

M/507-101/01



7

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ ABOUBAKR BELKAID - TLEMCEM

Faculté des sciences

Département de Chimie

Laboratoire de Chimie Organique Substances

Naturelles et Analyses - COSNA -

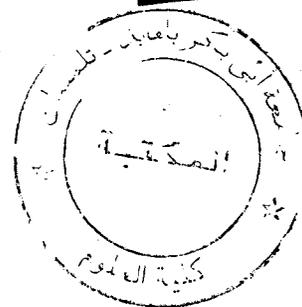
Inscrit Sous le N°:  
Date le: 06-DEC-2016  
Code: 1934

Soutenu par:

CHIKHI Ilyas

En vue d'obtenir le diplôme de:

Master 02



Spécialité : *Chimie Bio-Organique et Thérapeutique*

**Sujet : Extraction de la globularine de *Globularia alypum* L. et étude de sa réactivité chimique - activité biologique**

Dirigé par : MERGHACHE Salima

Soutenu le 10 juin 2009 devant le jury composé de :

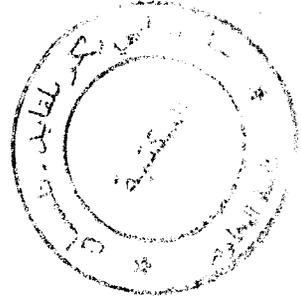
Ghalem Said.	Professeur	Président	UABT
Tabti Boufeldja.	Professeur	Examineur	UABT
Joseph Kajima Mulengi	Professeur	Examineur	UABT
Atmani Abdelkrim	Maître de Conférences	Examineur	UABT
Bensaid Okkacha	Professeur	Examineur	UABT
Arrar Zoheir	Maître de Conférences	Examineur	UABT
Allali Hocine	Maître de Conférences	Examineur	UABT

bibliothèque des sciences



BFS1934

Inscrit:  
Date: 28/10/2009  
Code: 3724



*A mes parents*

*A ma famille,*

*A mes frères et sœurs,*

*A mes ami(e)s*

*A toutes les mains qui m'ont été tendues...*



## Remerciements

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Chimie Organique Substances Naturelles et Analyses COSNA, sous la direction du Professeur Joseph Kajima Mulengi. Je tiens à le remercier pour m'avoir offert l'opportunité de travailler au sein de son groupe de recherche et pour la confiance qu'il m'a accordé pour mener à bien ce sujet.

Une spéciale dédicace pour mon encadreur le Dr. MERGHACHE Salima qui m'a beaucoup soutenu au cours des expériences effectuées dans notre laboratoire. Elle ma offert une aide très précieuse et j'en suis très reconnaissant.

Monsieur le Professeur GHALEM Said, je vous remercie d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.

Je remercie le Professeur TABTI Boufeldja, le Professeur Joseph KAJIMA MULENGI, le Dr. ATMANI Abdelkrim, le Professeur BENSAID Okkacha, le Dr. ARRAR Zoheir ainsi que le Dr. Allali Hocine de l'honneur qu'ils me font de juger ce travail.

Je tiens à remercier tous mes camarades de « promo » avec qui j'ai passé de joyeux moments.

Je tiens aussi à exprimer ma profonde reconnaissance à tous les membres du Laboratoire de Chimie Organique Substances Naturelles et Analyses COSNA.

Je souhaite également exprimer mon profond respect, ma reconnaissance et mon admiration pour Mesdames & Messieurs : MERGHACHE S., Tabti B., J. Kajima Mulengi, GHALEM S., Arrar Z., BENSAID O., ATMANI A., Allali H. ... car grâce a ses braves gens je suis arrivé jusque là, et je suis très fier de saisir la chance et de travailler au sein de ces extraordinaires professeurs.

Je remercie également mes parents mes frères et sœurs et tous mes amis pour leurs encouragements et leur soutien permanent.



Merci à toutes et à tous....

# TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 : PRESENTATION DE <i>Globularia alypum</i> L.....	4
I. PRESENTATION DES GLOBULARICEES.....	4
I.1. Le genre <i>Globularia</i> .....	4
I.2. Etymologie.....	4
I.3. Écologie et habitat .....	5
I.4. Morphologie générale et végétative .....	5
I.5 Usage.....	5
II. TRAVAUX SCIENTIFIQUES REALISES SUR <i>Globularia alypum</i> L.	
II.1. Récapitulatif sur les travaux de type chimique réalisés sur <i>Globularia alypum</i> L.....	5
II.2. Récapitulatif sur les travaux de type biologique réalisés sur <i>Globularia alypum</i> L. ....	9
Références.....	11
CHAPITRE 2 : GENERALITES SUR LES IRIDOIDES	
I. Introduction .....	15
II. Structure des irridoïdes.....	15
III. Etymologie.....	17
IV. Propriétés physico-chimiques .....	17
V. Activité biologique des irridoïdes .....	17
VI. Réactivité des irridoïdes.....	17
Références.....	19

## CHAPITRE 3 : ACTIVITE BIOLOGIQUE DES METABOLITES SECONDAIRE

I. LE DIABETE ET LA PHYTOTHERAPIE .....	3
I.1. Diabète.....	24
I.2. Diabète type1.....	24
I.3. Diabète type2.....	24
II. LES ANTIOXYDANTS SOURCES ET INTERT.....	24
II.1 Source des antioxydants .....	24
II.2. Propriétés chimiques.....	24
II.3. Activité antioxydante.....	24
II.4. Test du pouvoir antioxydant.....	25
III. LES SUBSTANCES ANTIMICROBIENNES.....	26
III. 1. Introduction.....	26
III. 2. Groupes des plantes antimicrobiennes.....	26
Références.....	28

## CHAPITRE 4 GENERALITES SUR LES TECHNIQUES D'EXTRACTION, ET LES METHODES D'ANALYSE

I. INTRODUCTION.....	32
II. TECHNIQUES D'EXTRACTION.....	32
III. METHODES CHROMATOGRAPHIQUES DE SEPARATION.....	33
III.1. Définition .....	33
III.2. Chromatographie sur couche mince (CCM) .....	33
III.3. Chromatographie sur colonne.....	34
III.4. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) .....	34
III.5. Chromatographie en phase liquide à haute performance.....	35
IV. METHODES SPECTROSCOPIQUES .....	35
IV.1. Spectrophotométrie UV - Visible.....	36
IV.1. Spectrophotométrie IR.....	36
Références.....	38
CHAPITRE 5 PARTIE EXPERIMENTALE.....	39

I. INTRODUCTION.....	39
II. MATERIEL VEGETAL.....	39
II.2. Identification botanique.....	39
II.3. Préparation des échantillons.....	39
III SOLVANTS, PRODUITS CHIMIQUES ET APPAREILS.....	40
III.1. Solvants et produits chimiques.....	40
III.2. Appareils utilisés.....	40
IV. TESTS PHYTOCHIMIQUES .....	40
IV.1. Taux d'humidité .....	41
IV.1. Flavonoïdes .....	41
IV.1.1. Réaction à la cyanidine.. .....	41
IV.1.2. Leucoanthocyanes .....	41
IV.2. Tanins .....	42
IV.2.1. Tanins catéchiques.....	42
IV.2.2. Tanins galliques.....	42
IV.3. Composés réducteurs .....	42
IV.4. Saponosides.....	42
IV.5. Alcaloïdes .....	43
IV.6. Stérols et terpènes .....	43
IV.7. Coumarines .....	43
V. EXTRACTION DE LA GLOBULARINE DES FEUILLES DE <i>Globularia</i> <i>alypum</i> L. ....	44
V.I. Extractions .....	44
V.2. Fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de <i>Globularia</i> <i>alypum</i> L. et isolements de la globularine.....	46
VI. Hémisynthèse de la globularine .....	46
VI.1. Acétylation de la globularine.....	47
VII. Activités biologiques.....	47
VII.1. Mode opératoire de l'activité hypoglycémiant.....	48
a) Induction du diabète expérimental .....	48
b) Etude aiguë de l'activité antidiabétique de la globularine.....	48
c) Test de tolérance au glucose chez des rats normaux.....	48
VII.2. Mode opératoire de l'activité antimicrobienne.....	48

a) Provenance des germes.....	48
b) Choix des antibiotiques.....	49
IX. 3. Méthode utilisée.....	49
VII.3. Mode opératoire du pouvoir antioxydant.....	50
Références.....	52
 <b>CHAPITRE 6 : DISCUSSION DES RESULTATS</b>	
I. TESTS PHYTOCHIMIQUES.....	54
II. EXTRACTION - PURIFICATION.....	54
II.1. Rendements d'extractions.....	55
II.2. Fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de <i>Globularia alypum</i> L. et isolements de la globularine.....	55
III. ACETYLATION DE LA GLOBULARINE.....	57
III.1 Produit AC1 : .....	57
III.2. Caractéristiques des deux produits .....	59
IV. ACTIVITE BIOLOGIQUE.....	59
IV.1. Activité hypoglycémiante.....	59
IV.2. Activité antimicrobienne.....	61
IV.3 Pouvoir antioxydant.....	62
CONCLUSION.....	63

# INTRODUCTION

Les plantes sont une source inépuisable de substances biochimiques : tanins, glucosides, iridoïdes, flavonoïdes, saponines, etc., et qui procurent des propriétés curatives appréciables. Plus de 10 000 plantes possèdent des propriétés médicinales [1]. L'approche ethnopharmacologique, qui vise l'évaluation scientifique de l'ensemble des pratiques traditionnelles relatives à la médication par les plantes et les substances d'origine naturelle et la mise en évidence de leurs propriétés curatives, constitue la principale voie de découverte de nouvelles molécules candidates à servir de médicaments [2]. Ainsi, sur 252 médicaments considérés comme essentiels par l'OMS, plus de 11 % sont exclusivement produits à partir de plantes médicinales [3]. C'est dans cette problématique que se place ce présent travail. En se basant sur les résultats d'enquêtes ethnopharmacologiques effectuées auprès de la population de la région de Tlemcen, une plante a fait l'objet de notre étude [2,4].

La méthode globale de travail que nous avons adoptée, est basée sur une action pluridisciplinaire, visant une valorisation des plantes de la flore de la région de Tlemcen, utilisées en médecine traditionnelle et permettant de relier conformément les éléments d'information apportés par les ethnobotanistes, au travail des chimistes et des biologistes.

La plante que nous avons retenue est une dicotylédone. Il s'agit d'une Globulariaceae, *Globularia alypum* L. appelée localement « Ain Larnab ». Le choix de celle-ci a été guidé par les indications d'usage traditionnelle mais aussi par le fait que cette plante appartient à une famille botanique où l'on retrouve des groupes chimiques ayant des activités biologiques variées.

*Globularia alypum* est utilisée dans tout le Maghreb pour le traitement du diabète. Le décocté ou l'infusé des feuilles, possède une activité hypoglycémiant [5,6]. Les pharmacopées traditionnelles méridionales utilisent ses feuilles en infusion pour leurs propriétés astringentes, laxatives (suivant la dose, elles peuvent devenir purgatives), stomachiques et sudorifiques [7].

*Globularia alypum* est riche en un iridoïde « la globularine ». Par ailleurs, l'activité hypoglycémiant de « la globularine » a été faite sur des rats Wistar normaux ou diabétiques. Ces derniers sont rendus diabétiques par la streptozotocine (diabète sévère). Les résultats ont montré que la globularine possède une activité hypoglycémiant peu significative. Par contre, elle possède un effet sur la diminution du taux des triglycérides et du cholestérol [8].

La première partie de ce manuscrit rappelle les travaux déjà réalisés sur la plante.

La seconde partie portera sur les travaux réalisés sur la plante sélectionnée. Il nous a paru intéressant et nécessaire de combler le vide par :

- ◆ La détermination des différentes classes de familles chimiques présentes dans les fleurs de la plante par criblage phytochimique.
- ◆ L'extraction et l'isolation de la globularine des feuilles de *Globularia alypum*.
- ◆ L'étude de la réactivité de la globularine en réalisant son acétylation.
- ◆ La détermination de l'activité hypoglycémiante de la globularine sur des rats atteints par un diabète modéré.
- ◆ La détermination de l'activité antibactérienne de la globularine et du produit obtenu par l'acétylation de la globularine.
- ◆ La détermination du pouvoir antioxydant de la globularine et du produit obtenu par l'acétylation de la globularine.

## Références bibliographiques

- [1] **P. Iserin.**  
La rousse encyclopédie des plantes médicinales, Edition Larousse, 2001, p.46.
- [2] **M. Eddouks, M.L. Ouahidi, O. Farid, A. Moufid, A. Khalidi, A. Lemhadri.**  
L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc, *Phytothérapie* 5, 2007, 194–203.
- [3] **S.M.K. Rates.**  
Plants as source of drugs, *Toxicon*, 39: 603-13, 2001, 603-13.
- [4] **Allali, H. et al.**  
Phytotherapy of diabetes in west Algeria. *Asian Journal of Chemistry*.2008; 20(4), 2701 - 2710.
- [5] **H. Benmehdi.**  
Valorisation de certaines plantes médicinales a activité hypoglycémiantes comme la Coloquinte, Mémoire de Magister en Chimie Organique Appliquée, dirigé par B. Tabti. Université de Tlemcen,2000.
- [6] **I. Ahmad, F. Aqil, M. Owais.**  
Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs, Edition: wiley-VCH, 2006.
- [7] **G. Garnier, L. Bezanger – Beauquesne et G. Debraux.**  
Ressources médicinales de la flore française. Tome I. Edition Vigot frères. Paris VI. 1961.
- [8] **S.Merghache.**  
Contribution à l'étude chimique et biologique de *Globularia alypum* L. et *Ruta chalepensis* L., deux plantes de la flore de la région de Tlemcen utilisées en médecine traditionnelle, Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Tlemcen ,2007.

# CHAPITRE 1

## PRESENTATION DE *Globularia alypum* L.

## **I. PRESENTATION DES GLOBULARICEES**

La famille des Globulariacées (Globulariaceae) est une famille de plantes dicotylédones qui comprend 30 espèces réparties en 2 genres, *Globularia* avec environ 28 espèces et *Poskea* avec 2 espèces [1,2].

Les Globulariacées sont des plantes herbacées ou arbustives vivaces aux feuilles simples alternes, entières lisses et sans stipules. Les fleurs sont en capitules, en panicules (*Globularia*) ou en épis (*Poskea*) [2].

### **I.1. Le genre *Globularia***

**Genre :** *Globularia*

**Espèce :** *Alypum*

**Synonymes [3-6]**

*Globularia alypa* St. Lag.

*Globularia turbith* Wilk

*Globularia virgata* Salisb

Nom en Français : Globulaire, Séné, Turbith, Herbe terrible, Petit globe, Marguerite bleue.

Nom en Anglais : Globe daisy.

Nom en Arabe : Tasselgha, Sana el-baladi, Aïnoun.

Nom commun : Ain larnab, Chebra, Zerga, hallab rwa.

### **I.2. Etymologie**

*Globularia* se rapporte à la forme globuleuse de l'inflorescence, de même que le terme *alypum* lequel en grec, désignait déjà une plante dont les fleurs étaient ainsi groupées [7].

### **I.3. Écologie et habitat :**

Plante vivace poussant dans les lieux rocaillieux et broussailleux secs, de préférence sur calcaire, parfois aussi dans les maquis. On trouve fréquemment des buissons poussant sur de gros rochers isolés ou sur les falaises. Distribution : pratiquement dans tout le pourtour méditerranéen, surtout à l'ouest du bassin [7,8].

#### **I.4. Morphologie générale et végétative :**

Arbrisseau très ramifié, d'une hauteur allant de 30 cm à 1 m. Tiges brun-rouge striées. Feuilles persistantes très nombreuses, coriaces, alternes, généralement spatulées et mucronées (terminées par une pointe), Floraison: de novembre à mai. Le fruit caractéristique est akénien. Elle est très résistante à la sécheresse et elle tolère sans problème -12 à -15°C. [3,8].

