolique (EBr-HA), un volume de ce dernier a été séché et conservé à 4°C l'autre partie subie à un fractionnement liquide-liquide avec différents solvants organiques à polarité croissante (Amrani *et al.*, 2014).

2.2.2.2. Soxhlet

Une quantité du broyat (20 g) a été déposée dans une cartouche (en papier filtre) et soumis à une extraction méthanolique en utilisant le Soxhlet (Figure 4). Un volume du méthanol (350 ml) a été versé dans le ballon, le matériel végétal a été soumis à 4 cycles d'extraction à 40°C. L'extrait obtenu nommé comme extrait brut méthanolique de soxhlet (EBr-SMé) a été évaporer (40 °C) par le rotavapeur, séché à l'aide d'étuve (40 °C) et finalement conservé à 4°C (Harnafi *et al.*, 2010).

Dans un système conventionnel de Soxhlet comme montré dans la figure 4, la matière végétale est placée dans une cartouche, et remplie de solvant frais condensé à partir d'un ballon à distiller. Quand le liquide atteint le niveau de débordement, un siphon aspire la solution de la cartouche et la décharge de nouveau dans le ballon à distiller, portant les molécules d'extraits dans le liquide. L'opération est répétée jusqu'à ce que l'extraction complète soit réalisée (Amor, 2008).

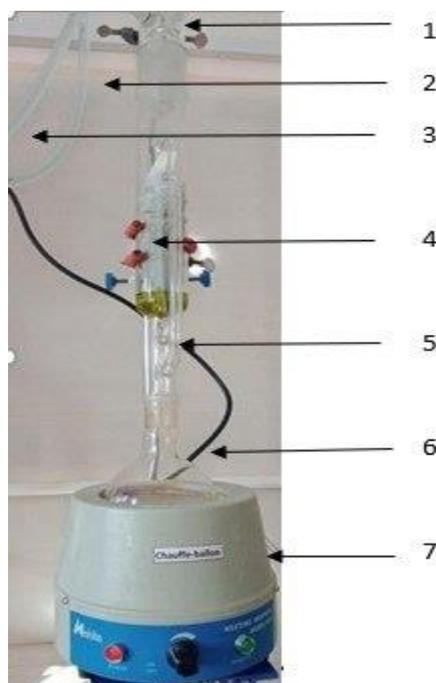


Figure 4. Appareil d'extraction Soxhlet. 1 : réfrigérant, 2 : l'entrée d'eau froid, 3 : sortie d'eau chauffé 4 : cartouche, 5 : siphon, 6 : ballon, 7 : chauffe ballon. Le système de refroidissement a été assuré manuellement par des bacs de glaces et une pompe.

2.2.2.3. Préparation de fractions brutes des solvants organiques

Dix grammes de broyat ont été macérés avec 150 ml d'hexane, le mélange a été laissé macérer pendant 12h sous agitation à 4°C à l'abri de la lumière. Ensuite, le mélange a été filtré à l'aide d'un papier filtre, le filtrat obtenu a été conservé à 4°C tandis que le marc a été soumis à une deuxième extraction (150 ml de solvant), le deuxième filtrat a été mélangé avec le premier et le deuxième marc a été jeté. Le mélange des deux filtrats obtenus a été mis à une évaporation à 40°C pour éliminer le maximum de solvant. L'extrait obtenu est considéré comme étant brut d'hexane (EBr-Hx) (Mezouar *et al.*, 2014), et par les mêmes étapes et à chaque fois on utilise 10 g de broyat de la plante avec des solvants organique : chloroforme, acétate d'éthyle, les extraits obtenus sont : EBr-Ch, EBr-Ae, respectivement.

2.2.3. Fractionnement des biomolécules d'*Equisetum arvense* L.

Dans ce travail plusieurs techniques de fractionnement ont été réalisées (fractionnement d'extrait brut ou bien fractionnement à partir du broyat de cette plante) résumées comme suivant :

2.2.3.1. Fractionnement par macération successive du broyat

La préparation des fractions organiques a été effectuée par épuisement successif du matériel végétal par trois solvants organiques à polarités croissantes hexane, chloroforme, acétate d'éthyle et un mélange hydro-éthanolique (80/20 %, 50/50 %), successivement. Le broyat (10 g) a été macéré avec 150 ml d'hexane, pendant 12 h sous agitation à 4°C à l'abri de la lumière, ensuite filtré à l'aide d'un papier filtre, le filtrat obtenu a été conservé à 4°C tandis que le marc a été soumis à une deuxième extraction par le même solvant (150 ml d'hexane), après la filtration le marc obtenu (Marc 1) a été soumis à une deuxième extractions et le deuxième filtrat a été mélangé avec le premier. (Yakhlef *et al.*, 2011). Le marc 1 a été soumis à une autre macération en suivant les mêmes étapes décrites précédemment en utilisant le chloroforme pour l'obtention de filtrat de chloroforme (évaporé à 40°C) et le marc 2. Ce dernier a été soumis à une troisième et quatrième macération (en respectant les mêmes étapes et conditions) en utilisant l'acétate d'éthyle et le mélange hydro-alcoolique, respectivement (Figure 5). Il faut noter que chaque macération a été répétée deux fois pour le même marc en utilisant le même solvant sauf que pour l'hydro-alcoolique la première et la deuxième macération ont été réalisé en utilisant un mélange d'éthanol/eau (80/20,50/50%), respectivement. Les deux filtrats de chaque macération ont été mélangés, évaporés rotativement (40°C), séchés (45°C) et conservés à 4°C jusqu'à leurs utilisations. Les fractions obtenus par l'utilisation des solvants : hexane, chloroforme, acétate d'éthyle ont été codé

comme: F-Mc-Hx, F-Mc-Ch, F-Mc-Ae et F-Mc-HA, respectivement la technique de fractionnement a été répétée deux fois).

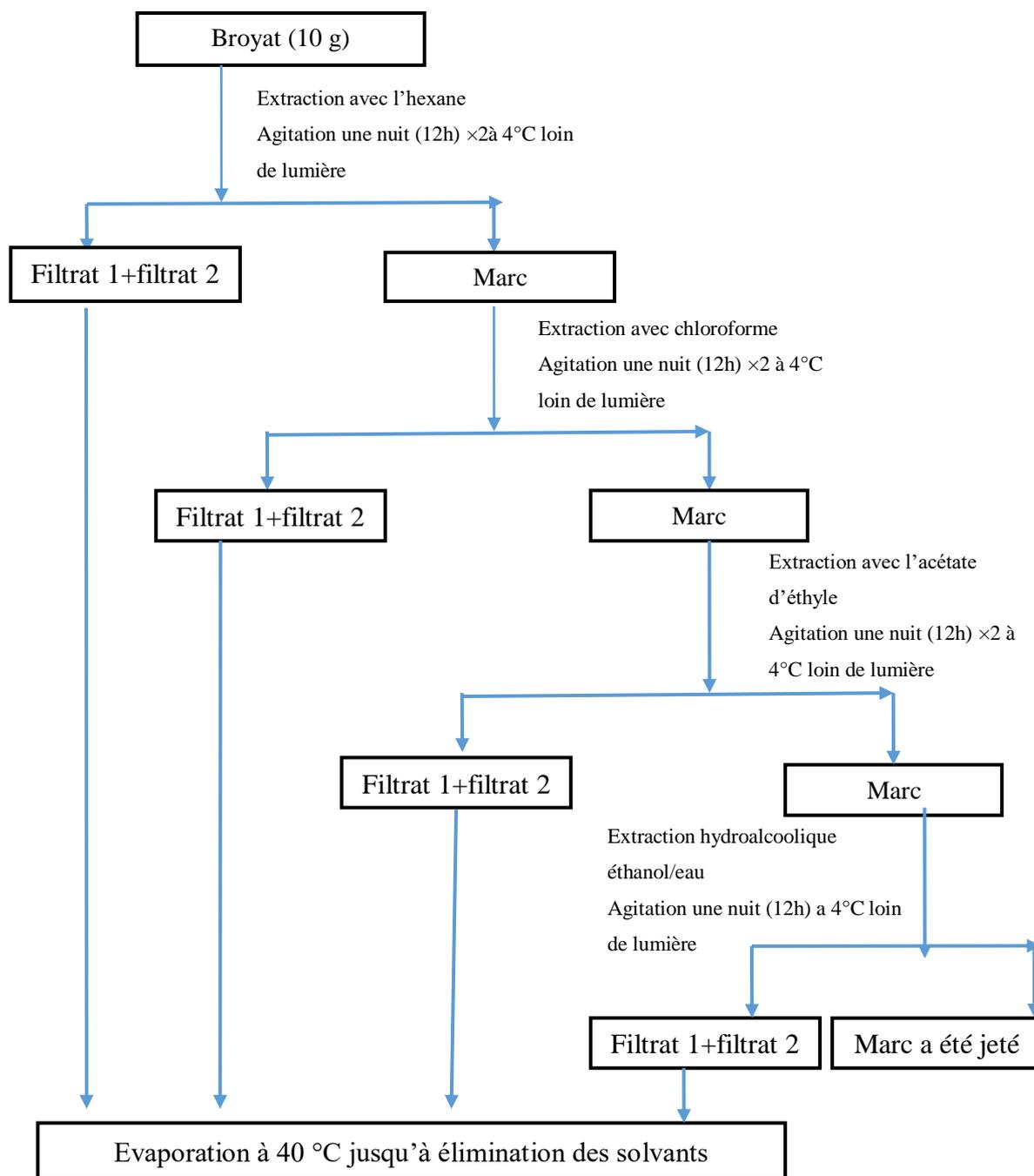


Figure 5. Schéma de fractionnement par macération du broyat d'*Equisetum arvense* L.

2.2.3.2. Fractionnement du broyat par le soxhlet

Les fractionnements au Soxhlet ont été effectués de façon séquentielle (Harnafi *et al.*, 2010), en utilisant des solvants à polarité croissante d'hexane, chloroforme, acétate d'éthyle et mélange hydro-alcoolique (éthanol/eau à 80/20 % et 50/50 %), successivement, en gardant la

même cartouche de matériel biologique. Cette approche d'extraction permet de fractionner grossièrement les divers produits naturels de la matrice végétale. Le broyat (20 g) mise dans la cartouche du Soxhlet, le premier solvant (350 ml d'hexane) est introduit dans le ballon puis chauffé à 40°C pour démarrer l'extraction, on attend les 4 cycles pour récupérer l'extrait. L'extrait obtenu (F-SHx) a été évaporé à 40°C par le rotavapeur et puis séché et finalement conservé à 4 °C jusqu'à son utilisation. A chaque fois en utilisant le même broyat de plante avec les solvants suivants : chloroforme, acétate d'éthyle, un mélange éthanol/eau, les fractions obtenues sont : F-SCh, F-SAe, F-SHA, respectivement.

2.2.3.3. Fractionnement d'EBr-HA par lavage liquide-liquide

L'EBr-HA a été initialement mélangée par utilisation d'ampoule à décanté avec l'hexane, le mélange a été laissé décanter, et la phase organique a été récupérée. L'extraction est refaite plusieurs fois jusqu'à ce que le solvant (hexane) devienne transparent. L'hexane est par la suite évaporé et l'extrait résultant est considéré comme étant la fraction de l'hexane (F-Ell-Hx). La phase aqueuse résiduelle est soumise à une autre extraction par le chloroforme, et enfin par l'acétate d'éthyle en suivant les mêmes étapes que la première extraction par l'hexane. Quatre fractions sont obtenues : fraction d'hexane (F-Ell-Hx), la fraction du chloroforme (F-Ell-Ch), la fraction de l'acétate d'éthyle (F-Ell-Ae) et la fraction aqueuse (F-Ell-Aq) résiduelle. Les quatre fractions ont été évaporées, séchées et conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation (Amrani *et al.*, 2014).

2.3. Dosage des flavonoïdes des EBrS et des Fractions d'*Equisetum arvense* L.

Le dosage des flavonoïdes des extraits et des fractions (24 extraits) de la plante a été effectué selon la méthode du trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) (Ghedadba *et al.*, 2015), 1 V de chaque extrait (préparé dans l'éthanol) avec des dilutions convenables, a été ajouté à un 1 V de solution d' $AlCl_3$ (2 % dans l'éthanol). Après 10 min d'incubation, l'absorbance a été lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes a été déduite à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quercitrine. La quantité des flavonoïdes a été rapportée en microgramme d'équivalent de la quercétine par un milligramme d'extrait (μg EQ/mg d'extrait).

2.4. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH) d'*Equisetum arvense* L.

L'activité anti-radicalaire des différents extraits et fractions d'*Equisetum arvense* L. a été évaluée, *in vitro*, par le test de DPPH. Cette méthode permet de suivre spectrophotométriquement la cinétique de décoloration de radical DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette à 517 nm (Boumarfegue *et al.*, 2012). Pour cela, 50 μ l de

chacune des différentes concentrations des extraits ont été incubés avec 950 µl d'une solution méthanolique de DPPH à 0.004 %. Après l'incubation pendant 30 min, une lecture au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 517 nm a été faite. Le pourcentage d'inhibition (% I) du radical DPPH par les extraits a été calculé comme suit :

$$\% I = [(AC - AE) / AC] \times 100$$

AC : absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif).

AE : absorbance en présence de l'inhibiteur (échantillon).

2.4. Analyses statistiques

Les valeurs ont été en général exprimées en moyenne \pm SD. Les résultats des différents tests ont été analysés par ANOVA univariée, grâce au logiciel « Graphpad Prism » version 7.00.

Chapitre 2

Résultats et Discussion

3.1. Rendement des extractions

La technique d'extraction est une étape très importante dans l'isolement et la récupération des composés phytochimiques existants dans le matériel végétal (Quy Diem Do *et al.*, 2014). Elle est influencée par le solvant, le pH, la température, le temps d'extraction et la composition de l'échantillon ainsi que la présence de substances interférentes (Stalikas, 2007). Le solvant a la capacité de dissoudre d'autres substances sans les modifier chimiquement et sans se modifier lui-même. Chaque solvant a des caractéristiques différentes qui sont les conséquences de sa structure moléculaire comme sa miscibilité à l'eau son moment dipolaire ou son caractère polaire, sa densité et sa volatilité (Abe *et al.*, 2010).

3.1.1. Rendement des EBr d'*Equisetum arvense* L.

Dans cette étude, plusieurs facteurs ont été étudiés pour le but de déterminer l'impact de chaque facteur sur la qualité et la quantité de l'extrait. Le tableau 8 représente le résumé de toutes les techniques d'extraction des EBr réalisées dans ce travail, en présentant les points de différences.

Tableau 8. Préparation des extraits bruts d'*Equisetum arvense* L.

Type d'extraits	Abréviation	Nom d'extraction	Conditions
Extrait brut aqueux 10 g de broyat $V_{H_2O} = 150$ ml (100 °C)	EBr-D ₁	Infusion chaude	Sans ébullition et laisser refroidir pendant 20 min
	EBr-D ₂	Décoction	Ebullition pendant 2 min
	EBr-D ₃		Ebullition pendant 10 min
	EBr-D ₄		Ebullition pendant 30 min $V_{H_2O} = 200$ ml
Extrait brut Alcoolique 10 g de broyat, 150 ml de solvant, 12 h, sous agitation à 4°C	EBr-Eth	Macération éthanolique	Solvant éthanol
	EBr-Méth	Macération méthanoïque	Solvant méthanol
Extrait brut hydro-alcoolique 10 g de broyat, 150 ml de solvant, 12 h, sous agitation à 4°C	EBr-HA	Macération hydro-alcoolique	Solvant mélange éthanol/eau (80/20) % et (50/50) %
Fractions brutes des solvants organiques 10 g de broyat, 150 ml de solvant, 12 h, sous agitation à 4°C	EBr-Hx	Macération d'hexane	Solvant : hexane
	EBr-Ch	Macération de chloroforme	Solvant : chloroforme
	EBr-Ae	Macération d'acétate d'éthyle	Solvant : d'acétate d'éthyle
Extrait brut méthanolique du soxhlet	EBr-SMé	Extraction par soxhlet	20 g de broyat $V_{\text{solvant}} = 350$ ml méthanol Nombre des cycles = 4

3.1.1.1. Rendement des extraits bruts aqueux

L'extraction aqueuse de la partie aérienne d '*Equisetum arvense* L. été effectuée par une première méthode l'infusion chaude, est une méthode d'extraction des principes actifs et/ou des arômes d'un végétal par dissolution dans un liquide (eau) initialement bouillant que l'on laisse refroidir. Le temps d'infusion est variable suivant la nature de la plante (Bancirova, 2010). La deuxième méthode c'est la décoction, est une méthode d'extraction des principes actifs d'une préparation généralement végétale par dissolution dans une eau chauffée à ébullition (Zhang *et al.*, 2018). Les calculs des rendements par rapport au poids de matière végétale sec présenté dans le tableau 9.

Tableau 9. Rendement des extraits bruts aqueux.

Extraits	Rendement	
	%	g d'extrait /Kg de la plante sèche
EBr-D₁	11.10 ± 1.414	110.0 ± 14.142
EBr-D₂	13.30 ± 0.424	133.0 ± 4.242
EBr-D₃	13.10 ± 0.280	131.0 ± 2.820
EBr-D₄	12.65 ± 0.636	126.5 ± 6.360

La comparaison entre les rendements des EBr de décoction montre qu'il y a une diminution de rendement avec la progression de temps, ce qui est peut-être dû la présence des molécules hydrosoluble volatile dans cette plante.

La comparaison entre les résultats de rendement des extraits bruts aqueux montre que EBr-D₁ représente la masse la plus faible par rapport aux autres extraits bruts D₂, D₃ et D₄, cela indique qu'extraction par décoction pendant 2 min est la meilleure méthode d'extraction aqueux par rapport aux quantités, selon Chabrier (2010), la décoction permet une extraction plus complète que par l'infusion, d'après Spigno *et al.* (2007), Il y'a des molécules nécessite une température d'extraction modéré et un temps d'extraction court.

La comparaison entre les % de rendements de la plante étudiée avec d'autres plantes (Tableau 10), montre que d'*Equisetum arvense* L. présente un rendement inférieur aux *Azadirachta indica* et *Psidium guajava* dans les deux méthodes utilisé (infusion et décoction).

Tableau 10. Rendement des extraits bruts aqueux de quelque plante médicinale.

Nom de plante	% Rendement d'extraction		Référence
	Par infusion	Par décoction	
<i>Azadirachta indica</i>	14,30 ± 0,23	16,30 ± 0,17	(Bohui <i>et al.</i> , 2018)
<i>Psidium guajava</i>	15,90 ± 0,28	19,30 ± 0,35	

3.1.1.2. Rendement des extraits bruts organiques

L'extraction solide-liquide, appelé aussi extraction au solvant, est une opération unitaire, visant à la séparation d'un ou plusieurs composé (soluté) contenus dans une matrice solide à l'aide d'une phase liquide (solvant) en fonction de polarité (Bauer *et al.*, 2010). Le calcul des rendements des extraits brut organique, obtenus à partir d'une macération (éthanolique, méthanolique et hydro-alcoolique) et en utilisant un montage de soxhlet, présenté dans le tableau 11.

Tableau 11. Rendements des extraits bruts organiques.

Extrait	%	g d'extrait /Kg de la plante sèche
EBr-Eth	6,65 ± 0,071	66.50 ± 0.707
EBr-Méth	12,32 ± 0,460	123.25 ± 4.596
EBr-SMé	17.78 ± 68.943	355.50 ± 137.880
EBr-HA	14,67 ± 0,363	146.70 ± 5.138

D'après les résultats de tableau 11, le rendement d'EBr-Méth est deux fois plus élevé que le rendement d'EBr-Eth. La comparaison entre la polarité des deux solvants ne présente pas une différence significative. Pour cela, la différence très significative de rendement est peut-être dû aux autres caractéristiques physico-chimiques des deux solvants (Tableau 12), comme la viscosité qui influence sur la solubilité des molécules à extraire.

Tableau 12. Propriétés physico-chimiques d'éthanol et méthanol.

Solvant	Méthanol	Ethanol	Références
Formule chimique	CH ₃ OH	CH ₃ CH ₂ OH	(Bégin et Gérin,2002)
Masse moléculaire (da)	32	46	(Hopkins, 2003)
Point d'ébullition (c)	65	75	
Viscosité	1.082	0.545	(González <i>et al.</i> , 2007)
Densité	0.7872	0.7854	
Polarité	6.5	5.2	(Bourgou <i>et al.</i> , 2016)

L'extraction par Soxhlet est une technique standard qui sert comme un référence pour évaluer les résultats d'autres méthodes d'extraction solide-liquide, c'est la technique qui permet d'avoir les meilleurs rendements (Castro et Ayuso, 1998).

Après la comparaison des rendements d'extraction par macération et soxhlet (Tableau 11) avec le même solvant (méthanol), les résultats montrent que l'extraction par le soxhlet est mieux que la macération, en termes de quantité. L'efficacité de l'extraction par le soxhlet est peut être liée aux deux facteurs : la température (40°C) et au fait que le solvant qui se condense et qui vient au contact de la matière végétal est toujours pur (quatre cycles de solvant pure), en comparant avec la macération qui se réalise à 4°C et avec deux cycles de

solvant pure. Selon Salem (2009), le solvant de la macération peut arriver à saturation et perdre progressivement sa capacité d'extraction au cours du procédé. D'après les résultats de Alessandro *et al.*(2012), l'augmentation de la température favorise l'extraction, car elle permet de réduire la viscosité du solvant, en améliorant la pénétration de solvant dans la matrice végétale, et augmente le coefficient de diffusion et la solubilité des composés, et rendus les parois cellulaire plus perméable.

D'après le tableau 11, l'EBr-HA donne une masse importante par rapport au EBr-Eth et EBr-Méth, les résultats montrent que le solvant hydro-alcoolique est plus efficace que le méthanol et l'éthanol en termes de quantité. D'après Mohammadi et Atik (2011), les solvants mixtes sont particulièrement efficaces et aboutit à un fort enrichissement des extraits en polyphénols.

L'utilisation d'eau avec les solvants organique permet de moduler la polarité du solvant et de modifier la solubilité de différents composés phénoliques dans le solvant d'extraction, il permet de combiner les effets positifs des deux types de solvant et d'extraire des polyphénols de nature différente. Le solvant organique déstabiliser les membranes cellulaires et permettant solubiliser les polyphénols totaux et l'utilisation de l'eau permet non seulement la solubilisation des polyphénols polaire mais également le gonflement de la plante, permettant aux solvants de pénétrer plus facilement dans la matrice végétale et améliorant donc l'extraction des polyphénols (Naczka et Shahidi, 2004).

Lors de l'extraction des composés chimiques d'une source végétale, la solubilité de se composer dans l'extrait et notamment gouverner par la polarité du solvant utilisé, les solvants les plus couramment utilisé pour l'extraction des biomolécules sont l'eau, méthanol, l'éthanol (Ignat *et al.*, 2011).

Le mélange hydro-alcoolique donne le rendement le plus élevé par rapport aux autres solvants (eau, éthanol et méthanol). Ces résultats traduits par l'influence significative de mélange des solvants sur le rendement d'extraction. Concernant l'effet de méthode d'extraction, l'extraction par soxhlet donne le rendement le plus élevé par rapport aux autres méthodes utilisées (infusion, décoction et macération).

3.1.1.3. Rendement de fractions brutes des solvants organiques

L'extraction a été effectuée par macération en variant la polarité du solvant. Trois systèmes des solvants ont été choisis séparément : l'hexane, chloroforme, acétate d'éthyle, (Figure 6).

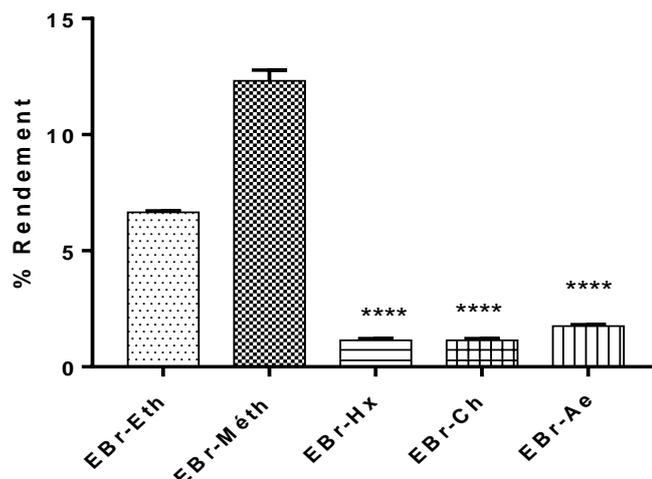


Figure 6. Rendement des EBr des solvants à polarité croissante. Comparaison statistique vis à vis l' EBr-Eth et l'EBR-Méth, **** : $p < 0,0001$.