#### **I.5 Usage**

*Globularia alypum* est très utilisée dans la médecine traditionnelle algérienne, Les composés actifs sont des irridoïdes [9], bien qu'on la suppose toxique à la longue. Des herboristes avisés ont préconisé durant la cure (qui doit être de durée limitée) un régime qui consiste à s'abstenir de consommer des aliments acides (citron ...), les piments forts et d'autres espèces piquantes. Au Maroc la plante est signalée comme dépurative, antiarthritique et purgative. En Tunisie, elle est utilisée contre les ulcères [8,9]. *Globularia alypum* est utilisée dans le traitement des maladies de l'hypertension et cardiovasculaire [10,11].

Au Maroc et en Algérie, *Globularia alypum* (feuilles) est très utilisée en infusion et en décoction par les personnes diabétiques, pour diminuer le taux de glucose dans le sang [12].

Les pharmacopées traditionnelles méridionales utilisent ses feuilles en infusion pour leurs propriétés astringentes, laxatives (suivant la dose, elles peuvent devenir purgatives), stomachiques et sudorifiques [13].

## **II. TRAVAUX SCIENTIFIQUES REALISES SUR *Globularia alypum L.***

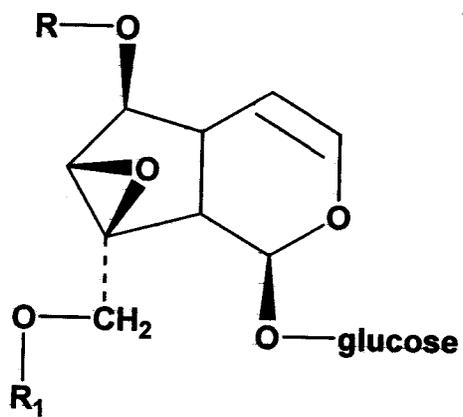
### **II.1. Récapitulatif sur les travaux de type chimique réalisés sur *Globularia alypum L.***

Nous reporterons ci-après, sous forme de tableau (tableau 1), les molécules identifiées. Les principales formules moléculaires seront représentées par la suite.

**Tableau 1 : Récapitulatif sur les travaux de type chimique réalisés sur *Globularia alypum L.***

Molécules isolées	Référence
Globularine M1	[14]
Catalpol M2	[15]
Globularidine M3	[15]
Globularicisine M4	[16]
Apigenin M5	[16]
Lutéolin M6	[17]
Liriodendrine M7	[17]
Syringine M8	[18]
4',7-dihydroxyflavone M9	[19]
Bayine M10	[20]
Apigénine-7-glucoside M 11	[21]
Rutine M12	[22]
6-hydroxylutéolin 7-O-laminaribioside M13	[23]
Globularioside M14	[22,23]

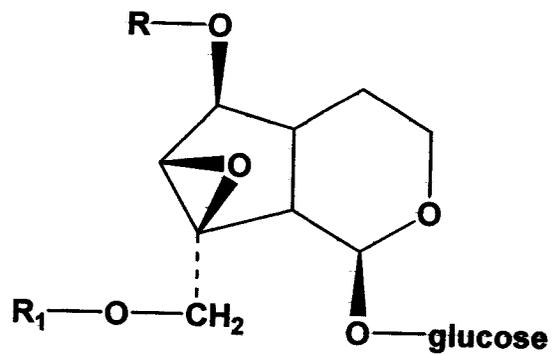




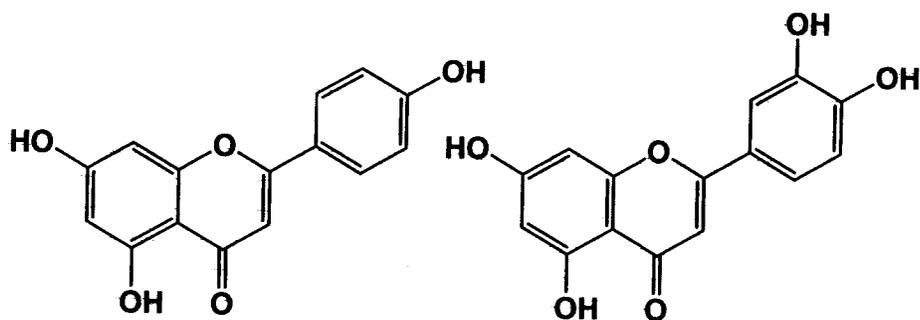
**M1** : R = H ; R<sub>1</sub> = trans-cinnamoyl

**M4** : R = H ; R<sub>1</sub> = cis-cinnamoyl

**M2** : R = R<sub>1</sub> = H



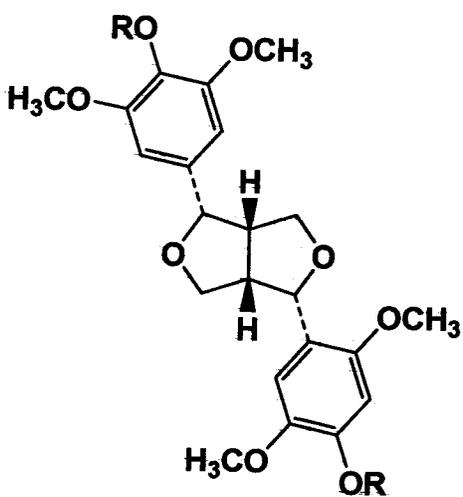
**M3** : R = H ; R<sub>1</sub> = trans-cinnamoyl



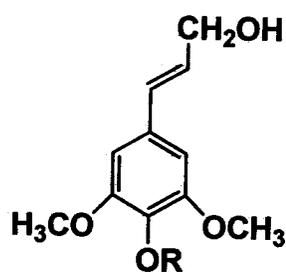
**M5**

**M6**

R = β-D-glucose

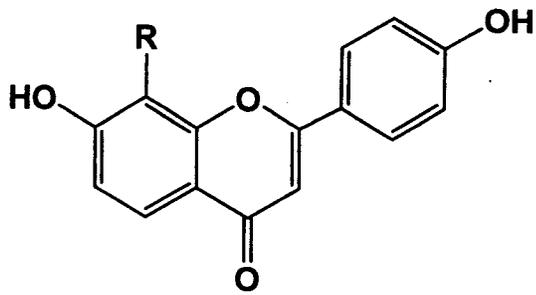


**M7**

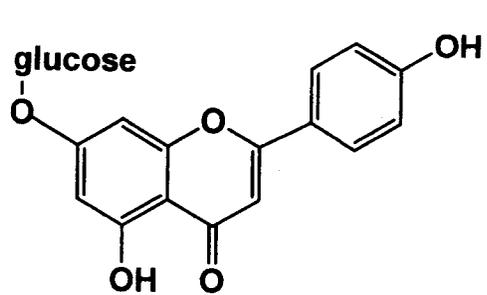


**M8**

R = β-D-glucose

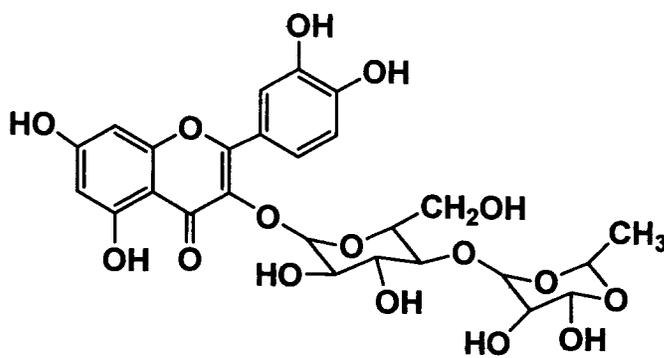


**M9: R=H**

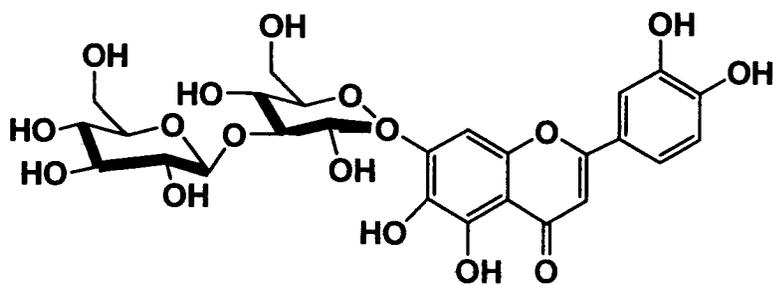


**M11**

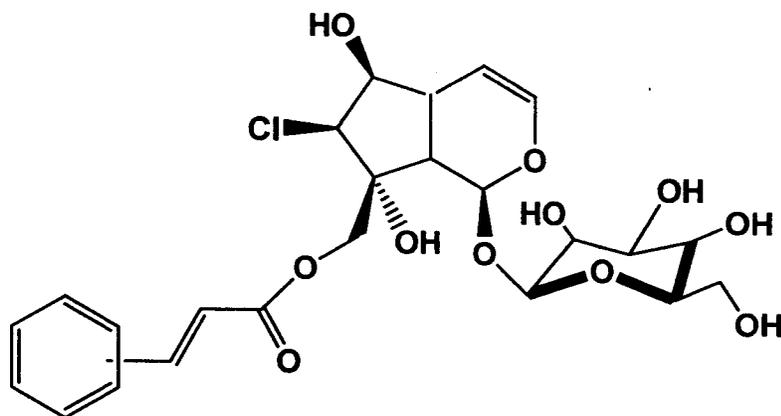
**M10: R=glucosyle**



**M12**



**M13**



**M14**

Le composé majoritaire de *Globularia alypum* de l'Algérie est la globularine. Dans le tableau 2, nous donnons les teneurs en globularine des différentes parties de la plante [24].

**Tableau 2 : Les rendements moyens en globularine.**

ORGANES DE PLANTE	FEUILLES	TIGES	GRAINS	RACINES
Rendements par rapport à la matière végétale sèche (%)	3.40	1.45	2.07	0.15

## II.2. Récapitulatif sur les travaux de type biologique réalisés sur *Globularia alypum* L.

Les études biologiques réalisées sur *Globularia alypum* ont montré que l'extrait aqueux des feuilles est utilisé comment un agent laxatif et antiseptique.

D'autres études biologiques réalisées sur *Globularia alypum* ont montré que l'extrait aqueux des feuilles possède une activité antileucémique, une activité immunosuppressive et un effet hypoglycémiant significatif [25-26].

Certains travaux ont été effectués sur le pouvoir antioxydant, les résultats obtenus ont suggéré que *Globularia alypum* pourrait être une source potentielle d'antioxydants [27,28].

L'activité hypoglycémiant de la globularine isolée des feuilles de *Globularia alypum*, a été faite sur des rats Wistar normaux ou diabétiques. Ces derniers sont rendus diabétiques par la streptozotocine (diabète sévère). Les résultats ont montré que la globularine

possède une activité hypoglycémiant peu significative. Par contre, elle possède un effet sur la diminution du taux des triglycérides et du cholestérol [24].

Néanmoins, il serait souhaitable que cette plante soit consommée avec prudence car il y a risque de toxicité [29, 30].

## **Références bibliographiques**

- [1] **H. Gaussen, J. F. Leroy et P. Ozenda.**  
Précis de botanique, Edition Masson, 1982, p.412.
- [2] **H. Vernon Heywood.**  
Les plantes à fleurs : 306 familles de la flore mondiale, Edition Nathan, Paris, 1996.
- [3] **B. Boullard.**  
Dictionnaire des plantes médicinales du monde, Edition Estem, 2001.
- [4] **NT. WS. Beniston.**  
Fleurs d'Algérie, Entreprise nationale du livre, 1984.
- [5] **P. Quezel et S. Santa,**  
Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Edition du centre national de la recherche scientifique, 1963.
- [6] **Joachim W. Kadereit,**  
Flowering plants, dicotyledons, Edition Springer, 2004.
- [7] **G. Garnier, L. B. Beauquesne, G. Debraux.**  
Ressources médicinales de la flore française, Edition Vigot frères, 1961.
- [8] **Joachim W. Kadereit.**  
Flowering plants, dicotyledons, Edition Springer, 2004.
- [9] **F. Darghouth.**  
Etude analytique de *Olea europaea L.* et *Globularia alypum L.* et leurs transformations par voie chimique, Thèse de doctorat, Université d'Aix-Marseille 3, Aix-en-Provence, 2003.
- [10] **A. Pieroni, L. Price.**  
Eating and healing: traditional food as medicine, Edition Haworth Press, 2006.

- [11] **A. Ziyyat, A. Legssyer, H. Mekhfi, M. Serhouchni and W. Benjelloun.**

Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal of Ethnopharmacolog*, 1997, 58, 45-54.

- [12] **A. Djeridane , M. Yousfi , B. Nadjemi, N. Vidal, JF. Lesgards, P. Stocker.**

Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity, *Eur Food Res Technol* , 2007, 224, 801-809.

- [13] **F. Baba Aissa.**

Encyclopédie des plantes utiles. Edition Librairie moderne. Rouiba, 1999.

- [14] **G. Di Maio and L. Panizzi.**

Struttura della globularina. *La Ricerca Scientifica Anno*, 1966 , 36 (9) , 845-850.

- [15] **P. Bernard, M. Lallemand et G Balansard.**

A propos des hétérosides chromogéniques, type iridoïde dans les feuilles de *Globularia alypum L.* *Plantes Médicinales et Phytothérapie*. Tome VIII, 1974, 3, 180-187.

- [16] **A. Boutiti, A. Benguerb R. Kitouni, M. Bouhroum, S. Benayache , F. Benayache**

Secondary metabolites from *Globularia alypum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 2008, 44, 437-443.

- [17] **R. K. Chaudhuri and O. Sicher.**

Structure of two highly oxygenated iridoïd glucosides from *Globularia alypum L.* *Tetrahedron Letters*, 1979, 34, 3149-3152

- [18] **R. K. Chaudhuri and O. Sicher.**

Structure of globularidine: an unusual iridoïd glucoside from *Globularia alypum L.* *Helvetica a Chimica Acta*, 1979, 62, 2 (67), 644-646.

- [19] **R. K. Chaudhuri and O. Sicher.**

New iridoïd glucosides and a lignan diglucoside from *Globularia alypum L.* *Helvetica Chimica Acta*, 1981, 64, 1 (1), 3-15.

- [20] **B. Ben Hassine, A. M. Bui, Z. Mighri et A. Cavé.**

Flavonoïdes et anthocyanes de *Globularia alypum L.* *Plantes Médicinales et Phytothérapie*. Tome XVI., 1982, 3, 197-205.

- [21] **N. E. Es Safi, A. Kollmann, S. Khlifi and P. H. Ducrot.**

Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum L.* Structure – activity relationship. *LWT-Food Science and Technology*, 2007, 40 (7), 1246-1252

- [22] **N. E. Es Safi, S. Khlifi, L. Kerhoas, A. Kollmann, A. El Abbouyi .**

Antioxidant constituents of the aerial parts of *Globularia alypum L.* growing in Morocco. *J. Nat. Prod*, 2005, 68, 1293-1296.

- [23] **N. E. Es Safi, S. Khlifi, L. Kerhoas, A. Kollmann, A. El Abbouyi and P. H.**

Iridoïd glucosides from the aerial parts of *Globularia alypum L.* (Globulariaceae) *Chem. Pharm. Bull*, 2006, 54 (1), 85-88.

- [24] **S. Merghache**

Contribution à l'étude chimique et biologique de *Globularia alypum L.*, et *Ruta chalepensis L.*, deux plantes de la flore de la région de Tlemcen utilisées en médecine traditionnelle, Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Tlemcen, 2007.

- [25] **G. Caldes, B. Prescott and J. R. King.**

A potential antileukemic substance present in *Globularia alypum*. *Planta Medic*, 1975, 27, 72-76.

- [26] **B. Fehri, I. R. Tebbett, B. Freiburger and J. Karli.**

The immunosuppressive Effect of *Globularia alypum* extracts. *Phytotherapy Research*, 1996; 10; 539-540.

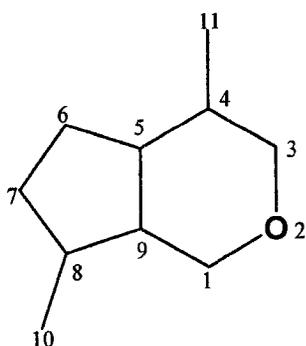
**CHAPITRE 2**  
**GENERALITES SUR LES IRIDOIDES**

## I. Introduction

Les iridoïdes sont des composés très répandus dans la Nature, présents en particulier dans de nombreuses plantes médicinales. Ces composés sont amers, solides ou liquides, ayant des températures de fusion élevées. Ils sont des intermédiaires importants dans la biosynthèse de nombreux alcaloïdes. Les iridoïdes appartiennent à la classe des monoterpènes. Ils présentent des propriétés biologiques intenses et très diversifiées [1-4].

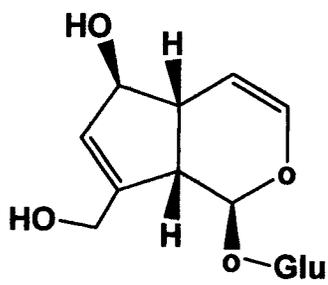
## II. Structure des iridoïdes

Les iridoïdes sont caractérisés par un squelette cyclopenta [c][pyranique parfois désigné par le terme d'iridanes ( cis-2-oxabicyclo-[4,3,0] - nonane ) [5].

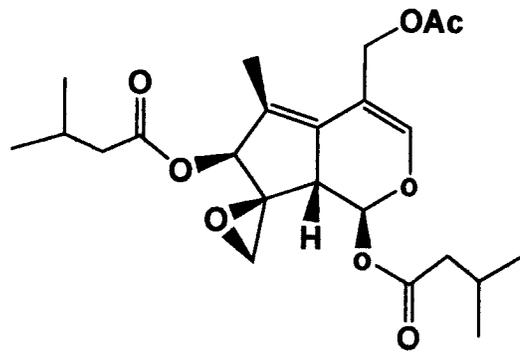


**M1**

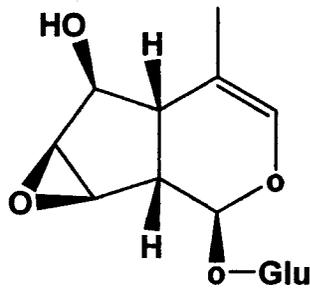
Mais un certain nombre de structures dérivant de ce noyau (seco - iridoïdes par exemple par l'ouverture du cyclopentanique) sont y inclus.



M2



M3

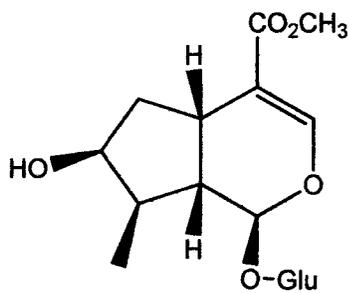


M4

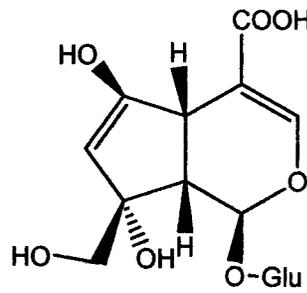


Le groupement méthyle C-10 généralement porté par le carbone C-8, peut être plus ou moins oxydé en hydroxy méthyle (aucuboside) (M2), époxyde (valtrate)(M3), il est carrément absent comme dans le cas du deutzioside (M4) [6 -12].

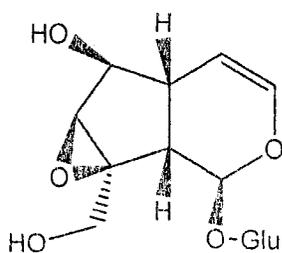
Les irridoïdes sont des dérivés de monotéropénoïdes de 9 à 10 atomes de carbone, généralement présents sous forme de glycosides unis par l'oxygène. Le carbone C-11 est habituellement inclus dans un groupe carbométhoxy comme dans le cas du loganoside (M5) ou carboxylique comme dans le cas du monotropéoside (M6). Dans un certain nombre de cas, le carbone C-11 est absent comme dans le cas du catalpol (M7) [13-16].



M5



M6



M7

Dans la nature le groupe 2-hydroxyl est protégé soit avec un glycoside ou par un ester [17].

### III. Etymologie

Les iridoïdes tirent leur nom de celui des fourmis du genre *Iridomirmex* à partir desquelles furent isolés des composés impliqués dans les mécanismes de défense propres à ces insectes [18].

### IV. Propriétés physico-chimiques

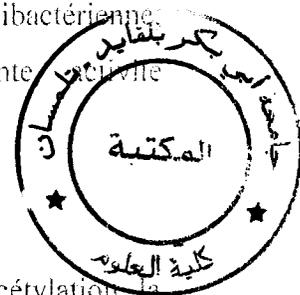
Les iridoïdes et les seco - iridoïdes sont des solides cristallisés ou amorphes, caractérisés par leur sensibilité aux acides, quelques uns sont même sensibles aux bases. Des réactions de coloration ont été signalées pour certains d'entre eux : l'aucubine et l'asperuloside donnent diverses colorations avec les phénols et les amines, la génipine donne une coloration bleu violacé avec les acides aminés. L'hydrolyse acide ou même enzymatique des glycosides, conduit le plus souvent à une aglycone oxydable [19-24].

### V. Activité biologique des iridoïdes

Les iridoïdes sont les principaux constituants de beaucoup de familles de plantes. Ils couvrent un large domaine d'activités biologiques telles que : l'activité antibactérienne, l'activité anti tumorale, l'activité anti-inflammatoire, activité antioxydante, activité antivirale .... Certains possèdent un effet laxatif et diurétique [22-31].

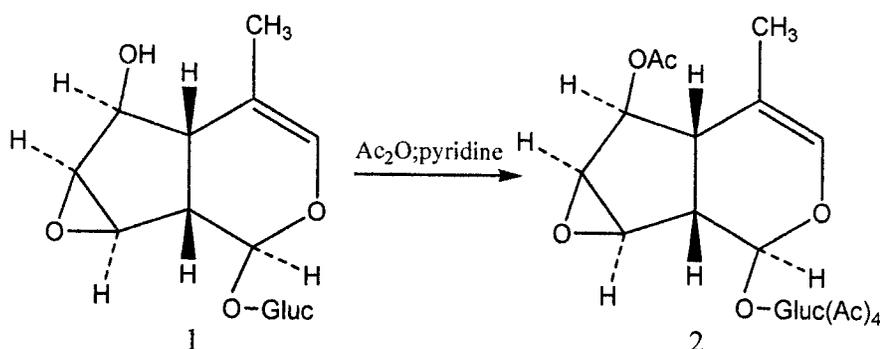
### VI. Réactivité des iridoïdes

Les iridoïdes peuvent subir plusieurs types de réactions telles que : l'acétylation, la méthylation, la silylation...etc. Dans ce travail, nous nous intéresserons à la réaction



d'acétylation. L'acétylation est donc la substitution dans une molécule d'un atome d'hydrogène par un radical acétyle. Les réactions d'acétylation peuvent aboutir à des molécules biologiquement actives telle que la N-acétyl-DL-leucine qui est une petite molécule résultant de la N-acétylation de l'acide amino-isocaproïque. La N-acétyl-DL-leucine, largement prescrite en France par les médecins, spécialistes ou généralistes, bien connue des pharmaciens sous le nom de Tanganilet dont l'efficacité est appréciée par de nombreux patients atteints de vertiges, est un médicament dont le mécanisme d'action, après plus de quatre décennies, reste encore peu connu [32].

On donne un exemple de ce type de réactions : l'acétylation de mentzeloside (1) dans un mélange de 5 ml de pyridine et 1 ml d'anhydride acétique. Après chauffage sous reflux pendant (2 h), le mélange réactionnel a été versé dans de l'eau froide, on a obtenu un précipité blanc : Mentzeloside Pentacétate (2), avec un rendement de 85% [33].



## **Références bibliographiques**

- [1] **M.W. Hajnos, J. Sherma, T.Kowalska.**  
Thin Layer Chromatography in Phytochemistry, Edition CRC Press, 2008.
- [2] **C. Socaciu.**  
Food Colorants: Chemical and Functional Properties, Edition CRC Press, 2007.
- [3] **T.Eicher.**  
The chemistry of heterocycles, Edition Wiley-VCH, 2003.
- [4] **P.C. Vollhardt, N.E. Schore .**  
Traité de chimie organique, Edition De Boeck Université, 2004.
- [5] **S.D. Sarker, Zahid Latif, A.I. Gray.**  
Natural products isolation, Edition Humana Press, 2006.
- [6] **G.M. Polya.**  
Biochemical targets of plant bioactive compounds, Edition CRC Press, 2003.
- [7] **D. Scimeca, M. Tétau.**  
Votre santé par les plantes: Le guide phyto utile pour toute la famille, Edition Alpen, 2005.
- [8] **J.I.G. Codagan, J. Buckingham, F.J.M. Donald, P.H. Rhodes.**  
Dictionary of organic compounds, Edition CRC Press, 1996.
- [9] **P.J. Houghton.**  
Valerian: the genus Valeriana, Edition CRC Press, 1997.
- [10] **T.S. Tracy, R.L. Kingston.**  
Herbal products: toxicology and clinical pharmacology, Edition Humana Press, 2007.

[11] **Paul M. Dewick.**

Medicinal natural products: a biosynthetic approach, Edition John Wiley and Sons, 2002.

[12] **Damtoft,S .,Franzyk,H.Jensen,S.R.**

The iridoid content of *Zaluzianskya capensis* has been investigated. A new iridoid, zaluzioside (6- $\beta$ -hydroxygardoside methyl ester) was found in addition to catalpol and ajugol  
*Phytochemistry*, 1997, 45,743-750.

[13] **W.S.Judd, C.S.Campbell.**

Botanique systématique, Edition De Boeck Université, 2001.

[14] **E. M. MPONDO , J. GARCIA.**

Iridoids from *Gentiana verna*, *Phytochemistry*, 1989, 28, 2503-2504.

[15] **W. Herz, H. Falk, J. C. Braekman, L.**

Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, Edition Springer, 2000.

[16] **J. P. Alazard, J. L. Brayer, A. Tixidre and C. Thal.**

Synthèse de cyclopenta[c]dihydro-3, 4 pyrannes précurseurs d'iridoïdes, *Tetrahedron* 40 1984, 695-707.

[17] **T. Eicher, S. Hauptmann, H. Suschitzky, J. Suschitzky.**

The chemistry of heterocycles: structure, reactions, syntheses, and applications, Edition Wiley-VCH, 2003.

[18] **E.D. Morgan.**

Biosynthesis in insects, Edition: Royal Society of Chemistry, 2004, p.62.

[19] **J. Bruneton.**

Pharmacologie, photochimie plantes médicinales, édition Tec et Doc, 2003.

[20] **D.B. Dougall.**

Colour in food: improving quality, Edition CRC Press, 2002.

[21] **A Nagia A, G.Prasuna.**

Synthesis of cyclopentacyran skeleton of iridoid lactones ;*Tetrahedron*, **1997**, **53(43)**,14507-14545.

[22] **D. Castillo , J. Arevalo , F. Herrera.**

Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae), *Ethnopharmacology*, **2007**, **112**, 410–414.

[23] **S.E. Kintzios, M.G. Barberaki.**

Plants that fight cancer, Edition CRC Press, **2004**, p. 24.

[24] **D. Tasdemir , N.D. Guner , R.Perozzo.**

Anti-protozoal and plasmodial FabI enzyme inhibiting metabolites of *Scrophularia lepidota* roots, *Phytochemistry*, **2005**, **66**, 355–362.

[25] **J.B. Harborne, H. Baxter, G.P. Moss.**

Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants, Edition CRC Press, **1999**.

[26] **N.M. Eskin, S. Tamir.**

Dictionary of nutraceuticals and functional foods, Edition CRC Press, **2006**.

[27] **B. Charpentier, F.H. Lorleac'h, A. Harlay, L. Ridoux.**

Guide du préparateur en pharmacie, Edition Elsevier Masson, **2008**.

[28] **P. M. Dewic.**

Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, Edition John Wiley and Sons, Edition, **2009**.

[29] **M. Maurice, J. C. Wootton.**

Ethnomedicine and drug discovery, Edition Elsevier, **2002**.

[30] **R.M. Gutiérrez.**

Handbook of Compounds with Antiprotozoal Activity Isolated from Plants, Edition Nova Publishers, **2007**.

CHAPITRE 3  
ACTIVITE BIOLOGIQUE DES METABOLITES  
SECONDAIRE



## **I. LE DIABETE ET LA PHYTOTHERAPIE**

### **I.1. Diabète**

Le diabète est une maladie complexe tant par ses mécanismes physiopathologiques que par son déterminisme génétique ainsi que la genèse de ses complications. C'est un groupe hétérogène de maladies métaboliques dont la caractéristique principale est une hyperglycémie résultant d'un défaut de sécrétion, d'action de l'insuline ou de ces deux anomalies associées [1].

Généralement, on distingue deux types de diabète : diabète de type 1 ou diabète insulino-dépendant, diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant. Le nombre de personnes atteintes de diabète ne cesse de croître de façon très alarmante. L'impact de cette pathologie sur les systèmes de santé est très lourd à travers les pertes humaines et les coûts liés aux traitements, à la prise en charge et aux complications. Les traitements actuels représentés essentiellement par l'insuline et les hypoglycémisants oraux visent à soigner et non à guérir la maladie [2,3].

Plusieurs enquêtes ethnopharmacologiques ont été menées à travers le monde pour recenser les plantes antidiabétiques utilisées dans les différentes pharmacopées traditionnelles [4 - 12]. Les informations ethnobotaniques recueillies dans plusieurs régions du monde estiment que plus de 1200 espèces végétales, soit plus de 725 genres appartenant à 183 familles, sont utilisées pour leurs propriétés hypoglycémiantes et antihyperglycémiantes [5, 13].

Les investigations ethno pharmacologiques sont actuellement centrées sur la validation expérimentale des propriétés curatives, traditionnellement attribuées à ces remèdes. Dans 81 % des cas, les indications traditionnelles de plantes antidiabétiques ont été expérimentalement confirmées [13]. Certaines de ces plantes, dont l'activité pharmacologique a été confirmée sur des modèles animaux, ont également fait l'objet de plusieurs études cliniques [14]. Pour plusieurs plantes, les composés actifs responsables de l'activité pharmacologique ont été identifiés et isolés et les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les effets thérapeutiques ont été partiellement ou complètement élucidés [15].

## **I.2. Diabète type 1**

Le diabète de type 1 (qu'on appelait auparavant diabète insulino-dépendant ou diabète de l'enfant) se caractérise par une sécrétion insuffisante d'insuline. Il est rapidement mortel sans l'administration quotidienne d'insuline [16].

## **I.3. Diabète type 2**

Le diabète de type 2 (nommé autrefois non insulino-dépendant ou diabète de l'adulte) est dû à une mauvaise utilisation de l'insuline par l'organisme. Il représente 90 % des cas de diabète dans le monde et résulte principalement d'un surpoids et du manque d'exercice physique [17].

## **II. LES ANTIOXYDANTS SOURCES ET INTERT**

### **II.1 Source des antioxydants**

Le nombre de substances d'origine naturelle présentant des propriétés antioxydantes avérées est en perpétuelle augmentation et cette catégorie de molécules compte aujourd'hui des représentants dans la plupart des classes chimiques du règne végétale : terpènes, alcaloïdes, coumarines, lignanes méthylxanthines [18].

On désigne par antioxydant toute substance qui lorsqu'elle est présente en faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat. Les antioxydants d'origine naturelle semblent contribuer de manière significative à la prévention de certaines maladies telles que les cancers et les maladies cardiovasculaires [19].

### **II.2. Propriétés chimiques**

D'un point de vue chimie chimique, un antioxydant n'est qu'un composé réducteur : il va donc réagir avec un autre oxydant pour le neutraliser. Les molécules antioxydantes ont des polarités variables. Les mécanismes d'action sont multiples incluant la réduction de radicaux ou de peroxydes, la désactivation des radicaux par addition covalents [20].