Le rendement le plus élevé est obtenu par les solvants le plus polaire (méthanol, éthanol), cela indique que l'*Equisetum arvense* L. contient une quantité importante de biomolécules polaires. En revanche le rendement le plus faible est représenté par les solvants apolaires.

L'extrait à l'hexane contient des composés apolaires, tandis que le chloroforme extrait les composés peu polaires et que l'acétate d'éthyle permet d'obtenir un extrait riche en composés moyennement polaires. La projection de ces informations sur le rendement d'extraction montre la richesse de la plante en molécules polaire soluble dans l'acétate d'éthyle.

Généralement les lipides et les molécules basique sont très solubles dans hexane (Manca *et al.*, 1989). Les stéroïdes qui se trouve permet les compositions chimiques de l'*Equisetum arvense* L. solublent dans le chloroforme (Menini, 1966). En effet, la plupart des composés benzodiazépines sont solubles dans l'acétate d'éthyle (Lambert *et al.*, 1995).

La comparaison entre les résultats de rendement des deux EBr d'hexane et de chloroforme ne montre pas une différence significative, l'interprétation de cette résultat baser sur ; la composition chimique de la plante, peut être ne contient pas des molécules solubles dans l'intervalle de polarité entre les deux solvants, ou bien la capacité des deux solvant à franchir la membrane cellulaire et à solubiliser les molécules.

3.1.2. Rendement du fractionnement des biomolécules d'*Equisetum arvense* L.

Le fractionnement est un procédé de séparation d'un mélange d'un extrait brut en plusieurs fractions successives de propriétés différentes par utilisation des solvants à polarité

croissante. Les techniques de fractionnement sont fondées sur les différences entre les propriétés des espèces constitutives du mélange d'origine. Ces propriétés peuvent être la solubilité qui peut être modifiée selon le type de solvant utilisé.

Dans cette étude, plusieurs méthodes de fractionnement ont été étudiées pour le but de déterminer l'impact de chaque méthode sur la qualité de l'extrait. Le tableau 13 représente le résumé de toutes les techniques d'fractionnement réalisées dans ce travail, en présentant les points de différences.

Tableau 13. Préparation des fractions.

Type d'extraits	Abréviation	Nom d'extraction	Conditions
Fraction obtenue par macération Le même broyat 10 g (V solvants : 150 ml pendant 12 h sous agitation à 4°C à l'abri de la lumière) × 2	F-Mc-Hx	Fractionnement par macération hexane	Solvant : hexane
	F-Mc-Ch	Fractionnement par macération chloroforme	Solvant : chloroforme
	F-Mc-Ae	Fractionnement par macération acétate d'éthyle	Solvant : acétate d'éthyle
	F-Mc-HA	Fractionnement par macération hydro-alcoolique	Solvant : mélange éthanol/eau (80/20) % et (50/50) %
Fraction obtenue par soxhlet Le même broyat 20 g V solvants : 350 ml Nombre de cycle = 4	F-SHx	Fractionnement par soxhlet hexane	Solvant : hexane
	F-SCh	Fractionnement par soxhlet chloroforme	Solvant : chloroforme
	F-SAe	Fractionnement par soxhlet acétate d'éthyle	Solvant : acétate d'éthyle
	F-SHA	Fractionnement par soxhlet hydro-alcoolique	Solvant : mélange éthanol/eau (80/20) % et (50/50) %
Fraction obtenue par lavage liquide-liquide L'EBr HA a été mélangée avec des solvants à polarité croissante	F-Ell-Hx	Fractionnement par lavage liquide-liquide hexane	Solvant : hexane
	F-Ell-Ch	Fractionnement par lavage liquide-liquide chloroforme	Solvant : chloroforme
	F-Ell-Ae	Fractionnement par lavage liquide-liquide acétate d'éthyle	Solvant : acétate d'éthyle
	F-Ell-HA	Fractionnement par lavage liquide-liquide hydro-alcoolique	La phase résiduelle est considérée comme une phase aqueuse

3.1.2.1. Rendement de fractionnement par macération successives du broyat

Ce type est le plus simple des méthodes à mettre en œuvre pour l'extraction des métabolites secondaires. Un même échantillon peut subir plusieurs macérations successives en utilisant des solvants de plus en plus polaires, pour obtenir des extraits enrichis en molécules d'intérêt.

Les solvants utilisés sont d'ailleurs hexane chloroforme acétate d'éthyle et un mélange entre éthanol et l'eau.

Le calcul des rendements par rapport au poids de la matière végétale sec est présenté dans tableau 14. Le rendement des fractions est diminué dans l'ordre suivant : F-Mc-HA > F-Mc-Ch > F-Mc-Hx > F-Mc-Ae.

Tableau 14. Rendement des fractions issues de macération.

Extrait	Rendement	
	%	g d'extrait /Kg de la plante sèche
F-Mc-Hx	1.80 ± 0.28	18.0 ± 2.82
F-Mc-Ch	2.25 ± 0.21	22.5 ± 2.12
F-Mc-Ae	1.40 ± 0.56	14.0 ± 5.65
F-Mc-HA	2.80 ± 0.56	28.0 ± 5.65

Une comparaison entre le rendement de fractionnement par macération en utilisant des solvants à polarité croissante et le rendement d'extraction en utilisant les mêmes solvants ; montre que ; le rendement de l'hexane est similaire pour les deux, par contre le rendement de F-Mc-Ch est supérieur à l'EBr-Ch, sachant que l'EBr-Ch est obtenu après un contacte directe avec la plante (totalité des molécules), mais la F-Mc-Ch est obtenue après une pré-extraction par l'hexane (fraction des molécules). Cela est peut être due à la pré-incubation de la plante avec l'hexane avec qui facilite l'extraction des molécules soluble dans la fraction de chloroforme (F-Mc-Ch). D'après Harborne *et al* (2013), une pré-extraction par l'hexane est fréquemment réalisée pour délipider le matériel végétal.

3.1.2.2. Fractionnement par le soxhlet du broyat

L'appareillage Soxhlet, en utilisant des solvants, offre une extraction continue des molécules chimiques contenues dans une matrice solide. Contrairement aux macérations classiques, l'échantillon placé dans une cartouche poreuse est traversé par le vapeur du solvant (Castro *et al.*, 2010).

Le calcul de rendement des fractions obtenu par soxhlet montré dans le tableau 15. Le rendement des fractions est diminué dans l'ordre suivant : F-SHA > F-SCh > F-SAe > F-SHx.

Tableau 15. Rendement de fractionnement par soxhlet.

Extrait	Rendement	
	%	g d'extrait /Kg de la plante sèche
F-SHx	0.375 ± 0.17	3.75 ± 1.76
F-SCh	0.575 ± 0.10	5.75 ± 1.06
F-SAe	0.525 ± 0.03	5.25 ± 0.35
F-SHA	6.275 ± 0.10	62.75 ± 1.06

La comparaison entre les deux méthodes de fractionnement indique que le rendement représenté par macération successive est supérieur que le fractionnement par soxhlet en utilisant l'hexane, le chloroforme et l'acétate d'éthyle. Cela est peut être due à la température exercé sur les trois solvants organique en diminuant leurs capacité d'extraction. Par contre cette condition exerce un effet positif sur le mélange hydro-alcoolique.

3.1.2.3. Rendement de fractionnement liquide-liquide d'EBr-HA

L'extraction liquide-liquide est une technique utilisée pour permettre le passage d'une substance en général organique d'un solvant à un autre solvant. Ces deux solvants étant non miscibles. La décantation est le procédé permettre de séparer ces deux phase liquide non miscible de densité différentes lune étant aqueuse et l'autre organique, l'efficacité de l'extraction dépend du coefficient de partage du composé à extraire entre les deux phases, les extractions continue sans utiliser lorsque le coefficient de partage est défavorable et consistent à extraire plusieurs fois avec une recyclage du solvant (González *et al.*,2007).

L'extrait brut fractionné peut contenir des flavonoïdes, des aminoacides, des terpènes et des tannins. Les différentes fractions préparées sont : l'extrait d'hexane qui est en générale constitué de flavonoïdes aglycones hautement méthoxyles, l'extrait du chloroforme est plus riche en flavonoïdes aglycones, l'extrait d'acétate d'éthyle contient les flavonoïdes glycosylés en particulier mono, di et tri-glycosylés et l'extrait aqueux peut être constitué des flavonoïdes les plus polaires (di, tri et tetra-glycosylés) (Markham, 1982).

Les calculs des rendements des fractions par rapport au poids d'EBr-HA (Tableau 16) montrent que la F-Ell-Aq représente le rendement le plus élevé (62.82%) suivi par l'F-Ell-Ch, F-Ell-Ae et en fin le rendement de F-Ell-Hx est le plus faible. Cela confirme une autre fois que l'*Equisetum arvense* L. contient une quantité importante de biomolécules très polaires.

Tableau 16. Rendement des fractions issues de lavage liquide-liquide.

Extrait	Rendement	
	% Rendement/EBr	g d'extrait /Kg de la plante sèche
F-Ell-Hx	3.932 ± 1.109	6.071 ± 1.515
F-Ell-Ch	6.450 ± 0.218	10.000 ± 0.000
F-Ell-Ae	4.456 ± 0.367	6.905 ± 0.337
F-Ell-Aq	62.128 ± 6.128	97.619 ± 12.795

Cette technique de fractionnement présente le rendement le plus élevé en comparant avec les autres techniques de fractionnement. L'efficacité de cette méthode, en comparant avec le fractionnement par macération, est peut être due au pourcentage des pertes au cours des macérations et filtrations successives. Mais en comparant avec le fractionnement de soxhlet, l'efficacité est peut être due aux pertes des propriétés des solvants à cause de la

température (déjà prouvé). Il faut noter que le coefficient de partage liquide-liquide a donné un rendement plus élevé que le partage solide-liquide.

3.2. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes se sont considérés comme un repaire important pour évaluer l'importance médicinale des plantes. C'est une sous-classe de polyphénols dans la littérature, plus de 6000 flavonoïdes ont été identifiés dans les plantes. Ces composés sont responsables de la protection des plantes contre les microbes et les insectes, en jouant dans le corps humain un rôle de défense en tant qu'anti-inflammatoire, antimicrobien, anticancéreux et antioxydant (Asgar *et al.*, 2016).

Le contenu total en flavonoïdes a été déterminé en utilisant la méthode colorimétrique de chlorure d'aluminium décrite par Ghedadba *et al.* (2015), avec quelques modifications. Les concentrations des flavonoïdes ont été déduites à partir de la courbe d'étalonnage établie avec la quercétine (Figure 7). La quantité des flavonoïdes a été rapportée en microgramme d'équivalent de la quercétine par un milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ}/\text{mg}$ d'extrait).

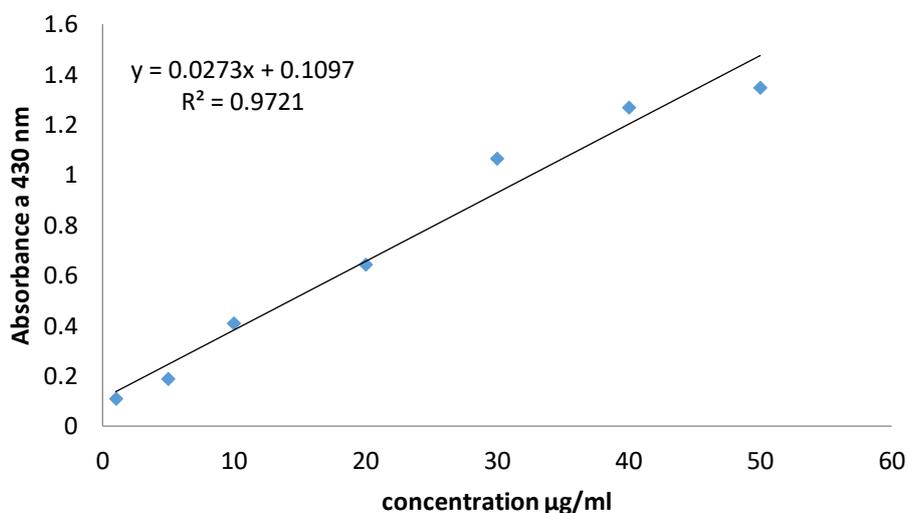


Figure 7. Courbe d'étalonnage d'interaction de la quercétine avec l' AlCl_3 . Chaque point dans la courbe représente la moyenne \pm SD ($n = 3$).

3.2.1. Dosage des flavonoïdes des EBrS d'*Equisetum arvense* L.

3.2.1.1. Dosage des flavonoïdes des EBrS aqueux

Les flavonoïdes sont fréquemment présents dans la nature et facile à extraire de différentes nombreuses plantes, mais leur solubilité est très faible dans l'eau, la solubilité était fortement affectée à la fois par la nature du solvant et la structure des flavonoïdes. La teneur en flavonoïdes des extraits brut aqueux représenté dans le tableau 17.

Tableau 17. Dosage des flavonoïdes des extraits aqueux.

Méthode	Infusion chaude		Décoction	
	EBr-D ₁	EBr-D ₂	EBr-D ₃	EBr-D ₄
Teneur en flavonoïdes EA µg EQ/mg d'extrait	11.51 ± 0.28	16.39 ± 0.97	14.73 ± 0.95	7.96 ± 0.13

Les résultats de dosage des flavonoïdes des extraits bruts de décoction indiquent que la concentration des flavonoïdes diminués dans l'ordre : EBr-D₂, EBr-D₃ et EBr-D₄. Ces résultats pourraient être dû au temps d'extraction par la décoction, la concentration en flavonoïdes des extraits diminué en fonction de temps de décoction. En effet, le temps très long dans le cas d'EBr-D₄ pourrait entraîner la dégradation de certaines substances naturelles comme les flavonoïdes (Bohui *et al.*, 2018).

La comparaison entre l'EBr-D₁ et les extraits bruts de décoction montre que la décoction pendant 2 min est nécessaire pour atteindre l'équilibre thermodynamique et pour une extraction d'une grande partie des flavonoïdes, donc c'est la meilleure méthode d'extraction, par rapport au teneur en flavonoïdes.

Selon ces résultats, la présence des flavonoïdes dans l'EBr aqueux pourrait être provoquée par une combinaison des flavonoïdes sous forme complexe avec d'autres molécules. D'après Saidman *et al* (2002), les cycles A et B des flavonoïdes sont hydrophobes, ils peuvent cependant interagir avec les molécules polaire grâce à leurs hydroxyles phénoliques, la glycosylation des flavonoïdes augmente sa solubilité dans l'eau (Macheix *et al.*, 2005), comme les anthocyanoside (Jean, 2009).

En combinant les résultats des extraits bruts aqueux (Tableaux 17 et 9), on met en évidence l'existence d'une relation étroite entre le rendement des extraits bruts et leurs teneur en flavonoïde.

3.2.1.2. Dosage des flavonoïdes des extraits bruts organiques

D'après les résultats de tableau 18, l'EBr-Eth représente une teneur de flavonoïdes plus élevée que celle d'EBr-Méth.

Tableau 18. Dosage des flavonoïdes des extraits organiques.

Extait	µg EQ/mg d'extrait
EBr-Eth	10,136 ± 0,093
EBr-Méth	8,469 ± 0,093
EBr-SMé	12,667 ± 1,961
EBr-HA	21,975 ± 1,864

Le dosage des flavonoïdes d'*Equisetum arvense* L. montre une teneur plus inférieure que celle de *Myrtus nivellei* Batt et Trab (tableau 19) (Touaibia et Chaouch, 2014).

Tableau 19. Taux des flavonoïdes d'une plante médicinale.

Nom de plante	Type d'extrait	Taux ($\mu\text{g EQ/mg}$)	Référence
<i>Myrtus nivellei Batt et Trab</i>	Méthanol	$152,25 \pm 0,485$	(Touaibia et Chaouch, 2014)
	Ethanol	$181,1 \pm 0,073$	

La comparaison entre l'EBr-Méth et l'EBr-SMé (Tableau 19) déduit que l'extraction par soxhlet est préférable pour l'extraction d'une grande quantité des flavonoïdes soluble dans le méthanol que la macération. Dans ce contexte, Bourgoui *et al.* (2016), notent que l'extraction par soxhlet est plus efficace que la macération pour l'extraction des flavonoïdes de la plante *Euphorbia helioscopia*.

Pour surmonter les inconvénients de la faible solubilité des flavonoïdes, l'utilisation de mélanges des solvants organiques-aqueux (par exemple eau-éthanol) ont été suggérés comme alternative (Stovall *et al.*, 2005), l'EBr-HA représente un teneur en flavonoïde ($21,975 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait) qui est supérieure à deux fois que les solvant pur pour tous les techniques testées (infusion, décoction, soxhlet et macération méthanolique et éthanolique).

3.2.1.3. Dosage des flavonoïdes des fractions bruts des solvants organiques

Les résultats dans la figure 8 indiquent que les teneurs en flavonoïdes varient significativement selon le solvant utilisé, avec des teneurs allant de 1.469 à 19.062 $\mu\text{g EQ/mg}$. La quantité en flavonoïdes la plus élevée est représentée par le chloroforme ce qui montre que, selon la macération, l'*Equisetum arvense* L. est riche en flavonoïdes aglycones, et que le solvant d'extraction a influencé significativement sur le dosage des flavonoïdes. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Mohdaly *et al.* (2009).

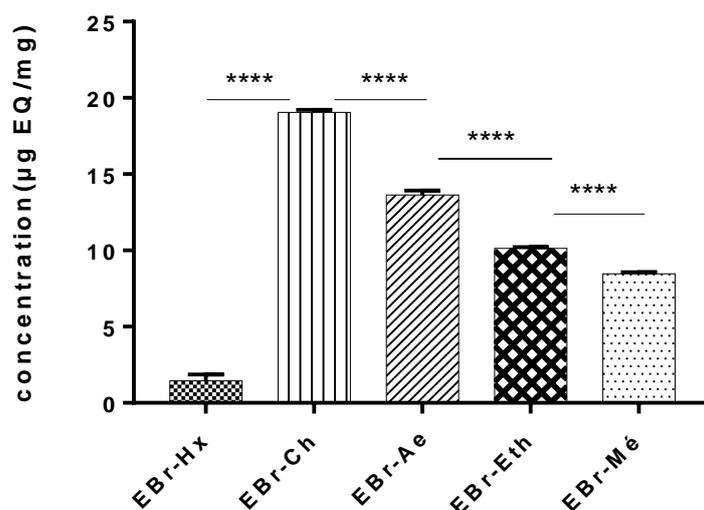


Figure 8. Dosage des flavonoïdes des EBr des solvants a polarité croissante. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=3) **** : $p \leq 0.0001$.

3.2.2. Dosage des flavonoïdes des fractionnements

Le fractionnement est un procédé de séparation d'un mélange d'un extrait brut en plusieurs fractions successives de propriétés différentes par utilisation des solvants à polarité croissante. Les techniques de fractionnement sont fondées sur les différences de propriété des espèces constitutives du mélange d'origine. Ces propriétés peuvent être la solubilité qui peut être modifiée le type de solvant utilisé. Les résultats du figure 9 montrent que les teneurs en flavonoïdes varient considérablement entre les deux méthodes de fractionnement, dans le même ordre : F-Ch>F-Ae>F-HA>F-Hx.

Après la comparaison de ces résultats, la fraction de chloroforme représente la teneur en flavonoïdes la plus élevée pour les deux méthodes, ce qui confirme la richesse de cette plante en flavonoïde aglycone.

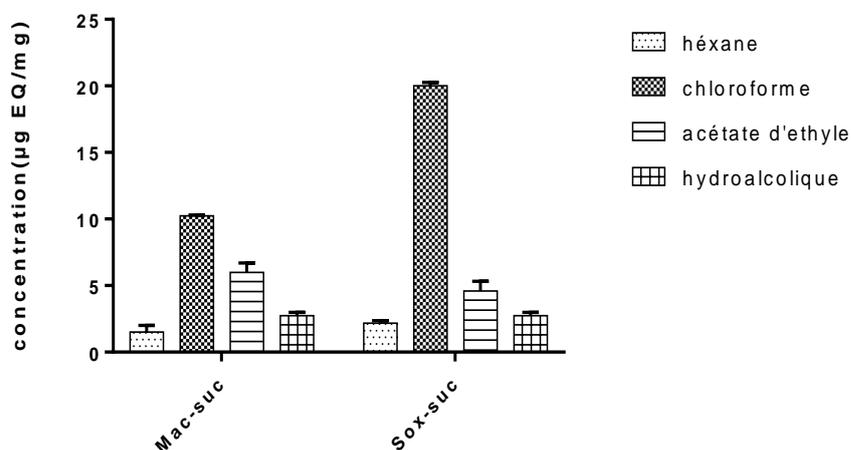


Figure 9. Dosage des flavonoïdes deux types de fractionnement .Mac-suc : macération successive Sox-suc : soxhlet successive.

Une autre fois les résultats de dosage montre la richesse de la fraction chloroformique issue de lavage liquide-liquide de l'EBR-HA (30,617 µg EQ/mg) (Figure 10). Cette technique de fractionnement représente la technique la plus efficace pour la séparation des flavonoïdes en termes de quantité.

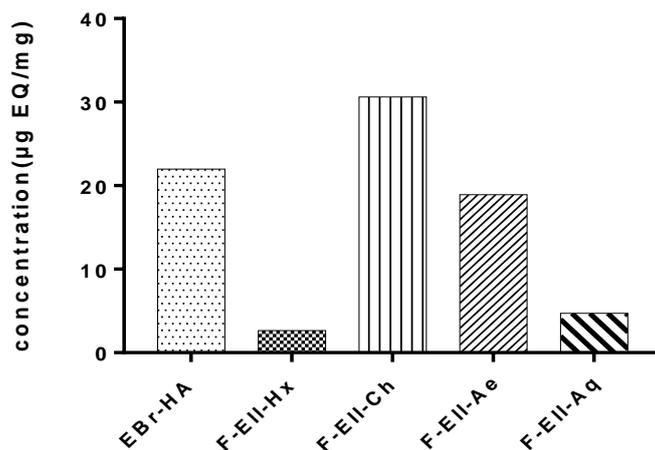


Figure 10. Teneur en flavonoïdes des fractions d'EBr-HA par lavage liquide-liquide.

3.3. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH)

L'activité antioxydante, des différents extraits et des fractions obtenus par les différentes techniques d'extraction et fractionnement de l'*Equisetum arvense* L., a été évaluée *in vitro* par la méthode du piégeage du radical libre DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) (Figure 11). Ce dernier est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activités-radicalaire en raison de sa stabilité en forme radicalaire libre et la simplicité de l'analyse (Kholkhal *et al.*, 2013). En présence de composés antiradicalaires, le radical DPPH est réduit et change de sa couleur au jaune (Bentabet *et al.*, 2014).

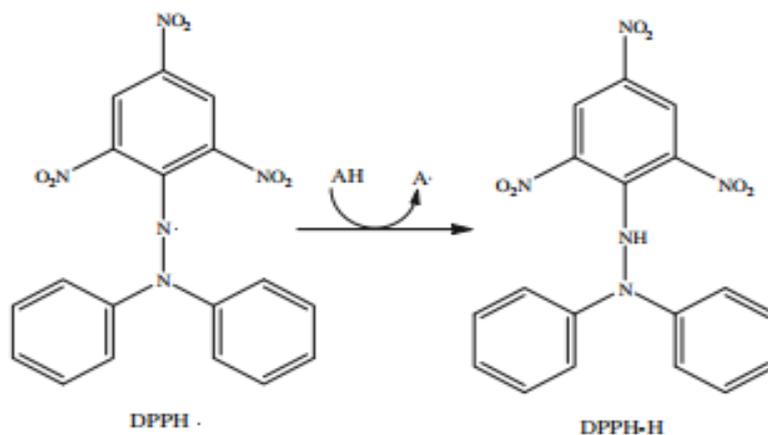


Figure 11. Effet de piégeage des radicaux DPPH par un antioxydant (AH) (Gulcin, 2012).