### **II.3. Activité antioxydante**

Les radicaux libres peut être contrebalancée par les antioxydants .Ces substances protectrices se trouvent a l'état naturel : ce sont notamment les vitamines E et C, les

caroténoïdes, les acides aminés cystéines et taurine et des enzymes. C'est donc l'alimentation (principalement les fruits et légumes), complétée par l'action de l'organisme, qui apporte des antioxydants mais ceux-ci ne sont pas toujours présents en quantité optimale.

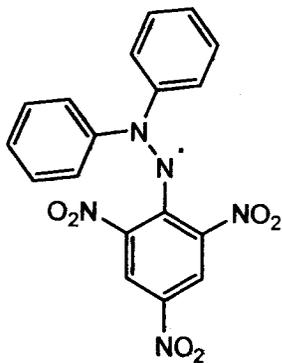
En 1957, l'américain Denham Harman a donc l'idée d'augmenter la présence de ces substances chez des organismes vivants. En administrant des produits antioxydants à des souris, il réussit à augmenter leur durée de vie de 20 %. A la fin des années soixante, sur la base des résultats enregistrés chez ces animaux, il estime que la consommation régulière d'antioxydants pourrait permettre à l'être humain de vivre de 10 à 15 ans supplémentaire.

Les antioxydants empêchent la formation des molécules très réactives ou provoquent l'élimination des ces espèces avant d'endommager les constituants de la cellule [21,22].

#### **II .4. Test du pouvoir antioxydant**

Le radical DPPH (fig :3.2.4) est stable à température ordinaire, il présente en solution une absorption caractéristique a 517 nm qui lui confère une coloration violette. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit par un capteur de radicaux libres.

Ainsi en chromatographie sur couche mince CCM, les composés actifs sont visualisables sous la forme de taches jaunes sur fond violet.



(Fig: 3.2.4) 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle(DPPH)

DPPH est commercialisé, peu onéreux et en nécessite qu'une mise en solution dans le méthanol (éthanol, DMSO) pour être utilisé comme révélateur en CCM. Cette solution peut être stockée au congélateur pour des périodes assez longues sans diminution notable d'activité du radical.

Certaines substances réagissent immédiatement (acide caféique) et d'autres plus lentement. Le temps optimal de réaction est de trente minutes à une heure [23,24].

### **III. LES SUBSTANCES ANTIMICROBIENNES**

#### **III. 1. Introduction**

De nos jours, un grand nombre de composés issus de plantes sont utilisés en médecine moderne et une majorité de ceux-ci le sont pour leur usage traditionnel. Des 25 composés pharmaceutiques les plus vendus à travers le monde, 12 proviennent des substances naturelles, mais jusqu'ici, environ seulement 10 % des 250 000 espèces de plantes inventoriées ont fait l'objet de recherche des molécules bioactives [25].

Les antimicrobiens réduisent ou stoppent le développement et la multiplication des bactéries, ce qui confère à ces produits une place unique dans la lutte contre les maladies infectieuses graves dues à diverses bactéries pathogènes. Grâce à eux, nous sommes devenus davantage capables de traiter des maladies infectieuses telles que la pneumonie, la méningite, la tuberculose, le paludisme, le SIDA et les infections nosocomiales [26-27].

#### **III. 2. Groupes des plantes antimicrobiennes**

Dans le monde prodigieux des Plantes à Fleur, plus de 800 espèces produisent des inhibiteurs de croissance de divers (microbes). Mais le nombre de végétaux aptes à synthétiser des antibiotiques comparables à ceux que l'on extrait des bactéries ou de champignons est infiniment moindre. Il s'agit surtout de composés soufrés, d'hétérosides, d'alkaloïdes, de lactones non saturées, d'acides gras ou de quinones et leurs dérivés.

On donne dans le tableau 1, les genres et les espèces de plantes à fleurs synthétisant des substances développant une activité antibiotique particulièrement importante [28].

Tableau 1 :

Genres et Espèces	Antibiotiques
<i>Allium sativum L.</i>	Allicine
<i>Anacardium occidentale L.</i>	acide anacardique
<i>Cassia verticulata L.</i>	acide cassique
<i>Coumaronuna odorata Willd.</i>	coumarine

### **Références bibliographiques**

- [1] The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, *Diabetes Care* 25(suppl. 1), 2002, S5-S15.
- [2] **S. Jacqueminet, A. Grimaldi.**  
Pharmacologie du diabète : Guide pratique du diabète, Edition Elsevier Masson, 2005.
- [3] **J. Calop, S. Limat, C. Fernandez.**  
Association nationale des enseignants de pharmacie clinique, Edition Elsevier Masson, 2008.
- [4] **A.U. Rahman, K. Zaman** Medicinal plants with hypoglycemic activity, *J Ethnopharmacol*, 1989, 26, 1-55.
- [5] **C.J. Bailey, C. Day .**  
Traditional plant medicines as treatment for diabetes, *Diabetes Care*, 1989, 12, 553-564.
- [6] **M. Eddouks, M. Maghrani, A. Lemhadri.**  
Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the southeast region of Morocco, *J. Ethnopharmacol* , 2002, 82, 97-103.
- [7] **K.J. Grover, S. Yadav, V. Vats.**  
Medicinal plants of India with anti-diabetic potential, *J Ethnopharmacol*, 2002, 81, 81-100.
- [8] **M.D. Ivorra, M. Paya, A. Villar.**  
A review of natural products and plants as potentiel antidiabetic drugs,

*J Ethnopharmacol*, 1989, 27,243-275.

[9] **H. Jouad , M. Haloui, H. Rhiouani.**

Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane),

*J Ethnopharmacol*, 2001, 77,175-82.

[10] **H.X. Wang.**

Natural products with hypoglycemic, hypotensive, hypocholesterolimic, antiatherosclerotic and antithrombotic activities, *Life Sci*, 1999, 65, 2663-77.

[11] **Z. Yaniv, A. Dafni, J. Friedman, D. Palevitch.**

Plants used for the treatment of diabetes in Israel, *J Ethnopharmacol* , 1987, 2, 145-151.

[12] **A. Ziyat, H. Legssyer , A. Mekhfi.**

Phytotherapy of hypertension and diabetes in Oriental Morocco, *J Ethnopharmacol*, 1997, 58, 45-54.

[13] **R.J. Marles, N.R. Farnsworth.**

Antidiabetic plants and their active constituents, *Phytomedicine* , 1995, 213-189.

[14] **E. Ernst.**

Plants with hypoglycaemic activity in humans, *Phytomedicine*, 1997, 4, 73-8.

[15] **A.Y. Oubré, T.J. Carlson, S.R. King,**

From plant to patient: an ethnomedical approach to the identification of news drugs for the treatment of NIDDM, *Diabetologia*, 1997, 40,614-7.

[16] **G. Hennen.**

Endocrinologie, Edition De Boeck Université, 2001, p.133.

**[17] G. Slama.**

Prise en charge du diabète de type 2 non insulino-dépendant, Edition John Libbey Eurotext, 2000, p.11.

**[18] M. Cuendet.**

Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie : *Fagraea blmei*(loganiaceae) et de trois plantes d'altitude : *Bartsia alpina* (Scrophulariaceae), *Loiseleuria procumbens*(Eriacaceae) et *Campanula brabata* (campanulaceae), Thèse de doctorat , Faculté des sciences de l'Université de Lausanne 1999,

**[19] J. Guy.**

Antioxydants et vieillissement, Edition John Libbey Eurotext, 1994, p.45.

**[20] J. Ferrari.**

Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles : *Gnidia involucrata Steud. ex A. Rich.* Thèse de doctorat, Faculté des sciences de l'Université de Lausanne , 2002, p 175.

**[21] T. Halay.**

Histoire des centenaires et de la longévité, Editions L'Harmattan, 2007, p.217.

**[22] J.F. Toussaint.**

L'athérosclérose: physiopathologie, diagnostics, thérapeutiques  
Edition Elsevier Masson, 2003.

**[23] T.Hennebelle.**

Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de lamiales productrices d'antioxydants : *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana* , *Ballota pseudodictamnus*(Lmaiacées) et *Lippia alba* (Verbénacées), Université des sciences et technologies de Lille-Lille 1, 2006, p.271.

**[24] J. P. Mercier, E. Maréchal.**

Chimie des polymères: synthèses, réactions, dégradations, Edition PPUR presses polytechniques, 1993, p.61.

[25] **K. Rhayour, T. Bouchikhi, A. Tantaoui-Elaraki.**

The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, *J. Essential Oil Res*, 2003, 15(5),356-362.

[26] **M. Curé.**

Le risque biologique, Edition Elsevier Masson, 2004.

[27] **E. Jawetz, J. L. Melnick, E. A. Adelberg.**

Microbiologie médicale, Edition Presses Université Laval, 1973, p.136.

[28] **B. Boullard.**

Dictionnaire des plantes médicinales du monde, Edition Estem, 2001.

## I. INTRODUCTION

La **phytochimie**, où chimie des végétaux, est la science qui étudie la structure, le métabolisme et la fonction ainsi que les méthodes d'analyse, de purification et d'extraction des substances naturelles issues des plantes. Elle est indissociable d'autres disciplines telles que la pharmacognosie traitant des matières premières et des substances à potentialité médicamenteuse d'origine biologique.

Les végétaux sont des organismes qui peuvent synthétiser un grand nombre de molécules organiques complexes qui n'interviennent pas dans les grandes voies du métabolisme de base, c'est-à-dire le métabolisme énergétique et le métabolisme de carboné. Ces molécules sont toutefois utiles aux plantes elles-mêmes et aux consommateurs des chaînes alimentaires pour diverses raisons. Les plantes qui disposent d'énergie et de squelettes carbonés en quantité suffisante, grâce à la photosynthèse, s'avèrent être des producteurs polyvalents.

## II. TECHNIQUES D'EXTRACTION

Les techniques d'extraction sont nombreuses et leur mise en oeuvre, plus ou moins facile. Certaines sont utilisées de longue date par l'homme, d'autres sont le résultat d'avancées récentes, toutes ont pour but de récupérer un corps pur (arôme, médicament...) à partir d'un mélange [1, 2].

- **Le pressage** (ou expression) : Cette opération consiste à « faire sortir » un produit en exerçant une pression. Les Égyptiens écrasaient des fleurs pour extraire des arômes ou des parfums ; c'est aussi l'opération effectuée lorsqu'on se prépare un jus d'orange !
- **La décoction** : On place des plantes finement divisées dans de l'eau froide ou un autre solvant et on porte le tout à ébullition.
- **L'infusion** : On laisse tremper des végétaux finement divisés dans de l'eau bouillante ou dans tout autre solvant à chaud, de façon à y dissoudre les principes actifs.  
*Exemple*: préparation du thé.
- **La macération** : On laisse séjourner, à froid, les végétaux finement divisés dans un liquide pour en extraire les constituants solubles. *Exemple* : préparation de liqueurs par macération de fruits dans l'alcool.



- **Le cryobroyage** : On congèle les plantes ou les fleurs à très basses températures, sous azote liquide, à  $-196^{\circ}\text{C}$ ; les végétaux sont alors broyés, et on recueille une poudre fine et homogène. Les vitamines, les enzymes et les substances volatiles sont conservés.
- **L'enfleurage** : On étale des pétales de fleurs sur de la graisse. Celle-ci extrait les parfums et les odeurs de la plante et, une fois saturée, elle est traitée à l'alcool. Celui-ci est ensuite évaporé sous vide. Il reste alors un résidu très parfumé, l'« absolue », qui servira à la fabrication des parfums. On distingue l'enfleurage à froid (pour les plantes délicates : jasmin, violette) de l'enfleurage à chaud (la graisse est chauffée entre  $60^{\circ}\text{C}$  et  $70^{\circ}\text{C}$ ).
- **L'entraînement à la vapeur** : Les parfums de la plante sont entraînés par de la vapeur d'eau. Après condensation dans un réfrigérant, on obtient un distillat qui doit ensuite être traité.
- **L'extraction par solvant** : Le produit de base (pétales de fleurs, plantes...) est mis en présence d'un solvant dans lequel l'espèce chimique à extraire se met en solution. C'est un procédé récent (19<sup>e</sup> siècle) car il fait appel à des produits organiques qui n'étaient pas connus auparavant (cyclohexane, pentane, acétone, éther de pétrole...). Ce produit organique est ensuite évaporé, pour former un résidu solide très parfumé, le « concrète », qui est ensuite traité à l'alcool pour obtenir l'« absolue ».

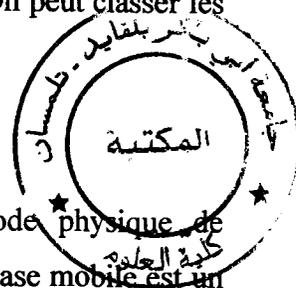
### III. METHODES CHROMATOGRAPHIQUES DE SEPARATION

#### III.1. Définition

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinité des substances à analyser à l'égard de deux phases : l'une stationnaire ou fixe et l'autre mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînée par la phase mobile, résulte soit de leurs adsorptions successives sur la phase stationnaire, soit de leurs solubilités différentes dans chaque phase. On peut classer les méthodes chromatographiques d'après la nature des phases utilisées [2, 3].

#### III.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (C.C.M), est une méthode physique de séparation qui repose principalement sur les phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que



CHAPITRE 4  
GENERALITES SUR LES TECHNIQUES  
D'EXTRACTION, ET LES METHODES  
D'ANALYSE



l'échantillon ait été déposé vers le bas de la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

Le facteur de rétention (**R.F**) d'une substance est une constante, elle constitue une de ses caractéristiques physiques, qui est le quotient de la distance de migration de chaque composé, de la ligne de départ (dépôt), jusqu'au centre de composé, sur la distance de solvant.

$$\text{R.F} = \frac{\text{distance parcourue par le composé}}{\text{distance parcourue par le solvant}}$$

### III.3. Chromatographie sur colonne

La substance à analyser est déposée au sommet d'une colonne, constituée par un tube en verre vertical ouvert aux deux extrémités, et rempli d'un solvant, qui entraîne les constituants du mélange à vitesses différentes selon leur nature. C'est le développement du chromatogramme

La polarité de l'éluant est progressivement augmentée afin d'accélérer la désorption des composés polaires.

### III.4. Chromatographie en phase gazeuse (CPG):

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode d'analyse immédiate, qui permet de séparer les mélanges gazeux complexes ou susceptibles d'être vaporisés, elle constitue pour le chercheur la méthode de choix indispensable à l'analyse qualitative et quantitative des mélanges complexes. Un tel processus est basé sur la migration différentielle des constituants du mélange à analyser.

La séparation se produit dans un tube appelé colonne : celle-ci remplie d'un substrat dit phase stationnaire, et parcourue par un gaz appelé gaz vecteur, celui-ci constitue la phase mobile. Les constituants du mélange, dits aussi solutés, se partagent inégalement entre les deux phases.



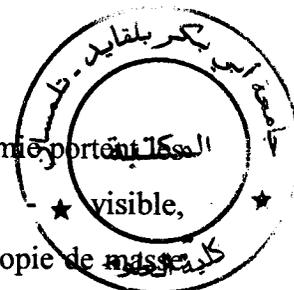
### III.5. Chromatographie en phase liquide à haute performance

La chromatographie en phase liquide à haute performance CLHP, mais on trouve plus fréquemment l'abréviation anglaise HPLC (*high performance liquid chromatography*) depuis les années 1990, est une technique de séparation analytique en fonction de l'hydrophobicité et préparative des molécules d'un composé ou un mélange de composés. Pour certains, HP signifie « haute pression ». Cette forme de chromatographie est fréquemment utilisée en biochimie, ainsi qu'en chimie analytique.

L'échantillon à analyser est poussé par un liquide (appelée phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie. Le débit d'écoulement de la phase mobile est élevé ce qui entraîne une augmentation de la pression dans le système. Ce débit élevé diminue le temps nécessaire pour séparer les composants le long de la phase stationnaire. La fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants. En effet, pour un même volume de phase stationnaire la surface d'échange augmente si les "grains" qui la composent sont de diamètre plus petit. Les pics obtenus sont plus étroits donc la résolution est améliorée, le seuil de détection est également plus bas. La combinaison de ces attributs - rapidité et résolution élevées - conduit à l'appellation « haute performance ». Les solvants utilisés sont des combinaisons miscibles d'eau et de divers liquides organiques (alcools, acétonitrile, dichlorométhane, ...). Souvent, la composition de la phase mobile est modifiée au cours de l'analyse, c'est le mode dit "gradient" ou "élution graduée". Par exemple, sur une colonne apolaire, en utilisant un mélange eau/méthanol comme phase mobile, les composants les plus hydrophobes sont élués avec une concentration élevée en méthanol alors que les composants plus hydrophiles sont élués préférentiellement avec une concentration faible en méthanol. Selon la nature de la phase stationnaire, on commencera par une concentration élevée en méthanol ou le contraire.

### IV. METHODES SPECTROSCOPIQUES

Les méthodes spectroscopiques les plus couramment rencontrées en chimie portent les noms de spectroscopies infrarouge (IR), spectrophotométrie ultraviolet - visible, spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN), ou encore spectroscopie de masse (SM) et spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE). Les méthodes spectroscopiques sont des techniques basées sur l'interaction entre un photon et un atome ou plus généralement une molécule. L'énergie du photon est absorbée par la molécule qui se



retrouve alors dans un état excité. Selon l'énergie du photon, plusieurs types de processus d'excitation peuvent être engagés. La mécanique quantique nous a appris que les différentes particules du monde microscopique suivent des règles très précises : les sauts d'énergie sont quantifiés. Les particules sont au repos dans un niveau fondamental d'énergie  $E_1$ , et se retrouvent ensuite par apport d'une énergie  $DE$  dans un niveau excité  $E_2$ , avec  $\Delta E = E_2 - E_1$  [5].

#### **IV.1. Spectrophotométrie UV - Visible**

La technique de spectrophotométrie ou d'absorptiométrie est basée sur la propriété de la matière, et plus particulièrement de certaines molécules, d'absorber certaines longueurs d'ondes du spectre UV-visible. Elle permet de réaliser des dosages grâce à la **loi de Beer-Lambert** qui montre une relation de proportionnalité entre l'absorbance et la concentration, aussi bien qu'une étude structurale des complexes par l'étude des spectres d'absorption.

Cette méthode est basée sur l'utilisation d'un spectrophotomètre qui détermine l'absorption d'une solution pour une longueur d'onde donnée ou pour une plage de longueurs d'ondes judicieusement choisie. Le domaine UV s'étale entre 10 et 400 nm mais la plupart des spectroscopes ont comme limites 190 à 400 nm. De plus, ces appareils permettent aussi d'accéder aux longueurs d'ondes visibles, entre 400 et 750 nm. Les deux grandeurs caractéristiques d'une molécule en spectroscopie UV-visible seront sa longueur d'onde d'absorption maximale ( $\lambda_{max}$ ) et son coefficient d'absorption ( $\epsilon_{max}$ ) à  $\lambda_{max}$  donné. Précisons que le  $\lambda_{max}$  correspond à la longueur d'onde la mieux absorbée par la molécule, et  $\epsilon_{max}$  l'aptitude plus ou moins importante à absorber les photons à cette longueur d'onde. Ces deux valeurs caractérisent un site de la molécule, site dont la structure possède l'aptitude à absorber les électrons UV ou visible. Ce site s'appelle un chromophore [6].

#### **IV.2. Spectrophotométrie I.R**

La spectroscopie d'infra-rouge permet de déterminer la présence de groupements fonctionnels dans les molécules organiques, et les structures dans certaines molécules simples.

La spectroscopie IR est une méthode d'emploi courant, laissée un peu de côté ces dernières années au profit de la RMN, qui permet de déterminer avec une grande précision les structures moléculaires.



Un spectre IR est représenté sur un graphe qui reporte la transmission (T, l'inverse de l'absorption :  $T = -\ln I/A$ ) en fonction du nombre d'onde, l'inverse de la longueur d'onde [7]



## Références bibliographiques

- [1] [homepage.mac.com/chaوران/prof/Public/TechniquesDExtraction.pdf](http://homepage.mac.com/chaوران/prof/Public/TechniquesDExtraction.pdf) (Mai 2009).
- [2] **J. Bruneton.**  
Eléments de phytochimie et de pharmacognosie. Technique et Documentation Lavoisier. Paris. 1987.
- [3] **G. Verin.**  
La chromatographie sur couche mince, techniques et application en chimie organique, Edition Dunod, Paris 1970.
- [4] **A. Berthilier.**  
La Chromatographie et ses applications, Edition Dunod, Paris 1992.
- [5] **L. Glasser .**  
Fourier Transforms for Chemists. Part I. Introduction to the Fourier Transform - *J. Chem. Ed.*, 64, 1987, p. A228-A233.
- [6] **C. Denier, Meyer R. et Biasini G.**  
Spectroscopie : apprentissage et évaluation, *Bull. Un. Phys.*, 784, 1996, p. 909-916.
- [7] **H.H.R Schor and Teixeira E.L.**  
The Fundamental Rotational-Vibrational Band of CO and NO, *J. Chem. Ed.*, 71, 1994, p. 771-774.



## **I. INTRODUCTION**

Si l'on s'intéresse tout particulièrement à une matrice végétale, il est important de définir son identité, décrire sa morphologie, connaître son origine, son mode de production et analyser sa composition chimique. Toutefois, cette étude n'est exhaustive et le domaine concerné, étant très vaste, nécessite plus d'approfondissement.

De nombreuses recherches continuent d'élaborer des méthodologies et des instrumentations plus optimisées. Néanmoins, bien que certaines techniques analytiques soient largement connues, il n'est pas inutile de rappeler brièvement leur concept avant de procéder aux données expérimentales et mode opératoires.

Une attention particulière sera simplement portée aux méthodes disponibles et utilisées dans nos travaux.

## **II. MATERIEL VEGETAL**

### **II.1. Origine Géographique et période de récolte**

*Globularia alypum* a été récoltée en période de Floraison (Février 2006) dans la région de Ouchba.

### **II.2. Identification botanique**

L'espèce a été identifiée au Laboratoire de Botanique, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen. Un échantillon des plantes a été déposé au niveau de l'herbarium au niveau du laboratoire de Botanique.

### **II.3. Préparation des échantillons**

Après leur récolte, les échantillons ont été triés. Le séchage du matériel a été réalisé dans un espace couvert (à l'abri du soleil) et bien aéré. Le matériel végétal était retourné au fur et à mesure de son séchage.

Les échantillons broyés ont été mis dans des bocaux, en verres hermétiquement fermés, conservés à la température du laboratoire.



### **III SOLVANTS, PRODUITS CHIMIQUES ET APPAREILS**

#### **III.1. Solvants et produits chimiques**

Les réactifs utilisés lors des différents travaux sont commerciaux et utilisés sans purification supplémentaire.

Le gel de silice utilisé pour la chromatographie sur colonne présente une granulométrie de 0.063-0.2 mm (70-230 mesh) Merck-gel de silice 60.

Les chromatographies analytiques sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur plaques de silice Kieselgel 60 F254 Art. 5719 Merck.

Les produits sont révélés par extinction de fluorescence en lumière UV à 254 nm, fluorescence en lumière UV à 366 nm.

#### **III.2. Appareils utilisés**

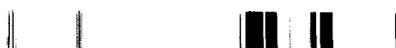
Les spectres en lumière infrarouge (IR) ont été réalisés sur un spectrophotomètre GENESIS M FTIR de Marque Mattson, monofaisceau, nombre de scan : 32. Les bandes d'absorptions sont exprimées en  $\text{cm}^{-1}$ .

Le spectre en lumière ultra - violette (UV) a été enregistré sur un spectrophotomètre Thermo Spectronic Heliosy (type Helios Gamma). Les échantillons sont en solution dans le DMSO et sont placés dans une cuve de trajet optique 1 cm.

Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil :Wagner Emunz Nr 6666, Heizbank, System Kofler Type WME.

### **IV. TESTS PHYTOCHIMIQUES**

De nos jours, la découverte de ressources naturelles du monde végétal reste capitale pour la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques. Ces composés chimiques sont déterminés par une étude phytochimique qui consiste à caractériser les différentes catégories de molécules existantes dans la plante. Ces dernières peuvent servir, non seulement à obtenir des principes actifs utilisés comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matériaux économiques.



Pour cela, les fleurs de *Globularia alypum* L. ont été soumises aux tests phytochimiques [1].

#### IV.1. Taux d'humidité

C'est la détermination de la perte de masse par dessiccation à l'étuve. Introduire 1 à 2 g de poudre, dans les verres de montre préalablement tarés. Placer les verres contenant la poudre à l'étuve de 100°C pendant 24 heures, puis peser de nouveau après refroidissement.

$$\text{Masse drogue essai} = \text{Masse totale avant étuve} - \text{Tare.}$$

$$\text{Masse eau} = \text{Masse totale avant étuve} - \text{Masse totale après étuve.}$$

Nous avons effectué cinq prises d'essai et considéré la teneur moyenne.

#### IV.1. Flavonoïdes

A l'infusé à 5 % présentant une coloration plus ou moins foncée, ajouter un acide (5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) puis une base (5 ml de NH<sub>4</sub>OH). Si la coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu violacée en milieu basique, on peut conclure à la présence d'anthocyanes.

##### IV.1.1. Réaction à la cyanidine

Introduire dans un tube à essai 5 ml de l'infusé, ajouter 5 ml d'alcool chlorhydrique (éthanol à 95 %, eau distillée, HCl concentré à parties égales en volumes) ; puis quelques copeaux de magnésium et 1 ml d'alcool isoamylique. L'apparition d'une coloration rose orangée (flavones) ou rose violacée (flavonones) ou rouge (flavonols, flavanonols) rassemblée dans la couche surnageante d'alcool isoamylique indique la présence d'un flavonoïde libre (génine). Les colorations sont moins intenses avec les hétérosides flavoniques. La réaction est négative avec les chalcones, les dihydrochalcones, les aures, les catéchines et les isoflavones.

##### IV.1.2. Leucoanthocyanes

Effectuer la réaction à la cyanidine sans ajouter les copeaux de magnésium et chauffer pendant 15 mn au bain-marie. En présence de leucoanthocyanes, il se développe une coloration rouge cerise ou violacée.

## IV.2. Tanins

Dans un tube à essai contenant 1 ml de l'infusé, ajouter 1 ml d'une solution aqueuse diluée de  $\text{FeCl}_3$  à 1%. En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu noirâtre.

**IV.2.1. Tanins cathéchiques :** Ajouter à 5 ml d'infusé, 1 ml d'alcool chlorhydrique (5 ml d'alcool 95° C, 5 ml d'eau distillée, 5 ml d'HCl concentré) concentré, le tout porté à ébullition pendant 15 minutes. En présence de tanins cathéchiques, il y a formation d'un précipité rouge soluble dans l'alcool amylique.

**IV.2.2. Tanins galliques :** Ajouter à 30 ml d'infusé, 15 ml de réactif de Stiany (10 ml de formol à 40 %, 15 ml d'acide chlorhydrique concentré). Chauffer au bain-marie à 90°C pendant 15 minutes. Filtrer le précipité et saturer le filtrat de 5 g d'acétate de sodium pulvérisé. Ajouter 1 ml goutte à goutte d'une solution de  $\text{FeCl}_3$  à 1 %. L'obtention de précipité montre la présence de tanins galliques. Filtrer et saturer 10 ml de filtrat d'acétate de sodium. Ajouter quelques gouttes de  $\text{FeCl}_3$  à 1 %. Le développement d'une teinte bleue noire indique la présence de tanins galliques non précipités par le réactif de Stiany.

## IV.3. Composés réducteurs

5 ml de décocté aqueux à 10 % sont évaporés au bain-marie jusqu'à sec. Ajouter au résidu 1 ml de réactif de Fehling (0,5 ml réactif A + 0,5 ml réactif B, mélange extemporané). L'obtention d'un précipité rouge brique indique la présence de composés réducteurs.

## IV.4. Saponosides

Il se fait sur le décocté à 10% de la drogue. Dans une série de 10 tubes à essai de 160 × 16mm, répartir 1, 2, ..., 10ml d'extrait et ajuster le volume avec l'eau à 10 ml dans chaque tube. Agiter ensuite dans le sens de la longueur pendant 15 secondes en raison de 2 agitations par seconde, laisser reposer 15 mn et mesurer la hauteur de la mousse dans chaque tube. Celui dans lequel la hauteur fait 1cm indique la valeur de l'indice de mousse, il est égal à (1000 / n° tube).



#### IV.5. Alcaloïdes

A 20 g de poudre est additionné de l'acide sulfurique dilué au 1/20. L'ensemble est laissé en macération pendant 24 heures puis filtré. Dans un tube à essai, introduire 1 ml de filtrat et ajouter 5 gouttes de réactif de Mayer dans le premier tube et 5 gouttes de réactif de Dragendorff dans le second tube. S'il y a apparition d'un précipité, la présence d'alcaloïdes est confirmée par leur extraction.

Observation : présence de turbidité ou précipitation.

(+) est enregistré si le réactif produit une légère opacité.

(++) est enregistré si le réactif produit une turbidité et non une floculation.

(+++) est enregistré si le réactif produit une floculation ou un précipité lourd.

##### Réactif de Dragendorff

Nitrate de bismuth pulvérisé 20,80 g. Iode 38,10 g. Iodure de sodium anhydre 200 g. Eau distillée 1000 ml. Agiter pendant 30 mn.

##### Réactif de Mayer

Iodure de potassium 25 g. Chlorure mercurique 6,77 g. Eau distillée 500ml.

#### IV.6. Stérols et terpènes

L'extrait à tester est obtenu à partir de 1 g de poudre et 20 ml d'éther laissés en macération pendant 24 heures, filtrer et compléter à 20 ml. Evaporer jusqu'à sec dans une capsule de 10 ml d'extrait, puis dissoudre le résidu dans 1 ml d'anhydride acétique puis 1 ml de chloroforme. Partager dans deux tubes à essai, l'un servant de témoin. Mettre dans le fond du second tube à l'aide d'une pipette 1 à 2 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré. A la zone de contact des deux liquides il y a formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet, la couche surnageante devenant verte ou violette révèle la présence de stérols et triterpènes.

#### IV.7. Coumarines

5 ml d'extrait éthérique obtenu après une macération de 24 heures sont évaporés à l'air libre, puis repris avec 2 ml d'eau chaude. La solution est partagée entre deux tubes à essai. La présence de coumarines est manifestée après ajout dans l'un des tubes de 0,5 ml de

NH<sub>4</sub>OH à 25 % et observation de la fluorescence sous UV 366 nm. Une fluorescence bleue intense dans le tube où il a été ajouté de l'ammoniaque indique la présence de coumarines.

## **V. EXTRACTION DE LA GLOBULARINE DES FEUILLES DE *Globularia alypum* L.**

### **V.I. Extractions**

Les extractions sont faites sur les feuilles. Une quantité de matière végétale sèche broyée, est mise dans un ballon, à laquelle, nous avons ajouté un mélange d'acétone – eau (60-40%). Le tout est mis à reflux et ceci en mettant au dessus du ballon, un réfrigérant. L'extrait obtenu est filtré. Cette extraction est refaite deux fois au marc pour épuiser la matière végétale.

Après avoir éliminé l'acétone, sous vide, nous avons fait une série d'extraction liquide - liquide sur la phase aqueuse, en utilisant plusieurs solvants à polarité croissante (l'heptane, l'éther et l'acétate d'éthyle). Ceci est fait dans une ampoule à décanter. Afin d'épuiser la phase aqueuse, l'extraction liquide – liquide est refaite trois fois pour chaque solvant. Après l'extraction à l'acétate d'éthyle, l'eau de la phase aqueuse est éliminée. Nous avons récupéré un extrait solide. Ce dernier est épuisé par le méthanol (infusion à température ambiante), nous avons récupéré une fraction solide après filtration et évaporation du méthanol. A la fin, il restait un solide non soluble dans le méthanol. Les détails de cette extraction sont donnés sous forme de schéma (figure 1).