3.3.1. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH) des EBrS d'*Equisetum arvense* L.

3.3.1.1. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH) des EBrS aqueux

Les résultats des courbes d'inhibition obtenus (Figure 12), ont montré que les quatre extraits aqueux présentent une activité anti-radicalaire dose dépendante.

L'EBr-D₃ présente le pouvoir piégeur le plus important par rapport aux autres extraits bruts aqueux. A une concentration de 0.1 mg/ml, il atteint un pourcentage d'inhibition égale à $93.10 \pm 0.47 \%$, alors que l'EBr-D₁ n'a atteint que $70.44 \pm 0.49 \%$ à la même concentration. Un pourcentage d'inhibition de $63.57 \pm 0.59 \%$ et $38.31 \pm 0.47 \%$ pour l'EBr-D₄ et l'EBr-D₂, respectivement. Ces résultats montrent que, dans l'intervalle de concentration 0.02 jusqu'à 0.1 mg/ml l'EBr-D₃ est plus active que les autres extraits aqueux.

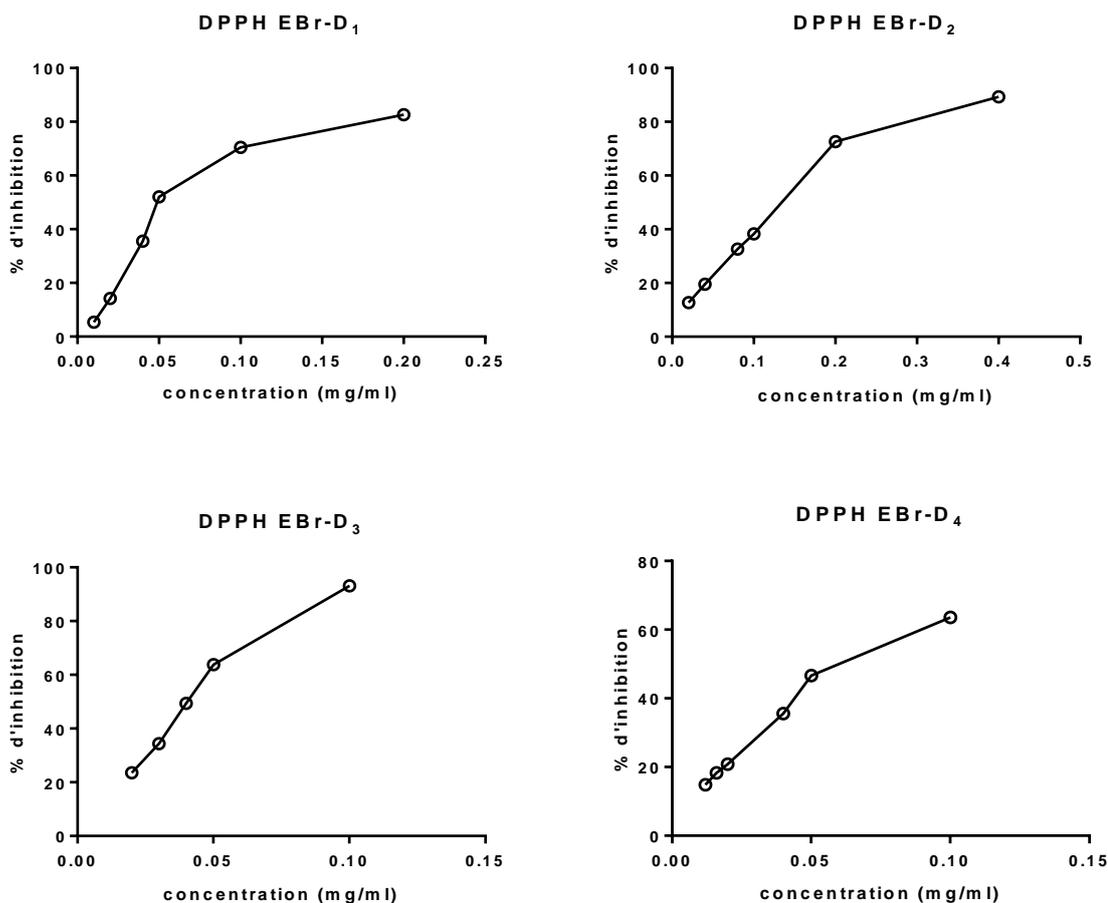


Figure 12. Courbes d'activité anti-radicalaire des quatre extraits aqueux d'*Equisetum arvense* L. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=3).

L'IC₅₀ c'est les concentrations des différents extraits qui piègent 50 % du r DPPH. (Atoui *et al.*, 2005). C'est un paramètre utilisé pour estimer l'activité antioxydante ; plus cette concentration est faible plus l'effet antioxydant est très élevé (Boumarfegue *et al.*, 2012).

Les résultats obtenus d'IC₅₀ des extraits aqueux (Figure 13), ont montrés que l'EBr-D₃ possède l'activité anti-radicalaire la plus puissante parmi les quatre extraits avec une valeur d'IC₅₀ = $44.658 \pm 0.138 \mu\text{g/ml}$, suivi par l'EBr-D₄ et l'EBr-D₁ avec des valeurs d'IC₅₀ de $64.678 \pm 7.813 \mu\text{g/ml}$ et $63.533 \pm 0.295 \mu\text{g/ml}$, respectivement. Tandis que, l'EBr-D₁ ayant l'activité anti-radicalaire la plus faibles avec une valeur d'IC₅₀ de $132.720 \pm 0.593 \mu\text{g/mg}$. Ces

résultats expriment que la décoction pendant 10 min (D₃) de cette plante récupère des molécules qui ont une bonne activité anti-radicalaire *vis-à-vis* le DPPH.

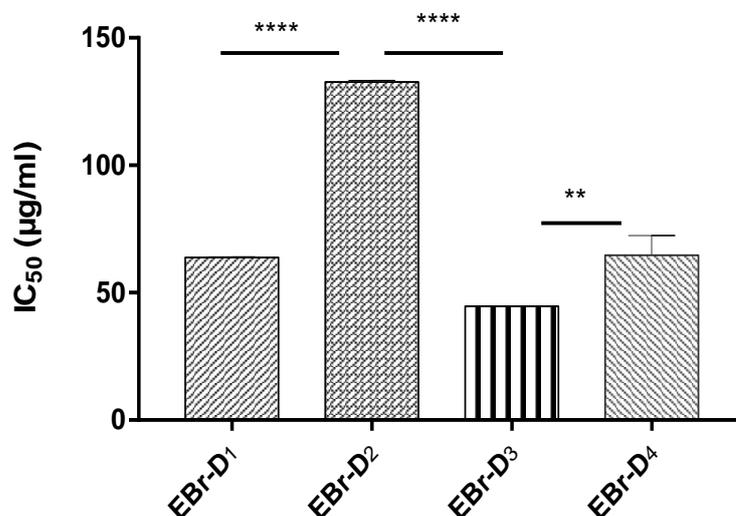


Figure 13. IC₅₀ du radical DPPH par les EBr aqueux. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=3). **** : $p < 0.0001$, ** : $p = 0.0011$.

La comparaison avec d'autres résultats qui ont été obtenus par la méthode de DPPH sur des EBr-aqueux des différentes plantes (Tableau 20), ont montrés que les EBr aqueux d'*Equisetum arvense* L. ont une activité inférieure à celle de *Psidium laruotteanum*, et supérieure à celle d'*Azadirachta indica* et *Psidium guajava*.

Tableau 20. IC₅₀ d'activité anti-radicalaire vis-à-vis le DPPH des extraits des plantes.

Type d'extrait	Plante	IC ₅₀ µg/ml	Références
Infusion	<i>Psidium laruotteanum</i>	3.86	(Takao <i>et al.</i> , 2015)
Décoction	<i>Azadirachta indica</i>	470	(Bohui <i>et al.</i> , 2018)
Infusion	<i>Psidium guajava</i>	330	

3.3.1.2. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH) des EBr organique

Les résultats présentent que l'EBr-Méth a le pouvoir scavenger le plus important par rapport aux autres extraits bruts organique. A une concentration de 0.05 mg/ml, il atteint un pourcentage d'inhibition égale à 82.38 ± 0.88 %, alors que l'EBr-Eth n'a atteint que 73.15 ± 0.81 %, et EBr-HA $< 8\%$, et E-SMe 40.11 ± 0.25 % (Figure 14).

Les deux extraits commencent par une très faible activité ralentie après la concentration de 0.02 mg/ml, jusqu'à arriver à la valeur la plus élevée à une concentration de 0.05 mg/ml.

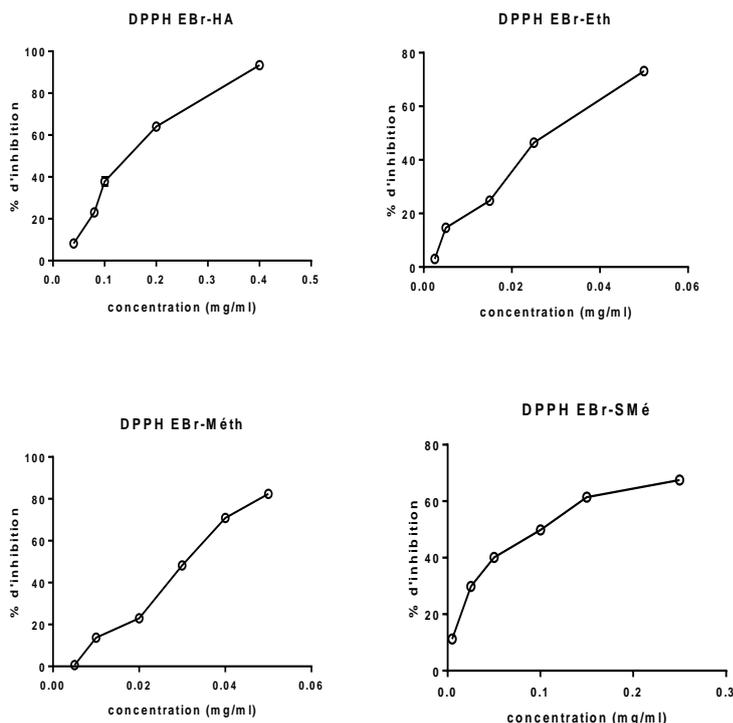


Figure 14. Courbes d’activité anti-radicalaire des Cinque extraits organique d’*Equisetum arvense* L. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=3).

Les résultats d’IC₅₀ d’activité antiradicalaire des extraits bruts organique sont présenté dans la figure 15, l’EBr-Eth et EBr-Méth présente une bonne activité anti radicalaire avec des IC₅₀ proche 31.837 \pm 0.387 μ g/ml et 30.755 \pm 0.603 μ g/ml, respectivement.

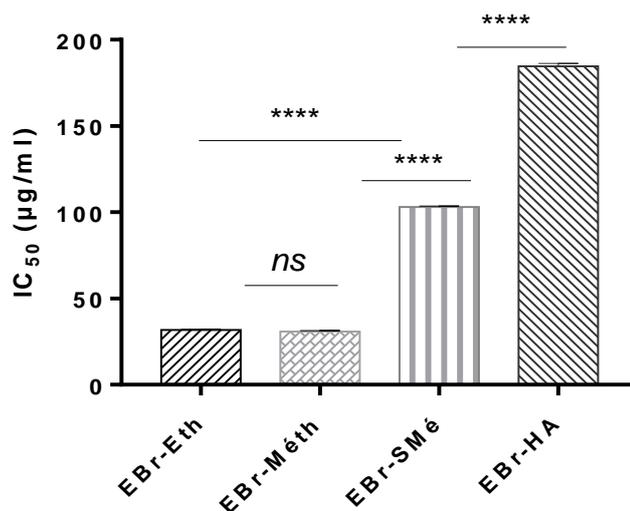


Figure 15. IC₅₀ du radical DPPH par les EBrS organiques. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=3). **** : $p < 0.0001$, ** : $p=0.0011$, ns : non significatif.

La comparaison entre les deux extraits méthanolique (EBr-Meth et EBr-SMé) a montré que l'extraction par macération est plus efficace que le soxhlet en termes d'activité antioxydant, cela est peut être due à la dénaturation des molécules antioxydants par la chaleur.

La comparaison avec d'autres résultats qui ont été obtenus par la méthode de DPPH sur des EBr-organique des différents plantes (Tableau 21), ont montrés que les l'EBr-Méth d'*Equisetum arvense* L. a une activité supérieur à celle de *Moringa oleifera*, et l'EBr-SMé inférieur à celle de *Mentha pulegium*.

Tableau 21. IC₅₀ des extrais organique de quelque plante médicinale.

Type d'extrait	Plante	IC ₅₀ (µg/ml)	Références
Macération méthanol	<i>Moringa oleifera</i>	49.30	(Fitriana <i>et al.</i> , 2016)
Extraction par soxhlet méthanol	<i>Mentha pulegium</i>	24	(Samir <i>et al.</i> , 2016)

3.3.1.3. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH) des fractions brut des solvants organique

Les résultats d'IC₅₀ représenté dans la figure 16 montre que l'EBr-Ch a la plus forte activité anti-radicalaire parmi les quatre extraits avec une valeur d'IC₅₀ = 78,982 ± 0,810 µg/mL, suivi par l'EBr-Ae avec IC₅₀ = 219,180 ± 2,024 µg/mL. Alors que l'EBr-Hx a la plus faible activité anti-radicalaire avec l'IC₅₀ la plus élevée 901.080 ± 27.154 µg/mL.

La comparaison entre ces résultats et les résultats de dosage montrent que l'EBr-Ch présente la concentration la plus élevée en flavonoïdes (aglycone), peut être cette activité antiradicalaire est exprime par ce type des biomolécules (flavonoïdes).

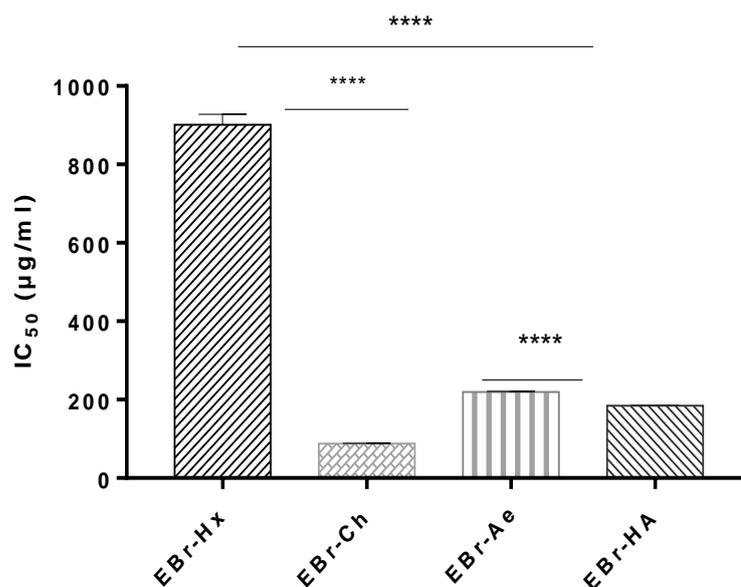


Figure 16. IC₅₀ du radical DPPH par les EBr du solvant à polarité croissante. Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n=3). **** : $p < 0.0001$, *** $p=0.0011$.

3.3.2. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH) des fractions

3.3.2.1. Fractionnement par macération et soxhlet

La figure 17 présente les IC₅₀ des différentes fractions obtenir par macération et soxhlet. Les fractions de macération présentent une activité croissante dans l'ordre ; F-Mc-Hx, F-Mc-Ae, F-Mc-Ch et F-Mc-HA. Les fractions obtenir par soxhlet présentent une activité décroissante dans l'ordre : F-Mc-HA, F-Mc-Ch, F-Mc-Ae et F-Mc-Hx. Les fractions hydro-alcooliques obtenues par les deux méthodes possèdent l'activité antiradicalaire la plus élevée par apport aux autres fractions.

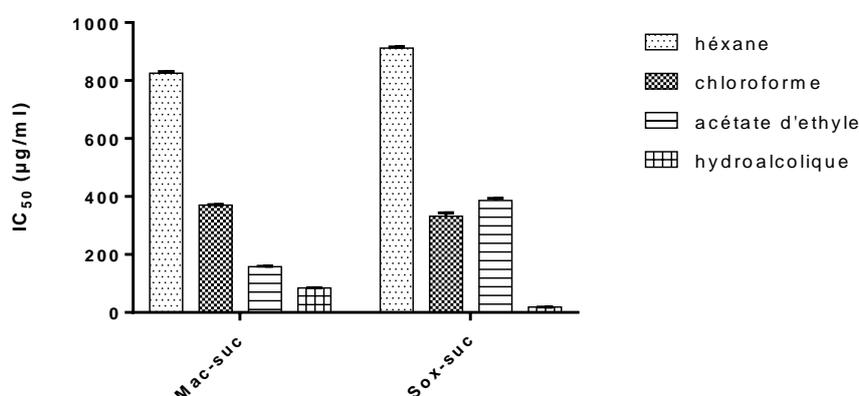


Figure 17. IC₅₀ du radical DPPH par les fractions obtenue par deux méthodes de fractionnement Mac-suc : macération successive. Sox-suc : soxhlet successive.

La comparaison entre ces résultats et les résultats de dosage des flavonoïdes où la fraction hydro-alcoolique présente des concentrations faibles en flavonoïdes. L'activité de ce dernier peut être due à une classe des flavonoïdes actifs ou d'autres classes des molécules. Selon Mota (1985), l'activité antioxydant ne peut être attribuée seulement aux polyphénols mais à d'autres composés présents (tanins, saponines, phénanthrènes) dont leur teneur et leur activité antioxydant au niveau des végétaux est non négligeable

La raison principale pour une activité antioxydant faible des fractions d'hexane (faible polarité) contre le DPPH est peut être corrélée à la solubilité et à la stabilité du composés responsables de l'activité antioxydant qui peut être un composé polaire (Naseer *et al.*, 2015).

3.3.2.2. Fractionnement par lavage liquide-liquide

D'après la figure 18 qui présente les différentes activités d'inhibition radicalaire des fractions issues de lavage liquide-liquide, l'IC₅₀ de l'EBr-HA est 184.668 ± 1.56 µg/ml et ses fractions ; F-Ell-Hx (63.849 ± 1.11 µg/ml), F-Ell-Ch (62.621 ± 1.16 µg/ml), F-Ell-Ae (198.254 ± 3.20 µg/ml) et F-Ell-Aq (59.1081 ± 0.18 µg/ml), les résultats montre que l'EBr-

HA possède une activité anti-radicalaire plus faible que ses fractions cela est peut être due au démasquage de leur activité antioxydant par le fractionnement liquide-liquide.

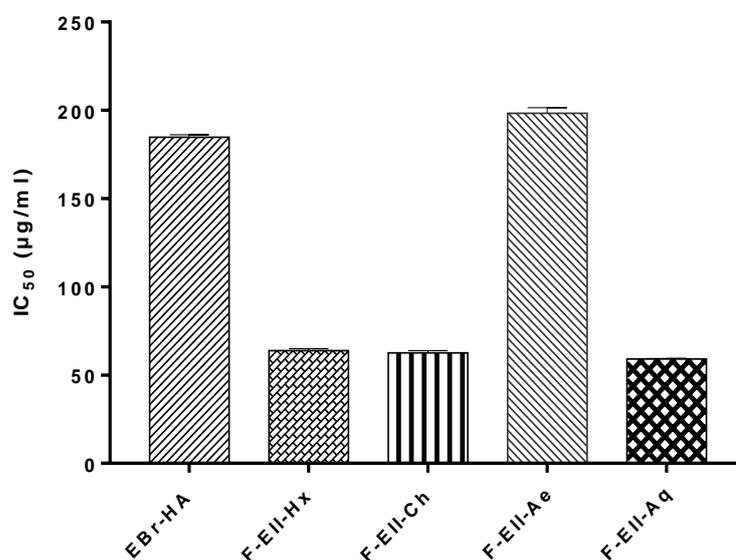


Figure 18. IC₅₀ du radical DPPH par les EBr-HA et ces fractions par lavage liquide-liquide.

La comparaison entre les résultats d'IC₅₀ d'EBr-HA et F-Mac-HA montre que l'extrait brut obtenue par macération hydro-alcoolique possède une activité anti-radicalaire plus faible que les fractions obtenue par macération successive, cela est peut être due au démasquage de leur activité par le fractionnement en utilisant la macération successive.

En conclusion, pour les trois méthodes de fractionnement, l'extraction fractionnée influence positivement sur l'activité anti-radicalaire vis-à-vis le DPPH.

Les fractions hydro-alcooliques (macération et soxhlet), présente une activité antioxydant plus importante que les fractions des solvants pure. La présence de l'eau dans le solvant d'extraction permet d'extraire plus de composés ayant des propriétés antioxydants. La biomasse des plantes contient en général plusieurs types des polyphénols qui ont des solubilités différentes *vis-à-vis* de l'eau et qui ont une activité antioxydant (Dabire *et al.*, 2011).

Conclusion

Conclusion

De nos jours encore, en Afrique comme partout ailleurs dans le monde, les plantes médicinales retrouvent une place de choix dans la thérapeutique après la vague des médicaments minéraux et d'antibiothérapie. Se travaille cibler à *Equisetum arvense* L. qui appartient aux familles des Equisetaceae. Elle est parmi les plantes les plus utilisées traditionnellement comme un diurétique doux, antioedémateux et également une capacité antioxydant élevée ainsi que des effets antimicrobiens.

D'abord l'extraction par décoction pendant 2 min présente le bon rendement. Et concernant les rendements d'extraction par macération organique, la macération hydro-éthanolique exprime le bon rendement, l'extraction par le soxhlet donne le meilleur rendement par rapport à l'autre méthode d'extraction utilisé dans cette étude.

Le fractionnement des l'EBr-HA à l'aide de lavage liquide-liquide indique que F-ElI-Aq présent le bon rendement par rapport aux autres fractions. La comparaison entre les deux méthodes de fractionnement indique que le rendement représenté par macération successive est supérieur que le fractionnement par soxhlet.

L'analyse quantitative des flavonoïdes montre que l'extraction par décoction pendant 2 min est plus riche en flavonoïdes que les autres extrais bruts aqueux, pour les extrais bruts organique l'EBr-HA présente l'extrait le plus concentré en flavonoïdes et pour les fractions brutes organique, l'EBr-Ch est plus concentré en flavonoïdes qui expliqué par la richesse de cette plante par les flavonoïdes aglycone. Et concernant les méthodes de fractionnement la technique de lavage liquide-liquide représente la technique la plus efficace pour la séparation des flavonoïdes en termes de quantité.

Après la récupération des extraits et son analyse, ce travail a pour le but de tester l'activité antioxydant de tous les extraits et les fractions par le teste de DPPH, ce teste indique que l'EBr-D₃ présente une bonne activité de piégeage radicalaire par rapport à les autres extrais aqueux, pour les extrais bruts organique l'EBr-Eth et l'EBr-Méth présentent des bonnes activités de piégeage radicalaire par rapport à les autres extrais bruts organiques. F-SHA présente la meilleur activité anti radicalaire par rapport à les autres fractionnes obtenir par soxhlet, les résultats d'IC₅₀ de des fractions obtenir par macération successive et lavage liquide-liquide indiquent que le fractionnement exerce un démasquage d'activité.

Des études plus approfondies comme la méthode de chélation des métaux (Ferrozine), la méthode de FRAP et et identification des molécules de fraction hydro alcoolique, aussi des

tests *in vivo* sont nécessaire pour bien évaluer des autres activités biologique d'*Equisetum arvense* L. leurs doses thérapeutiques ainsi que leurs effets toxiques. Cela permettrait de préparer des produits pharmaceutiques de grand intérêt thérapeutique.