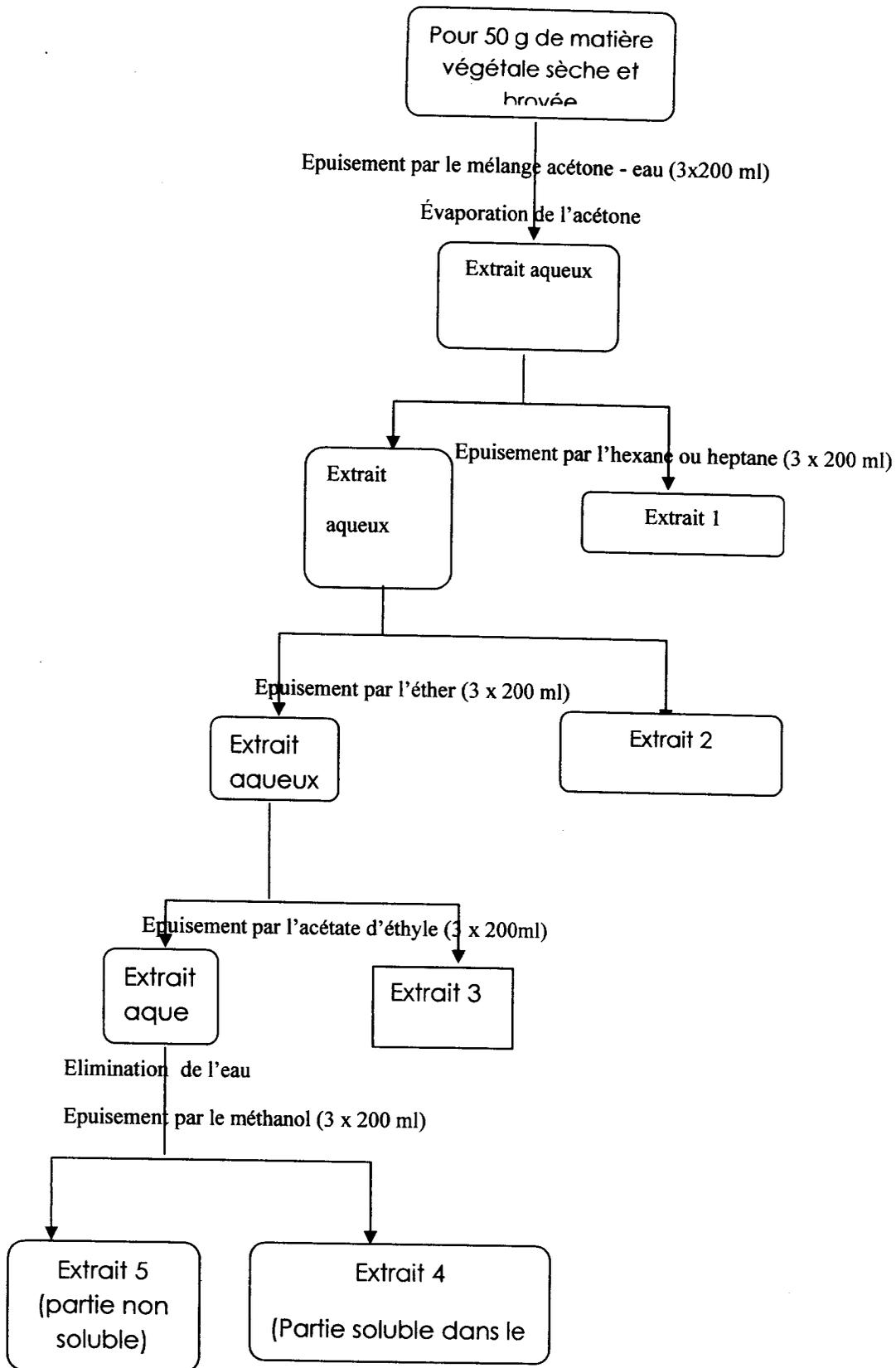


Figure 1 : schéma décrivant les différentes étapes de l'extraction à reflux et des extractions liquide - liquide.

Nous désignons par :

**Extrait 1** : extrait à l'heptane;

**Extrait 2** : extrait à l'éther ;

**Extrait 3** : extrait à l'acétate d'éthyle ;

**Extrait 4** : extrait au méthanol (à froid) ;

**Extrait 5** : extrait non soluble dans le méthanol.

## **V.2. Fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Globularia alypum* L. et isollements de la globularine**

Les extraits à l'acétate d'éthyle ont subi des chromatographies sur colonne en utilisant la silice. L'éluant utilisé pour 2.52 gramme d'extrait est un mélange d'acétate d'éthyle (A.E) et de méthanol (MeOH) : 100 ml A.E, 100 ml A.E – MeOH (98 – 2), 100 ml A.E – MeOH (95 – 5), 400 ml A.E – MeOH (90 – 10), 100 ml A.E – MeOH (85 – 15), 200 ml A.E – MeOH (80 – 20), 100 ml A.E – MeOH (75 – 25), 200 ml A.E – MeOH (50 – 50). Nous avons regroupé les fractions en fonction de leurs Rf après analyse par CCM. Le Rf est le facteur de rétention.

## **VI. Hémisynthèse de la globularine**

Après l'extraction et l'identification de la globularine ( identifiée par CCM à un produit déjà isolé de *Globularia alypum* et caractérisé par RMN, IR, SM, UV, et Analyse Élémentaire) , notre intérêt est portée sur la réalisation des modifications chimiques sur la structure de cette molécule.

Dans la majorité des cas, les molécules d'origine naturelles sont douées d'activités thérapeutiques précieuses. Mais l'inconvénient majeur à leur développement, à être comme un candidat médicamenteux. Ceci est dû à leur toxicité, une mauvaise biodisponibilité dans l'organisme ou bien, des activités non ciblées ce qui engendre de graves conséquences. Pour cela, l'apport des modifications structurales, à titre exemple, substitué un groupe, réduire un autre, ou bien effectuer des ouvertures de cycles, s'il en existe. Ces modifications améliorent en générale ces inconvénients. Les molécules qui en résultent d'une telle opération sont qualifiées d'hémisynthèse.

Il est à noter, que de telles procédés sont d'immense utilité à grande échelle, ceci est en raison du gain du temps, de l'argent, et la réduction sur le nombre de réactions.

### VI.1. Acétylation de la globularine

Dans un ballon de 100 ml, on a introduit 500 mg de la globularine dans une solution, de pyridine (2 ml)/anhydride acétique (3ml), le mélange ainsi obtenu a été agité à température ambiante pendant 48h. La réaction d'acétylation, a été suivie par chromatographie sur couche mince CCM. A la fin de la réaction, 30 ml d'eau glacée est ajouté au milieu réactionnel. Nous avons obtenu, un solide blanc (AC1) en suspension dans le mélange réactionnel et un autre solide jaune pâle (AC2) collé à la paroi du ballon. Le solide AC1 est filtré. Pour éliminer la pyridine, nous avons lavé les deux solides par une solution aqueuse de  $\text{CuSO}_4$  à 2%. Ensuite le solide AC2 est récupéré dans le chloroforme, et il a subit des extractions liquides – liquides avec l'eau (3 x 50 ml de chloroforme). Le solvant organique a été éliminé par évaporation [3,4].

## VII. Activités biologiques

### VII.1. Mode opératoire de l'activité hypoglycémiant

#### a) Induction du diabète expérimental

Un diabète expérimental a été provoqué chez des rats à jeûne (16 heures) mâles et femelles par unique injection intra péritonéale de la streptozotocine (Fluka,  $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_7$ ) à une dose de 65mg/kg qui est préparée, juste avant l'administration, dans un tampon citrate (0.01M, pH 4.5). Le tampon citrate (5ml/kg) a été injecté aux rats témoins.

#### b) Etude aiguë de l'activité antidiabétique de la globularine

Des rats diabétiques ont été soumis à un jeûne de 16 heures. Le poids des rats a été déterminé le jour même de l'expérience, avant l'administration des substances à tester. Ces dernières ont été administrées par voie intra péritonéale (injection unique). Trois groupes de rats (5 rats par groupe) ont été utilisés.

**Groupe 1 :** Rats diabétiques (témoins) + sérum physiologique à 0.9%, (5ml/kg).

**Groupe 2 :** Rats diabétiques + la globularine 30mg/kg.

**Groupe 3 :** Diabétiques contrôle positif ; glibenclamide 5mg/kg.

Le sang a été prélevé à partir de l'extrémité de la queue à 0 min (avant l'injection) et à 30, 60, 120 et 180 mn (après injection).

La glycémie a été mesurée directement après prélèvement par des bandelettes Accu Chek active et lecteur glycémie Accu Chek.

### c) Test de tolérance au glucose chez des rats normaux

Un test de tolérance au glucose a été réalisé sur 2 groupes de rats normaux glycémiant. Après un jeûne de 16 heures, les rats ont été chargés d'une solution de glucose (2g/kg), après 90 min, nous avons effectué les administrations des molécules suivantes ; NaCl (0.9% ; 5ml/kg) et la globularine (30 mg/kg).

Un échantillon de sang a été collecté de l'extrémité de la queue à 0 min (avant gavage) et à 30, 60, 90, 120,180 min après gavage. La glycémie est mesurée par lecteur glycémie Accu Chek.

## VII.2. Mode opératoire de l'activité antimicrobienne

### a) Provenance des germes

Les souches pathogènes utilisées sont indiquées dans le tableau 1. Elles sont celles qui causent les maladies courantes (infections urinaires, broncho-pulmonaires, cutanées, digestives...) causées par les bactéries.

Tableau 1: Provenance des germes étudiés

Souches utilisées	Origine
<b>Bactéries à GRAM (-) :</b>  <i>Pseudomonas aeruginosa (Pa)</i>  <i>Escherichia coli (Ec)</i>	Souches pures fournies par l'institut Pasteur de Paris (IPP)
<b>Bactéries à GRAM (+) :</b>  <i>Staphylococcus aureus (St)</i>	

**b) Choix des antibiotiques**

La disponibilité des souches a été testée vis-à-vis un antibiotique, ceci en fonction de ceux utilisés au laboratoire de microbiologie à l'hôpital de Tlemcen, et aussi en fonction de leur disponibilité (tableau 2)

**Tableau 2 : L'antibiotique (ATB) utilisé.**

Groupe microbien	ATB	Sigle
Bactéries	Gentamicine	GT

**IX. 3. Méthode utilisée**

La méthode utilisée est celle de la diffusion des ATB sur gélose ou méthode des disques. Cette méthode se base sur la diffusion de l'extrait testé dans la gélose. Elle consiste à déposer à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé par la suspension de germes choisis, des disques de papier filtres imprégnés des produits à tester [5] :

- Préparation de l'inoculum : On a préparé une culture de 24 heures à 37°C, de bactéries à tester sur gélose nutritive, après 24 heures d'incubation, On a pris 4 à 5 colonies et les mettre dans 5 ml de bouillon nutritif ;
- On a mesuré la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre à  $\lambda = 625 \text{ nm}$ , La valeur affichée doit être comprise dans l'intervalle [0.08 – 0.1], ce qui correspondra à une concentration en bactéries de  $10^8 \text{ U.F.C / ml}$  ;
- On a fait une dilution de 1/100 dans l'eau physiologique à 0.9%. Ce qui donnera une concentration en bactéries finale de  $10^6 \text{ U.F.C / ml}$  ;
- Ensemencement de la gélose Mueller-Hinton (MH) par inondation, l'excès du liquide est aspiré et la surface de la gélose est laissée sécher 15 à 20 minutes à  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  ;
- Préparation des disques : les disques sont préparés à partir du papier filtre (6 mm de diamètre). Ces derniers sont imprégnés des produits à raison de 10  $\mu\text{l}$  pour les différents produits, ensuite séchés;

- A l'aide d'un distributeur de disques, on place sur la surface de la gélose Mueller – Hinton (MH) préalablement ensemencée, les différents disques d'ATB choisis. Les boîtes ont été laissées durant 20 minutes à la température ambiante pour permettre une bonne diffusion de l'ATB. Elles ont été ensuite incubées à  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 18 à 24 heures. La lecture a été faite par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour du disque.

**Remarques :**

Les produits sont solubilisés dans le DMSO.

Inactif : diamètre  $d \leq 6$  mm ;

Activité moyenne :  $6 < d \leq 12$  mm ;

Activité modérée :  $12 < d \leq 20$  mm ;

Bonne activité :  $d > 20$  mm.

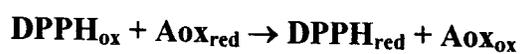


**VII.3. Mode opératoire du pouvoir antioxydant**

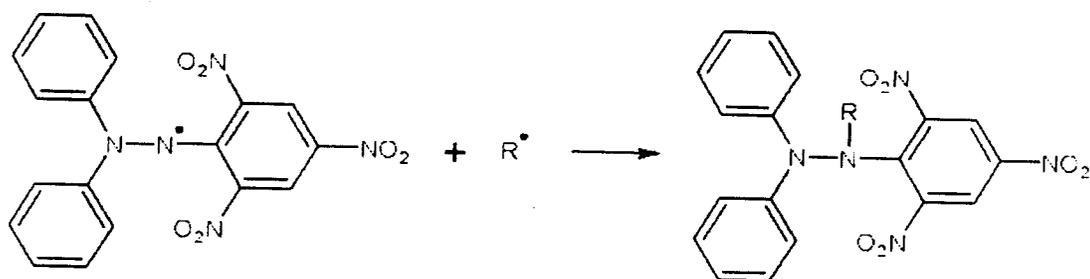
Les antioxydants radicalaires permettent l'interruption de la chaîne autocatalytique :  $\text{AH} + \text{R}^\bullet \rightarrow \text{A}^\bullet + \text{RH}$ . La molécule AH est antioxydante si le radical formé  $\text{A}^\bullet$  est plus stable. La stabilité du radical  $\text{A}^\bullet$  peut s'expliquer par sa conservation en composés non radicalaires :  $\text{A}^\bullet + \text{A}^\bullet \rightarrow \text{A-A}$  ou  $\text{A}^\bullet + \text{R}^\bullet \rightarrow \text{A-R}$

Pour détecter l'activité antiradicalaire dans notre laboratoire, nous utilisons le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), un radical stable, violet en solution et présentant un maximum d'absorption caractéristique à 517 nm. Le protocole appliqué en routine repose sur la disparition de ce maximum lorsque le DPPH est réduit par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration.

La mesure de l'efficacité d'un antioxydant (capacité à fixer les radicaux libres, donc arrêter la propagation de la réaction en chaîne : oxydation) se fait en mesurant la diminution de la coloration violette, due à une recombinaison des radicaux DPPH.



Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) de couleur violette, vire au jaune, en présence de capteurs de radicaux libres, et se réduit en 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazine.



La disparition de la couleur violette aura lieu à 517 nm [6-13].

**Manipulation :** Nous avons préparé une solution de DPPH dans le DMSO (5.5 mg / 25 ml). 1 ml (0.22 mg de DPPH) de cette solution est ajouté à 0.1 mg d'extrait préalablement solubilisé dans le DMSO, le mélange est complété à 5 ml par le DMSO. Le mélange est fortement agité. Ensuite, ce dernier est laissé incubé pendant 30 mn dans l'obscurité à température ambiante. Après incubation, l'absorbance est mesurée à 517 nm (plusieurs mesures d'absorbance ont été faites afin d'avoir une valeur moyenne). Par ailleurs, un essai à blanc a été effectué, c'est-à-dire 1 ml de la solution de DPPH (5.5 mg/25 ml) est dilué 5 fois pour obtenir 5 ml, ensuite nous avons mesuré l'absorbance à 517 nm : c'est une solution de contrôle de DPPH. Le pourcentage du DPPH réduit est donné par la relation :

$$\% \text{ DPPH}_{\text{réduit}} = [(AC - AE)/AC] \times 100$$

AC : absorbance de contrôle ; AE : absorbance de l'extrait.