Bibliographie

Bibliographie

- Abdoulaye Sérémé, J. M. 2008, 05 15. Concentration en Tanins des Organes de Plantes Tannifères du Burkina Faso. pp. 55-61.
- Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin, P., and Lomri A. 2007. Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases: rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du rhumatisme*. 74(7), pp 636-643.
- Ali-Rachedi F., Meraghni S., Touaibia N., and Mesbah, S. 2018. Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne Scabiosa Atropurpurea sub. Maritima L. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. pp 13 -21.
- Al-Snafi A. 2017. the pharmacology of Equisetum avense . pp 31-42.
- Alugoju. 2014, juin. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their. *Ind J Clin Biochem*, pp 11-26.
- Amor. 2008, janvier 28. maîtrise de l'aptitude technologique de la matiere vegetale dans les operations d'extraction de principes actifs ; texturation par detente instantanee controlee. Thèse de Doctorat. *rochelle, génie des procédés industriels*, France.187 p
- Amrani A., Benaissa O., Boubekri N., Zama D., Biod K., Beroal N., end Bettuzzi, S. 2014. Effet hépatoprotecteur et antiradicalaire d'un extrait butanolique de Rhantherium suaveolens. *Phytothérapie*, 12(6), pp 386-392.
- Annegowda H. V., Bhat R., Tze L. M., Karim A., et Mansor S. M. 2013. The free radical scavenging and antioxidant activities of pod and seed extract of Clitoria fairchildiana (Howard)-an underutilized legume. *Journal of food science and technology*, 50(3), pp 535-541.
- Asgarpanah J., et Roohi, E. 2012. Phytochimie et propriétés pharmacologiques d'Equisetum arvense L. *Journal of Medicinal Plants Research* , 6 (21), pp 3689-3693.
- Asghar N., Naqvi S. A. R., Hussain Z., Rasool, N., Khan Z. A., Shahzad S. A., and Jaafar, H. Z. 2016. Compositional difference in antioxidant and antibacterial activity of all parts of the Carica papaya using different solvents. *Chemistry Central Journal*, 10(1), pp 5.
- Atoui A. K., Mansouri A., Boskou G., and Kefalas P. 2005. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food chemistry*, 89(1), pp 27-36.
- Aurousseau B. 2002. Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage: conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRAE Productions Animales*, 15(1), pp 67-82.
- Baeza A., and Marano F. 2007. Pollution atmosphérique et maladies respiratoires-Un rôle central pour le stress oxydant. *médecine/sciences*, 23(5), pp 497-501.
- Balasundram N., Sundram K., and Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), pp 191-203.
- Bancirova, M. 2010. Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea. *Food Research International*, 43(5), pp 1379-1382.
- Barouki, R. 2006. Stress oxydant et vieillissement. *médecine/sciences*, 22(3), pp 266-272.
- Bauer J., Badoud R., et Löliger J. 2010. Science et technologie des aliments : Principes de chimie des constituants et de technologie des procédés. *PPUR Presses polytechniques*. 720 p
- Beaudeux J. L., Delattre J., Therond P., Bonnefont-Rousselot D., Legrand A., et Peynet J. 2006. Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse and Biologie spécialisée*, 21(3), pp 144-150

- Bégin D., and Gérin, M. 2002. Les grandes familles des solvants organiques-Utilisations et aspects physicochimiques. *Solvants industriels: Santé, Sécurité, Substitution*. Masson, Paris. pp 13-38.
- Benayache S et Bettuzzi S. 2014. Effet hépatoprotecteur et antiradicalaire d'un extrait butanolique de *Rhanterium suaveolens*. *Phytothérapie*, pp 386-392.
- Bendimerad N. 2013. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Saturejacalaminthassp. Nepeta (L.) Briq.* *Nature & Technology*, (9), 14. pp 14-19.
- Bentabet N., Boucherit-Otmani Z., end Boucherit K. 2014. Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie*, 12(6), pp 364-371
- Benzeggouta N. 2015. Evaluation des Effets Biologiques des Extraits Aqueux de Plantes Médicinales Seules et Combinées. 1-96. L'Obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences, Université Mentouri-Constantine, Département de Chimie, 96 p
- Bohui G, Adima, A, NiamkéB et N'Guessan D. 2018. Etude comparative de trois méthodes d'extraction des flavonoïdes totaux à partir des feuilles de plantes médicinales: *Azadirachta indica* et *Psidium guajava*. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 46, pp 50-58.
- Bordbar. 2016. Green synthesis of Pd/walnut shell nanocomposite using *Equisetum arvense* L. leaf extract and its application. *Environ Sci Pollut Res*, pp 4093-4104.
- Boumerfeg S., Baghiani A., Djarmouni M., Ameni D., Adjadj, M., Belkhiri F., et Arrar L. 2018. Inhibitory activity on xanthine oxidase and antioxidant properties of *Teucrium polium* L. extracts. pp 30-41
- Bourgou S., Serairibeji R., Medini F., Ksouri R. 2016. Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *journal of new sciences*, 28(12), pp 1649-1655.
- Bus J. S., and Gibson J. E. 1984. Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity. *Environmental health perspectives*, 55, pp 37-46.
- Cano, N., Barnoud, D., Schneider, S. M., Vasson, M.-P., Hasselmann, M., et Leverve, X. 2006. Traité de nutrition artificielle de l'adulte. *Springer Science and Business Media*. 1188 p
- Carneiro, D. M., Freire, R. C., Honório, T. C. D. D., Zoghaib, I., Cardoso, F. F. D. S., Tresvenzol, L. M. F., and Cunha, L. C. D. 2014. Randomized, double-blind clinical trial to assess the acute diuretic effect of *Equisetum arvense* (field horsetail) in healthy volunteers. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. pp 8
- Carneiro, D. M., Tresvenzol, L. M. F., Jardim, P. C. B. V., et Cunha, L. C. D. 2013. *Equisetum arvense*: scientific evidences for clinical use. (8): pp 1579-1596
- Castro L., Priego-Capote F. 2010. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, pp 2383–2389.
- Chabrier J. Y. 2010. Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie .Thèse de Doctorat, UHP-Université Henri Poincaré. 172 p
- Chaudhuri S., Banerjee A., Basu K., Sengupta B., Sengupta K. 2007. Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and anti-hemolytic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*. pp 42–48
- Cheurfa M., Allem R. 2015. Évaluation de l'activité anti-oxydante de différents extraits des feuilles. *Phytothérapie*. pp 1-7.
- d'Alessandro L. G., Kriaa K., Nikov I., and Dimitrov, K. 2012. Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and purification technology*, 93, pp. 42-47.

- Dabire C., Nebie R. H. C., Belanger A., Nacro M., and SibF. S. 2011. Effet du séchage de la matière végétale sur la composition chimique de l'huile essentielle et l'activité antioxydante d'extraits de *Ocimum basilicum* L. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 5(3), pp 1082-1095
- De Castro M. L., et Priego-Capote F. 2010. Soxhlet extraction: Past and present practice. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), pp 2383-2389.
- De Keulenaer W. G., Alexander R. W., Ushio-Fukai M., Ishizaka N., and Griendling K. 1998. Tumour necrosis factor α activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochemical journal*, 329(3), pp 653-657.
- De Marco, F. 2013. Oxidative stress and HPV carcinogenesis. *Viruses*, 5(2), 708-731.
- Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen L., Huynh H., Soetaredjo E., Ismadji S., et Ju YH. 2014. Effet du solvant d'extraction sur la teneur totale en phénol, la teneur totale en flavonoïdes et l'activité antioxydante de *Limnophila aromatica*. *Journal d'analyse des aliments et des drogues*, 22 (3), pp 296-302.
- Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), pp 47-95.
- Edeas M. 2007. Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie*. (5).264–270.
- Favier A. 2003. The oxidative stress: concept and experimental interest to understand diseases mechanisms and therapeutic approaches. *Actualité Chimique*, (11-12), pp 108-115.
- Fitriana W. D., Ersam T., Shimizu K., et Fatmawati S. 2016. Antioxidant activity of *Moringa oleifera* extracts. *Indonesian Journal of Chemistry*, 16(3), pp 297-301.
- Ghedadba N., Hambaba L., Ayachi A., Aberkane C., Bousselsela H., and Oueld-Mokhtar S. M. 2015. Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie*. 13(2), pp 118-129.
- Ghedira K., Goetz P. 2010. La prêle : *Equisetum arvense* L. (Equisetaceae). *Phytothérapie*. pp 388–392.
- Ghedira K. 2005. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques,. *Phytothérapie*. pp 162-169.
- Giasson B. I., Duda J. E., Murray I. V., Chen Q., Souza, J. M., Hurtig H. I., and Lee V. M. Y. 2000. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective α -synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science*. 290(5493), pp 985-989.
- González B., Calvar N., Gómez E., and Domínguez Á. 2007. Density, dynamic viscosity, and derived properties of binary mixtures of methanol or ethanol with water, ethyl acetate, and methyl acetate at T=(293.15, 298.15, and 303.15)K. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 39(12), pp 1578-1588.
- Guillouty A. 2016. Plantes médicinales et antioxydants. Thèse de Doctorat, Université Toulouse III-Paul Sabatier). 101 p
- Gülcin I. 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of toxicology*. 86(3), pp 345-391.
- Gutteridge J. 1993. Free-radicals in disease processes—A compilation of cause and consequence. *Free Radical Research Communications*. pp 141-158.
- Haleng J., Pincemail J., Defraigne J. O., Charlier C., and Chapelle J. P. 2007. Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*. 62(10), pp 628-38.
- Handa S., Khanuja S., Longo G., and Rakesh D. 2008. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. Trieste: *International Centre For Science And High Technology*. pp 260 .
- Harborne J. 1994. *The Flavonoids Advances in Research Since 1986*. New York: Routledge pp 661

- Harnafi H., Hennebelle T., Martin-Nizard F., Amran S. 2010. Effet hypolipémiant des fractions méthanolique et aqueuse du basilic chez la souris hyperlipidémique. *Phytotherapie*. pp 9–15.
- He Z., Xia, W., and Chen, J. 2008. Isolation and structure elucidation of phenolic compounds in Chinese olive (*Canarium album* L.) fruit. *European Food Research and Technology*. 226(5), pp 1191-1196.
- Hemwimon S., Pavasant P., et Shotipruk A. 2007. Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Separation and Purification Technology*. 54(1), pp 44-50.
- Hopkins W. G. 2003. Physiologie végétale. De Boeck Supérieur.
- Ignat I., Volf, I., and Popa V. I. 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry*. 126(4), pp 1821-1835.
- Jean B. 2009. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e ed). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e ed.). Lavoisier. pp 192
- Jothy L., Zuraini Z., et Sasidharan S. 2011. Phytochemicals screening, DPPH free radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activities of *Cassia fistula* seeds extract. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(10), pp 1941-1947.
- Kada S. 2018. Recherche d'extrait de plantes médicinales doués d'activités biologiques : biologie. Thèse de Doctorat, Sétif, 130 p.
- Kebière M., Lakroun Z., Mraïhi Z., and Soulimani, R. 2011. Effet anti diabétogène et cytoprotecteur de l'extrait butanolique de *Ranunculus repens* L. et de la quercétine sur un modèle expérimental de diabète alloxanique. *Phytothérapie*, 9(5), pp 274-282.
- Khoddami A., Wilkes M. A., and Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*. 18(2), pp 2328-2375.
- Kholkhal F., Lazouni H. A., Bendahou M., Boublenza, I., Chabane, S. D., and Chaouch, T. 2013. Étude phytochimique et évaluation de l'activité anti-oxydante de *Thymus Ciliatus* ssp. *Coloratus*. Afrique Science : *Revue Internationale des Sciences et Technologie*. 9(1), pp 151-158.
- Kumar S., and Pandey, A. K. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The scientific world journal*. pp 1-16.
- Lambert E., Meyer E., Xue-Ping Y., and De Leenheer, A. P. 1995. Screening, identification, and quantitation of benzodiazepines in postmortem samples by HPLC with photodiode array detection. *Journal of analytical toxicology*, 19(1), pp 35-40.
- Macheix J., Fleuriet A., and Allemand C. 2005. Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *PPUR presses polytechniques*. 131p
- Manca D., Ferron L., and Weber, J. P. 1989. A system for toxicological screening by capillary gas chromatography with use of a drug retention index based on nitrogen-con
- Markham K. 1982. Techniques of flavonoid identification (Chapitre 1 et 2): Academic Press, London. pp. 1-113.
- Mena S., Ortega A., and Estrela, J. M. 2009. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 674(1-2), 36-44. taining reference compounds. *Clinical chemistry*, 35(4), pp 601-607.
- Menini E. 1966. The indirect analysis of 17-oxosteroid glucosiduronates and sulphates in human urine. *Biochemical Journal*, 99(3), pp 747-759.
- Menvielle J. 2005. La superoxyde dismutase, puissant antioxydant naturel., pp 118-121.