L'acide ascorbique et l'acide tannique sont utilisés comme composés de référence.

**Remarques :**

Pouvoir antioxydant faible : % DPPH réduit < 50% ;

Pouvoir antioxydant modéré :  $50 \leq \% \text{ DPPH}_{\text{réduit}} \leq 70\%$  ;

Pouvoir antioxydant fort : % DPPH réduit  $\geq 70\%$ .

## Références bibliographiques

- [1] **J. Bruneton.**  
Eléments de phytochimie et de pharmacognosie. Technique et Documentation Lavoisier. Paris. 1987.
- [2] **M. N. Diarra.**  
Etude phytochimique d'une plante antipaludique utilisée au Mali : *spilanthus oleracea* Jacq. (*Asteraceae*), Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université de Bamako, 2003.
- [3] **Julien Ferrari.**  
Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles : *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich. Thèse de doctorat, Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne, 2002.
- [4] **R. K. Chaudhuri and O. Slicher.**  
New iridoïd glucosides and a lignan diglucoside from *Globularia alypum* L. *Helvetica Chimica Acta*. 1981; Vol. 64; 1 (1); 3-15.
- [5] **Tentaoui – Elaraki, A. A. Errifi, B. Bendjillali and N. Lallaoui.**  
Antimicrobial activity of four chemically different essential oils. *Rivista Italiana EPPOS*. 1992; 6; 20 - 24.
- [6] **Suaib Luqman et al.**  
Antioxidant potential of the root of *Vetiveria zizanioides* L. Nash, *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, February 2009, Vol. 46; 122-125.
- [7] **N. E. Es Safi et al.**  
Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum* L. Structure – activity relationship. *LWT-Food Science and Technology*. 2007; 40 (7); 1246-1252.

Antimicrobial and free radical scavenging activities of some *Lamium* species from Turkey, Nacette pe University, *Journal of the Faculty of pharmacie*, January 2007, Vol. 27, N° 1; 11-22.

[9] Hashem F.A. et al.

Free Radical scavenging activity of the flavonoids isolated from *Tecama Radicans*, *Journal of Basic and Applied*, 2007, Vol. 3, N°1.

[10] U. Sebnem Harput et al.

Secondary metabolite from *Phlomis syriaca* and their antioxidant activities, *Turk. J. Chem.*, 2006, 30; 383-390.

[11] Patricia Middleton et al.

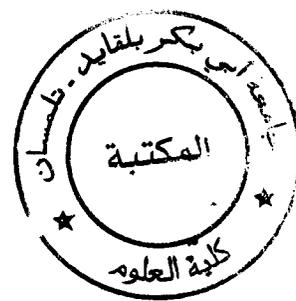
Antioxydant activities and general toxicity of *Alnus glutinosa*, *Fraxinus excelsior* and *Papaver rhoeas*, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2005, 2; 81-86.

[12] Masafumi Okawa et al.

DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants, *Biol. Pharm. Bull.*, 2001, 24, 10 ; 1202-1205.

[13] Y. Rolland.

Antioxydants naturels végétaux, Burgundy Botanical Extracts, [research@burgundy-extracts.com](mailto:research@burgundy-extracts.com), p: 530 - 535



# CHAPITRE 6

## RESULTATS



## I. TESTS PHYTOCHIMIQUES

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la partie étudiée de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés.

### Taux d'humidité :

a)- les fleurs = 0.59 %.

b)- les feuilles = 0.56 %.

Les résultats des examens phytochimiques obtenus sur les différents organes de la plante sont résumés dans le tableau 1.

**Tableau 1 : Les Résultats des tests phytochimiques faits sur les fleurs de *Globularia alypum*.**

Famille	Résultats du test
Flavonoïdes	+++
cyanidine	+
Leucoanthocyanes	-
Tanins	++
Tanins catéchiques	+
Tanins galliques	+
Composés réducteurs	+++
Saponosides	-
Alcaloïdes	++
Stérols et terpènes	+
Coumarines	+

- : absence ;

++ : présence en quantité moyenne ;

+ : présence en faible quantité ;

+++ : présence en forte quantité

L'analyse de ces résultats expérimentaux nous conduit aux conclusions suivantes :

- Les flavonoïdes, les tanins, coumarines, les stérols, alcaloïdes, composés réducteurs et cyanidine sont présents dans les fleurs en quantité variable.

Les leucoanthocyanes et les saponosides sont absents dans les fleurs de *Globularia alypum*.

## II. EXTRACTION - PURIFICATION

### II.1. Rendements d'extractions

Les rendements en pourcentage des extractions liquide - liquide faites sur les feuilles de *Globularia alypum L.*, sont donnés dans le tableau 2.

**Tableau 2: les rendements d'extractions.**

	Extrait heptane	Extrait l'éther	Extrait l'acétate d'éthyle
Rendement (%)	0.22	0.37	4,56
Aspect physique	pâte jaune	pâte verte	solide jaune

### Rendements d'extractions au méthanol

Les rendements des extraits issus de l'extraction solide - liquide sont donnés dans le tableau 3.

**Tableau 3: les rendements d'extractions.**

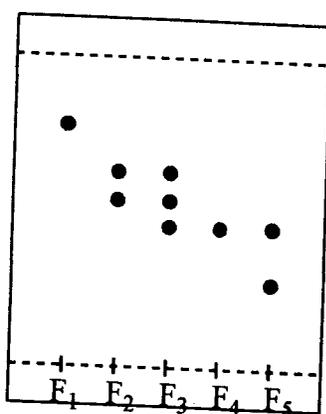
	Extrait méthanol	Extrait aqueux
Rendement (%)	1.69	12.93
Aspect physique	Solide marron	Solide marron foncé

### II.2. Fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Globularia alypum L.* et isolements de la globularine

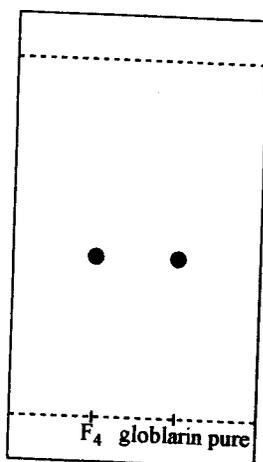
Nous avons regroupé les fractions en fonction de leurs  $R_f$  après analyse par CCM. Nous avons obtenu 05 fractions (tableau 4, figure1).

Tableau 4 : Fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Globularia alypum L.*

Fractions	Poids (g)	Observa en CCM	facteur de rétention $R_f$
F1	0.12	1 tache	0.87
F2	0.19	2 taches	0.54 ; 0.63
F3	0.22	3 taches	0.63; 0.5; 0.45
F4	1.71	1 tache	0.45
F5	0.36	2 taches	0.27 ; 0.45



a)



b)

Figure 1 : Les fractions obtenues de la chromatographies sur colonne

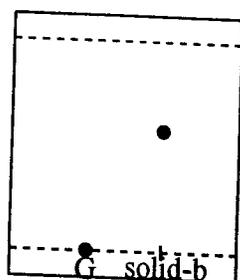


La CCM a montré que la fraction  $F_4$  de masse 1.71 g correspond à une mono tache qui correspondait à la *Globularine*

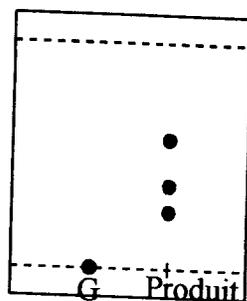
Cette chromatographie sur colonne nous a permis de calculer un rendement en globularine = 3.09%.

### III. ACÉTYLATION DE LA GLOBULARINE

Après acétylation de la globularine (G : 500 mg), nous avons obtenu deux produits : AC1 (40 mg) et AC2 (620 mg). D'après les résultats de CCM, AC1 correspond à une seule tache, Par contre AC2, correspond à trois taches (figure 2).



a) AC1



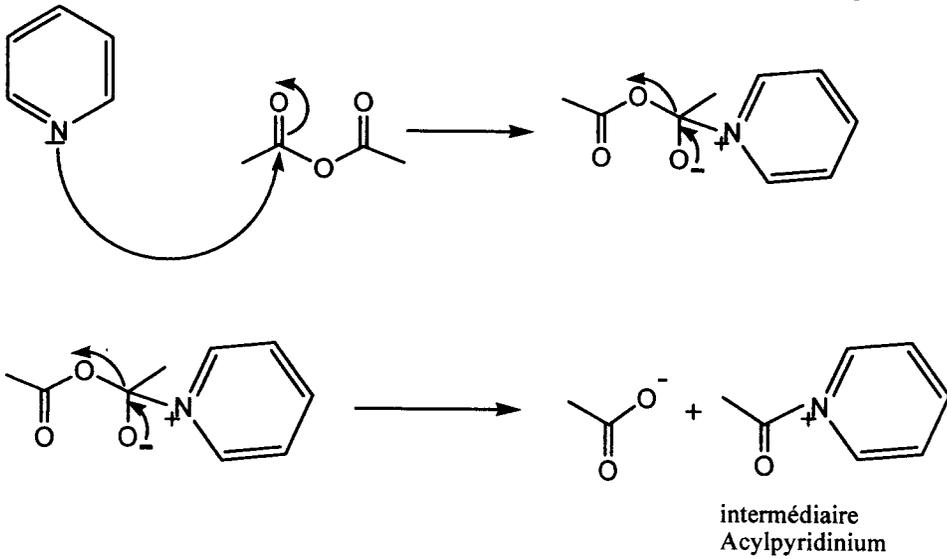
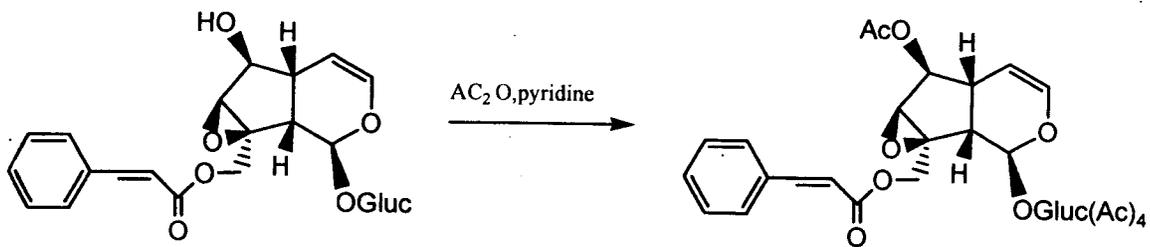
b) AC2

Figure 2 : Plaques CCM des produits obtenus par acétylation

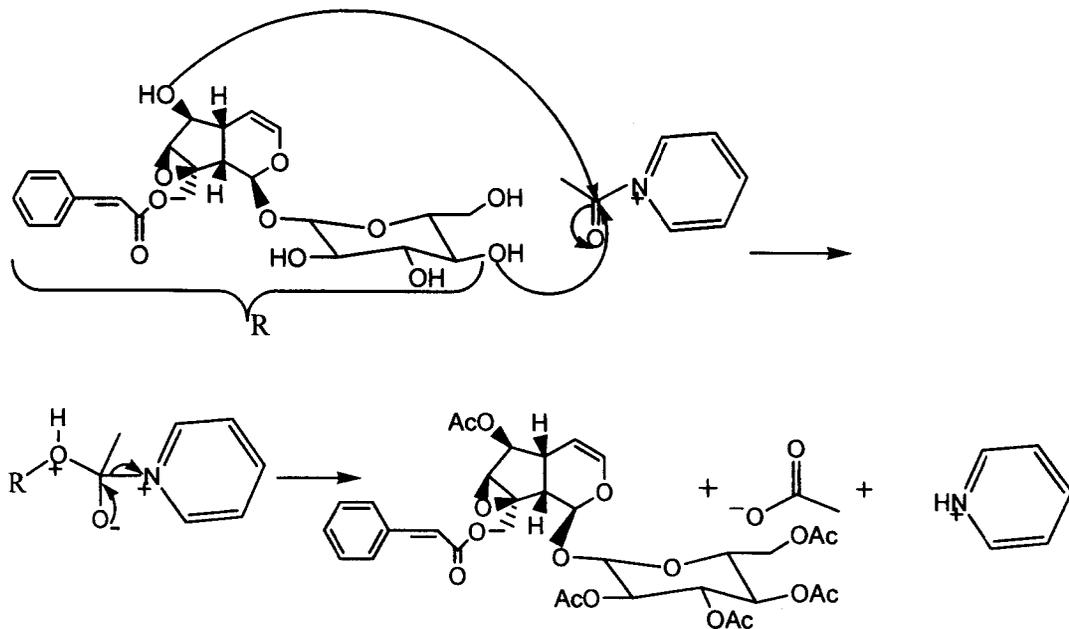
Le premier produit de AC2 (moins polaire) correspond à AC1.

#### III.1 Produit AC1 :

D'après la comparaison des spectres I.R de AC1 et G, nous pouvons conclure que AC1 est le penta acétate globularine (reste à confirmer par les résultats de la RMN). Dans le spectre LR de AC1, la bande correspondante au groupement OH a disparu (changement de H par le groupe acétyle  $\text{CH}_3\text{CO}$ ). Alors, nous proposons le mécanisme suivant :



L'intermédiaire acétylpyridinium est plus électrophile vis à vis de l'alcool que l'anhydride acétique car il possède une charge positive.



La pyridine est utilisée comme promoteur lors de la réaction d'acétylation où il forme un complexe acétylpyridinium avec l'anhydride acétique. Cette espèce est beaucoup plus réactive que l'anhydride acétique seul. La pyridine est également utilisé afin de neutraliser l'acide acétique formé in situ pendant la réaction.

AC2 est riche en AC1, nous avons essayé de faire une chromatographie sur colonne du produit AC2, mais nous avons obtenu que des fractions.

### III.2. Caractéristiques des deux produits

Ces caractéristiques sont données dans le tableau 5.

**Tableau 5 : Caractéristiques des produits AC1 et AC2.**

Produits	AC1	AC2
Aspect physique	Solide blanc	Solide jaune
Rendement (%)	5.61	86.96
Point de fusion (°C)	129	65
$\lambda_{max}$ (DMSO)	289.5 nm, 296.5 nm	290.0 nm, 299.5 nm

## IV. ACTIVITE BIOLOGIQUE

### IV.1. Activité hypoglycémiante

Les résultats de cette étude sont représentés dans les tableaux 6, 7 et figures 3, 4.

**Tableau 6 : Résultats de l'étude en aiguë de l'activité antidiabétique de la globularine**

Temps (mn)	0	30	60	120	180
La glycémie (g/l) des rats diabétiques témoins	3.11	4.13	3.63	3.39	3.01
La glycémie (g/l) des rats diabétiques traités par la globularine	1.38	2.14	2.12	2.19	2.18
La glycémie (g/l) des rats diabétiques traités par glibenclamide	2.75	2.90	2.70	1.90	1.70

**Tableau 7 : Résultats du test de tolérance au glucose chez des rats normaux**

Temps (mn)	0	30	60	120	180
La glycémie (g/l) des rats normaux témoins	0.83	1.59	1.10	0.93	0.96
La glycémie (g/l) des normaux traités par la globularine	0.84	1.38	1.36	1.36	1.03

D'après ces résultats, nous remarquons que la globularine injectée à une dose de 30 mg/Kg, aux rats ayant un diabète modéré, possède une activité modérée.

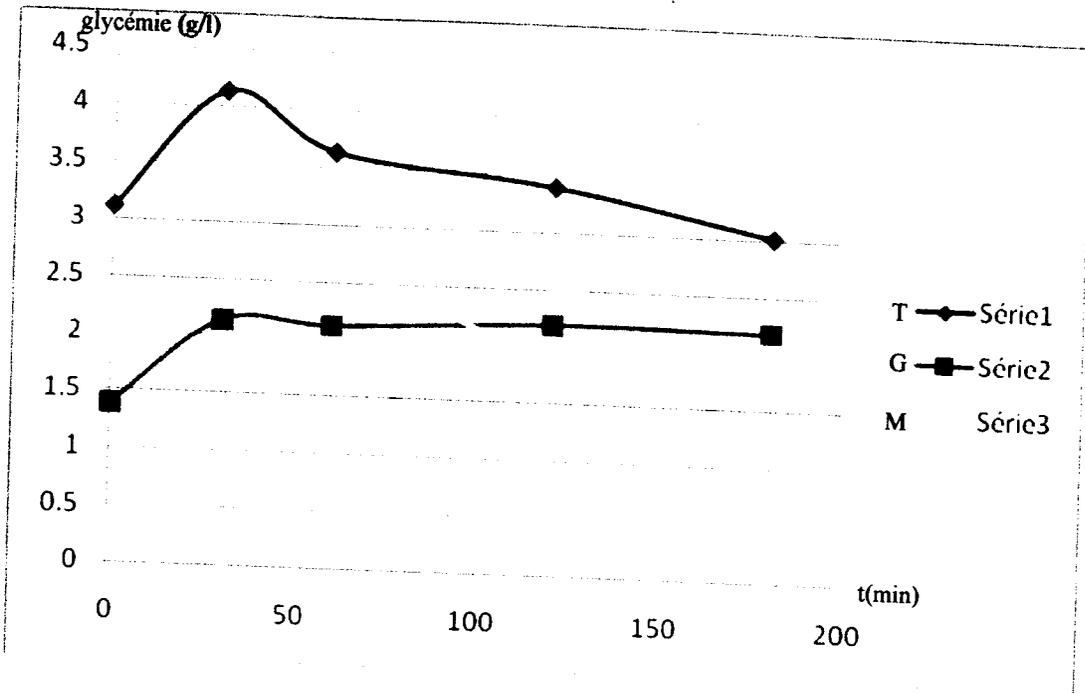


Figure 3 : Etude en aiguë de l'activité antidiabétique de la globularine

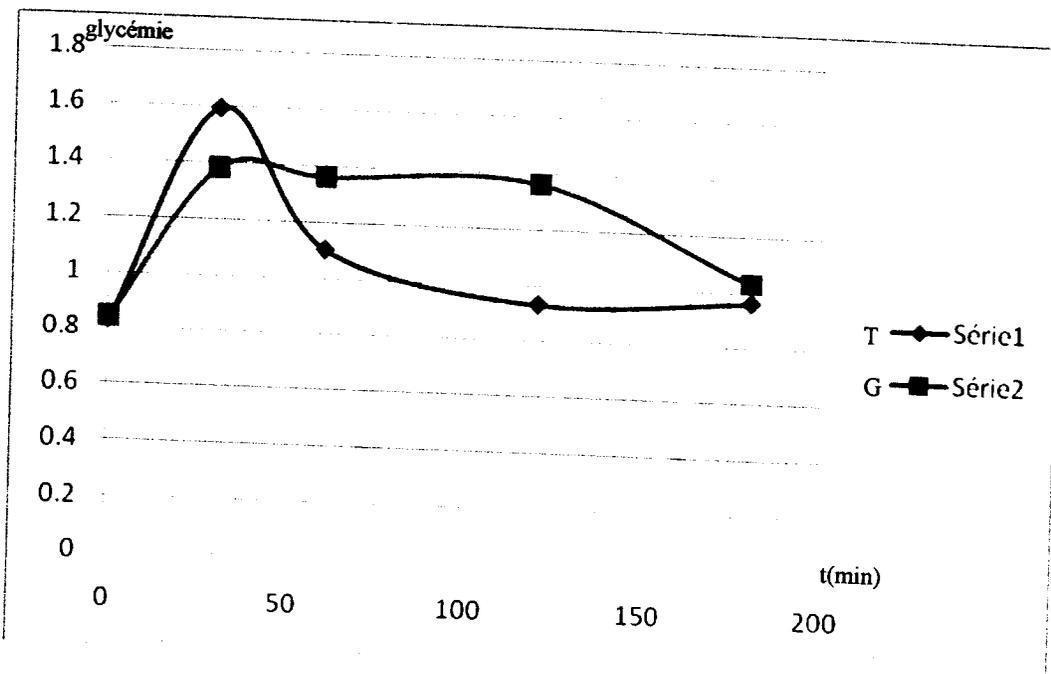


Figure 4 : Test de tolérance au glucose chez des rats normaux

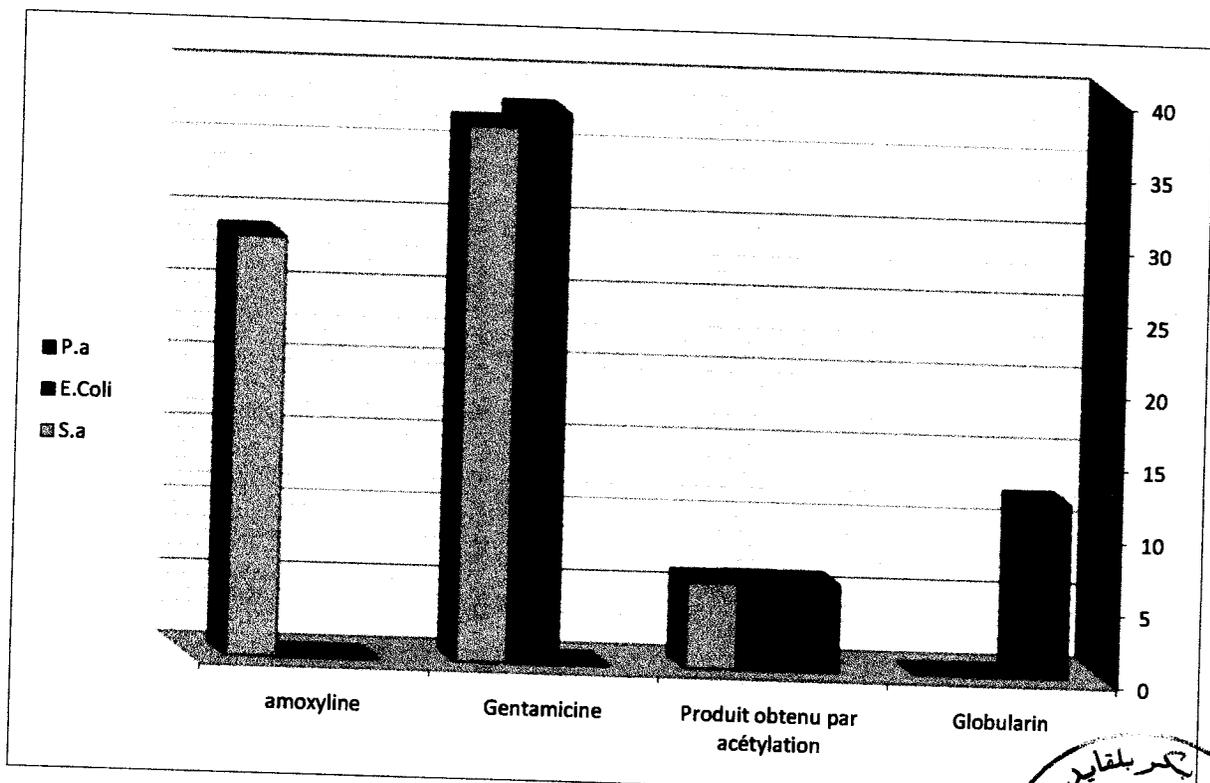
#### IV.2. Activité antimicrobienne

Les résultats de cette étude sont représentés dans le tableau 8 et la figure 5.

**Tableau 8 : Antibiogramme : diamètre (mm) des zones d'inhibition des différentes souches.**

Produits – concentrations	Pa.	Ec.	Sa.
Globularine (20 mg/ml)	12	0	0
AC1 (20 mg/ml)	6	6	6
GT (100 µg/disque)	n .d	38	37
Amox (25 µg/disque)	n.d	0	29

n .d : non déterminée



**Figure 5 : Histogrammes représentant les résultats de l'activité antibactérienne**

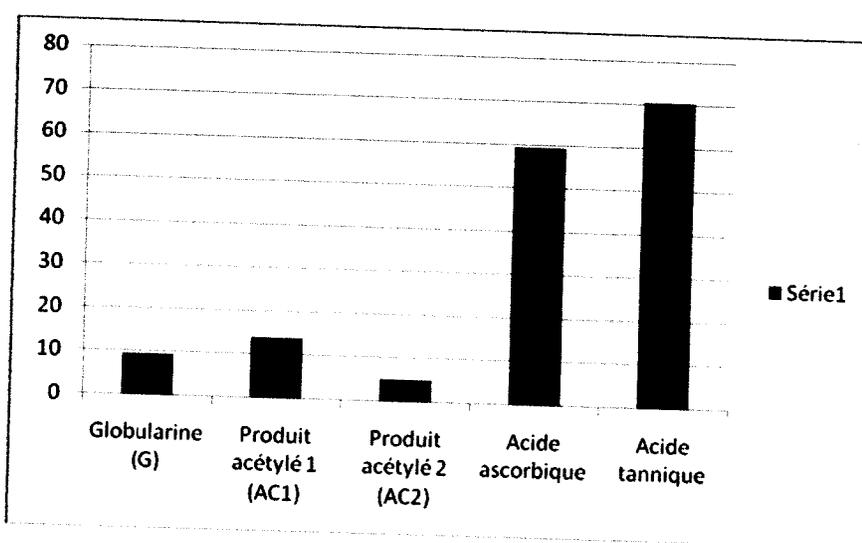
D'après ces résultats, nous remarquons que la réaction d'acétylation n'a pas amélioré l'activité antibactérienne de la globularine vis-à-vis des bactéries étudiées.

### IV.3 Pouvoir antioxydant

Les résultats de cette étude sont représentés dans le tableau 9 et figure 6.

**Tableau 9: Pourcentage de DPPH réduits.**

Produits	% DPPH réduit
Globularine (G)	9.48
Produit acétylé 1 (AC1)	13.68
Produit acétylé 2 (AC2)	5.00
Acide ascorbique	59.21
Acide tannique	70.29



**Figure 6 : Histogramme donnant les Pourcentages de DPPH réduits**

D'après ces résultats, nous remarquons que le produit AC1 améliore légèrement le pouvoir antioxydant de la globularine. Par ailleurs, G, AC1, AC2 possèdent un faible pouvoir antioxydant par comparaison à ceux de l'acide ascorbique et l'acide tannique.

## CONCLUSION



Ce mémoire, s'inscrit dans le cadre de la recherche des molécules bioactives, et l'étude de leurs réactivités. Pour atteindre nos objectifs, dans un premier temps, notre attention s'est portée sur l'étude phytochimique des fleurs de *globularia alypum L.*

Dans un second temps, nous avons pu isoler le métabolite secondaire majoritaire des feuilles de la plante (la globularine) par des extractions et les méthodes chromatographiques.

Ainsi l'étude de sa réactivité, dans un processus d'acétylation qui est une réaction classique fort répandue dans la littérature, mais originale vis-à-vis le produit isolé. Ce choix n'est pas fait au hasard, mais dans l'intérêt d'améliorer les activités hypoglycémiantes, antioxydante et antimicrobienne de ce composé.

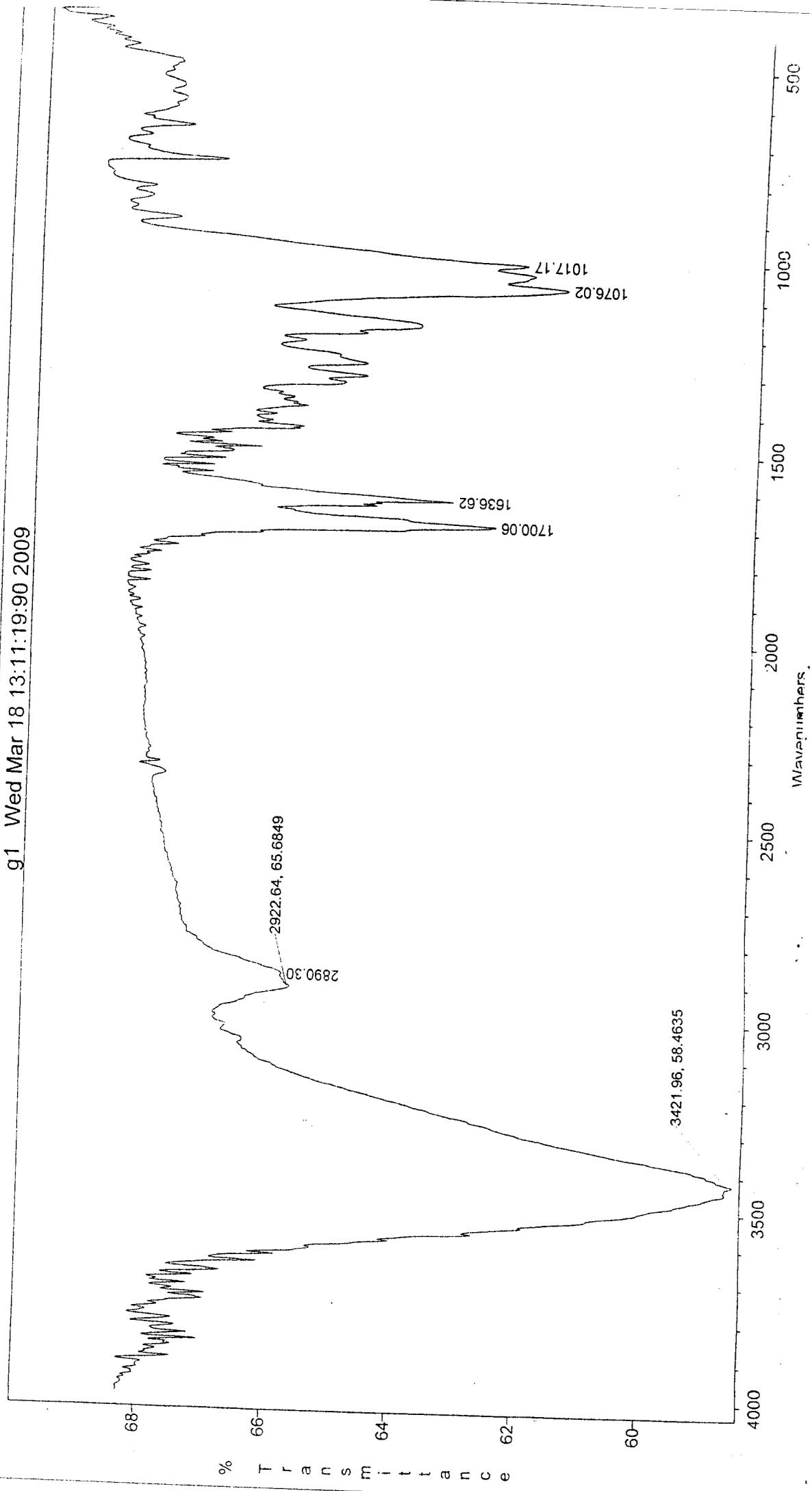
La méthodologie de purification de la globularine, et le produit d'acétylation a été essentiellement fondée sur la combinaison de différentes méthodes chromatographiques et par analyse Infra Rouge. La globularine a été identifiée par rapport à un échantillon de globularine déjà isolé des feuilles de *Globularia alypum*, identifié par les méthodes spectroscopiques.

Dans la partie biologique de notre travail, nous avons étudié les activités hypoglycémiantes, antibactérienne et antioxydante. La globularine possède une activité hypoglycémiantes modérée à une dose de 30 mg/ Kg pour des rats ayant un diabète modéré. Concernant l'activité antibactérienne, l'acétylation n'a pas amélioré l'activité antibactérienne de la globularine vis-à-vis les souches étudiées. Quand au pouvoir antioxydant de la globularine est légèrement amélioré.

En définitif, ce travail s'il fixe des résultats certains, ouvre des perspectives et des pistes de recherches telles que :

- ◆ L'étude de la réactivité de la globularine, en faisant d'autres types de réaction.
- ◆ L'étude de l'activité hypoglycémiantes du produit d'acétylation.

g1 Wed Mar 18 13:11:19:90 2009



r2 Tue Apr 21 16:45:47:07 2009