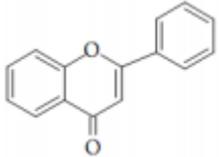
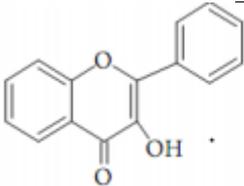
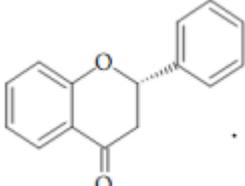
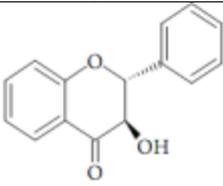
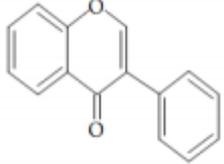
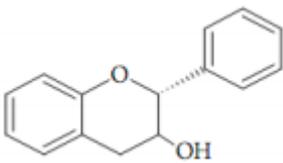
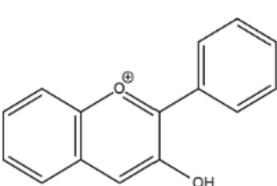
- Mezouar D., Lahfa F. B., Abdelouahid D. E., Adida H., Rahmoun N. M., and Boucherit-Otmani Z. 2014. Activité antimicrobienne d'extraits d'écorce de racines de *Berberis vulgaris*. *Phytothérapie*, 12(6), pp 380-385.
- Migdal C., and Serres, M. 2011. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*, 27(4), pp 405-412.
- Milovanović V., Radulović N., Todorović Z., Stanković M., and Stojanović, G. 2007. Antioxydant, antimicrobial and genotoxicity screening of hydro-alcoholic extracts of five Serbian *Equisetum* species. *Plant Foods for Human Nutrition*, 62(3), pp 113-119.
- Mohammed Z., and Atik, F. 2011. Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) Karst. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. (2).pp 609-615.
- Mohdaly A, Sarhan A, Smetanska I., et Mahmoud, A. 2010. Propriétés antioxydantes de divers extraits dissolvants de pelure de pomme de terre, de pulpe de betterave sucrière et de tourteau de sésame. *Journal de la science de l'alimentation et de l'agriculture*, 90 (2),pp 218-226.
- Mota R., Thomas G., Barbosa Filho J.M. 1985. Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. *Journal of ethnopharmacology*, 13, pp 289-300.
- Murley JS, Kataoka Y, Hallahan DE, Roberts JC, Grdina DJ. 2001. Activation of NFκB and MnSOD gene expression by free radical scavengers in human microvascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2001;30(12):pp 1426-1439.
- Musa K. H., Abdullah A., Jusoh K., and Subramaniam, V. 2011. Antioxydant activity of pink-flesh guava (*Psidium guajava* L.): effect of extraction techniques and solvents. *Food Analytical Methods*, 4(1), pp 100-107.
- Nacz M., and Shahidi F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*, 1054(1-2), pp 95-111.
- Naseer F., Ahmad S., Atta-ur-Rehman T. A., and Perveen, N. (2015). Antioxydant Potential of Leaves of *Opuntia monacantha* Ethanol Extract and Various Fractions: An in vitro Study. *Global Journal of Pharmacology*, 9(2), pp 144-149.
- Perry M. 2013. Herboristerie : enquête sur les principales demandes à l'officine. Thèse de Doctorat, Université de Lorraine. 151 p.
- Phaniendra A., Jestadi B et Periyasamy L. 2015. Radicaux libres : propriétés, sources, cibles et leur implication dans diverses maladies. *Journal indien de biochimie clinique*, 30 (1), pp 11-26.
- Popovici C .2009. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH . *Revue de Génie Industriel* .(4). 25-39 Sandhu, N. S., Kaur, S. A. R. A. B. J. I. T., and Chopra, D. I. V. N. E. E. T. (2010). *Equisetum arvense*: pharmacology and phytochemistry-a review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 3(3), pp 146-150.
- Reynaert N. L., Aesif S. W., McGovern T., Brown A., Wouters E. F., Irvin C. G., and Janssen-Heininger, Y. M. 2007. Catalase overexpression fails to attenuate allergic airways disease in the mouse. *The Journal of Immunology*, 178(6), pp 3814-3821.
- Richard P. 2005. Classification et reconnaissance des plantes. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 45(3), pp 189-193.
- Robbins R. J. 2003. Phenolic acids in foods : an overview of analytical methodology. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(10), pp 2866-2887.
- Ruan Z. P., Zhang L. L., and Lin, Y. M. 2008. Evaluation of the antioxydant activity of *Syzygium cumini* leaves. *Molecules*, 13(10), pp 2545-2556.

- Saffidine K. 2015. Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *Carthamus caeruleus* L. et de *Plantago major* L., Département de Microbiologie, Doctorat en Sciences, Sétif, 64 p.
- Saidman, E., Yurquina, A., Rudyk, R., Molina, M. A. A., & Ferretti, F. H. (2002). A theoretical and experimental study on the solubility, dissolution rate, structure and dipolar moment of flavone in ethanol. *Journal of molecular structure: THEOCHEM*, 585(1-3), pp1-13.
- Saker I. 2012. Etude Phytochimique Et Activités Biologiques D'une Plante De La Région De M'sila *MenthaPulegium* L (Doctoral Dissertation, Université Mohamed Boudiaf De M'sila).pp19-2.
- Salem J. H. 2009. Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitrarietusa* et synthèse de dérivés acylés de ces molécules par voie enzymatique (Thèse de Doctorat).251p.
- Spigno G., Tramelli, L., and De Faveri, D. M. 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of food engineering*, 81(1), pp 200-208.
- Stalikas C. D. 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*, 30(18), pp 3268-3295.
- Stasia M. J. 2007. La granulomatose septique chronique X+-Un fabuleux modèle d'étude de l'activation du complexe NADPH oxydase. *médecine/sciences*, 23(5), 526-532.
- Stovall, D. M., Acree Jr, W. E., and Abraham, M. H. 2005. Solubility of 9-fluorenone, thianthrene and xanthene in organic solvents. *Fluid phase equilibria*, 232(1-2), pp 113-121
- Takao L. K., Imatomi M., and Gualtieri, S. C. J. 2015. Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna). *Brazilian Journal of Biology*, 75(4), pp 948-952.
- Touaibia M., and Chaouch, F. Z. 2014. Evaluation de l'activité anti-oxydante des extraits aqueux, méthanolique et éthanolique de l'espèce saharo-endémique *Myrtus nivellei* Batt et Trab. (Myrtaceae) [Evaluation of the antioxidant activity of aqueous, methanolic and ethanolic extracts of the Sahara-endemic species *Myrtus nivellei* Batt et Trab. (Myrtaceae)]. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 6(3), pp 407.
- Trabsa H., Baghiani A., Boussoualim N., Krache I., Khenouf S., Charef N., and Arrar L. 2015. Kinetics of Inhibition of Xanthine Oxidase by *Lycium arabicum* and its Protective Effect against Oxonate- Induced Hyperuricemia and Renal Dysfunction in Mice. (T. H. L, Éd.) *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, pp 249-256.
- Valko M., Rhodes C., Moncol J., Izakovic M., and Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. (160).pp 1-40
- Yakhlef G., Laroui S., Hambaba L., Aberkane M., Ayachi A. 2011. Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle. *Phytothérapie*, pp 209-218.
- Zahoui S, Zirihi N, Soro Y, Traore F. 2010. Effet hypotenseur d'un extrait aqueux de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Waterman (Rutaceae). *Phytothérapie*. (8). pp 359–369
- Zerargui. 2015. Activité antioxydante des extraits de racines *tamus communis* L et caractérisation des substances bioactives. L'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences, Université Ferhat Abbas, Sétif.169p

- Zhang D. X., and Gutterman D. 2007. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 292(5), H2023-H2031.
- Zhou Y., Yan H., Guo M., Zhu J., Xiao Q. and Zhang L. 2013 .Reactive oxygen species in vascular formation and development. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. pp 1-14.

Annexes

Annexe 1 : Différentes classes de flavonoïdes et leurs structures (Kumar et Pandey, 2013).

Classes	Flavonoïdes	Structure	Substation
flavones	Luteoline Apigénine Chrysin		5, 7, 3', 4'-OH 5, 7, 4'-OH 5, 7-OH
Flavonols	Quercétine Kaempferol Myricétine		5, 7, 3', 4'-OH 5, 7, 4'-OH 5, 7, 3', 4', 5'-OH
Flavanones	Hesperétine Naringénine		5, 7, 3', 4 -OCH ₃ 5, 7, 4'-OH
Flavanonols	Taxifoline		3, 5, 7, 3', 4'-OH
Isoflavones	Genistéine Genistéine Daidzéine		5, 7, 4'-OH 5, 4'-OH, 7-Oglu 7, 4'-OH
Flavan-3-ols	catechine epicatechine epigallocatechine		3, 5, 7, 3', 4'-OH 3, 5, 7, 3', 4'-OH 3, 5, 7, 3', 4', 5'-OH
Anthocyanidine	Cyanidine Cyanine Pelargonidine		3, 5, 7, 3', 4'-OH 3O-glc, 5, 7, 3', 4'- OH 3, 5, 7, 4'-OH

ملخص

في هذه الدراسة، تم إجراء مقارنة بين تقنيات استخراج المكونات النشطة *Equisetum arvense* L. عن طريق التسريب الساخن، والإغراق، والنقع الكحولي والمائي الكحولي، وعن طريق Soxhlet، وتقنيات تجزئة EBR-HA عن طريق الغسيل السائل السائل. بمذيبات عضوية مختلفة ذات قطبية متزايدة ثم تجزئة بواسطة النقع المتتالي، و Soxhlet. تم إجراء تحليل EBRs وتجزئة باستخدام اختبار قياس الألوان $AlCl_3$. يُظهر اختبار DPPH نشاطاً مثبطاً قوياً لـ EBR-D₃ مقارنة بالمستخلصات الخام الأخرى، وتشير IC_{50} للكسور إلى كفاءة طرق التجزئة، وأفضل طريقة للتجزئة هي الغسيل السائل-السائل. يمكن إثراء هذه النتائج من خلال طريقة إزالة معدن ثقيل (فيروزين)، وطريقة FRAP والكروماتوغرافيا وكذلك الاختبارات المجراة على الجسم الحي.

الكلمات المفتاحية: *Equisetum arvense*، الكسر، الفلافونويد، نشاط مضادات الأكسدة، DPPH

Résumé

Dans la présente étude, une comparaison a été réalisée entre les techniques d'extraction des principes actifs d'*Equisetum arvense* L., par infusion chaude, décoction, macération alcoolique et hydro-alcoolique, et par Soxhlet, et les techniques de fractionnement d'EBR-HA par un lavage liquide-liquide avec différents solvants organiques à polarité croissante, puis le fractionnement par macération successive, et Soxhlet. L'analyse des EBRs et fraction a été réalisée à l'aide de dosage colorimétrique $AlCl_3$. Le test DPPH montre une forte activité inhibitrice d'EBR-D₃ par rapport aux autres extraits bruts, les IC_{50} des fractions indiquent l'efficacité des méthodes de fractionnement, et la meilleure méthode de fractionnement est le lavage liquide-liquide. Ces résultats peuvent être enrichis par la méthode de chélation des métaux (Ferrozine), la méthode de FRAP et chromatographie et aussi des tests *in vivo*.

Mots clés : *Equisetum arvense*, Fractionnement, Flavonoïdes, Activité antioxydante, DPPH.

Abstract

In the present study, a comparison was made between the techniques extraction of active principles of *Equisetum arvense* L. by hot infusion, decoction, alcoholic and hydroalcoholic maceration, and by Soxhlet, and the techniques of fractionation of EBR-HA by liquid-liquid lavage. with different organic solvent with increasing polarity then fractionation by successive maceration, and Soxhlet. The analysis of RBAs and fraction was carried out using $AlCl_3$ colorimetric assay. The DPPH test shows strong inhibitory activity of EBR-D₃ compared to other crude extracts, the IC_{50} of the fractions indicate the efficiency of fractionation methods, and the best fractionation method is liquid-liquid washing. These results can be enriched by the method of metal chelation (Ferrozine), the method of FRAP and chromatography and also *in vivo* tests.

Key words: *Equisetum arvense*, Fractionation, Flavonoids, Antioxidant Activity, DPPH.